

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

**Estudos dos mecanismos de resistência de genótipos de algodão
submetidos à diferentes condições bióticas e abióticas**

Erika Thalyta Veras Pereira*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

***Bolsista CNPq**

São Carlos-SP
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Erika Thalyta Veras Pereira, realizada em 16/12/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior (UNESP)

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento (UNESP)

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes (FFCLRP/USP)

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

**Ao meu pai,
Oswaldo Veras Pereira (*in memoriam*).**

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me proporcionar todas as coisas, ser minha constância quando tudo mais é frágil e passageiro e por vezes fazer o que eu não era capaz.

A minha família por ser cuidado e carinho. Ao meu pai (*in memoriam*), por ser a alegria em cada pequena conquista; a minha irmã, por ser a mulher mais forte que eu conheço; a minha mãe, por toda dedicação e amor; ao meu cunhado, pelo cuidado e companheirismo com nossa família, e a minha sobrinha, por nos lembrar que tudo se renova. Amo vocês, tanto e sempre!

Ao meu marido, que é um exemplo de pessoa e profissional, que em vários momentos foi meu apoio emocional e acadêmico e por me instigar a novos desafios.

A Max Rodrigues pelas conversas divertidas, devaneios bem aleatórios e risadas. A Iza Storch por não desistir de mim e por ser a melhor companhia mesmo quando alguém não quer companhia. A Tauani Zampieri que é cuidado e troca, é carinho e inspiração.

Ao Prof. Moacir Rossi Forim por abrir as portas do laboratório para mim, não medir esforço para dar condições financeiras para realização da pesquisa e por toda orientação. Aos colegas do grupo, em especial a Ana Felizatti pela troca de experiências.

Aos prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior e Dr. Carlos Alessandro de Freitas pela parceria no cultivo do algodão e compartilhar lagartas e conhecimento. O trabalho não seria possível sem a colaboração de vocês. Muitíssimo obrigada!

Como um ciclo se encerra não poderia deixar de agradecer as minhas orientadoras de mestrado, Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, e Iniciação científica, Profa. Dra. Mariana Helena Chaves e Dra. Ruth Raquel Farias, por me ajudar a construir minha vida acadêmica e por serem modelo para o que ainda quero desenvolver.

Aos professores do Departamento de química da UFSCar, por todos os ensinamentos, e todos os outros funcionários que tornam possível o funcionamento da universidade.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e aos demais órgãos, CAPES e FAPESP, que fomentam o ensino e a pesquisa no DQ-UFSCar.

Lista de TABELAS

TABELA 1.1 - Compostos voláteis de <i>Gossipium</i> sp relatados na literatura.	9
TABELA 1.2 – Compostos não voláteis de <i>Gossipium</i> sp relatados na literatura.	12
TABELA: 4.1: Genótipos de algodão estudados, origem e histórico de resistência dos genótipos. Adaptado de FREITAS (2019).	29
TABELA 4.2 - Experimento fatorial para otimização da extração 2 para GC-MS.	34
TABELA 4.3 - Condições cromatográficas do GC-MS.	35
TABELA 4.4- Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial.	36
TABELA 4.5-Planejamento fatorial para otimização da metodologia de extração.	37
TABELA 4.6 - Método cromatográfico para análise das folhas de algodão em cromatografia líquida.	38
TABELA 4.7 - Condições de análise para o espectrômetro de massas do UPLC-QTOF-MS	39
TABELA 5.1 - Identificação das substâncias das folhas de algodão analisadas por GC-MS e comparação das duas metodologias de preparo de amostra estudadas.	45
TABELA 5.2 – Monitoramento de picos analisados por GC-MS em diferentes tempos após a derivatização.	49
TABELA 5.3 - Dados de recuperação nos níveis baixo, médio e alto dos padrões daidzeína e narigenina na matriz vegetal.	58
TABELA 5.4– Níveis de confiança de identificação dos compostos.	59
TABELA 5.5 – Identificação dos metabólitos das folhas de algodão analisadas por UPLC-QTof-MS.	62
TABELA 5.6 - Compostos diferenciais entre amostra controle e injúria dos genótipos BRS 286, BRS 335 e BRS 336 identificados por GC-MS.	81
TABELA 5.7 – Variação de rutina e quercetina-hexose em experimentos com FMT 701.	137

TABELA 5.8 – Variação de jasmonato de metila, ácido jasmônico e jasmolona analisados por UPLC-QToF-MS nos experimentos com o genótipo Delta Opal. 140

TABELA 5.9 – Variação de jasmonato de metila, ácido jasmônico e jasmolona analisados por UPLC-QToF-MS nos experimentos com o genótipo FMT 701. 140

Lista de FIGURAS

FIGURA 1.1 - Modelo de reconhecimento químico vegetal associado a herbívoros.	2
FIGURA 1.2 - Lagarta <i>Spodoptera cosmioides</i> .	6
FIGURA 1.3 - Algodoeiro, <i>S. cosmioides</i> se alimentando de folhas de algodão e folha de algodão após herbivoria por <i>S. cosmioides</i>	7
FIGURA 5.1 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC Waters (Acquity UPLC H-Class System) dos extratos de algodão com diferentes metodologias para secagem da amostra.	42
FIGURA 5.2 - Cromatograma obtido por análise de GC-MS das folhas de algodão, metodologia de derivatização direta das folhas.	43
FIGURA 5.3 - Cromatograma obtido por análise de GC-MS das folhas de algodão, metodologia de extração com CHCl ₃ /MeOH seguida de derivatização.	44
FIGURA 5.4 - Cromatograma comparativo da análise por GC-MS das folhas de algodão metodologia de extração direta (preto) e extração seguida de derivatização (rosa).	44
FIGURA 5.5 - Comparação do perfil químico das folhas de algodão por GC-MS nos tempos 0h, 3h, 6h e 12h após a derivatização.	49
FIGURA 5.6 - Perfil químico comparativo das folhas de algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 7 e 11.	51
FIGURA 5.7 - Perfil químico comparativo das folhas de algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 1 e 5 da metodologia de extração.	52
FIGURA 5.8 - Perfil químico comparativo das folhas de algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 3 e 7 da metodologia de extração.	52
FIGURA 5.9 - Perfil químico comparativo das folhas de algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 1 e 3 da metodologia de extração.	53
FIGURA 5.10 - Perfil químico comparativo das folhas de algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 2 e 4 da metodologia de extração.	54
FIGURA 5.11 - Perfil químico das folhas de algodão em UPLC-DAD-MS (Waters) - experimento 3 - nos comprimentos de onda 254nm, 310nm e 280nm.	55
FIGURA 5.12 - Curvas de calibração do padrão daidzeína e narigenina.	57
FIGURA 5.13 - Cromatograma modo positivo (a) e negativo (b) das folhas de algodão analisadas por UPLC Qtof MS.	61

FIGURA 5.14 - Análise dos Componentes principais dos dados do perfil metabolômico dos doze genótipos de algodão analisados por GC-MS. (a) Gráfico dos escores PC1 x PC2 x PC3 e (b) Gráfico dos scores PC1 x PC2	68
FIGURA 5.15 - Análise dos Componentes principais dos dados do perfil metabolômico dos doze genótipos de algodão analisados por UPLC-QToF-MS. (a) Gráfico dos escores PC1 x PC2 x PC3 e (b) Gráfico dos scores PC1 x PC2	69
FIGURA 5.16 - Dendograma dos perfis químicos das folhas de 12 genótipos de algodão analisados por GC-MS.	71
FIGURA 5.17 - Dendograma dos componentes voláteis das folhas de 12 genótipos de algodão analisados por GC-MS.	72
FIGURA 5.18 - Dendograma dos perfis químicos das folhas de 12 genótipos de algodão analisados por UPLC-QToF-MS.	72
FIGURA 5.19 - Análise dos Componentes principais dos dados do perfil metabolômico dos doze genótipos de algodão, genótipo controle (bolinha) e genótipo submetido a herbivoria por <i>S. cosmioides</i> (triângulo) analisados por GC-MS. (a) Gráfico dos escores PC1 x PC2 x PC3 e (b) Gráfico dos scores PC1 x PC2	75
FIGURA 5.20 - Análise dos Componentes principais dos dados do perfil metabolômico dos doze genótipos de algodão, genótipo controle (bolinha) e genótipo submetido a herbivoria por <i>S. cosmioides</i> (triângulo) analisados por UPLC-QToF-MS. (a) Gráfico dos escores PC1 x PC2 x PC3 e (b) Gráfico dos scores PC1 x PC2	76
FIGURA 5.21 - Gráfico dos scores de PC1 <i>versus</i> PC2, para os dados de GC-MS do genótipo BRS 286.	78
FIGURA 5.22 - Gráfico dos scores de PC1 <i>versus</i> PC2, para os dados de UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 286.	78
FIGURA 5.23 - Gráfico de volcano para os dados de GC-MS das amostras BRS 286 <i>versus</i> BRS 286 In	79
FIGURA 5.24 - Compostos diferenciais entre genótipo e genótipo submetido a herbivoria, genótipos BRS 286, BRS 335 e BRS 336.	83
FIGURA 5.25 - Porção aglicona dos flavonoides anotados.	84
FIGURA 5.26 - Espectros de massas dos conjugados de kaempferol. (a) kaempferol-hexose-pentose e (b) kaempferol-hexose.	85
FIGURA 5.27 - Espectros de massas dos conjugados de quercetina. (a) quercetina-hexose, (b) quercetina-2hexose e (c) quercetina-pentose	86
FIGURA 5.28 - Diagrama de Venn com os dados da análise por UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 226 <i>versus</i> BRS 286 sob indução de herbivoria por <i>S. cosmioides</i> .	87

FIGURA 5.29 - Espectro de massas obtido na análise de BRS 286 In por UPLC-QToF-MS indicando o composto cis-jasmona.	88
FIGURA 5.30 - Perfil químico do genótipo BRS 286 (preto) e BRS 286 In (azul) analisados por UPLC-QToF-MS	89
FIGURA 5.31 - Gráfico dos scores de PC1 <i>versus</i> PC2, para os dados de GC-MS do genótipo BRS 335.	90
FIGURA 5.32 - Gráfico dos scores de PC1 <i>versus</i> PC2, para os dados de UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 335.	91
FIGURA 5.33 - Gráfico de vulcano para os dados de GC-MS das amostras BRS 335 <i>versus</i> BRS 335 In.	91
FIGURA 5.34 - Gráfico de vulcano para os dados de UPLC-QToF-MS das amostras BRS 335 In <i>versus</i> BRS 335.	93
FIGURA 5.35 - Espectro de massa do composto anotado como hidroxadenina apontado como <i>up-regulation</i> no BRS 335 In.	93
FIGURA 5.36 - Espectro de massas do composto anotado como Kaempferol-pentose.	94
FIGURA 5.37 - Espectro de massas do composto anotado como 4- metil liquiritigenina-7-ramnosídeo.	94
FIGURA 5.38 - Espectro de massas do ácido <i>p</i> -cumárico obtido por UPLC-QToF-MS.	95
FIGURA 5.39 - Perfil químico comparativo entre o genótipo BRS 335 e o genótipo BRS 335 submetido a herbivoria por <i>S. cosmioides</i> .	96
FIGURA 5.40 - Gráfico dos scores de PC1 <i>versus</i> PC2, para os dados de GC-MS do genótipo BRS 336.	97
FIGURA 5.41 - Gráfico dos scores de PC1 <i>versus</i> PC2, para os dados de UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 336.	98
FIGURA 5.42 - Gráfico de vulcano para os dados de GC-MS das amostras BRS 336 In <i>versus</i> BRS 336.	98
FIGURA 5.43 - Estrutura da heliotrina (C ₁₆ H ₂₇ NO ₅).	99
FIGURA 5.44 - (a) Cromatograma e (b) espectro de massas comparativos do composto anotado como heliotrina nas amostras BRS 336 (preto) e BRS 336 In (laranja).	100
FIGURA 5.45 - Espectro de massas das bandas cromatográficas em 9,53 min e 9,60 min, substâncias não identificadas.	101
FIGURA 5. 46 - Perfil químico comparativo do genótipo BRS 336 e BRS 336 In obtido por UPLC-QToF-MS	102

FIGURA 5.47 - Perfil químico dos genótipos Delta Opal e FMT 701 por GC-MS.	104
FIGURA 5.48 - Perfil químico dos genótipos Delta Opal e FMT 701 por UPLC-QToF-MS.	105
FIGURA 5.49 - PCA dos metabólitos dos genótipos FMT e DO analisados por GC-MS.	105
FIGURA 5.50 - PCA dos metabólitos dos genótipos FTM e DO analisados por UPLC-QToF-MS.	106
FIGURA 5.51 - Gráficos de escores PC1 vs PC2 do genótipo DO Controle e os tratamentos de indução de resistência	108
FIGURA 5.52 - Gráfico de Volcano para as amostras de DO Controle <i>versus</i> tratamentos com adição de jasmonato de metila.	110
FIGURA 5.53 - Gráficos de Volcano de DO Controle <i>versus</i> tratamentos submetidos a herbivoria.	111
FIGURA 5.54 - Gráfico de Volcano DO Controle <i>versus</i> DO Hídrico	112
FIGURA 5.55 – Variação do Mio-inositol isômero 1 (preto) e 2 (roxo) nos diferentes tratamentos.	113
FIGURA 5.56 - Gráficos dos escores de PC1 <i>versus</i> PC2 dos experimentos de FMT 701	114
FIGURA 5.57 - Gráfico de Volcano FMT Controle <i>versus</i> FMT 200S.	115
FIGURA 5.58 - Gráfico de Volcano FMT Controle <i>versus</i> FMT 200P.	116
FIGURA 5.59 - Gráficos de volcano FMT Controle <i>versus</i> FMT Herb e FMT Herb 200S.	117
FIGURA 5.60 - Variações do capesterol (amarelo), glicerol (vinho) e NI 50.51 min nos experimentos de FMT.	119
FIGURA 5.61 - Espectro de massa da banda cromatográfica em 41.42 min.	120
FIGURA 5.62 - Variação do composto em 41.52 minutos nos experimentos com Delta Opal e FMT 701.	120
FIGURA 5.63 - Rota de biossíntese de formação do ácido jasmônico a partir do ácido linolênico.	122
FIGURA 5.64 - Variação do ácido linoleico nos diferentes tratamentos com o genótipo Delta Opal.	123
FIGURA 5.65 - Variação do ácido linolênico nos diferentes tratamentos com o genótipo Delta Opal.	123

FIGURA 5.66 - Variação do ácido linoleico nos diferentes tratamentos com o genótipo FMT 701.	124
FIGURA 5.67 - Variação do ácido linolênico nos diferentes tratamentos com o genótipo FMT 701.	124
FIGURA 5.68 - PCA 3D e PCA 2D (PC1 X PC2) dos experimentos de indução de resistência com o genótipo Delta Opal.	125
FIGURA 5.69 - Diagrama de Venn dos potenciais metabolitos dos experimentos DO Controle, DO 20S e DO 200S.	126
FIGURA 5.70 - Diagrama de Venn dos potenciais metabolitos dos experimentos DO Controle, DO 20S e DO 200S.	127
FIGURA 5.71 - Diagrama de Venn dos potenciais metabolitos dos experimentos DO Controle, DO 20S e DO 200S.	128
FIGURA 5.72 - Perfil cromatográfico de DO Herb e DO Herb 200S obtido por UPLC-QToF-MS.	129
FIGURA 5.73 - Diagrama de Venn dos potenciais metabólitos de DO Controle e DO Hid	129
FIGURA 5.74 - PCA 3D e PCA 2D (PC1 X PC2) dos experimentos de indução de resistência com o genótipo FMT 701.	130
FIGURA 5.75 - Dendograma obtido para os experimentos com o genótipo FMT 701 com o método de agrupamento Ward.	131
FIGURA 5.76 - Diagrama de Venn e Gráfico de Volcano para FMT Hid versus FMT Controle	132
FIGURA 5.77 - Diagrama de Venn com os potenciais metabólitos de FMT Controle e experimentos com adição de metil jasmonato exógeno.	134
FIGURA 5.78 - Área foliar consumida (cm ²) por lagartas de 3 ^o instar de <i>Spodoptera cosmioides</i> em diferentes tratamentos de indução de resistência em cultivares de algodão.	135
FIGURA 5.79 - Índice de atratividade (IA) por lagartas de 3 ^o instar de <i>Spodoptera cosmioides</i> em diferentes tratamentos para indução de resistência em cultivares de algodão.	135
FIGURA 5.80 - Diagrama de Venn com os potenciais metabólitos de FMT Controle, FMT Herb e FMT Herb 200S.	136
FIGURA 5.81 - Estrutura das substâncias monitoradas nos experimentos com DO e FMT.	138

ESTUDOS DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE ALGODÃO SUBMETIDOS À DIFERENTES CONDIÇÕES BIÓTICAS E ABIÓTICAS. O algodão é um cultivar de grande interesse econômico, movimentando mundialmente cerca de 17 bilhões de dólares por ano. A oferta de algodão é marcada por diversos fatores interligados como sinais de mercado, aspectos climáticos e pressões de praga. O complexo *Spodoptera* está entre as principais pragas da cotonicultura, sendo interesse econômico o seu controle. Assim, este trabalho se propõe a investigar as respostas de defesa de diferentes genótipos de algodão e comparar o perfil químico dos mesmos quando submetidos a diferentes fatores de indução de resistência, contribuindo assim para o desenvolvimento de propostas e políticas de manejo agrícola sustentável de controle de insetos praga. Doze genótipos de algodão foram estudados, comparando seu perfil químico quando submetido à herbivoria por *Spodoptera cosmioides*. Os genótipos FMT 701 e Delta Opal foram submetidos a seis tratamentos de indução de resistência: aplicação da solução de jasmonato de metila ao solo na concentração de 20 μmolL^{-1} e 200 μmolL^{-1} , aplicação por pulverização de jasmonato de metila nas folhas na concentração de 200 μmolL^{-1} , herbivoria por *S. cosmioides*, herbivoria por *S. cosmioides* mais aplicação de jasmonato de metila (200 μmolL^{-1}) no solo e estresse por déficit hídrico. As metodologias de análise por GC-MS e UPLC-QToF-MS foram desenvolvidas, otimizadas e validadas. Todos os genótipos apresentaram resposta de defesa a nível metabólico quando submetidos a herbivoria. Os genótipos BRS 335 e BRS 336 apresentam perfis metabólicos similares, bem como os cultivares Delta Opal e BRS 293. Compostos como α -tocoferol, ácido-*p*-cumárico, 1-linoleoilglicerol, 2-monopalmitina, campesterol e heliotrina foram alguns dos metabólitos associados a resposta de defesa dos genótipos a herbivoria. A aplicação de jasmonato de metila exógena nos genótipos Delta Opal e FMT 701 mostrou-se mais efetiva quando realizada por pulverização nas folhas. Não foi identificado acúmulo de jasmonato de metila nos experimentos de aplicação exógena do composto, mas houve modificação do perfil metabolômico, ou seja, a aplicação de jasmonato de metila não causa seu acúmulo, mas induz mudanças no perfil metabolômico dos genótipos. Observou-se uma correlação positiva entre a adição de jasmonato de metila e o acúmulo de ácido linolênico, ácido linoleico e ácido jasmônico em Delta Opal e FMT 701, esses compostos são conhecidos por sinalizarem respostas de defesa em plantas. Os cultivares Delta Opal e FMT 701 não responderam metabolicamente ao estresse hídrico. Pode-se concluir que o mecanismo de defesa do algodão engloba diferentes metabólitos de diferentes rotas e nenhuma substância isoladamente é responsável pela defesa da planta.

Palavras-chave: Metabolômica, *Spodoptera cosmioides*, Delta Opal, FMT 701, metabólitos de defesa.

STUDIES OF RESISTANCE MECHANISMS OF COTTON GENOTYPES SUBMITTED TO DIFFERENT BIOTIC AND ABIOTIC CONDITIONS. Cotton is a cultivar of economic interest, with a worldwide turnover around 17 billion dollars per year. Its supply is marked by several interconnected factors such as market signals, climatic aspects and pest pressures. The *Spodoptera* complex is among the main pests of cotton plantations, and its control has economic interest. Thus, this work proposes to investigate the defense responses of different cotton genotypes and compare their chemical profile when subjected to different resistance inducing factors, thus contributing to the development of proposals and policies for sustainable agricultural management to control pest insects. Twelve cotton genotypes were studied, by comparing their chemical profile when subjected to herbivory by *Spodoptera cosmioides*. The FMT 701 and Delta Opal genotypes were submitted to six resistance induction treatments: application of methyl jasmonate solution on the soil at concentrations of 20 μmolL^{-1} and 200 μmolL^{-1} , application by spraying methyl jasmonate on the leaves at a concentration of 200 μmolL^{-1} , herbivory by *S. cosmioides*, herbivory by *S. cosmioides* and application of methyl jasmonate (200 μmolL^{-1}) in the soil, and water deficit stress. GC-MS and UPLC-QToF-MS analysis methodologies were developed, optimized and validated. Compounds such as α -tocopherol, p-coumaric acid, 1-linoleoylglycerol, 2-monopalmitin, campesterol and heliothrin were identified as metabolites associated to the defense response of genotypes to herbivory. The exogenous application of methyl jasmonate to Delta Opal and FMT 701 genotypes was more effective when sprayed on leaves. No accumulation of methyl jasmonate was identified in the experiments of exogenous application, but there was a change in the metabolomic profile, that is, the application of methyl jasmonate does not cause its accumulation but induces changes in the metabolism of the genotypes. A positive correlation was observed between the addition of methyl jasmonate and the accumulation of linolenic acid, linoleic acid and jasmonic acid in Delta Opal and FMT 701, and these compounds are already known as signal defense responses in plants. The Delta Opal and FMT 701 cultivars did not respond metabolically to water stress. It can be concluded that the cotton defense mechanism encompasses different metabolites from different routes and no single substance is responsible for the plant's defense.

Keywords: Metabolomics, *Spodoptera cosmioides*, Delta Opal, FMT 701, defense metabolites.

Sumário

1 - Introdução.....	1
2 - Revisão bibliográfica	4
2.1 - Algodão.....	4
2.2 - <i>Spodoptera cosmioides</i>	5
2.3 - Melhoramento genético e identificação de metabólitos do algodão.....	7
2.4 - Ácido jasmônico.....	21
2.5 - Metabolômica.....	22
3 - Objetivos.....	27
3.1 - Objetivo Geral.....	27
3.2 - Objetivos específicos.....	27
4 - Materiais e métodos.....	28
4.1 - Cultivo de <i>Gossypium</i> sp.....	28
4.2 - Insetos utilizados para herbivoria.....	29
4.3 - Experimentos de cultivo de <i>Gossypium</i> sp.....	29
4.3.1 - Experimento com os genótipos.....	29
4.3.2 - Experimento de resistência induzida por herbivoria....	30
4.3.3 - Experimento de Resistência induzida por fatores bióticos e abióticos.....	30
4.4 – Análise metabolômica.....	32
4.4.1 - Estudo da secagem do material vegetal.....	32
4.4.2 - Métodos de análise.....	32
4.4.2.1 – GC-MS.....	32
4.4.2.1.1 - Equipamento.....	32
4.4.2.1.2 - Extração.....	33
4.4.2.1.3 - Otimização cromatográfica.....	34
4.4.2.1.4 - Análise dos dados.....	35
4.4.2.2 - UPLC-QToF-MS.....	35
4.4.2.2.1 – Equipamento.....	35
4.4.2.2.2- Extração.....	35

4.4.2.2.3 - Otimização cromatográfica.....	38
4.4.2.2.4 - Estudos de desempenho analítico.....	39
4.4.2.2.5 - Análise dos dados.....	40
4.4.3 - Análise multivariada.....	40
5 - Resultados e discussão.....	41
5.1 - Análise metabolômica.....	41
5.1.1 - Secagem do material vegetal.....	41
5.1.2 - Análise por GC-MS.....	42
5.1.2.1 - Estabilidade da análise.....	48
5.1.3 - Análise por UPLC-QToF-MS.....	50
5.1.3.1 - Extração do material vegetal.....	50
5.1.3.2 - Estudo dos parâmetros de desempenho analítico..	56
5.1.3.3 - Identificação dos metabólitos.....	59
5.2 - Resistência constitutiva.....	66
5.3 - Resistência induzida por herbivoria com <i>Spodoptera</i> <i>cosmioides</i>	74
5.4 - Resistência induzida por fatores bióticos e abióticos.....	102
5.4.1 - Análise por GC-MS.....	106
5.4.2 - Análise por UPLC-QToF-MS.....	124
5.4.2.1 – Delta Opal.....	124
5.4.2.2 – FMT 701.....	129
5.4.3 - Fitormônios e substância de defesa.....	136
6 – Conclusão.....	140
Referências bibliográficas.....	142
Apêndice.....	155
Apêndice A.....	155
Apêndice B.....	155
Apêndice C.....	162
Apêndice D.....	172

1 - Introdução

As plantas interagem com diferentes organismos em seu habitat, algumas dessas interações podem causar prejuízo e assim as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa que englobam arranjos estruturais e mecanismos bioquímicos. Por exemplo, contra pragas e patógenos destaca-se a produção de fitoalexinas, metabólitos secundários com extensa atividade contra patógenos e utilizados como marcadores de resistência a doenças; e os fitormônios, metabólitos que modulam os mecanismos bioquímicos e fisiológicos e regulam diferentes respostas da planta (AHUJA et al., 2012; SHARMA et al., 2019; TAIZ et al., 2017).

Os mecanismos de defesa bioquímicos estão divididos em *i*) respostas de defesa constitutivas (RDCs), são os mecanismos de defesa sempre presentes que incluem a grande maioria dos metabólitos secundários que podem ser específicos para grupos taxonômicos e atuarem como compostos de estocagem conjugados (reduzindo a toxicidade), ou ainda como precursores ativos, sendo facilmente ativados em caso de injúria; e *ii*) respostas de defesas induzidas (RDIs), este tipo de mecanismo inicia-se somente após dano, por exemplo a herbivoria, com a ativação de genes e expressão proteica, ocasionando a produção de metabólitos secundários de defesa de maneira quase imediata (TAIZ et al., 2017).

Para uma resposta eficiente de defesa, a planta requer sistemas sensíveis de percepção que detectem e neutralizem os agentes causadores de danos, sendo os insetos uma das maiores ameaças devido a herbivoria. Assim, as plantas desenvolveram mecanismos de reconhecimento a ameaça de herbivoria baseados nos hábitos comportamentais desses animais como o toque, a oviposição e a alimentação (HILKER e MEINERS, 2010)

O inseto ao pousar e caminhar sobre a folha exerce pressão sobre ela, o que pode feri-la, ou mesmo secretar substâncias. Consequentemente, as plantas respondem a esses fatores quimicamente (FIGURA 1.1) (HILKER e MEINERS, 2016; FORTERRE et al., 2005).

A oviposição de insetos herbívoros, também acarreta resposta de defesa pela planta denominada de HIT - *Imunidade Induzida por HAMPs (Padrões moleculares*

associados a Herbivoria) -podendo gerar necrose programada e/ou produção de substâncias que inibam a eclosão das larvas, dessecação ou desprendimento do ovo (HILKER e FATOUROS, 2016).

A herbivoria, ao quebrar a integridade do tecido vegetal, desencadeia vários mecanismos de resistência, são eles: 1) *Resistência Induzida por Injúrias* (WIR), iniciada quando os *Receptores de Reconhecimento Padrão* identificam os *Padrões Moleculares Associados aos Danos* (DAMPs), no caso os danos físicos a planta; e 2) HIT, que se inicia pelo reconhecimento de substâncias liberadas pelo herbívoro durante a alimentação, os HAMPs (*Padrões Moleculares Associados a Herbívoros*) (ERB et al., 2012).

Além disso, os herbívoros podem produzir eliciadores (ou elicitores), que inibem a produção dos padrões moleculares como forma de contradefesa as plantas. Estas, por sua vez, podem responder diretamente aos elicitores por ETI - Imunidade Ativada por Efeitor- (ERB et al., 2012).

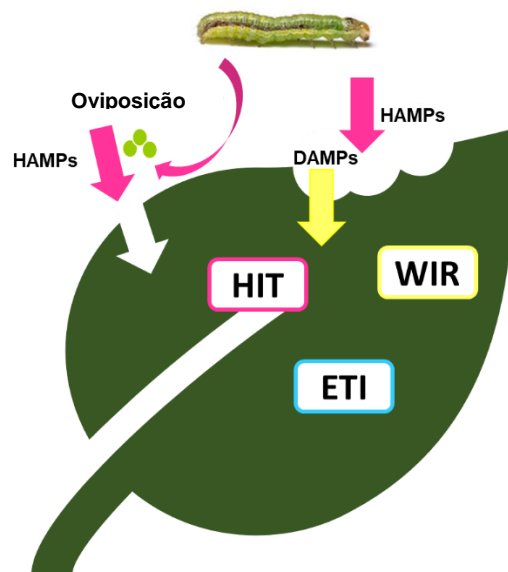


FIGURA 1.1 - Modelo de reconhecimento químico vegetal associado a herbívoros. Adaptado de ERB et al., 2012. **HAMPs**: Padrões moleculares associados a Herbivoria; **DAMPs**: Padrões Moleculares Associados aos Danos; **HIT**: Imunidade Induzida por HAMPs; **WIR**: Resistência Induzida por Injúrias; **ETI**: Imunidade Ativada por Efeitor.

Esse jogo de defesa/contra-defesa/defesa se constitui uma corrida a sobrevivência do herbívoro e da planta. Desta forma, esses organismos desenvolvem mecanismos complexos de resistência. Nas plantas, os mecanismos bioquímicos representam um grande papel na defesa com ativação de rotas biossintéticas por precursores químicos, para produção de fitormônios e fitoalexinas (AHUJA et al., 2012; SHARMA et al., 2019).

Diversos trabalhos na literatura demonstram a ação dos fitormônios na indução de produção de uma extensa quantidade de metabólitos secundários que agem como substâncias de defesa. Como exemplo de fitormônios destacam-se ácido salicílico, etileno, auxina, ácido abscísico, giberelinas, citocininas, brassinosteroides e o ácido jasmônico e seus derivados (ERB et al., 2012). As fitoalexinas são substâncias de defesa contra patógenos e a estresses físicos e químicos, como a camalexina na família Brassicaceae (PEDRAS e YAYA, 2010), medicarpinas na família Fabaceae, kauralexinas na família Poaceae, entre outras (AHUJA et al., 2012; PEDRAS et al., 2006). Embora muitas fitoalexinas já tenham sido identificadas, ainda há muitas espécies e cultivares não caracterizados, e muitos mecanismos de ação ainda não elucidados (AHUJA et al., 2012).

Compreender os mecanismos de defesa das plantas, como os insetos se adaptam e contornam essas defesas e as substâncias envolvidas nesses mecanismos é fundamental na busca de controles biorracionais de pragas e patógenos.

Os metabólitos são os pontos finais das vias moleculares resultantes das alterações de outras -ômicas (proteômica e transcriptômica). Portanto, o metaboloma define o fenótipo individual, em contraste com a transcriptoma e proteoma (DJANDE et al., 2020). Deste modo, estudos metabolômicos são uma importante ferramenta na construção de hipóteses que buscam compreender a resposta de um organismo a processos biológicos normais e a estresses e estímulos bióticos e abióticos.

Algumas plantas possuem seu arsenal defensivo bem conhecido. No entanto, a eficácia e os mecanismos e metabolitos de defesa ainda permanecem pouco caracterizados para o algodão. O intuito desse trabalho é avaliar as respostas de defesa constitutivas e induzidas do algodão frente a estresse biótico e abiótico.

2 - Revisão bibliográfica

2.1 - Algodão

A família Malvaceae possui 200 gêneros e diversos representantes de valor econômico como o quiabo (*Abelmoschus spp.*), os hibiscos e malvaviscos (gêneros *Hibiscus* e *Malvaviscus*), o cacau (*Theobroma spp.*) e o algodão (*Gossypium spp.*). O gênero *Gossypium* possui aproximadamente 50 espécies, 4 delas encontradas no Brasil: o *Gossypium barbadense* L., *Gossypium herbaceum* L. e *Gossypium hirsutum* L. não endêmicas, mas naturalizadas e cultivadas para uso na agricultura ou para ornamentação, e a *Gossypium mustelinum* Miers como nativa na região nordeste (FERNANDES-JÚNIOR, 2022).

A importância econômica do cultivo de algodão (*Gossypium sp.*) pode ser representada pelo seu cultivo em todo os continentes e em aproximadamente 100 países e uma movimentação de aproximadamente 17 bilhões de dólares por ano (ABRAPA, 2018). O Brasil juntamente com Índia, Estados Unidos, China e Paquistão são os cinco maiores produtores mundiais de algodão. De acordo com a CONAB, o Brasil foi responsável por 6% da produção mundial de algodão em pluma nos anos-safra 2006/07 a 2016/17, ocupando a 5ª posição como produtor mundial, e no mesmo período de anos-safra foi responsável por 7,85% do total de algodão em pluma exportada no mundo (OLIVEIRA NETO, 2016). Na safra de 2019/20, ocupou a quarta posição do ranking mundial de produtores de algodão e a segunda posição em exportação, posição que manteve na safra de 21/22 sendo responsável por 23% do total de exportação de algodão em pluma, ficando atrás apenas dos EUA. No Brasil, o algodão é plantado principalmente no centro oeste e nordeste do país, com os estados de Mato Grosso e Bahia como os maiores produtores nacionais (VATS, 2022; ICAC, 2021).

Além do uso da pluma na indústria têxtil, outras subpartes são aproveitadas pelas indústrias. A fibrilha é empregada na fabricação de especialidades têxteis como feltro, tapete, pano de chão, pavio, gaze, pelúcia, veludo, fita e bordado; o caroço pode ser transformado em óleo, línter e farelo, que são utilizados nas indústrias farmacêutica, química e de alimentos, papel e celulose, adubos, ração animal e biodiesel; e mais recentemente o uso do algodão como matéria-prima biodegradável na produção de

moveis e artigos para casa ganhou espaço no mercado biossustentável. Ao incluir o ciclo de produção de matéria-prima, consumo e descarte consciente, o algodão se incorpora no conceito emergente de Economia circular (ABRAPA, 2018).

O consumo de algodão cresce 3% ao ano e em média tem-se plantado cerca de 30 milhões de hectares para atender a demanda mundial. No entanto, a oferta de algodão é marcada por diversos fatores interligados como sinais de mercado, políticas e ações estatais, climáticos e pressões de pragas que não são facilmente previstos e/ou contornados (ICAC, 2021).

2.2 - *Spodoptera cosmioides*

A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) estima que anualmente até 40% da produção agrícola global de cultivares de interesse comercial é perdida por pragas, sendo os insetos responsáveis por custos de pelo menos 70 bilhões de dólares ao ano (FAO, 2021). *Lygus hesperus* (BARMAN e PARAJULEE, 2013) e Hemiptera: Pentatomidae (MEDRANO et al., 2011) são alguns dos insetos pragas de algodão que causam grandes danos as plantações e consequente diminuição do lucro.

No Brasil o *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro) e *Spodoptera frugiperda* são as pragas de maior impacto para a cotonicultura. O complexo *Spodoptera* spp. que inclui *Spodoptera frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* estão entre as principais pragas em vários cultivares de interesse econômico, dentre eles o milho, soja, algodão, feijão, aveia, eucalipto e maçã (MIRANDA, 2010).

Spodoptera cosmioides conhecida popularmente como lagarta-da-vagem ou lagarta-preta é responsável por perdas significativas em diversas culturas. As lagartas *S. cosmioides* possuem hábito gregário nos primeiros instars e depois se tornam solitárias; são desfolhadoras, podendo devastar lavouras inteiras logo após a emergência, mas também se alimentam perfurando botões florais, frutos e até mesmo vagens de soja quando atingem o terceiro instar. No algodão ocorrem desde a fase inicial de florescimento e durante todo o florescimento. (MIRANDA, 2010) (FIGURA 1.2 e 1.3).

SILVA e colaboradores (2017) relataram que *S. cosmioides* tem preferência alimentar e de oviposição por algodão e soja, em detrimento de milho, trigo e aveia. Além disso, o consumo do algodão pela lagarta foi maior e apresentou maior digestão e peso final das lagartas que os outros cultivares estudados. A conclusão dos autores é que *S. cosmioides* é melhor adaptada a cultura do algodão (SILVA, 2014; SILVA et al. 2017).

A fase larval da *Spodoptera cosmioides* pode durar de 13 a 28 dias, com um ciclo total ovo-adulto variando de 15 e 35 dias. Cada fêmea ovoposita entre 150 e 500 ovos e as lagartas eclodem após três a quatro dias após a oviposição, com um potencial biótico de 6.547×10^{21} indivíduos/fêmea/ano (BAVARESCO et al., 2003; SILVA et al., 2017; SPECHT e ROQUE-SPECHT, 2019). Logo, a *S. cosmioides* tem um ciclo curto que se completado produz uma nova geração numerosa e, somado ao seu hábito polífago e seu consumo alimentar, a posiciona como uma importante praga a ser controlada.



FIGURA1.2 - Lagarta *Spodoptera cosmioides*. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.



FIGURA 1.3 - Algodoeiro, *S. cosmioides* se alimentando de folhas de algodão e folha de algodão após herbivoria por *S. cosmioides* (Fonte própria da autora).

Estudos têm sido realizados visando a melhoria da resistência da planta do algodão a ação de pragas, da qualidade e da quantidade da fibra produzida, além de melhoria nas estratégias de manejo (QIN et al., 2017; SU et al., 2017; LUO et al., 2017; NEVES e PINTO 2017). Uma das estratégias que tem ganhado cada vez mais espaço é o melhoramento genético.

2.3 - Melhoramento genético e identificação de metabolitos do algodão

O controle de pragas nem sempre utiliza substâncias que mantenham a qualidade do produto ou são ecologicamente corretas. Tentando minimizar os danos causados pela herbivoria de forma biorracional, alguns estudos relatam variedades genéticas de algodão que podem se recuperar mais rápido da herbivoria, ou modificações em que as plantas possuem maior quantidade de taninos e terpenos lhes conferindo maior resistência ao ataque de insetos (SADRAS e FITTI, 1996) e (SADRAS e FITT, 1997).

Estas estratégias de melhoramento genético do algodão têm obtido sucesso no controle de pragas. O inseto-praga *Adelphocoris suturalis*, principal praga do algodão na China, é resistente a *Bacillus thuringiensis* (Algodão Bt), até então usado como controle biorracional. No trabalho de LUO e colaboradores (2017) uma linhagem de algodão transgênico foi desenvolvida ao expressar um gene na planta que inibe o gene AsFAR,

responsável pela reprodução do inseto. A nova linhagem de algodão suprimiu significativamente o desenvolvimento de populações de *A. suturalis* e são resistentes aos danos causados pela infestação dos insetos.

Considerando o cultivo de algodão no Brasil, 33 genótipos de algodão foram cultivados comercialmente na safra 2016/2017, em termos de área cultivada 88% são de cultivares resistentes simultaneamente a lagartas e herbicidas, 11% são resistentes apenas a herbicidas e apenas 1% é convencional ou não transgênico, demonstrando os avanços no melhoramento genético da planta do algodão (NEVES e PINTO 2017).

No âmbito químico, substâncias de diversas partes do algodão como flores, sementes, raiz, caule, flores e folhas estão descritas na literatura e a variedade metabólica compreende substâncias das classes dos terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos e seus análogos, taninos, cumarinas, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, dentre outros (TABELA 1.1 e 1.2) (EGBUTA et al., 2017). É sabido que tanto substâncias voláteis quanto não voláteis fazem parte do mecanismo de defesa das plantas e podem ser importantes indicadores da existência ou não de resistência a herbivoria. A TABELA 1.1 apresenta uma lista das substâncias voláteis já relatadas para o algodão e a TABELA 1.2 das substâncias não voláteis.

TABELA 1.1 - Compostos voláteis de *Gossipium* sp. relatados na literatura.

Substância identificada	Parte da planta	Referências
Acetato de Bornil	Folha	ESSIEN et al., 2011
Ácido Dehidrohumulínico	Folha	PERVEEN et al., 2001a
Ácido hexadecanoico	Folha	PERVEEN et al., 2001a
α -bergamoteno	Flor	AQUINO, 2020
	Folha	MINYARD et al., 1966
β – bisabolol	Flor	AQUINO, 2020
	Folha	MINYARD et al., 1966 ELZEN et al., 1984 OPTIZ et al., 2008
γ - bisaboleno	Flor	PERVEEN et al., 2001a
	Folha	OPTIZ et al., 2008 MINYARD et al., 1966 ELZEN et al., 1984
δ -cadineno	Flor	MINYARD et al., 1966
γ -cadineno	Folha	ESSIEN et al., 2011
Canfeno	Folha	ESSIEN et al., 2011
Cariofileno	Folha	AQUINO, 2020
γ - cariofileno	Flor	MINYARD et al., 1966
β -cariofileno	Folha	ESSIEN et al., 2011
		PERVEEN et al., 2001a
		OPTIZ et al., 2008 ELZEN et al., 1984
α -cariofileno	Folha	ESSIEN et al., 2011
		PERVEEN et al., 2001a
Ciclo propil metil cetona	Folha	PERVEEN et al., 2001a
Cis-hexanol	Folha	PERVEEN et al., 2001a

ρ -cimeno	Folha	ESSIEN et al., 2011
1,4-cineol	Folha	AQUINO, 2020
Copaeno	Flor	MINYARD et al., 1966
Espatuleno	Flor	ELZEN et al., 1984
Farneseno	Flor	AQUINO, 2020
	Folha	MINYARD et al., 1966
Gossonorol	Flor	ELZEN et al., 1984
α -guaiano	Folha	AQUINO, 2020
δ -guaiano	Flor	MINYARD et al., 1966
<i>n</i> -hexanal	Folha	AQUINO, 2020
(<i>E</i>)-2-hexenal	Folha	AQUINO, 2020
(<i>Z</i>)-2-hexenal	Folha	AQUINO, 2020
2,4-hexadien-1-ol	Folha	PERVEEN et al., 2001a
Humuleno	Folha	AQUINO, 2020
α -humuleno	Flor	PERVEEN et al., 2001a
	Folha	MINYARD et al., 1966
		ELZEN et al., 1984
		OPTIZ et al., 2008
Isolodeno	Folha	ESSIEN et al., 2011
Limoneno	Folha	AQUINO, 2020
		ESSIEN et al., 2011
		PERVEEN et al., 2001a
Mirceno	Folha	AQUINO, 2020
		ESSIEN et al., 2011
		PERVEEN et al., 2001a
δ -Muuroleno	Folha	AQUINO, 2020

β -ocimeno	Folha	AQUINO, 2020 ESSIEN et al., 2011 PERVEEN et al., 2001a OPTIZ et al., 2008
Óxido de bisaboleno	Flor	HEDIN et al., 1972
Óxido de α -cariofileno	Flor	MINYARD et al., 1966
α -pineno	Folha	AQUINO, 2020 ESSIEN et al., 2011 PERVEEN et al., 2001a OPTIZ et al., 2008
β -pineno	Folha	ESSIEN et al., 2011 PERVEEN et al., 2001a OPTIZ et al., 2008
Sabineno	Folha	ESSIEN et al., 2011
α -santalol	Folha	PERVEEN et al., 2001a
Espatuleno	Folha	PERVEEN et al., 2001a
α -terpineno	Folha	ESSIEN et al., 2011
γ -terpineno	Folha	ESSIEN et al., 2011
Terpinoleno	Folha	ESSIEN et al., 2011 PERVEEN et al., 2001a
Tetradecanal	Folha	AQUINO, 2020
α -tujeno	Folha	AQUINO, 2020 ESSIEN et al., 2011
Triciclono	Folha	ESSIEN et al., 2011
Veridiflorol	Folha	PERVEEN et al., 2001a

TABELA 1.2 – Compostos não voláteis de *Gossipium* sp relatados na literatura.

Substância	Fórmula molecular	Massa monoisotópica	Íon Molecular	Íons Relacionados	Referência
Ácido benzoico ^{L, C}	C ₇ H ₆ O ₂	122.036781	[M+H] ⁺ = 123.0448 [M-H] ⁻ = 121.0306	77.04455; 95.05389 120.02131; 92.02631	BOZOROV et al., 2018 KIRKAN et al., 2018
Ácido chicórico ^L	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	474.07983	[M+NH ₄] ⁺ = 492.1140 [M-H] ⁻ = 473.0730	163.040024; 135.044815; 145.030075 149.008118; 179.03479; 135.042282	KONAN et al., 2014
Ácido clorogênico ^L	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.09508	[M+H] ⁺ = 355.1014	163.03566; 355.18753; 126.97653	KONAN et al., 2014 PERVEEN et al., 2001b
Ácido <i>p</i> -cumárico ^{L, C}	C ₉ H ₈ O ₃	164.04734	[M+H] ⁺ = 165.0540	119.0518; 91.0566; 91.0553	PERVEEN et al., 2001b KIRKAN et al., 2018
Ácido 3- <i>p</i> -coumaroilquínico ^L	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.10017	[M+H] ⁺ = 339.1070 [M+Na] ⁺ = 361.0890	147.044464; 119.049065; 91.054176 147.044617; 215.054062	KONAN et al., 2014

Ácido gálico ^{L, C}	C ₇ H ₆ O ₅	244.07356	[M-H] ⁻ = 169.0191	125.0777	PERVEEN et al., 2001b KIRKAN et al., 2018
Ácido gentísico ^L	C ₇ H ₆ O ₄	154.026611	[M+H] ⁺ = 155.0338	1 09.03394; 81.03571; 81.03192	PERVEEN et al., 2001b
Ácido jasmônico ^L	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	210.1255	[M-H] ⁻ = 209.1195	59.01505; 59.01397; 59.01613	ZEBELO et al., 2017
Ácido ferúlico ^{L, C}	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.05791	[M+H] ⁺ = 195.0650 [M-H] ⁻ = 193.0500	177.05447; 145.02829; 195.15729 134.03629; 178.02644; 193.05	KONAN et al., 2014 PERVEEN et al., 2001b KIRKAN et al., 2018
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ^C	C ₇ H ₆ O ₃	138.03169	[M-H] ⁻ = 137.0239	93.0331	KIRKAN et al., 2018
Ácido protocatecuico ^{L, C, B}	C ₇ H ₆ O ₄	137.02442	[M-H] ⁻ = 153.0205	109.03104; 108.02219; 153.01828	PERVEEN et al., 2001b KIRKAN et al., 2018 ZHANG et al., 1998
Ácido siríngico ^{L, C}	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.05282	[M+H] ⁺ = 199.0592	140.04753; 140.05418; 140.0442	PERVEEN et al., 2001b KIRKAN et al., 2018
Apigenina ^C	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.05282	[M+H] ⁺ = 271.0601	P.153.0152	KIRKAN et al., 2018

			[M-H] ⁻ =269.0520	N. 151.0080; 149.0290; 117.0380	
Cafeoil- <i>D</i> -glucose ^L	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.0951	[M-H] ⁻ = 341.1	179; 161; 135	KONAN et al., 2014
Catequina ^{L, B}	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.07904	[M+H] ⁺ = 291.0811	130.05025; 130.04865; 162.03555	KONAN et al., 2014 ZHANG et al., 1998
Cianidina ^L	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	287.0556	[M] ⁺ = 287.0556	213.0553; 137.0221	BOZOROV et al., 2018
Cianidina-3-(3- glicosídeo) ^F	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁺	449.10839	[M] ⁺ = 449.1067 [M-H] ⁻ = 447.27	P. 186.9557; 221.1377; N. 285.17	HANNY,1980
Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	400.3705			LUO et al., 2008
Desoxihemigossipol ^C	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	244.1099	-	-	ALCHANATI et al., 1998
Desoxi-hemigossipol-6- metil eter ^C	C ₁₆ H ₁₈ O ₃	258.1256	-	-	ALCHANATI et al., 1998
(-)-Epicatequina ^C	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.0790	[M+H] ⁺ = 291.0868 [M-H] ⁻ = 289.0719	P. 139.0397; 123.0446; 147.0453 N. 245.08197; 109.0287	KIRKAN et al., 2018
Eriodictiol ^C	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.063388	[M+H] ⁺ = 289.0711	163.0385; 153.0186	KIRKAN et al., 2018

Galactinol ^L	C ₁₂ O ₁₁ H ₉	342.116211	[M-H] ⁻ =341.1084	179.0563; 71.0151; 101.0247	BOZOROV et al., 2018
Gossipetina ^L	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.0376	[M+H] ⁺ = 319.0000	137.0; 149.0; 169.0; 181.0	KONAN et al., 2014 HEDIN et al., 1992
Gossipetina-3,7- diglicosídeo ^F	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₈	642.5175	-	-	HANNY, 1980
Gossipetina-3-glicosídeo ^F	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480.0903	-	-	HANNY, 1980
Gossipetina-7-glicosídeo ^F	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480.0903	-	-	HANNY, 1980
Gossipetina 8-O- glicosídeo ^{L,F}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480.0903	-	-	HEDIN et al., 1992 HANNY, 1980
Gossipetina-3' 7- glicosídeo ^F	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480.0903	-	-	HANNY, 1980
Gossipetina 8-O- Ramnosideo ^L	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095476	-	-	HEDIN et al., 1992
Gossivertina ^C	C ₁₆ H ₁₈ O ₄	274.1205	-	-	KARIMDZHANOV et al.,1976
Gossipol ^{L,C,F}	C ₃₀ H ₃₀ O ₈	518.194092	[M+H] ⁺ =519.2014	P 485.1860 486.1894	EISENRING et al., 2017

			[M-H] ⁻ = 517.1860	N 489.191162; 231.102234; 259.096924	ZEBELO et al., 2017 KONAN et al., 2014 HEDIN et al., 1992 HANNY, 1980
Heliocide H1 ^{L,S}	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	410.209320	-	314; 313; 275; 136; 135; 107	EISENRING et al., 2017 OPTIZ et al., 2008 BELL et al., 1978 STIPANOVIC et al., 1978
Heliocide H2 ^L	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	410.209320	[M-H] ⁻ = 409.2010	395.2217; 389.2111; 269.0808	OPTIZ et al., 2008 BELL et al., 1978
Heliocide H3 ^L	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	410.209320			OPTIZ et al., 2008 BELL et al., 1978
Heliocide H4 ^{L,S}	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	410.209320	[M-H] ⁻ = 409.2015	408; 341; 323; 314; 313; 276; 136;135 107	EISENRING et al.,2017 OPTIZ et al., 2008 BELL et al., 1978 STIPANOVIC et al., 1978

Hemigossipol ^C	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	260.28500	-	-	ALCHANATI et al., 1998
Hemigossipolona ^L	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	274.0841	[M+H] ⁺ =275.0919	P. 257.0814 205.051; 177.0552	EISENRING et al., 2017
			[M-H] ⁻ =273.0763	N. 161.0239; 39.0235	STIPANOVIC et al., 1993
					OPTIZ et al., 2008 BELL et al., 1978
Hemigossipol-6-metil eter ^C	C ₁₆ H ₁₈ O ₄	274.3120	-	-	ALCHANATI et al., 1998
<i>p</i> -hidroxi benzoato ^L	C ₈ H ₈ O ₃	137.02442	-	-	PERVEEN et al., 2001b
3-Hidroxi- α -calacoreno ^S	C ₁₅ H ₂₀ O	216.151415	-	-	STIPANOVIC et al., 2006
Inositol (mioinositol) ^L	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.063385	[M-H] ⁻ = 179.0584	87.007180	BOZOROV et al., 2018
Isoquercitrina ^B	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.0955			ZHANG et al., 1998
kaempferol	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.15844			YUAN et al., 2012
3-O- α -L- ramnopiranosil(1-2)-[α -L- ramnopiranosil (1-6)]- α - glicopiranosideo ^S					

Kaempferol 3-O- β -D-apiofranosil (1-2)- β -D-glicopiranosídeo ^S						YUAN et al., 2012
Piceatanol ^L	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	244.07356	[M-H] ⁻ = 243.0674	243.07034; 243.0674; 159.04637		KONAN et al., 2014
Pteroestilbeno ^L	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	256.10994	[M+H] ⁺ = 257.1162	133.06496; 121.06453; 119.05016		KONAN et al., 2014
Quercetina 3-O-[α -D-apiofuranosil(1-5)- β -D-apiofuranosil(1-2)]- α -L-ramnopiranosil(1-6)- β -D-glicopiranosídeo ^S	C ₃₇ H ₄₅ O ₂₄	873.2301	[M+H] ⁺ = 875 [M-H] ⁻ = 873.2309	743; 611; 597; 465 303		YUAN et al., 2012
Quercetina ^C	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042653	[M+H] ⁺ = 303.0496 [M-H] ⁻ = 302.1770	P.229.0461; 153.0180 N.245.0447; 152.0184; 150.9975		KIRKAN et al., 2018
Quercetina diglicosídeo 1 e 2 ^L	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626.1483	[M+H] ⁺ = 627.155	303.051788; 465.106506; 304.055145		HEDIN et al., 1992
quercetin-3-diglicosídeo ^F	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626.1483	[M+H] ⁺ = 627.155			HANNY, 1980
quercetin-3,7-diglicosídeo ^F	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626.1483	[M+H] ⁺ = 627.155			HANNY, 1980
Quercetina 3-O glicosídeo ^{L, F}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095476	[M-H] ⁻ =463.0557	301.0159; 271.0072; 255.0134		HEDIN et al., 1992 HANNY, 1980

Quercetina 3'-O glicosídeo ^{L, F}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095476	[M-H] ⁻ =463.0557		HEDIN et al., 1992 HANNY, 1980
Quercetina 7-O glicosídeo ^L	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095476	[M-H] ⁻ =463.0557		HEDIN et al., 1992
Quercetina 3-O-ramnosil glicosídeo ^{L, F}	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626.1483	[M+H] ⁺ = 627.155		HEDIN et al., 1992 HANNY, 1980
quercetin-7-ramnosil glicosídeo ^F	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626.1483	[M+H] ⁺ = 627.155		HANNY, 1980
Raimondal ^L	C ₁₆ O ₅ H ₁₇	290.1154	[M] ⁺ =2901154	275.090781; 272.10367; 257.08031	STIPANOVIC et al., 1980
Raimondalona ^L	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	304.09469	[M] ⁺ =304	289; 274; 259; 246	STIPANOVIC et al., 1993
1,2,3,4-tetra- hidro - 1 α ,2 β ,7 - trihidroxi - 1 β ,6 - dimetil - 4 β - iso- propilnaftaleno-1-O- β -D- glicosídeo ^B	C ₂₁ H ₃₂ O ₈	412.2097	[M+Na] ⁺ = 435.1969	-	ZHANG et al., 1997
1,2,3,4-tetrahidro- 1 α ,2 β ,7-tri- hidroxi- 1 β ,6-dimetil-4 β - isopropolnaftaleno- 2- O- β -D-glicosídeo ^B	C ₂₁ H ₃₂ O ₈	412.2097	[M+Na] ⁺ = 435.2007	-	ZHANG et al., 1997

Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	414.3862			LUO et al., 2008
Tirosina ^L	$C_9H_{11}NO_3$	181.07389	$[M-H]^- = 180.065857$	163.039139 119.048943 93.033142; 72.007607	BOZOROV et al., 2018
Trans-resveratrol ^L	$C_{14}H_{12}O_3$	228.07864	$[M+H]^+ = 229.0859$	135.0440; 107.0500; 81.0550	KONAN et al., 2014
Vanillina ^C	$C_8H_8O_3$	152.047344	$[M+H]^+ = 153.0445$ $[M-H]^- = 151.0392$	P.125.0598; 111.0443 N. 136.0155; 108.0202	KIRKAN et al., 2018

C= caule; L= folhas; F= Flores; S=sementes; B=Casca. P.= Fragmentação em modo positivo, N.= Fragmentação em modo Negativo

2.4 - Ácido jasmônico

Os fitormônios regulam diversos aspectos das plantas como crescimento, desenvolvimento e resposta de defesa, constituindo-se moléculas essenciais de sinalização que modulam a variação fenotípica da planta para adaptação a fatores bióticos e abióticos de maneira complexa (CHINI et al., 2017). Desta maneira, quando há uma perturbação na integridade vegetal durante a alimentação de herbívoros, um mecanismo de resposta é desencadeado pela planta e sinalizado pelos fitormônios que modulam a indução de defesa, agindo em fatores de transcrição de genes de defesa vegetal (ERB et al., 2012).

Dentre os fitormônios o ácido jasmônico (JA) e seus derivados, tal como o jasmonato de metila (Me-JA), tem ganhado destaque com diversos estudos demonstrando suas respostas de defesa (CREELMAN e MULLET 1995). Por exemplo, o tratamento com JA em *Piceas abies* induziu a formação de dutos de resina e acúmulo de mono e sesquiterpenos para a defesa contra patógenos, demonstrando que o JA promove alterações químicas e anatômicas (ZENELI et al., 2006)

TRETNER e colaboradores (2008) ao aplicarem mecanoestimulação em plantas observou o acúmulo de JA e a expressão de genes que codificam as enzimas AOC, responsáveis pela biossíntese do ácido jasmônico, e DXS2, responsável pela biossíntese de isoprenóides.

Em respostas a fatores bióticos, FUJIMOTO e colaboradores (2011) demonstraram que ao tratar *Meloidogyne incognita* com Me-JA houve ativação de genes de multicisteína e inibidores de proteinase e relacionaram esse resultado com a redução do número de nematoides na raiz. DINIZ e colaboradores (2017) observaram que o tratamento com JA ativou genes de defesa inibindo o crescimento do fungo *Colletotrichum kahawae* patógeno do cafeeiro. Além disso, estudos demonstraram que níveis baixos de JA causa preferência a oviposição e herbivoria (ATAIDE et al., 2016; BOSH et al., 2014).

Ao induzir a herbivoria em diferentes genótipos de *Nicotiana attenuata* observou-se uma diminuição na produção de carboidratos, relacionados ao crescimento da planta e um aumento na produção de ácido jasmônico, estes resultados reforçam o modelo

custo/benefício, onde as plantas direcionam a energia gasta no crescimento para mecanismos de defesa (MACHADO et al., 2017).

O catabolismo do JA, pode levar além da formação de Me-JA, a formação de diversas classes de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas. Assim, não é necessariamente observado o acúmulo de JA, mas sim a síntese de metabólitos, por ativação de genes induzidos por este fitormônio, tais como alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas, estilbenos, entre outros (CREELMAN e MULLET, 1997; AHUJA et al., 2012; KONAN et al., 2014).

2.5 - Metabolômica

A metabolômica pode ser definida como a abordagem analítica de estudo de todas as moléculas de baixo peso molecular, ou tantas quanto forem possíveis, presentes em uma determinada matriz biológica, seja ela animal, vegetal ou de microrganismos (VUCKOVIC, 2012; MARTIAS et al., 2021; GONÇALVES et al., 2022). A metabolômica se baseia em dados de forma multidisciplinar, abrangendo bioquímica, química analítica, informática e bioestatística, com uma gama de aplicações, tais como descoberta de biomarcadores, efeitos da nutrição, compreensão de doenças, toxicologia, melhoramento genético de plantas, compreensão de processos biológicos e estudo de interações ecológicas (ALAMGIR et al., 2016; OH et al., 2021; GUIJARRO-DÍEZ et al., 2015).

KIM e VERPOORTE (2010) consideram que há três passos fundamentais em um estudo metabolômico de plantas: a preparação da amostra, a aquisição dos dados e a análise quimiométrica.

Em uma matriz vegetal a preparação da amostra para estudo metabolômico envolve coleta, secagem, extração e preparo da amostra, este considerado o pré-processamento antes da análise propriamente dita. A escolha da rotina empregada não é simples, mesmo se tratando de material vegetal cada matriz é única e requer um preparo de amostra próprio, que depende também do objetivo do estudo e dos métodos de análise (KIM e VERPOORTE, 2010).

A coleta pode ser feita de um espécime em estado natural, em dia e horário específico ou não, ou cultivada em laboratório sob condições controladas. Também é

necessário ter um cuidado para que ela realmente seja representativa e padronizada, pois a idade da folha, altura em que caule ou folha foram coletados influenciam no perfil metabolômico (GARCIA et al., 2018; LIU et al., 2019; ALBRECHT et al., 2012). O congelamento da amostra imediatamente após a coleta também é aconselhável, para evitar que os metabólitos sofram degradação enzimática; ou ainda há casos que a análise é feita de forma direta imediatamente após a coleta (MAHMUD et al., 2015; FREUND et al., 2017).

O material vegetal pode passar por secagem ou ser utilizado *in natura*. As duas maneiras têm vantagens e desvantagens, uma vez que ao secar as folhas os metabólitos podem ser degradados ou perdidos, como no caso de voláteis; entretanto, a presença de água torna o meio propício para degradação enzimática e níveis diferentes de água na matriz atrapalham as análises de quantificação dos metabólitos. A secagem do material vegetal pode ser feita por liofilização, secagem ambiente ou em estufa, dentre outras (MAHMUD et al., 2015; MANAGA et al., 2020). Além do mais, a possibilidade de moer a amostra antes pode ser vantajosa, pois diminui o tempo e melhora a eficiência da secagem (KIM e VERPOORTE, 2010).

A extração é um outro desafio, pois a ampla diversidade de compostos presentes na matriz vegetal com diferentes características de polaridade, basicidade-acidez e massa molar, torna difícil a busca por um solvente que englobe toda essa heterogeneidade (SALEM et al., 2020). Os solventes metanol e etanol são os mais utilizados, por serem capazes de extrair diferentes classes metabólicas de maneira maximizada. Contudo, diferentes solventes como acetona, acetonitrila, clorofórmio, acetato de etila e água também são utilizados, além da mistura entre dois ou mais solventes (BIJTTEBIER et al., 2016; SOARES et al., 2011). Outras variáveis aplicadas a extração são temperatura, tempo, razão solvente:amostra e instrumentação empregadas. A metodologia de extração pode envolver extração em repouso ou por agitação, sonificação, turbólise e forno micro-ondas, esta última é pouco empregada no campo da metabolômica (CASTRO e DELGADO-POVEDANO, 2014). Há também a extração com fluido supercrítico, mas essa técnica ainda é pouco popular na metabolômica (BIMARK et al., 2011).

