

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

“Potencial dos compostos orgânicos voláteis como estimulantes vegetais: uma investigação em diferentes cultivares de tomate”

Maria Clara Santana Aguiar*

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

Orientador: Moacir Rossi Forim

* bolsista (CAPES)

São Carlos - SP

2024

Santana Aguiar, Maria Clara

Potencial dos compostos orgânicos voláteis como estimulantes vegetais: uma investigação em diferentes cultivares de tomate / Maria Clara Santana Aguiar -- 2024. 205f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Moacir Rossi Forim

Banca Examinadora: Álvaro José dos Santos Neto, Ana Rita de Araújo Nogueira, Marcos David Ferreira, Roberta Cerasi Urban

Bibliografia

1. Agricultura sustentável. 2. Estudos metabolômicos. 3. Química de alimentos. I. Santana Aguiar, Maria Clara. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



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 Maria Clara Santana Aguiar, realizada em 30/04/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Profa. Dra. Roberta Cerasi Urban (UFSCar)

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto (IQSC/USP)

Prof. Dr. Marcos David Ferreira (EMBRAPA)

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

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

“A ciência nasce da intuição
e cresce nas incertezas,
e isso a faz humana”

Hugo Aguilaniu

Agradecimentos

A minha família e amigos, pois estes tornaram possível a execução desta pesquisa em meio às adversidades.

Ao professor Moacir Rossi Forim, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu grupo de pesquisa, pela confiança, liberdade para tomar decisões e incentivo ao longo desta caminhada.

Ao professor Felipe Christoff Wouters por todo incentivo e por disponibilizar o seu laboratório para a execução dos experimentos finais.

A Dorai, Josi, Luis e Victoria pelo companheirismo nos últimos anos e a Luize e Bárbara que me acompanharam desde o princípio desta jornada acadêmica.

A todos que estiveram presentes em minha formação pessoal e também escolar e que desde a alfabetização me mostraram a importância de uma vida guiada pela responsabilidade social, lealdade e humanização das relações.

A Universidade Federal de São Carlos, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela estrutura oferecida e oportunidade de realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos durante um período deste projeto.

A vida e a natureza, gratidão e amor!

Namastê! Evoé!

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
COV	Compostos Orgânicos Voláteis
Dg	Desejabilidade Global
Di	Desejabilidade Individual
DIC	Detector de Ionização em Chama
DPR	Desvio Padrão Relativo
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
PCA	Principal Component Analysis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Idec	Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	Índice de Retenção
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LMR	Limite Máximo de Resíduo
m/z	Razão massa/carga
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PARA	Programa de Análise de Alimentos
PTFE/SIL	Politetrafluoretileno/Silicone
r^2	Coefficiente de Determinação
t_R	Tempo de Retenção
TGA	Análises Termogravimétricas

Lista de Tabelas

TABELA 1. 1. Tipos de bioestimulantes e os efeitos observados em uma variedade de culturas alimentares.	11
TABELA 3.1. Níveis codificados das variáveis independentes empregadas na obtenção das suspensões coloidais contendo os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja.	34
TABELA 3.2. Áreas relativas dos compostos voláteis do óleo essencial de alecrim, erva-cidreira e laranja.	43
TABELA 3.3. Representação da matriz do planejamento fatorial com os níveis codificados e as respostas obtidas em função da recuperação de limoneno, linalol, cânfora utilizando amido de mandioca nativo e modificado.	48
TABELA 3.4. Teor de macro e micronutrientes nas amostras de lignina, casca de banana, casca e polpa de pequi, amido nativo e modificado.	55
TABELA 3.5. Resultados obtidos para separação de fases e recuperação dos ativos após a incorporação dos adjuvantes às formulações contendo 1,0; 2,5 e 5,0 de polissorbato.	56
TABELA 3.6. Resumo dos dados obtidos para as análises de TGA.	61
TABELA 3.7. Parâmetros cinéticos de liberação dos óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja livres e em suspensão coloidal.	64
TABELA 3.8. Equações das retas e os respectivos coeficientes de determinação obtidos para as curvas de calibração, valores de LOD e LOQ.	68
TABELA 3.9. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (CV%).	69

TABELA 4.1. Matriz do planejamento para a extração dos compostos fixos por ESL-EAU e as respostas dependentes.....	87
TABELA 4.2. Valores de desejabilidade individual e global obtidos ao avaliarmos a mistura extratora e o tempo na ESL-EAU.	89
TABELA 4.3. Análise de variância (nível de confiança de 95%) para a ESL.	91
TABELA 4.4. Matriz do planejamento para a extração compostos voláteis por <i>headspace</i> e as respostas dependentes.....	94
TABELA 4.5. Valores de desejabilidade individual e global obtidos ao avaliarmos a força iônica e o tempo na extração por <i>headspace</i>	94
TABELA 4.6. Análise de variância (nível de confiança de 95%) para a extração por <i>headspace</i>	96

Lista de Figuras

- FIGURA 1.1. Índices de segurança alimentar e desnutrição global (a) e brasileiro (b) no ano de 2022. Taxas mundiais de crescimento populacional, agrícola e per capita nos anos de 1960 a 2020 (c). 2
- FIGURA 1.2. Produção mundial de commodities entre 1970 e 2022 (a) e venda de defensivos agrícolas entre os anos de 2010 e 2022 (b). Ciclo de defensivos agrícolas e fertilizantes no ambiente (c), adaptado de Kailasa et al., 2013⁷..... 5
- FIGURA 1.3. Porcentagem de alimentos brasileiros com resíduos de defensivos agrícolas acima do limite máximo permitido e/ou contendo substâncias proibidas (a) e porcentagem de perdas de alimentos em toda a cadeia produtiva (b) no ano de 2022. 7
- FIGURA 1.4. Exemplos de bioestimulantes e de alterações no fenótipo e em nível celular e molecular que podem ocorrer após a aplicação dos bioestimulantes nas folhas ou no solo..... 17
- FIGURA 2. 1. Fluxograma descrevendo as etapas realizadas. 23
- FIGURA 3.1. Estrutura química do amido. Amilose (a) e amilopectina (b). .27
- FIGURA 3.2. Ilustração representando as etapas para a síntese das suspensões coloidais contendo os óleos essenciais. 33
- FIGURA 3.3. Representação do sistema de *headspace* estático (1) autoamostrador, (2) forno e processo de evaporação e equilíbrio que ocorre dentro do *vial*, (3) injetor e (4) compartimento para a coluna cromatográfica..... 36
- FIGURA 3.4. Ilustração esquemática de como foram realizados os experimentos para avaliar a liberação dos óleos essenciais emulsionados em água (livre) e em suspensão coloidal (encapsulado). 40

FIGURA 3.5. Cromatogramas de íons totais dos compostos voláteis dos óleos essenciais de alecrim (a), erva-cidreira (b) e laranja (c).....	42
FIGURA 3.6. Estrutura dos marcadores químicos dos óleos essenciais e visualização da coloração dos óleos essenciais utilizados.....	50
FIGURA 3.7. Representação dos efeitos das variáveis investigadas sobre o encapsulamento dos óleos essenciais de laranja, erva-cidreira e alecrim utilizando (a, b) amido nativo e (c, d) amido modificado.	50
FIGURA 3.8. Avaliação da viscosidade para os experimentos de 1 a 8 propostos pelo planejamento fatorial utilizando amido e amido modificado. O sinal (-) indica que há a manutenção da estabilidade e o sinal (+) indica que há formação de fases após 12h do preparo das suspensões coloidais.....	52
FIGURA 3. 9. Representação do fruto do pequi aberto e fechado, com destaque para o mesocarpo interno e externo.....	54
FIGURA 3.10. Imagens ópticas das suspensões coloidais preparas com a mistura dos óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja na proporção 1:1:1. As setas vermelhas apontam para micro gotículas (b).	57
FIGURA 3.11. Imagens de microscopia eletrônica das suspensões coloidais preparas com a mistura dos óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja na proporção 1:1:1. As figuras (a), (c) e (e) foram obtidas utilizando detector SE (secondary electrons), diferenciando as amostras em função da topografia e as figuras (b) e (d) detector BSE (backscattered electrons), diferenciando as amostras em função da composição química.	59
FIGURA 3.12. Curvas do monitoramento da concentração da cânfora, limoneno e linalol presente nas suspensões coloidais individuais (a) e na mistura dos óleos essenciais (b).....	62