A última etapa antes da análise na instrumentação selecionada é o preparo da amostra. Esse preparo pode ser simples, apenas uma alíquota da amostra a ser inserida no aparelho - como no caso de análises por RMN ou espectrometria de massas direta, ou passar por etapas necessárias a adequação desse extrato ao aparelho de análise (SALEM et al., 2020).

Para análise em Cromatografia em fase Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) uma alíquota da amostra pode ser inserida e se o intuito é analisar os compostos voláteis, esta pode ser injetada por injeção direta ou por *headspace* (FARIAS et al., 2018; ANDREU-COLL et al., 2020). Contudo, se o intuito é analisar compostos não voláteis é necessário fazer uma etapa de derivatização para aumentar a volatilidade e estabilidade dos metabólitos (ROSENTAL et al., 2016).

Na análise por Cromatografia em fase Líquida (LC) o preparo da amostra deve buscar o equilíbrio entre a necessidade de adequação da amostra ao equipamento de análise ao passo que também precisa evitar a perda de metabólitos e reprodutibilidade com excessivas manipulações (VUCKOVIC, 2012). A mais comum das técnicas é a utilização de cartuchos de Extração por Fase Sólida (SPE) e a filtração com filtros com poros de 0,22 µm, cada um com diversos adsorventes disponíveis sendo a escolha baseada principalmente nas características físico-químicas dos compostos de interesse (LEME et al., 2014). A centrifugação e coleta de uma alíquota do sobrenadante também pode ser utilizada, com a vantagem de ser simples e rápida e com menos passos de manipulação da amostra (LI et al., 2017).

O segundo passo em um estudo metabolômico é a aquisição dos dados e foi o avanço das técnicas de análise que permitiu uma melhor cobertura de analitos e possibilitou que os estudos metabolômicos ganhassem espaço. As técnicas acopladas garantiram uma maior automação e robustez aos estudos e são hoje amplamente empregadas (PATEL et al., 2021). A cromatografia gasosa e a cromatografia líquida acoplada a espectrômetros de massas (GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS) tem obtido êxito nos estudos metabolômicos bem como a cromatografia líquida acoplada a ressonância magnética nuclear (LC-HRMS), utilizada mais recentemente (HUMBERTY et al., 2020; GIKA et al., 2019; SILVA et al., 2021; FLAMINI et al., 2014). Com isso, diversos estudos

são dedicados ao desenvolvimento, otimização e validação dos métodos cromatográficos e de análise (CARERE et al., 2016; BADER et al., 2016; VECHIA et al., 2016).

Assim, a metabolômica cada vez mais passou a gerar grandes conjuntos de dados multidimensionais a serem analisados, que requerem um tratamento e processamento refinado e multivariado. Dessa forma, a Quimiometria emerge da necessidade de extrair informações dentro dos metadados adquiridos, dispondo de técnicas estatísticas apropriadas como análise de componentes principais (PCA), agrupamento hierárquico (HCA) e análise discriminante pelo método de quadrados mínimos (PLS-DA), com softwares dedicados para esse fim tais como o Matlab, RSudio e Mass Profiler Professional (MPP) (FERREIRA, 2015; RAFIEI e SLENO, 2015; FLAMINI et al., 2014). Adicionalmente, softwares e bancos de dados são empregados na deconvolução e identificação dos compostos, dentre eles o próprio MPP, Nist, GNPS e Mass Hunter (XIAO et al., 2012; FLAMINI et al., 2014; OH et al., 2021).

T'KINDT e colaboradores (2009) avaliaram seis diferentes abordagens de extração variando solventes, tempo, temperatura e ordem de adição dos solventes a fim de estabelecer um protocolo de análise mais adequado para metabolômica das folhas de *Arabidopsis thaliana* por GC-MS e UPLC-MS. Os dados de LC-MS foram processados utilizando QuanLynx® e MarkerLynx® (Waters, Milford, MA) e para GC-MS o AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) foi utilizado para identificação dos compostos. Além disso, o software SIMCA-P (Umetrics, Umea, Sweden) foi utilizado para processamento multivariado. Apesar de indicar a melhor extração em termos de quantidade de metabolito extraídos, os autores afirmam que não importa o quanto os métodos de extração diferentes busquem maior abrangência de metabólitos, nenhum método é capaz de uma cobertura total.

O estudo metabolômico conduzido por LI e colaboradores (2018), avaliou 13 cultivares de chá chinês com o intuito de observar as diferenças metabólicas entre eles. O preparo de amostra foi realizado de maneira simples por extração com metanol/água (7:3) e centrifugação, seguido da filtração de uma alíquota do sobrenadante em filtro com membrana de 0,22µL. As análises foram realizadas por LC-QToF-MS e os dados processados por MassHunter Profinder - versão B.08.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A análise multivariada foi realizada utilizando o Mass Profiler

Professional, versão 13.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Com o estudo foi possível observar uma separação entre dois grupos de cultivares, os cultivares do grupo GT produziam mais flavonoides glicosilados, enquanto os cultivares do grupo G&BT produziam mais catequinas e ácidos fenólicos. Além disso, 73 compostos foram provisoriamente identificados, entre eles aminoácidos, catequinas, flavonoides glicosilados, ácidos fenólicos e alcaloides.

A indicação do ácido cafeoilquínico e do éster metílico do ácido ferúlico como biomarcadores de escurecimento precoce em folhas de alface também foi resultado do estudo metabolômico não direcionado com mais de 30 cultivares de alface. A coleta foi realizada em três dias diferentes e as amostras congeladas com nitrogênio líquido até a extração. A análise foi realizada por UPLC-MS QTOF e diferentes softwares de análise e estatística multivariada foram utilizados tais como Mass Profiler Professional, SIMCA e The Unscrambler (GARCIA et al., 2018).

AUSTEL e colaboradores (2021) avaliaram o efeito da herbivoria por *Brassicogethes aeneus* em botões de flores de 24 espécies de *Brassica sp.* O tratamento estatístico e a análise de dados foram realizados com software *RStudio* (version 1.0.143) e MassHunter (versão B.06.01). O perfil metabolômico por LC-ESI-QTOF-MS demonstrou a separação das 24 espécies em três grupos. Além disso, as espécies *Barbarea vulgaris* e *Raphanus sativus* apresentaram mais de 1000 entidades específicas após a herbivoria e 53 metabolitos foram anotados de diferentes classes como saponinas, flavonoides e ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos.

3 – Objetivos

3.1 – Objetivo Geral

Desenvolver estudos de ecologia química investigando as relações entre o perfil químico de plantas de algodão submetidas a diferentes mecanismos de indução de resistência, contribuindo assim para identificação de metabólitos de defesa constitutiva e induzida do algodão.

3.2 – Objetivos específicos

- Cultivar 12 variedades de algodão em condições normais e sob herbivoria;
- Selecionar dois cultivares, um resistente e um suscetível, e cultivá-los em diferentes condições de estresses bióticos e abióticos;
- Desenvolver metodologias de análise dos metabólitos da folha do algodão por UPLC-QToF-MS e GC-MS;
- Analisar o perfil químico de 12 cultivares de algodão bem como as defesas constitutivas e defesa induzida deles;
- Avaliar as variações químicas entre cultivares sobre os diferentes sistemas de estresses;
- Detectar as substâncias relacionadas a resposta da planta nas condições de estresse.

4 - Materiais e métodos

4.1 – Cultivo de *Gossypium* sp.

Os experimentos foram realizados com 12 diferentes cultivares de algodão. Os cultivares foram selecionados por possuírem relato de resistência ou suscetibilidade a espécies-pragas ou por serem utilizados na agricultura brasileira, como descrito na TABELA 4.1. O cultivo das plantas foi realizado no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do Departamento de Ciências da Produção Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Unesp-Jaboticabal pelo Dr. Carlos Alessandro de Freitas sob supervisão do professor Dr. Arlindo Leal Boiça-Junior.

As plantas foram cultivadas em vasos de 12L, contendo substrato composto por solo, esterco bovino e areia (3:1:1). Cada cultivar foi semeado em três vasos, cada vaso contendo cinco plantas e considerado como uma replicata. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação vedada com tela anti-afídeo e irrigados sempre que necessário, tomando o cuidado de não causar nenhum tipo de estresse hídrico. Após 60 dias de emergência os experimentos foram conduzidos (Item 4.3).

TABELA: 4.1: Genótipos de algodão estudados, origem e histórico de resistência dos genótipos. Fonte: FREITAS (2019).

	Genótipo	Origem	Histórico de resistência
1	BRS 286	Embrapa	Não avaliado
2	BRS 293	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> (BOIÇA JÚNIOR et al., 2012) e <i>Spodoptera frugiperda</i> (JESUS et al., 2014).
8	FMT 701	Fundação MT	antixenose e/ou antibiose a <i>A. argillacea</i> (BOIÇA JÚNIOR et al., 2012) e <i>S. frugiperda</i> (JESUS et al., 2014).
9	FMT 707	Fundação MT	Não avaliado
10	FMT 709	Fundação MT	Não avaliado
11	FMX 910	Bayer S.A.	Antibiose de <i>A. argillacea</i> (BOIÇA JÚNIOR et al., 2012).
12	FMX 993	Bayer S.A.	Suscetível a <i>Chrysodeixis includens</i> (FUNICHELLO et al. 2013).

4.2 – Insetos utilizados para herbivoria

As lagartas de *Spodoptera cosmioides* utilizadas faziam parte da colônia do laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do Departamento de Ciências da Produção Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp-Jaboticabal, esta colônia anualmente recebe indivíduos coletados no campo para manutenção da diversidade genética. As lagartas pertenciam a 19^a- 22^a geração e estavam no 5^o instar no momento do experimento.

4.3 – Experimentos de cultivo de *Gossypium* sp.

4.3.1 – Experimento de defesa constitutiva

Os doze genótipos foram cultivados em triplicata como descrito no item 4.1, e após 60 dias de emergência, a terceira e a quarta folha - a partir da base de cada planta,

foram coletadas, totalizando 10 folhas por vaso, cada vaso foi considerado uma réplica da triplicata. As folhas foram imediatamente congeladas com Nitrogênio líquido para promover o *quenching* metabólico e armazenadas em ultrafreezer -80°C (SANYO, Modelo MDF-U56VC) (FREITAS, 2020).

4.3.2 – Experimento de resistência induzida por herbivoria

O experimento de indução de herbivoria foi realizado com os 12 genótipos e lagartas da espécie *Spodoptera cosmioides* mantidas sem alimentação por 3 h antes dos ensaios. A lagarta foi posicionada sobre a segunda folha a partir da base, envolta em uma gaiola de tecido “voile” (20 x 15 cm), mantida por 16 h, resultando em um consumo da área foliar de 80%, e então removida. Depois de três dias da remoção da lagarta, a terceira e quarta folha, a partir da base das plantas, dos dois grupos, controle e injúria por herbivoria, foram coletadas (FREITAS, 2020). As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C. O experimento de defesa constitutiva (item 4.3.1) foi realizado em paralelo e utilizado como grupo controle.

4.3.3 – Experimento de Resistência induzida por fatores bióticos e abióticos

A resistência induzida por fatores bióticos e abióticos foi conduzida com 6 diferentes tratamentos e dois genótipos a fim de observar a resposta metabólica dos genótipos a diferentes condições de estresse. Os genótipos FMT 701 e Delta Opal foram escolhidos como representantes de cultivar resistente e suscetível, respectivamente. Os dois genótipos foram cultivados como descrito no item 4.1 e após 60 dias de emergência foram induzidos a resistência, como descrito a seguir. As folhas após coleta eram imediatamente congeladas e armazenadas em freezer -80°C.

a) Adição de jasmonato de metila ao solo na concentração de 20 μmolL^{-1} (20S):

Uma solução de jasmonato de metila na concentração de 20 μmolL^{-1} foi preparada com jasmonato de metila (95%, Sigma-Aldrich) utilizando 0,01% de Tween® 80 como veículo. Com uma pipeta de Pasteur®, 10 ml da solução foi adicionada

diretamente na superfície do solo de cada vaso. As folhas foram coletadas dois dias após a adição da solução de jasmonato de metila.

*b) Adição de jasmonato de metila ao solo na concentração de 200 μmolL^{-1} (**200S**):*

Uma solução de jasmonato de metila na concentração de 200 μmolL^{-1} foi preparada com jasmonato de metila (95%, Sigma-Aldrich) utilizando 0,01% de Tween® 80 como veículo. Com uma pipeta de Pasteur® 10 ml da solução foi adicionada diretamente na superfície do solo de cada vaso. As folhas foram coletadas dois dias após a adição de jasmonato de metila.

*c) Pulverização de jasmonato de metila nas folhas (**200P**):*

Um volume de 2ml da solução de jasmonato de metila na concentração de 200 μmolL^{-1} foi pulverizada sobre as folhas de cada planta com auxílio de borrifador. As folhas foram coletadas dois dias após a adição da solução.

*d) Herbivoria (**Herb**)*

As lagartas de *Spodoptera cosmioides*, no 5º instar de desenvolvimento, foram mantidas 3 horas sem alimento antes dos experimentos. Em seguida, uma lagarta era posicionada na segunda folha, a partir da base de cada planta, e envolta em uma gaiola de tecido voile (20 x15 cm). Após 16 h, tempo em que 50-60% da área foliar foi consumida, as lagartas eram removidas. As folhas foram coletadas três dias após a remoção das lagartas.

*e) Herbivoria mais jasmonato de metila (**Herb 200S**)*

A herbivoria foi realizada como descrita no item anterior (item 4.3.3d). Após 24 h da remoção da lagarta 10 ml da solução de jasmonato de metila na concentração de 200 μmolL^{-1} foi adicionado no solo (preparada como em Adição de jasmonato de metila ao solo na concentração de 200 μmolL^{-1} , item 4.3.3b). A coleta das folhas foi realizada após 2 dias da adição da solução de jasmonato de metila.

*f) Estresse hídrico (**Hid**)*

As plantas foram mantidas em estresse por déficit hídrico durante 5 dias, neste período as plantas não foram regadas. Após os 5 dias as folhas foram coletadas.

4.4 – Análise metabolômica

4.4.1 – Estudo da secagem do material vegetal

A fim de avaliar qual a melhor condição de extração do material vegetal, as folhas foram moídas em um moinho IKA® modelo A11 basic, e três metodologias foram avaliadas: material *in natura* (ou seja, não seco), material seco em estufa de ar circulante a 40°C e material seco por liofilização.

A extração foi realizada com 300 mg do material, de cada uma das três condições avaliadas, e 3 ml de metanol por um processo de turbólise. A turbólise ocorreu por 1 min nos tempos 0, 15 e 30 min e em seguida a amostra foi centrifugada por 5 min e o sobrenadante reservado. A extração foi realizada duas vezes consecutivas, totalizando 6 ml de extrato líquido. O solvente foi evaporado e o extrato ressolubilizado em 2 ml de metanol, esta solução foi centrifugada por 20 min a 25°C e 12.000xg e 1 ml do sobrenadante foi armazenada em *vials* para análise cromatográfica.

O perfil cromatográfico das amostras foi adquirido por UPLC-DAD-QDa (Waters Corp., Milford, MA, USA – Acquity H-class equipado com detector de arranjo de fotodiodo “PDA” e um detector de massa *single* quadrupolo “QDA”, Software Empower®, Coluna: Waters CSH C18 -1.7 µm; 2.1x10 0mm) com injeção de 1 µL do extrato e eluição em MeOH/H₂O em modo gradiente (5 →100% em 25 min), permanecendo em 100% metanol até 30 minutos. Os perfis foram comparados e a metodologia por secagem em estufa de ar circulante foi escolhida como método de secagem.

4.4.2 – Métodos de análise

4.4.2.1 – GC-MS

4.4.2.1.1 - Equipamento

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás modelo 2010 Plus acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo TQ-8040 (GC-MS) (Shimadzu, Kyoto, Japão), injetor automático com amostrador AOC 5000 (Shimadzu, Kyoto, Japão). O gás Hélio 5.0 (99.999%) (White Martins, São Carlos, SP, Brasil) foi

usado como gás de arraste. Os dados foram obtidos utilizando Software *GC-MS Solution* (Shimadzu, Kyoto, Japão).

4.4.2.1.2 - Extração

Com o intuito de analisar diferentes classes de metabólitos, optou-se pela análise por GC-MS com amostras derivatizadas das folhas de algodão. Duas metodologias de extração foram realizadas a fim de avaliar qual seria mais efetiva. Os testes de extração foram feitos com uma mistura foliar (folhas secas) dos 12 diferentes genótipos. A escolha da metodologia de extração considerou além da quantidade de picos, as classes de substâncias observadas. A identificação dos metabólitos foi efetuada por comparação dos espectros de massa em base de dados NIST (NIST 21, NIST 05, NIST 17-1, NIST 107, WILEY 8) e comparação dos índices de Kovats.

Extração 1

As folhas de algodão secas e moídas foram diretamente derivatizadas, adicionando-se 60 µL de piridina a 5 mg de material vegetal. A solução ficou em repouso por 5 min a 60°C. Após este tempo, foram adicionados 100 µL do derivatizante Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e seguiu-se um novo repouso de 30 minutos. Posteriormente, a solução foi filtrada e reservadas em *vials*, acrescida de 340 µL de clorofórmio e injetadas em GC-MS.

Extração 2

Nesta metodologia as amostras de GC-MS foram preparadas obtendo-se o extrato foliar antes da derivatização. Uma quantidade de 150 mg de folha secas de algodão foi extraída com 4 ml de solvente extrator por turbólise durante 4 minutos, em seguida, o extrato ficou em repouso por 30 minutos, e então foi filtrado e seco. Um planejamento fatorial simples foi realizado para a escolha do solvente e temperatura de extração (TABELA 4.2). O experimento 4 foi escolhido por apresentar o maior número de picos. A derivatização foi realizada do mesmo modo que a extração 1, contudo utilizando 5 mg do extrato seco.

A extração e derivatização de todas as amostras foi realizada como descrito neste item utilizando CH₃Cl/MeOH (1:1) a temperatura ambiente de 25°C.

A análise foi realizada em gradiente exploratório iniciado a 75°C, com rampa de temperatura de 5°Cmin⁻¹ até atingir 300°C, fluxo de gás 1 mlmin⁻¹, modo de injeção split no valor de 1:10 e temperatura de injeção igual a 280°C, em coluna RTX-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 mm).

TABELA 4.2 - Experimento fatorial para otimização da extração 2 para GC-MS.

	CHCl₃/MeOH	Temperatura (°C)
Exp. 1	8:2	55
Exp. 2	8:2	25
Exp. 3	1:1	55
Exp. 4	1:1	25
Exp. 5	65:35	40
Exp. 6	65:35	40
Exp. 7	65:35	40

4.4.2.1.3 -. Otimização cromatográfica

Um gradiente exploratório foi desenvolvido, variando a temperatura inicial (50 e 70 °C), o modo de injeção (Split de 10, 20 e 50) e o gradiente de temperatura (5, 7 e 10°C/min). O método foi escolhido considerando a otimização do tempo e a resolução cromatográfica (TABELA 4.3). A sequência de injeção das amostras foi realizada utilizando o padrão: 6 amostras e uma injeção de solvente.

TABELA 4.3 - Condições cromatográficas no GC-MS.

Coluna	Rtx-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25µm)	Temp. do injetor	280 °C
Gás de arraste	Hélio (1 mlmin ⁻¹)	Temp. do forno	75°C por 1min, 75-300°C em 5°Cmin ⁻¹ , 300°C por 5 min
Volume de injeção	1 µL	Temp. Interface	300°C
Split	10:1	Temp. da fonte de ionização	300°C
Fonte de ionização	EI (<i>m/z</i> : 45-1000)		

4.4.2.1.4 - Análise dos dados

Os picos cromatográficos foram integrados manualmente de maneira comparativa, desconsiderando ruídos e os sinais do branco da amostra. A planilhas de dados foram geradas no Microsoft® Excel a partir da área dos picos e tempos de retenção, que foram normalizados utilizando o mentol, como padrão interno.

4.4.2.2 – UPLC-QToF-MS

4.4.2.2.1 – Equipamento

As análises dos compostos não voláteis foram realizadas em um sistema UPLC-QToF-MS, com cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography, UPLC* - Agilent 1290, Agilent Technologies, CA, United States) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Quadruple Time of Flight Mass Spectrometry, QToF-MS - Agilent 6545) equipado com fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI) e *software Mass Hunter*.

4.4.2.2.2 – Extração

A fim de obter uma extração otimizada as variáveis independentes: solvente, método de extração e razão solvente/amostra foram avaliados em até três níveis e

codificados de acordo com a TABELA 4.4. O planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado como descrito na TABELA 4.5.

Os extratos foram preparados utilizando 300 mg de material seco em estufa de ar circulante a 40°C. Cada extração teve um período de 30 minutos e a amostra foi submetida a agitação por dois minutos no início do processo e nos tempos 15 e 30 minutos. O extrato foi então centrifugado e o sobrenadante reservado. A extração foi realizada por duas vezes consecutivas totalizando 6 ml de extrato. O preparo da amostra e análise no UPLC-DAD-MS foi realizada como descrito no item 4.4.1.

Os aparelhos usados para extração foram Turrax IKA, T 10 basic ULTRA-TURRAX® Package (Turrax 1); Turrax IKA, ULTRA-TURRAX® Tube Drive, 2 x ST-20, 2 x DT-20 (Turrax 2) e Vórtex IKA, 3365000 Lab dancer (Vórtex).

TABELA 4.4- Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial.

Nível	-1	0	1
Equipamento	Turrax 1	Turrax 2	Vórtex
Solvente	EtOH/H ₂ O (8:2)	MeOH (8:2)	-
Volume (ml)	3	6	-

TABELA 4.5-Planejamento fatorial para otimização da metodologia de extração.

Experimento	Equipamento	Solvente	Volume
Exp1	-1	-1	-1
Exp2	-1	-1	0
Exp3	-1	0	-1
Exp4	-1	0	0
Exp5	0	-1	-1
Exp6	0	-1	0
Exp7	0	0	-1
Exp8	0	0	0
Exp9	1	-1	-1
Exp10	1	-1	0
Exp11	1	0	-1
Exp12	1	0	0

Os perfis cromatográficos dos experimentos foram comparados e as condições do experimento 3 foram escolhidas para a extração (TABELA 4.3). Após otimização da extração, a extração padrão de todas as amostras foi realizada como descrita a seguir.

As folhas foram moídas com moinho IKA® modelo A11 basic, secas em estufa de ar circulante a 40°C e submetidas a extração por turbólise com Metanol/H₂O (8:2) duas vezes consecutivas, utilizando 150 mg de folha seca e 3 ml de solvente extrator. A agitação por turbólise aconteceu por dois minutos nos tempos 0, 15 e 30 min. O extrato foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante reservado. Ao final das duas extrações, todo o extrato foi centrifugado por 20 minutos e 2 ml do sobrenadante reservado em *vials* e armazenados em freezer a -20°C. Antes da análise cromatográfica o extrato foi filtrado em membrana PVDF de 0,22 µm. A amostra para injeção consistiu em 900 µL de extrato filtrado e 100 µL de solução padrão de cafeína (0,1 mgml⁻¹), utilizada como padrão interno.

4.4.2.2.3 - Otimização cromatográfica

Uma amostra contendo uma mistura dos doze genótipos, foi extraída como descrito no item anterior (item 4.4.2.2.2), a fim de desenvolver um método cromatográfico satisfatório para todos os genótipos.

A análise dos metabólitos foi realizada utilizando UHPLC-QToF-MS (Agilent LC-6545B, item 4.4.2.2.1). Variáveis como temperatura (25 e 45 °C), eluente (MeOH/H₂O ou ACN/H₂O) e a adição ou não de Ácido fórmico 1% como modificador na fase móvel foram testadas. Além disso, as análises foram realizadas no modo positivo e negativo, variando os parâmetros de fragmentação, voltagem do capilar e do *nozzle*. O método foi selecionado de acordo com o maior número de picos apresentados, após otimização. Desta forma, a aquisição de dados foi realizada de acordo com os métodos descritos na TABELA 4.6 e 4.7. As sequências de injeção foram feitas de forma aleatória seguindo um padrão de repetição de 6 injeções de amostras e uma injeção de solvente, utilizado como intervalo.

TABELA 4.6 - Método cromatográfico para análise das folhas de algodão em cromatografia líquida.

Coluna	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18(2.1x50mm 1.8 µm)
Fluxo	0,3 ml/min ¹
Vol. De Injeção	1 µL
Eluente	Acetonitrila/Água
Modificador	Ácido fórmico 0,1% (apenas no modo positivo)
Temperatura da coluna	40°C
Gradiente	ACN/H ₂ O 5%-100% em 15 min 100% de ACN por 5 min.

TABELA 4.7 - Condições de análise para o espectrômetro de massas do UPLC-QTOF-MS

			Modo positivo	Modo Negativo
Gás Temp	320°C	Fragmentador	150	150
Drying Gás	8	VCap	4.000	1000
Nebulizador	35	Nozzle Voltagem	1500	3000
Sheat Gás Temp	350°C			
Sheat Gás Flow	11			
Skimmer	65			

4.4.2.2.4 - Estudos de desempenho analítico

Dois flavonoides, Daidzeína (0,2 mgml⁻¹) e Naringenina (0,5 mlml⁻¹), foram escolhidos para avaliar seletividade, linearidade, precisão e exatidão do método de análise.

Para o estudo de seletividade e linearidade adicionou-se 200, 350, 550, 750, 900 µL de daidzeína a 6 ml de MeOH/H₂O (8:2), e uma alíquota de 900 µL de cada uma destas soluções foi reservada para a curva de calibração dos padrões em solvente, lembrando que 100 µL de cafeína foi adicionada como padrão interno. As amostras de folha de algodão secas e moídas foram dopadas nas mesmas concentrações e, após evaporação do solvente, extraídas de acordo com a metodologia de extração (item 4.5.2.2). O mesmo procedimento foi realizado com a Naringenina, no entanto com a adição de 50, 200, 350, 550, 750 e 900 µL. As estimativas dos coeficientes das curvas foram realizadas por regressão linear.

A precisão foi aferida pelo desvio padrão absoluto de um número determinado de amostras, que pode ser expressa por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A ANVISA (2017), para estudo de repetitividade, sugere a avaliação com um número mínimo de 9 repetições, abrangendo 3 concentrações: baixa, média e alta, em triplicata. Neste estudo, utilizamos concentrações de 60, 425 e 800 µL dos padrões.

A exatidão foi medida por meio de ensaio de recuperação, com adição de 60, 425 e 800 μL das soluções padrão daidzeína e naringenina como compostos substitutos, o experimento foi realizado em triplicata.

A análise dos dados de validação foi realizada utilizando as áreas dos picos m/z de cada padrão com o auxílio do software *MassHunter Quantitative Analysis*, e os gráficos de regressão linear foram construídos utilizando o programa *OriginPro 8.5*.

4.4.2.2.5 - Análise dos dados

Os dados brutos adquiridos foram pré-processados no Software *MassHunter Qualitative Analysis Workflows* (versão B.08.00). Os dados foram deconvolvidos utilizando a função “*Find by Molecular Feature*”, os picos extraídos no tempo de retenção de 1-17 min e m/z de 50,0000 a 800,0000. Os picos com alturas inferiores a 5000 *counts* foram removidos e a qualidade mínima aceita foi de 90%. Os picos m/z detectados nas análises do branco foram desconsiderados e as tabelas geradas em modo “.cef”.

4.4.3 - Análise multivariada

Com o intuito de visualizar os padrões de semelhanças e diferenças entre os diferentes genótipos e tratamentos, realizou-se análises multivariadas, tais quais Análise de Componentes Principais (PCA), Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), Gráficos de Volcano e Diagramas de Venn, utilizando o Software MPP (*Mass Profiler Professional* – Agilent). Para isso os dados foram alinhados e normalizados utilizando como padrão interno a cafeína, para as análises por UPLC-QToF-MS, e o mentol, para análise por GC-MS. As entidades foram filtradas de acordo com sua presença nas triplicatas de uma mesma amostra, $p < 0,05$ e *cut-off* de 2.0. A ANOVA foi realizada por Teste-*t* e teste de correção Benjamin and Hochberg - FDR. A análise multivariada foi realizada com a lista de potenciais metabólitos filtrados que apresentaram significância estatística pelo teste de ANOVA aplicado.

5 - Resultados e discussão

5.1 - Análise metabolômica

5.1.1 - Secagem do material vegetal

A secagem do material é uma etapa importante no processo de extração e preparo de amostra. Além da secagem evitar a decomposição dos metabólitos, pois a água fornece o meio para reações enzimáticas que podem ocorrer durante a preparação da amostra, diferentes quantidades de água na amostra modifica os resultados da quantificação, o que comprometeria o objetivo deste estudo (KIM E VERPOORTE, 2010).

Três abordagens foram avaliadas em relação ao método de secagem do material vegetal utilizado para extração, extração realizada com as folhas frescas – *in natura*, folhas secas por liofilização, e folhas secas em estufa de ar circulante a 40°C.

Ao comparar os cromatogramas observa-se que a extração com diferentes tratamentos do material vegetal apresentou variações, principalmente quantitativas, entre o material seco e *in natura* (FIGURA 5.1). O material seco, seja por estufa ou por liofilização apresentou uma maior quantidade de picos cromatográficos, além de maior intensidade, indicativo de maior concentração dos metabólitos, corroborando com o que discutido por KIM e VERPOORTE (2010). Diante disso, optou-se pela secagem do material vegetal por estufa de ar circulante, por demandar menor tempo que a secagem por liofilização, e as duas metodologias resultarem em perfis químicos semelhantes.

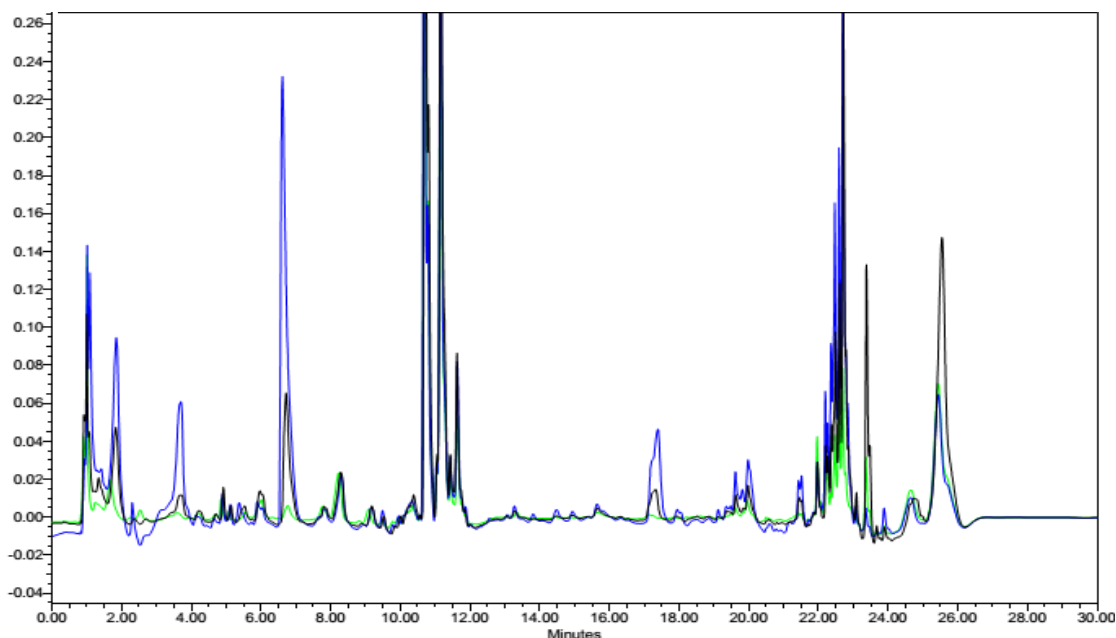


FIGURA 5.1 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC Waters (Acquity UPLC H-Class System) dos extratos de algodão com diferentes metodologias para secagem da amostra. Coluna C18 (1.7 μ m; 2.1 x 10mm), eluição em gradiente com MeOH/H₂O 10% \rightarrow 100% em 25min, permanecendo em 100% metanol até 30 min, 0,3 mlmin⁻¹.

Azul: material seco em estufa de ar circulante, **Preto:** material seco por liofilização, **Verde:** material in natura.

5.1.2 - Análise por GC-MS

Duas metodologias de preparo de amostra para análise dos não-voláteis foram avaliadas neste estudo: derivatização direta das folhas (D-D) e extração com CHCl₃/MeOH (1:1) com posterior derivatização (E-D), como descrito na seção 4.5.1.2 (FIGURA 5.2 e 5.3). A TABELA 5.1 apresenta os picos observados nas duas metodologias, a identificação destes picos e a comparação qualitativa das duas metodologias. A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros massas com bases de dados NIST e pelo índice de Kovats.

No preparo de amostras por derivatização direta (D-D) é possível observar majoritariamente açúcares e derivados de açúcares e algumas substâncias voláteis da classe dos terpenos, como limoneno, cariofileno e humuleno. Na metodologia de extração com CHCl₃/MeOH (1:1) e posterior derivatização (E-D) diferentes classes de substâncias

foram observadas dentre elas ácidos graxos de cadeia longa, ácidos orgânicos, açúcares e derivados, aminoácidos e esteroides (TABELA 5.1).

A extração com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) e posterior derivatização (E-D) foi escolhida como metodologia de extração, uma vez que permitiu observar um número maior de substâncias, 141 picos, de diferentes classes (FIGURA 5.2, TABELA 5.1).

Em contrapartida, a metodologia com derivatização direta (D-D) das folhas não se mostrou interessante para nosso objetivo. Embora tenha a vantagem de ser mais simples e utilizar menos solvente e tempo, a D-D resultou em 61 picos, número bem inferior a E-D, os picos se caracterizaram em sua maioria de açúcares, com apenas algumas substâncias diferentes, e apesar de possibilitar a análise de alguns compostos voláteis estes já foram estudados por AQUINO (2020) não sendo de interesse para as análises aqui propostas (FIGURA 5.3 e 5.4). Vale ressaltar que os açúcares possuem espectros de massa e índice de retenção (IR) semelhantes, o que dificulta a identificação dos mesmos, sendo considerados irrelevantes para o estudo metabolômico aqui proposto (TABELA 5.1).

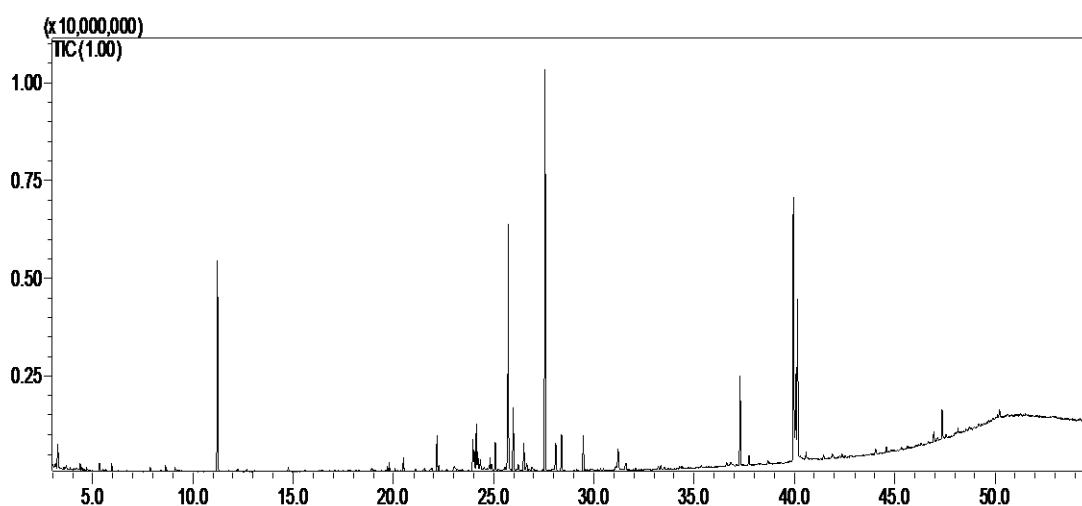


FIGURA 5.2 - Cromatograma obtido por análise de GC-MS das folhas de algodão, metodologia derivatização direta das folhas. Coluna RTX-5MS (30m; 0,25 mm; 0,25 μm), 75°C por 1 min, 5°Cmin⁻¹ até 300°C, 300°C por 5 min.

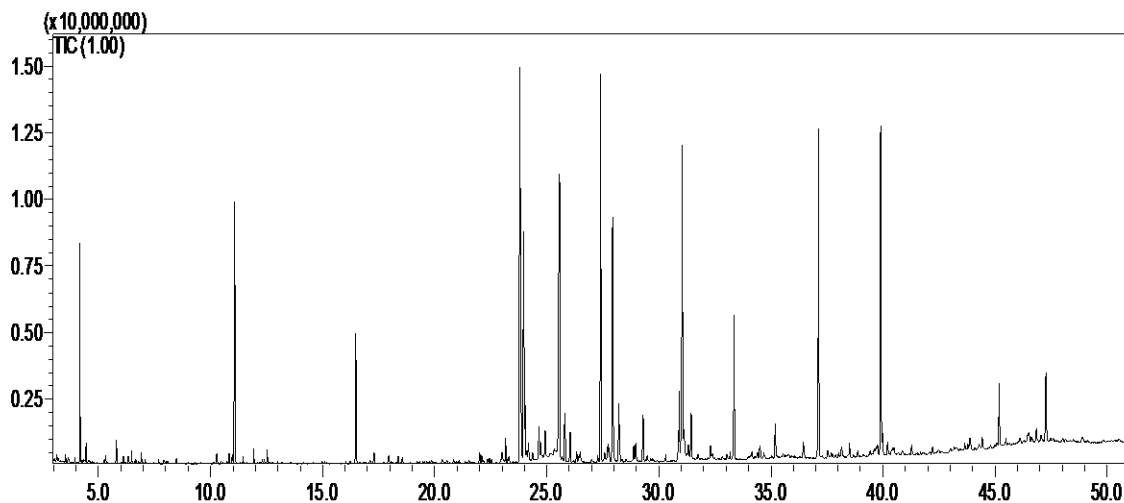


FIGURA 5.3 - Cromatograma obtido por análise de GC-MS das folhas de algodão, metodologia de extração com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ seguida de derivatização. Coluna RTX-5MS (30m; 0,25 mm; 0,25 μm), 75°C por 1 min, 5°Cmin⁻¹ até 300°C, 300°C por 5 min.

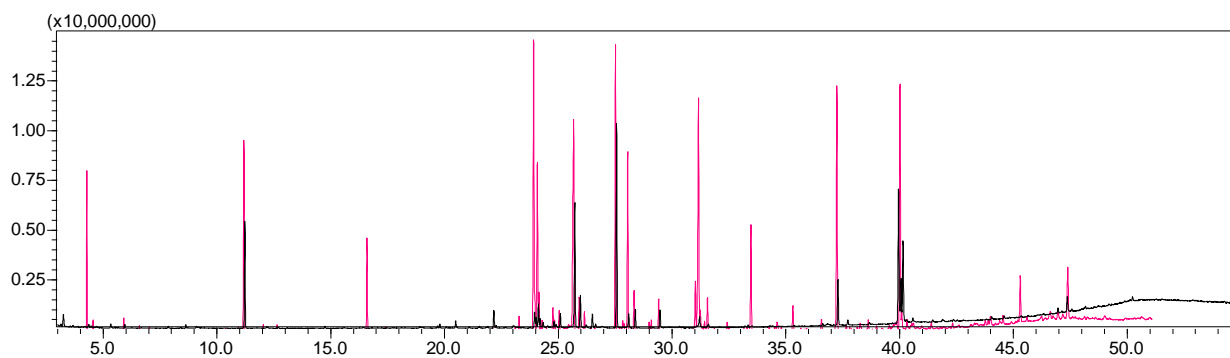


FIGURA 5.4 - Cromatograma comparativo da análise por GC-MS das folhas de algodão metodologia de extração direta (preto) e extração seguida de derivatização (rosa). Coluna RTX-5MS (30m; 0,25 mm; 0,25 μm), 75°C por 1 min, 5°Cmin⁻¹ até 300°C, 300°C por 5 min.

TABELA 5.1 - Identificação das substâncias das folhas de algodão analisadas por GC-MS e comparação das duas metodologias de preparo de amostra estudadas.

Composto	TR	E-D	D-D	IR exp,	IR lit,
Limoneno	5,162	-	+	1028	1031
NI	5,316	+	-	1035	ND
Ácido láctico, 2 TMS	5,795	+	+	1057	1065
Ácido glicólico, 2 TMS	6,105	+	tr	1072	1080
L-Valina, TMS	6,330	+	-	1082	1083,2
NI	6,475	+	tr	1089	ND
NI	6,915	+	-	1109	ND
Ácido propanóico TMS	7,680	+	-	1144	1151
L-Leucina, TMS	7,920	+	-	1155	1155,7
Ácido 3-hidroxi-butírico, 2 TMS	8,085	+	-	1163	1167
Isoleucina, TMS	8,432	+	-	1179	1178,6
Glicerol, 2 TMS	8,929	-	+	1202	*
Ácido 3-hidroxisovalérico, 2 TMS	9,290	+	tr	1216	1216
Ácido 4-hidroxi-butanoico, 2 TMS	9,925	+	-	1241	1246
Ácido benzoico, TMS	10,155	+	-	1251	1257
NI	10,275	+	-	1255	ND
NI	10,825	+	-	1277	ND
NI	10,970	+	-	1283	ND
Glicerol, 3 TMS	11,075	+	+	1287	1292
Niacina, TMS	11,315	+	-	1297	1298
Ácido benzenoacético, TMS	11,455	+	tr	1303	12951
Ácido butenedioico, 2 TMS	11,930	+	tr	1321	1321
Ácido glicérico, 3 TMS	12,530	+	+	1345	1344
Ácido 2-butenedioico, 2 TMS	12,750	+	-	1354	1358
Ácido Nonanoico, TMS	12,995	+	-	1364	1369
Cariofileno	14,575	-	+	1428	1421
Humuleno	15,411	-	+	1464	1465
Ácido L- aspártico, 3 TMS	16,035	+	-	1490	1502,4
Ácido málico, 3 TMS	16,485	+	-	1509	*
NI	17,095	+	tr	1534	ND
Ácido piroglutâmico	17,145	+	tr	1536	*
Ácido 4-Aminobutanoico, 3 TMS	17,296	+	-	1542	1541

Ácido eritrônico, 4 TMS	17,952	+	tr	1570	1569
NI	18,375	+	-	1588	ND
NI	18,529	+	-	1594	ND
Ácido benzoico, 2 TMS	19,478	+	tr	1637	1637
Monossacarídeo	19,551	+	+	1640	ND
Monossacarídeo	19,641	+	+	1645	ND
Ácido 4-hidroxibenzenoacético, 2TMS	19,768	+	-	1650	1650
Ácido dodecanoico, 1 TMS	19,936	+	+	1658	1657
Monossacarídeo	20,340	+	+	1677	ND
Monossacarídeo	20,392	tr	+	1679	ND
Monossacarídeo	20,835	+	tr	1699	ND
Ácido subérico, 2 TMS	21,075	+	-	1710	1710
Ribitol, 5 TMS	21,467	+	tr	1728	1727,1
Monossacarídeo, 3 TMS	21,535	+	-	1732	1724
Xilitol, 5 TMS	22,009	+	+	1753	1748
Adonitol, 5 TMS	22,112	+	+	1758	1756
NI	22,445	+	tr	1773	ND
NI	22,998	+	tr	1799	ND
Ácido azelaico, 2TMS	23,168	+	-	1807	1806
NI	23,267	+	tr	1812	ND
NI	23,330	+	tr	1815	ND
Monossacarídeo	23,804	+	+	1839	ND
Monossacarídeo	23,856	+	+	1842	ND
Monossacarídeo	23,964	+	+	1847	ND
Monossacarídeo	24,044	+	+	1851	ND
Ácido mirístico, TMS	24,112	+	-	1855	1850
Monossacarídeo	24,180	+	+	1858	ND
Monossacarídeo	24,656	+	+	1882	ND
NI	24,725	+	+	1886	ND
Monossacarídeo	24,930	+	+	1896	ND
NI	25,402	+	+	1920	ND
Monossacarídeo	25,565	+	+	1928	ND
Monossacarídeo	25,814	+	+	1941	ND
NI	26,041	+	-	1952	ND

D-mannitol, 6TMS	26,335	+	+	1967	1969
NI	26,494	-	+	1975	ND
Monossacarídeo	27,005	+	-	2001	ND
Monossacarídeo	27,407	+	+	2023	ND
Monossacarídeo	27,591	+	tr	2033	ND
Ácido D-Glucônico, 6TMS	27,725	+	tr	2040	2037
Ácido palmítico, TMS	27,940	+	+	2052	2047
Mio-Inositol (isom1), 6 TMS	28,222	+	+	2068	2073,7
Ácido galactárico, 6TMS	28,546	+	-	2085	2085
NI	28,881	+	-	2104	ND
Monossacarídeo	28,978	+	tr	2109	ND
Mio-inositol, (isômero 2), 6TMS	29,302	+	+	2127	2130
Ácido heptadecanoico, TMS	29,724	+	-	2150	2144
Álcool estearílico, TMS	29,916	+	tr	2161	2154
Ácido linoleico, TMS	30,914	+	+	2217	2210
Ácido α -linolênico, TMS	31,049	+	+	2225	2218
Ácido oleico, TMS	31,123	+	-	2230	2229
Monossacarídeo	31,312	+	-	2241	ND
Ácido esteárico, TMS	31,448	+	+	2249	2243
NI	31,756	+	-	2268	ND
NI	32,312	+	-	2301	ND
Monossacarídeo	32,397	+	tr	2306	2301
Monossacarídeo	33,044	+	+	2345	ND
NI	33,184	+	+	2353	ND
NI	33,356	+	+	2364	ND
1-Monomiristina, 2TMS	34,158	+	tr	2412	2418
Ácido eicosanóico, TMS	34,692	+	-	2447	2451
Uridina, 3 TMS	35,200	+	tr	2480	2470
NI	36,460	+	+	2561	ND
1-Monopalmitina 2TMS	37,126	+	+	2605	2606
NI	37,541	+	+	2634	ND
Ácido beénico, TMS	37,697	+	tr	2645	2644
NI	38,512	+	-	2702	ND
NI	38,877	+	-	2727	ND
NI	39,763	+	+	2783	ND

2-Monostearina, 2TMS	39,906	+	+	2779	2806
NI	39,984	+	+	2805	ND
NI	40,127	+	-	2815	ND
NI	40,138	-	+	2816	ND
NI	40,428	+	+	2838	ND
NI	41,290	+	+	2902	ND
NI	41,734	-	+	2936	ND
NI	43,783	+	-	3095	ND
NI	43,886	+	+	3103	ND
1-Octacosanol	44,434	+	+	3147	3139
NI	45,187	+	tr	3207	ND
NI	46,848	+	+	3348	ND
Estigmast-5-eno, 1TMS	47,279	+	+	3384	*
NI	50,234	-	+	3634	ND

TR: Tempo de retenção; IR exp: Índice de retenção experimental; IR lit: Índice de retenção relatado na literatura; D-D: Derivatização direta das folhas; E-D: Extração seguida de derivatização; NI: Não identificado; ND: Não determinado, tr= traço.

Desta forma, a extração seguida de derivatização foi utilizada para as análises por GC-MS, pois demonstrou-se satisfatória com a detecção de diversas classes de metabólitos, incluindo metabólitos primários como a leucina, isoleucina, xilitol e niacina; ácidos graxos dentre eles ácido esteárico e ácido beénico, além dos ácidos linolênicos e linoleico já conhecidos como participantes de mecanismos de defesa de plantas (SUMAYO et al., 2014; BABENKO et al., 2017); diferentes ácidos orgânicos tais como ácido propanoico, ácido láctico e ácido 2-butenodioico; e o esteroide estigmast-5-eno.

5.1.2.1 - Estabilidade da análise

A avaliação da estabilidade da amostra e método de análise foi realizada injetando a amostra nos tempos 0, 3, 6 e 12 horas após a derivatização. Os cromatogramas de cada análise foram comparados e examinados em termos qualitativos e quantitativos. Na FIGURA 5.5 pode-se observar que não houve alteração no perfil cromatográfico no decorrer do tempo e que os cromatogramas possuem perfis idênticos.

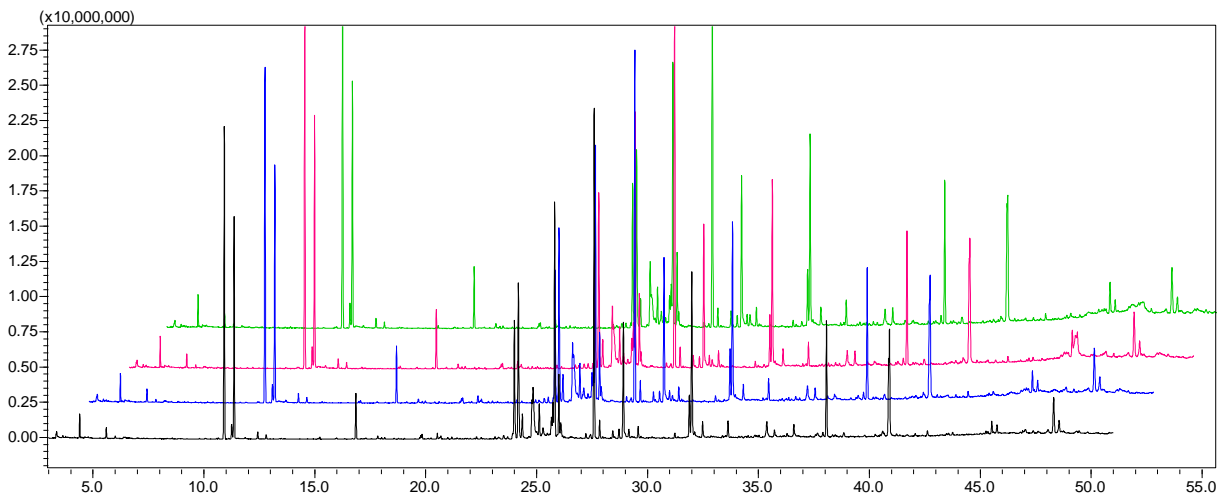


FIGURA 5.5 – Comparação do perfil químico de algodão por GC-MS nos tempos 0h, 3h, 6h e 12h após metodologia de extração seguida de derivatização. 0h preto; 3h azul; 6h rosa; 12h verde

Para ilustrar a estabilidade da amostra em termos quantitativos os compostos glicerol, ácido málico, ácido α -linoleico e sigmat-5-eno foram monitorados e os valores representados em abundância relativa ao padrão interno mentol (TABELA 5.2). O critério de escolha desses compostos se deve ao fato de pertencerem as diferentes classes de moléculas observadas e por se encontrarem em tempos de retenção que abrangem todo o cromatograma. Os valores de desvio padrão relativo estão em uma faixa entre 0,5 – 7,3, condizentes com as exigências da FDA (2018) que estipula valores de até 20% em casos de amostras biológicas analisadas por cromatografia. Pode-se observar também que os valores após 3 h ficam ainda mais semelhantes, o que confere reprodutibilidade e estabilidade da metodologia empregada.

TABELA 5.2 – Monitoramento da área relativa dos picos analisados por GC-MS em diferentes tempos após a derivatização.

Composto/ Tempo	0h	3h	6h	12h	DPR
Glicerol	67,39	68,08	68,14	68,20	0,56
Ácido málico	14,41	15,97	16,41	16,63	6,31
Ácido alfa linoleico	59,55	62,98	61,06	63,66	3,02
Sigmast-5-eno	17,72	19,44	19,39	21,15	7,22

DPR: Desvio Padrão relativo

5.1.3 - Análise por UPLC-QToF-MS

5.1.3.1 - Extração do material vegetal

Um dos maiores desafios em um estudo metabolômico é a escolha do solvente em virtude da diversidade das propriedades físico-químicas dos metabólitos presentes em matrizes biológicas, como polaridade, massa molecular e caráter ácido-base. Como não há um solvente capaz de extrair todos os compostos presentes em razão da variedade metabólica, o que se observa é um perfil limitado, como uma janela de extração, e não a totalidade metabolômica. Portanto, o solvente escolhido para uma análise metabolômica deverá ser capaz de extrair o maior número de compostos, das mais diferentes classes e em maior quantidade, além de ser compatível com o sistema analítico (HALL, 2006; KIM e VERPOORTE,2010).

A fim de obter uma extração otimizada, um planejamento fatorial foi realizado, como descrito na metodologia, item 4.4.2.2.2. Os aspectos avaliados foram método de extração, utilizando 3 equipamentos Vórtex - maceração, Ultraturrax 1 (IKA T10) ou Turrax 2 (IKA Tube Drive) - turbólise; solvente extrator, MeOH/H₂O (8:2) ou EtOH/H₂O (8:2) e proporção amostra/solvente extrator, 150 mg de folhas e 3 ml ou 6 ml de solvente. Os solventes e/ou a mistura de solventes metanol, etanol e água apresentam-se como interessantes para extração sendo comumente utilizados em análises cromatográficas e metabolômica (LEME et al., 2014; BIJTTEBIER et al., 2016).

Ao analisar os cromatogramas observa-se que o processo de turbólise foi mais efetivo que a agitação por vórtex (FIGURA 5.6), isto acontece porque a turbólise ao quebrar a parede celular extrai de forma mais eficiente as substâncias presentes no interior da folha, enquanto o Vórtex promove apenas uma agitação vigorosa, com equilíbrio e saturação entre o solvente e o interior da célula sem uma completa extração dos compostos (MELLO e VALONE, 2022).

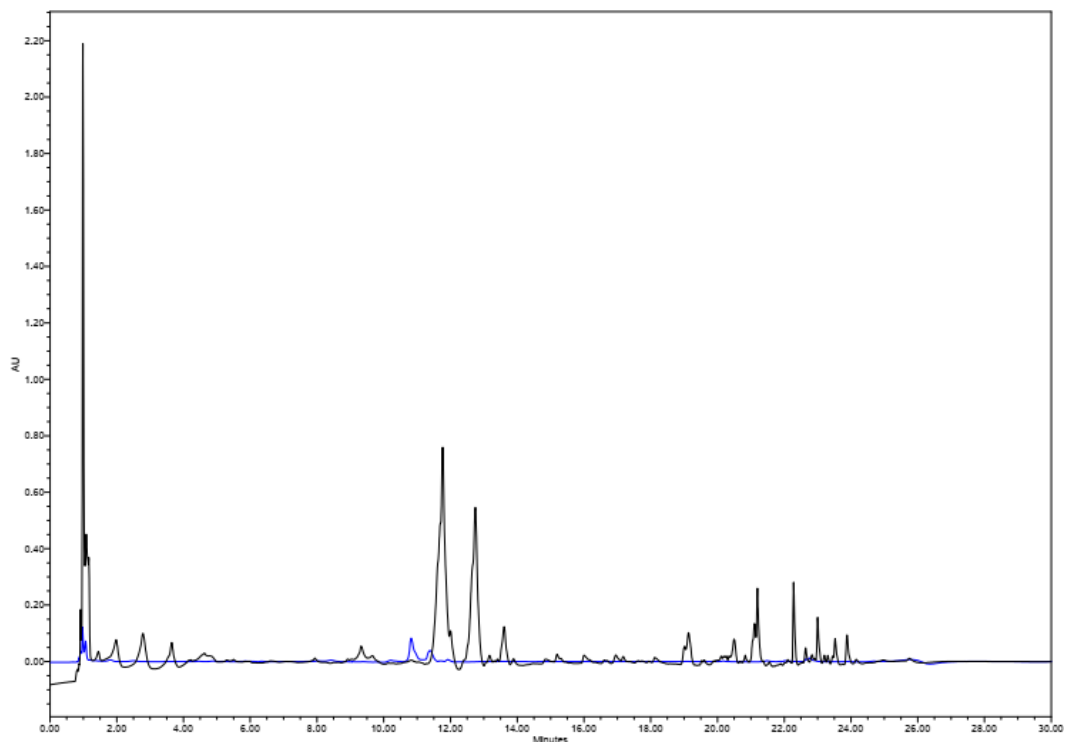


FIGURA 5.6 - Perfil químico comparativo das folhas de algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 7 e 11. Coluna C18 (1.7 μ m; 2.1 x 10mm), eluição em gradiente com MeOH/H₂O 10% \rightarrow 100% em 25min, permanecendo em 100% metanol até 30 min, 0,3 mlmin⁻¹. Exp 7 (preto): Turrax 2; Exp11 (azul): Vórtex. Solvente: 3 ml de MeOH/H₂O (8:2)

Ao compararmos os perfis cromatográficos dos experimentos 1, 2, 3 e 4 com os experimentos 5, 6, 7 e 8 observa-se que não há diferença significativa entre os Turrax 1 e 2 (FIGURAS 5.7 e 5.8). No entanto, o experimento com Turrax 2 inviabiliza a realização de experimentos de quantificação, por necessitar de várias etapas de transferência de amostra aumentando assim o erro operacional (CANUTO et al., 2018). Assim, a turbólise utilizando o Turrax 1 foi escolhida como método de extração.

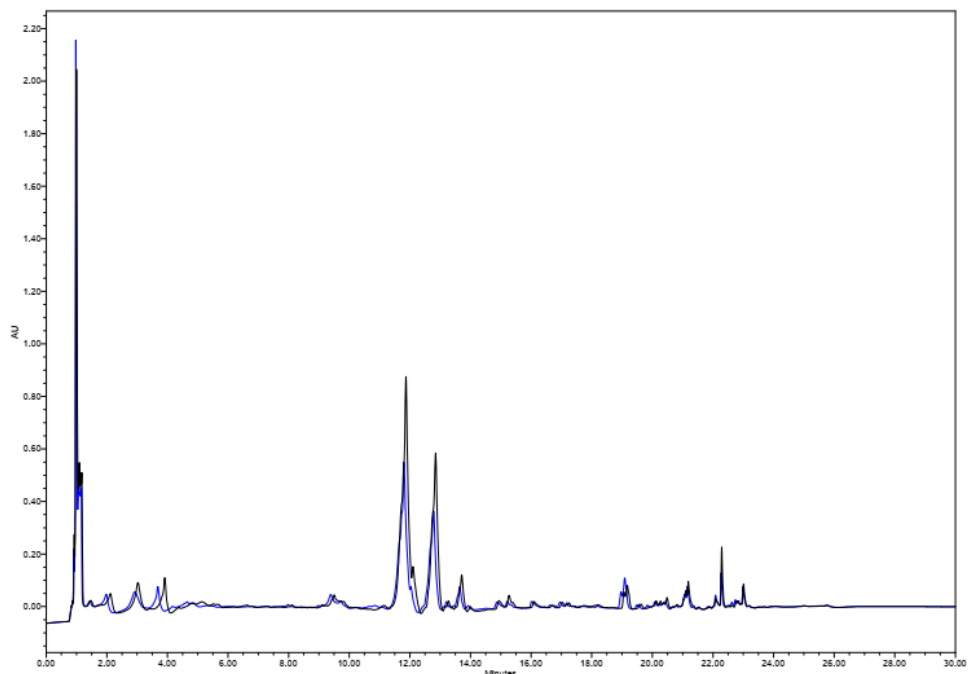


FIGURA 5.7 - Perfil químico comparativo do algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 1 e 5 da metodologia de extração. Coluna C18 (1.7 μ m; 2.1 x 10mm), eluição em gradiente com MeOH/H₂O 10% \rightarrow 100% em 25min, permanecendo em 100% metanol até 30 min, 0,3 mlmin⁻¹. Exp 1(preto): Turrax 1; Exp 5 (azul): Turrax 2; Solvente: 3ml de EtOH/H₂O (8:2)

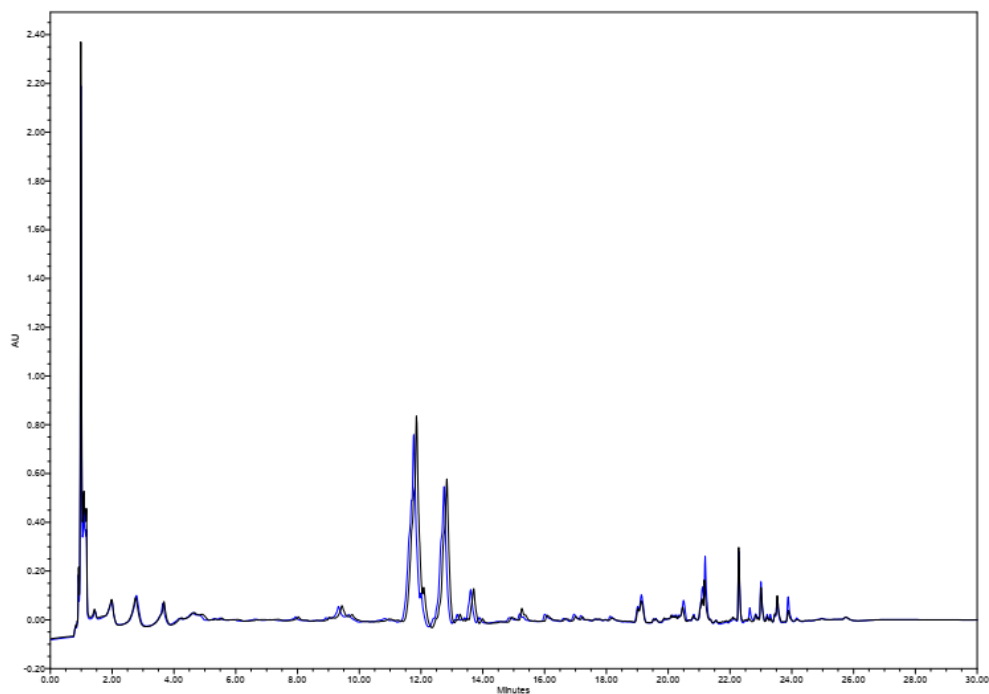


FIGURA 5.8 - Perfil químico comparativo do algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 3 e 7 da metodologia de extração. Coluna C18 (1.7 μ m; 2.1 x 10mm), eluição em gradiente com MeOH/H₂O 10% \rightarrow 100% em 25min, permanecendo em 100% metanol até 30 min, 0,3 mlmin⁻¹. Exp 3(preto): Turrax 1; Exp 7 (azul): Turrax 2; Solvente: 3ml de MeOH/H₂O (8:2)

Considerando os experimentos 1-4 (FIGURAS 5.9 e 5.10) verifica-se que há 2 picos cromatográficos próximos a 24 min a mais nos perfis 3 e 4, extraídos com metanol/água, que não são observadas nos experimentos 1 e 2, extraídos com etanol/água. Diante disto, o solvente MeOH/H₂O (8:2) foi escolhido como solvente extrator, porquanto foi capaz de extrair maior número de metabólitos, abrangendo também todos os metabólitos extraídos com etanol/água.