FIGURA 3.13. Representação do cromatograma do extrato da matriz de (a) amido e (b) amido modificado isentas dos óleos essenciais e (c) fortificadas com 1 mg L ⁻¹ de cânfora, limoneno e linalol na matriz de amido nativo e amido modificado (t _R = 5,4 min: limoneno, t _R = 9,6 min: cânfora, t _R = 10,0 min: linalol e t _R = 16,3 min: padrão interno).....	65
FIGURA 3.14. Curvas analíticas preparadas em extrato da matriz para a cânfora (a), linalol (b) e limoneno (c).....	67
FIGURA 4.1. Representação esquemática das etapas para a realização de um estudo metabolômico.	74
FIGURA 4.2. Etapas do crescimento das mudas de tomate. (a). Destaque para a planta contendo estaca de bambu (b). Diferenças observadas na morfologia das folhas (c) e frutos dos tomates de diferentes cultivares de tomate (d, e, f).	84
FIGURA 4.3. Ciclos do desenvolvimento das plantas de tomate: da germinação à obtenção de frutos maduros.....	86
FIGURA 4.4. Representação dos efeitos das variáveis investigadas sobre a ESL-EAU. Sendo as variáveis avaliadas a mistura extratora, o tempo de extração e a interação entre as duas.	89
FIGURA 4.5. Cromatograma dos compostos totais extraídos para as amostras obtidas no experimento 1 e nos experimentos no ponto central (5 a 8).	91
FIGURA 4.6. Representação dos cromatogramas obtidos após o processo de derivatização e análises por CG-EM.	93
FIGURA 4.7. Representação dos efeitos das variáveis investigadas sobre a extração por headspace. Sendo as variáveis avaliadas a força iônica e o tempo de extração.....	95
FIGURA 4.8. Representação das principais classes química detectadas nas folhas de tomate.	97

FIGURA 4.9. Gráficos de <i>scores</i> (a) e <i>loadings</i> (b) para a primeira e segunda componentes das amostras de <i>S. pimpinellifolium</i> e <i>S. lycopersicum</i> (c – <i>scores</i> e d - <i>loadings</i>) nos estágios de plântula, crescimento vegetativo e floração.....	98
FIGURA 4.10. Compostos cuja variação na área durante os estágios de variação foram determinantes para o agrupamento na análise por PCA para o cultivo <i>S. pimpinellifolium</i> (a) e <i>S. lycopersicum</i> (b).....	99
FIGURA 4.11. Cromatograma e espectro de massas com destaque para a massa do pico base da giberelina A13. Resumo da biossíntese das giberelinas (b). Variação na área da giberelina A13 em função do cultivar e do estágio de desenvolvimento (c). Letras diferentes no topo das barras representam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey....	100
FIGURA 4.12. Cromatograma e espectro de massas para o ácido clorogênico (a). Representação de raízes adventícias no caule do tomate (b).	102
FIGURA 4.13. Obtenção das moléculas de kaempferol e quercetina a partir da molécula de narigenina (via dos fenilpropanoides).	103
FIGURA 4.14. Representação esquemática da via dos fenilpropanoides, com destaque para a biossíntese de antocianinas.	104
FIGURA 4.15. Resumo da biossíntese da tomatidina a partir do colesterol (a). Modulação na área da tomatidina em função das fases de desenvolvimento e do cultivar estudado. Letras diferentes no topo das barras representam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey. (b). Pico e espectro de massas da tomatidina (c).	106
FIGURA 4.16. Etapas da fragmentação da tomatidina.....	107

FIGURA 4.17. Fotografia das plantas em estágio de plântula. Gráfico de PCA (a) e volcano (b) obtidos comparando os metabólitos produzidos para as plantas em estágio de plântula. Moléculas diferencialmente expressas pelos cultivares (c).....	109
FIGURA 4.18. Biossíntese da <i>alfa</i> -tomatina e seu espectro de massas.	110
FIGURA 4.19. Etapas da fragmentação da <i>alfa</i> -tomatina.	111
FIGURA 4.20. Fotografia demonstrando a diferença na coloração das folhas de tomate (a). Estrutura química do ácido indol-3-acrílico (b).	112
FIGURA 4.21. Fotografia das plantas em estágio de crescimento vegetativo. Gráfico de PCA (a) e volcano (b) obtidos comparando os metabólitos produzidos para as plantas em estágio de plântula. Moléculas diferencialmente expressas pelos cultivares (c)..	114
FIGURA 4.22. Fotografia das plantas em estágio de floração. Gráfico de PCA (a) e volcano (b) obtidos comparando os metabólitos produzidos para as plantas em estágio de plântula. Moléculas diferencialmente expressas pelos cultivares (c).....	116
FIGURA 5.1. Representação da montagem dos experimentos de cultivo do tomate em casa de vegetação.	123
FIGURA 5.2. Efeito dos tratamentos com os bioestimulantes no crescimento das plantas de <i>S. pimpinellifolium</i> . Os parâmetros da planta estudados incluem a área foliar, altura, diâmetro do caule e teor de clorofila. Letras diferentes no topo das barras representam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.	129
FIGURA 5.3. Efeito dos tratamentos com os bioestimulantes no crescimento das plantas de <i>S. lycopersicum</i> . Os parâmetros da planta estudados incluem a área foliar, altura, diâmetro do caule e teor de clorofila. Letras diferentes no topo das barras	

	representam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.	130
FIGURA 5.4.	Efeito dos tratamentos com os bioestimulantes no crescimento das plantas de <i>S. pimpinellifolium</i> . Os parâmetros da planta estudados iguais no topo das barras indicam que não há diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.	133
FIGURA 5.5.	Efeito dos tratamentos com os bioestimulantes no crescimento das plantas de <i>S. lycopersicum</i> . Os parâmetros da planta estudados iguais no topo das barras indicam que não há diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.	134
FIGURA 5.6.	Gráfico de PCA obtido comparando os metabólitos extraídos após o tratamento das plantas com a aplicação das formulações contendo os óleos essenciais para o cultivar de <i>S. pimpinellifolium</i> e <i>S. lycopersicum</i>	135
FIGURA 5.7.	Gráficos de <i>scores</i> (a) e <i>loadings</i> (b) para a primeira e segunda componentes das amostras de <i>S. pimpinellifolium</i> após o tratamento com as formulações contendo óleos essenciais. .	136
FIGURA 5.8.	Gráfico de PCA comparando as amostras controle com as tratadas com biopolímero (a), com a formulação de alecrim (b) e (d) com as amostras tratadas com óleo essencial de erva-cidreira, laranja e a mistura agrupada como tratamento e seus respectivos gráficos de vulcano em (c) e (e).	137
FIGURA 5.9.	Gráficos de <i>scores</i> (a) e <i>loadings</i> (b) para a primeira e segunda componentes das amostras de <i>S. lycopersicum</i> após o tratamento com as formulações contendo óleos essenciais. .	140

FIGURA 5.10. Gráfico de PCA comparando as amostras controle com as tratadas com biopolímero (a) e com a formulação de ervacideira e seu respectivo gráfico de vulcano em (c). 141

Resumo

POTENCIAL DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COMO ESTIMULANTES VEGETAIS: UMA INVESTIGAÇÃO EM DIFERENTES CULTIVARES DE TOMATE. Os óleos essenciais extraídos das plantas são constituídos por compostos orgânicos voláteis que possuem uma ampla gama de atividades biológicas nos sistemas vitais de diversos organismos. São conhecidos vários efeitos dos óleos essenciais no crescimento e fisiologia das plantas. No entanto, os seus efeitos em nível molecular ainda não estão bem elucidados. Além disso, sua natureza volátil e facilmente degradável restringe a sua aplicação. Com base nisto, nós investigamos o potencial dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), erva-cidreira (*Lippia alba*) e laranja (*Citrus sinensis*) como bioestimulantes vegetais usando como modelo os cultivares de tomate *Solanum pimpinellifolium* e *S. lycopersicum*, classificados como Planta de Introdução e comercial, respectivamente. Para avaliarmos a ação bioestimulante dos óleos essenciais este estudo foi conduzido em três frentes de pesquisa, sendo elas (i) o desenvolvimento da formulação contendo o bioestimulante, (ii) a avaliação de métodos de extração e otimização instrumental para a caracterização das interações bióticas e (iii) a aplicação dos produtos formulados nos cultivares de tomate. A primeira etapa da pesquisa consistiu em estabilizar e melhorar a dispersão dos óleos essenciais em meio aquoso. Por isso, nós avaliamos um método para a obtenção de microcápsulas biopoliméricas contendo os óleos essenciais. Para preparar as microcápsulas, avaliamos o tipo de biopolímero (amido de mandioca *in natura* e modificado), o teor de surfactante (polissorbato 80) e a adição, ou não, de adjuvantes (resíduos de banana, pequi e lignina). As emulsões foram analisadas quanto às suas viscosidades, morfologias da superfície e concentrações dos óleos após o preparo das emulsões e após a aplicação em solo. Verificamos que a utilização de amido

modificado associado à adição de adjuvantes favoreceu o processo de microencapsulamento com recuperações dos óleos essenciais superiores a 85% (v v⁻¹). Com os ensaios em solo, observamos que as microcápsulas biopoliméricas permitiram uma retenção dos óleos duas vezes maior em comparação com os óleos emulsionados. Para a segunda etapa deste estudo, exploramos as técnicas de preparo das amostras vegetais para as análises metabolômicas instrumentais. Este processo foi fundamental para garantir a padronização e reprodutibilidade das análises do material vegetal. Utilizando os métodos avaliados observamos que, para ambos os cultivares, ocorreu uma gradual modulação das giberelinas e de precursores de furanocumarinas durante as etapas de desenvolvimento. Além disso, as plantas comerciais apresentaram um maior acúmulo de isoflavonas no estágio vegetativo que pode estar associado à coloração roxa das suas folhas. Por outro lado, as Plantas de Introdução no decorrer do desenvolvimento apresentaram uma maior indução na biossíntese de moléculas glicosiladas de quercetina e kaempferol. O cultivar Planta de Introdução também foi o único em que detectamos a molécula de *beta*-tomatina nas fases de desenvolvimento. Na terceira etapa aplicamos as formulações contendo os óleos essenciais e, utilizando os métodos padronizados, verificamos a indução na biossíntese de metabólitos relacionados a mecanismos de defesa para ambos os cultivares após os tratamentos. Além disso, confirmamos que os óleos essenciais estimularam o crescimento das raízes, confirmando o seu potencial bioestimulante para as plantas de tomate. Estes dados representam o primeiro estágio para o desenvolvimento de produtos contendo óleos essenciais como bioestimulantes vegetais.

Abstract

POTENTIAL OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS AS PLANT STIMULANTS: AN INVESTIGATION IN DIFFERENT TOMATO CULTIVARS. Essential oils extracted from plants are composed of volatile organic compounds that have a wide range of biological activities in vital systems. Various effects of essential oils on plant growth have been demonstrated. However, their effects at the molecular level are not well understood. In addition, their volatile and degradable nature limits their application. Therefore, we investigated the potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), lemon balm (*Lippia alba*), and orange (*Citrus sinensis*) essential oils as plant biostimulants using the tomato cultivars *Solanum pimpinellifolium* and *S. lycopersicum* as models, classified as Plant Introduction (PI) and commercial, respectively. To evaluate the biostimulant activity of essential oils, this study was conducted in three research fronts, namely (i) the development of the formulation containing the biostimulant, (ii) the evaluation of extraction methods to characterize biotic interactions, and (iii) the application of the formulated products in tomato cultivars. The first stage of the research was to improve the dispersion of essential oils in an aqueous medium. Therefore, a method for obtaining biopolymer microcapsules containing essential oils was evaluated. To prepare the microcapsules, we evaluated the type of biopolymer (native and modified manioc starch), the surfactant content (polysorbate 80) and the addition (or not) of adjuvants (banana, pequi and lignin residues). The emulsions were analyzed for their viscosities, surface morphologies, and oil concentrations after emulsion preparation and soil application. We found that the use of modified starch combined with the addition of adjuvants favored the microencapsulation process with essential oil recoveries higher than 85% ($v v^{-1}$). In the soil tests, we observed that the biopolymer microcapsules allowed

the retention of oils twice as high as the emulsified oils. For the second phase of this study, we investigated the extraction techniques of plant samples for instrumental metabolomic analysis. This process was essential to ensure standardization and reproducibility of plant material analyses. Using the methods evaluated, we observed that for both cultivars there was a gradual modulation of gibberellins and furanocoumarin precursors during the developmental stages. In addition, commercial plants showed a higher accumulation of isoflavones in the vegetative stage, which may be related to the purple color of their leaves. The PI during development showed a greater induction in the biosynthesis of glycosylated molecules of quercetin and kaempferol. The PI variety was also the only one in which we detected the *beta*-tomatine molecule in the developmental stages. In the third step, we applied the formulations containing the essential oils and verified, using standardized methods, the induction in the biosynthesis of metabolites related to defense mechanisms for both cultivars after the treatments. In addition, we confirmed that the essential oils stimulated root growth, confirming their biostimulant potential for tomato plants. These data represent the first step in the development of products containing essential oils as plant biostimulants.

Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	Padrões atuais de cultivo e distribuição alimentar	3
1.2	Como resolver a questão da produção dos alimentos?	8
1.3	E os compostos orgânicos voláteis, seriam uma alternativa?	13
1.4	Desafios para a pesquisa de moléculas bioestimulantes	15
2	Objetivos e visão geral	21
3	Desenvolvimento de formulações contendo óleos essenciais.....	25
3.1	Introdução.....	25
3.2	Materiais e métodos	29
3.2.1	Reagentes	29
3.2.2	Amostras de óleos essenciais	30
3.2.3	Caracterização das matrizes	31
3.2.4	Determinação de macro e micronutrientes nos biopolímeros e adjuvantes.....	32
3.2.5	Sínteses das suspensões coloidais	32
3.2.5.1	Recuperação dos óleos essenciais após o processo de encapsulamento	35
3.2.5.2	Separação por cromatografia gasosa.....	36
3.2.6	Qualificação analítica.....	37
3.2.7	Caracterizações das suspensões coloidais.....	38
3.2.7.1	Avaliação da viscosidade	38
3.2.7.2	Características microestruturais	38
3.2.7.3	Análises termogravimétricas.....	38
3.2.7.4	Estudos de liberação em solo	39
3.2.8	Análises estatísticas.....	41
3.3	Resultados e discussão	42
3.3.1	Caracterização dos óleos essenciais	42

3.3.2 Avaliação dos biopolímeros para o encapsulamento dos óleos essenciais.....	47
3.3.3 Caracterização microestrutural	56
3.3.4 Estabilidade térmica dos óleos essenciais em suspensão coloidal.	60
3.3.5 Estudos da cinética de liberação em solo.....	62
3.3.6 Quantificação e qualificação analítica	64
3.3.6.1 Seletividade.....	64
3.3.6.2 Linearidade da resposta do detector, LOD e LOQ	66
3.3.6.3 Precisão e exatidão.....	69
3.4 Conclusões	70
4 Métodos analíticos para a análise de amostras vegetais: preparo de amostras e análises constitutivas	73
4.1 Introdução.....	73
4.2 Material e métodos	76
4.2.1 Reagentes	76
4.2.2 Material vegetal.....	77
4.2.3 Coleta das amostras de folhas de tomate	77
4.2.4 Protocolos de extração de metabólitos secundários.....	78
4.2.4.1 Compostos orgânicos não voláteis das folhas de tomate.....	78
4.2.4.2 Compostos orgânicos voláteis das folhas de tomate.....	79
4.2.5 Análises cromatográficas	80
4.2.6 Métodos de processamento de dados	81
4.2.7 Análise estatística.....	83
4.3 Resultados e discussão	83
4.3.1 Obtenção das sementes e condições de cultivo.....	83
4.3.2 Metodologias de extração dos metabólitos	86
4.3.2.1 Compostos orgânicos não voláteis nas folhas de tomate.....	87
4.3.3 Compostos orgânicos voláteis nas folhas de tomate.....	93