A variável proporção solvente/massa não demonstrou influência na extração nas proporções testadas, 3 ml ou 6 ml de solvente extrator para 150 mg de folhas, indicando que o volume de 3 ml é suficiente para extrair os metabólitos. Com isso, optou-se por utilizar 3 ml para minimizar o consumo de solvente. Portanto, a análise dos cromatogramas dos experimentos do planejamento fatorial apontou que o Exp 3 possui a melhor condição de extração, utilizando o Turrax 1 e 3 ml de MeOH/Água (8:2) como solvente extrator (FIGURA 5.11, TABELA 4.5). Assim a extração foi realizada conforme descrito no item 4.5.2.2.

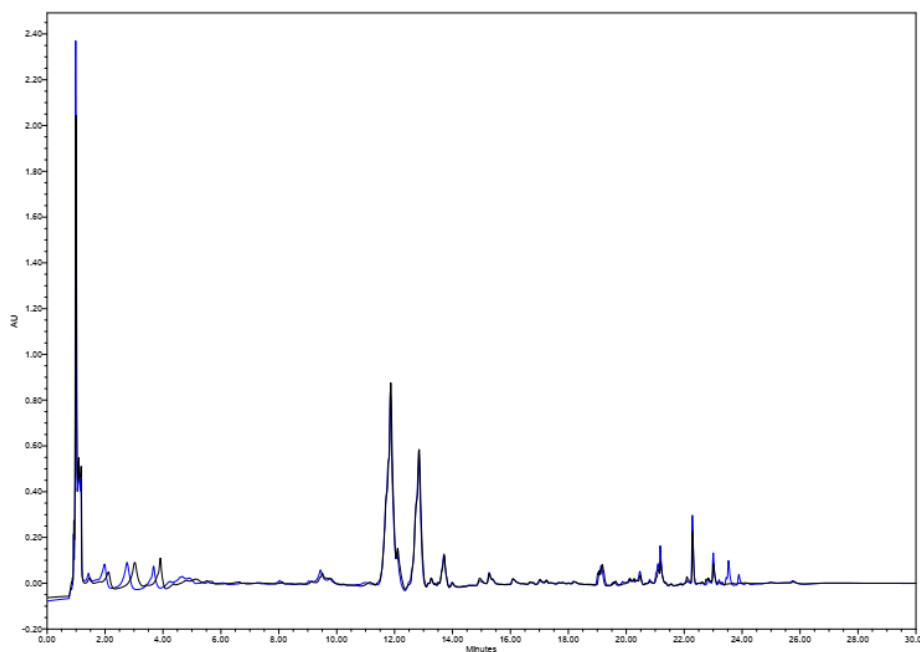


FIGURA 5.9 - Perfil químico comparativo do algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 1 e 3 da metodologia de extração. Coluna C18 (1.7 μ m; 2.1 x 10mm), eluição em gradiente com MeOH/H₂O 10% \rightarrow 100% em 25min, permanecendo em 100% metanol até 30 min, 0,3 mlmin⁻¹. Exp 1 (preto): EtOH/H₂O (8:2); Exp 3 (azul): MeOH/H₂O (8:2); Turrax 1, 3 ml de solvente extrator.

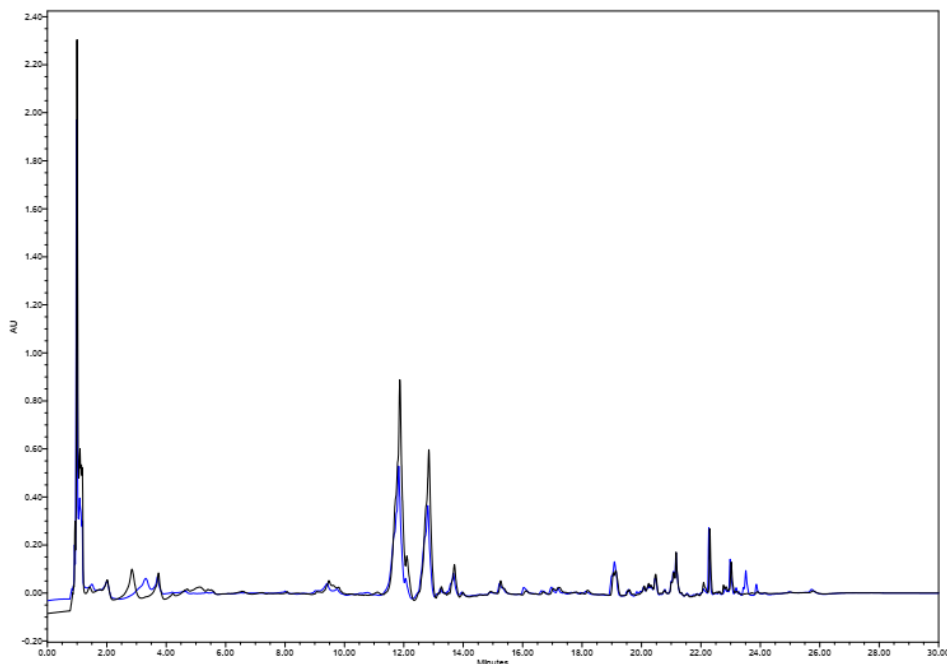


FIGURA 5.10 - Perfil químico comparativo do algodão obtido por UPLC-DAD-MS (Waters) dos experimentos 2 e 4 da metodologia de extração. Coluna C18 (1.7 μ m; 2.1 x 10mm), eluição em gradiente com MeOH/H₂O 10% \rightarrow 100% em 25min, permanecendo em 100% metanol até 30 min, 0,3 mlmin⁻¹. Exp 2(preto): EtOH/H₂O (8:2); Exp 4 (azul): MeOH/H₂O (8:2); Turrax 2, 3 ml de solvente extrator.

O preparo de amostra utilizando extração por fase sólida (SPE) é um dos métodos mais empregados, mas pode diminuir a gama de compostos observados, em consequência da seletividade durante o procedimento (VUCKOVIC, 2012). Desta forma, decidiu-se que o sobrenadante dos extratos centrifugados seria apenas filtrado com filtros de seringa PVDF, membrana de 0,22 μ m, antes da injeção, resultando em uma etapa a menos no procedimento com consequente diminuição do erro operacional. Uma alíquota de 100 μ L do padrão cafeína (0,1 mgml⁻¹) foi adicionada aos *vials* contendo 900 μ L do extrato filtrado, a fim de ser utilizada como padrão interno para a ionização e quantificação relativa dos compostos. A cafeína foi escolhida como padrão interno por não fazer parte dos metabólitos descritos para o algodão e por apresentar características físico-químicas semelhantes as esperadas para as classes dos compostos extraídos. A FIGURA 5.11 mostra a análise cromatográfica realizada em três comprimentos de onda diferentes utilizando a metodologia descrita para as análises por UPLC-DAD-MS (Waters), item 4.4.1. A FIGURA 5. 13 (Seção 5.1.3.3) apresenta a análise cromatográfica realizada em modo positivo e negativo após extração utilizando a metodologia otimizada e aplicada para as análises por UPLC-QToF-MS (Agilent).

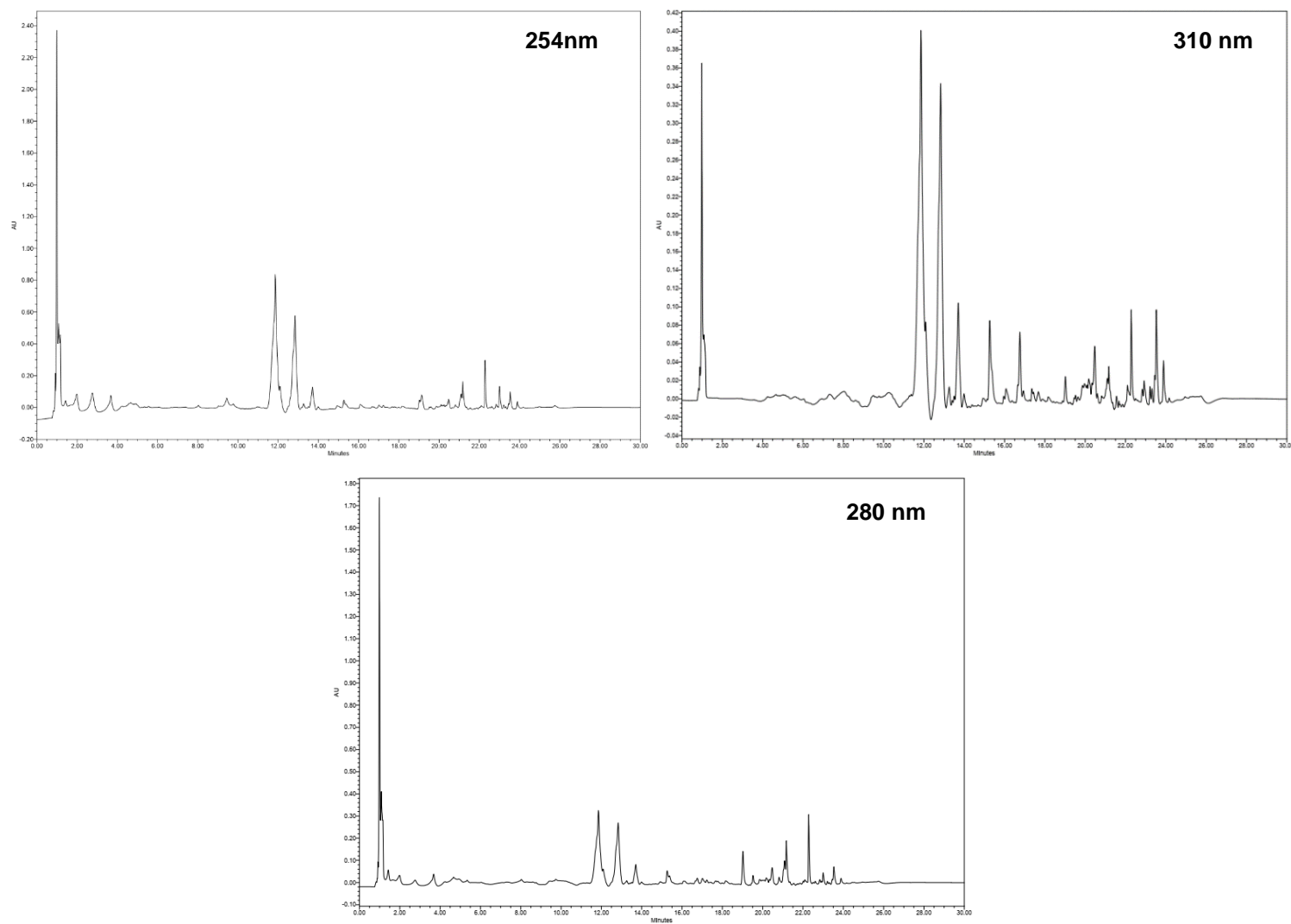


FIGURA 5 11 - Perfil químico do algodão em UPLC-DAD-MS (Waters) - experimento 3 - nos comprimentos de onda 254nm, 310nm e 280nm. Coluna C18 (1.7 μ m; 2.1 x 10mm), eluição em gradiente com MeOH/H₂O 10% \rightarrow 100% em 25min, permanecendo em 100% metanol até 30 min, 0,3 mlmin⁻¹.

5.1.3.2 - Estudo dos parâmetros de desempenho analítico

A validação parcial da metodologia de análises foi realizada avaliando os parâmetros de desempenho analítico como seletividade, linearidade, precisão e exatidão, uma vez que estes são alguns dos parâmetros a serem avaliados na validação de um método bioanalítico (CASSIANO et al., 2009).

Devido a impossibilidade de obter uma matriz isenta dos analitos de interesse, o método de adição de padrão foi aplicado para validação parcial do método (RIBANI et al., 2003). A daidzeína e naringenina foram utilizados como os padrões de referência adicionados, pois são dois flavonoides que não foram detectados nas análises por UPLC-QToF-MS e são da mesma classe dos potenciais metabólitos de interesse, como compostos participantes dos mecanismos de defesa de planta (RUTTANAPHAN et al., 2022; GOMEZ et al., 2018).

Duas curvas analíticas foram construídas e comparadas, uma curva contendo os padrões em solução e outra contendo os padrões na matriz (FIGURA 5.12). De acordo com os artigos 29 e 30 da resolução 166/2017 da ANVISA a ausência do efeito de matriz é comprovada quando as curvas de calibração dos padrões de referência em solução e na amostra fortificada são paralelas.

Na FIGURA 5.12 observa-se o paralelismo entre as curvas do padrão daidzeína em solução e na amostra sendo possível inferir que não há interferência da matriz na determinação da substância e o método pode ser considerado seletivo e não apresenta efeito de matriz.

O efeito de matriz é um importante parâmetro a ser avaliado, pois ele aponta o nível de interferência das substâncias presentes na matriz durante a detecção das substâncias de interesse; permitindo a avaliação da confiabilidade e seletividade do método (MATSZEWSKI et al., 2003).

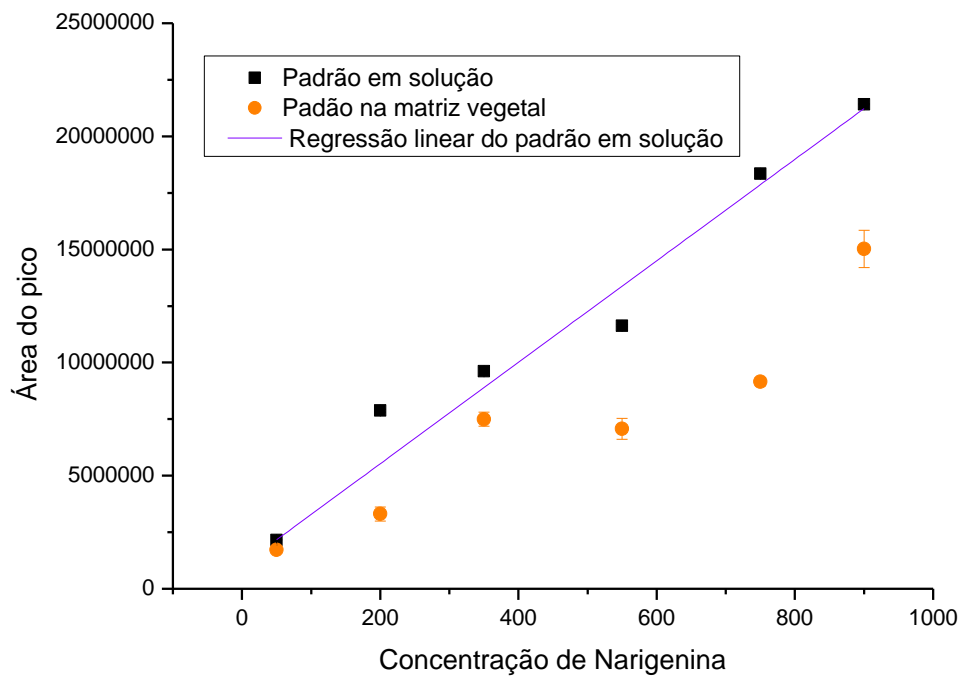
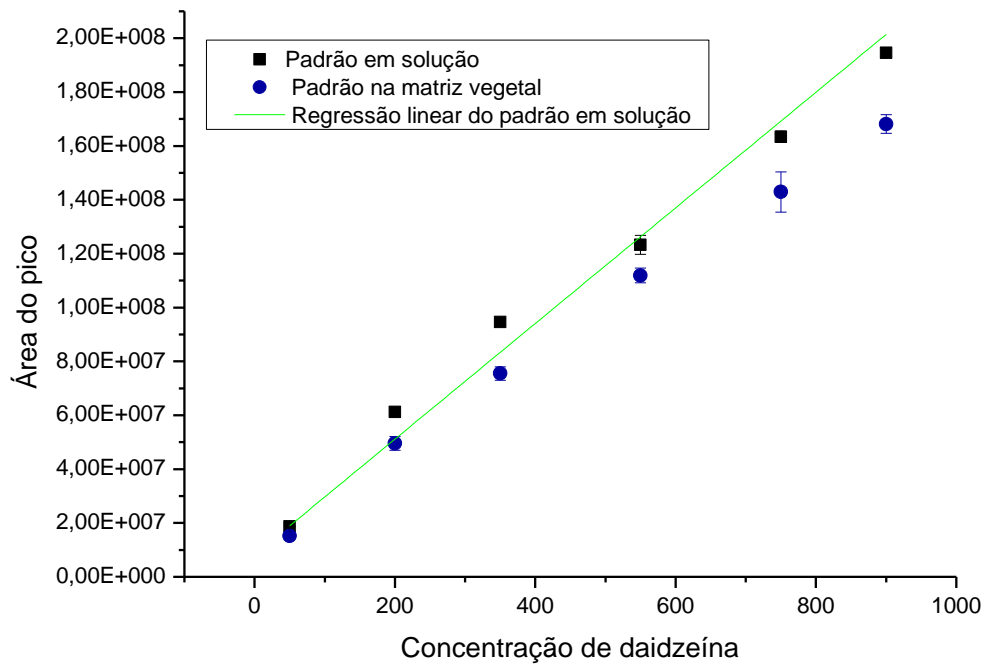


FIGURA 5.12- Curvas de calibração do padrão daidzeína e naringenina.

Para o padrão Naringenina observa-se um efeito de matriz principalmente nas concentrações mais altas, ou seja, as altas concentrações podem ter afetado a detecção do analito diminuindo a eficiência de ionização do mesmo, se configurando no efeito de matriz observado (FIGURA 5.12) (MATUSZEWSKI et al., 2003). Entretanto, o efeito pode ser aceitável pois se trata de uma matriz complexa e os estudos de recuperação demonstram que os níveis de naringenina recuperados ainda estão dentro do aceitável, bem como os desvio padrões, de modo que como as análises são comparativas entre uma amostra e outra o efeito de matriz não exerce forte influência nos resultados que serão apresentados.

A linearidade do método foi analisada pelo coeficiente de correlação das curvas analíticas (r). Um coeficiente próximo de 1,0 demonstra que há pouca dispersão dos pontos experimentais e a ANVISA recomenda que este valor seja acima de 0,990. O coeficiente de determinação das curvas (r^2) foram 0,98897 e 0,99358 para daidzeína e naringenina, respectivamente, o que demonstra que o método escolhido possui linearidade.

O ensaio de repetitividade como medida de precisão foi realizado com pontos em concentração alta, média e baixa. De acordo com a ANVISA (2017), desvios padrões de até 20% são aceitos para amostras complexas, como é o caso de uma matriz vegetal. Na dopagem com volume de 60, 425 e 810 μL dos padrões daidzeína e naringenina, o maior desvio padrão foi 4,41% (810 μL) para daidzeína e 18,41% (60 μL) para naringenina na matriz vegetal (TABELA 5.3).

TABELA 5.3 - Dados de recuperação nos níveis baixo, médio e alto dos padrões daidzeína e naringenina na matriz vegetal.

Volume adicionado	Daidzeína*			Naringenina*		
	Área \pm DP	%DP	%Rec	Área \pm DP	%DP	%Rec
60	16,575 \pm 0,08	0,49	78,62	1,44 \pm 0,27	18,41	60,43
425	92,30 \pm 2,20	2,39	92,82	10,91 \pm 0,72	6,56	103,20
810	150,43 \pm 6,63	4,41	82,61	14,95 \pm 2,29	13,35	54,33

Área: Área do pico 10^6 ; DP: Desvio Padrão; %Rec: Porcentagem recuperado do analito; * Daidzeína= 0,2 mgml^{-1} , Naringenina= 0,5 mgml^{-1} .

Utilizando ensaios de recuperação, nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de repetitividade, analisamos a exatidão do método. Para amostras complexas valores de recuperação entre 50 e 120% são aceitáveis. As porcentagens de recuperação para daidzeína e naringenina estão dentro da faixa aceita indicando que o método possui exatidão (TABELA 5.3).

Diante disso, o método de análise foi considerado satisfatório, possuindo bom desempenho analítico sendo aplicado nas análises deste estudo.

5.1.3.3 – Identificação dos metabólitos

Em metabolômica a identificação é comumente classificada em níveis, que abrangem desde substâncias caracterizadas, inclusive com determinação da estereoquímica, a substâncias não identificadas, mas que são monitoradas pois configuram-se em metabólitos diferenciais designados em análises (BLAŽENOVIC et al., 2018 e SUMNER et al., 2007), como descrito na tabela a seguir.

TABELA 5.4– Níveis de confiança de identificação dos compostos.

Nível 0	Isolado	Composto puro, isolado e com estrutura 3D determinada.
Nível 1	Identificado	Comparação com padrão de referência ou elucidação 2D. Utilização de pelo menos duas técnicas ortogonais (ex. MS/MS e RT)
Nível 2	Anotado	Provável estrutura com similaridade espectral com bancos de dados ou literatura e evidências que excluem outros candidatos.
Nível 3	Caracterizado	Possível estrutura ou classe, incluindo diferentes isômeros. Pelo menos uma informação que apoie a caracterização proposta como similaridade espectral com compostos conhecidos de uma classe química.
Nível 4	Monitorado	Candidato de interesse, porém não identificados ou caracterizados, mas que podem ser monitorados e quantificados.

Fonte: Adaptado de BLAŽENOVIC et al., 2018 e SUMNER et al., 2007.

As sugestões de identificação dos compostos presentes nas folhas de algodão estão apresentadas na TABELA 5.5. Uma diversidade de classes metabólicas foi observada, incluindo flavonoides, alcaloides, ácidos graxos, ácidos fenólicos, aminoácidos e esteroides (FIGURA 5.13 e TABELA 5.5).

As substâncias rutina e gossipol foram identificadas em nível 1, por comparação com padrões analíticos. Embora HANNY (1980) tenha relatado a presença de quercetinas diglicosiladas, este é o primeiro relato de rutina como componente das folhas de algodão.

Algumas das substâncias identificadas já foram relatadas para o algodão como anteriormente apresentado nas TABELAS 1.1 e 1.2 (Seção 2.3), por exemplo o gossipol e a hemigossipolona, o ácido cumárico - também observado nas análises por GC-MS, pelo menos dois isômeros de heliocide e diversas quercetinas e kaempferóis glicosilados. Os flavonoides glicosilados possuem diversos isômeros o que torna sua identificação difícil e por vezes inviável, uma vez que o método de análise não foi otimizado para uma substância específica e os padrões de fragmentação desses compostos pelo método escolhido não forneceu dados suficientes para a diferenciação desses isômeros, a maioria foi identificado a nível 3.

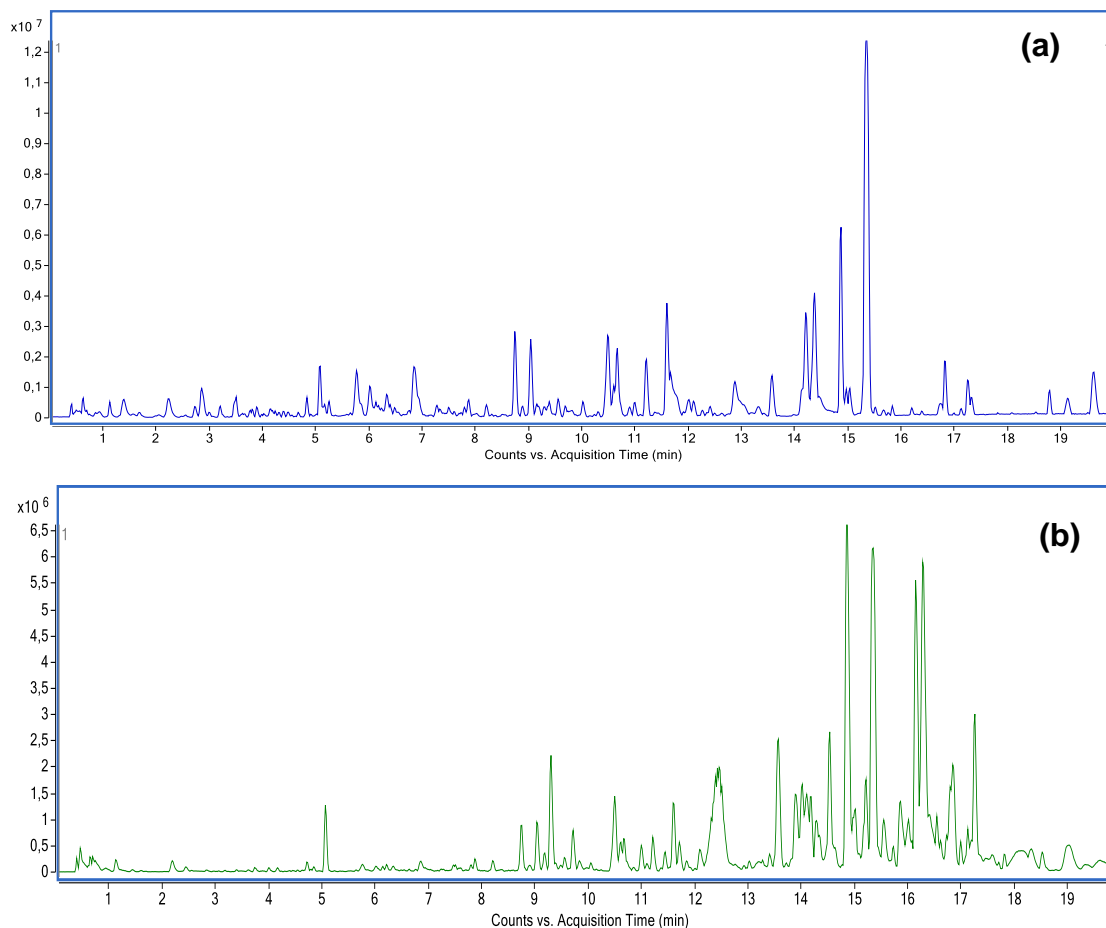


FIGURA 5.13 - Cromatograma modo positivo **(a)** e negativo **(b)** das folhas de algodão analisadas por UPLC QTof MS. Coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 μ m; 2.1 x 50mm), eluição em gradiente com ACN/H₂O 5% → 100% em 15min, permanecendo em 100% de acetonitrila por 5min, 0,3 mlmin⁻¹. Condições de análise Tabela 4.6 e 4.7.

TABELA 5.5 – Identificação dos metabólitos das folhas de algodão analisadas por UPLC-QToF-MS.

Anotação	Tempo de retenção	m/z experimental	Massa monoisotópica	Erro de massa (ppm)	Fórmula molecular	Fragmentação observada MS/MS (m/z)
N-(D-fructos-1-il)-L-fenilalanina	1.92	[M+H] ⁺ = 328.1387	327.1313	1.4	C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	167.0864; 166.0865; 127.0495; 121;0841; 120.0809;
ácido p-cumárico ácido m-cumárico	2.09	[M+H] ⁺ =165.0543	164.0473		C ₉ H ₈ O ₃	165.0543; 148.0471; 147.0440; 120.0520; 119.0488
2-O-cafeoilglucarato	2.70	[M+Na] ⁺ =395.0591	370.0536		C ₁₅ H ₁₆ O ₁₁	181.0498; 164.0424; 163.0394 145.0284; 135.0441
ácido p-cumárico ácido m-cumárico	3.50	[M+H] ⁺ =165.0543	164.0473		C ₉ H ₈ O ₃	165.0545; 148.0474; 147.0442; 120.0533; 119.0491
Quercetina 3-O-(6'' -malonil-glicosídeo) 7- glucosídeo	3.50	[M+Na] ⁺ =735.1375	712.1487		C ₃₀ H ₃₂ O ₂₀	735.1375; 554.0925; 303.0493
Ácido cafeico 4-O-glucuronídeo Ácido cafeico 3-O-glucuronídeo Cafeoil C1-glucuronídeo	3.71	[M+H] ⁺ =379.0644	378.0571	-2.18	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	401.0459; 757.1183; 779.1031
Gossipetina 3,5,8,3',4'-pentametiléter	4.13	[M+Na] ⁺ =411.1057	388.1158	-0.45	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	411.1057; 303.0497
Jasmonato de metila	4.27	[M+H] ⁺ =225.1485	224.1412	0.01	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	225.1485

Quercetina diglucosídeo	4.70	[M+H] ⁺ =627.1564	626.1483	-0.99	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1383; 303.0504
Miricetina diglucosídeo		[M-H] ⁻ =625.1390				465.1021
Ácido 3,7 dimetil, 2,6-decadien-1,10-dioico	5.06	[M+H] ⁺ = 227.1280 [M+Na] ⁺ = 249.1107 [2M+Na] ⁺ = 475.2329	226.1207	0.91	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	
Rutina	5.09	[M+H] ⁺ =611.1604	610.1533		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	633.1427; 619.1277; 597.1457 465.1033; 435.0923; 455.1729 303.0505 595.1340
		[M-H] ⁻ =609.1433				
Kaempferol-pent-glicosídeo	5.17	[M+H] ⁺ =581.1487 [M+Na] ⁺ =603.1304	580.1423		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	449.1066; 287.0545
Kaempferol-glicosídeo	5,60	[M+H] ⁺ = 449.1069 [M+Na] ⁺ = 471.0886	448.1005		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	287.0586
Quercetina-hexose	5.25	[M+H] ⁺ = 465.1044		-1.05	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0855; 303.0509; 951.1802 927.1829
		[M-H] ⁻ = 463.0905				
Quercetina-malonilglicosídeo	5.44	[M+H] ⁺ = 551.1017 [M+Na] ⁺ = 273.0829	550.0959		C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	303.0486
Quercetina-pentose	5.49	[M+H] ⁺ = 435.0911 [M+Na] ⁺ = 457.0723	434.0949		C ₁₅ H ₁₈ O ₉	303.0490

Ácido jasmônico	5.61	[M+H] ⁺ =211.1331	210.1256	1.26	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	
Kaempferol - pentose	5.79	[M+H] ⁺ = 419.0961			C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	287.0542
Heliotrina	4.45	[M+H] ⁺ =314.1960 [M+Na] ⁺ = 336.1782	313.1889	0.04	C ₁₆ H ₂₇ NO ₅	
Ácido Hidroxitetradecanóico	6.82	[M+NH ₄] ⁺ = 262.2379		-0.42	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	195.1742; 177.1635
N-jasmonoilsoleucina	7.10	[M+H] ⁺ = 324.2169	323.2093	-1.09	C ₁₈ H ₂₉ NO ₄	
4'-metiliquiritigenina 7-raminosídeo	7.21	[M+NH ₄] ⁺ =434.1793	416.1471		C ₂₂ H ₂₄ O ₈	
Jasmolona	9.08	[M+H] ⁺ =181.1226	180.1150	-1.2	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	203.1045; 163.1120
Celastrol	10.95	[M+H] ⁺ =451.2844	450.2769	-0.16	C ₂₉ H ₃₈ O ₄	473.2656
N-linolenil glutamina	11.81	[M+H] ⁺ = 407.2901 [M+Na] ⁺ = 429.2731	406.2828	-0.77	C ₂₃ H ₃₈ N ₂ O ₄	277.2174; 317.2090; 121.1011; 135.1168
Hemigossipol	14,48	[M+H] ⁺ = 261.1120	260.1047	-0.16	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	

Helicoides B2	14.49	[M+H] ⁺ =425.2316 [M+Na] ⁺ = 447.2122	424.2236	-3.24	C ₂₆ H ₃₂ O ₅	
Helicoides H1, H2, H3 ou H4	14.93	[M+H] ⁺ =411.2169	410.1093	-0.45	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	433.1988
Gossipol	14.96	[M+H] ⁺ = 519.1290	518.5630	0	C ₃₀ H ₃₀ O ₈	*
Helicoides H1, H2, H3 ou H4	15.08	[M+H] ⁺ =411.2171	410.1093	-0.98	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	433.1986
N-linolenil- valina	15.19	[M+H] ⁺ = 380.3168 [M+Na] ⁺ = 402.3013	379.3093	1.76	C ₂₃ H ₄₁ NO ₃	121.1010; 135.1168; 277.2161; 295.2291; 317.2086;
1-Monopalmitin 2-Monopalmitin	15.72	[M+H] ⁺ =331.2829 [M+Na] ⁺ = 353.26.52	330.2764	1.96	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	313.2729; 281.2468; 257.2466; 239.2367; 138.1021; 124.0875
Cis-jasmona	15.78	[M+H] ⁺ =165.1268	164.1201	-2.26	C ₁₁ H ₁₆ O	

*identificada por comparação com padrão analítico

Devido a grande quantidade de dados e a diversidade de classes metabólicas e de metabólitos não é possível realizar uma identificação completa e precisa de todos os metabólitos presentes nos diferentes genótipos e experimentos. Adicionalmente, existe uma deficiência de cobertura dos bancos de dados uma vez que se trata de uma técnica relativamente recente (CAO et al., 2016). A existência de isômeros com possibilidade de substituintes em diferentes posições também se configura como um desafio para uma identificação precisa, pois os espectros de massa obtidos não permitiram a diferenciação desses isômeros. Por isso, os metabólitos foram anotados na TABELA 5.5 levando em consideração principalmente a maior precisão de identificação dentre aqueles que se destacaram em algum experimento ou genótipo.

5.2 – Resistência constitutiva

Após o desenvolvimento dos métodos de preparo e análise das amostras, os métodos foram aplicados nos experimentos propostos com os 12 genótipos de algodão a fim de observar o perfil metabolômico e a variabilidade metabólica dos cultivares.

As análises apontaram a presença dos esteroides estigmasterol e estigmast-5-ene e o flavonoide rutina que são aqui descritos pela primeira vez para o algodão, sendo encontrados nos doze genótipos. Além deles, algumas substâncias não identificadas na análise de desenvolvimento do método para GC-MS (TABELA 5.1) foram detectadas na análise individual dos genótipos, dentre elas: o campesterol, γ -sitosterol, α -tocoferol, 1-linolenoilglicerol e 2-linolenoilglicerol (Apêndice A).

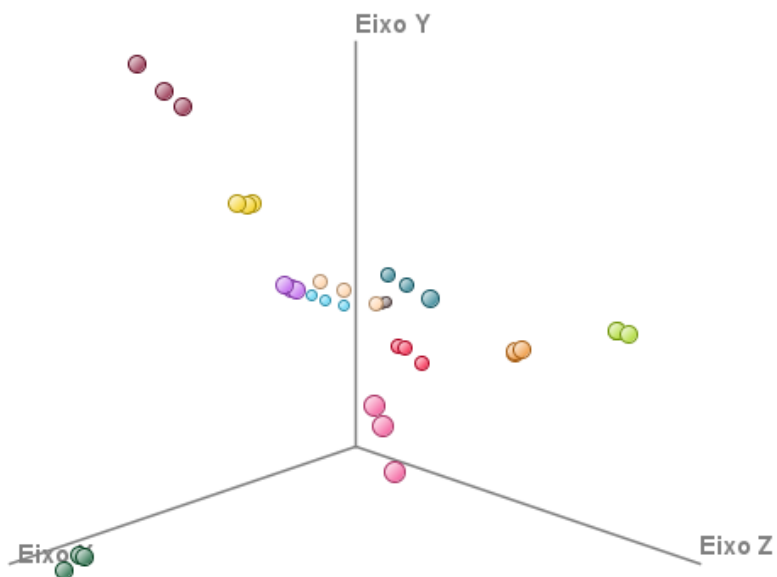
A análise dos componentes principais foi realizada utilizando os dados obtidos por GC-MS e UPLC-QToF-MS, separadamente, com intuito de observar os dados multivariados em um espaço dimensional menor possibilitando examinar as relações entre as amostras sem que elas sejam afetadas e simultaneamente examinar as diferenças existente entre os genótipos (FERREIRA, 2015). As FIGURAS 5.14 e 5.15 apresentam os gráficos de PCA dos 12 genótipos analisados por GC-MS e UPLC-QToF-MS, respectivamente.

O PCA dos 12 genótipos por análise do GC-MS condensou graficamente apenas 48,37% das informações (FIGURA 5.14a). No entanto, ainda é possível observar a separação dos genótipos FMX 993, FMX 910, FMT 709, FMT 701 e FMT 707 dos demais genótipos pela PC1 (FIGURA 5.14b).

A PCA com o perfil metabolômico por UPLC-QToF-MS explicou 64,57% das informações dos dados, com 41,85% para PC1, 13,02% para PC2 e 9,7% para PC3 (FIGURA 5.15a). Do lado inferior direito estão agrupados os genótipos BRS 286, BRS 335 e BRS 336, indicando semelhança metabólica entre estes, estes separam-se dos demais genótipos pela PC1 e do genótipo FMT 709 pela PC1 e PC2 (FIGURA 5.15b).

A diferença metabólica entre os cultivares era esperada, pois apesar de ser a mesma espécie são variedades genéticas diferentes e conseqüentemente essas modificações genéticas onde genes são expressos ou silenciados alteram as rotas biossintéticas modificando o perfil químico observado, uma vez que os metabólitos são os produtos finais destas rotas (OLIVER et al. 2002).

(a)



(b)

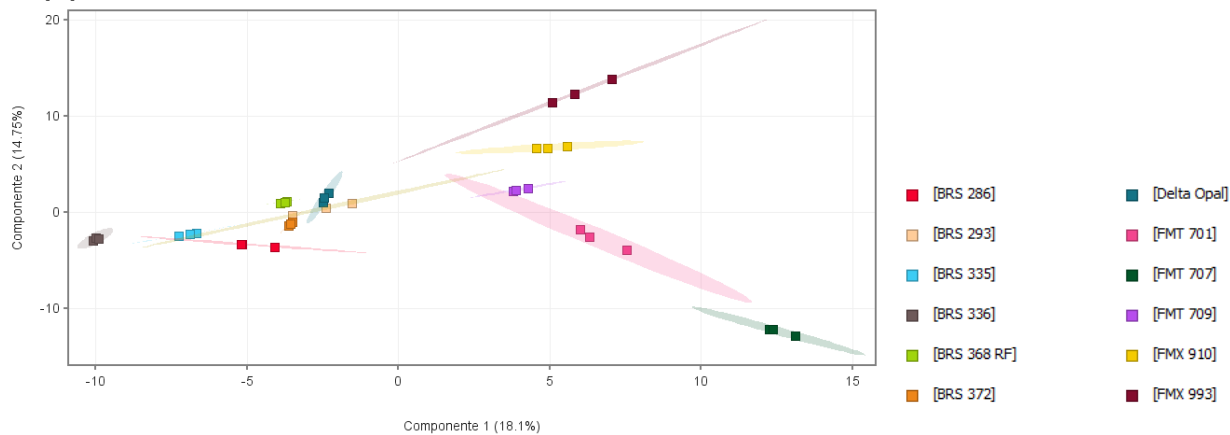


FIGURA 5.14 - Análise dos Componentes principais dos dados do perfil metabólico dos doze genótipos de algodão analisados por GC-MS. (a) Gráfico dos escores PC1 x PC2 x PC3 e (b) Gráfico dos scores PC1 x PC2

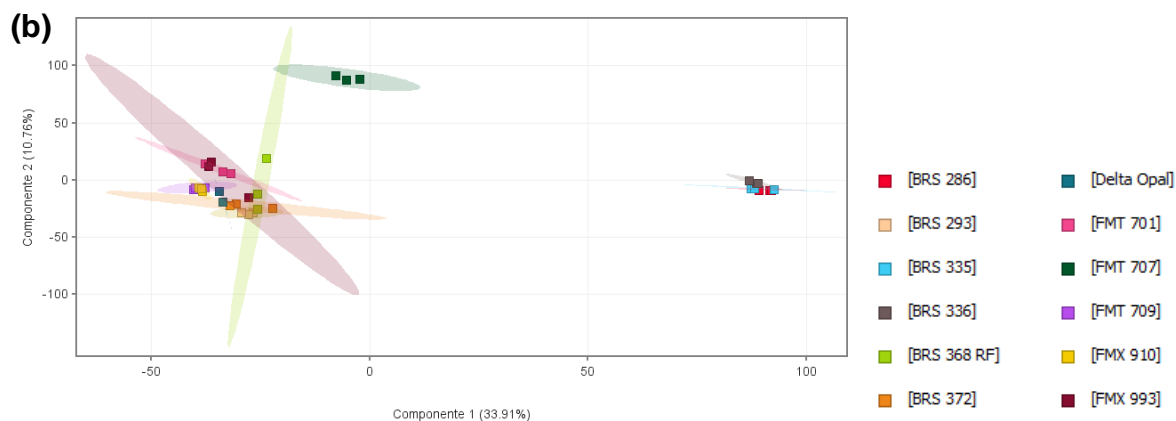
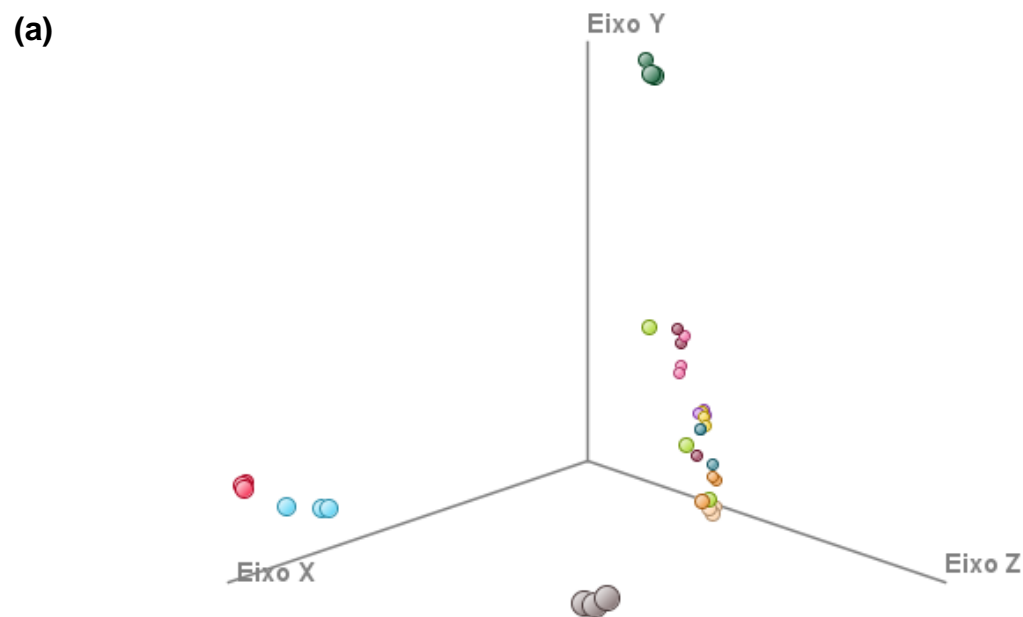


FIGURA 5.15 - Análise dos Componentes principais dos dados do perfil metabolômico dos doze genótipos de algodão analisados por UPLC-QToF-MS. **(a)** Gráfico dos escores PC1 x PC2 PC3 e **(b)** Gráfico dos scores PC1 x PC2

As análises hierárquicas foram realizadas com o método Ward e os dendrogramas apresentam as amostras distribuídas em dois grupos principais. Contudo, os agrupamentos são diferentes dependendo dos dados utilizados, isto é, se o perfil metabolômico foi adquirido por GC-MS ou por UPLC-QToF-MS (FIGURAS 5.16 e 5.18).

Entende-se que os agrupamentos distintos são decorrentes dos perfis metabolômicos diferentes analisados, mesmo tratando-se da mesma matriz vegetal. Enquanto no método aplicado de extração, preparo de amostra e as análises por GC-MS observa-se principalmente metabólitos primários como açúcares, ácidos graxos e

aminoácidos, além de metabólitos secundários mais apolares como os terpenos; na metodologia empregada para análise por UPLC-QToF-MS observa-se metabólitos secundários mais polares como os flavonoides e alcaloides.

No dendrograma com os dados do perfil químico por GC-MS a separação parece ocorrer pela empresa de origem do genótipo, com os genótipos FMT 701 e FMT 707 (G1), FMX 910 e FMX 993 (G2), e os genótipos BRS 286, BRS 335 e BRS 336 (G3) formando subgrupos entre si (FIGURA 5.16), provavelmente por cada empresa utilizar processos tecnológicos semelhantes que deu origem as suas variedades.

O cultivar FMT 701 possui alta tolerância aos nematoides *Rotylenchulus reniformis* e *Meloidogyne incógnita* (nematóide das galhas) e possui ciclo tardio, enquanto o cultivar FMT 707 possui resistência à ramulária e nematóides e é mais indicado para começo de plantio, sendo de ciclo médio (GIRASSOL AGRÍCOLA, 2022; GAZETA DIGITAL, 2008, PIMENTEL, 2012).

Essas duas variedades, FMT 701 e FMT 707, formam um grupo menor (G1) sendo discriminado de todas as outras variedades agrupadas com uma distância maior que 22,0 demonstrando a baixa similaridade entre G1 e os demais grupos. Com isso entende-se que os genótipos FMT 701 e FMT 707 possuem perfis químicos semelhantes - adquiridos por GC-MS - como apresentado no dendrograma e no PCA, em que os genótipos estão posicionados no mesmo quadrante (FIGURAS 5.14b e 5.16). Tal semelhança metabólica também foi observada pelos estudos de AQUINO (2020) que analisou os compostos voláteis dos mesmos 12 genótipos de algodão e verificou também a semelhança entre os dois genótipos na HCA (FIGURA 5.17).

FREITAS (2019), avaliando a influência de diferentes genótipos de algodão sobre os hábitos alimentares, desenvolvimento e parâmetros nutricionais de *Spodoptera cosmióides*, demonstrou que lagartas que se alimentavam de FMT 701 e FMT 707 apresentam o mesmo período de desenvolvimento larval. Além disso, o cultivar FMT 701 apresentou repelência em comparação aos outros cultivares e o FMT 707 apesar de apresentar-se como neutro no teste de repelência, apresenta menor consumo foliar pelas lagartas. O pesquisador conclui que o genótipo FMT 707 possui efeito de antibiose e que possivelmente há alguma característica da planta que influencia negativamente o comportamento de alimentação de *Spodoptera cosmióides*.

As análises por GC-MS apontam 3 compostos responsáveis pela maior diferenciação de FMT 707 com os demais genótipos, a uracila, a timina e o fitol. A uracila (RT= 12,95 min) está presente apenas no genótipo FMT 707 e no genótipo FMX 993, quando este é submetido a herbivoria; a timina (RT= 14,52 min) está presente no genótipo FMT 701 e nos genótipos FMX 993 e BRS 293 sob condições de herbivoria; e o fitol observado em quase todos os genótipos submetidos a herbivoria e amostras controle, exceto no BRS 372 em que está presente apenas sob condições de indução de resistência por herbivoria. Adicionalmente, verifica-se que o fitol, embora esteja presente em 11 genótipos, está em maior quantidade no genótipo FMT 707 (Apêndice A).

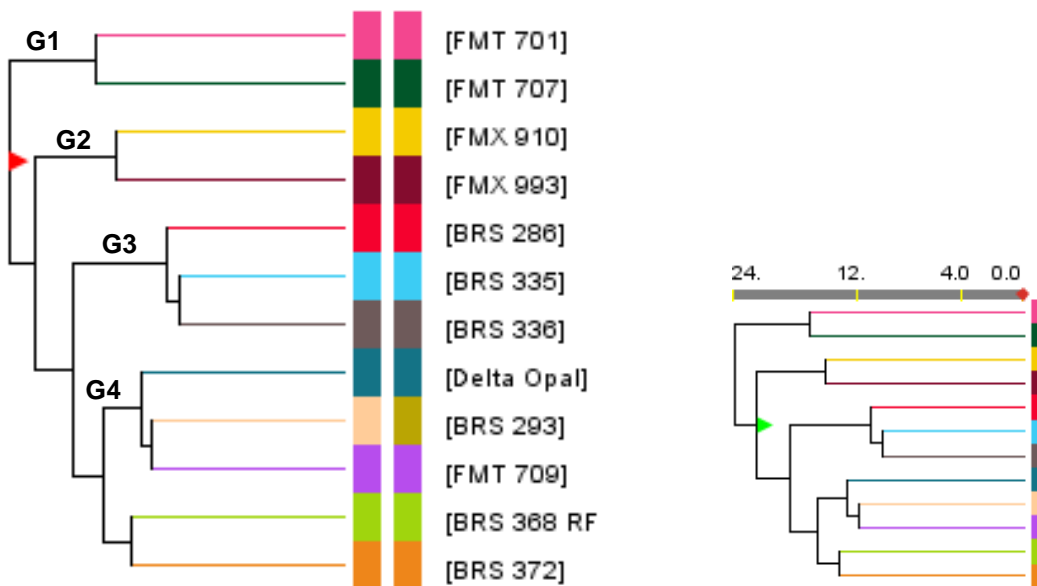


FIGURA 5. 16 – Dendrograma dos perfis químicos das folhas de 12 genótipos de algodão analisados por GC-MS.

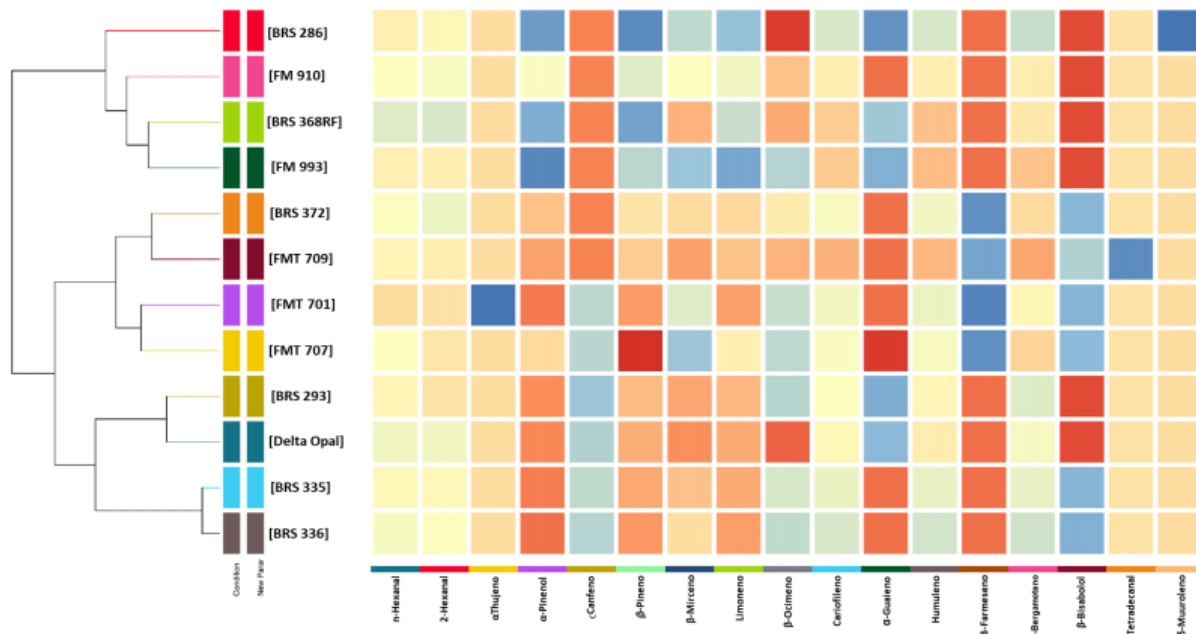


FIGURA 5. 17 – Dendrograma dos componentes voláteis das folhas de 12 genótipos de algodão analisados por GC-MS. Fonte: AQUINO, 2020.

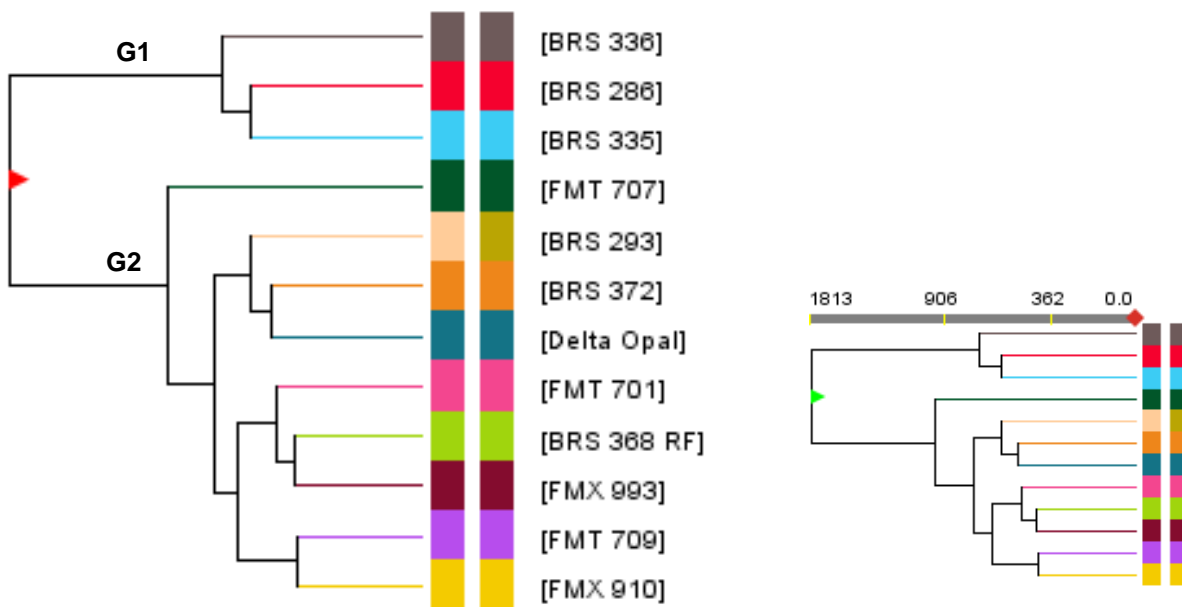


FIGURA 5. 18 – Dendrograma dos perfis químicos das folhas de 12 genótipos de algodão analisados por UPLC-QToF-MS.

Para as análises UPLC-QToF-MS apesar dos cultivares FMT 701 e FMT 707 estarem posicionados no mesmo grupo na HCA, eles se encontram em subgrupos

diferentes, com uma distância de 961 e o genótipo FMT 707 se diferenciando de todos os demais genótipos do subgrupo (FIGURA 5.18). A PCA também apresenta o cultivar FMT 707 como não agrupado com nenhum outro genótipo, demonstrando que há diferenças a nível metabólico entre eles (FIGURA 5.15).

O dendrograma das análises por UPLC-QToF-MS apontou dois grupos principais. O G1 formado pelos genótipos BRS 336, BRS 335 e BRS 286 e o G2 por todos os demais cultivares que se posicionaram em outros subgrupos. A similaridade entre as variedades genéticas contidas no grupo G1 também foi observada no HCA das análises por GC-MS em que os três genótipos se agruparam no subgrupo G3. Além disso a semelhança metabólica entre os genótipos BRS 335 e BRS 336 foi apontada por AQUINO (2020) ao estudar os voláteis das folhas de algodão (FIGURA 5.17).

Os cultivares Delta Opal e BRS 293 também demonstraram possuir perfis químicos semelhantes entre si, sendo agrupados no mesmo subgrupo nos HCAs pelos dois métodos de análise bem como no estudo dos voláteis por Aquino (2020). Na avaliação de FREITAS (2019) os dois cultivares foram considerados moderadamente resistentes a *Spodoptera cosmioides*. Embora o cultivar BRS 293 possa atrair mais as lagartas *S. cosmioides*, ele apresentou menor área foliar consumida quando comparado aos outros genótipos no teste sem chance de escolha, viabilidade total, além de baixa adaptabilidade da lagarta. Para o Delta Opal o consumo foliar foi elevado, mas observou-se baixa viabilidade larval e total, além de baixo índice de adaptação e RGR (taxa de crescimento relativo), assim a lagarta parece ter tentado suprir um desequilíbrio nutricional elevando sua taxa de consumo. Desta forma, mesmo por causas aparentemente distintas de defesa, os genótipos possuem resistência moderada por efeito de antibiose. Portanto, a semelhança metabólica apontada nas análises multivariadas e o efeito de antibiose descrito por FREITAS (2019) para os dois genótipos parecem estar em concordância.

A TABELA dos dados de GC-MS com as substâncias observadas para cada um dos genótipos e suas perspectivas áreas relativas ao padrão interno mentol está apresentada no apêndice A.

5.3 – Resistência induzida por herbivoria com *Spodoptera cosmioides*

A resposta dos genótipos de algodão frente a herbivoria por *S. cosmioides* foi avaliada e os dados multivariados foram projetados nos gráficos de PCA geral - os doze genótipos e seus respectivos experimentos de injúria por herbivoria (FIGURA 5.19 e 5.20). No PCA com os dados de GC-MS a variância total explicada foi de apenas 32,17% e para os dados de UPLC-QToF-MS de 56,14% (FIGURA 19a e 20a), sendo possível ter uma visão geral sobre os experimentos, mas com informação insuficiente para direcionar a busca por diferenças metabólicas.

Diante disso, gráficos de PCA individuais para cada genótipo – genótipo *versus* genótipo submetido a herbivoria – foram realizados a fim de ter uma resposta mais direta para cada genótipo. Todos os genótipos demonstraram resposta metabólica a herbivoria pelos dois métodos de análise, sendo separados principalmente pela PC1 com explicação de até 98,76% da variância explicada dos dados de GC-MS e 99,48% para o UPLC-MS-QToF (Apêndice B).

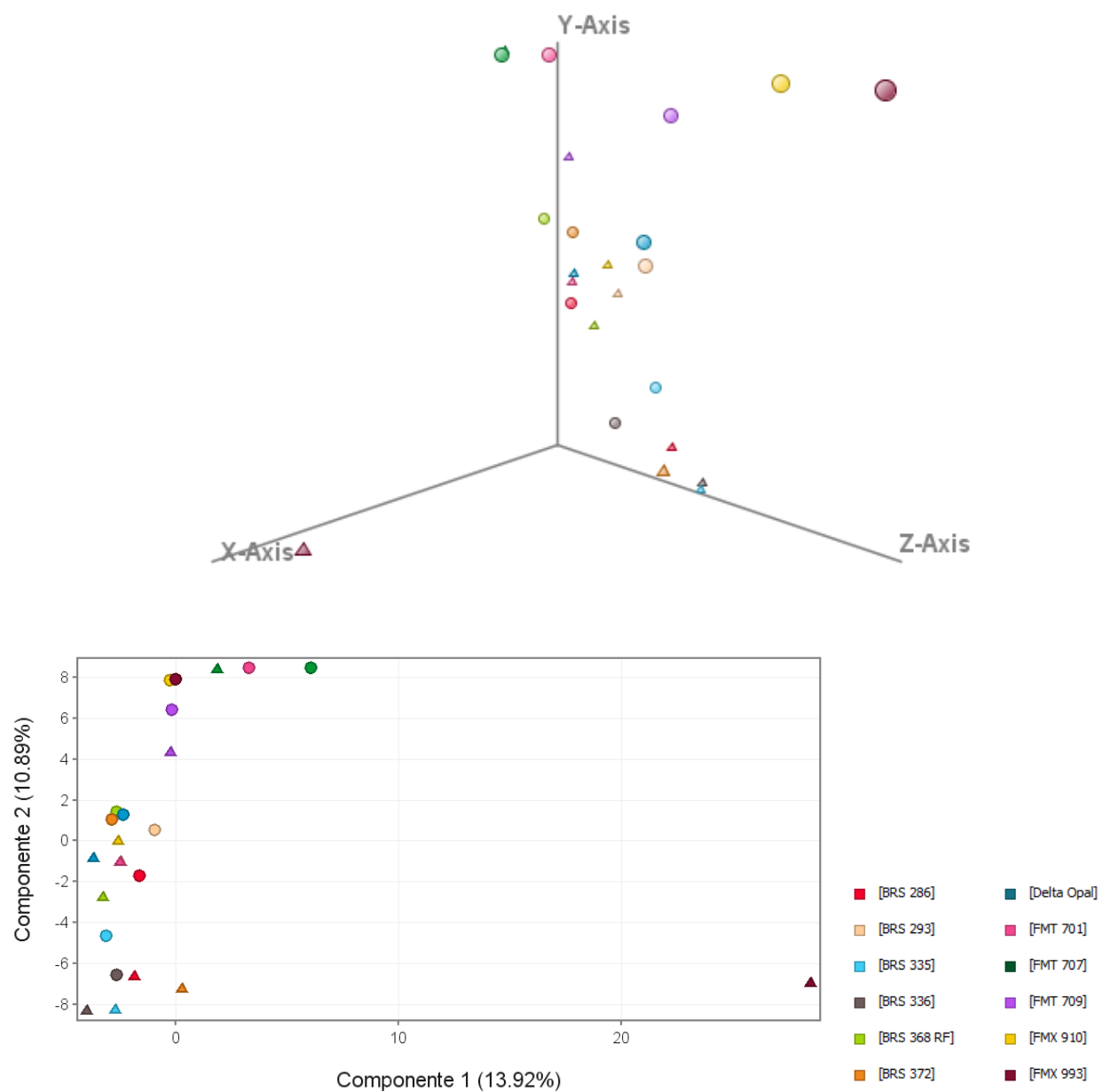


FIGURA 5.19 – Análise dos Componentes Principais dos dados do perfil metabolômico dos doze genótipos de algodão, genótipo controle (**bolinha**) e genótipo submetido a herbivoria por *S. cosmioides* (**triângulo**) analisados por GC-MS. **(a)** Gráfico dos escores PC1 x PC2 x PC3 e **(b)** Gráfico dos scores PC1 x PC2

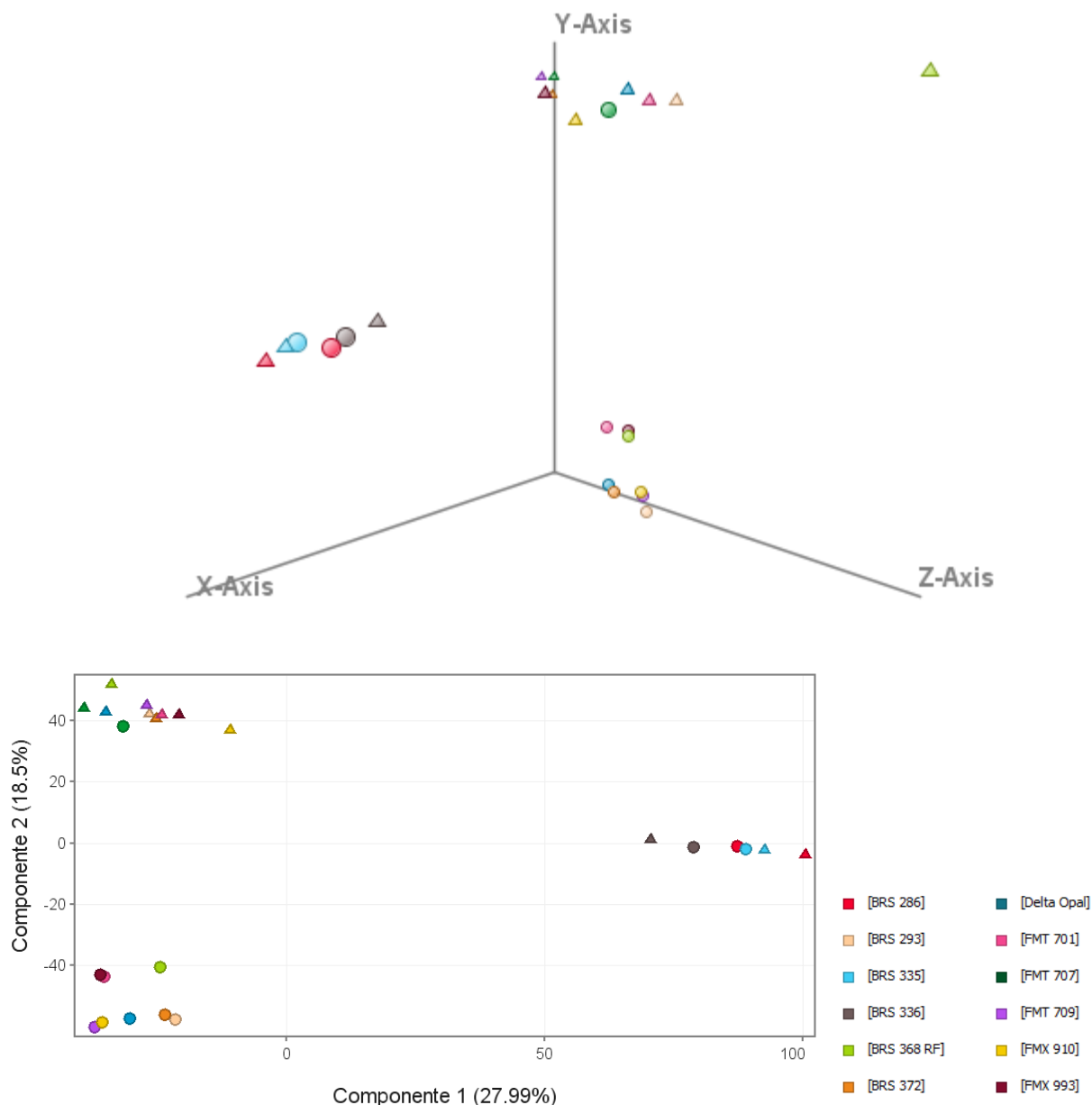


FIGURA 5.20 - Análise dos Componentes Principais dos dados do perfil metabólico dos doze genótipos de algodão, genótipo controle (**bolinha**) e genótipo submetido a herbivoria por *S. cosmioides* (**triângulo**) analisados por UPLC-QToF-MS. **(a)** Gráfico dos escores PC1 x PC2 x PC3 e **(b)** Gráfico dos scores PC1 x PC2

Ao analisar as respostas da herbivoria a nível metabólico e correlacionar aos resultados obtidos por AQUINO (2020) e FREITAS (2019) alguns genótipos demonstraram-se interessantes e uma investigação mais detalhada foi realizada com os genótipos escolhidos. Com os genótipos Delta Opal e FMT 701 experimentos adicionais foram realizados e os resultados da indução por herbivoria estão discutidos no item 5.4.