4.3.5	Influência dos estágios de desenvolvimento no perfil químico das folhas de tomate	97
4.3.6	Influência dos cultivares no perfil químico das folhas de tomate	108
4.3.6.1	Plântula.....	108
4.3.6.2	Crescimento vegetativo.....	113
4.3.6.3	Floração.....	115
4.4	Conclusões	117
5	Influência de estimulantes vegetais na diversidade química de cultivares de tomate	119
5.1	Introdução.....	119
5.2	Material e métodos	120
5.2.1	Reagentes	120
5.2.2	Preparo das formulações bioestimulantes	121
5.2.3	Cultivo das plantas de tomate e aplicação dos bioestimulantes ..	122
5.2.4	Coleta das amostras de folhas de tomate	124
5.2.5	Avaliações fisiológicas.....	124
5.2.6	Extração dos metabólitos primários e secundários	125
5.2.7	Extração dos metabólitos voláteis.....	125
5.2.8	Análises cromatográficas	126
5.2.9	Métodos de processamento de dados	127
5.2.10	Análise estatística.....	128
5.3	Resultados e discussão	128
5.3.1	Observações fenotípicas e efeitos dos bioestimulantes nos parâmetros de crescimento.....	128
5.3.2	Efeitos dos bioestimulantes no metaboloma das plantas de tomate	134
5.4	Conclusões	143
6	Conclusões gerais e perspectivas	145
	Apêndice A.....	166

Apêndice B	171
Apêndice C	172
Apêndice D	173
Apêndice E	180

1 *Introdução*



O mundo continua com o desafio de alimentar toda a população humana de forma sustentável. Se pensarmos em nível mundial, no ano de 2022 mais de 735 milhões de pessoas apresentavam subnutrição e 2,35 bilhões de pessoas estavam em situação de insegurança alimentar.¹ Ou seja, não conseguimos garantir que os alimentos estivessem disponíveis para pelo menos 29% da população mundial. Deste valor, 900 milhões de pessoas estavam em insegurança alimentar grave¹ (Figura 1.1a). Considerando a realidade brasileira, 9,9% da população passou por situação de insegurança alimentar grave em 2022 (Figura 1.1b).

Além dos desafios atuais para alimentar uma população de aproximadamente 8 bilhões de pessoas, há a tendência de um crescimento populacional entre 9 e 10 bilhões de habitantes até o ano de 2050, o que torna a situação mais desafiadora.^{2,3} Assim, o futuro da produção de alimentos implica em responder a questão: haverá alimentos em quantidade e qualidade suficientes? Como produzir alimentos em meio às alterações climáticas?³

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, sigla do inglês *Food and Agriculture Organization*), há duas décadas a taxa de produção global de alimentos aumentou mais rápido do que a taxa de crescimento da população mundial (Figura 1.1c).¹ Ou seja, já produzimos mais de 1,5 vezes alimentos suficientes para alimentar todos no planeta. Isto é, já temos alimentos suficientes para alimentar 10 bilhões de pessoas.⁴ Então, por que a fome, subnutrição e insegurança alimentar ainda existem? Discutiremos mais sobre isto no tópico a seguir.

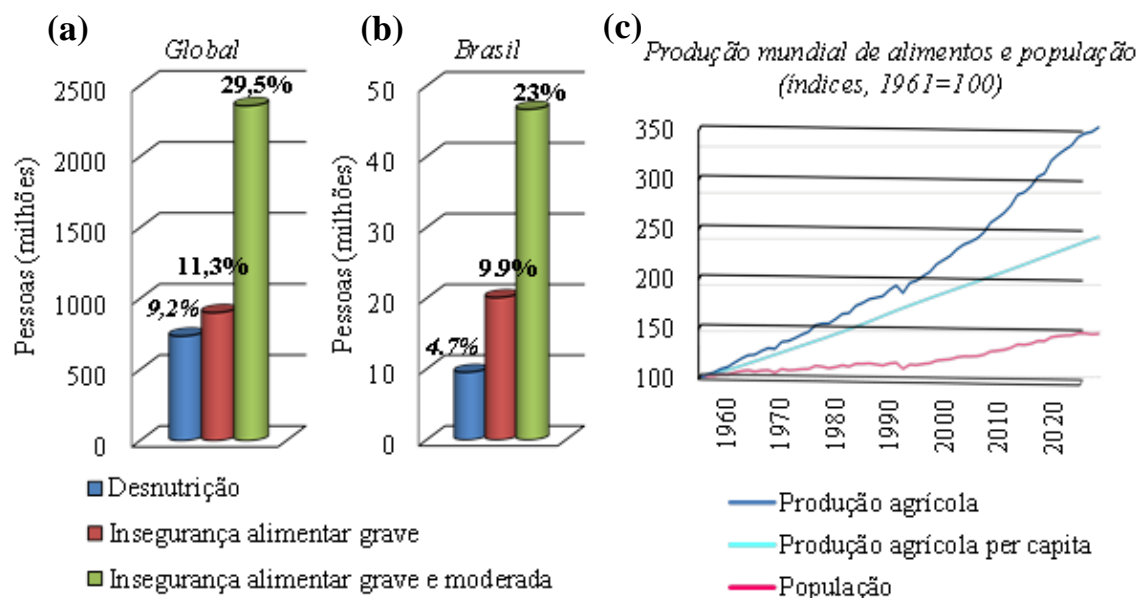


FIGURA 1.1. Índices de segurança alimentar e desnutrição global (a) e brasileiro (b) no ano de 2022. Taxas mundiais de crescimento populacional, agrícola e per capita nos anos de 1960 a 2020 (c).

Fonte: FAOSTAT.

1.1 Padrões atuais de cultivo e distribuição alimentar

Inicialmente, com a premissa de aumentar o rendimento agrícola e promover o alívio da fome, os governos e a indústria de alimentos têm investido massivamente na produção de *commodities* agrícolas¹ em detrimento de outros grupos alimentares.⁵

Na Figura 1.2a, demonstramos que a produção de produtos como algodão, milho e soja apresentou um crescimento constante nos últimos 30 anos. Enquanto isso, grupos alimentares direcionados diretamente para o consumo populacional como tomate, feijão e batata-doce apresentaram uma estabilidade na produção. Efetivamente, a maior parte das culturas produzidas industrialmente vai para a exportação, obtenção de biocombustíveis e para o preparo de rações de animais em confinamento, como milho, cana e a soja. Assim, alguns cultivares que inicialmente eram destinados a alimentação foram transformados em *commodities* e dissociados do sentido de alimentação.^{4,5}

Além disso, independentemente do tipo ou da finalidade do alimento produzido, a necessidade de diminuirmos a pressão sobre a terra tem direcionado os produtores a aumentar a produção agrícola sem expandir as terras aráveis.² A expansão histórica da agricultura em florestas e ecossistemas naturais contribuiu significativamente para a perda de serviços ecossistêmicos.² Isto deu um impulso adicional à constatação de que os futuros aumentos na oferta de alimentos precisam ser conduzidos sem aumentar a área agrícola.

Com base nisto, a agricultura moderna incluiu várias ideias inovadoras para melhorar a produção agrícola, tais como as aplicações de fertilizantes e defensivos químicos na agricultura. A adição destes produtos tornou-se a parte fundamental dos sistemas agrícolas atuais para satisfazer a demanda alimentar.^{5,6} Na Figura 1.2b, por exemplo, ilustramos que a aquisição

¹Produtos primários comercializados *in natura* ou com baixo teor de industrialização. São produtos com características padronizadas e sem diferenciação de origem, demandados em escala global.

de defensivos agrícolas mais que dobrou nos últimos 10 anos em comparação com a menor expansão da terra disponível para o cultivo.

Embora esta prática tenha obtido sucesso em curto prazo no aumento da produção de alimentos, em longo prazo também tem gerado diversos problemas ambientais, tornando-a conflitante com a premissa anterior de diminuir os impactos sobre a Terra.^{6,7} Afinal, os padrões atuais para a produção das culturas têm sido associados principalmente à (i) diminuição na disponibilidade de uma variedade de culturas que contribuem para o abastecimento da população, (ii) ao surgimento de resistência em pragas agrícolas desencadeada pelo (iii) uso excessivo e/ou incorreto de defensivos agrícolas e fertilizantes que por meio da lixiviação têm contaminado o meio ambiente.^{6,7}

Durante a aplicação de fertilizantes e defensivos químicos na superfície das plantas, eles podem ser carregados por escoamento direto ou lixiviação, deixando resíduos no ar, no solo e na água de rios, lagos ou águas subterrâneas (Figura 1.2 c).^{6,7} O processo também pode ocorrer pelo descarte de embalagens vazias, lavagem de equipamentos, etc. e, independente da forma de liberação para o ambiente, essas substâncias também podem ser inseridas na cadeia alimentar (Figura 1.2c).^{6,7}

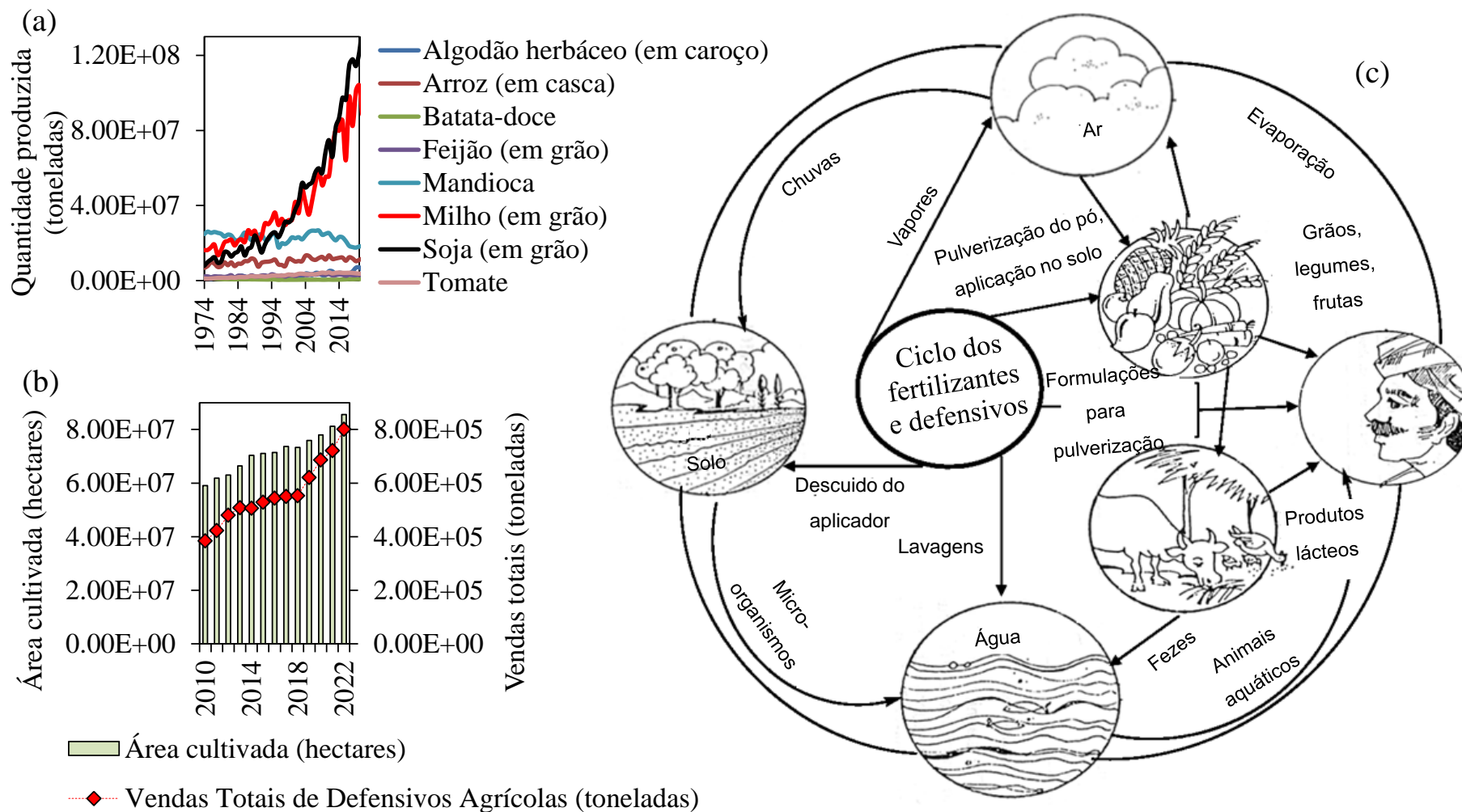


FIGURA 1.2. Produção mundial de commodities entre 1970 e 2022 (a) e venda de defensivos agrícolas entre os anos de 2010 e 2022 (b). Ciclo de defensivos agrícolas e fertilizantes no ambiente (c), adaptado de Kailasa et al., 2013⁷.

Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal.

Os resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgado em 2023⁸ atestaram que em mais de 3000 amostras, 25% dos alimentos brasileiros testados tinham resíduos de defensivos agrícolas acima do Limite Máximo de Resíduo Permitido (LMR) e, em algumas amostras, possuíam resíduos proibidos para determinada cultura. Mais alarmante ainda é se considerarmos que dentre os alimentos mais contaminados apresentados pelo relatório, alguns são consumidos *in natura* como alface, goiaba, manga, tomate e pimentão (Figura 1.3a).⁸

A ingestão destes alimentos contendo resíduos de defensivos agrícolas pode aumentar o risco do desenvolvimento de doenças crônicas, tornando-se um contraponto para o consumo de determinados alimentos.⁹ Por exemplo, o tomate é uma das espécies mais cultivada mundialmente pelo seu sabor característico, elevado teor de nutrientes, vitaminas e carotenoides, além de apresentar atividades antioxidantes, anti-inflamatórias^{10,11} e reduzir o risco de alguns tipos de câncer com ensaios *in vitro* em células tumorais.¹² No entanto, devido à sua vulnerabilidade à pragas e doenças, frequentemente recebe grandes quantidades de defensivos químicos e, ao mesmo tempo que fornece benefícios pode apresentar danos à saúde do consumidor.⁹

Além dos alimentos *in natura*, produtos alimentícios processados também podem apresentar resíduos de defensivos aplicados durante a produção agrícola. Uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (Idec) em 2021 identificou resíduos de defensivos agrícolas em mais de 50% dos alimentos ultraprocessados analisados (cereais matinais, derivados de soja, bolachas recheadas, biscoitos de água e sal, dentre outros).¹³

Outro ponto de destaque do sistema atual de cultivo, é que da parcela de alimentos que são diretamente direcionados para a população, a FAO já estimou que um terço (ou 1,3 bilhão de toneladas) dos alimentos produzidos para consumo humano é perdido ou desperdiçado globalmente. A perda dos

alimentos ocorre ao longo de toda a cadeia de abastecimento, desde a produção agrícola até o consumo final, impactando na segurança alimentar, na preservação dos alimentos, na saúde humana e em alterações ambientais em virtude dos rejeitos da produção (Figura 1.3b).² Este processo diminui a disponibilidade dos alimentos e também está relacionado à fome.