- BRS 286

O cultivar BRS 286 foi desenvolvido para os biomas cerrado e caatinga pela Fundação Bahia, EMBRAPA Algodão e EDBA (Empresa Bahiana de Desenvolvimento Agrícola). Este cultivar possui boa produtividade em pluma e caroço, superando outros genótipos já utilizados como BRS Ipê e BRS Camaçari e apresenta resistência as principais pragas que atinge o algodão cultivado no cerrado e semi-árido da Bahia - a mancha angular, mosaico de nervura e mosaico comum - e possui resistência moderada ao complexo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* - *Meloidogyne incógnita*/*Rotylenchulus reniforme* (EMBRAPA, 2009). O genótipo BRS 286 também foi testado para interação com *Bacillus thuringiensis* (Bt) a fim de promover resistência a *Spodoptera frugiperda*, no entanto, a inoculação não ocasionou resultados diferentes dos observados para o grupo controle e testes adicionais não foram realizados (COSTA, 2020).

A avaliação da resistência induzida por injúria causada por *S. cosmioides* no genótipo BRS 286 indicou que o cultivar apresenta resposta metabólica significativa ao ser submetido a esta herbivoria. As FIGURAS 5.21 e 5.22 apresentam os gráficos de PC1 versus PC2 obtidos pela análise de GC-MS e UPLC-QToF-MS, respectivamente, do genótipo BRS 286 e do genótipo submetido a indução de resistência por *S. cosmioides* (BRS 286 In). As amostras foram separadas principalmente pela PC1, que foi capaz de explicar 98,76% da variância observada nas análises por GC-MS e 98,99% da variância nas análises por UPLC-MS. AQUINO (2020) também observou variação metabólica dos compostos voláteis neste cultivar ao ser submetido a injúria por *S. cosmioides*. e FREITAS (2019) afirma que esse genótipo apresenta resistência a *S. cosmioides* ao realizar testes de consumo foliar

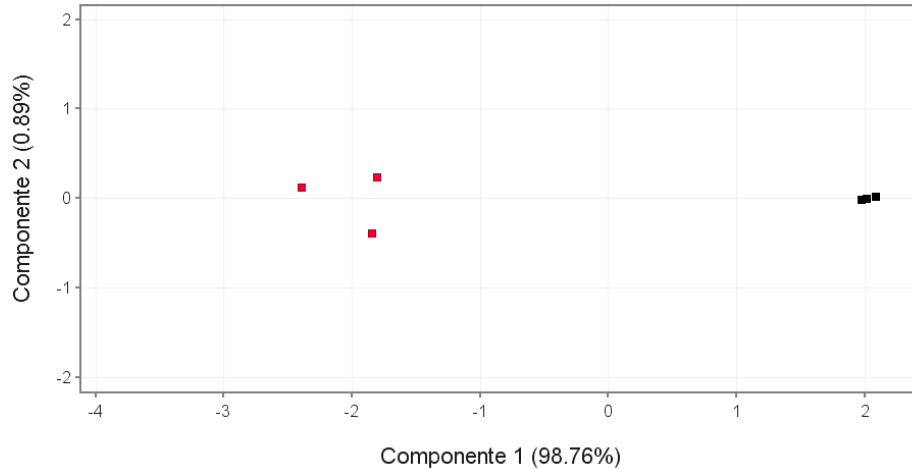


FIGURA 5.21 – Gráfico dos scores de PC1 *versus* PC2, para os dados de GC-MS do genótipo BRS 286. Preto: BRS 286; Vermelho: BRS 286 In.

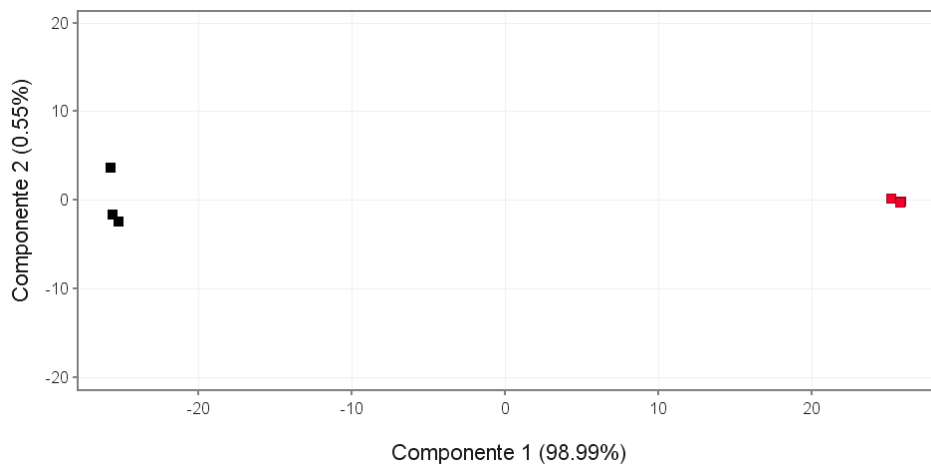


FIGURA 5.22 – Gráfico dos scores de PC1 *versus* PC2, para os dados de UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 286. Preto: BRS 286; Vermelho: BRS 286 In.

Os gráficos de Volcano mostram a dispersão dos metabólitos dos experimentos entre o genótipo controle e o genótipo submetido a herbivoria (FIGURA 5.23). Cada ponto no gráfico corresponde a um pico de m/z nos perfis, o que pode significar um metabólito diferente. O eixo x é a taxa média de variação relativa de cada metabólito e o eixo y representa a razão do valor- p de cada metabólito. Picos que possuem abundâncias semelhante entre as duas amostras são plotados próximos ao ponto zero da vertical do eixo x, no centro do gráfico. Picos que são abundantes em uma das duas amostras são plotados à esquerda ou à direita da origem do eixo x. A ordem dos metabólitos no eixo y é determinada pela significância estatística da razão do valor- p ; assim, picos com valores

p significativos se encontram no canto superior direito ou no canto superior esquerdo. Os pontos em verde indicam a *down regulation* dos genótipos submetidos a herbivoria, ou seja, os picos que estão em menor quantidade; e os pontos em lilás a *up regulation*, picos que estão mais abundantes no experimento com indução de resistência por herbivoria (HUR et al.,2013). As tabelas com os dados dos gráficos de volcano apresentados nessa seção estão no Apêndice C.

O gráfico de volcano BRS 286 *versus* BRS 286 In exibe a regulação dos compostos analisados por GC-MS do genótipo BRS 286 submetido a herbivoria (FIGURA 5.23). Observa-se em lilás do lado direito os compostos em *up-regulation*, dentre eles o ácido glicólico (**1**, TR= 6,38 min), ácido fosfórico (**2**, TR= 11,25 min), glicerol (**3**, TR= 11,34 min), ácido linoleico (**4**, TR= 31,87), uridina (**5**, TR= 35,71 min), 2-linoleoil glicerol (**6**, TR=40,48 min) e o estigmasterol (**7**, TR= 47,37 min), além de 6 compostos não identificados (NI). No limiar do *up-regulation*, em laranja, encontra-se o ácido palmítico (**8**, TR=28.89), α -metil linolenato (**9**, TR=29,28), ácido α -linolênico (**10**, TR= 31,98 min), ácido esteárico (**11**, TR=32,48 min), 2-monoestearina (**12**, TR=40,89 min) e Estigmast-5-eno (TR=48,29 min).

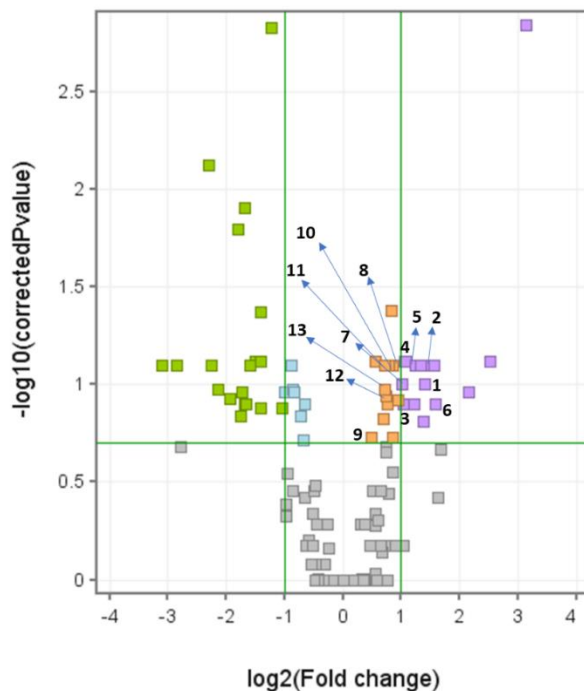


FIGURA 5.23 – Gráfico de volcano para os dados de GC-MS das amostras BRS 286 *versus* BRS 286 In

As análises por GC-MS indicaram que além das substâncias observadas em maior quantidade - *up-regulation*- no genótipo ao ser submetido a injúria (BRS 286 In), outros 34 compostos foram produzidos apenas quando BRS 286 sofreu herbivoria, destes, 22 compostos não foram identificados e os demais estão indicados na TABELA 5.6 e FIGURA 5.24. Aminoácidos e ácidos graxos de cadeia longa foram a classe mais observadas na diferenciação metabólica, com destaque também para os terpenos α -tocoferol e campesterol.

O campesterol é um fitoesteroide que está relacionado a um efeito negativo no ganho de massa de lagartas *Spodoptera littoralis* pela inibição de consumo foliar das folhas de milho em que esse composto está abundante; a *S. littoralis* pertence ao mesmo gênero da *S. cosmioides* e ambas possuem hábitos similares e fazem parte do complexo Spodoptera. Embora os fitoesteroides não sejam ligados diretamente a defesa das plantas contra herbívoros, há evidências que apoiam que eles possuem resistência contra insetos por não preferência alimentar (SANTOS et al., 2019).

As análises de GC-MS demonstraram que os genótipos BRS 286, BRS 335 e BRS 336, quando submetidos a herbivoria com *S. cosmioides*, produziram α -tocoferol, não havendo níveis detectáveis deste metabólito nas amostras controle dos genótipos (TABELA 5.6, FIGURA 5.24). O α -tocoferol é um antioxidante lipossolúvel comum em plantas, que pode ser encontrado no cloroplasto das folhas e faz parte do mecanismo de redução das espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo acumulado durante estresses bióticos e abióticos (TAIZ et al. 2017). FREITAS (2019) indica que esses três genótipos devem possuir substâncias capazes de interferir negativamente no comportamento de alimentação de *S. cosmioides*, sendo possível fazer correlação com as observações de PAVELA et al. (2014), onde os autores descreveram que as frações 1 e 2 do extrato de *Ailanthus altissima* possuem alto teor de tocoferol e são capazes de causar inibição do crescimento e toxicidade crônica às larvas de *Spodoptera littoralis*. Portanto, o α -tocoferol pode ser apontado como resposta de defesa à herbivoria e um dos compostos que contribui para o menor consumo foliar e menores taxas de crescimento da *S. cosmioides* observados por FREITAS (2019).

TABELA 5.6 - Compostos diferenciais entre amostra controle e injuria dos genótipos BRS 286, BRS 335 e BRS 336 identificados por GC-MS.

Composto	TR	IR exp.	IR teo	BRS 286	BRS 286 In	BRS 335	BRS 335 In	BRS 336	BRS 336 In
α-pineno	3,93	936	935				X		
Ácido 3,3-dimetilacrílico, TMS	5,00	1004	1003		X	X	X		
L-valina	6,70	1083	-		X	X	X	X	
Ácido hidracrílico, 2TMS	8,02	1139	1145						X
L-leucina	8,32	1151	-		X	X	X	X	
L-isoleucina	8,85	1172	-		X				
Ácido acetoacético, 2TMS	9,55	1200	1221				X		
Niacina, TMS	11,85	1289	1297			X			
(E) Ácido 2-butenodioico, 2TMS	13,39	1349	1348		X	X	X	X	X
Ácido 3,4-dihidroxi-butanoico, 3TMS	15,47	1430	1439						X
L-5-Oxo-prolina, 2 TMS	17,54	1514	1524		X				
Ácido p-cumárico, 2TMS	26,77	1934	1940		X		X		X
Fitol	30,08	2106	2106				X		X
Ácido heptadecanoico, TMS	30,72	2142	2148				X		X
2' – desoxiuridina, 2TMS	34,90	2383	-		X	X	X	X	X

2-monopalmitin, 2TMS	37,56	2551	2540		X		X	X
2-linoleoilglicerol, 2TMS	40,48	2747	2739	X	X	X	X	X
1-linoleoilglicerol	40,58	2754	2752		X		X	X
α -tocoferol, TMS	45,60	3126	3136		X		X	X
Campesterol, TMS	47,02	3233	3250		X	X	X	X
Estigmasterol, TMS	47,37	3257	3262	X	X	X	X	X

Diferenças quantitativas e qualitativas entre os perfis químicos das amostras de BRS 286 sob indução de herbivoria e as amostras controles também foram observadas nas análises por UPLC-QToF-MS (FIGURA 5.30).

A maioria dos flavonoides identificados no genótipo BRS 286 estão em menor quantidade nas amostras sob indução de herbivoria e foram identificados como dois kempferóis glicosilados, com $m/z = 287.0545$ correspondente a porção aglicona; e quatro quercetinas glicosiladas, porção aglicona $m/z = 303.0493$ (FIGURAS 5.25-27), sendo uma delas a rutina (RT= 5,09 min, $[M+H]^+ = 611.1604$), identificada por comparação com padrão analítico (TABELA 5.5). Embora os flavonoides sejam conhecidos como participantes de mecanismos de defesa, a diminuição de sua produção observada quando o cultivar sofreu herbivoria indica que esse não deve ser o mecanismo de defesa induzido desse genótipo (GOMEZ et al., 2018).

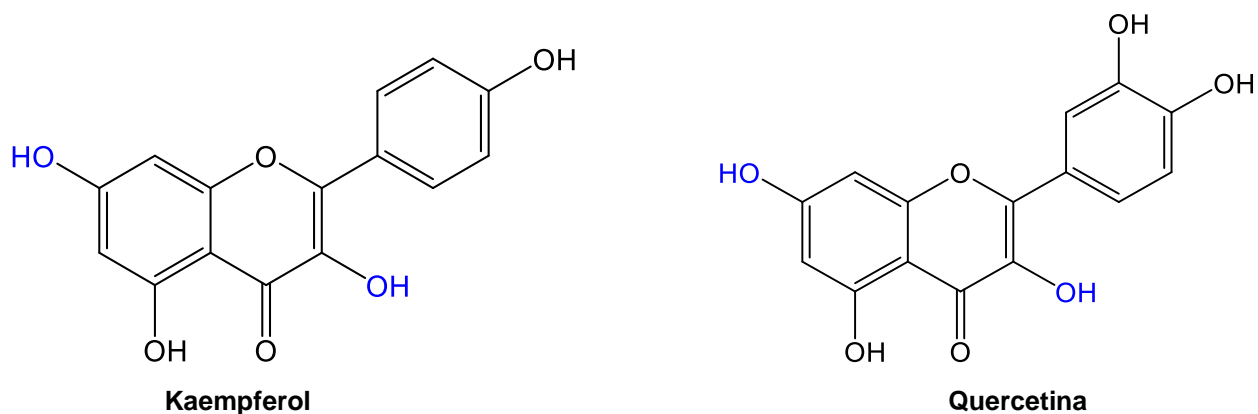


FIGURA 5.25: Porção aglicona dos flavonoides anotados. Destaque em azul para as posições mais comum em que ocorre substituição glicosídica nos flavonoides.

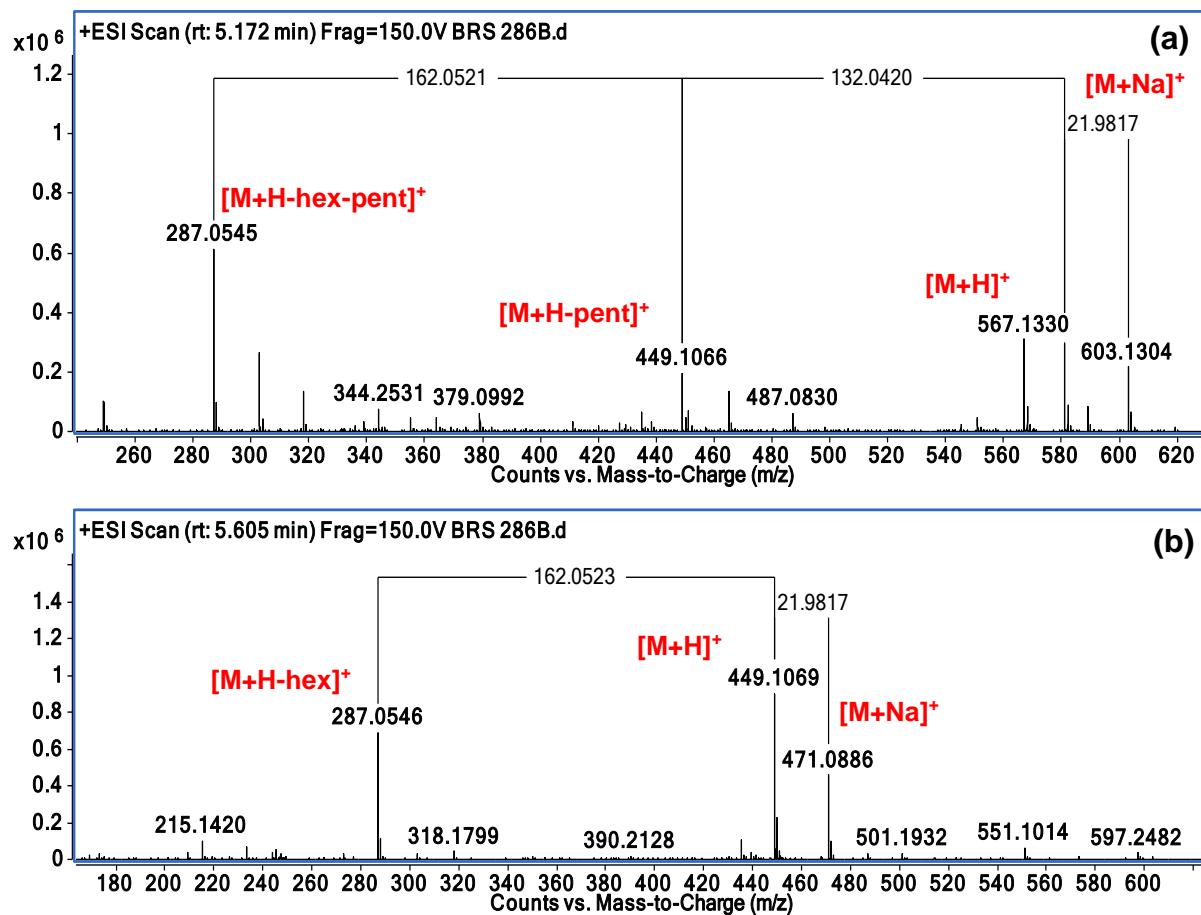


FIGURA 5.26 – Espectros de massas dos conjugados de kaempferol. **(a)** kaempferol-hexose-pentose e **(b)** kaempferol-hexose.

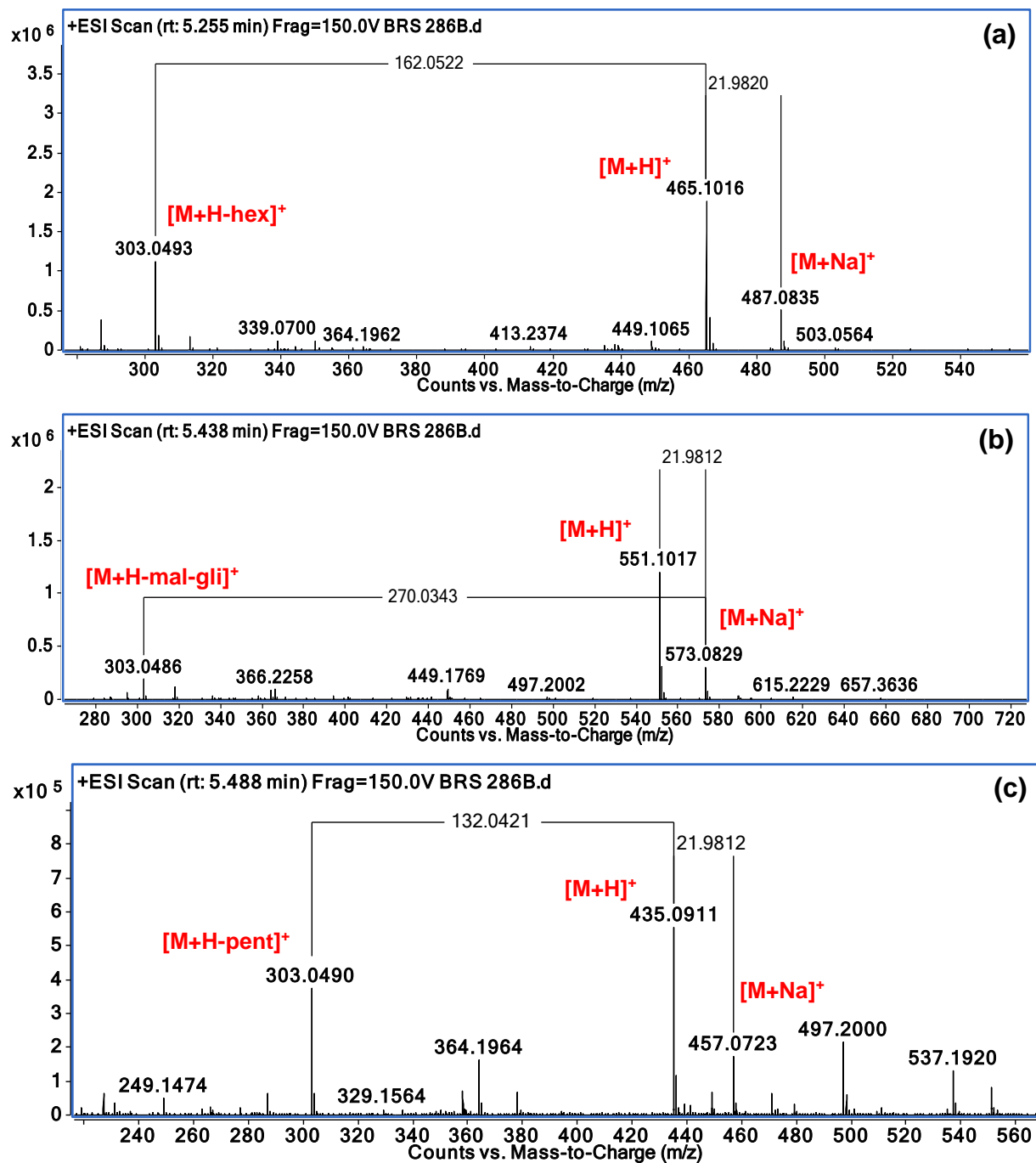


FIGURA 5.27 – Espectros de massas dos conjugados de Quercetina. **(a)** quercetina-hexose, **(b)** quercetina-malonil-hexose e **(c)** quercetina-pentose

A comparação dos cromatogramas aponta pelo menos 15 picos em maior abundância no BRS 286 após sofrer herbivoria (BRS 286 In), enquanto o gráfico de Venn indica 966 potenciais metabolitos diferenciais produzidos como resposta a herbivoria (FIGURA 5.28 e 5.30).

O diagrama de Venn é utilizado para comparar múltiplos conjuntos de dados de forma simples indicando as relações dos candidatos a metabólitos que são comuns entre os conjuntos ou candidatos únicos detectados apenas para uma amostra. Este tipo de diagrama está sendo cada vez mais explorado nos estudos metabolômicos e proteômicos por ilustrar de forma simples e de fácil interpretação os dados multivariados e outros modelos com associações mais complexas estão sendo desenvolvidos (LIN et al., 2016; AUSTEL et al., 2020).

Todavia, mesmo com 966 metabólitos candidatos como resposta de defesa as sugestões de identificação dos potenciais metabólitos não puderam ser melhor fundamentadas, pois a maior parte se refere a aminoácidos e ácidos graxos conjugados com glicosídeos ou aminoácidos. A substância cis-jasmona foi anotada com 79,87% de similaridade e uma diferença de massa de -2.26 ppm e é um dos picos indicado como substância acumulada após herbivoria por *S. cosmioides* (TABELA 5.5 e FIGURA 5.29).

O cis-jasmona é um elicitador de defesa de plantas contra herbívoros, inclusive participa dos mecanismos de defesa do algodão. Por exemplo, a aplicação de cis-jasmona em plantas de algodão induziu a produção de COVs (Compostos Orgânicos Voláteis) com capacidade repelente contra *Aphis gossypii* - pulgão de algodão (HEDGE et al., 2012). Desta forma, a indicação de uma maior quantidade de cis-jasmona no genótipo BRS 286 sob indução de herbivoria parece válida e consistente com os mecanismos de defesa conhecidos para o algodão e sugere-se que o genótipo BRS 286 utiliza essa via como defesa contra *S. cosmioides* e que a cis-jasmona pode ser uma das substâncias responsáveis pela repelência de *S. cosmioides* observada por FREITAS (2019) no genótipo.

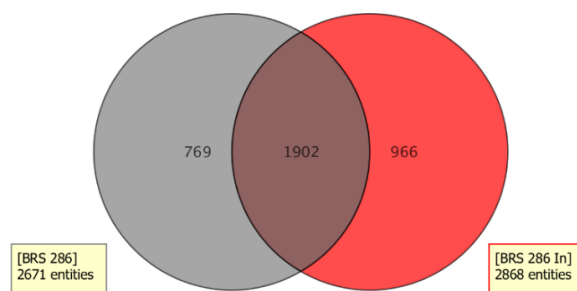


FIGURA 5.28 – Diagrama de Venn com os dados da análise por UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 226 versus BRS 286 sob indução de herbivoria por *S. cosmioides* (BRS 286 In).

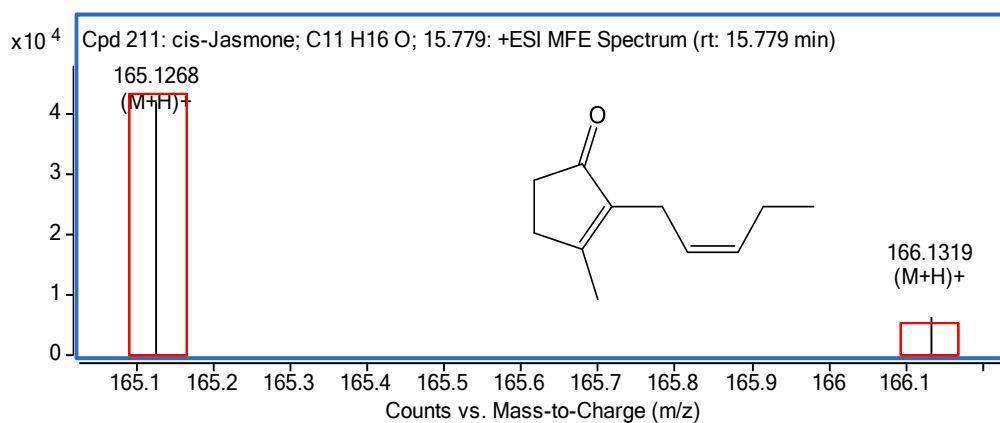


FIGURA 5.29 – Espectro de massas obtido na análise de BRS 286 In por UPLC-QToF-MS indicando o composto cis-jasmona

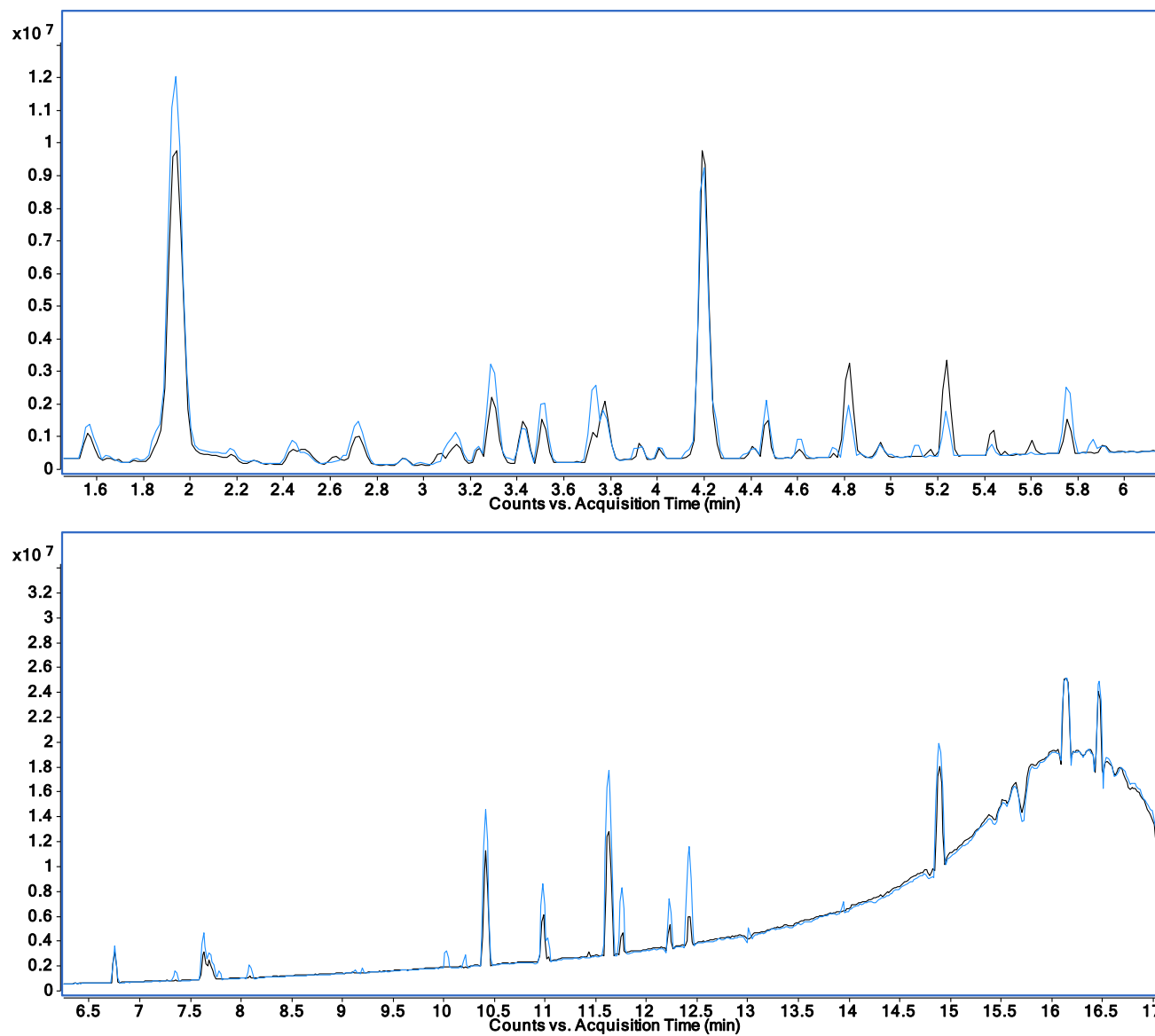


FIGURA 5.30 – Perfil químico do genótipo BRS 286 (preto) e BRS 286 In (azul) analisados por UPLC-QToF-MS

- BRS 335

O genótipo BRS 335 foi desenvolvido a partir do cruzamento entre os cultivares DP 4049, CNPA ITA96 e Delta Opal visando alta produtividade. Esse genótipo é resistente a mancha angular, moderadamente suscetível ao nematoide-das-galhas, murcha-de-fusário, doença-azul e mancha-de-ramulária; e suscetível à ramulose (EMBRAPA, 2011a).

As análises dos componentes principais apontaram diferenciação a nível metabólico do cultivar ao ser submetido a herbivoria por *S. cosmioides*, com variância explicada de 97,32% para PC1 nas análises por GC-MS e 99,48% nas análises por UPLC-QToF-MS diferenciando o genótipo e o genótipo submetido a herbivoria (BRS 335 In) (FIGURAS 5.31 e 5.32).

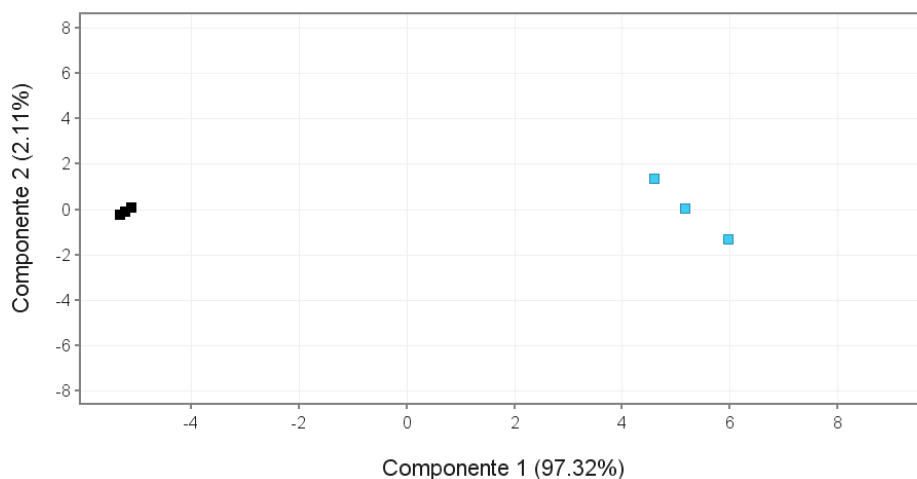


FIGURA 5.31 - Gráfico dos scores de PC1 versus PC2, para os dados de GC-MS do genótipo BRS 335. Preto: BRS 335; Azul: BRS 335 In.

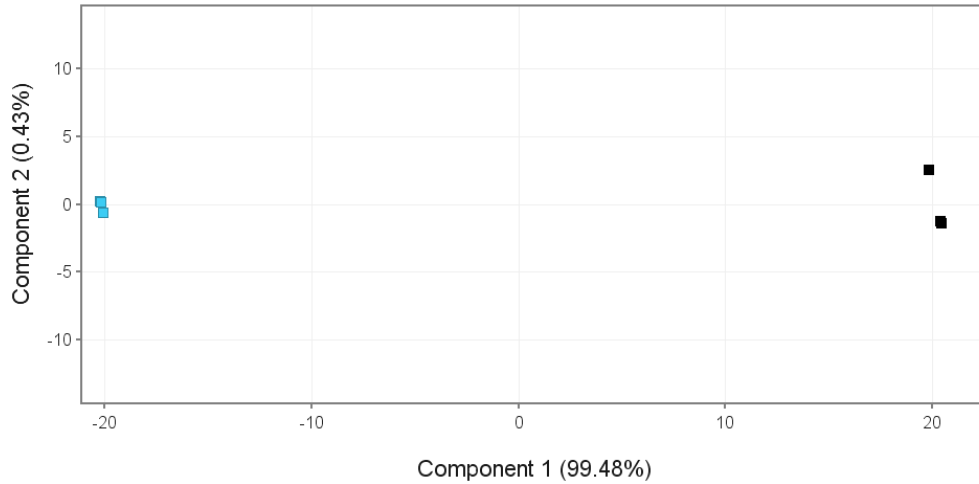


FIGURA 5.32 - Gráfico dos scores de PC1 *versus* PC2, para os dados de UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 335. Preto: BRS 335; Azul: BRS 335 In.

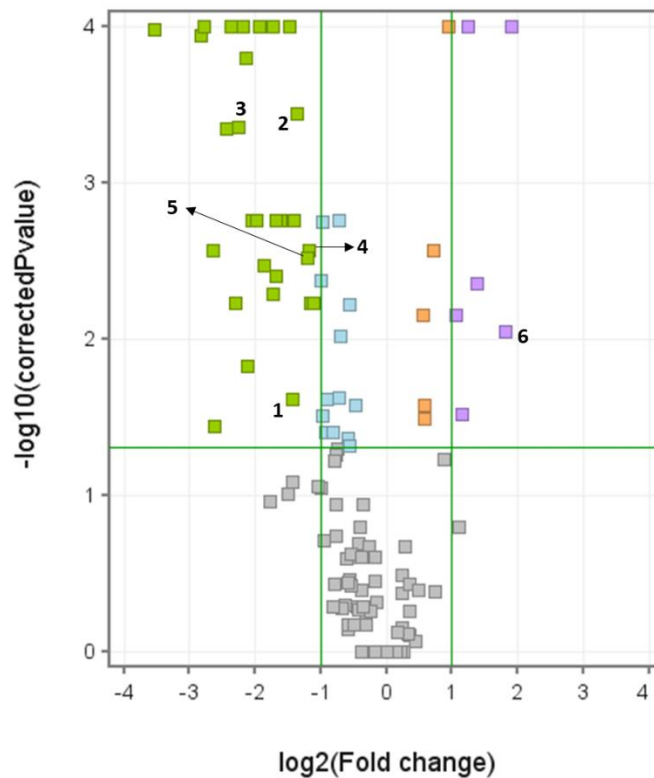


FIGURA 5.33 – Gráfico de vulcano para os dados de GC-MS das amostras BRS 335 *versus* BRS 335 In

No gráfico de vulcano BRS 335 In *versus* BRS 335 os compostos em *down-regulation* foram o ácido málico (1, TR=16,84 min), ácido hexanodioico (2, TR=17,29

min), L-5-oxoprolina (**3**, TR=17.54 min), ácido eritrônico (**4**, TR=18,14 min) e o 1-octasanol (**5**, TR= 45,74 min), ademais o ácido hidracrílico (**6**, TR= 8,02) foi observado apenas no controle bem como outras 5 substâncias não identificadas (Apêndice C, FIGURA 5.33).

As análises por GC-MS apontaram 29 compostos como resposta a herbivoria por *Spodoptera cosmioides*, esses compostos foram observados apenas no BRS 335 In e não observados no controle (Apêndice A). Destes, 19 compostos não foram identificados, e os compostos identificados estão apresentados na TABELA 5.6, dentre eles o α -pineno.

Embora o α -pineno tenha sido observado apenas no BRS 335 In e não no controle, AQUINO (2020) observou o composto como presente também no genótipo sem injúria, mas em maior quantidade quando submetido a herbivoria. Isso pode ser explicado pelo método de extração e análise diferente entre os dois estudos, pois o objetivo de AQUINO eram os compostos voláteis e os observou com mais eficiência que a análise proposta no presente estudo. No entanto, em termos comparativos entre controle e herbivoria tanto o estudo de AQUINO como os resultados apresentados nesta Tese apontam o α -pineno como resposta a herbivoria. O α -pineno é um monoterpene bicíclico tóxico para insetos e é encontrado como composto de estocagem. Esse tipo de composto geralmente é armazenado em organelas de armazenamento - como vacúolos, ductos de resina ou tricomas glandulares; relativamente isolados de tecidos susceptíveis para que não haja dano a planta, sendo liberados imediatamente após os danos causados por herbívoros (TAIZ et al. 2017). Assim, a observação de uma maior quantidade desta substância no genótipo BRS 335 após indução de herbivoria demonstra que esse genótipo utiliza o α -pineno como um dos mecanismos de defesa contra herbivoria por *S. cosmioides*.

O gráfico de vulcano com as análises de UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 335 indicou um elevado número de substâncias como *up-regulation* ou *down-regulation*, resultado da observação de intermediários e substâncias que devem ser blocos de construção de metabólitos secundários, como é o caso da hidroxadenina (98,85% de similaridade, diferença de -0.24 ppm) apresentada em *up-regulation* para o BRS 335 In (FIGURA 5.34 e 5.35). Ainda assim, é possível pontuar algumas diferenças metabólicas resultantes da resposta do genótipo à herbivoria da *S. cosmioides*.

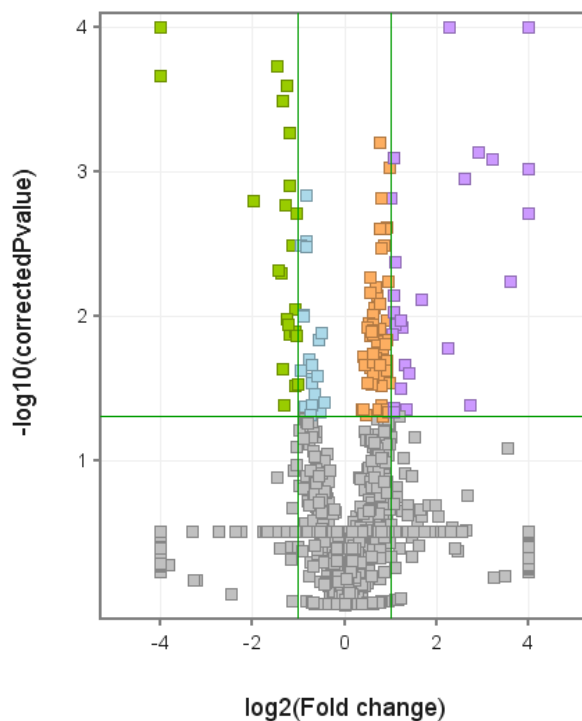


FIGURA 5.34 – Gráfico de vulcano para os dados de UPLC-QToF-MS das amostras BRS 335 In *versus* BRS 335

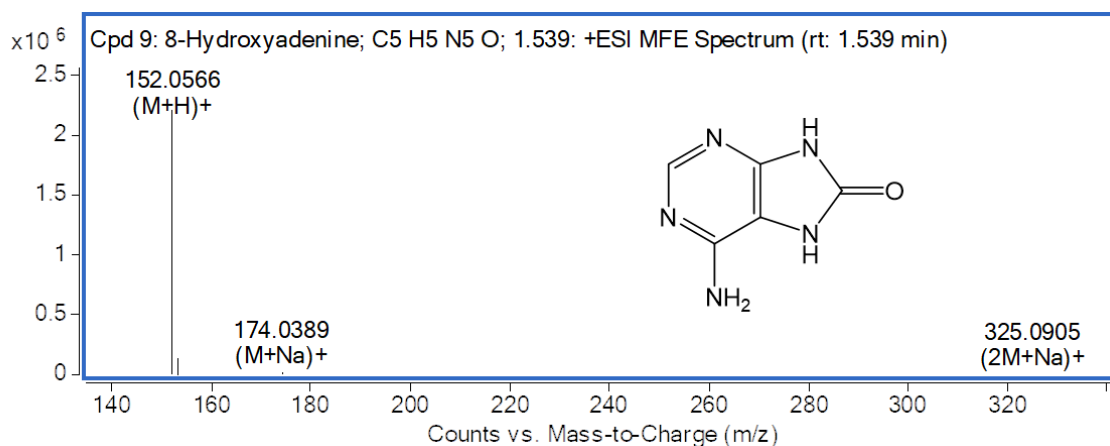


FIGURA 5.35 – Espectro de massa do composto indicado como hidroxadenina apontado como *up-regulation* no BRS 335 In.

O cultivar BRS 335 apresenta um comportamento semelhante ao BRS 286, com os mesmos flavonoides descritos - kaempferol-hexose-pentose, kaempferol-hexose, quercetina-hexose, quercetina-malonilglicosídeo e quercetina-pentose - em maior abundância nas amostras controle do que no genótipo submetido a herbivoria (FIGURAS 5.26 e 5.27). Adicionalmente, dois outros flavonoides anotados como kaempferol-pentose

e metil-liquiritigenin-raminosídeo ($[M+NH_4]^+$ = 434.1793, 86,64% de similaridade e diferença de -2,11 ppm) estão em *down-regulation* no BRS 335 In (FIGURAS 5.36 e 5.37), assim como os compostos heliotrina (RT= 4,60 min; $m/z=314.1966$) e cafeoil-glucunoride (RT= 2.57 min; $m/z= 357.1966$).

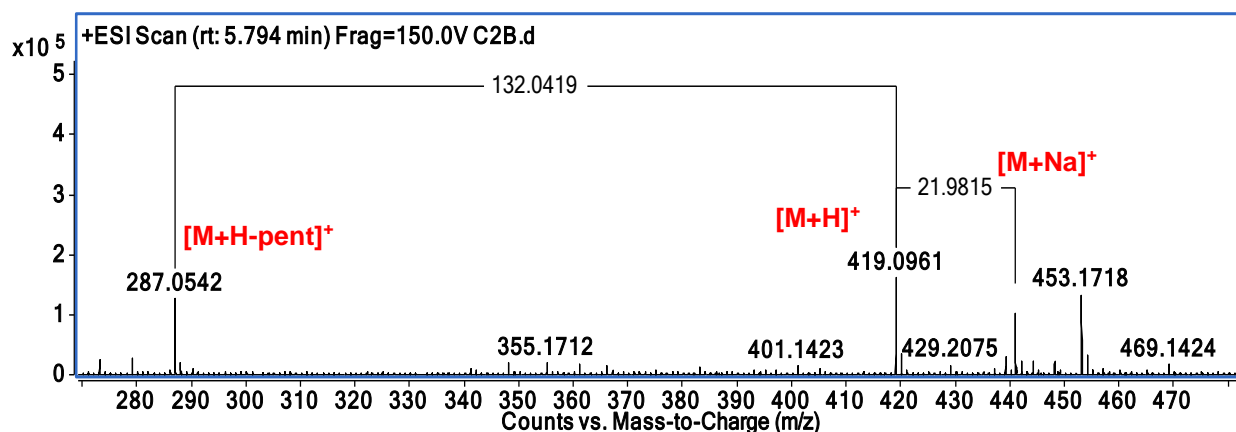


FIGURA 5.36 – Espectro de massas do composto anotado como Kaempferol-pentose

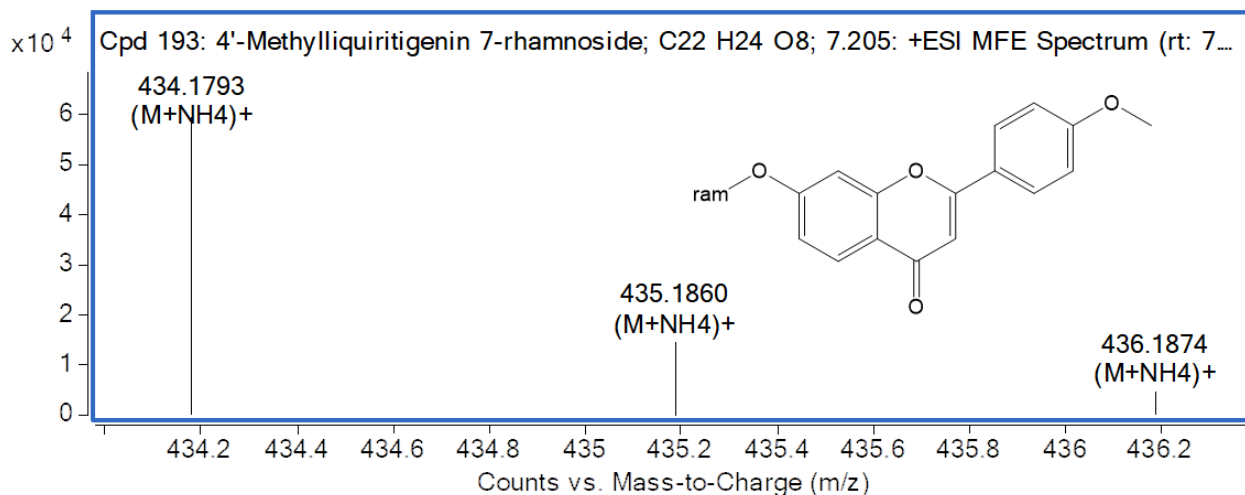


FIGURA 5.37 – Espectro de massas do composto anotado como 4- metil liquiritigenina-7-ramnosídeo

Dentre as substâncias com maior acúmulo após herbivoria (BRS 335 In) temos o ácido *p*-cumárico e uma banda cromatográfica em 3,31 min em que pelo menos duas

substâncias coeluem, um composto caracterizado como um flavonoide diglicosilado ($m/z= 654.1709$, $C_{28}H_{28}O_{17}$) e uma substância não identificada com $m/z= 561.1710$.

O ácido *p*-cumárico é um composto fenólico, comumente presente em plantas, e seu acúmulo foi observado tanto nas análises por GC-MS quanto por UPLC-QToF-MS no genótipo BRS 335 submetido a herbivoria (FIGURA 5.38). Este composto também foi apontado como resposta metabólica de defesa dos genótipos BRS 286 e BRS 336 à herbivoria de *S. cosmioides* (TABELA 5.6). De acordo com SAMBANGI e RANI (2016), o ácido cumárico apresenta atividade antialimentar em larvas da espécie *Spodoptera litura* F. e *Amsacta albistriga* W., além de reduzir o peso das larvas em dose-dependente. RANI e PRATYUSHA (2014) relataram acúmulo desse composto fenólico em folhas de mamona infestadas com *S. litura* na proporção de quatro vezes mais em comparação a plantas saudáveis. Também foi observada a diminuição do peso larval e o aumento do período de pupação das lagartas ao se alimentarem de folhas com maior quantidade de ácido cumárico, e, apesar do composto apresentar um estímulo à oviposição da *S. litura*, ele também estimula o parasitismo dos ovos pelo patógeno *Trichogramma chilonis*. Assim, os autores afirmam que o ácido cumárico desempenha funções de defesa direta e indireta. Com isso, podemos relacionar o acúmulo de ácido *p*-cumárico observado nos genótipos sob herbivoria de *S. cosmioides* como uma resposta de defesa desses genótipos ao ataque do herbívoro.

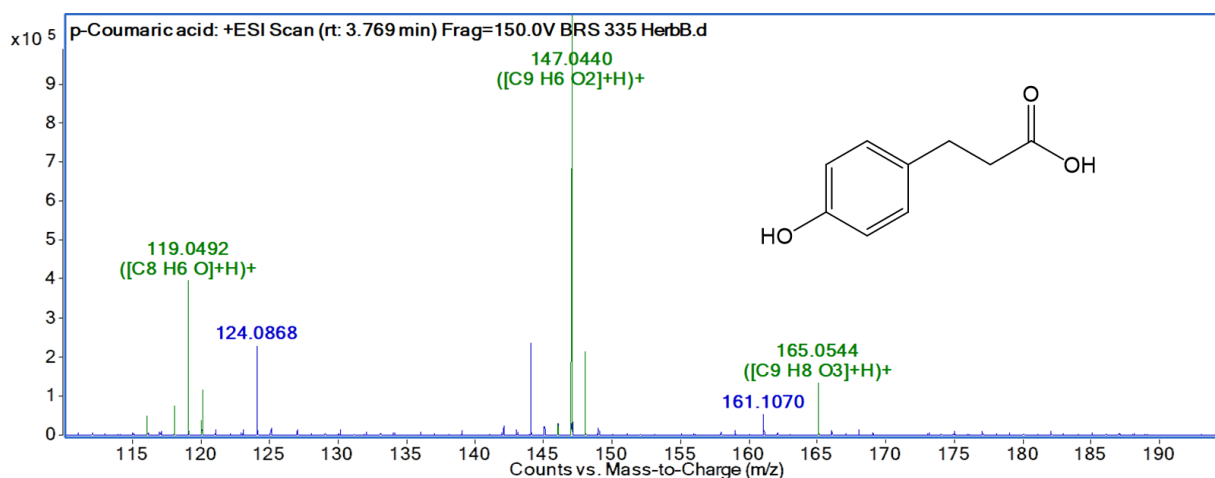


FIGURA 5.38 – Espectro de massas do ácido *p*-cumárico obtido por UPLC-QToF-MS.

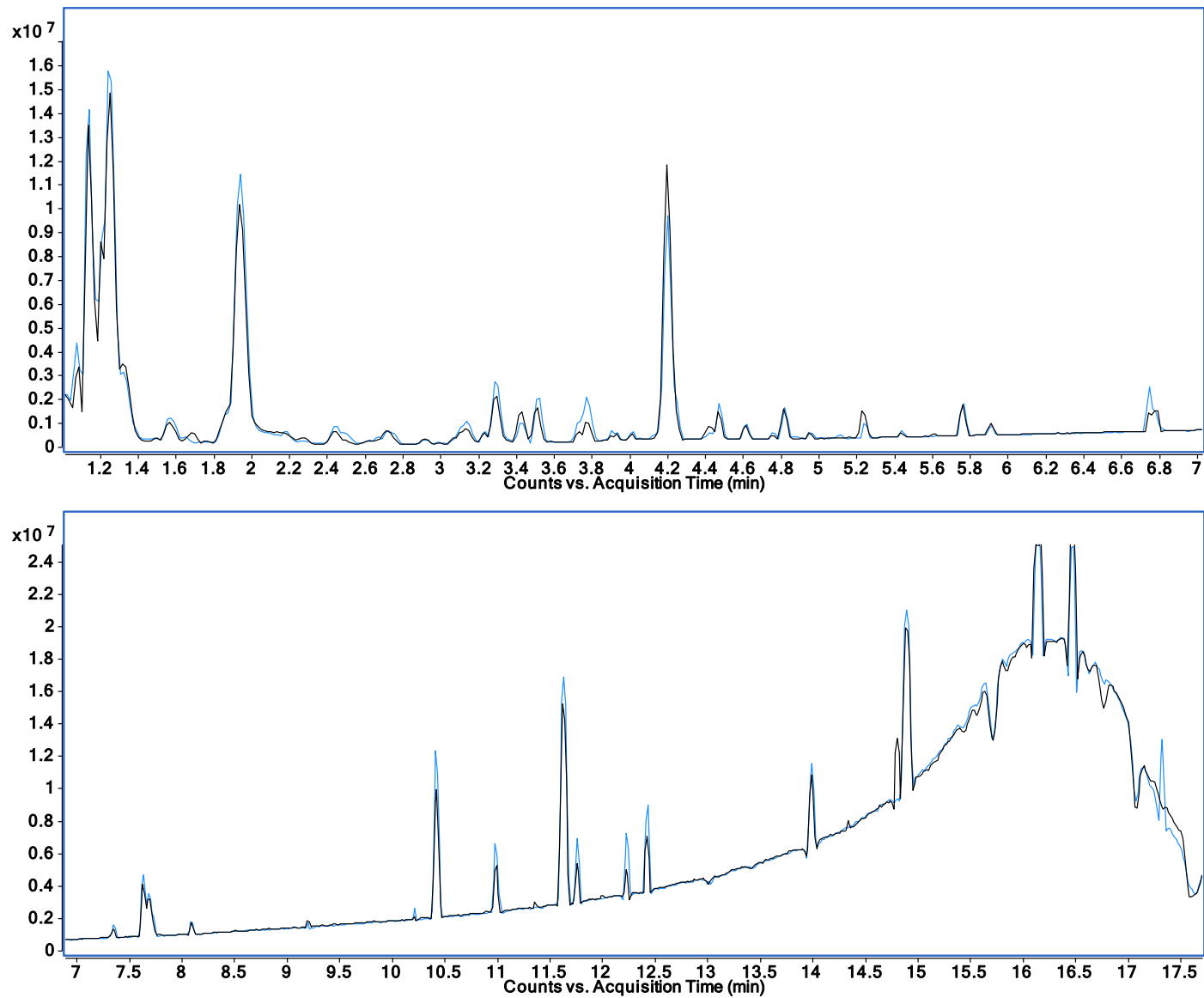


FIGURA 5.39 – Perfil químico comparativo entre o genótipo BRS 335 (preto) e o genótipo BRS 335 submetido a herbivoria por *S. cosmioides* (azul).

- BRS 336

Lançado em 2011, juntamente com o BRS 335, o BRS 336 foi produzido pelo cruzamento entre os cultivares CHACO 520, BRS Itaúba e Delta Opal, sua principal característica é a alta qualidade da fibra, com fibras mais longas. Este genótipo é resistente à mancha-angular e mancha de alternária; moderadamente resistente à doença-azul; moderadamente suscetível à mancha-de-ramulária e à ramulose; e suscetível à murcha-de-fusário e ao nematoide-das-galha (EMBRAPA, 2011b e CIA et al. 2014).

A análise dos componentes principais indicou que o cultivar responde metabolicamente à injúria por herbivoria. A primeira componente principal, PC1, descreve 96,7% da informação original dos dados obtidos por GC-MS, diferenciando genótipo sob injúria do grupo controle (FIGURA 5.40). Para os dados obtidos por UPLC-QToF-MS, a PC1 foi capaz de descrever 99,26% das informações e também diferenciar os dois grupos de amostra (FIGURA 5.41)

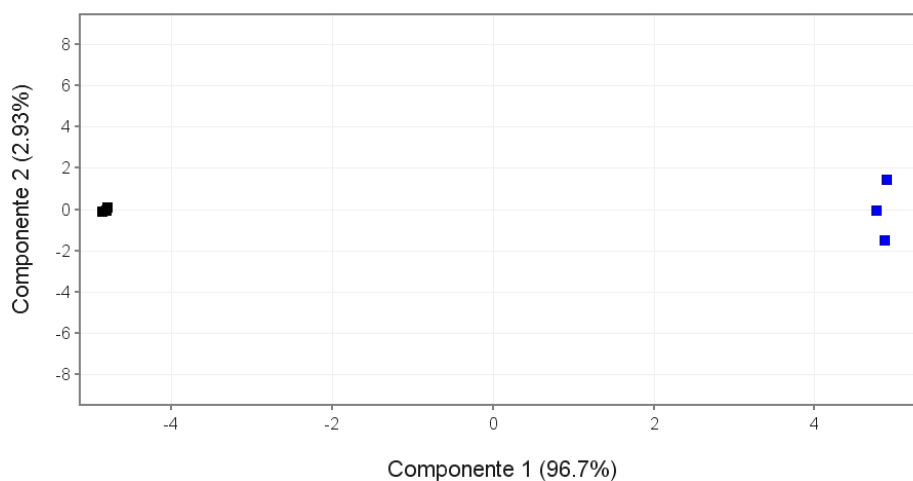


FIGURA 5.40 - Gráfico dos scores de PC1 *versus* PC2, para os dados de GC-MS do genótipo BRS 336. Preto: BRS 336; Azul: BRS 336 In.

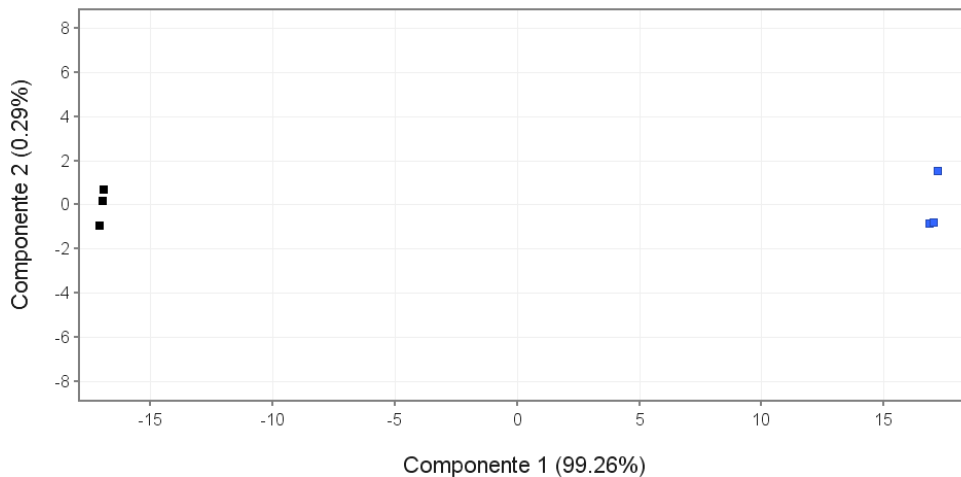


FIGURA 5.41 - Gráfico dos scores de PC1 *versus* PC2, para os dados de UPLC-QToF-MS do genótipo BRS 336. Preto: BRS 336; Azul: BRS 336 In.

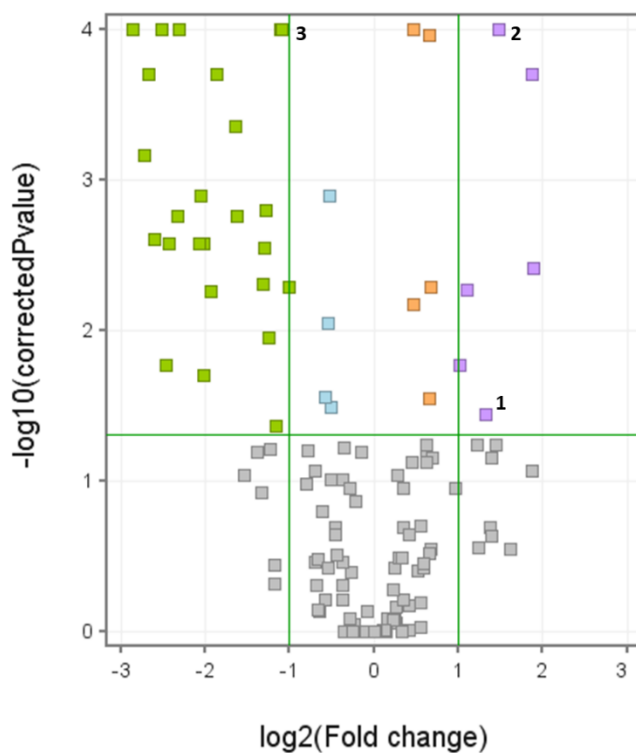


FIGURA 5.42 – Gráfico de volcano para os dados de GC-MS das amostras BRS 336 In *versus* BRS 336

Considerando a análise por GC-MS, pelo menos sete substâncias foram suprimidas quando o genótipo BRS 336 sofreu herbivoria, a L-valina (1, TR= 6,70 min),

L-leucina (**2**, TR 8,32 min), glicerol (**3**, TR=9,22 min) e outras 4 substâncias não identificadas (FIGURA 5.42). Em contrapartida, 35 substâncias passaram a ser produzidas pelo cultivar quando este foi submetido a herbivoria, 22 não identificadas e outras 13 identificadas, dentre elas o α -tocoferol, estigmasterol e o ácido *p*-cumárico (TABELA 5.6, FIGURA 5.24 e APÊNDICE A).

As análises multivariadas obtidas com os dados de UPLC-QToF-MS apontam que a heliotrina encontra-se em maior abundância quando o genótipo BRS 336 é submetido à herbivoria por *S. cosmioides* (FIGURA 5.43 e 5.44).

A heliotrina é um alcaloide pirrolizidínico, essa classe de composto é conhecida por suas propriedades tóxicas e muitas vezes utilizada como mecanismo de defesa de plantas contra herbívoros. Entretanto, alguns insetos se adaptaram e fazem detoxificação dessas substâncias as utilizando em benefício próprio (HARTMANN et al., 1997 apud STEGEMANN et al., 2019); como no caso da lagarta *Utetheisa ornatrix* que utiliza os alcaloides pirrolizidínicos de defesa da planta *Crotalaria spp.* como precursor de feromônios (CONNER et al., 1981). SIVLINGHAM e BRINK (1998) relatam que a heliotrina tem efeito teratogênico em *Drosophila*, sendo a fase pupal a mais afetada. No entanto, na literatura consultada não foram encontrados relatos sobre a toxicidade da heliotrina frente a *S. cosmioides*, e há apenas um estudo relacionando heliotrina a uma lagarta do gênero *Spodoptera* em que os autores indicam que a *S. litoralis* elimina eficientemente esse alcaloide quando ingerido (LINDIGKEIT et al., 1997). Assim, não se pode afirmar se a heliotrina é eficiente ou não na defesa do algodão contra o ataque por *S. cosmioides*, contudo, o acúmulo desse alcaloide no genótipo BRS 336 quando submetido à herbivoria infere que o genótipo utiliza essa substância como resposta de defesa.

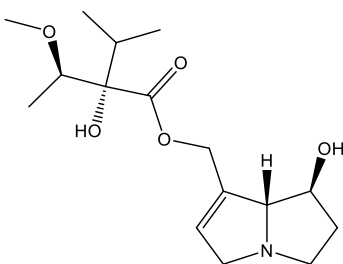


FIGURA 5.43 – Estrutura da heliotrina (C₁₆H₂₇NO₅)

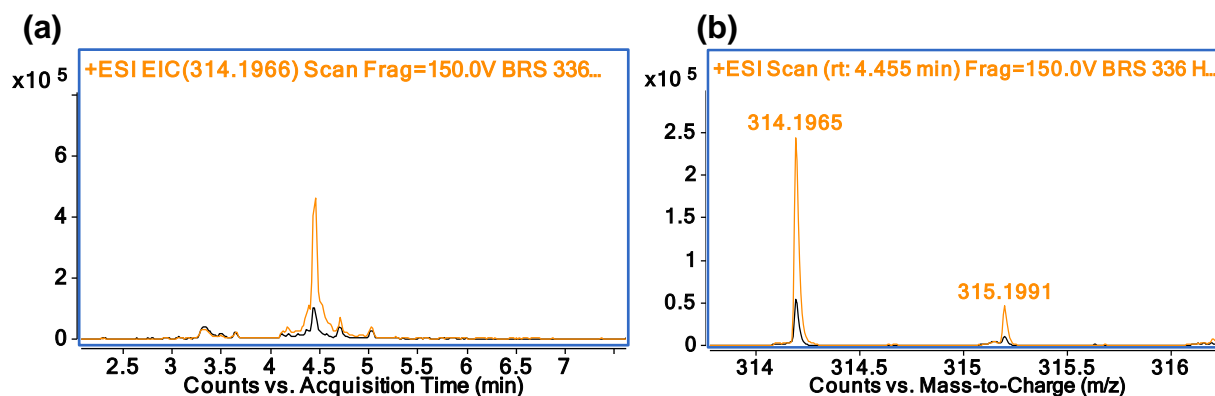


FIGURA 5.44 – (a) Cromatograma e (b) espectro de massas comparativos do composto anotado como heliotrina nas amostras BRS 336 (preto) e BRS 336 In (laranja).

Além da heliotrina, 2 bandas cromatográficas demonstraram-se interessantes, pois são observadas de forma abundante em BRS 336 In e estão em pequena quantidade em BRS 336, são elas as bandas em 9,53 min e 9,60 min que parecem ser compostos de cadeia longa substituídos, sendo que o segundo assemelha-se a um álcool de cadeia longa (FIGURA 5.45). Essas observações estão coerentes com as apontadas pelas análises GC-MS, em que BRS 336 In apresenta ácidos de cadeia longa como o 1-linoleoilglicerol, 2-linolenoilglicerol, ácido heptadecanoico e 2-monopalmitina como resposta de defesa e os mesmos compostos não estão em níveis detectáveis no genótipo sem ataque por *S. cosmoides* (BRS 336).

Os flavonoides presentes no genótipo não apresentaram diferenças quantitativas significativas entre as amostras controle de BRS 336 e as amostras submetidas a injúria não podendo serem relacionados aos mecanismos de defesa do genótipo BRS336 contra *S. cosmoides*.

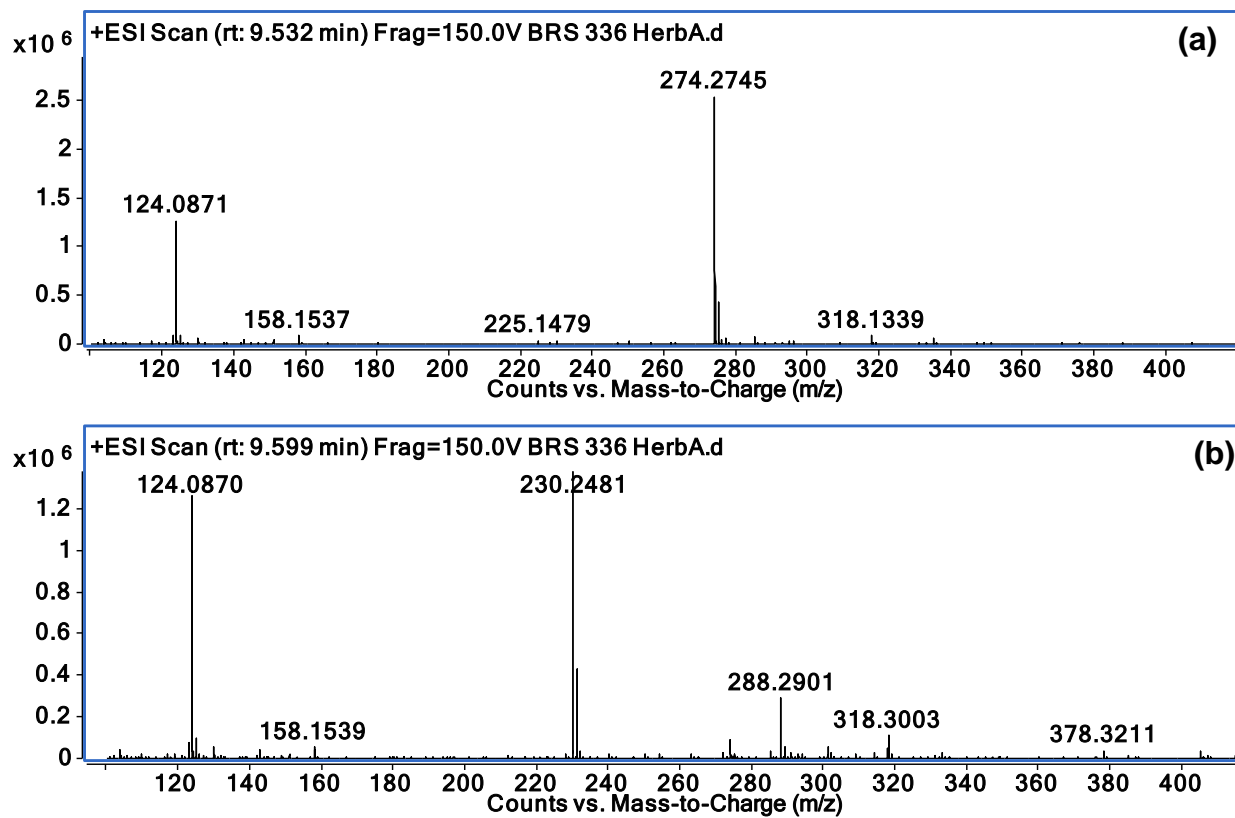


FIGURA 5.45 – Espectros de massas das bandas cromatográficas em 9,53 min **(a)** e 9,60 min **(b)**, substâncias não identificadas.

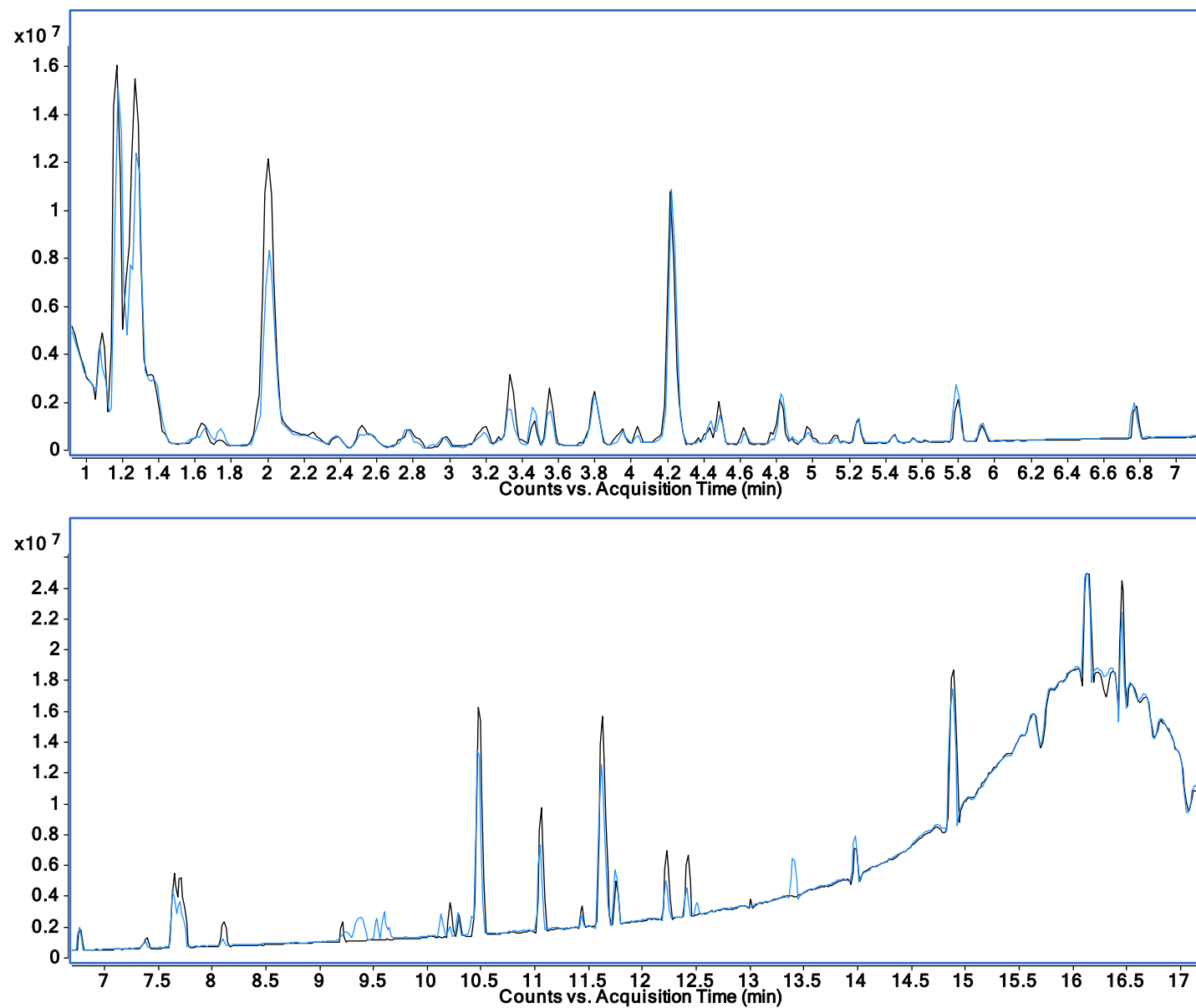


FIGURA 5. 46 – Perfil químico comparativo do genótipo BRS 336 (preto) e BRS 336 In (azul) UPLC-QToF-MS

5.4 - Resistência induzida por fatores bióticos e abióticos

O estudo de resistência induzida foi planejado a fim de se observar a resposta química do algodão a fatores bióticos e abióticos e buscar correlacionar essas respostas a resistência observada.

Dois genótipos de algodão foram selecionados, o FMT 701 como cultivar resistente e Delta Opal como suscetível frente a *Alabama argillacea* e *Spodoptera frugiperda* (BOIÇA JÚNIOR et al. 2012; JESUS et al. 2014). Ademais, testes com FMT 701 e Delta Opal demonstraram que *S. cosmiodes* possuem menor atratividade e menor consumo foliar para o genótipo FMT 701 e que, embora Delta Opal tenha tido uma maior área foliar consumida, o genótipo apresenta efeitos de antibiose com menor viabilidade larval e total. Assim, os dois genótipos possuem algum mecanismo de defesa contra *S. cosmiodes* e o genótipo Delta Opal é moderadamente resistente (FREITAS, 2019).

As FIGURAS 5.47 e 5.48 comparam os perfis cromatográficos dos genótipos FMT 701 e Delta Opal por GC-MS e UPLC Q-Tof-MS, respectivamente. De forma geral, as duas variedades possuem perfis semelhantes, algo esperado pois são da mesma espécie. Contudo, também é possível observar diferenças, principalmente quantitativas, que são justificadas por se tratar de variedades genéticas diferentes. Como anteriormente discutido, os diferentes genótipos possuem perfis químicos distintos em consequência de sua variedade genética, uma vez que quando genes são expressos ou silenciados as rotas biossintéticas são alteradas (OLIVER et al., 2002).

Ao plotarmos um gráfico de PCA entre Delta Opal e FMT 701 nota-se que elas se diferenciam pela PC1 com variância total de 82,96%, com 60,48% de variância explicada pela PC1 e 22,48% pela PC2 na análise por GC-MS (FIGURA 5.49). Na análise por UPLC QTof-MS a variância total explicada foi de 99,9%, com 99,79% para PC1 e 0,11% para PC2 (FIGURA 5.50). O agrupamento em lados opostos da PC1, nos dois gráficos, demonstra que há diversificação de seus perfis químicos, corroborando a ideia de que os dois genótipos possuem diferenças metabólicas significativas.

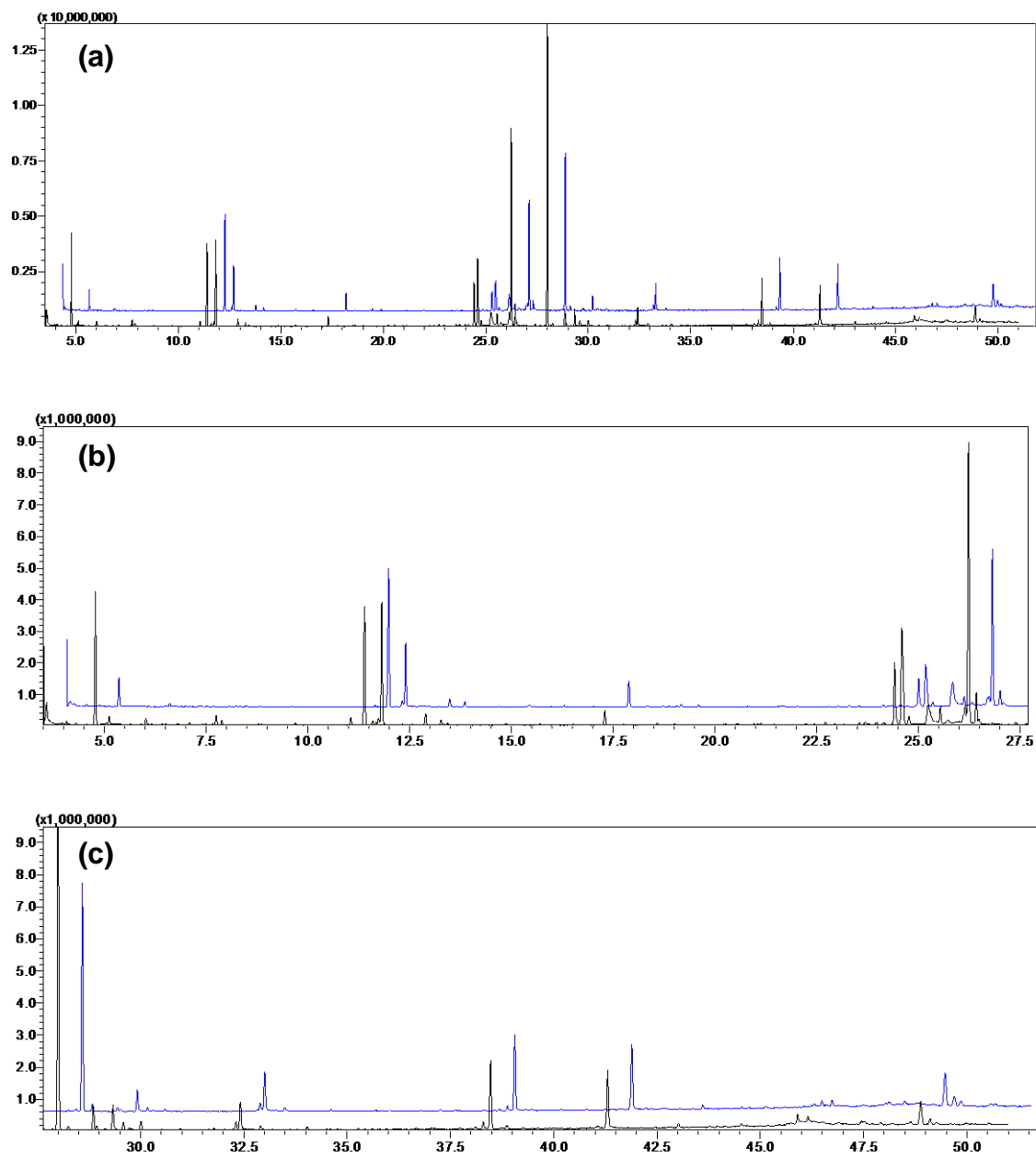


FIGURA 5.47 Perfil químico dos genótipos Delta Opal e FMT 701 por GC-MS. Delta Opal em preto; FMT 701 em azul, (a): Cromatograma completo, (b): Expansão cromatográfica nos tempos de 0 a 27,5 min; (c): Expansão cromatográfica nos tempos de 27,5- 50 minutos.

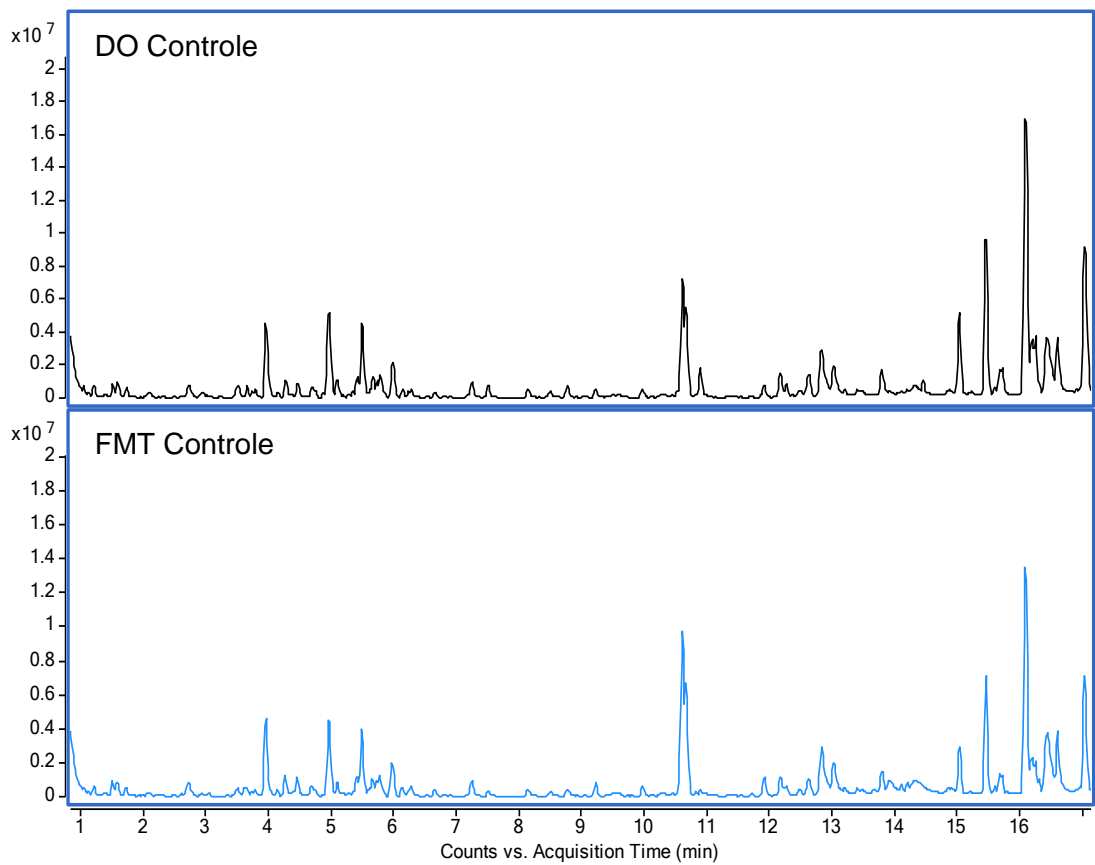


FIGURA 5.48 – Perfil químico dos genótipos Delta Opal e FMT 701 por UPLC-QToF-MS

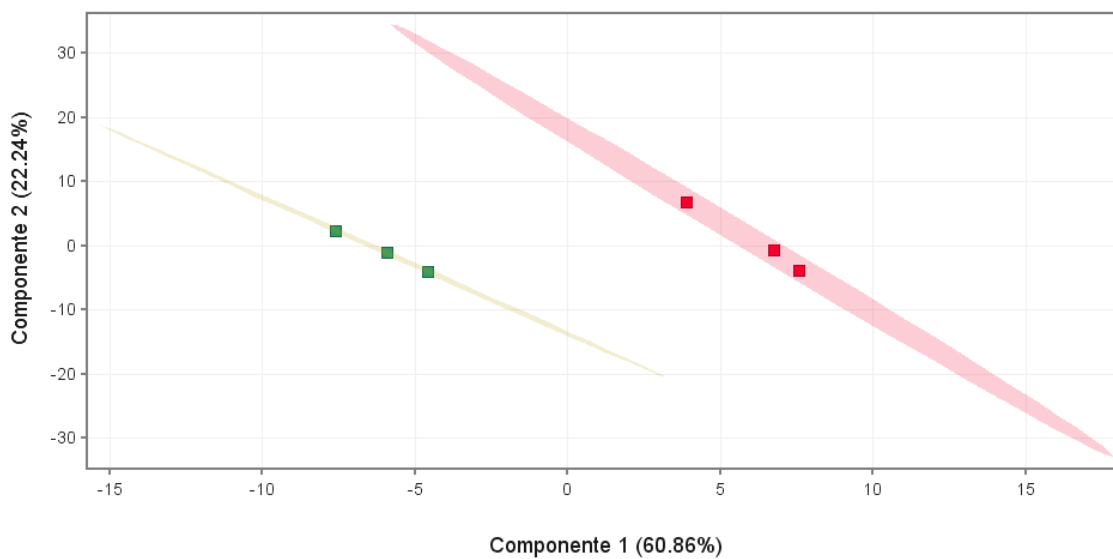


FIGURA 5.49- PCA dos metabólitos dos genótipos FMT e DO analisados por GC-MS. DO:vermelho; FMT: Verde.

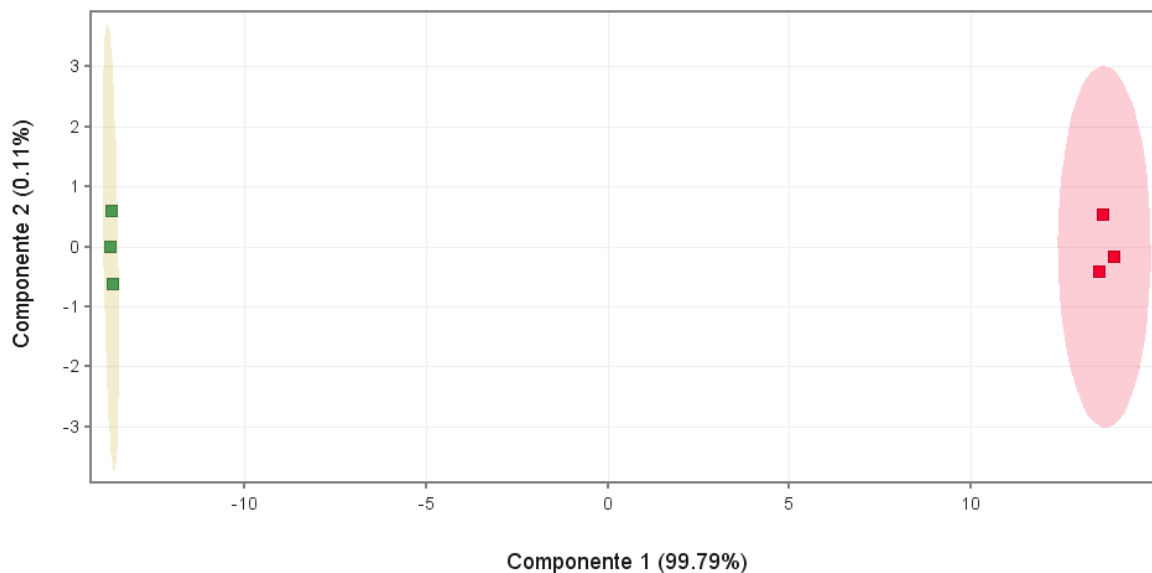


FIGURA 5.50– PCA dos metabólitos dos genótipos FTM e DO analisados por UPLC-QToF-MS. DO:vermelho; FMT: Verde.

Com intuito de observar como cada genótipo se comporta quimicamente aos fatores bióticos e abióticos, as duas variedades genéticas foram submetidas a seis tratamentos: aplicação da solução de jasmonato de metila ao solo na concentração de $20\mu\text{molL}^{-1}$ e $200\mu\text{molL}^{-1}$, aplicação por pulverização de jasmonato de metila nas folhas na concentração de $200\mu\text{molL}^{-1}$, herbivoria por *Spodoptera cosmioides*, herbivoria por *S. cosmioides* mais aplicação de jasmonato de metila ($200\mu\text{molL}^{-1}$) no solo e estresse por déficit hídrico.

O jasmonato de metila foi escolhido em razão de ser um fitormônio, e como tal modula a indução de defesa da planta, e aplicado em concentrações diferentes e em partes diferentes da planta a fim de mensurar a resposta de defesa da planta a ele (KONAN et al., 2014). A herbivoria por *S. cosmioides* foi selecionada como uma forma de avaliar diretamente o comportamento de defesa da planta ao ataque de um herbívoro e a aplicação de jasmonato de metila juntamente a herbivoria com intuito de observar se a planta seria mais efetiva em sua resposta de defesa. O estresse por déficit hídrico foi uma tentativa de observar as mudanças a nível metabólico causadas pelo estresse de escassez de um componente indispensável para a planta como a água.

5.4.1 - Análise por GC-MS

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada utilizando as áreas dos picos das substâncias observadas no GC-MS para os genótipos Delta Opal e FMT controle e os diferentes tratamentos a que foram submetidos, com o intuito de reduzir a dimensionalidade dos dados e ao mesmo tempo manter o máximo de informação, dispondo assim, de uma visão geral e maximizada da similaridade ou diferença entre o grupo controle e os grupos tratamentos.

A FIGURA 5.51 apresenta os resultados da PCAs dos diversos tratamentos de estresse do genótipo Delta Opal através do gráfico bi-plot (scores e loadings) sob a perspectivas da PC1 e PC2. Em todas as induções de resistência, Delta Opal se distinguiu do controle pela PC1, com maior variância explicada para o tratamento de herbivoria mais jasmonato de metila com 85,34% (DO Herb 200S) e menor para o tratamento com herbivoria mais adição de metil jasmonato nas folhas com 69,83% (DO Herb 200S). A maior separação é observada nos tratamentos com aplicação de jasmonato de metila no solo, nas duas concentrações testadas (DO 20S e DO 200S) e no tratamento submetido a herbivoria mais adição de jasmonato de metila (DO Herb 200S). Portanto, o genótipo Delta Opal, demonstrou responder a nível metabólico significativamente as induções de resistência estudadas.

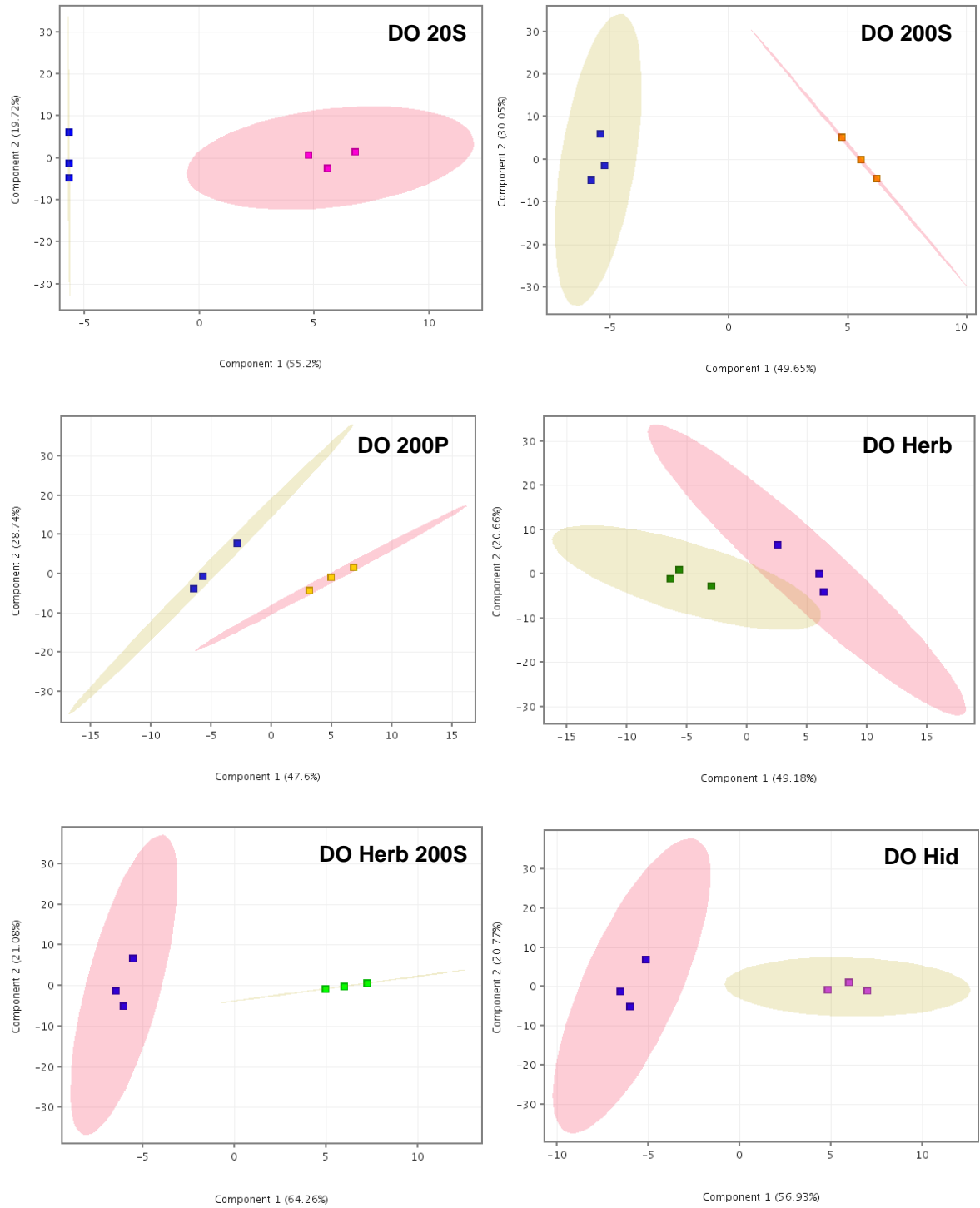


FIGURA 5.51 – Gráficos de escores PC1 vs PC2 do genótipo DO Controle e os tratamentos de indução de resistência

Os gráficos de vulcano Delta Opal (DO) controle *versus* DO experimentos foram gerados a fim de identificar quais picos mais influenciam na diferenciação apontada pelo PCA, os dados dos gráficos de vulcano dos experimentos com o genótipo Delta Opal estão no Apêndice D. A FIGURA 5.52 apresenta os gráficos de vulcano entre o Delta Opal Controle *versus* A) Delta Opal com adição de jasmonato de metila na concentração de 20 μmolL^{-1} ao solo (DO 20S), B) Delta Opal com adição da solução de jasmonato de metila na concentração de 200 μmolL^{-1} no solo (DO 200S), C) Delta Opal com adição de jasmonato de metila (200 μmolL^{-1}) nas folhas (DO 200P), reunindo assim os gráficos da regulação metabólica decorrente da adição do jasmonato de metila.

O ponto lilás em *up regulation* no vulcano de DO 20S corresponde ao composto não identificado (NI) (**1**, TR= 12.96), esse composto está presente no DO 20S, mas não é encontrado no controle. Vale ressaltar que esse mesmo composto aparece no vulcano do DO 200P, como o ponto laranja no limiar superior direito do cut-offs, ou seja, ele também aparece em *up regulation* no DO 200P. Para o tratamento DO 200S a *up regulation* se devem ao ácido linoleico (**6**, TR=32.31), ácido linolênico (**7**, TR= 32.42) e uridina (**8**, TR=36.16) presentes em ambas as amostras, mas em maior quantidade no tratamento DO 200S que no DO Controle. O mesmo ocorre com o glicerol (**10**, TR=11.81) no DO 200P (FIGURA 5.52).

Em *down regulation* temos os isômeros 1 e 2 do mio-inositol (**2**, TR=28.87 e **3**, TR= 30.01) nos experimentos DO 20S e DO 200P. O somatório dos açúcares em 20 (**4**) e 25 (**5**) minutos também se apresenta em *down regulation* para DO 20S. No tratamento DO 200S o ácido dodecanóico (**9**, TR=36.64) está em menor quantidade que no DO Controle.

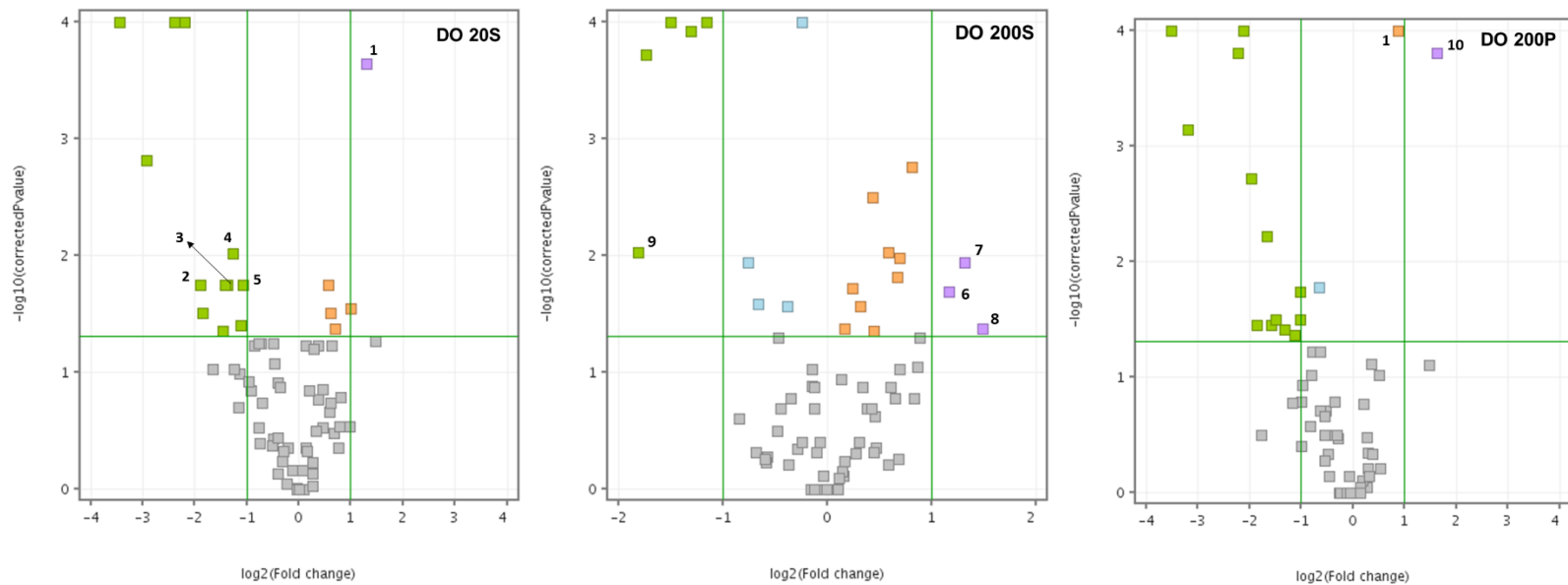


FIGURA 5.52 – Gráfico de Volcano para as amostras de DO Controle *versus* tratamentos com adição de jasmonato de metila.

A FIGURA 5.53 apresenta os gráficos de Volcano dos tratamentos A) pós herbivoria (DO Herb) e B) pós herbivoria mais adição de jasmonato de metila (200 μmolL^{-1}) ao solo (DO Herb 200S). No tratamento DO Herb temos *up regulation* para o ácido linolênico (TR=32.42) e um esteroide não identificado (**11**, TR=49.27). Alguns pontos no limiar do cut-off/*up regulation* no tratamento DO Herb mostraram-se interessantes, como o ácido linoleico (**6**, TR=32.31), presente como *up-regulation* no tratamento DO 200S; uma substância glicosilada não identificada (**12**, TR=41.52) e um outro pico não identificado em 49.11 min (**13**), ambos também aparecem em *up-regulation* no experimento DO Herb 200S.

Além dos picos em 41.52 (**12**) e 49.11 (**13**) min, o ácido butanoico (**14**, RT=12.89) e mais dois outros picos não identificados (RT= 12.96; 32.05) aparecem em maior concentração nas amostras induzidas de DO Herb 200S (*up-regulation*). O composto não identificado em 12.96 min (**1**) já foi apontado em *up-regulation* nos tratamentos DO 20S e DO 200P e não está presente na amostra sem indução (DO Controle). No limiar cut-offs/*up-regulation* temos o esteroide não identificado (**11**, TR=49.27) que também está em *up-regulation* no DO Herb, o ácido málico (**16**, TR=17.30) e o pico em 43.97 min (**17**) que aparece apenas na indução DO Herb 200S e não está presente no controle, podendo ser uma resposta de defesa a herbivoria expressada quando há o precursor jasmonato de metila em excesso.

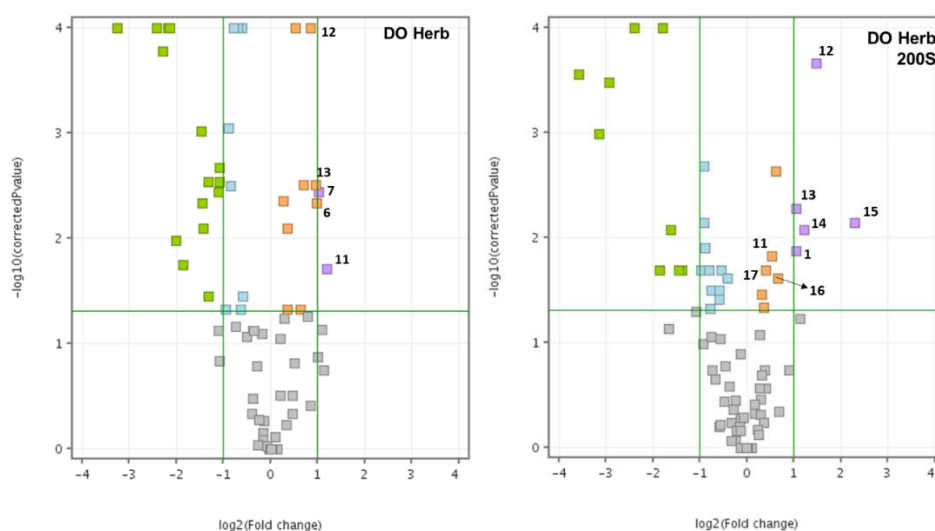


FIGURA 5.53 – Gráficos de Volcano de DO Controle *versus* tratamentos submetidos a herbivoria.

No gráfico de vulcano DO controle *versus* tratamento de estresse por déficit hídrico (DO Hid) apenas uma substância foi apontada em *up regulation*, um esteroide não identificado (**11**, TR= 49.27). Em contrapartida, há doze pontos em *down regulation*, dentre eles o ácido propanoico (**18**, TR=13.27), o mio inositol (isômero 1, TR=28.87) e o somatório dos açúcares entre 20-25 minutos (**5**) (FIGURA 5.54).

Essa diminuição na quantidade de algumas substâncias pode ser explicada pela necessidade da planta de redirecionar seu metabolismo a fim de regular os danos causados por estresses sejam eles abióticos ou bióticos (TAIZ et al., 2017). A FIGURA 5.55 demonstra essa variação para o mio inositol (isômero 1 e 2) que aparecem em menor quantidade nos experimentos DO Hid, DO Herb, DO Herb 200S e nos experimentos DO 200P e DO 20S. KOSAR e colaboradores (2021) observaram que o estresse hídrico além de prejudicar os parâmetros de crescimento da planta supriu a produção de proteínas solúveis totais, da clorofila e dos ácidos palmítico e linoleico em dois cultivares de girassóis (Hysun 33 e FH 598). Uma diminuição análoga foi observada para o DO Hid com menores quantidades de pelo menos 11 metabólitos além dos açúcares totais.

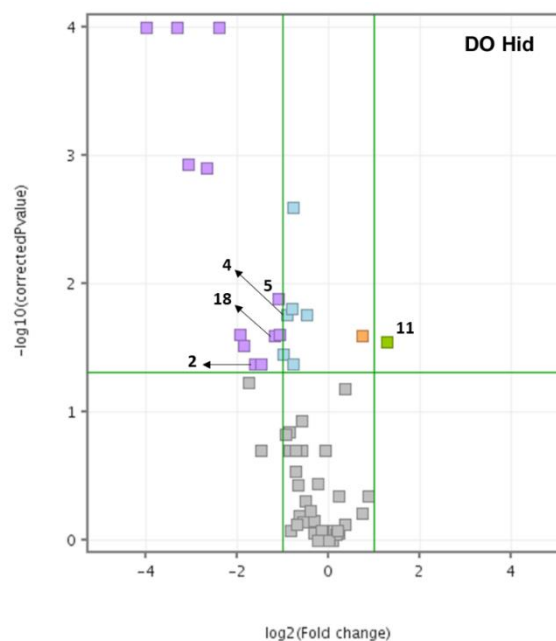


FIGURA 5.54- Gráfico de Volcano DO Controle *versus* DO Hídrico

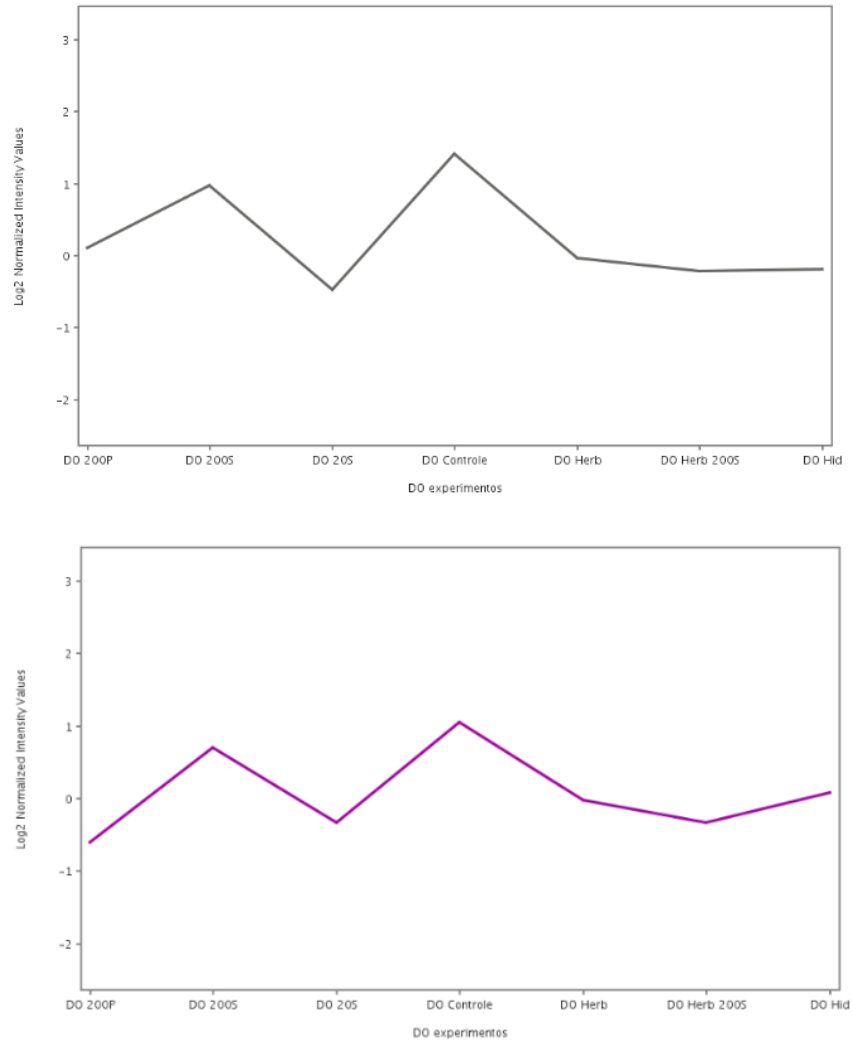


FIGURA 5.55– Variação do Mio-inositol isômero 1 (preto) e 2 (roxo) nos diferentes tratamentos.

Os gráficos de PCA para o genótipo FMT 701 e os respectivos experimentos de indução a defesa estão representados na FIGURA 5.56. Cada PCA condensou graficamente mais de 70% da informação multivariada considerando apenas os componentes principais PC1 e PC2, apresentados, respectivamente, nos eixos x e y. Pode-se observar que o FMT 701 Controle e os experimentos de indução foram convenientemente separados em quase todos os experimentos, exceto para os experimentos de adição de jasmonato de metila na concentração de $20 \mu\text{molL}^{-1}$ no solo (FMT 20S) e no estresse por déficit hídrico (FMT 701 Hid). Assim, infere-se que não houve diferenciação a nível metabólico significativa nos experimentos FMT 20S e FMT

Hid, uma vez que as amostras desses experimentos e do controle estão agrupadas. Em contrapartida, nos demais experimentos as separações observadas por meio da PC1, no gráfico de scores de PC1 *versus* PC2 entre tratamentos induzidos e controle, indica que houve indução de resistência significativa para esses experimentos.

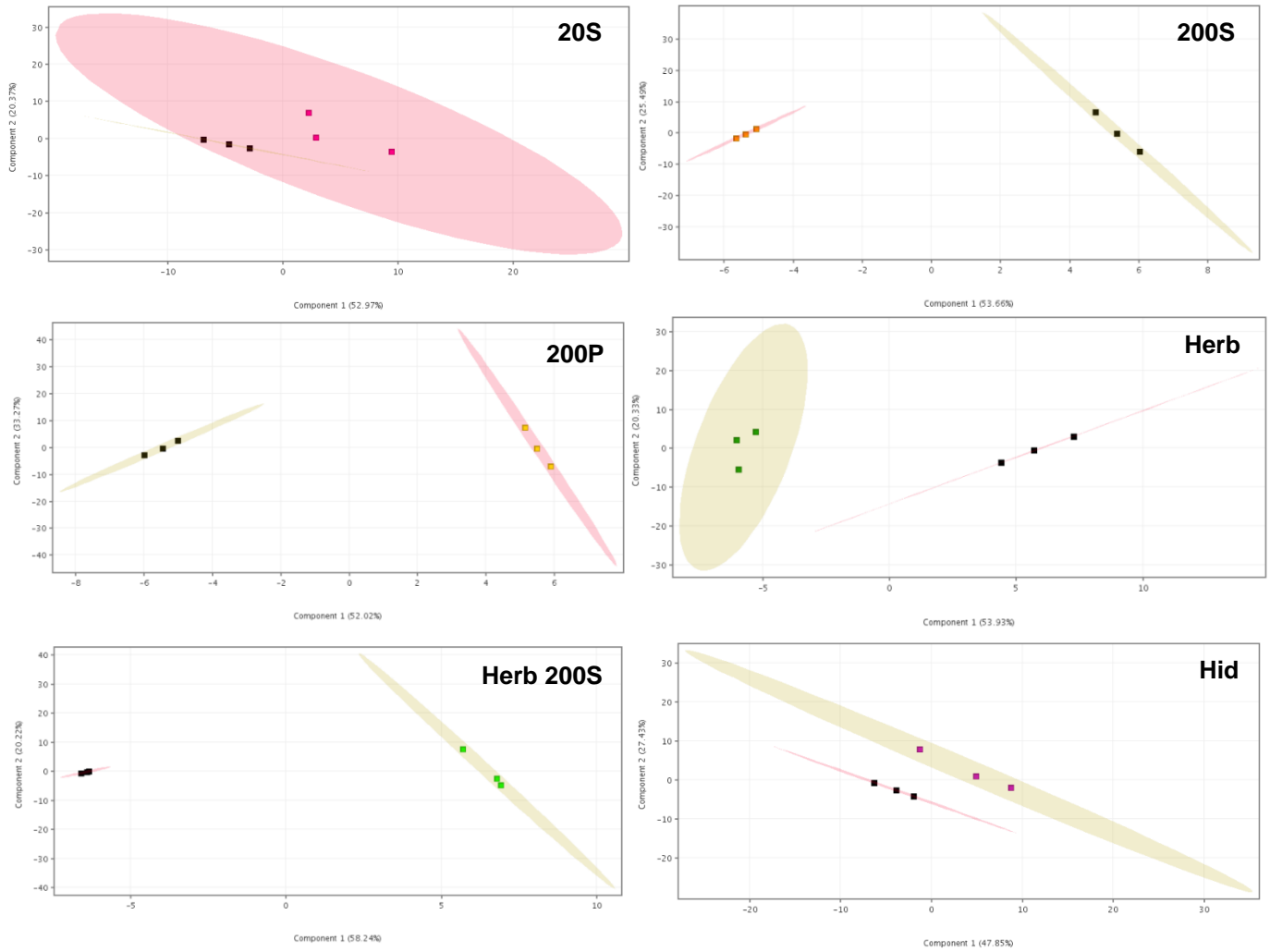


FIGURA 5.56- Gráficos dos escores de PC1 *versus* PC2 dos experimentos de FMT 701

Os gráficos de vulcano dos experimentos que indicaram diferenciação metabólica foram gerados utilizando o método de *test-t* moderado e a *fold-change* a fim de identificar os metabólitos diferenciais, com o \log_2 (*fold change*) plotado no eixo x contra o \log_{10} (valor *p*) do *test-t* plotado no eixo y. Os dados dos gráficos de vulcano dos experimentos com o genótipo FMT 701 estão no Apêndice D.

A adição de jasmonato de metila na concentração de $200 \mu\text{molL}^{-1}$ no solo (FMT 200S) induziu a produção do campesterol (**1**, TR=47.53 min) e do glicerol (**2**, TR= 11.81 min) e suprimiu a produção do açúcar não identificado (**3**, TR= 14.79 min) (FIGURA 5.57).

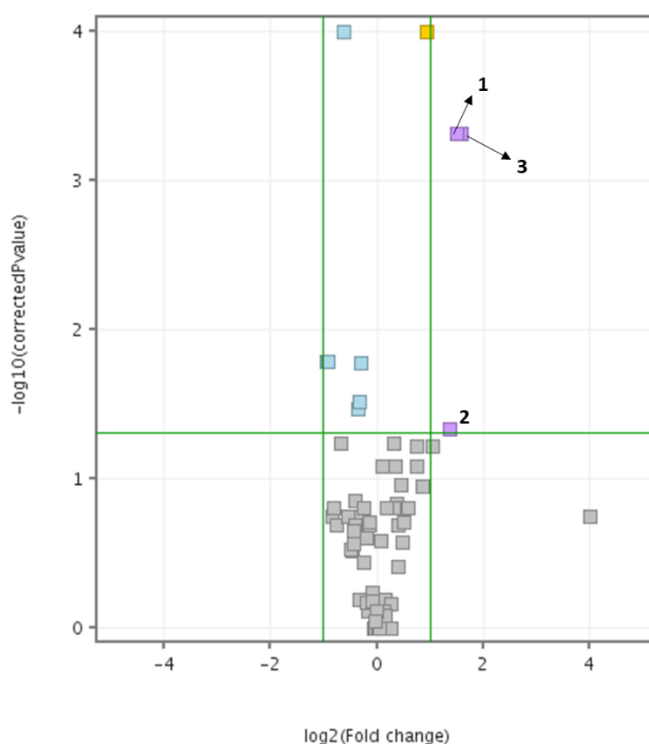


FIGURA 5.57 - Gráfico de Volcano FMT Controle *versus* FMT 200S

Para o experimento com adição de jasmonato de metila pulverizado nas folhas (FMT 200P) novamente o gráfico de vulcano apresenta o glicerol (**2**), campesterol (**1**) e o açúcar não identificado em 14.79 min (**3**) como metabólitos diferenciais, além de 3 outros picos não identificados em 16.52, 17.43 e 17.89 min. O glicerol e o açúcar NI como *up-regulation* e o campesterol com *down regulation*. Os picos NI em 17.43 e 17.89 estão

presentes apenas em FMT 200P e não estão presentes no FMT controle e o pico o açúcar NI (TR= 4.79) está presente apenas no FMT Controle (FIGURA 5.58).

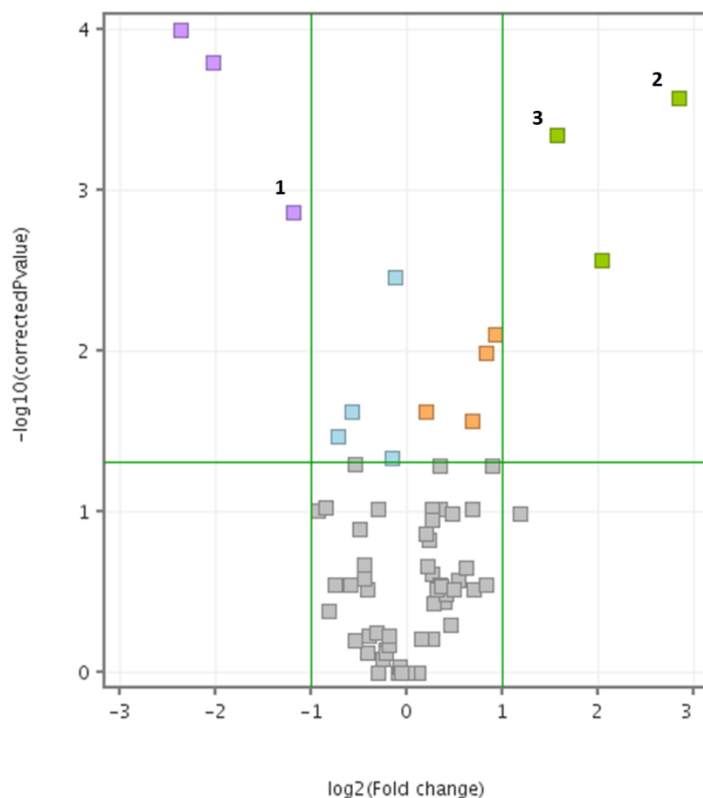


FIGURA 5.58 - Gráfico de Volcano FMT Controle *versus* FMT 200P

No experimento de herbivoria como genótipo FMT 701 (FMT Herb) o ácido succínico (**4**, TR=12.89 min), ácido linoleico (**5**, TR=32.31 min) e mais 4 picos estão presentes como *up-regulation* e o pico em 4.06 min está em *down regulation*. O tratamento com herbivoria mais adição de metil jasmonato (FMT Herb 200S) apontou 18 metabólitos diferenciais, 16 em *up-regulation* dentre eles os mesmos 6 encontrados em *up-regulation* no tratamento FMT Herb mais o campesterol (**1**) e o glicerol (**2**); e 6 em *down regulation*, um deles sendo um açúcar (TR= 21.62 min) presente apenas neste tratamento (FIGURA 5.59).

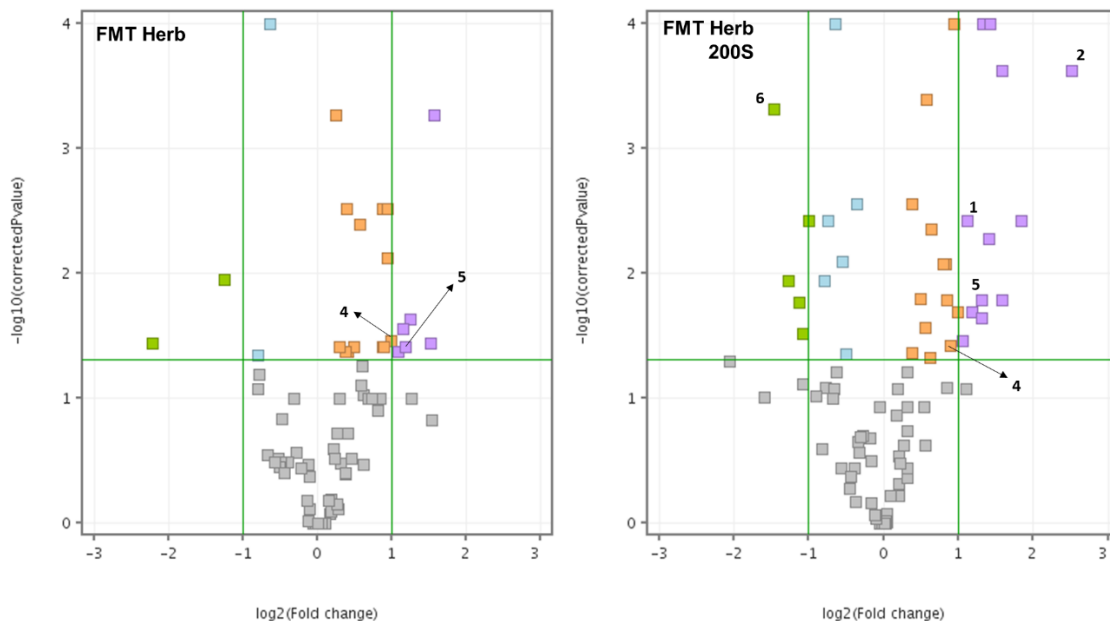


FIGURA 5.59 - Gráficos de volcano FMT Controle *versus* FMT Herb e FMT Herb 200S

A FIGURA 5.60 apresenta as flutuações de alguns dos metabólitos nos diferentes experimentos para FMT. Pode-se observar que o campesterol e o glicerol tiveram diferenças significativas sendo expressos em maior quantidade nos experimentos de FMT Herb e FMT Herb 200S em comparação ao FMT Controle. Entretanto, o pico em 50.11 min está mais presente no controle que em todos os experimentos de indução de resistência.