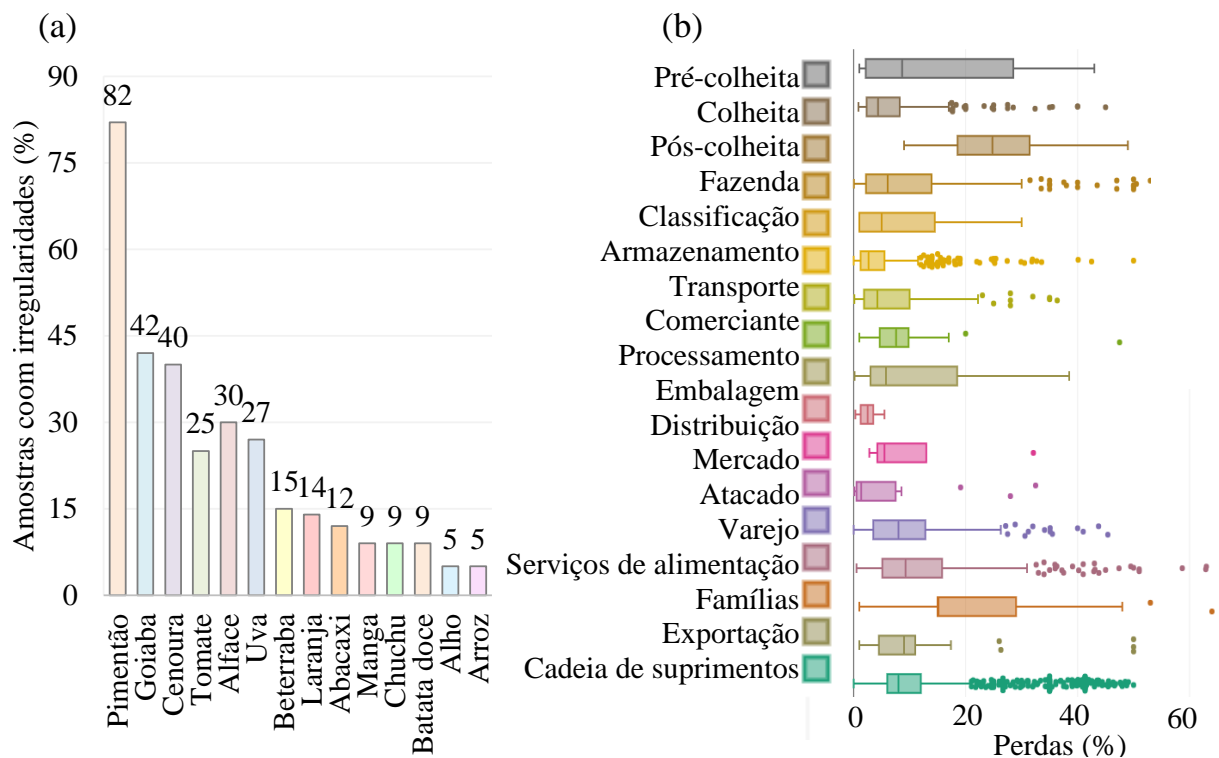


FIGURA 1.3. Porcentagem de alimentos brasileiros com resíduos de defensivos agrícolas acima do limite máximo permitido e/ou contendo substâncias proibidas (a) e porcentagem de perdas de alimentos em toda a cadeia produtiva (b) no ano de 2022.

Fonte: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA⁸ e FAOSTAT.

De acordo com o relatório sobre o Estado da Alimentação e da Agricultura (*The State of Food and Agriculture*, FAO, 2019)¹⁴, a maior perda de alimentos ocorre antes da colheita e cerca de 14% dos alimentos mundiais

continuam a ser perdidos após a colheita e antes da comercialização. Uma vez com os consumidores, mais de 17% dos nossos alimentos são desperdiçados.¹⁵

Estes dados tornam questionável a premissa de que é preciso apenas aumentar a produção mundial de alimentos e sua qualidade nutricional, e também indicam a necessidade de estratégias adequadas de armazenamento, transporte e manuseio na colheita e pós-colheita para a redução das perdas alimentares.

1.2 Como resolver a questão da produção dos alimentos?

Esta é uma questão de múltiplas possibilidades. Para este estudo, buscamos alternativas que minimizem as perdas na etapa da plantação e também reduzam os efeitos adversos das formas de cultivo agrícola atuais com a aplicação exhaustiva de fertilizantes e defensivos químicos.

Para além dos impactos ambientais, os padrões de cultivo agrícola atuais muitas vezes estão mais interessados no alto rendimento e baixo custo de produção sem avaliarem e estimularem as características nutricionais e funcionais dos alimentos. Estas características não precisam ser dissociadas, ou seja, as culturas podem ser desenvolvidas com maximização do rendimento e das propriedades nutricionais.^{6,16,17}

Para isso, os agricultores e governos precisam operar como gestores do campo, valorizando os seus próprios produtos (e subprodutos) e utilizando produtos agrícolas com melhor perfil ambiental. Além das estratégias de melhoria da qualidade do solo e diversificação do sistema de cultivo, a busca de novas tecnologias e abordagens para aumentar a produtividade das culturas e para melhorar a eficiência do uso dos recursos, por exemplo água e fertilizantes, é crucial para garantir a segurança alimentar, preservando ao mesmo tempo a qualidade do solo e proporcionando oportunidade de negócios para os agricultores.^{6,16,17}

Produtos de base biológica, como os bioestimulantes, representam uma tecnologia sustentável e eficiente ou um complemento aos seus produtos sintéticos (ou seja, defensivos agrícolas e fertilizantes) para melhorar a eficiência do uso de nutrientes e garantir a estabilidade do rendimento das culturas agrícolas.¹⁷

Um dos primeiros autores a abordarem a teoria dos bioestimulantes foi Filatov em 1933, para discutir a ação de produtos derivados de vegetais ou animais que apresentavam ação de estimulante biogênico.¹⁸ Posteriormente, Zhang e Schmidt (1997) denominaram estas moléculas como “materiais que, em quantidades ínfimas, promovem o crescimento das plantas”, embora os autores não tenham explicitamente escrito o termo “bioestimulante”. Apenas posteriormente o termo foi adotado por muitos pesquisadores e reguladores para indicar “substância(s) e/ou micro-organismo(s) cuja função é estimular os processos naturais que melhoram a absorção de nutrientes, a eficiência do uso de nutrientes, a tolerância ao estresse abiótico e a qualidade das culturas”.¹⁹

Do ponto de vista global, não existe um acordo regulatório que defina os bioestimulantes. Em 2019, a União Europeia propôs uma definição com base em quatro funções agrícolas. Estes seriam então “um produto que estimula os processos de nutrição das plantas, independentemente do teor de nutrientes do produto, com o único objetivo de melhorar pelo menos uma das seguintes características das plantas ou da sua rizosfera: (i) eficiência na utilização de nutrientes, (ii) tolerância ao estresse abiótico, (iii) características de qualidade e (iv) disponibilidade dos nutrientes no solo ou na rizosfera”, Tabela 1.1.²⁰

Mesmo com a definição do termo ainda em formação, é possível indicar que os bioestimulantes são compostos que desencadeiam processos fisiológicos e moleculares que modulam o rendimento e a qualidade das culturas, embora a sua função principal não seja fornecer nutrientes (como os fertilizantes) ou proteger as plantas contra pragas e patógenos transmitidos pelo

solo ou tecidos foliares (como os defensivos agrícolas).^{21,22} Estas moléculas podem auxiliar na germinação das sementes, melhorar o crescimento, o rendimento, a absorção de nutrientes, a qualidade pós-colheita e a resistência a estresses ambientais e, de maneira indireta, também podem auxiliar na resistência das plantas à pragas e micro-organismos.^{17,21-23}

Muitas substâncias naturais e derivados químicos de compostos naturais ou sintéticos, bem como micro-organismos benéficos, já estão catalogados como bioestimulantes vegetais, incluindo: (i) ácidos húmicos e fúlvicos, (ii) hidrolisados proteicos de origem vegetal ou animal, (iii) extratos de algas marinhas e vegetais, (iv) quitosona e outros biopolímeros, (v) compostos inorgânicos, (vi) fungos e bactérias benéficos como as Micorrizas Formadoras de Arbúsculos (FMA) e bactérias do gênero *Rhizobium* e *Azotobacter*²²⁻²⁴ como pode ser verificado na Tabela 1.1

TABELA 1. 1. Tipos de bioestimulantes e os efeitos observados em uma variedade de culturas alimentares.

Bioestimulante	Cultura	Efeitos observados
Ácidos húmicos e fúvicos	Damasco (<i>Prunus armeniaca</i> L.) ²⁵	Maior tolerância ao estresse salino.
	Pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.) ²⁶	Diminuição no tamanho do caule e número de folhas.
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) ²⁷	Aumento da atividade antioxidante. Aumento na absorção de N, P, K, Ca e Mg nas folhas.
Hidrolisados proteicos	Manga (<i>Mangifera indica</i>) ²⁸	Aumento na produtividade (quantidade de frutos).
	Milho (<i>Zea mays</i> L.) ²⁹	Aumento do teor de proteínas nos grãos (milho).
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) ³⁰	Aumento na absorção de N e P nas folhas.
Extrato de algas marinhas		Aumento na taxa de germinação.
		Aumento no crescimento de brotos e raízes.
	Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>) ³¹	Aumento no teor de clorofila.
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) ³²	Aumento na quantidade de frutos.
	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) ³³	Melhoria na qualidade dos frutos.
		Maior tolerância à salinidade, seca e estresse pelo frio.
		Indução de resistência à micro-organismos fitopatogênicos.
		Crescimento radicular.