Como anteriormente discutido o campesterol está relacionado a menor consumo alimentar de *S. litoralis* acompanhado de um menor ganho de massa da lagarta (SANTOS et al. 2019). Esse composto foi identificado como metabólito diferencial de defesa contra *S. cosmioides* para os genótipos BRS 286 e BRS 336 e as flutuações quantitativas observadas para esse composto no genótipo FMT 701 sugere que ele também faz parte do mecanismo de defesa do genótipo sendo mais produzido quando ocorre herbivoria.

A substância glicosilada não identificada em 41.52 min (FIGURA 5.61) aparece nos experimentos FMT Herb, FMT Herb 200S, DO Herb e DO Herb 200S e não está presente nos genótipos nos grupos controle, FMT Controle e DO Controle, e nem nas outras induções de resistência. Além do mais, ela se encontra em maior quantidade

quando há indução por herbivoria mais adição de jasmonato de metila ao solo na concentração de $200 \mu\text{molL}^{-1}$ e o comportamento de resposta da planta em relação a esta substância é semelhante nos dois genótipos. Assim, pode-se inferir que esta substância é uma resposta de defesa da planta a herbivoria, e na presença de jasmonato de metila e herbivoria é expressa em maior quantidade. (FIGURA 5.62). A substância é indicada como glicosilada, pois apresenta pico base em $m/z = 204$, característico de açúcar, além de ser apontada como açúcar pela comparação do seu espectro de massas com o da base de dados NIST, no entanto, o índice de retenção não é compatível a mono ou dissacarídeos. Desta forma, infere-se que se trata de uma substância com um açúcar como grupo substituinte. Contudo, ela não pode ser identificada, apenas monitorada e indicada como parte dos mecanismos de defesa dos dois genótipos contra *S. cosmioides*

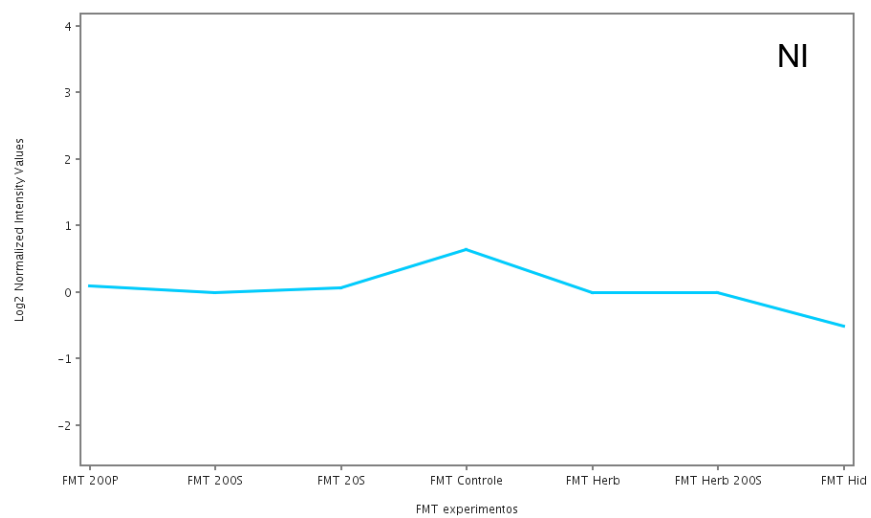
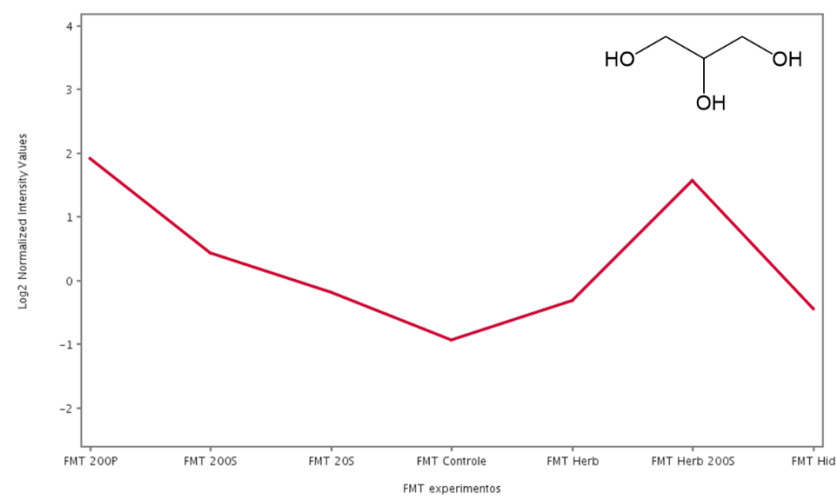
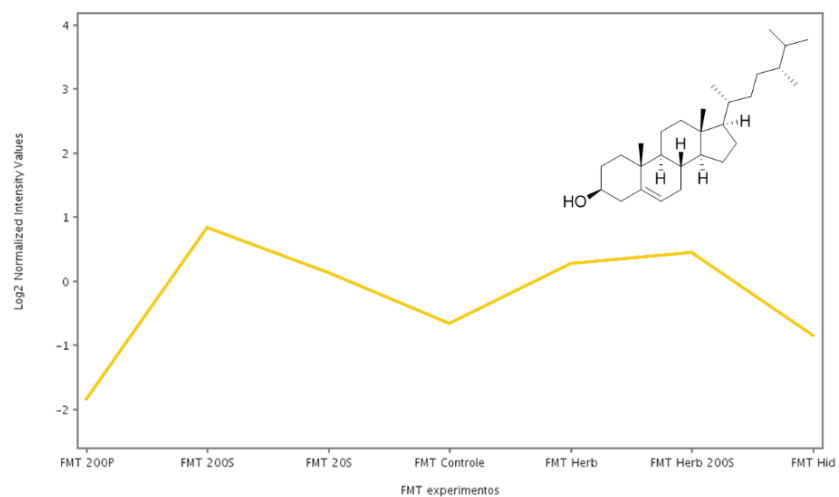


FIGURA 5.60 – Variações do campesterol (amarelo), glicerol (vinho) e NI 50.51 min (azul) nos experimentos de FMT.

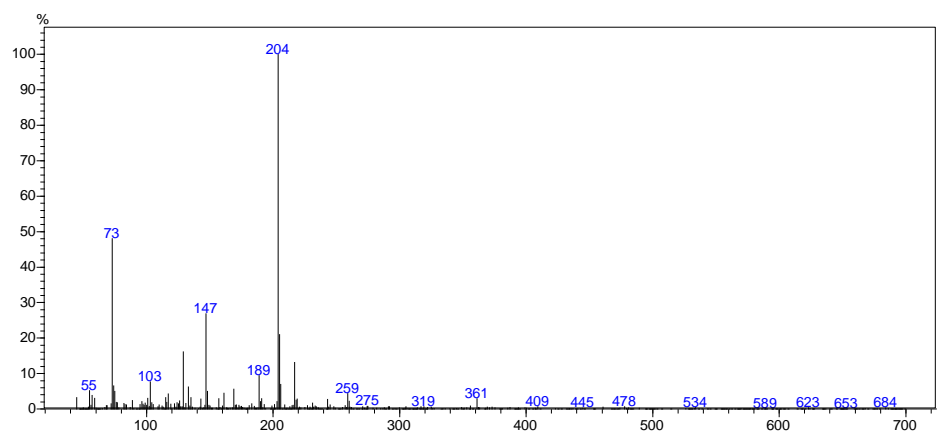


FIGURA 5.61 – Espectro de massa da banda cromatográfica em 41.42 min

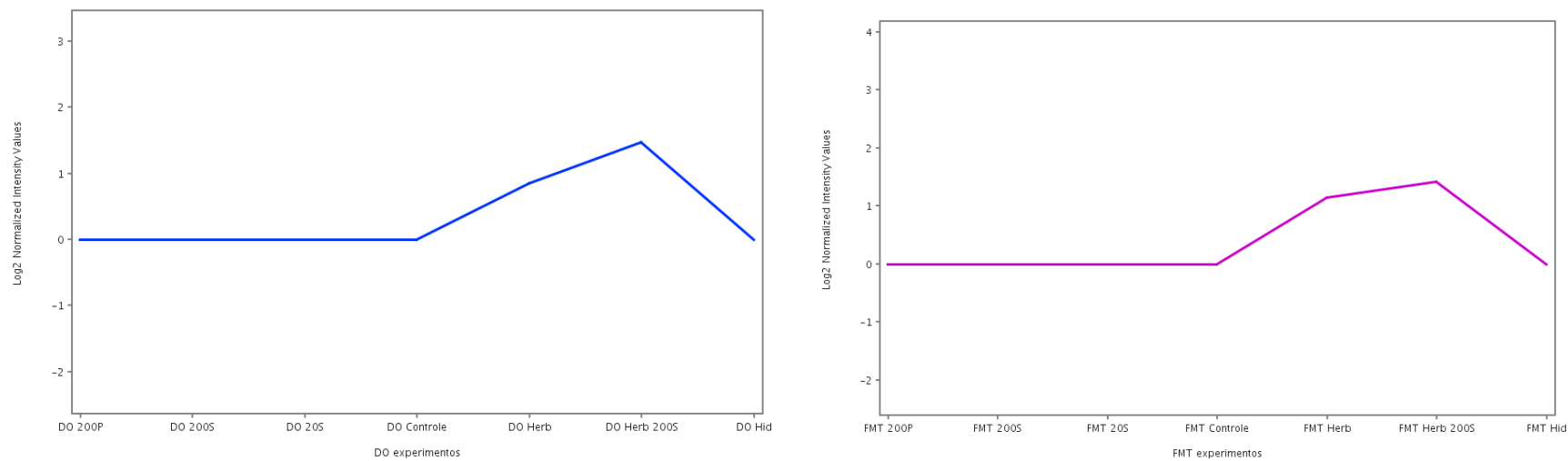


FIGURA 5.62 – Variação do composto NI em 41.52 minutos nos experimentos com Delta Opal e FMT 701

A resposta da planta representada pelos ácido linoleico e ácido linolênico também foi semelhante para os genótipos Delta Opal (DO) e FMT 701 (FMT). Nas induções de resistência com adição de jasmonato de metila no solo (20S e 200S), sob herbivoria (Herb) e herbivoria mais jasmonato de metila (Herb 200S) observou-se uma maior quantidade de ácido linoleico e ácido linolênico nos dois genótipos em comparação aos grupos controle (FIGURA 5.64-5.67). Para o genótipo FMT não se observou diferença quantitativa significativa dos ácidos ao compararmos os experimentos com herbivoria (FMT Herb) e herbivoria mais jasmonato de metila (FMT Herb 200S) (FIGURA 5.66 e 5.67).

A aplicação de jasmonato de metila por pulverização parece não ter sido capaz de provocar o acúmulo desses ácidos no genótipo DO, apresentando níveis semelhantes entre DO 200P e DO controle. No entanto, observou-se o acúmulo do ácido linolênico em FMT 200P com quantidades semelhantes a FMT 200S, demonstrando que as vias de aplicação, pulverização nas folhas ou aplicação no solo, induzem de forma similar a produção desses ácidos no genótipo FMT 701 (FIGURAS 5.64 e 5.65).

Os ácidos linolênico e linoleico são conhecidos por sinalizarem resposta de defesa em plantas (SUMAYO et al., 2014; BABENKO et al., 2017), seu acúmulo pode ser observado nos genótipos DO e FMT submetidos a herbivoria - DO/FMT Herb e DO/FMT Herb 200S - demonstrando que esses genótipos também utilizam os ácidos linolênico e linoleico como parte de sua resposta e mecanismos de defesa ao sofrerem herbivoria por *Spodoptera cosmioides*.

O acúmulo dos ácidos linolênico e linoleico também foi observado nos tratamentos com aplicações de jasmonato de metila exógeno ao solo na concentração de 20 e 200 μmolL^{-1} . Em plantas o ácido jasmônico e o ácido linolênico são sinalizadores e precursores de mecanismos de defesa e participam da mesma rota biossintética, sendo o ácido linolênico precursor do ácido jasmônico, pela rota conhecida como rota dos octadenóides, conforme apresentado na FIGURA 5.63 (DEWICK, 2009 e TAIZ et al., 2017) (FIGURA 5.63).

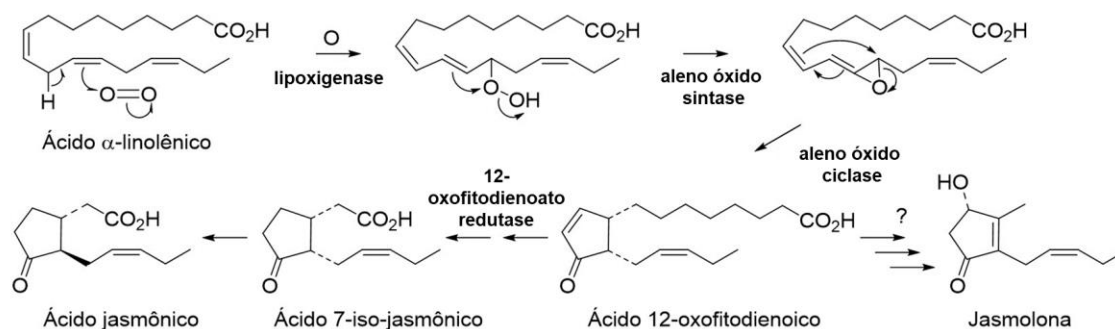


FIGURA 5.63 – Rota de biossíntese de formação do ácido jasmônico a partir do ácido linolênico. Fonte: DEWICK, 2009.

CAO e colaboradores (2016) observaram que o metabolismo do ácido α -linolênico foi ativado por tratamento com jasmonato de metila exógeno em *Arabidopsis*, sugerindo que apesar do ácido linoleico ser precursor de ácido jasmônico, o ácido jasmônico é regulado por um circuito fechado e pode se autorregular e regular positivamente ácidos graxos derivados do ácido linolênico. Além de observarem variações similares a dos mecanismos de ácido linolênico nos mecanismos de lipídeos do tipo prenol e esterol, indicando que o ácido jasmônico também interage sinergicamente com eles. Esses resultados estão de acordo com o acúmulo observado dos ácidos linoleico e linolênico nos genótipos Delta Opal e FMT 701 confirmando a regulação positiva entre esses ácidos e a adição de jasmonato de metila em plantas.

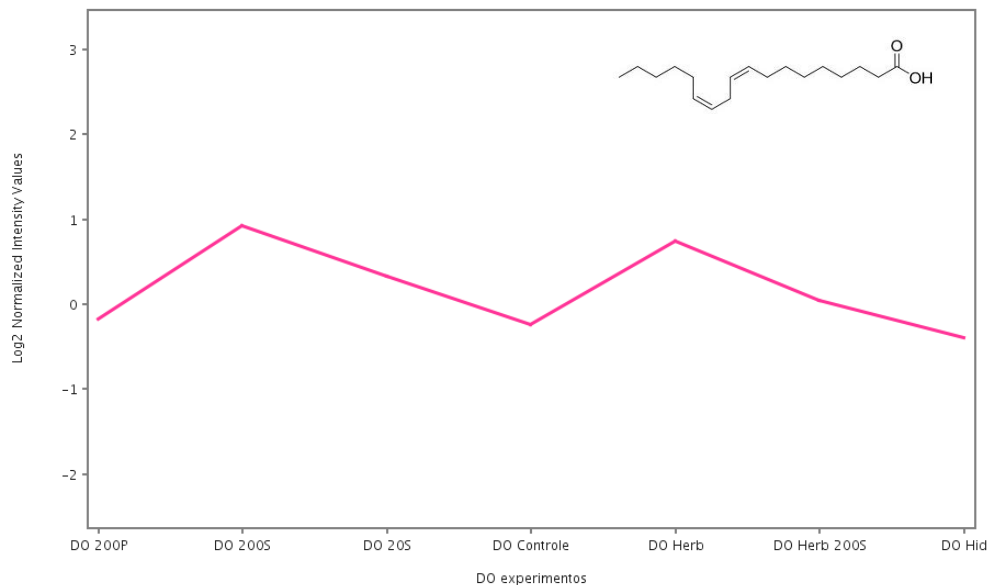


FIGURA 5.64 – Variação do ácido linoleico nos diferentes tratamentos com o genótipo Delta Opal.

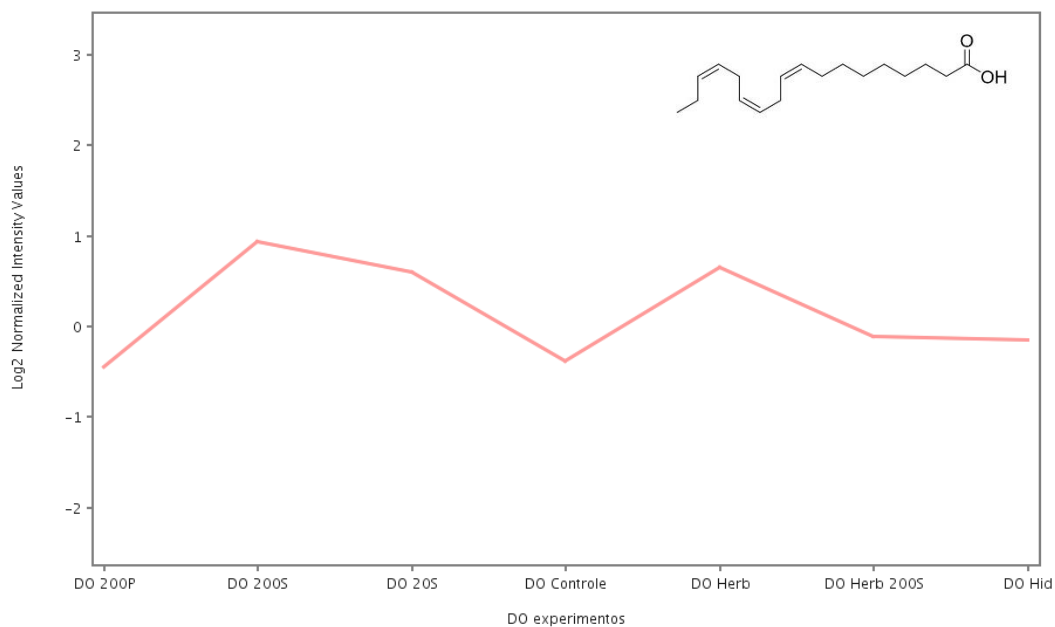


FIGURA 5.65 – Variação do ácido linolênico nos diferentes tratamentos com o genótipo Delta Opal.

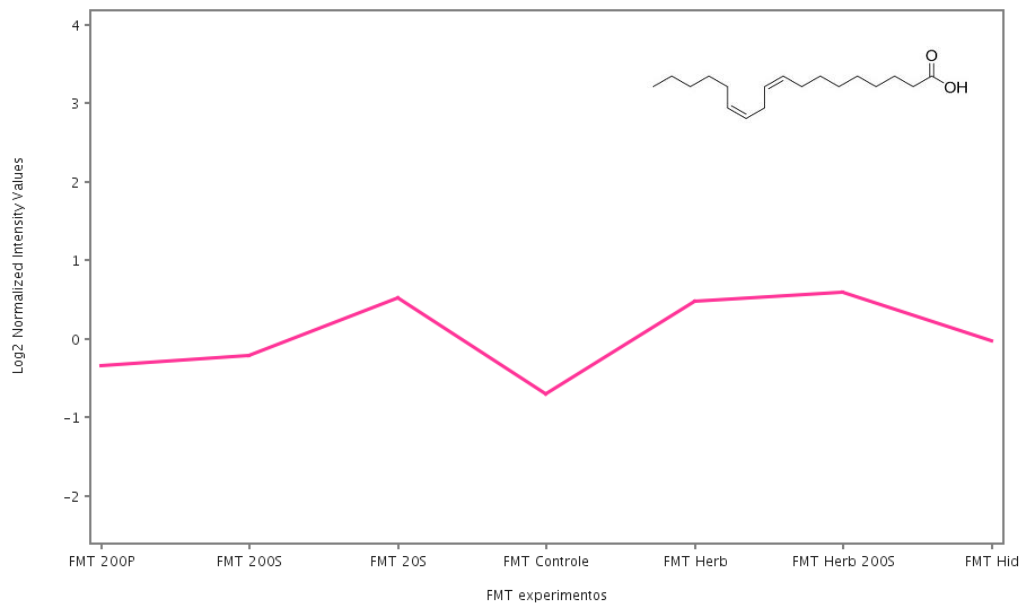


FIGURA 5.66 – Variação do ácido linoleico nos diferentes tratamentos com o genótipo FMT 701.

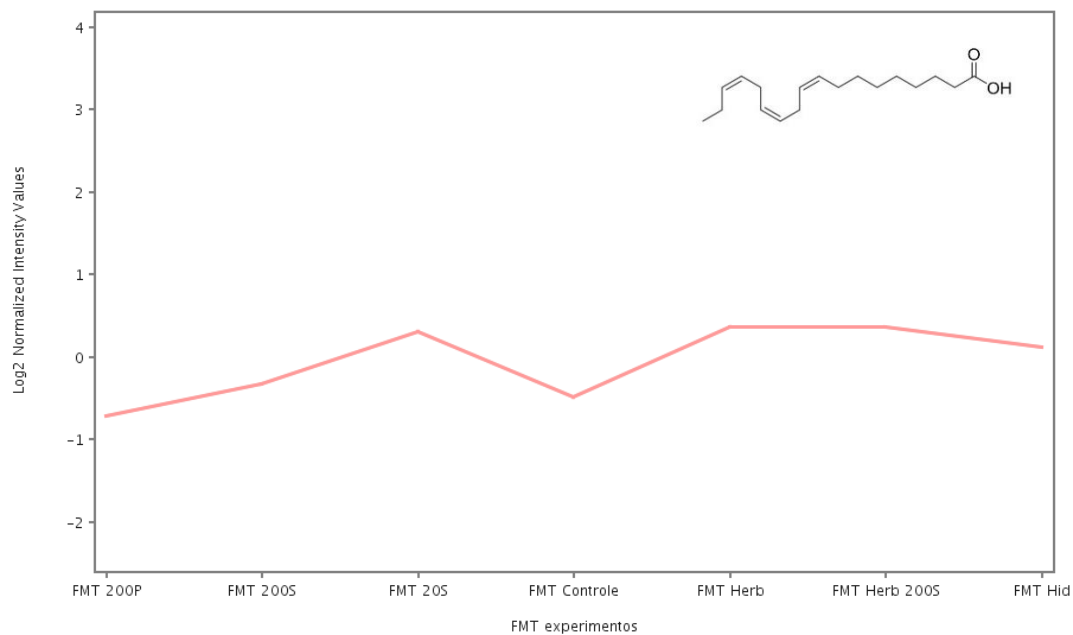


FIGURA 5.67 – Variação do ácido linolênico nos diferentes tratamentos com o genótipo FMT 701.

5.4.2 - Análise por UPLC-QToF-MS

A análise dos componentes principais foi realizada com todos os tratamentos de cada um dos genótipos Delta Opal e FMT 701 e demonstrou uma separação clara entre os tratamentos, indicando um efeito significativo e diferencial das induções de resistência nos dois genótipos a nível metabólico (FIGURA 5.68 e 5.74).

5.4.2.1 – Delta Opal

No genótipo Delta Opal (DO), considerado o genótipo suscetível, a PCA explicou 81,02% da variância total, com a primeira componente principal explicando 42,09%, a segunda 24,87% e a terceira 14,06%.

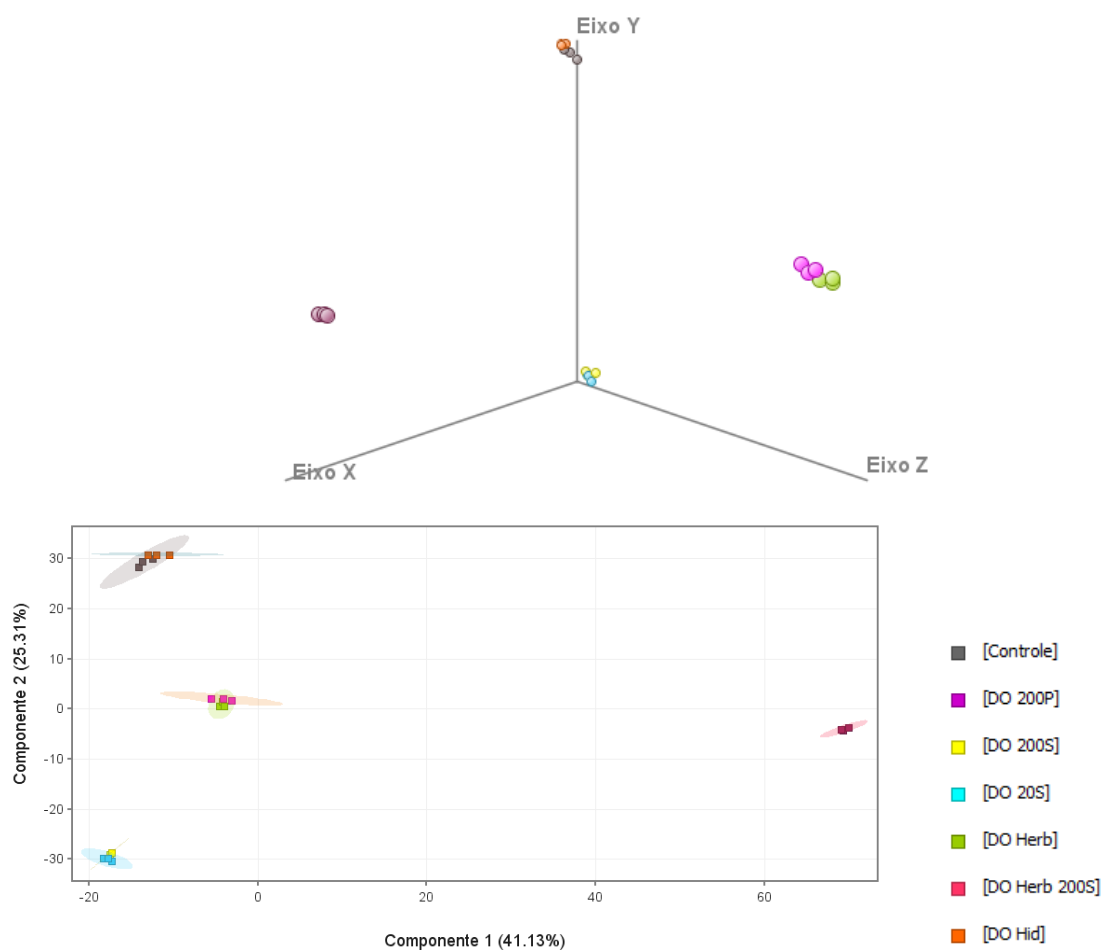


FIGURA 5.68 - PCA 3D e PCA 2D (PC1 X PC2) dos experimentos de indução de resistência com o genótipo Delta Opal.

Os tratamentos com adição de jasmonato de metila ao solo (DO 20S e DO 200S) demonstraram modificação metabólica semelhantes e separaram-se do DO Controle pela PC1 e PC2 (FIGURA 5.68), ou seja, o genótipo Delta Opal responde metabolicamente a aplicação de jasmonato de metila no solo. No entanto, DO 20S e DO 200S estão agrupadas, indicando que não há diferença significativa entre as duas concentrações avaliadas. No diagrama de Venn é possível observar mais claramente essa semelhança (FIGURA 5.69). O DO 20S e DO 200S compartilham 196 entidades como resposta da indução - aproximadamente metade das entidades consideradas para cada um, além das 159 entidade em comum ao DO controle, totalizando 355 potenciais metabólitos iguais; ademais cada tratamento possui quantidades de potenciais metabólitos específicos similares - DO 20S com 61 e DO 200S com 68 entidades, demonstrando a similaridade da resposta metabólica entre os dois experimentos. Portanto, a aplicação de jasmonato de metila no solo de DO gera uma resposta metabólica, mas a concentração, seja ela alta ($200 \mu\text{molL}^{-1}$) ou baixa ($20 \mu\text{molL}^{-1}$), não demonstra ser um fator discriminante para essa resposta. Podendo assim, o uso de concentrações baixas de jasmonato de metila no solo já ser suficiente para induzir modificações no perfil metabolômico no genótipo Delta Opal. Adicionalmente, os testes feitos por AQUINO (2020) apontam que *S. cosmioides* apresenta menor preferência alimentar e atratividade no experimento de DO 20S quando comparado ao controle e o mesmo não foi observado para DO 200S. Afirmando a vantagem da adição de jasmonato de metila exógeno em baixa concentração ($20 \mu\text{molL}^{-1}$).

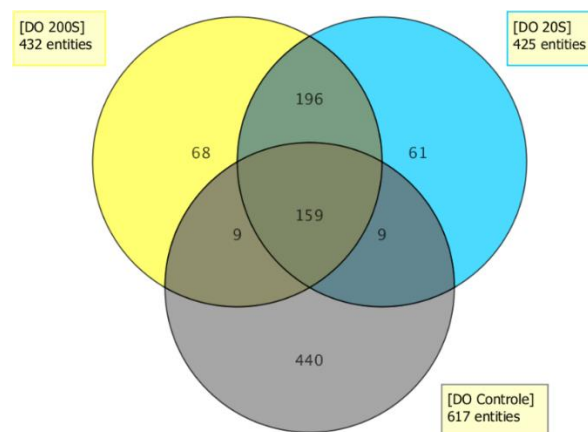


FIGURA 5.69 – Diagrama de Venn dos potenciais metabólitos dos experimentos DO Controle, DO 20S e DO 200S.

O tratamento com jasmonato de metila ($200 \mu\text{molL}^{-1}$) pulverizado nas folhas (DO 200P) se diferenciou do DO Controle por PC1 e PC2, indicando que a aplicação nas folhas promove alterações metabólicas no genótipo; além de DO 200P também se distinguir dos outros tratamentos com aplicação de metil jasmonato no solo (DO 20S e DO 200S) pela PC1 (FIGURA 5.68). O diagrama de Venn indica que 1171 potenciais metabólitos foram induzidos com a pulverização de jasmonato de metila nas folhas, destes ao menos 1030 entidades são específicas para DO 200P, não sendo encontradas no DO 20S e DO 200S (FIGURA 5.70).

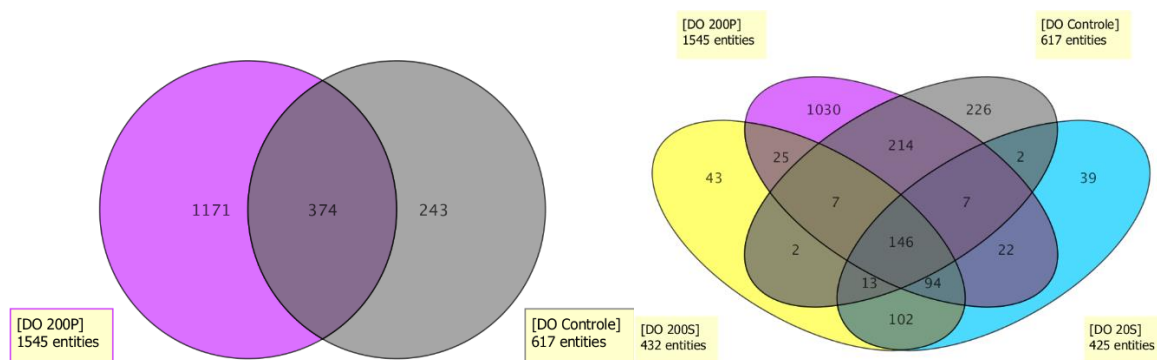


FIGURA 5.70 - Diagrama de Venn dos potenciais metabólitos dos experimentos DO Controle, DO 20S e DO 200S.

O maior número de possíveis metabólitos induzidos em DO 200P, comparado a DO 20S e DO 200S, demonstra que a eficiência do jasmonato de metila exógeno como precursor de novos metabólitos é maior se ele for pulverizado nas folhas que aplicado no solo. AQUINO (2020) analisando o perfil químico dos voláteis e o consumo foliar por *Spodoptera cosmioides*, nesses mesmos tratamentos com Delta Opal, relatou que o tratamento DO 200P foi o único a apresentar diferenças significativas tanto no perfil químico quanto no ensaio biológico de consumo foliar em relação ao grupo controle, indicando que a aplicação de jasmonato de metila nas folhas pode causar indução de resistência a *S. cosmioides*. Este resultado está de acordo com o observado para o perfil químico dos metabólitos fixos aqui estudados, sendo o tratamento DO 200P o que apresentou maior diferenciação metabólica, dentre todos os tratamentos com Delta Opal, na análise por UPLC-QToF-MS (FIGURA 5.68).

Os tratamentos herbivoria (DO Herb) e herbivoria mais jasmonato de metila (DO Herb 200S) demonstraram semelhança na resposta metabólica entre si e separaram-se do DO Controle principalmente pela PC2. O DO Herb e DO Herb 200S compartilham 194 entidades como resposta as induções de resistência, 139 encontradas em DO Herb e DO Herb 200S e 55 encontradas em DO Herb, DO Herb 200S e DO 200S. Além de 99 potenciais metabólitos diferenciais para DO Herb e 46 para DO Herb 200S, destes 34 são respostas específicas do sinergismo entre a herbivoria e a aplicação de jasmonato de metila exógeno (FIGURA 5.71), como é o caso do derivado do ácido caféico ([M+H⁺]= 379.0644, Tr=3.713 min) e um esteroide caracterizado como celastrol ([M+H⁺]= 450.2769, Tr=10.947 min) (TABELA 5.5).

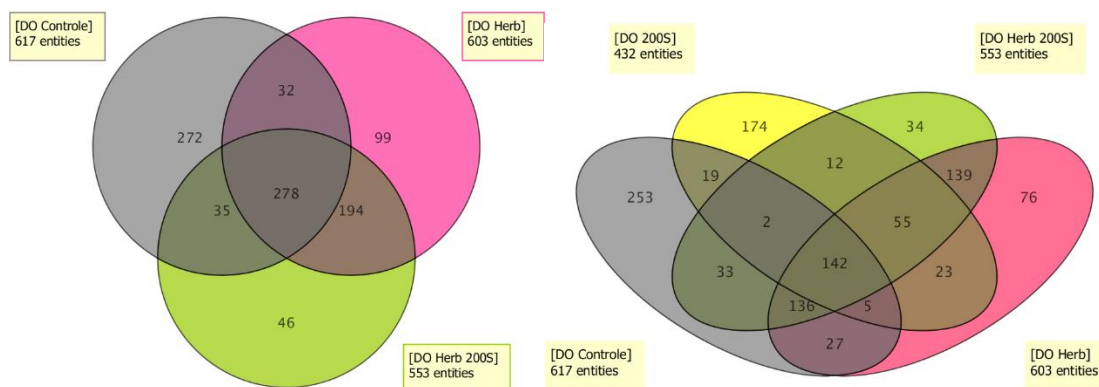


FIGURA 5.71 - Diagrama de Venn dos potenciais metabólitos dos experimentos DO Controle, DO 20S e DO 200S.

Na FIGURA 5.72 pode-se observar a diferenciação entre DO Herb e DO Herb 200S em termos quantitativos. A aplicação de jasmonato de metila juntamente com a herbivoria (DO Herb 200S) parece estimular a produção dos flavonoides, com os picos indicados como flavonoides em maior intensidade em DO Herb 200S que em DO Herb.

Tal acúmulo de flavonoides em plantas submetidas a aplicação de jasmonato de metila tem sido frequentemente descrito na literatura (WANG et al., 2015; IQBAL et al., 2018; HORBOWICZ et al., 2021). PREMATHILAKE e colaboradores (2020) relataram o aumento da expressão de genes estruturais da via de biossíntese de flavonoides com a

aplicação de jasmonato de metila exógeno em calos de pera e o aumento significativo do acúmulo de flavonoides.

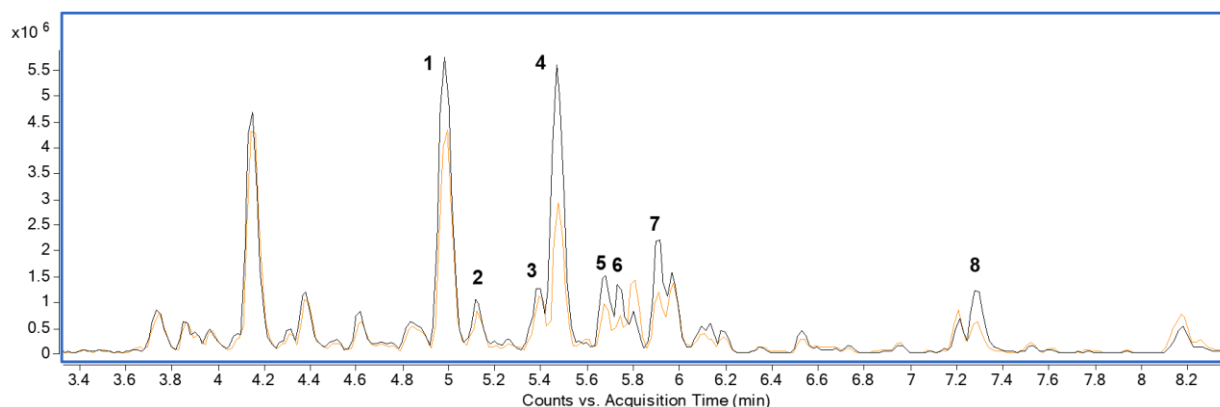


FIGURA 5.72 - Perfil cromatográfico de DO Herb e DO Herb 200S obtido por UPLC-QToF-MS. DO Herb: laranja; DO Herb 200S :preto; Números destacando os picos indicados como flavonoides.

No tratamento sob estresse por déficit hídrico (DO Hid) não houve diferenciação significativa em relação ao controle (DO Controle), com DO Hid e DO Controle agrupados na PCA, pela PC1 e PC2 (FIGURA 5.68). No diagrama de Venn, observa-se que 69,2% dos candidatos a metabólitos, equivalente a 522 entidades, estão presentes nos dois grupos e apenas 137 são específicas para o tratamento sob estresse hídrico. A diferença pouco expressiva entre o tratamento sob estresse hídrico e o grupo controle também foi observado na análise por GC-MS, sugerindo que o genótipo DO não responde a nível metabólico ao estresse hídrico ou que o estresse hídrico a que foi submetido nos experimentos não foi o suficiente para induzir uma resposta significativa na planta.

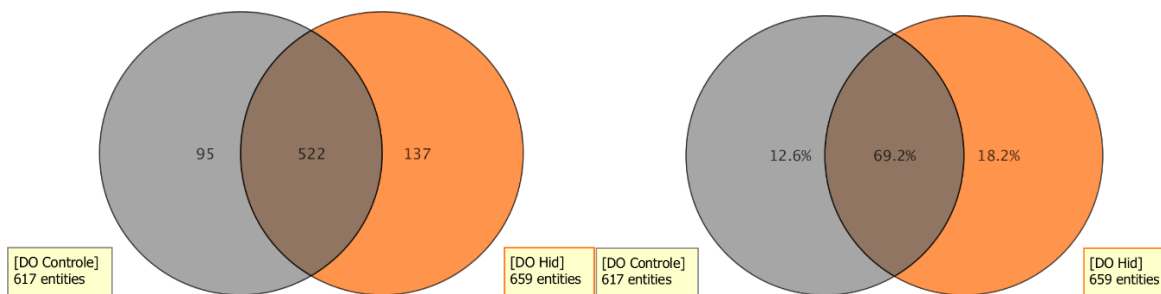


FIGURA 5.73 – Diagrama de Venn dos potenciais metabólitos de DO Controle e DO Hid

5.4.2.2 – FMT 701

A análise dos componentes principais do genótipo FMT 701 explicou 71,24% da variância total, com 36,4% para PC1, 27,4% para PC2 e 7,44 % para PC3, além de demonstrar uma boa separação estatística, como é possível observar pela disposição espacial dos experimentos na FIGURA 5.74. O PCA 2D dividiu claramente os tratamentos em três grupos, FMT Controle e FMT Hid do lado esquerdo, FMT 20S, FMT 200P e FMT Herb e FMT Herb 200S a direita e o tratamento FMT 200S apresentou-se sozinho no canto superior direito separado de todos os demais tratamentos.

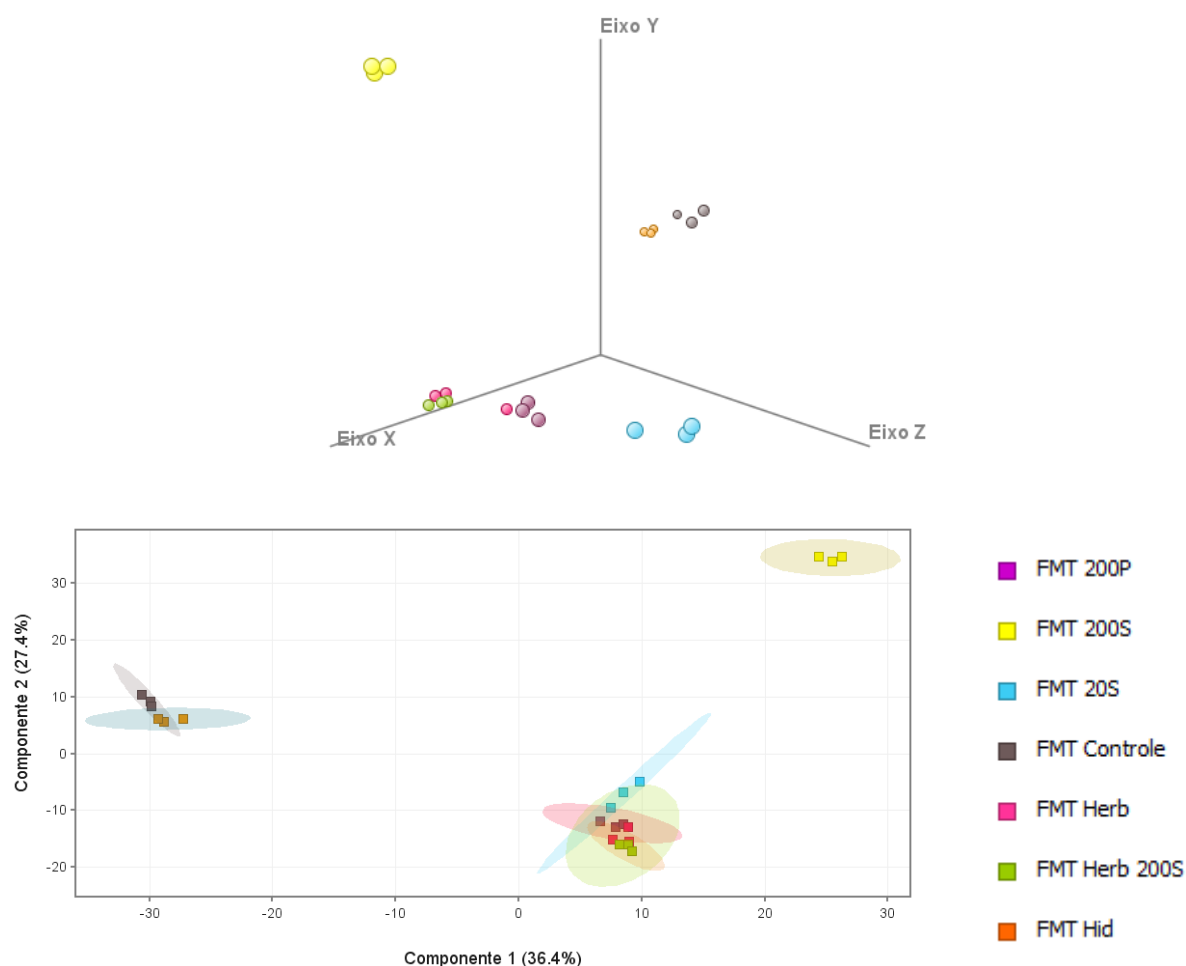


FIGURA 5.74 – PCA 3D e PCA 2D (PC1 X PC2) dos experimentos de indução de resistência com o genótipo FMT 701.

A análise do dendrograma demonstra os níveis de similaridade entre os diferentes tratamentos com o genótipo FMT 701 e os agrupamentos naturais existentes entre eles (FIGURA 5.75), as cores mais frias (azul) significam menor concentração dos

potenciais metabólitos e as cores mais quentes (vermelho) maior concentração. Ao estabelecer uma distância igual a 285 os experimentos dividem-se em 3 grupos. Os experimentos FMT Controle e FMT Hid estão agrupados a uma distância de 165, o que indica que os experimentos são semelhantes e que há pouca diferenciação metabólica entre os dois experimentos, o mesmo acontece com os experimentos FMT Herb e FMT Herb 200S que também são similares; com uma distância igual a 114 é possível discriminar os sete experimentos.

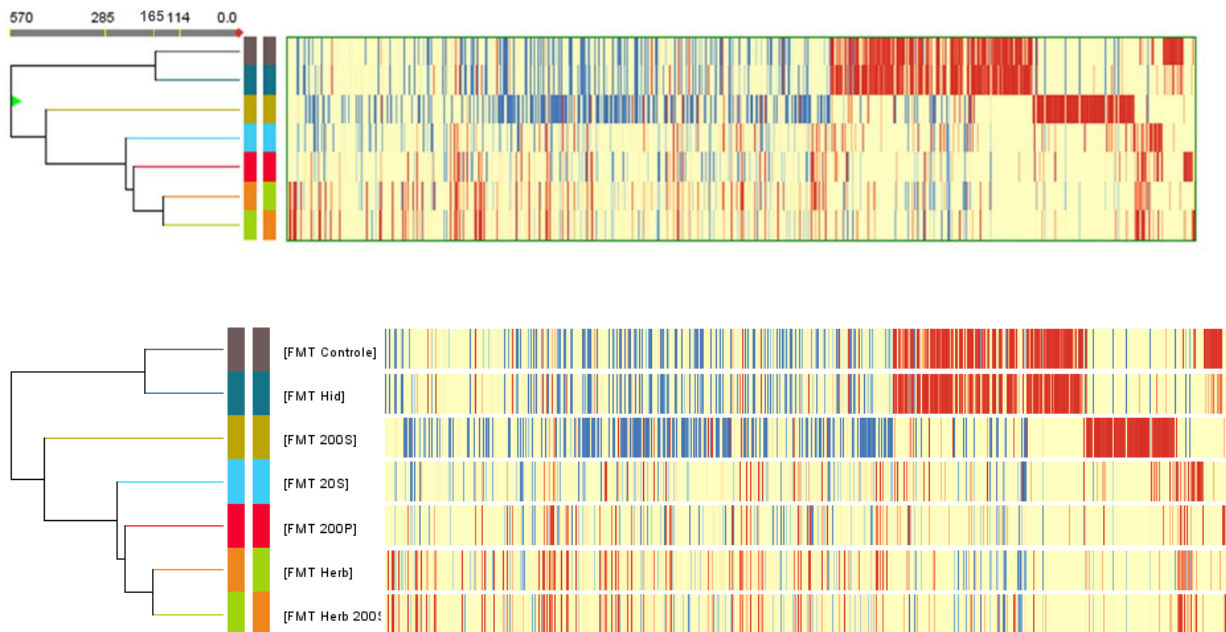


FIGURA 5.75- Dendrograma obtido para os experimentos com o genótipo FMT 701 com o método de agrupamento Ward.

O experimento de estresse hídrico novamente é o mais semelhante ao grupo controle - o qual encontra-se agrupado pela PC1 e PC2 (FIGURA 5.74), demonstrando menor distância euclidiana no dendrograma e apresentando resposta similar, com 81,58% de entidades compartilhadas entre eles, e uma diferenciação discreta com 13 entidades em *down regulation* para FMT Hid e 18 em *up regulation* (FIGURA 5.76).

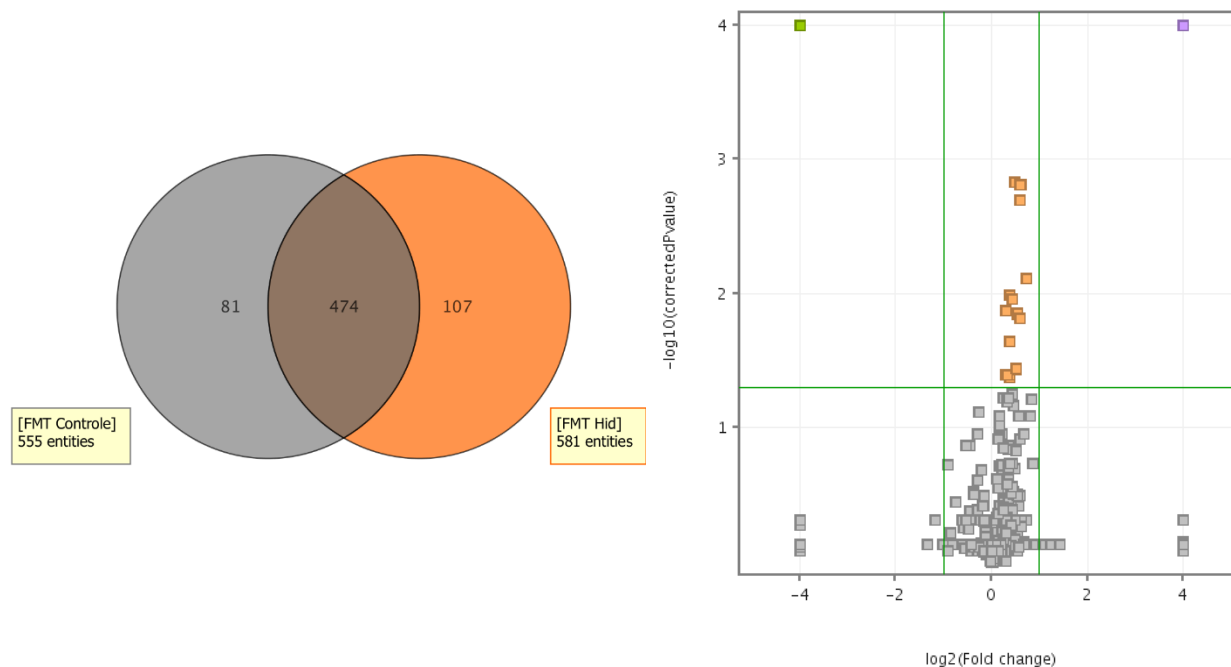


FIGURA 5.76 - Diagrama de Venn e Gráfico de Volcano para FMT Hid *versus* FMT Controle

Sabe-se que as plantas respondem ao estresse hídrico, seja ele por excesso ou escassez de água, e que a resposta e sua eficiência dependem da espécie e do genótipo estudado (SHARMA et al., 2019; KHAN et al., 2021).

As plantas de algodão necessitam de maior quantidade de água um pouco antes e durante a floração, e a escassez de água no período de frutificação causa prejuízo a produção e qualidade de fibra (CORDÃO SOBRINHO et al., 2015; REICHARD, 1990 apud RODRIGUES et al. 2016; LUZ et al., 1997). Genótipos que toleram melhor a seca e utilizam mecanismos de defesa para que suportem períodos de estiagem são economicamente interessantes para minimizar custos ou perdas por mudanças climáticas. No entanto, os genótipos FMT 701 e Delta Opal parecem não possuírem essas capacidades.

A similaridade entre os tratamentos sob estresse hídrico e grupo controle também foi observada na análise dos metabólitos fixos por GC-MS e no genótipo Delta Opal, bem como nas análises dos voláteis dos dois genótipos submetidos a estresse hídrico realizada por AQUINO (2020). Essas observações podem indicar que os dois genótipos

não respondem a nível metabólico ao estresse hídrico, sendo susceptíveis a variações de irrigação, ou que os experimentos a que foram submetidos não se configuraram como estressantes o bastante para induzir uma resposta significativa na planta

BALDO et al. (2009) avaliando o cultivar Delta Opal relatou que a planta não tolera déficit hídricos de 25% de VTP (volume total de poros), ocorrendo comprometimento no seu desenvolvimento e estruturas reprodutivas, mas que genótipo tolera bem excesso de água.

PEREIRA (2017) avaliou a tolerância ao estresse hídrico em 9 genótipos de algodão, dentre eles o FMT 701. O genótipo FMT 701 demonstrou sensibilidade ao ambiente com limitação hídrica e lentidão no restabelecimento do crescimento após a reidratação. O estresse hídrico ocasionou diminuição na resistência da fibra, algo não desejável e tolerado pela indústria. O autor ainda afirma que essas observações estão de acordo com as condições genéticas desse cultivar, que foi desenvolvido para expressar um maior potencial produtor em climas de cerrado e não possui características genéticas para tolerar estresse hídrico prolongado.

Correlacionando os resultados encontrados por BALDO e colaboradores (2009), PEREIRA (2017) e os observados na análise metabolômica de Delta Opal e FMT 701, pode-se afirmar que os dois genótipos não possuem um forte mecanismo de defesa contra o déficit hídrico, sendo susceptíveis a estresse hídrico, e respondem metabolicamente de forma discreta a mudanças quando submetido a escassez de água.

Os tratamentos com adição de jasmonato de metila exógeno separaram-se do grupo controle na PCA demonstrando que há indução de novos metabólitos (FIGURA 5.74). Curiosamente, FMT 20S se assemelha mais a FMT 200P que a FMT 200S. O diagrama de Venn mostra que FMT 20S compartilha 373 potenciais metabólitos com FMT 200P; em contrapartida, um número bem menor de candidatos, 241, são comuns a FMT 20S e FMT 200S. Apesar do FMT 200S possuir 127 entidades específicas, seu grau de distinção com FMT controle é menor, cerca de 54,41% de candidatos diferentes do controle, contra 59,50% para FMT 20S e 60,2% para FMT 200P. A pulverização de jasmonato de metila nas folhas (200P) demonstra ser o meio mais efetivo de adição do

fitormônio, pois induz uma maior resposta metabólica nos genótipos FMT 701 e Delta Opal (FIGURA 5.77).

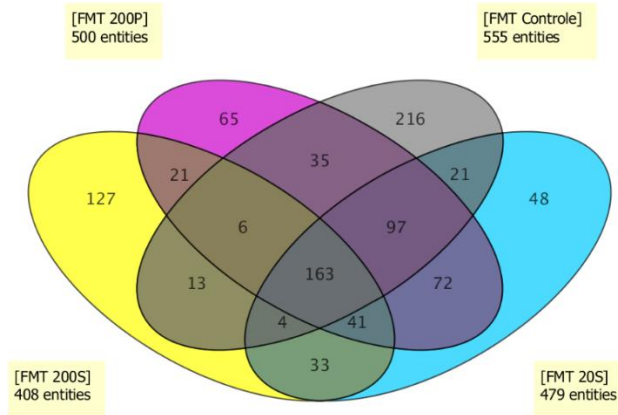


FIGURA 5.77 – Diagrama de Venn com os potenciais metabólitos de FMT Controle e experimentos com adição de jasmonato de metila exógeno.

Segundo AQUINO (2020) as lagartas de *Spodoptera cosmiodes* tiveram menor preferência alimentar pelo tratamento FMT 20S e FMT 200P, preferindo as folhas do grupo controle. No entanto, o mesmo comportamento não foi observado com o genótipo FMT 200S, que não apresentou diferença estatística de consumo foliar com o FMT Controle. Adicionalmente, as lagartas mostraram-se repelidas pelo tratamento FMT 200P corroborando que a pulverização com jasmonato de metila induz uma maior resposta da planta e é a forma mais eficiente de utilizar o jasmonato de metila como precursor de resistência (FIGURA 5.78 e 5.79).

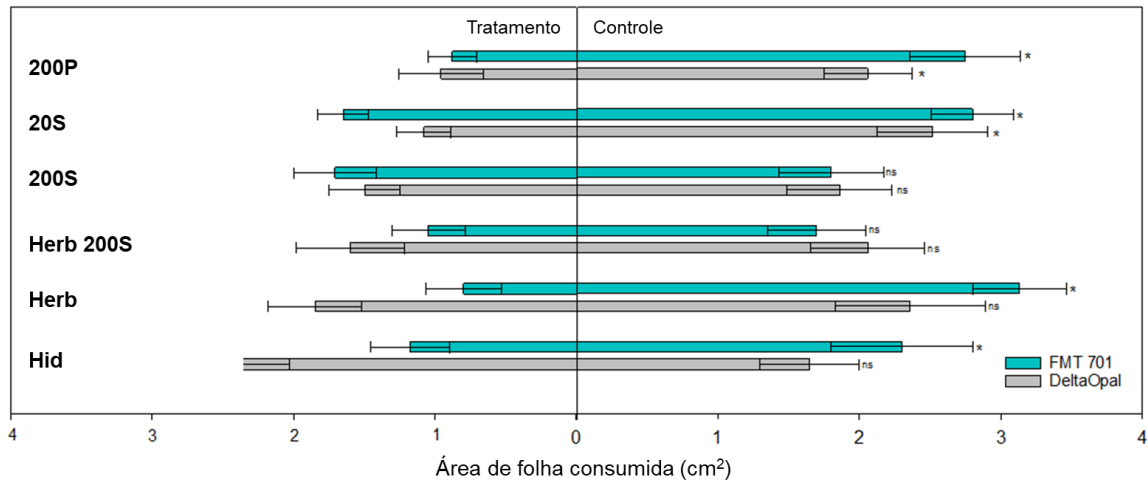


FIGURA 5.78 - Área foliar consumida (cm²) por lagartas de 3^o ínstar de *Spodoptera cosmioides* em diferentes tratamentos de indução de resistência em cultivares de algodão (Fonte: AQUINO, 2020). * O tratamento apresenta diferença significativa pelo teste t (P < 0,05). ns O tratamento não apresenta diferença significativa pelo teste t (P < 0,05).

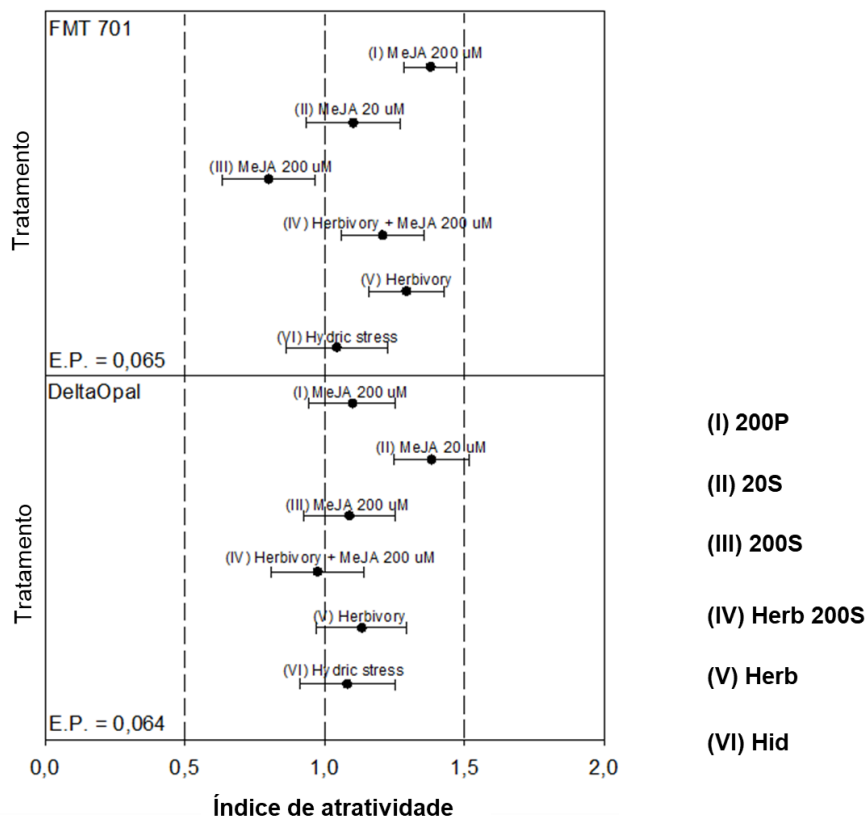


FIGURA 5.79 - Índice de atratividade (IA) por lagartas de 3^o ínstar de *Spodoptera cosmioides* em diferentes tratamentos para indução de resistência em cultivares de algodão (Fonte: AQUINO, 2020). IA ± E.P. > 1 repelência pelo tratamento em relação ao controle; IA ± E.P. < 1 preferência pelo tratamento em relação ao controle; IA ± E.P. = 1 neutralidade.

As respostas metabólicas de FMT Herb e FMT Herb 200S são semelhantes e diferem-se do FMT Controle (FIGURA 5.80). O FMT Herb 200S apresentou 551 potenciais metabólitos, destes 309 (56,07%) comuns a FMT Controle e 445 (80,76%) comuns a FMT Herb. O FMT Herb apresentou 210 potenciais metabólitos como resposta a herbivoria, sendo 45 entidades como resposta específica a herbivoria e 165 candidatos presentes também em FMT Herb 200S. O FMT Herb 200S indicou 77 potenciais metabólitos específicos ao sinergismo entre a herbivoria e a adição de jasmonato de metila ao solo (FIGURA 5.80).

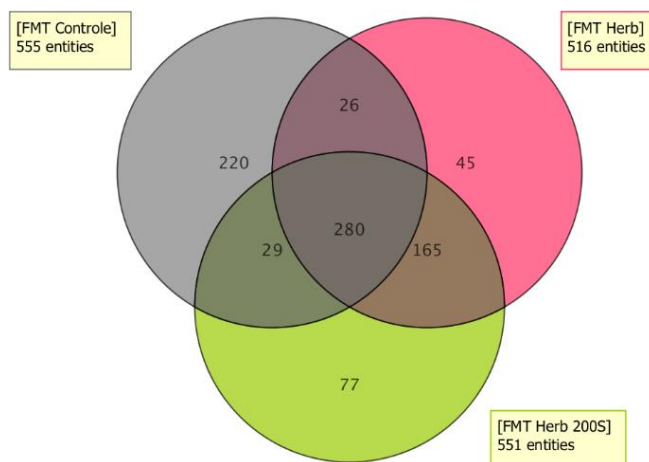


FIGURA 5.80 – Diagrama de Venn com os potenciais metabólitos de FMT Controle, FMT Herb e FMT Herb 200S.

Dois flavonoides foram monitorados e identificados como sendo os flavonoides rutina e a quercetina hexose (FIGURA 5.27). Estes flavonoides estão em maior quantidade em FMT Herb 200S que em FMT Herb e FMT Controle. No entanto, para a quercetina-hexose a diferença não é significativa. Para a rutina a herbivoria parece induzir sua produção e no experimento FMT Herb 200S ela é ainda mais expressada (TABELA 5.7). Os demais potenciais metabólitos diferenciais não puderam ser identificados, pois apresentaram baixa similaridade na comparação com os bancos de dados consultados. Isto é uma dificuldade da técnica já mencionada anteriormente, uma vez que os bancos de dados ainda são escassos e incompletos (CAO et al., 2016).

TABELA 5.7 – Variação de rutina e quercetina-hexose em experimentos com FMT 701.

	Rutina	Quercetina-hexose
FMT Controle	173,91a	154,48a
FMT Herb	214,49ab	166,40a
FMT Herb 200S	226,41b	184,59a

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Os tratamentos FMT Herb e FMT Herb 200S demonstraram repelência contra *S. cosmioides* quando comparado a FMT não induzido (FMT Controle), indicando que a diferenciação metabólica apresentadas por esses tratamentos são resultados da resposta de defesa da planta e que esta resposta é eficiente (FIGURA 5.79) (AQUINO, 2020).

5.4.3 – Fitormônios e substância de defesa

Os fitormônios são mensageiros químicos que regulam e coordenam o metabolismo, o crescimento e a morfogênese das plantas. O desenvolvimento das plantas é regulado por nove hormônios principais dentre eles os jasmonatos, mas as funções deles não estão ligadas apenas ao desenvolvimento vegetal. O ácido jasmônico ativa os genes relacionados a defesa e desliga o crescimento da planta para que os recursos sejam realocados para as rotas metabólicas envolvidas na defesa. Ele ativa não só as rotas para produção de metabólitos tóxicos ou repelentes, mas também desencadeia a biossíntese de proteínas que interferem no trato gastrointestinal do inseto. Desta forma, quando há ataque por herbívoros os níveis de ácido jasmônico aumentam rapidamente, sendo produzido pela rota dos octadecanoides (TAIZ et al., 2017) (FIGURA 5.63).

O derivado jasmonato de metila também é conhecido por sua atividade de indução de defesa, que, por ser lipossolúvel, atravessa facilmente as membranas e pode ser transportado pelas organelas vasculares e floema e sua volatilização permite que alcance outros órgãos (KONAN et al., 2014; FAGAN et al., 2015); por isso ele foi utilizado

para induzir resistência em alguns dos experimentos com os cultivares FMT 701 e Delta Opal

A compreensão de como esses hormônios agem na defesa e quais as rotas são ativadas por eles nos grupos vegetais auxilia no entendimento e elaboração de novas intervenções e estratégias de manejo agrícola.

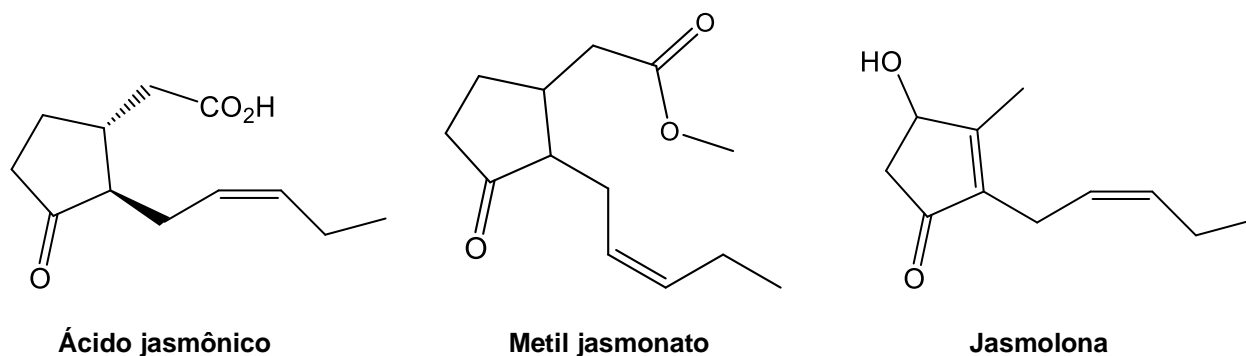


FIGURA 5.81- Estrutura das substâncias monitoradas nos experimentos com DO e FMT

O monitoramento desses fitormônios apontou que os níveis de jasmonato de metila nos experimentos com DO foram em sua maioria estatisticamente semelhantes ao DO Controle, mesmo aqueles em que houve aplicação do composto nas folhas ou no solo. Apenas DO Hid foi significativamente diferente com um maior acúmulo. Para os experimentos com FMT não houve diferença significativa na quantidade de jasmonato de metila monitorada dos experimentos em relação ao grupo controle (TABELA 5.8 e 5.9).

Quanto ao ácido jasmônico nos experimentos com DO, apenas o DO 200P apresentou um maior acúmulo em relação ao grupo controle e os demais experimentos tiveram níveis similares ao DO Controle. Nos experimentos com FMT, novamente o tratamento com pulverização de jasmonato de metila nas folhas (FMT 200P) apresentou acúmulo do ácido jasmônico em relação ao grupo controle, ademais o FMT Herb também apresentou acúmulo com quantidade distinta da encontrada para FMT Controle, mas em menor quantidade que para FMT 200P. Os únicos com níveis de ácido jasmônico significativamente diferentes do FMT Controle foram o FMT Herb e FMT 200P. Ao relacionar essas observações com as encontradas na análise metabolômica em que DO

200P se diferenciou de todos os outros experimentos e FMT 200P também demonstrou maior diferenciação metabólica em relação a FMT Controle que os experimentos FMT 20S e FMT 200S; corrobora-se a afirmação de que a pulverização com jasmonato de metila nas folhas é o meio mais efetivo de aplicação para indução de resistência.

O não acúmulo de jasmonato de metila, principalmente, e ácido jasmônico mesmo nos experimentos em que houve a aplicação de Me-JA podem ser resultado do mecanismo de cascata em que esses compostos detém o papel de precursores biossintéticos de novos metabólitos, como já mencionado, ao invés de serem acumulados pela planta.

Outra substância monitorada foi a jasmolona. A jasmolona provavelmente pertence a mesma rota biossintética do ácido jasmônico, mas sua biossíntese ainda é pouco conhecida. Ela é um dos três alcoóis que ao se ligar com o ácido transcrisantêmico ou ácido pirétrico formam as piretrinas, inseticidas fortemente eficientes (DEWICK et al., 2009; YAN et al., 2021; MATSUI et al., 2020).

O pico anotado como esta substância foi monitorado e a aplicação de jasmonato de metila parece causar uma diminuição na produção da mesma no genótipo Delta Opal, em que os experimentos com DO 20S, DO 200S e DO 200P tiveram menor quantidade que o DO Controle, e o experimento DO Herb 200S apresenta quantidade menor e significativamente diferente de jasmolona em relação a DO Herb. Para o FMT não houve diferença quantitativa significativa entre os experimentos e o grupo controle do composto anotado como jasmolona (FMT Controle).

FREITAS (2020) observou para o cultivar Delta Opal um alto consumo foliar por *S. cosmioides* acompanhado de baixa viabilidade total das lagartas, considerando assim o genótipo moderadamente resistente a esse herbívoro. Se as piretrinas fazem parte do mecanismo de defesa do algodão e contribuem para a resistência observada, as quantidades iguais de jasmolona entre os diferentes experimentos e grupo controle podem indicar que há uma resistência constitutiva no genótipo. Outras hipóteses também podem ser consideradas, como a menor quantidade nos experimentos com adição de metil jasmonato indicar ativação de outras rotas em detrimento da produção de jasmolona e conseqüentemente de piretrinas. Contudo, piretrinas não puderam ser detectadas e

apenas o monitoramento da jasmolona não é suficiente para obter resultados conclusivos.

TABELA 5.8 – Variação de jasmonato de metila, ácido jasmônico e jasmolona analisados por UPLC-QToF-MS nos experimentos com o genótipo Delta Opal.

	Jasmonato de metila	Ácido jasmônico	Jasmolona
DO Controle	2,70bc	0,38b	13,76ab
DO 20S	2,00c	0,45b	6,95c
DO 200S	2,02c	0,34b	7,68c
DO 200P	3,73bc	0,93a	9,36c
DO Herb	2,71bc	0,32b	16,07a
DO Herb 200S	3,14ab	0,25b	12,07b
DO Hid	3,82a	0,59ab	12,84b

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

TABELA 5.9 – Variação de jasmonato de metila, ácido jasmônico e jasmolona analisados por UPLC-QToF-MS nos experimentos com o genótipo FMT 701.

	Jasmonato de metila	Ácido jasmônico	Jasmolona
FMT Controle	2,91abc	0,28c	8,78ab
FMT 20S	2,78bc	0,30c	7,55b
FMT 200S	2,45c	0,42bc	6,23b
FMT 200P	3,05abc	0,87a	11,07ab
FMT Herb	3,67abc	0,54b	10,87ab
FMT Herb 200S	3,71ab	0,38bc	13,61a
FMT Hid	3,74a	0,23c	11,60ab

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

6 – Conclusão

Os métodos de análise por GC-MS e UPCL-MS-QToF demonstram-se satisfatórias para obtenção do perfil metabólico dos 12 genótipos de algodão.

Os genótipos de algodão estudados apresentam similaridade metabólica, mas também possuem metabólitos diferenciais. Os genótipos FMT 701 e FMT 707 apresentaram perfil químico dos metabólitos primários semelhantes e os genótipos BRS 335 e BRS 336 apresentam perfis metabolômicos similares tanto nas análises por GC-MS quanto por UPLC-QToF-MS, assim como os cultivares Delta Opal e BRS 293.

Todos os genótipos apresentaram mudança a nível metabólico ao serem submetidos a herbivoria por *Spodoptera cosmioides*. Compostos como α -tocoferol, ácido-*p*-cumárico, 1-linoleoilglicerol, 2-monopalmitina, campesterol e heliotrina foram alguns dos metabólitos associados a resposta de defesa dos genótipos a herbivoria.

A aplicação de jasmonato de metila exógena nos genótipos Delta Opal e FMT 701 é mais efetiva, produz maior diferenciação metabólica, se for realizada por pulverização nas folhas. A aplicação de jasmonato de metila no solo também foi capaz de induzir mudanças a nível metabólico, no entanto, a concentração de solução aplicada não parece ser determinante para a indução, pois nas duas concentrações testadas, 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a resposta metabólica foi semelhante.

Os cultivares Delta Opal e FMT 701 não responderam metabolicamente ao estresse hídrico e outros estudos apontam os dois como sendo susceptíveis a esse estresse.

Observou-se uma correlação positiva entre a adição de jasmonato de metila e o acúmulo de ácido linolênico, ácido linoleico e ácido jasmônico em Delta Opal e FMT 701, esses compostos são conhecidos por sinalizarem respostas de defesa em plantas. Não foi identificado acúmulo de jasmonato de metila nos experimentos de aplicação exógena do composto, mas houve modificação do perfil metabolômico, ou seja, a aplicação de jasmonato de metila não causa seu acúmulo, mas induz mudanças no metabolismo dos genótipos.

Diante do estudado, corrobora-se o entendimento que as plantas não utilizam um composto isoladamente para defesa, mas todo um sistema com diversos metabólitos de diferentes rotas biossintéticas compõe seu mecanismo de defesa

Assim, este trabalho contribui na compreensão da relação ecológica planta-inseto com uma abordagem a nível de metabólitos e de modificações genéticas, visando a melhoria do processo produtivo do algodão, trazendo observações relevantes acerca dos mecanismos de resposta a fatores bióticos e abióticos a fim de conduzir melhor as estratégias de manejo de cultivares de interesse socioeconômico.

Referência bibliográfica

- ABRAPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO. "Relatório de Gestão - Biênio 2017-2018". Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, Coronário Editora Gráfica Ltda., 2018, 480p.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. "Phytoalexins in defense against pathogens. Trends Plant Science", 17: 73-90, 2012.
- ALAMGIR, K. M.; HOJO, Y.; CHRISTELLER, J. T.; FUKUMOTO, K.; ISSHIKI, R.; SHINYA, T.; BALDWIN, I. T. & GALIS, I. "Systematic analysis of rice (*Oryza sativa*) metabolic responses to herbivory". Plant, Cell and Environment, 39: 453–466, 2016.
- ALBRECHT, C. F.; STANDER, M. A.; GROBBELAAR, M. C.; COLLING, J.; KOSSMANN, J.; HILLS, P. N. & MAKUNGA, N. P. "LC–MS-based metabolomics assists with quality assessment and traceability of wild and cultivated plants of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae)". South African Journal of Botany, 82: 33–45, 2012.
- ALCHANATI, I.; PATEL, J. A. A.; LIU, J.; BENEDICT, C. R.; STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A.; CUI, Y. & MAGILL, C. W. "The enzymatic cyclization of Nerolidyl diphosphate by δ -cadinene synthase from cotton stele tissue infected with *Verticillium dahlia*". Phytochemistry, 47 (6): 961-967, 1998.
- ANDREU-COLL, L.; NOGUERA-ARTIAGA, L.; CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; LEGUA, P. & HERNÁNDEZ, F. "Volatile composition of prickly pear fruit pulp from six Spanish cultivars", Journal of Food Science, 0 (0), 2020.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017. Disponível em: < http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 >. Acesso em: 17 de novembro de 2022.
- AQUINO, F. R. Estudo metabolômico dos constituintes voláteis de algodoeiro submetido à interações bióticas e abióticas e mecanismos de indução de resistência. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2020. Dissertação de Mestrado, 203p.
- ATAIDE, L. M. S.; PAPPAS, M. L.; SCHIMMEL, B. C. J.; LOPEZ-ORENES, A.; ALBA, A. M.; DUARTE, M. V. A.; PALLINI, A.; SCHUURINK, R. C. & KANTA, M. R. "Induced plant-defenses suppress herbivore reproduction but also constrain predation of their offspring". Plant Science, 252: 300-310, 2016.
- AUSTEL, N.; BOTTCHEER, C. & MEINERS, T. "Chemical defence in Brassicaceae against pollen beetles revealed by metabolomics and flower bud manipulation approaches". Plant Cell Environ., 44: 519–534, 2021.
- BABENKO, L. M.; SHCHERBATIUK, M. M.; SKATERNA, T. D. & KOSAKIVSKA, I. V. "Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance". Ukr. Biochem. J., 89 (1), 2017.

- BADER, T.; SCHULZ, W.; KUMMERER, K. & WINZENBACHER, R. "General strategies to increase the repeatability in non-target screening by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, 935: 173-186, 2016.
- BALDO, R.; SCALON, S. P. Q.; ROSA, Y. B. C. J.; MUSSURY, R. M.; BETONI, R. & BARRETO, W. S. "Comportamento do algodoeiro cultivar Delta Opal sob estresse hídrico com e sem aplicação de bioestimulante". *Ciênc. Agrotec., Lavras, Edição Especial*, 33: 1804 -1812, 2009.
- BARMAN, A. K. & PARAJULEE, M. N. "Compensation of *Lygus hesperus* Induced Preflower Fruit Loss in Cotton". *Journal of Economic Entomology*, 106 (3): 1209-1217, 2013.
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRÜTZMACHER, A. D.; FORESTI, J. & RINGENBERG, R. "Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão". *Ciência Rural, Santa Maria*, 33 (6): 993-998, 2003.
- BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D.; O'BRIEN, D. H. & FRYXELL, P. A. "Sesquiterpenoid aldehyde quinones and derivatives in pigment glands of *Gossypium*". *Phytochemistry*, 17: 1297-13, 1978.
- BIMARK, M.; RAHMAN, R. A.; TAIP, F. S.; GANJLOO, A.; SALLEH, L. M.; SELAMAT, J.; HAMID, A. & ZAIDUL, I. S. M. "Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves". *Food and bioproducts processing*, 89 (1): 67 -72, 2011.
- BIJTTEBIER, S.; AUWERA, A. V.; FOUBERT, K.; VOORSPOELS, S.; PIETERS, L. & APERS, S. "Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolomics studies and method validation". *Analytica Chimica Acta*, 935: 136-150, 2016.
- BLAŽENOVIC, I.; KIND, T.; JI, J. & FIEHN, O. "Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics". *Metabolites*. 8 (31), 2018.
- BOIÇA JÚNIOR, A. L.; JESUS, F. G. D.; JANINI, J. C.; SILVA, A. G. D. & ALVES, G. C. S. "Resistance of cotton varieties to the leafworm *Alabama argillacea* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae)". *Revista Ceres*, 59:48-55, 2012.
- BOSH, M.; WRIGHT, L. P.; GERSHENZON, J.; WASTERNAK, C.; HAUSE, B.; SCHALLER, A. & STINTZI, A. "Jasmonic acid and its precursor 12-oxophytodienoic acid control different aspects of constitutive and induced herbivore defenses in tomato". *Plant Physiology*, 166: 396-410, 2014
- BOZOROV, T. A.; USMANOV, R. M.; YANG H.; A HAMDULLAEV, S. A.; MUSAYEV, S.; SHAVKIEV, J.; NABIEV, S.; ZHANG, D. & ABDULLAEV, A. A. "Effect of water deficiency on relationships between metabolism, physiology, biomass, and yield of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)". *Journal of Arid Land*, 10 (3): 441–456, 2018.
- CAO, J.; LI, M.; CHEN, J.; LIU, P. & LI, Z. "Effects of MeJA on Arabidopsis metabolome under endogenous JA deficiency". *Scientific reports*, 6, 2016.

- CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. “Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas”. *Quimica Nova*, 41(1): 75-91, 2018.
- CARERE, J.; COLGRAVE, M. L.; STILLER, J.; LIU, C.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. & GARDINER, D. M. “Enzyme-driven metabolomic screening: a proof-of-principle method for discovery of plant defence compounds targeted by pathogens”. *New Phytologist*, 212: 770–779, 2016.
- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V. & CASS, Q. B. “Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas”. *Química Nova*, 32 (4): 1021-1030, 2009.
- CASTRO, M. D. L. & DELGADO-POVEDANO, M. M. “Ultrasound: A subexploited tool for sample preparation in metabolomics”. *Analytica Chimica Acta*, 806: 74-84, 2014.
- CHINI, A.; BEN-ROMDHANE, W.; HASSAIRI, A. & ABOUL-SOUD, M. A. M. “Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses”. *PLoS ONE*, 12 (6): 1-18, 2017.
- CIA, E.; FUZATTO, M. G.; ALMEIDA, W. P.; KONDO, J. I.; ITO, M. F. & DIAS, F. L. F. “Reação de genótipos de algodoeiro à mancha-de-alternária”. *Summa Phytopathol., Botucatu*, 40 (1): 81-83, 2014.
- CONNER, W. E.; EISNER, T.; MEER, R. K. V.; GUERRERO, A. & MEINWALD, J. “Precopulatory sexual interaction in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): Role of a pheromone derived from dietary alkaloids”. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 9: 227-235, 1981.
- CORDÃO SOBRINHO, F. P.; GUERRA, H. O. C.; ARAÚJO, W. P.; PEREIRA, J. R.; ZONTA, J. H. & BEZERRA, J. R. C. “Fiber quality of upland cotton under different irrigation depths”. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19 (11): 1057–1063, 2015.
- COSTA, F. S. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; SANTOS, R. C.; SOARES, C. M. S. & MONNERAT, R. G. “*Bacillus thuringiensis* Effect on the vegetative development of cotton plants and the biocontrol of *Spodoptera frugiperda*”. *Agronomy*, 10: 1889, 2020.
- CREELMAN, R. A & MULLET, J. E. “Biosynthesis and action of jasmonates in plants”. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 48: 355–381, 1997.
- CREELMAN, R. A. & MULLET, J. E. “Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 92: 4114-4119, 1995.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*. 3ª Ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. 539 p.
- DINIZ, I.; FIGUEIREDO, A.; LOUREIRO, A.; BATISTA, D.; AZINHEIRA, H.; VÁRZEA, V.; PEREIRA, A. P.; GICHURU, E.; MONCADA, P.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; OLIVEIRA, H. & SILVA, M. C. “A first insight into the involvement of phytohormones pathways in coffee resistance and susceptibility to *Colletotrichum kahawae*”. *PLOS ONE*, 12 (5), 2017.

DJANDE, C. Y. H.; PRETORIUS, C.; TUGIZIMANA, F.; PIATER, L. A.; & DUBERY, I. A. “Metabolomics: A tool for cultivar phenotyping and investigation of grain crops”. *Agronomy*, 10 (831), 2020.

EGBUTA, M. A.; MCINTOSH, S.; WATERS, D. L. E.; VANCOV, T. & LIU, L. “Biological importance of cotton by-products relative to chemical constituents of the cotton plant”. *Molecules*, 93 (22), 2017.

ELZEN, W. G.; WILLIAMS, H. J. & VINSON, S. B. “Isolation and identification of cotton synomones mediating searching behavior by parasitoid *Campoletis sonorensis*”. *Journal of Chemical Ecology*, 10(8): 3, 1984.

ESSIEN, E. E.; ABOABA, S. O. & OGUNWANDE, I. A. “Constituents and antimicrobial properties of the leaf essential oil of *Gossypium barbadense* (Linn.)”. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (5): 702-705, 2011.

EISENRING, M.; MEISSE, M.; HAGENBUCHER, S.; NARANJO, S. E.; WETTSTEIN, F. & ROMEIS, J. “Cotton defense induction patterns under spatially, temporally and quantitatively varying herbivory levels”. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2017.

EMBRAPA. “BRS 286”. Campina Grande-PB, 2009. Disponível em: < https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA-2009-09/21630/1/Folder_BRS_286.pdf >. Acesso em: 17 de novembro de 2022.

EMBRAPA. “BRS 335”, Campina Grande-PB, junho, 2011a. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/902744/4/FolderBRS335.pdf> >. Acesso em: 17 de novembro de 2022.

EMBRAPA. “BRS 336”, Campina Grande-PB, junho, 2011b. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/43034/1/Folder-BRS-336.pdf> >. Acesso em: 17 de novembro de 2022.

ERB, M.; STEFAN MELDAU, S. & HOWE, G. A. “Role of phytohormones in insect-specific plant reactions”. *Trends in Plant Science*, 17 (5), 2012.

FAGAN, E. B; ONO, E.O.; RODRIGUES, J. D.; CHALFUN, J. R. A. & DOURADO NETO, D. *Fisiologia vegetal: reguladores vegetais*. Editora Andrei. 2015. 302p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. “Climate change fans spread of pests and threatens plants and crops, new FAO study”. Roma, 2021, Disponível em: < <https://www.fao.org/news/story/en/item/1402920/icode/> >. Acesso em: 03 maio de 2022.

FARIAS, K. S.; DELATTE, T.; ARRUDA, R. C. O.; ALVES, F. M.; SILVA, D. B.; BEEKWILDER, J. & CAROLLO, C. A. “In depth investigation of the metabolism of *Nectandra megapotamica* chemotypes”. *PLOS*, 13 (8), 2018.

FDA - U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. “Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry”. 2018.

FERREIRA, M. M. C. “Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações”. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015

FERNANDES-JÚNIOR, A. J. “Gossypium in Flora e Funga do Brasil”. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB19516>>. Acesso em: 03 maio de 2022.

FLAMINI, R.; ROSSO, M.; PANIGHEL, A.; VEDOVA, A. D.; MARCHI, F. & BAVARESCO, L. “Profiling of grape monoterpene glycosides (aroma precursors) by ultra-high performanceliquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF)”. *J. Mass Spectrom.*, 49, 1214–1222, 2014.

FORTERRE, Y.; SKOTHEIM, J. M.; DUMAIS, J. & MAHADEVAN, L. “How the *Venus flytrap* snaps”. *Nature*, 433: 421-425, 2005.

FREITAS, C. A. Metodologia de pesquisa e resistência constitutiva de genótipos de algodão a *Spodoptera cosmioides* (WALKER) e *Chloridea virescens* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). Jaboticabal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – UNESP, 2019. Tese de doutorado, 85 p.

FREUND, D. M.; MARTIN, A. C.; COHEN, J. D. & HEGEMAN, A. D. “Direct detection of surface localized specialized metabolites from *Glycyrrhiza lepidota* (American licorice) by leaf spray mass spectrometry”. *Planta*, 247 (1): 267-275, 2017.

FUJIMOTO, T.; TOMITAKA, Y.; ABE, H.; TSUDA, S.; FUTAI, K. & MIZUKUBO, T. “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 jasmonato”. *Journal of Plant Physiology*, 16: 1084-1097, 2011.

FUNICHELLO, M.; GRIGOLLI, J.F.J.; SOUZA, B. H. S., BOIÇA JUNIOR, A. L. & BUSOLI, A. C. “Effect of transgenic and non-transgenic cotton cultivars on the development and survival of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)”. *African Journal of Agricultural Research.*, 8: 5424-5428, 2013.

GARCÍA, C. J.; GIL, M. I. & TOMAS-BARBERAN, F. A. “LC–MS untargeted metabolomics reveals early biomarkers to predict browning of fresh-cut lettuce”. *Postharvest Biology and Technology*, 146: 9–17, 2018.

GARCÍA-RIVERA, M. A.; FERNÁNDEZ-OCHOA, A.; BRÜNING, U.; FRITSCH-GUENTHER, R. & KIRWAN, J. A. “Identification and validation of small molecule analytes in mouse plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A case study of misidentification of a short-chain fatty acid with a ketone body”. *Talanta*, 242 (123298), 2022.

GAZETA DIGITAL. “Novas variedades de algodão no mercado”. Disponível em: <<https://www.gazetadigital.com.br/suplementos/terra-e-criacao/novas-variedades-de-algodao-no-mercado/181901>>. Acesso em: 17 de novembro de 2022.

GIKA, H.; VIRGILIOU, C.; THEODORIDIS, G; ROBERT S. PLUMB, R. S. & WILSON, I. A. “Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art”. *Journal of Chromatography B*, 1117: 136–147, 2019.

GIRASSOL AGRÍCOLA. “FMT 701”. Disponível em: < <http://www.girassolagricola.com.br/semente/202/fmt-701> >. Acesso em: 17 de novembro de 2022.

GOMEZ, J. D.; VITAL, C. E.; OLIVEIRA, M. G. A. & RAMOS, H. J. O. “Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)”. PLOS, 13 (10), 2018.

GONÇALVES, M. F. M.; HILÁRIO, S.; PEER, Y. V.; ANA C. ESTEVES, A. C. & ALVES, A. “Genomic and metabolomic analyses of the marine fungus *Emericellopsis cladophorae*: insights into saltwater adaptability mechanisms and its biosynthetic potential”. J. Fungi., 8 (31), 2022.

GUIJARRO-DÍEZ, M.; NOZAL, L.; MARINA, M. L. & CREGO, A. L. “Metabolomic fingerprinting of saffron by LC/MS: novel authenticity markers”. Anal Bioanal Chem., 407: 7197–7213, 2015.

HALL, R. D. “Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic”. New Phytologist, 169: 453–468, 2006.

HANNY, B. W. “Gossypol, flavonoid, and condensed tannin content of cream and yellow anthers of five cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Cultivars”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28: 504-506, 1980.

HARTMANN, T.; WITTE, L.; EHMKE, A.; THEURING, C.; ROWELL-HIERT, M. & PASTEEL, J. M. “Selective sequestration and metabolism of plant derived pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid leaf beetles”. Phytochemistry, 45 (3), 489-497, 1997.

HEDIN, P. A. THOMPSON, A. C. & GUELDER, R. C. “Isolation of bisabolene oxide from the cotton bud”. Phytochemistry, 11: 2118-2119, 1972.

HEDIN, P. A.; JENKINS, J. N & PARROTT, W. L. “Evaluation of flavonoids in *Gossypium arboreum* (L.) Cottons as potential source of resistance to tobacco budworm”. Journal of Chemical Ecology, 18 (2), 1992.

HEGDE, M.; OLIVEIRA, J.; COSTA, J. G.; LOZA-REYESE, E.; BLEICHER, E.; SANTANA, A. E. G.; CAULFIELD, J. C.; MAYON, P.; DEWHIRST, S. Y.; BRUCE, J. A.; PICETT, J. A. & BIRKETT, M. A. “Aphid antixenosis in cotton is activated by the natural plant defence elicitor cis-jasmone”. Phytochemistry 78: 81–88, 2012.

HILKER, M. & FATOUROS, N. E. “Resisting the inset of herbivore attack: plants perceive and respond to insect eggs”. Current Opinion in Plant Biology, 32: 9-16, 2016.

HORBOWICZ, M.; WICZKOWSKI, W.; GÓRAJ-KONIARSKA, J.; MIYAMOTO, K.; UEDA, J. & SANIEWSKI, M. “Effect of Methyl Jasmonate on the terpene trilactones, flavonoids, and phenolic acids in *Ginkgo biloba* L. Leaves: Relevance to Leaf Senescence”. Molecules, 26 (4682), 2021.

HUBERTY, M.; CHOI, Y. H.; HEINEN, R. & BEZEMER, T. M. “Above-ground plant metabolomic responses to plant–soil feedbacks and herbivory”. Journal of Ecology, 108: 1703–1712, 2020.

HUR, M.; CAMPBELL, A. A.; MACEDO, M. A.; LI, L.; RANSOM, N.; JOSE, A.; CRISPIN, M.; NIKOLAU, B. J. & WURTELE, E. S. "A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery". *Nat Prod Rep.*, 30(4): 565–583, 2013.

ICAC- INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE. "Cotton: Review of the world situation", 74(3), 2021.

IQBAL, M. S.; IQBAL, Z. & ANSARI, M. I. "Enhancement of total antioxidants and favonoid (quercetin) by methyl jasmonate elicitation in tissue cultures of onion (*Allium cepa* L.)". *Acta Agrobotanica*, 72 (3), 2019.

JESUS, F. G.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; ALVES, G. C. S.; BUSOLI, A. C. & ZANUNCIO J C. "Resistance of cotton varieties to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología* 40:158-163, 2014.

KARIMDZHANOV, A. K.; ISMAILOV, A. I.; ABDULLAEV, Z. S.; ISLAMBEKOV, S. Y.; KAMAEV, F. G. & SADYKOV, A. S. "Structure of gossyvertin - a new phytoalexin of the cotton plant". *Chemistry of natural compounds*, 12: 211-214, 1976.

KHAN, I.; AWAN, S. A.; IKRAM, R.; RIZWAN, M.; AKHTAR, N.; YASMIN, H.; SAYYED, R. Z.; ALI, S. & ILYAS, N. "Effects of 24-epibrassinolide on plant growth, antioxidants defense system, and endogenous hormones in two wheat varieties under drought stress". *Physiologia Plantarum*, 172: 696–706, 2021.

KIM, H. K. & VERPOORTE, R. "Sample Preparation for Plant Metabolomics". *Phytochem. Anal.*, 21: 4–13, 2010.

KIRKAN B, SARIKURKCU, C.; COPUROGLU, M.; CENGIZ, M. & TEPE, B. "Is it possible to use the stalks of *Gossypium hirsutum* L., an important by-product of cotton cultivation, as an alternative source of bioactive components?". *European Food Research and Technology*, 244: 1065–1071, 2018.

KONAN, Y. K. F.; KOUASSI, K. M.; KOUAKOU, K. L.; KOFFI, E.; KOUASSI, K. N.; SEKOU, D.; KONE, M. & KOUAKOU, T. H. "Effect of Methyl Jasmonate on phytoalexins biosynthesis and induced disease resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* in cotton (*Gossypium hirsutum*L.)". *International Journal of Agronomy*, 2014.

KOSAR, F.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M.; AHMAD, A.; ALYEMENIC, M. N. & AHMAD, P. "Impact of exogenously applied trehalose on leaf biochemistry, achene yield and oil composition of sunflower under drought stress". *Physiologia Plantarum*, 172: 317–333, 2021.

LEME, G. M.; COUTINHO, I. D.; CRESTE, S.; HOJO, O.; CARNEIRO, R. L.; BOLZANI, V. S. & CAVALHEIRO, A. J. "HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes". *Anal. Methods*, 6: 7781–7788, 2014.

LI, P.; DAI, W.; LU, M.; XIE, D.; TAN, J.; YANG, C.; ZHU, Y.; LV, H.; PENG, Q.; ZHANG, Y.; GUO, L.; NI, D. & LIN, Z. "Metabolomic analysis reveals the composition differences in 13 Chinese tea cultivars of different manufacturing suitabilities". *J Sci Food Agric.*, 98: 1153–1161, 2018.

LIN, G.; CHAI, J.; YUAN, S.; MAI, C.; CAI, L.; MURPHY, R. W.; ZHOU, W. & LUO, J. "VennPainter: A tool for the comparison and identification of candidate genes based on Venn Diagrams". PLoS ONE 11(4), 2016

LINDIGKEIT, R.; BILLER, A.; BUCH, M.; SCHIEBEL, H.; BOPPRE, M. & HARTMANN, T. "The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids". Eur. J. Biochem., 245: 626-636, 1997.

LIU, Y.; LI, M.; XU, J.; LIU, X.; WANG, S. & SHI, L. "Physiological and metabolomics analyses of young and old leaves from wild and cultivated soybean seedlings under low nitrogen conditions". BMC Plant Biology, 19 (389), 2019.

LUO, M.; TAN, K.; XIAO, Z.; HU, M.; LIAO, P. & CHEN, K. "Cloning and expression of two sterol C-24 methyltransferase genes from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)". J. Genet. Genomics., 35: 357-363, 2008.

LUO, J.; LIANG, S.; LI, J.; XU, J.; LI, L.; ZHU, B.; LI, Z.; LEI, C.; LINDSEY, K.; CHEN, L.; JIN, S. & ZHANG, X. "A transgenic strategy for controlling plant bugs (*Adelphocoris suturalis*) through expression of double-stranded RNA homologous to fatty acyl-coenzyme A reductase in cotton". New Phytologist, 215: 1173- 1185, 2017.

LUZ, M. J. S.; BEZERRA, J. R. C.; BARRETO, A. N.; SANTOS, J. W. & AMORIM NETO, M. S. "Efeito da deficiência hídrica sobre o rendimento e a qualidade da fibra do algodoeiro". Revista de Oleagionosas e Fibras, 1 (1): 125-133, 1997.

MACHADO, R. A. R.; BALDWIN, I. T. & ERB, M. "Herbivory-induced jasmonates constrain plant sugar accumulation and growth by antagonizing gibberellin signaling and not by promoting secondary metabolite production". New Phytologist, 215: 803-812, 2017.

MAHMUD, I.; KOUSIK, C.; HASSELL, R.; CHOWDHURY, K. & BOROJERDI, A. F. "NMR spectroscopy identifies metabolites translocated from powdery mildew resistant rootstocks to susceptible watermelon scions". J. Agric. Food Chem., 63: 8083-8091, 2015.

MANAGA, M. G.; SULTANBAWA, Y. & SIVAKUMAR, D. "Effects of different drying methods on untargeted phenolic metabolites, and antioxidant activity in chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis*) and nightshade (*Solanum retroflexum* Dun.)". Molecules, 25 (1326), 2020.

MARTIAS, C.; BAROUKH, N.; MAVEL, S.; BLASCO, H.; LEFÈVRE, A.; ROCH, L.; MONTIGNY, F.; GATIEN, J.; SCHIBLER, L.; DUFOUR-RAINFRAY, D.; NADAL-DESBARATS, L. & EMOND, P. "Optimization of sample preparation for metabolomics exploration of urine, feces, blood and saliva in humans using combined NMR and UHPLC-HRMS platforms". Molecules, 26 (4111), 2021.

MATSUI, R.; TAKIGUCHI, K.; KUWATA, N.; OKI, K.; TAKAHASHI, K.; MATSUDA, K. & MATSUURA, H. "Jasmonic acid is not a biosynthetic intermediate to produce the pyrethrolone moiety in Pyrethrin II". Scientific reports, 10 (6366), 2020.

- MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L. & CHAVEZ-ENG, C. M. "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS". *Anal. Chem.*, 75: 3019-3030, 2013.
- MELLO, J. C. P.; VALONE, L. "Extraction, isolation, and identification of hytopharmaceuticals". In: OLIVEIRA, W. P. (Ed). *Phytotechnology A Sustainable Platform for the Development of Herbal Products*. Boca Raton: Taylor and Francis, 2022. p. 85-104.
- MINYARD J.P.; TUMLINSON, J. H.; THOMPSON, A. C.; & HEDIN, P. A. "Constituents of the cotton bud sesquiterpene hydrocarbons". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14 (4), 1966.
- MIRANDA, J. E. "Manejo integrado de pragas do algodoeiro no cerrado brasileiros". Circular Técnica 131- EMBRAPA, 2010. Disponível em: <
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/863284/1/CIRTEC131.pdf> >
Acesso em 17 de novembro de 2022.
- NEVES, M. F. & PINTO, M. J. A "A cadeia do algodão brasileiro: safra 2016/2017: desafios e estratégias". Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (ABRAPA). Brasília, 2017, 248 p.
- OLIVER, D. J.; NIKOLAU, B. & WURTELE, E. S. "Functional Genomics: High-Throughput mRNA, protein, and metabolite analyses". *Metab. Eng.*, 4:98–106, 2002.
- OLIVEIRA NETO, A. A (Org). "Compêndio de estudos Conab/Companhia Nacional de Abastecimento". 1 (2016-), Brasília: Conab, 2016.
- OH, M.; PARK, S.; KIM, H.; CHOI, G. J. & KIM, S. H. "Application of UPLC-QTOF-MS based untargeted metabolomics in identification of metabolites induced in pathogen-infected rice". *Plants*, 10 (213), 2021.
- OPITZ, S.; KUNERT, G. & GERSHENZON, J. "Increased terpenoid accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum*) foliage is a general wound response". *Journal of Chemical Ecology*, 34: 508–522, 2008.
- PAVELA, R.; ZABKA, M.; TYLOVA, T. & KRESINOVA, Z. "Insecticidal activity of compounds from *Ailanthus altissima* against *Spodoptera littoralis* larvae". *Pak. J. Agri. Sci.*, 51(1): 101-112, 2014.
- PATEL, M. K.; PANDEY, S.; KUMAR, M.; HAQUE, M. I.; PAL, S. & YADAV, N. S. "Plants metabolome study: Emerging tools and techniques". *Plants*, 10 (2409), 2021.
- PEDRAS, M. S. C.; ADIO, A. M.; SUCHY, M.; OKINYO, D. P. O.; ZHENG, Q.; JHA, M. & SARWAR, M. G. "Detection, characterization and identification of crucifer phytoalexins using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1133: 172-183, 2006.
- PEDRAS, M. S.; YAYA, E. E. "Phytoalexins from Brassicaceae: News from the front". *Phytochemistry*, 71: 1191-1197, 2010.

PEREIRA, R. F. Prospecção De Genótipos De Algodoeiro Tolerantes Ao Estresse Hídrico Baseada Em Caracteres Agrônomicos E Fisiológicos. Areia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-UFPB, 2017. Tese de doutorado, 71 p.

PERVEEN, S. S.; QAISRANI, T. M.; SIDDIQUI, F.; PERVEEN, R. & NAQVI, S. H. M. "Cotton plant volatiles and insect's behavior". *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4 (5): 554-558, 2001a.

PERVEEN, S. S.; QAISRANI, T. M.; BHUTTA, S.; PERVEEN, R. & NAQVI, S. H. M. "HPLC analysis of cotton phenols and their contribution in bollworm resistance". *Journal of Biological Sciences*, 1 (7): 587-590, 2001b.

PIMENTEL, M. "Quatro novas cultivares de algodão". *JORNAL DIA DE CAMPO*. Disponível em: <
<http://diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=26811&secao=Pacotes%20Tecnol%F3gicos&c2=Algod%E3o>> . Acesso em: 17 de novembro de 2022.

PREMATHILAKE, A. T.; NI, J.; SHEN, J.; BAI, S. & TENG, Y. "Transcriptome analysis provides new insights into the transcriptional regulation of methyl jasmonate-induced flavonoid biosynthesis in pear calli". *BMC Plant Biology*, 20 (388), 2020.

QIN, Y.; WEI, W.; SUN, H.; HAO, P.; WANG, H.; SU, J. & YU, S. "Proteomic analysis of differences in fiber development between wild and cultivated *Gossypium hirsutum* L.". *Journal of Proteome Research*, 16: 2811-2824, 2017.

RAFIEI, A. & SLENO, L. "Comparison of peak-picking workflows for untargeted liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry metabolomics data analysis". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 29: 119–127, 2015.

RANI, P. U. & PRATYUSHA, S. "Role of castor plant phenolics on performance of its two herbivores and their impact on egg parasitoid behaviour". *BioControl*, 59: 513–524, 2014.

REICHARD, K. "A água em sistemas agrícolas". São Paulo-Sp: Manole, 186p. 1990.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos", *Quim. Nova*, 27 (5): 771-780, 2004.

RODRIGUES, J. D. Caracterização De Cultivares De Algodão Tolerantes Ao Estresse Hídrico Baseada Em Variáveis De Crescimento E Na Atividade Das Enzimas Oxidativas. Recife, Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas – UFRPE, 2016. Dissertação de mestrado, 48 p.

ROSENTAL, L.; PERELMAN, A.; NEVO, N.; TOUBIANA, D.; SAMANI, T.; BATUSHANSKY, A.; SIKRON, N.; SARANGA, Y. & FAIT, A. "Environmental and genetic effects on tomato seed metabolic balance and its association with germination vigor". *BMC Genomics*, 17: 1047, 2016.

RUTTANAPHAN, T.; THITATHAN, W.; PIYASAENGTHONG, N.; NOBSATHIAN, S. & BULLANGPOTI, V. "Chrysoeriol isolated from *Melientha suavis* Pierre with activity against the agricultural pest *Spodoptera litura*". *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 9: 21 2022.

- SADRAS, V. O. & FITT, G. P. "Resistance to insect herbivory of cotton lines" Quantification of recovery capacity after damage". *Field Crops Research*, 52: 127-134, 1996
- SADRAS, V. O. & FITT, G. P. "Apical dominance - variability among cotton genotypes and its association with resistance to insect herbivory". *Environmental and Experimental Botany*, 38: 145-153, 1997
- SALEM, M. A.; SOUZA, L. P.; SERAG, A.; FERNIE, A. R.; FARAG, M. A.; EZZAT, S. M. & ALSEEKH, S. "Metabolomics in the context of plant natural products research: from sample preparation to metabolite analysis". *Metabolites*, 10 (37), 2020.
- SAMBANGI, P. & RANI, P. U. "Physiological effects of resveratrol and coumaric acid on two major groundnut pests and their egg parasitoid behavior". *Archives Of Insect Biochemistry and Physiology*, 91, (4): 230–245, 2016.
- SANTOS, L. F. C; RUIZ-SÁNCHEZ, E.; GAMBOA-ÂNGULO, M. & GONZÁLEZ-COLOMA, A. "Insect deterrent activity of ethanolic leaf extracts of landrace maize and determination of active compounds against *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae)". *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126: 107–114, 2019.
- SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; KUMAR, V.; KOHLI, S. K.; SIDHU, G. P. S.; BALI, A. S.; HANDA, N.; KAPOOR, D.; BHARDWAJ, R. & ZHENG, B. "Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress". *Biomolecules*, 9, 285, 2019.
- SILVA, D. M. "Aspectos biológicos e nutricionais do Complexo *Spodoptera* spp. em culturas anuais". Londrina, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-UEL, 2014. Tese de doutorado, 101 p.
- SILVA, D. M.; BUENO, A. F.; STECCA, C. S.; ANDRADE, K.; NEVES, P. M. O. J. & OLIVEIRA, M. C. N. "Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants". *Florida Entomological Society*, 100 (4), 2017.
- SILVA, E.; BELINATO, J. R.; PORTO, C.; NUNES, E.; GUIMARÃES, F.; MEYER, M. C. & PILAU, J. J. "soybean metabolomics based in mass spectrometry: decoding the plant's signaling and defense responses under biotic stress". *J. Agric. Food Chem.*, 69: 7257–7267, 2021.
- SIVLINGHAM, R. & BRINK, N.G. "Somatic mutation induced by heliotrine in *Drosophila*". *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 8 (4): 205-213, 1988.
- SOARES, D. X.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. "Mixture designs for exploring class diversity and metabolite fingerprinting: An efficient column chromatographic strategy". *Analytica Chimica Acta*, 702: 288– 294, 2011.
- SPECHT, A. & ROQUE-SPECHT, V. F. "Biotic potential and reproductive parameters of *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory". *Braz. J. Biol.*, 79 (3): 488-494, 2019.

- STEGEMANN, T.; KRUSE, L. H.; BRÜTT, M. & OBER, D. "Specific distribution of pyrrolizidine alkaloids in floral parts of comfrey (*Symphytum officinale*) and its implications for flower ecology". *Journal of Chemical Ecology*, 45: 128–135, 2019.
- STIPANOVIC, R. D.; KIM, H.L.; ALTMAN, D. W.; BELL, A. A. & KOHEL, R. J. "Raimondalone, a sesquiterpene from a cotton interspecific hybrid". *Phytochemistry*, 36 (4): 953-956, 1994.
- STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A.; O'BRIEN, D. H. & LUKEFAHR, M. J. "Helioicide H₁ A new insecticidal C₂₅ terpenoid from cotton (*Gossypium hirsutum*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (115), 1978.
- STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A. & O'BRIEN, D. H. "Raimondal, a new sesquiterpenoid from *Gossypium raimondii*". *Phytochemistry*, 19: 1735-1738, 1980.
- STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L. S.; REIBENSPIES, J. H. & WILLIAMS, H. J. "The absolute configuration of (-)-3-hydroxy- α -calacorene". *Phytochemistry*, 67: 1304–1308, 2006.
- SU, Z. WANG, X.; LIU, Z.; GU, Q.; ZHANG, Y.; LI, Z.; KE, H.; YANG, J.; WU, J.; WU, L.; ZHANG, G.; ZHANG, C. & MA, Z. "Genome-wide association study discovered genetic variation and candidate genes of fibre quality traits in *Gossypium hirsutum* L.". *Plant Biotechnology Journal*, 15: 982-996, 2017.
- SUMAYO, M. S.; KWON, D. & GHIM, S. "Linoleic acid-induced expression of defense genes and enzymes in tobacco". *Journal of Plant Physiology*, 171 (18): 1757-1762, 2014.
- SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; BEALE, M. H.; BEGER R.; DAYKIN C. A.; FAN, T. W. M.; FIEHN, O.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L.; HANKEMEIER, T.; HARDY, N.; HARNLY, J.; HIGASHI, R.; KOPKA, J.; LANE, A. N.; LINDON, J. C.; MARRIOTT, P.; NICHOLLS, A. W.; REILY, M. D.; THADEN, J. J. & VIANT, M. R. "Proposed minimum reporting standards for chemical analysis". *Metabolomics*, 3: 211–221, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M. & MURPHY, A. "Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal". 6ª Ed. Porto Alegre: Arned, 2017.
- T'KINDT, R.; MORREEL, K.; DEFORCE, D. BOERJAN, W. & BOCXLAER, J. V. "Joint GC–MS and LC–MS platforms for comprehensive plant metabolomics: Repeatability and sample pre-treatment". *Journal of Chromatography B*, 877: 3572–3580, 2009.
- TRETNER, C.; HUTH, U. & HAUSE, B. "Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid". *Journal of Experimental Botany*, 59 (10): 2847-2856, 2008.
- VATS, P. "World Cotton Trade Update". ICAC- Cotton: Review of the World Situation, Vol. 76 (1), 2022.
- VECHIA, C. A. D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A. P.; DIEL, K. A. P.; FAUST, C.; MENIN, C.; GOMES, D. B. & ROMAN, JUNIOR W. A. "Isolamento químico e validação analítica

por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae)". Rev. Bras. Pl. Med., 18 (1): 288-296, 2016.

VUCKOVIC, D. "Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry". Anal Bioanal Chem., 403: 1523–1548, 2012.

WANG, J.; QIAN, J.; YAO, L.; LU, Y. "Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*". Bioresources and Bioprocessing, 2 (5), 2015.

XIAO, J. F.; ZHOU, B. & RESSOM, H. W. "Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics". Trends in Analytical Chemistry, 32, 2012.

YAN, R.; ZHOU, Q.; XU, Z.; WU, Y.; ZHU, G.; WANG, M.; GUO, Y.; DONG, K. & CHEN, M. "Pyrethrins elicit olfactory response and spatial repellency in *Aedes albopictus*". Pest Manag Sci., 77: 3706–3712, 2021.

YUAN, S.; YANG, M. & ZHAO, Y. "A new flavonol glycoside from glandless cotton seeds". Acta Pharmaceutica Sinica B, 2 (1): 42–45, 2012.

ZEBELO, S.; DISI, J.; BALUSU, R.; REEVES, B. & FADAMIRO, H. "*Spodoptera exigua* modulates gossypol biosynthesis in cotton *Gossypium hirsutum*". Journal of Plant Interactions, 12 (1): 121–127, 2017.

ZENELI, G.; KROKENE, P.; CHRISTIANSEN, E.; KREKLING, T. & GERSHENZON, J. "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, 26: 977-988, 2006.

ZHANG, H. L.; NAGATSU, A.; OKUYAMA, H.; MIZUKAMI, H. & SAKAKI-AKA, J. "Sesquiterpene Glycoside from Cotton Oil Cake". Phytochemistry, 48 (4): 665-668, 1998.

ZHANG, P. "Suppression of jasmonic acid-dependent defense in cotton plant by the mealybug *Phenacoccus solenopsis*". PLoS ONE, 6 (7), 2011.

Apêndice

Apêndice A

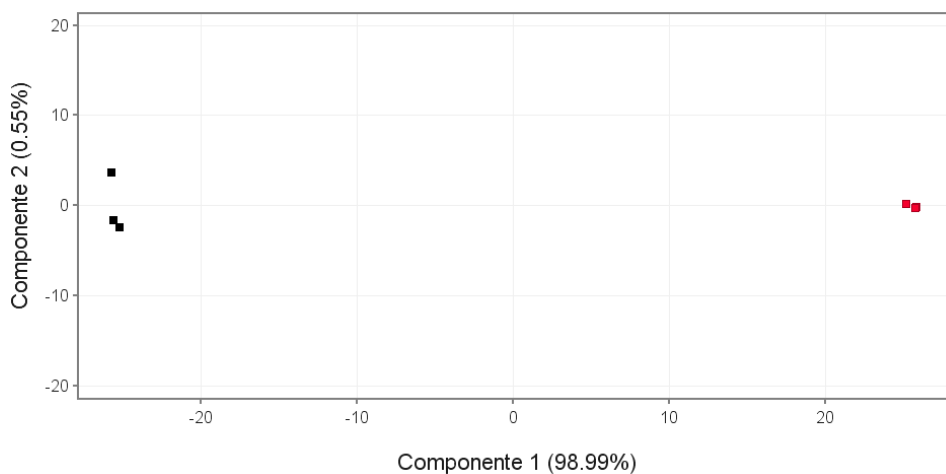
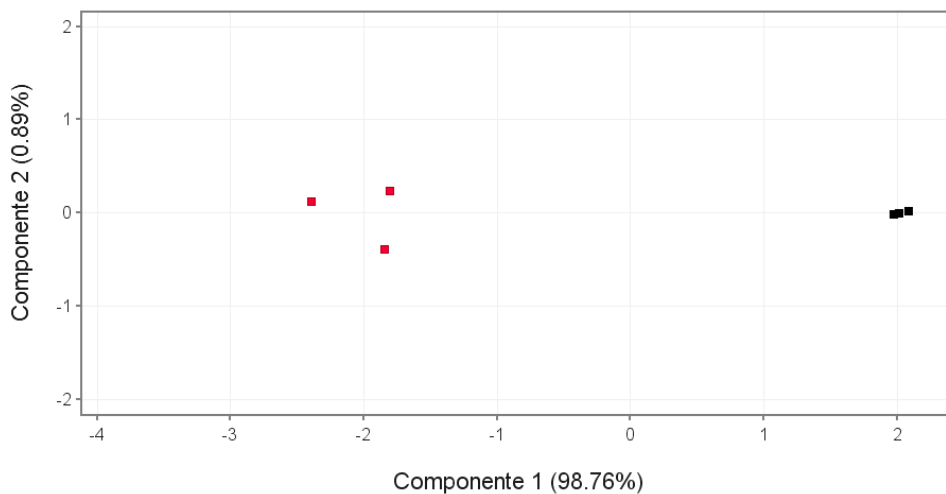
TABELA GC-MS para os doze genótipos de algodão *versus* injúria.

https://1drv.ms/x/s!Ar-7t_W-f_gbgal9q5uLynkVflbYsg?e=RTZWPq

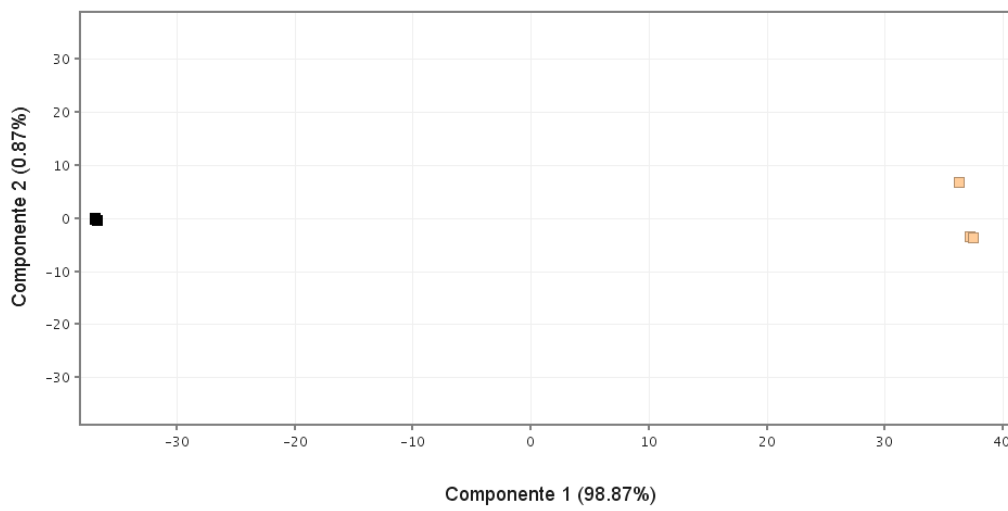
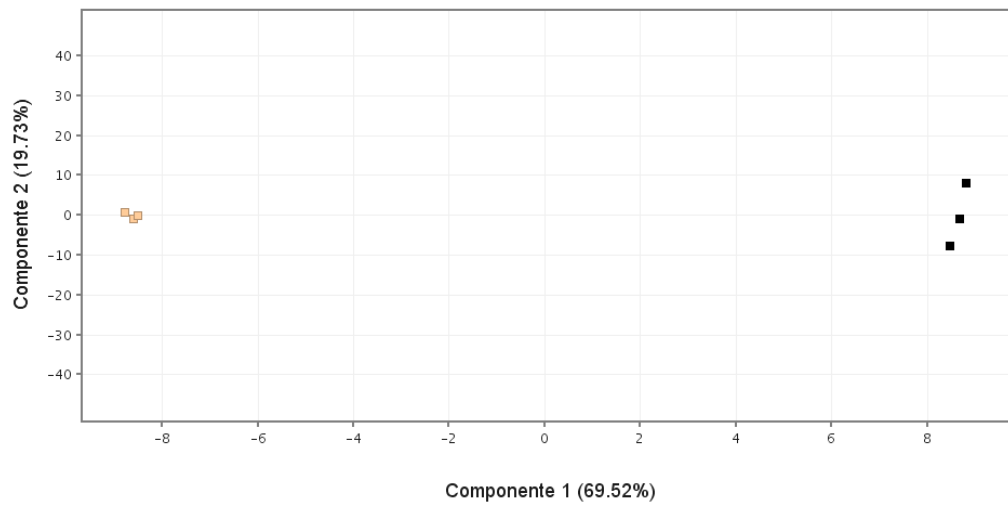
Apêndice B

Análise dos componentes principais PC1 *versus* PC2 das amostras dos genótipos *versus* genótipo sob indução de resistência por herbivoria com os dados de GC-MS e UPLC-Qtof-MS, respectivamente.