Quitina e quitosona	Alface (<i>Lactuca sativa</i> L. var.) ³⁴	Aumento no crescimento e floração das plantas.
	Milho (<i>Zea mays</i> L.) ³⁵	Indução de resistência à micro-organismos fitopatogênicos.
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) ^{36,37}	Aumento na expressão de enzimas relacionadas à mecanismos de resistência.
		Aumento na disponibilidade de nutrientes (NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ e Ca) liberados como resultado da degradação da quitina.
Compostos inorgânicos	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) ³⁸	Aumento na produção de biomassa.
	Trigo-sarraceno (<i>Fagopyrum esculentum</i>) ³⁹	Aumento no número de frutos e na produtividade., Fortalecimento das paredes celulares.
		Aumento no acúmulo de compostos fenólicos e na ação antioxidante.
Fungos e bactérias	Abobrinha (<i>Cucurbita pepo</i> L.) ⁴⁰	Aumento na quantidade de frutos.
	Cebola (<i>Allium cepa</i> L.) ⁴⁰	Aumento na massa dos frutos.
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) ⁴¹	Aumento na concentração de <i>beta</i> -caroteno (tomates).

1.3 *E os compostos orgânicos voláteis, seriam uma alternativa?*

Um grupo de moléculas com ação bioestimulante são os compostos orgânicos voláteis (COVs), mesmo que na literatura científica estudos que avaliam a sua ação não necessariamente utilizem o termo “bioestimulante” para descrevê-los.

Os COVs derivados de plantas são produtos de natureza complexa e que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas nos sistemas vivos. Estas moléculas têm sido utilizadas por suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias nas indústrias alimentícia, cosmética e na saúde humana.^{42,43} Além disso, sua natureza biodegradável, sua volatilidade e persistência limitada sob condições de campo favorecem a sua aplicação como biopesticidas.

Na natureza, os óleos essenciais são COVs isolados das glândulas ou cavidades secretoras da parede celular vegetal e podem ser encontrados nas folhas, caule, cascas, raízes, flores, frutos e sementes. Suas características aromáticas desempenham várias funções para as plantas, incluindo (i) atração ou repulsão de insetos, (ii) proteção ao calor ou frio (estresses abióticos), (iii) utilização de constituintes químicos dos óleos essenciais como moléculas de defesa⁴³⁻⁴⁵ e (iv) comunicação com plantas vizinhas.⁴⁶

Alguns estudos propuseram que os COVs podem trazer benefícios para as plantas que crescem em ambientes desfavoráveis. Hara et al. (2013)⁴⁷, por exemplo, demonstraram que a aplicação exógena de isotiocianatos aumentou a tolerância ao calor de plantas de *Arabidopsis thaliana* mantidas sob condição de estresse térmico de 55°C por uma hora. Também utilizando plantas de *A. thaliana*, Yamauchi et al. (2015)⁴⁸ observaram que no tratamento das plantas com voláteis reativos de cadeia curta (2-hexanal e 2-heptanona, dentre outros), estas moléculas atuaram como indutores da expressão gênica relacionada a atenuação do estresse abiótico com tratamento oxidativo causado pela aplicação de 10 µM de metilviológeno.

Avaliando também a influência de óleos essenciais no crescimento e na habilidade em absorver nutrientes pelas plantas, Farouk et al. (2021)⁴⁹ observaram que a aplicação dos óleos essenciais de jasmim e lavanda em mudas de berinjela proporcionou um aumento no crescimento e produtividade da cultura, além da elevação nos níveis de ácido ascórbico e no conteúdo total de carotenoides. Na mesma linha de estudo, Souri e Bakhtiarizade (2019)⁴² demonstraram que a aplicação do óleo essencial de alecrim em mudas de tomate resultou em efeitos benéficos para a absorção de nutrientes e em um maior crescimento das plantas.

Chaouch et al. (2023)⁵⁰ concluíram que o óleo essencial de tomilho, além de oferecer efeito protetor contra o estresse oxidativo em plantas de tomate, estimula o crescimento das plantas (enraizamento das mudas e crescimento aéreo) e atenua as limitações induzidas pelo estresse com o aumento no teor de clorofila e no aumento da atividade de algumas enzimas com atividade antioxidante na planta. Entretanto, Chrysargyris et al. (2020) verificaram que a incorporação do óleo essencial de alecrim em formulações contendo outros princípios ativos, como os compostos do óleo essencial de eucalipto, pode ocasionar em redução no teor de nutrientes dos frutos de tomate e em uma maior fragilidade na casca dos frutos dependendo da concentração do princípio ativo e da frequência de aplicação das formulações.⁵¹

Dessa forma, observamos a aplicação de COVs como bioestimulantes vegetais tem recebido atenção considerável e estão sendo cada vez mais integrados na agricultura e nos sistemas de produção como reguladores e/ou promotores do crescimento e rendimento das plantas, bem como condicionadores pré-estresse. No entanto, a limitada investigação fundamental sobre os modos de ação de muitos produtos bioestimulantes está entre as lacunas de conhecimento que requerem atenção científica. Assim, há a necessidade de estudos que investiguem os aspectos fisiológicos, moleculares e nutricionais detalhados dos efeitos da aplicação de bioestimulantes (e sua concentração e

forma de aplicação) no crescimento das plantas e desenvolvimento dos frutos. Estes dados também demonstram que o desenvolvimento de alimentos nutritivos e funcionais produzidos em sistemas de cultivo que equilibrem produtividade, sustentabilidade e qualidade nutricional é alcançável.

1.4 Desafios para a pesquisa de moléculas bioestimulantes

Se seguirmos o mesmo caminho traçado para a aplicação de defensivos químicos e fertilizantes para o desenvolvimento de bioestimulantes, utilizaremos uma abordagem cíclica que consiste em (i) identificar um problema (surgimento de novas pragas, necessidade de nutrição do solo, dentre outros), (ii) desenvolver e aplicar um novo produto, (iii) identificar os efeitos não esperados com conseqüente surgimento de novos problemas e (iv) desenvolver produtos para sanar os novos problemas. Apesar de alguns bons resultados terem sido alcançados ao longo dos anos, não podemos desconsiderar os custos associados a esta abordagem.⁶

Uma medida que pode ser introduzida para mitigar possíveis efeitos adversos de novos produtos para a aplicação agrícola seria a elucidação do modo de ação nos níveis celular e molecular, levando a uma exploração e aplicação eficaz de formulações bioestimulantes na agricultura.¹⁸ Para isto, também precisamos conhecer os resultados das aplicações de bioestimulantes em função da dose utilizada, do modo de aplicação, do momento ideal da aplicação e a caracterização da composição das biomoléculas e/ou microrganismos presentes nos produtos bioestimulantes.^{18,24}

Os mecanismos de ação destas substâncias nas plantas podem ocorrer de maneira direta e indireta. Como ilustramos na Figura 1.4, uma vez que as moléculas bioestimulantes penetram nos tecidos celulares, elas podem ser translocadas e transformadas nas plantas. Para que a sua introdução seja eficiente nos tecidos foliares, os principais requisitos são uma boa solubilidade em água (ou outro solvente adequado que não comprometa a integridade das

plantas) e uma penetração suficiente do componente ativo na estrutura interna da planta.^{18,52}