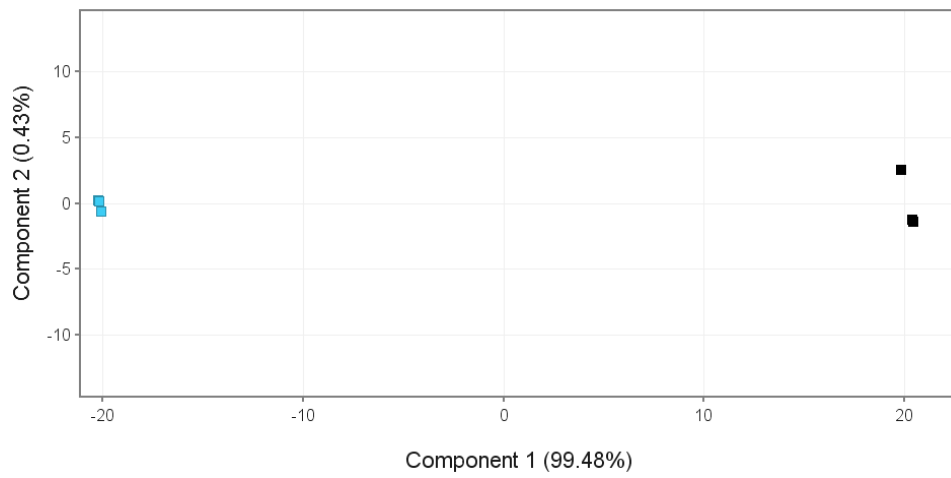
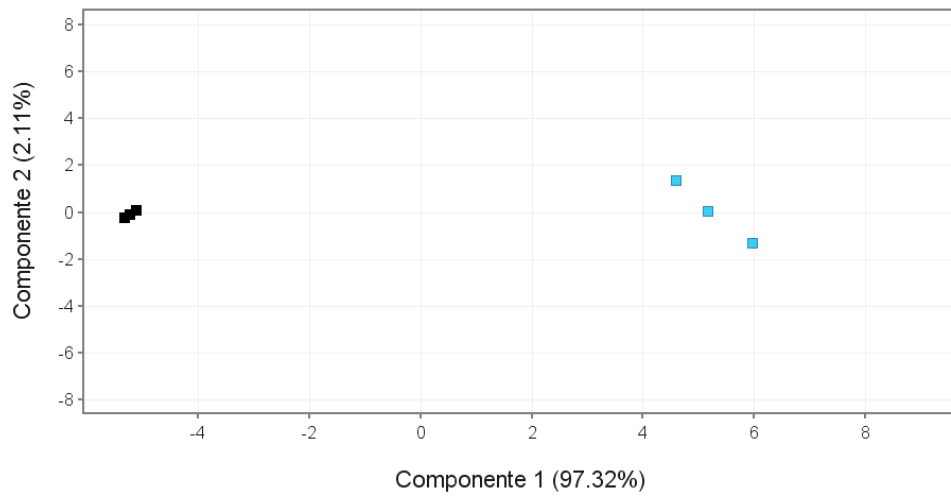
- BRS 286



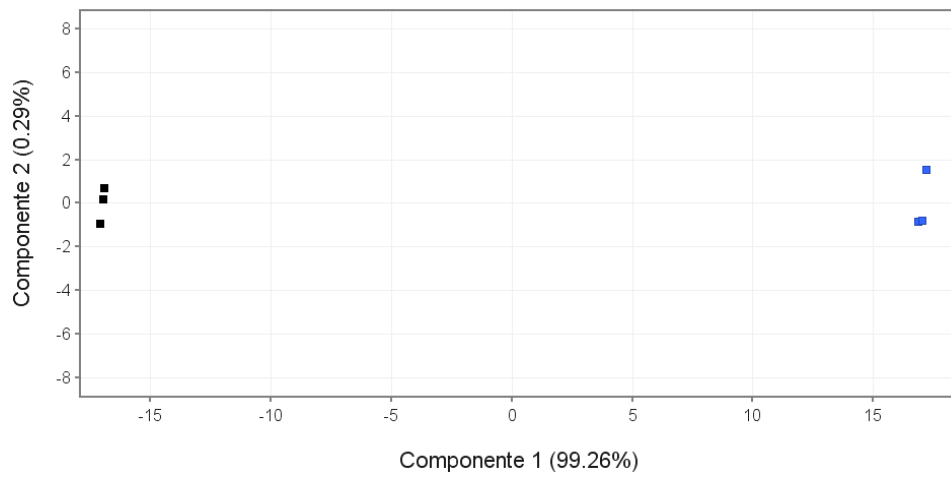
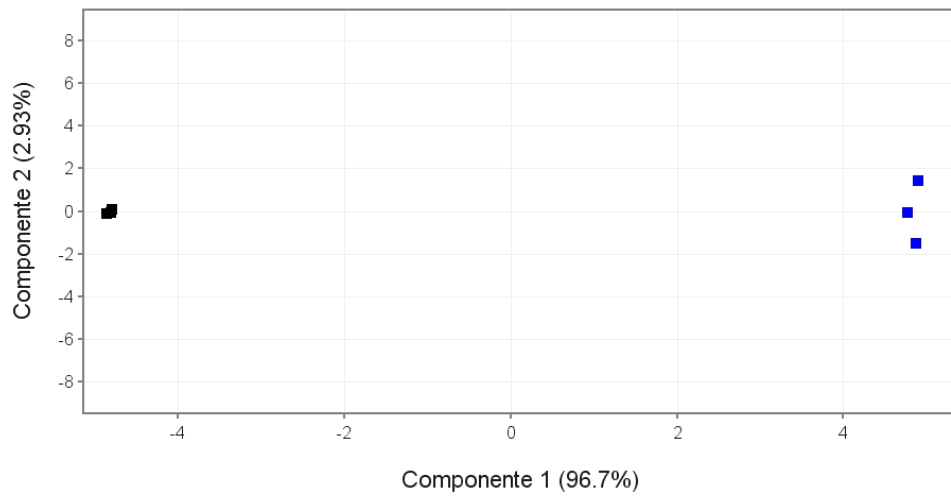
▪ BRS 293



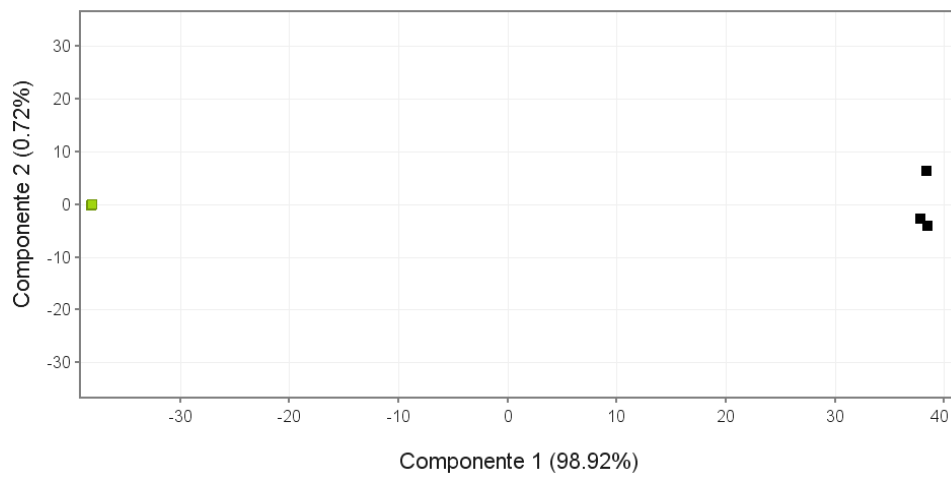
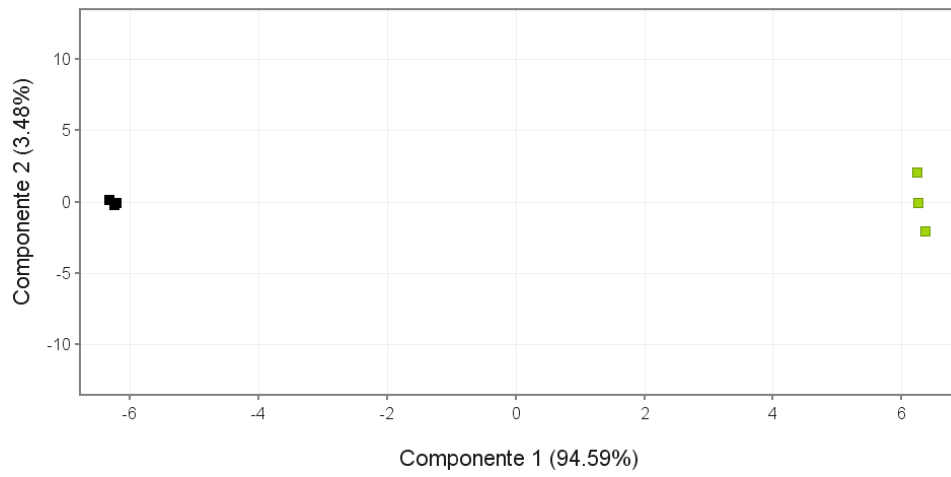
▪ BRS 335



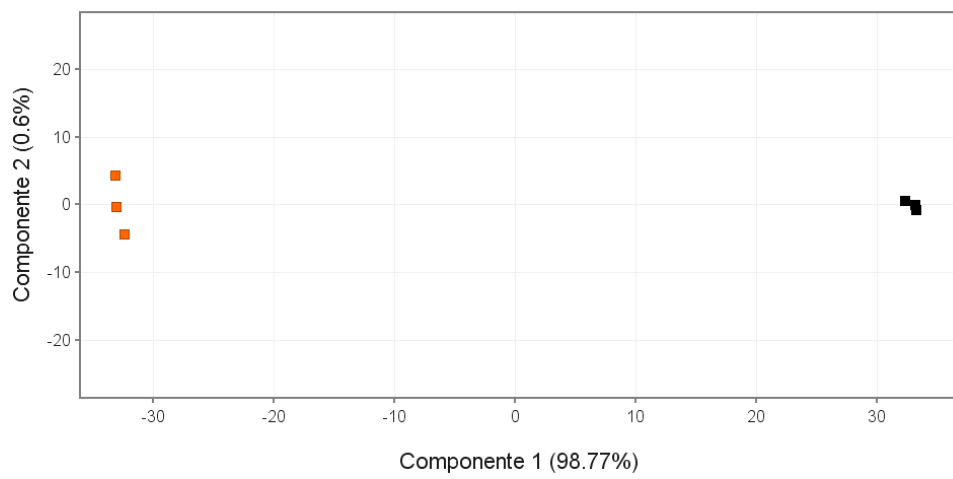
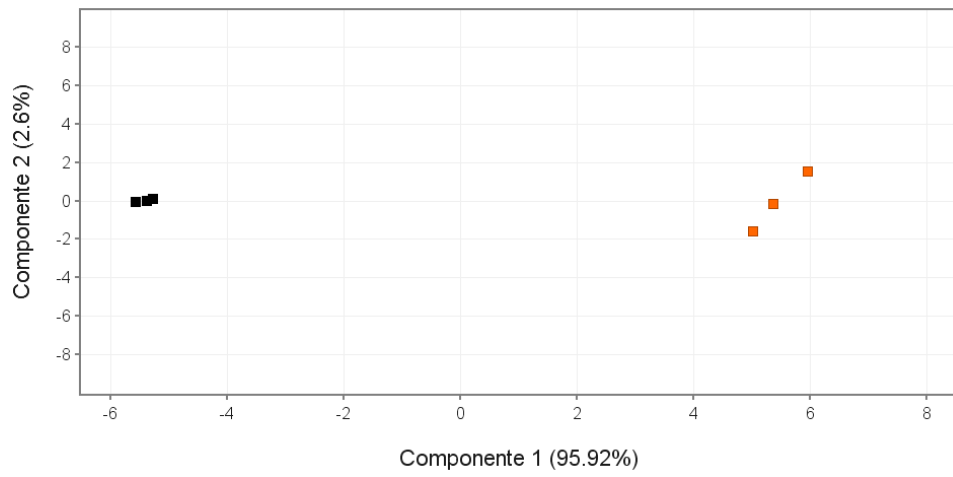
▪ BRS 336



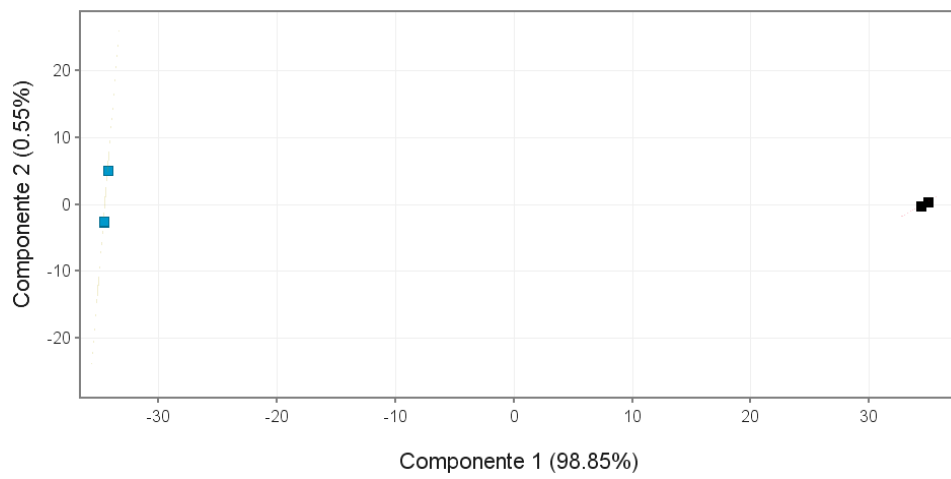
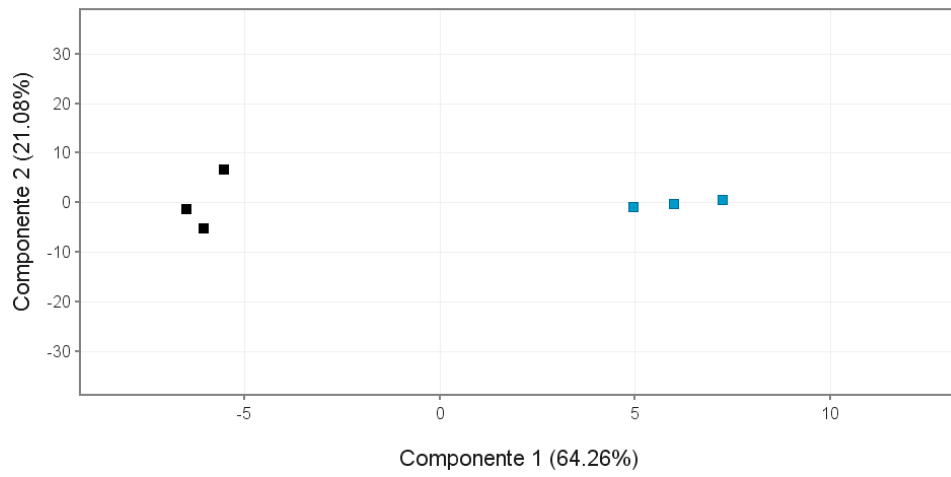
▪ BRS 368 RF



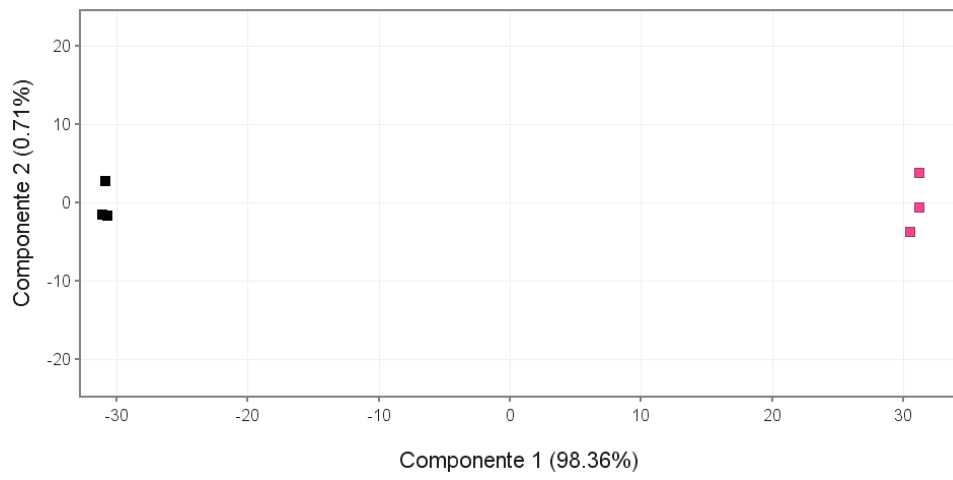
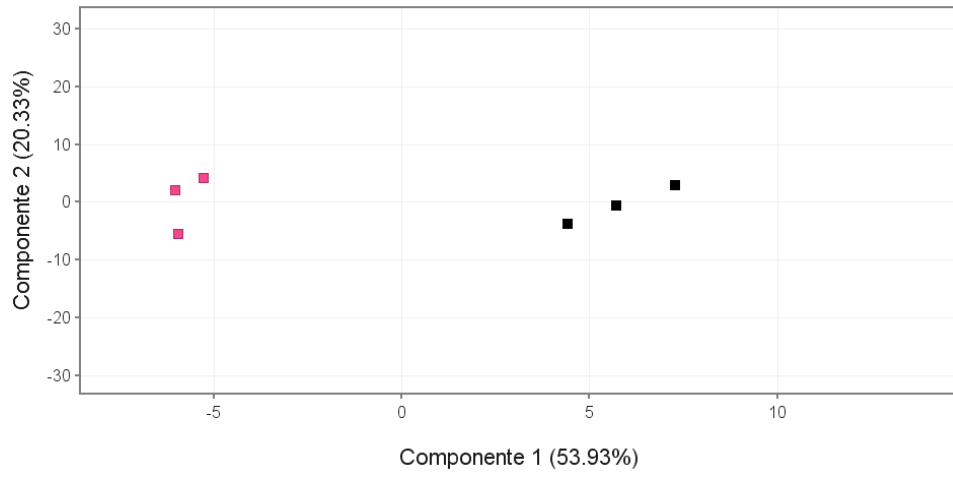
▪ BRS 372



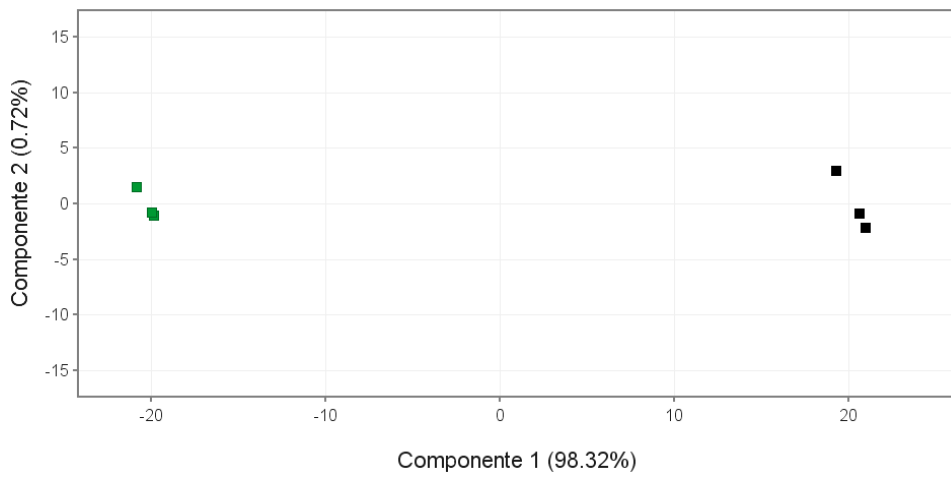
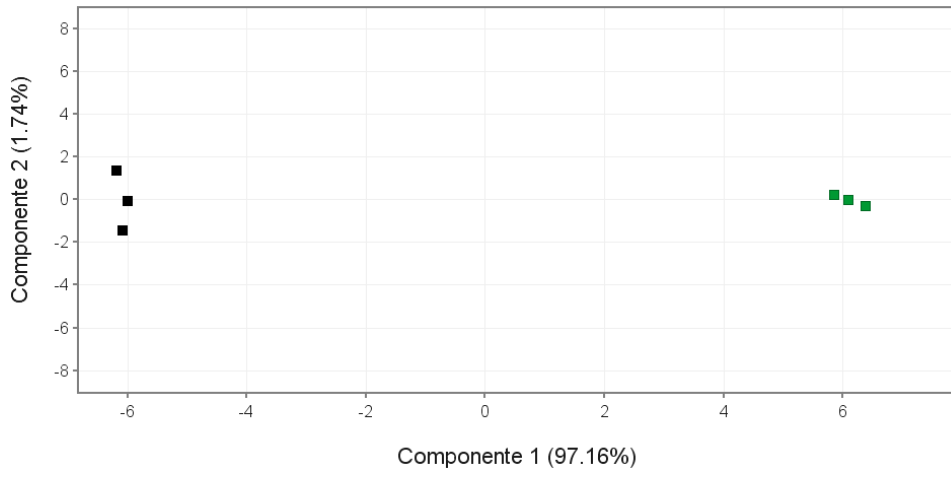
- Delta Opal



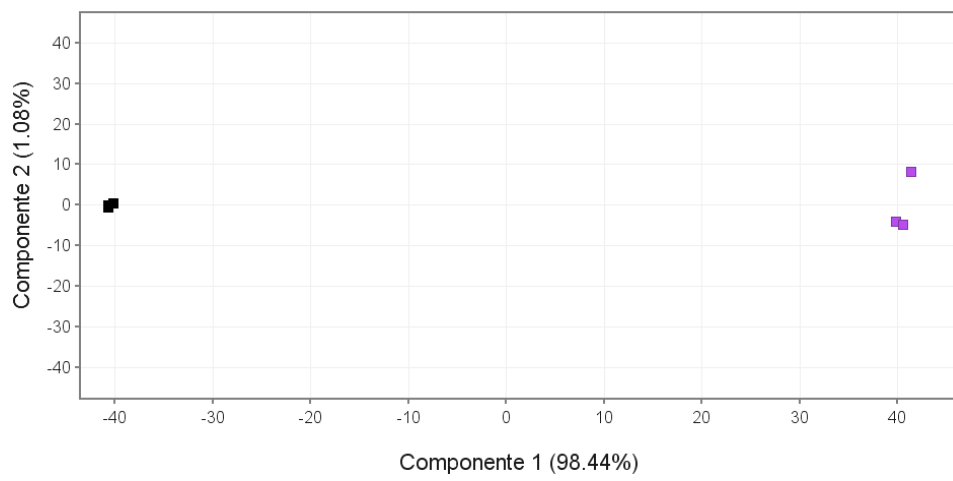
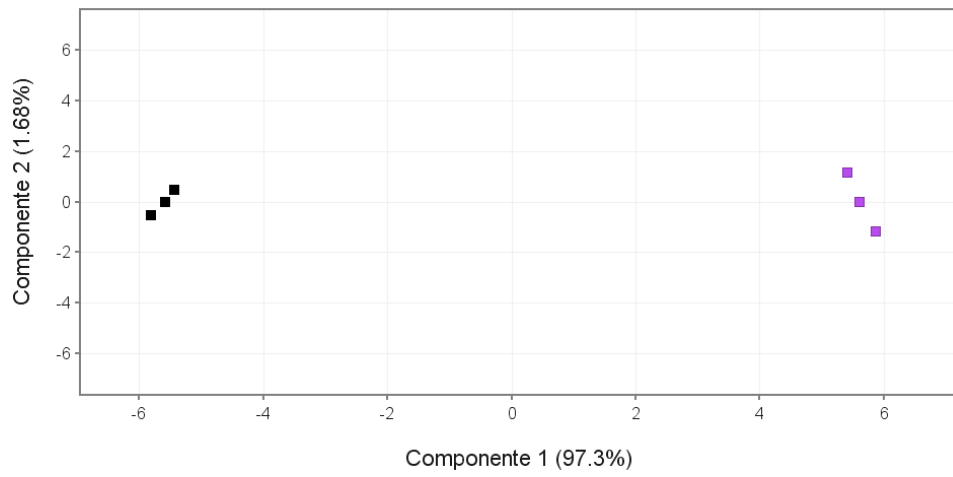
■ FMT 701



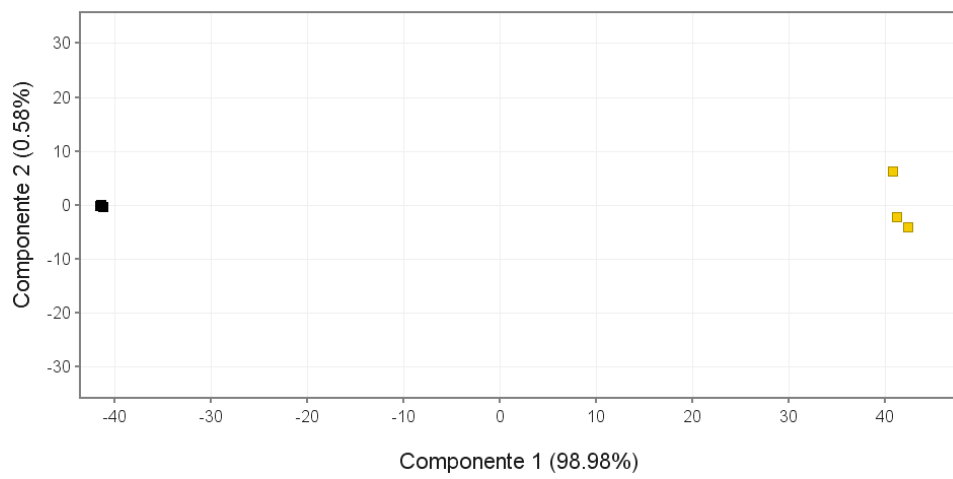
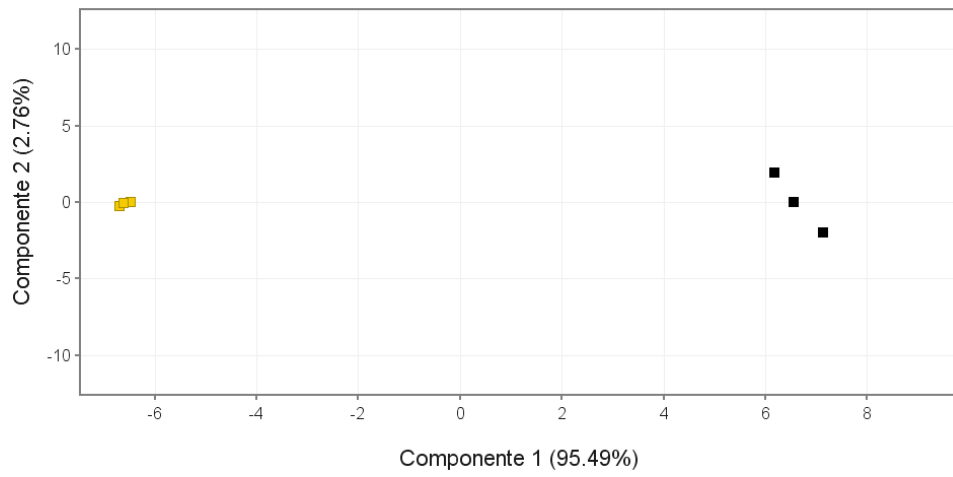
▪ FMT 707



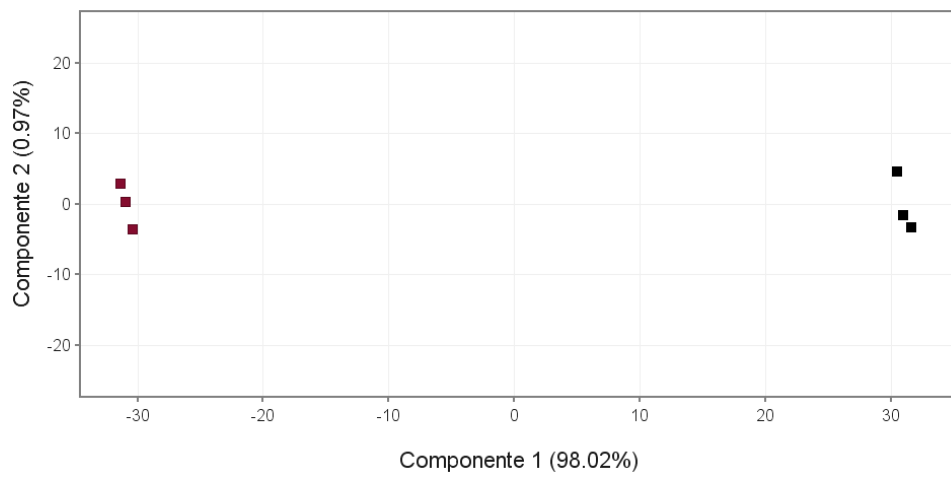
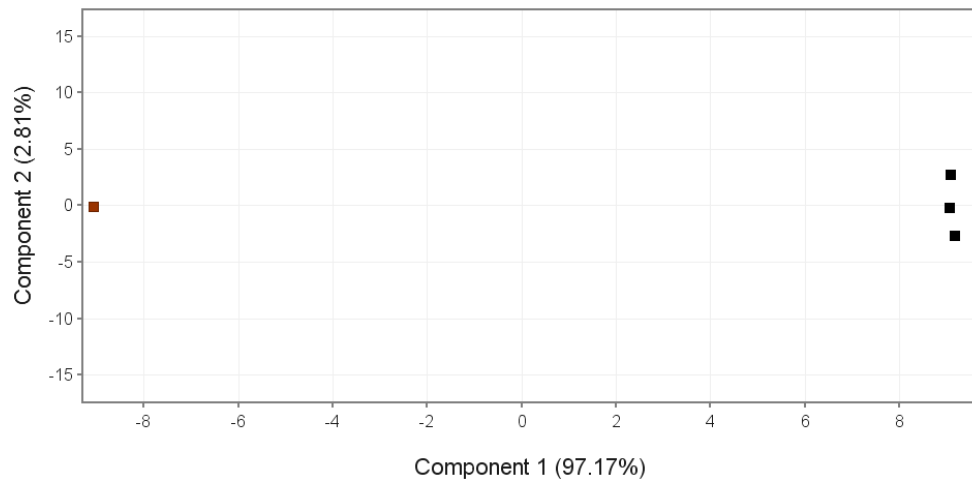
▪ FMT 709



▪ FMX 910



■ FMX 993



Apêndice C

Experimentos de resistência induzida com *Spodoptera cosmioides* - Dados gráficos de vulcano.

BRS 286

Compound (Tempo de retenção)	p ([BRS 286 In] Vs [BRS 286])	p (Corr) ([BRS 286 In] Vs [BRS 286])	FC (abs) ([BRS 286 In] Vs [BRS 286])	Regulation ([BRS 286 In] Vs [BRS 286])	FC ([BRS 286 In] Vs [BRS 286])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([BRS 286 In] Vs [BRS 286])
1.0@47.37	0.008837809	0.09950718	20.351.913	up	20.351.913	0.94798255	-0.07706759	10.251.644
1.0@40.649	0.018299283	0.1264314	31.510.131	down	-31.510.131	-0.68264174	0.5507994	-16.558.157
1.0@40.580	0.019419162	0.13118723	20.584.738	down	-20.584.738	-0.5142032	0.95958954	-10.415.751
1.0@40.479	0.017564017	0.1264314	29.865.491	up	29.865.491	0.5405712	-0.8874434	15.784.794
1.0@38.830	0.0063792723	0.080140874	25.166.621	up	25.166.621	30.392.294	16.037.055	13.315.115
1.0@38.439	0.01137934	0.109346196	4.434.611	up	4.434.611	0.7016005	-0.51127833	21.488.075
1.0@37.319	0.0045946892	0.080140874	300.879	down	-300.879	-0.66764045	0.5828567	-15.891.834
1.0@35.709	0.005861611	0.080140874	23.827.653	up	23.827.653	7.811.835	29.656.615	12.526.368
1.0@35.370	0.006590532	0.080140874	2.978.769	up	2.978.769	10.589.089	0.08257853	15.747.162
1.0@35.33	0.0021254877	0.07619306	57.739.863	up	57.739.863	17.720.516	0.8254206	25.295.677
1.0@34.439	0.014092914	0.11900683	382.447	down	-382.447	-0.73852587	0.43727964	-19.352.598
1.0@34.360	0.0055399165	0.080140874	47.507.157	down	-47.507.157	-0.78950536	0.34097904	-22.481.449
1.0@31.8700	0.0025063506	0.07619306	2.113.209	up	2.113.209	13.495.511	37.544.076	10.794.355
1.0@31.6200	0.016342128	0.1264314	2.319.941	up	2.319.941	0.84621423	-0.24090514	12.140.881
1.0@29.780	0.0032171148	0.07653578	20.796.194	up	20.796.194	0.5820832	-0.78070265	10.563.195
1.0@26.770	0.003085539	0.07653578	26.669.364	down	-26.669.364	-0.6250379	0.6779844	-14.151.834
1.0@26.5	0.022958523	0.14540398	33.484.316	down	-33.484.316	-0.7013527	0.51178795	-17.434.855
1.0@23.380	4,68E+01	0.0014223472	8.887.197	up	8.887.197	0.8874786	-0.17221577	31.517.284
1.0@17.829	0.02557654	0.15550536	26.042.607	up	26.042.607	0.81407076	-0.29677388	13.808.738
1.0@17.060	1,63E+02	0.012413286	32.004.855	down	-32.004.855	-0.6875474	0.54046893	-16.782.907
1.0@15.989	9,77E+00	0.0014856476	23.274.846	down	-23.274.846	-0.5703516	0.81007653	-12.187.716

1.0@15.150	2,65E+03	0.016092192	34.945.288	down	-34.945.288	-0.7138384	0.4863306	-18.050.979
1.0@13.869	0.005928115	0.080140874	8.530.237	down	-8.530.237	-0.88276994	0.17989059	-30.925.858
1.0@13.489	0.020079084	0.13269655	26.476.643	down	-26.476.643	-0.6223086	0.68429786	-14.047.202
1.0@13.390	9,74E+02	0.042290978	26.308.079	down	-26.308.079	-0.61988866	0.689919	-13.955.059
1.0@11.349	0.018183006	0.1264314	2.058.508	up	2.058.508	25.702.738	46.838.503	1.041.599
1.0@11.25	0.004851442	0.080140874	27.517.836	up	27.517.836	75.886.197	29.238.374	1.460.367
1.0@8.019	7,39E+02	0.0074912366	4.913.734	down	-4.913.734	-0.79648876	0.3282741	-22.968.197
1.0@7.200	0.002376553	0.07619306	28.154.035	down	-28.154.035	-0.64481115	0.6330514	-14.933.417
1.0@6.380	0.008790252	0.09950718	2.645.112	up	2.645.112	0.504078	-0.9882812	14.033.288
1.0@5.070	0.010481966	0.10621725	4.373.598	down	-4.373.598	-0.7713553	0.3745326	-21.288.207
1.0@5.010	0.016409814	0.1264314	32.006.843	down	-32.006.843	-0.6875668	0.54042816	-16.783.804
1.0@4.899	0.005862865	0.080140874	7.188.456	down	-7.188.456	-0.86088806	0.21610244	-2.845.682
1.0@3.850	0.011758083	0.109346196	33.069.692	down	-33.069.692	-0.69760835	0.5195108	-17.255.095

BRS 335

Compound (Tempo de retenção)	p ([BRS 335 ln] Vs [BRS 335])	p (Corr) ([BRS 335 ln] Vs [BRS 335])	FC (abs) ([BRS 335 ln] Vs [BRS 335])	Regulation ([BRS 335 ln] Vs [BRS 335])	FC ([BRS 335 ln] Vs [BRS 335])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([BRS 335 ln] Vs [BRS 335])
1.0@3.850	9,15E+00	3,48E+02	3.324.138	down	-3.324.138	-0.6991701	0.5162846	-17.329.803
1.0@3.929	4,16E+01	1,15E+03	71.305.256	down	-71.305.256	-0.8597579	0.21799763	-28.340.085
1.0@4.720	6,32E+01	1,60E+03	44.269.915	down	-44.269.915	-0.774113	0.36938393	-21.463.265
1.0@5.010	3,13E+03	0.0033965067	36.141.667	down	-36.141.667	-0.72331107	0.46731186	-18.536.631
1.0@5.070	6,75E+02	0.0059196684	4.919.503	down	-4.919.503	-0.7967274	0.32784188	-22.985.127
1.0@6.450	8,45E-03	1,28E+01	68.806.887	down	-68.806.887	-0.8546657	0.22656788	-2.782.553
1.0@6.739	3,51E-02	2,13E+02	51.212.163	down	-51.212.163	-0.8047339	0.31341633	-23.564.866
1.0@7.299	0.006068321	0.03689539	6.101.319	down	-6.101.319	-0.836101	0.25825086	-2.609.121
1.0@8.019	0.0011499464	0.008963685	3.531.439	up	3.531.439	0.7168293	-0.4802985	18.202.562
1.0@9.549	3,49E+00	1,06E+04	11.570.616	down	-11.570.616	-0.91357416	0.13040625	-35.323.937
1.0@10.580	1,10E+02	0.00174	26.446.135	down	-26.446.135	-0.6218729	0.68530834	-14.030.569
1.0@15.679	5,47E+02	0.005197622	32.925.012	down	-32.925.012	-0.6506349	0.62007993	-17.191.839
1.0@15.989	9,13E+00	3,48E+02	3.778.273	up	3.778.273	0.7353288	-0.4435386	1.917.727
1.0@16.130	0.004692021	0.03034839	223.012	up	223.012	0.55159366	-0.8583222	11.571.213
1.0@16.840	0.0035250713	0.024355039	26.973.555	down	-26.973.555	-60.770.063	-2.603.361	-14.315.456
1.0@17.219	1,05E-03	3,18E-02	23.625.271	up	23.625.271	0.5767244	-0.794046	12.403.309
1.0@17.29	1,55E+02	3,63E+02	25.806.231	down	-25.806.231	-0.7799649	0.35851884	-13.677.194
1.0@17.54	2,06E+02	4,47E+03	4.769.574	down	-4.769.574	-0.8839192	0.17801364	-22.538.605
1.0@18.140	2,14E+03	0.0027095564	2.243.478	down	-2.243.478	-0.59120154	0.7582781	-1.165.737
1.0@18.780	1,08E+02	0.00174	30.483.954	down	-30.483.954	-0.67195857	0.5735558	-160.805
1.0@21.229	2,27E+02	4,60E+02	54.223.485	down	-54.223.485	-0.8155781	0.29410505	-24.389.179
1.0@26.770	1,26E+03	0.00174	31.862.833	down	-31.862.833	-0.6861547	0.54339415	-16.718.745
1.0@29.079	9,91E+01	0.00174	4.146.286	down	-4.146.286	-0.7588203	0.39816982	-20.518.196
1.0@29.379	1,15E+03	0.00174	39.458.942	down	-39.458.942	-0.746572	0.42164665	-19.803.523
1.0@30.290	0.002026353	0.015024667	43.515.368	down	-43.515.368	-0.77019614	0.3767022	-2.121.525
1.0@30.719	1,39E+01	4,68E+01	38.057.787	down	-38.057.787	-0.7372417	0.43979046	-19.281.917

1.0@33.510	2,59E-01	1,97E+02	4.543.828	down	-4.543.828	-0.77992123	0.35859966	-21.839.082
1.0@37.659	6,82E+03	0.0059196684	22.341.967	down	-22.341.967	-0.5524118	0.85618395	-11.597.562
1.0@38.43	3,84E+03	0.004028969	32.197.142	down	-32.197.142	-0.6894134	0.5365587	-16.869.326
1.0@38.719	6,56E+02	0.0059196684	2.146.501	down	-2.146.501	-0.53412557	0.90474916	-11.019.869
1.0@40.580	1,23E+03	0.00174	26.369.293	down	-26.369.293	-0.62077105	0.6878668	-13.988.589
1.0@45.600	2,12E+00	1,97E+02	27.694.373	down	-27.694.373	-0.63891584	0.6463022	-14.695.928
1.0@45.739	2,69E+03	0.003033245	23.150.206	down	-23.150.206	-12.490.726	-0.3208573	-1.211.025
1.0@45.870	2,23E+03	0.002717037	62.476.554	down	-62.476.554	-16.082.155	-0.6854607	-26.433.148
1.0@46.370	4,51E+03	0.0044226404	2.587.727	up	2.587.727	3.996.454	19.987.205	13.716.854
1.0@49.820	8,93E+02	0.0071475534	20.998.952	up	20.998.952	3.869.204	19.520.369	10.703.174

BRS 336

Compound	p ([BRS 336 In] Vs [BRS 336])	p (Corr) ([BRS 336 In] Vs [BRS 336])	FC (abs) ([BRS 336 In] Vs [BRS 336])	Regulation ([BRS 336 In] Vs [BRS 336])	FC ([BRS 336 In] Vs [BRS 336])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([BRS 336 In] Vs [BRS 336])
1.0@4.190	0.0019246327	0.017208481	54.907.403	down	-54.907.403	-0.8178752	0.29004738	-24.570.007
1.0@5.010	6,96E+00	2,01E+03	36.665.406	up	36.665.406	0.72726333	-0.45945024	18.744.195
1.0@5.070	3,05E+03	0.0038606005	37.049.704	up	37.049.704	0.7300923	-0.45384926	1.889.462
1.0@6.450	5,26E+03	0.0055113677	37.869.875	down	-37.869.875	-0.73593783	0.4423442	-19.210.507
1.0@6.609	0.0056905462	0.04324815	22.244.391	down	-22.244.391	-0.46706927	10.982.915	-11.534.417
1.0@6.700	0.004710642	0.036718853	25.203.755	up	25.203.755	0.6032337	-0.7292111	13.336.387
1.0@8.019	7,27E+00	2,01E+03	63.381.543	down	-63.381.543	-0.8422254	0.24772176	-26.640.627
1.0@8.320	1,33E+01	8,58E+01	27.926.881	up	27.926.881	0.6419221	-0.6395298	14.816.544
1.0@8.880	1,82E+02	0.0026895658	4.023.033	down	-4.023.033	-0.75143135	0.4122868	-20.082.836
1.0@9.229	1,77E+01	8,99E+01	2.140.266	down	-2.140.266	-0.53276837	0.90841967	-109.779
1.0@11.119	6,91E+00	2,01E+03	36.148.996	down	-36.148.996	-0.72336715	0.4672	-18.539.556
1.0@13.869	2,06E-01	2,09E+02	5.668.507	down	-5.668.507	-0.8235867	0.28000757	-25.029.688
1.0@14.090	2,96E+01	6,91E+01	65.494.785	down	-65.494.785	-0.8473161	0.23902784	-271.138
1.0@15.469	1,96E+00	2,09E+02	494.093	down	-494.093	-0.797609	0.32624647	-23.047.826
1.0@16.7	2,18E+03	0.0028792967	24.645.038	down	-24.645.038	-0.5942388	0.75088525	-13.012.972
1.0@17.219	8,41E+01	0.0015985434	24.227.395	down	-24.227.395	-0.58724415	0.76796764	-12.766.392
1.0@18.780	1,58E+03	0.0025272807	60.333.543	down	-60.333.543	-0.83425474	0.26144013	-25.929.604
1.0@18.880	0.0023250536	0.02019475	40.575.213	down	-40.575.213	-0.7535441	0.40823618	-20.205.986
1.0@24.489	1,92E+03	0.0026895658	5.354.135	down	-5.354.135	-0.8132285	0.29826733	-24.206.536
1.0@24.780	0.0018866587	0.017208481	20.353.718	up	20.353.718	8.861.093	31.474.845	10.252.923
1.0@29.379	6,11E+01	0.0012984065	4.157.669	down	-4.157.669	-0.7594806	0.396915	-2.055.775
1.0@29.689	1,78E+02	4.501092E-4a	31.068.711	down	-31.068.711	-0.30230337	1.725.931	-16.354.624
1.0@30.719	1,05E+03	0.0017654859	5.018.957	down	-5.018.957	-0.8007554	0.3205665	-23.273.876
1.0@31.439	2,30E+01	9,99E+01	7.273.712	down	-7.273.712	-0.8625186	0.21337251	-28.626.919
1.0@36.729	9,90E+01	0.0017654859	30.647.135	down	-30.647.135	-0.6737052	0.5698106	-16.157.522

1.0@36.780	0.0011949207	0.011351747	23.673.263	down	-23.673.263	-0.5775825	0.7919011	-12.432.585
1.0@37.560	4,10E+03	0.004982456	2.493.661	down	-2.493.661	-0.59898317	0.7394126	-13.182.653
1.0@37.889	4,98E+03	0.00541131	21.572.661	up	21.572.661	0.6223478	-0.6842071	11.092.042
1.0@40.580	4,60E+03	0.0051816427	20.058.687	down	-20.058.687	-0.5014629	0.9957852	-10.042.272
1.0@40.649	1,95E+03	0.0026895658	4.185.935	down	-4.185.935	-0.7611047	0.39383316	-20.655.499
1.0@41.219	1,41E+01	8,58E+01	21.241.033	down	-21.241.033	-0.52921313	0.91807926	-10.868.539

Apêndice D

Experimentos de resistência induzida com os genótipos Delta Opal e FMT 701 – Dados gráficos de Volcano.

Delta Opal: Adição de metil jasmonato ao solo na concentração de 20 μmolL^{-1} (DO 20S)

Compound (Tempo de retenção)	p ([DO 20S] Vs [DO Controle])	p (Corr) ([DO 20S] Vs [DO Controle])	FC (abs) ([DO 20S] Vs [DO Controle])	Regulation ([DO 20S] Vs [DO Controle])	FC ([DO 20S] Vs [DO Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([DO 20S] Vs [DO Controle])
1.0@4.78	1,81E-02	1,63E+01	4.883.243	down	-4.883.243	-76.359.955	-62.547.445	-22.878.397
1.0@5.1199994	0.005260946	0.031565677	3.612.192	down	-3.612.192	-26.121.914	-13.852.606	-18.528.745
1.0@7.7399993	2,15E+00	6,46E+01	10.893.833	down	-10.893.833	-66.779.256	-27.394	-34.454.398
1.0@7.8800006	6,95E-02	3,13E+01	46.213.527	down	-46.213.527	-28.814.929	-15.268.165	-22.083.151
1.0@9.69	0.008972782	0.04486391	27.768.443	down	-27.768.443	-0.8431316	0.24617027	-14.734.462
1.0@11.06	3,33E+01	7,48E+01	52.261.367	down	-52.261.367	-4.704.774	-22.341.254	-23.857.448
1.0@11.59	1,02E+04	0.0015298887	7.656.928	down	-7.656.928	-30.061.276	-15.879.062	-29.367.657
1.0@12.96	1,26E+02	2,27E+03	24.396.012	up	24.396.012	14.396.012	0.5256692	12.866.453
1.0@20.0	7,57E+02	0.009736787	24.272.277	down	-24.272.277	-12.780.839	-69.978.385	-12.793.095
1.0@25.0	0.0020183737	0.017942287	2.103.707	down	-2.103.707	-37.698.538	-8.558.365	-10.729.338
1.0@28.87	0.0018701905	0.017942287	37.158.432	down	-37.158.432	-12.254.534	-36.152.437	-18.936.896
1.0@30.01	0.0023417328	0.017942287	26.047.468	down	-26.047.468	-42.387.342	-20.836.334	-13.811.431
1.0@31.78	0.0023923048	0.017942287	270.065	down	-270.065	-0.8398951	0.25171888	-14.333.067
1.0@40.89	0.0070256535	0.039519303	2.165.422	down	-2.165.422	-0.5381962	0.89379585	-11.146.482

Delta Opal: Adição de metil jasmonato ao solo na concentração de 200 µmolL⁻¹ (DO 200S)

Compound (Tempo de retenção)	p ([DO 200S] Vs [DO Controle])	p (Corr) ([DO 200S] Vs [DO Controle])	FC (abs) ([DO 200S] Vs [DO Controle])	Regulation ([DO 200S] Vs [DO Controle])	FC ([DO 200S] Vs [DO Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([DO 200S] Vs [DO Controle])
1.0@5.94	1,08E+02	1,94E+03	33.246.593	down	-33.246.593	-0.6992173	0.5161872	-17.332.065
1.0@22.1	3,67E-01	1,65E+02	28.285.751	down	-28.285.751	-0.64646506	0.62935567	-15.000.755
1.0@32.31	0.0034366448	0.02061987	22.501.185	up	22.501.185	789.939	29.817.412	11.700.009
1.0@32.42	0.0015307078	0.011480309	2.499.004	up	2.499.004	36.465.942	5.188.478	13.213.531
1.0@36.16	0.009162327	0.04234909	28.112.423	up	28.112.423	1.523.021	0.6069358	14.912.078
1.0@36.64	8,90E+02	0.009397058	3.508.869	down	-3.508.869	-0.5928473	0.7542676	-18.110.061
1.0@37.99	5,40E+01	1,21E+03	24.655.666	down	-24.655.666	-0.59441376	0.75046057	-13.019.192
1.0@40.89	8,14E-02	7,33E+01	22.331.705	down	-22.331.705	-0.55220616	0.8567211	-11.590.934

Delta Opal: Pulverização de metil jasmonato as folhas (DO 200P)

Compound (Tempo de retenção)	p ([DO 200P] Vs [DO Controle])	p (Corr) ([DO 200P] Vs [DO Controle])	FC (abs) ([DO 200P] Vs [DO Controle])	Regulation ([DO 200P] Vs [DO Controle])	FC ([DO 200P] Vs [DO Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([DO 200P] Vs [DO Controle])
1.0@4.78	5,45E-01	2,45E+01	43.695.993	down	-43.695.993	-7.404.847	-6.210.398	-2.127.501
1.0@5.124	0.00538536	0.035895374	3.612.192	down	-3.612.192	-26.121.914	-13.852.606	-18.528.745
1.0@6.799	0.0040747216	0.032146446	2.025.577	down	-2.025.577	-0.44351944	11.729.307	-1.018.333
1.0@7.739	7,89E+00	2,37E+02	11.457.224	down	-11.457.224	-67.111.154	-27.465.525	-35.181.856
1.0@7.880	1,50E+03	0.0019330231	39.277.935	down	-39.277.935	-2.740.991	-14.546.976	-1.973.719
1.0@11.06	8,68E+01	1,56E+02	4.689.889	down	-4.689.889	-45.774.827	-21.945.543	-22.295.537
1.0@11.59	4,84E+02	7,27E+03	9.183.683	down	-9.183.683	-3.081.201	-16.234.928	-31.990.728
1.0@11.81	7,13E-01	1,56E+02	30.639.813	up	30.639.813	20.858.847	77.045.155	16.154.075
1.0@14.979	0.0020228557	0.0182057	20.215.058	down	-20.215.058	-0.50531924	0.984733	-10.154.303
1.0@18.49	0.0077218395	0.043435346	22.025.936	down	-22.025.936	-0.37743723	14.056.914	-11.392.033
1.0@20.839	0.005583725	0.035895374	2.998.441	down	-2.998.441	-0.6664934	0.58533746	-15.842.125
1.0@28.87	0.006444334	0.038666002	24.848.335	down	-24.848.335	-10.019.127	-33.246.849	-13.131.492
1.0@30.01	5,36E+02	0.0060264994	31.633.873	down	-31.633.873	-47.051.888	-22.342.527	-16.614.702
1.0@36.64	0.004286193	0.032146446	2.821.451	down	-2.821.451	-0.53527504	0.9016477	-14.964.372

Delta Opal: Herbivoria por *Spodoptera cosmioides* (DO Herb)

Compound (Tempo de retenção)	p ([DO Herb] Vs [DO Controle])	p (Corr) ([DO Herb] Vs [DO Controle])	FC (abs) ([DO Herb] Vs [DO Controle])	Regulation ([DO Herb] Vs [DO Controle])	FC ([DO Herb] Vs [DO Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([DO Herb] Vs [DO Controle])
1.0@4.06	0.0030686583	0.010622279	4.059.208	down	-4.059.208	-10.618.007	-0.08651302	-20.211.983
1.0@4.78	4,79E-03	2,16E+00	45.520.043	down	-45.520.043	-7.492.905	-6.227.453	-2.186.502
1.0@5.119	0.005385118	0.017950393	3.612.192	down	-3.612.192	-26.121.914	-13.852.606	-18.528.745
1.0@5.299	7,64E+03	0.0036177384	21.689.544	down	-21.689.544	-0.53894836	0.89178103	-11.169.997
1.0@6.7999	0.0022535957	0.008112945	26.771.326	down	-26.771.326	-0.5487704	0.86572534	-14.206.886
1.0@7.7399	1,84E-02	5,31E+00	9.513.814	down	-9.513.814	-658.002	-2.718.092	-32.500.238
1.0@7.880	2,36E-01	5,31E+00	44.083.266	down	-44.083.266	-28.430.421	-15.074.354	-21.402.311
1.0@11.06	1,85E+02	1,67E+03	49.183.874	down	-49.183.874	-4.635.116	-22.126.055	-22.981.853
1.0@11.59	3,08E-01	5,54E-01	53.347.855	down	-53.347.855	-28.095.632	-14.903.458	-24.154.303
1.0@13.270	3,12E+01	0.0021627278	21.277.835	down	-21.277.835	-21.077.304	-10.756.904	-10.893.514
1.0@14.87	1,29E+03	9,64E+03	27.817.452	down	-27.817.452	-11.437.633	-0.19378853	-14.759.903
1.0@18.58	4,61E+03	0.0029083265	2.498.447	down	-2.498.447	-11.014.955	-0.1394636	-13.210.316
1.0@28.87	0.0011337415	0.0046380335	274.256	down	-274.256	-10.653.224	-34.132.183	-14.555.231
1.0@30.01	4,85E+03	0.0029083265	21.116.884	down	-21.116.884	-36.219.995	-18.567.864	-10.783.969
1.0@32.42	8,13E+02	0.0036584118	20.426.683	up	20.426.683	25.364.746	4.664.753	1.030.455
1.0@45.89	0.011947951	0.035843853	25.084.183	down	-25.084.183	-44.595.337	-21.568.928	-13.267.779
1.0@49.27	0.0060560806	0.019465974	22.704.546	up	22.704.546	19.287.924	0.9476978	11.829.813

Delta Opal: Herbivoria por *S. cosmioides* mais metil jasmonato (DO Herb 200S)

Compound (Tempo de retenção)	p ([DO Herb 200S] Vs [Controle])	p (Corr) ([DO Herb 200S] Vs [Controle])	FC (abs) ([DO Herb 200S] Vs [Controle])	Regulation ([DO Herb 200S] Vs [Controle])	FC ([DO Herb 200S] Vs [Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([DO Herb 200S] Vs [Controle])
1.0@49.11	5,36E+02	0.005364934	20.735.264	up	20.735.264	56.076.574	24.873.981	10.520.864
1.0@41.52	7,24E+01	2,17E+03	27.761.633	up	27.761.633	17.761.633	0.82876426	14.730.924
1.0@34.77	0.0052095484	0.020385189	27.470.815	down	-27.470.815	-0.63597727	0.6529529	-14.578.997
1.0@32.05	8,96E+01	0.0073307124	4.902.723	up	4.902.723	19.441.801	0.9591619	22.935.832
1.0@30.01	0.0039310586	0.020385189	26.194.468	down	-26.194.468	-4.253.557	-20.886.698	-13.892.621
1.0@28.87	0.0012169378	0.008424954	31.026.587	down	-31.026.587	-11.362.772	-3.506.243	-1.633.505
1.0@12.96	0.00224922	0.0134953195	20.706.818	up	20.706.818	10.706.816	0.09852947	10.501.058
1.0@12.89	0.0011901449	0.008424954	2.308.269	up	2.308.269	9.704.317	32.786.267	12.068.113
1.0@11.59	6,45E-04	5,81E-01	34.577.065	down	-34.577.065	-24.577.065	-12.973.126	-17.898.154
1.0@11.06	6,86E+01	0.0010285596	8.936.156	down	-8.936.156	-51.669.636	-23.693.168	-31.596.544
1.0@7.880	1,58E+01	7,11E+01	52.593.617	down	-52.593.617	-2.978.018	-15.743.525	-23.948.877
1.0@7.739	1,23E+02	2,77E+03	1.191.446	down	-1.191.446	-67.357.445	-27.518.375	-35.746.417
1.0@5.119	0.0050105276	0.020385189	3.612.192	down	-3.612.192	-26.121.914	-13.852.606	-18.528.745
1.0@4.78	1,84E+02	3,31E+03	7.662.489	down	-7.662.489	-8.349.223	-638.357	-2.937.813

Delta Opal: Estresse hídrico (DO Hid)

Compound (Tempo de retenção)	p ([DO Hid] Vs [Controle])	p (Corr) ([DO Hid] Vs [Controle])	FC (abs) ([DO Hid] Vs [Controle])	Regulation ([DO Hid] Vs [Controle])	FC ([DO Hid] Vs [Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([DO Hid] Vs [Controle])
1.0@4.78	1,74E-01	1,57E+01	52.564.125	down	-52.564.125	-7.775.596	-62.808.814	-23.940.785
1.0@5.119	0.005385459	0.030293206	3.612.192	down	-3.612.192	-26.121.914	-13.852.606	-18.528.745
1.0@7.739	8,59E-01	3,87E+02	9.876.124	down	-9.876.124	-66.083.727	-27.242.951	-3.303.945
1.0@7.880	2,42E+00	7,26E+01	25.270.834	down	-25.270.834	-3.531.677	-18.203.534	-46.594.014
1.0@9.69	0.0033381465	0.025036098	38.068.838	down	-38.068.838	-0.9715214	0.041682355	-19.286.106
1.0@11.06	6,95E+01	0.0012517676	62.992.477	down	-62.992.477	-48.944.225	-22.911.386	-26.551.795
1.0@11.59	5,24E+02	0.0011779604	8.429.526	down	-8.429.526	-30.475.166	-16.076.341	-30.754.516
1.0@13.270	0.00373486	0.025633143	22.775.815	down	-22.775.815	-223.065	-11.574.641	-11.875.026
1.0@18.49	0.0030660704	0.025036098	21.100.442	down	-21.100.442	-0.36367124	14.592.932	-10.772.732
1.0@25.0	0.0010306354	0.013251027	2.152.597	down	-2.152.597	-38.474.286	-858.775	-11.060.781
1.0@28.87	0.00942481	0.04244846	30.527.084	down	-30.527.084	-11.274.347	-3.494.972	-16.100.898
1.0@45.89	0.009432991	0.04244846	27.826.142	down	-27.826.142	-47.508.574	-22.481.878	-14.764.409
1.0@49.27	0.0048006894	0.028804136	24.329.379	up	24.329.379	21.754.732	11.213.293	12.826.995

FMT 701: Adição de metil jasmonato ao solo na concentração de 20 µmolL⁻¹ (FMT 20S)

Compound (Tempo de retenção)	p ([FMT 20S] Vs [FMT Controle])	p (Corr) ([FMT 20S] Vs [FMT Controle])	FC (abs) ([FMT 20S] Vs [FMT Controle])	Regulation ([FMT 20S] Vs [FMT Controle])	FC ([FMT 20S] Vs [FMT Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([FMT 20S] Vs [FMT Controle])
1.0@14.79	1,82E+02	0.0018059049	29.873.288	up	29.873.288	0.6652528	-0.5880254	1.578.856
1.0@14.979	0.0019635924	0.03814709	31.460.588	down	-31.460.588	-0.682142	0.551856	-16.535.456
1.0@16.520	1,15E+04	0.0057070195	21.897.388	up	21.897.388	0.28580427	-18.069.006	11.307.588
1.0@24.160	1,94E+03	0.00639377	23.633.676	up	23.633.676	13.088.279	0.38827538	1.240.844
1.0@35.790	0.0035996777	0.04454601	5.481.386	down	-5.481.386	-0.81756437	0.29059577	-24.545.407
1.0@47.44	9,42E+02	0.02332457	40.881.886	up	40.881.886	30.881.877	16.267.605	20.314.617
1.0@49.27	0.004243421	0.04667763	28.842.974	down	-28.842.974	-26.358.476	-13.982.669	-15.282.199

FMT 701: Adição de metil jasmonato ao solo na concentração de 200 µmolL⁻¹ (FMT 200S)

Compound (Tempo de retenção)	p ([FMT 200S] Vs [FMT Controle])	p (Corr) ([FMT 200S] Vs [FMT Controle])	FC (abs) ([FMT 200S] Vs [FMT Controle])	Regulation ([FMT 200S] Vs [FMT Controle])	FC ([FMT 200S] Vs [FMT Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([FMT 200S] Vs [FMT Controle])
1.0@11.81	0.00466113	0.046145186	25.708.728	up	25.708.728	5.964.328	5.898.288	13.622.582
1.0@14.79	1,98E+01	4,89E+02	29.873.288	up	29.873.288	0.6652528	-0.5880254	1.578.856
1.0@47.53	1,49E+02	4,89E+02	2.834.877	up	2.834.877	13.493.013	0.4322126	15.032.861

FMT 701: Pulverização de metil jasmonato as folhas (FMT 200P)

Compound (Tempo de retenção)	p ([FMT 200P] Vs [FMT Controle])	p (Corr) ([FMT 200P] Vs [FMT Controle])	FC (abs) ([FMT 200P] Vs [FMT Controle])	Regulation ([FMT 200P] Vs [FMT Controle])	FC ([FMT 200P] Vs [FMT Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([FMT 200P] Vs [FMT Controle])
1.0@47.53	7,00E+01	0.0013850208	2.264.128	down	-2.264.128	-0.4105746	12.842.838	-11.789.554
1.0@17.89	1,33E-02	1,32E+00	51.474.223	down	-51.474.223	-0.805728	0.31163517	-236.385
1.0@17.43	3,27E+01	1,62E+03	4.087.245	down	-4.087.245	-0.7553364	0.4048088	-20.311.286
1.0@16.520	1,67E+03	0.0027488775	412.195	up	412.195	0.74996847	-0.41509816	2.043.327
1.0@14.79	1,86E+02	4,60E+03	29.873.288	up	29.873.288	0.6652528	-0.5880254	1.578.856
1.0@11.81	8,14E+00	2,69E+03	72.001.014	up	72.001.014	23.540.701	78.790.135	28.480.172

FMT 701: Herbivoria por *Spodoptera cosmioides* (FMT Herb)

Compound (Tempo de retenção)	p ([FMT Herb] Vs [FMT Controle])	p (Corr) ([FMT Herb] Vs [FMT Controle])	FC (abs) ([FMT Herb] Vs [FMT Controle])	Regulation ([FMT Herb] Vs [FMT Controle])	FC ([FMT Herb] Vs [FMT Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([FMT Herb] Vs [FMT Controle])
1.0@4.06	0.0054315263	0.036397595	4.642.118	down	-4.642.118	-0.78458107	0.35000557	-22.147.832
1.0@14.79	1,66E+02	5,49E+02	29.873.288	up	29.873.288	0.6652528	-0.5880254	1.578.856
1.0@18.49	0.005514787	0.036397595	28.906.572	up	28.906.572	0.5314213	-0.912072	15.313.975
1.0@24.160	0.0023504405	0.02326936	23.782.747	up	23.782.747	13.231.387	0.4039643	12.499.154
1.0@32.05	0.0096957	0.04244357	21.196.692	up	21.196.692	11.196.692	0.16307256	1.083.839
1.0@32.31	0.006868102	0.03923388	22.748.456	up	22.748.456	48.926.477	22.906.153	11.857.686
1.0@34.77	0.001029842	0.011328261	23.870.468	down	-23.870.468	-0.58107233	0.78321034	-12.552.269
1.0@41.52	0.003077433	0.027696896	2.224.367	up	2.224.367	12.243.669	0.29203594	11.533.948

FMT 701: Herbivoria por *S. cosmioides* mais metil jasmonato (FMT Herb 200S)

Compound (Tempo de retenção)	p ([FMT Herb 200S] Vs [FMT Controle])	p (Corr) ([FMT Herb 200S] Vs [FMT Controle])	FC (abs) ([FMT Herb 200S] Vs [FMT Controle])	Regulation ([FMT Herb 200S] Vs [FMT Controle])	FC ([FMT Herb 200S] Vs [FMT Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([FMT Herb 200S] Vs [FMT Controle])
1.0@11.06	5,41E+02	0.0038281218	20.045.946	down	-20.045.946	-0.5140527	0.96001184	-10.033.104
1.0@11.81	1,45E+02	2,39E+03	5.678.712	up	5.678.712	17.764.246	74.728.327	25.055.637
1.0@14.79	1,39E+02	2,39E+03	29.873.288	up	29.873.288	0.6652528	-0.5880254	1.578.856
1.0@14.979	0.002475426	0.011669866	24.281.008	down	-24.281.008	-0.5881555	0.76573044	-12.798.283
1.0@16.449	0.0040907166	0.016403772	29.918.199	up	29.918.199	0.39524508	-13.391.806	15.810.233
1.0@18.49	5,02E+02	0.0038281218	35.577.374	up	35.577.374	0.7189225	-0.47609186	183.096
1.0@19.020	0.00967302	0.030891256	21.283.555	down	-21.283.555	-0.7256444	0.46266535	-10.897.391
1.0@21.62	3,90E+01	4,82E+03	27.797.754	down	-27.797.754	-0.64025867	0.64327323	-14.749.683
1.0@29.14	8,55E+03	0.005292039	26.348.739	up	26.348.739	0.82875276	-0.27098632	13.977.339
1.0@30.97	0.0045004725	0.017136414	2.200.004	down	-2.200.004	-0.54545534	0.874467	-11.375.062
1.0@31.78	0.005619533	0.020604953	22.548.053	up	22.548.053	0.6327222	-0.66035587	11.730.028
1.0@32.05	9,50E+00	2,35E+02	250.944	up	250.944	15.094.402	0.5940136	13.273.654
1.0@32.31	0.003918467	0.016403772	2.467.514	up	2.467.514	56.320.763	2.493.667	13.030.583
1.0@34.03	0.006647827	0.022694306	24.691.272	up	24.691.272	1.464.246	0.55015796	13.040.011
1.0@35.26	0.011395573	0.035255052	20.657.532	up	20.657.532	0.6444107	-0.63394755	10.466.679
1.0@41.52	5,41E-01	1,79E+02	2.671.455	up	2.671.455	16.714.551	0.74110466	14.176.257
1.0@47.53	4,98E+02	0.0038281218	21.574.743	up	21.574.743	0.8511643	-0.23249048	11.093.433

FMT 701: Estresse hídrico (FMT Hid)

Compound (Tempo de retenção)	p ([FMT Hid] Vs [FMT Controle])	p (Corr) ([FMT Hid] Vs [FMT Controle])	FC (abs) ([FMT Hid] Vs [FMT Controle])	Regulation ([FMT Hid] Vs [FMT Controle])	FC ([FMT Hid] Vs [FMT Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ([FMT Hid] Vs [FMT Controle])
1.0@24.160	0.0020010497	0.04952598	3.087.527	up	3.087.527	20.040.183	10.028.957	16.264.517
1.0@38.86	3,57E+03	0.011793596	21.548.007	up	21.548.007	13.653.966	0.44932008	11.075.544
1.0@47.44	1,86E+02	9,22E+03	43.803.816	up	43.803.816	33.803.816	1.757.186	21.310.565