Uma vez absorvidos pelo material vegetal, as moléculas bioestimulantes podem funcionar como osmólitos, reguladores de transporte celular, moléculas sinalizadoras, moduladores da abertura estomática, dentre outros. Assim, estas moléculas podem modular toda a diversidade de processos bioquímicos desenvolvidos pelas plantas para responder a tensões bióticas e abióticas.^{23,53} Por isso, os bioestimulantes geram efeitos que podem ir desde a indução na biossíntese de metabólitos secundários auxiliando as plantas na taxa fotossintética e na ação antioxidante, a alterações morfológicas, como o aumento da superfície e morfologia radicular que facilitam a absorção de água e nutrientes (Figura 1.4).^{22,23} Todos estes processos podem interferir na expressão gênica, sinalização vegetal e regulação do estado hormonal, alterando processos metabólicos com efeitos integrados em toda a planta.^{18,53}

Além dos efeitos nos tecidos vegetais mencionados, a aplicação dos bioestimulantes também pode alterar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo que, por sua vez, influencia no crescimento das plantas.²² Por exemplo, extratos de algas marinhas podem auxiliar na capacidade de retenção de umidade do solo, favorecendo o crescimento de micro-organismos benéficos.⁵⁴ Juntamente à microbiota do solo, precisamos considerar o fato das plantas serem hospedeiras de numerosos micro-organismos simbiotes suscetíveis à ação dos bioestimulantes. As associações das plantas e micro-organismos, tanto fora quanto dentro de seus tecidos, também permitem-lhes responder e se adaptar às condições de estresse.⁵⁵

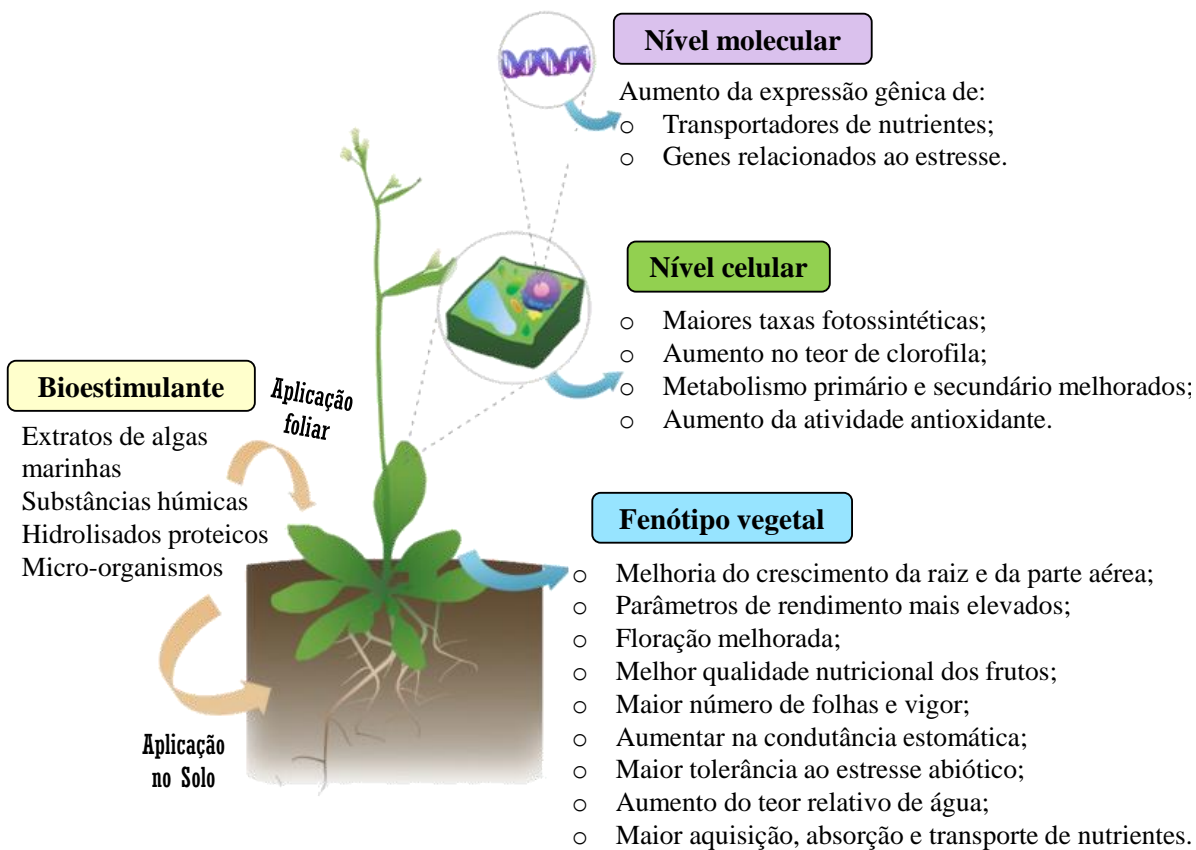


FIGURA 1.4. Exemplos de bioestimulantes e de alterações no fenótipo e em nível celular e molecular que podem ocorrer após a aplicação dos bioestimulantes nas folhas ou no solo.

Adaptado: Baltazar et al. (2021).²⁴

Embora conheçamos alguns dos mecanismos de ação e os benefícios relacionados ao uso dos bioestimulantes, grande parte dos processos ocasionados nas plantas ainda são pouco elucidados.⁵⁶ No entanto, a compreensão do modo de ação por meio do qual os bioestimulantes exercem a sua atividade pode fornecer informações úteis para definir melhor o(s) alvo(s) em termos de culturas, práticas agrícolas e calendário de aplicação.^{18,56}

Com esta premissa, podemos apontar que atender à demanda acima mencionada é um desafio. Isto se deve, principalmente, a dois motivos: (i) a complexidade dos processos bioquímicos vegetais, alguns deles ainda não totalmente elucidados e (ii) a variabilidade na resposta genotípica e o papel

fundamental da modelagem exercido pelo ambiente e pelas práticas agronômicas.^{18,53,56}

Várias abordagens podem ser usadas para esclarecer as variações bioquímicas ocasionadas por fatores externos, como o uso de bioestimulantes nas culturas. Entre elas, as abordagens não direcionadas têm sido recomendadas porque não requerem hipóteses *a priori*, sendo assim receptivas a cenários complexos.²² As ciências ômicas (por exemplo, genômica, proteômica e metabolômica) referem-se ao perfil de genes, proteínas e metabólitos em um sistema biológico e enquadram-se em abordagens não direcionadas. Dentre as diferentes ciências ômicas, a metabolômica é a que mais se aproxima do genótipo e tem sido eficientemente proposta para investigar o modo de ação de bioestimulantes vegetais.^{17,56}

A metabolômica é classicamente definida como uma medição abrangente e holística de todo o complemento de moléculas de pequeno peso molecular, ou seja, metabólitos com tamanho ≤ 1500 Da, dentro de um sistema biológico.⁵⁷ Consequentemente, as informações detalhadas dos tecidos foliares pode revelar os padrões refletidos na impressão digital metabolômica do sistema vegetal em estudo. A aplicação desta ciência ômica multidisciplinar no campo dos bioestimulantes vegetais geraria, assim, conhecimento integrado que poderia auxiliar a esclarecer os modos e mecanismos de ação dos bioestimulantes nos níveis celular e molecular.⁵³

Estas informações associadas aos avanços recentes em equipamentos analíticos, como espectrometria de massas de alta resolução em que é possível detectar e identificar uma variedade de moléculas para análises sensíveis e seletivas, impulsionaram a adoção da metabolômica nas ciências agrícolas.⁵³ A combinação de espectrometria de massas com gasosa e líquida é uma das principais plataformas analíticas para determinar o perfil abrangente do metaboloma vegetal⁵⁸, associadas também com a disponibilidade de bancos de

dados e gerenciamento de dados (incluindo análise estatística multivariada e ferramentas de bioinformática para a interpretação dos dados).^{53,58}

Utilizando a separação cromatográfica e a identificação por espectrometria de massas, Sorrentino et al. (2022) por exemplo revelaram alguns dos *insights* mecanicistas que descrevem as interações entre os bioestimulantes e as plantas em cultivares de tomate e alface.⁵⁹ Este estudo demonstrou que ambos os cultivares apresentaram melhoria no crescimento e no desempenho fotossintético com modulações na biossíntese de compostos nitrogenados (principalmente alcaloides), fenilpropanóides e terpenos após a aplicação de hidrolisados proteicos e a submissão das plantas a condições de estresse salino. Entretanto, as plantas de alface demonstraram os efeitos fenotípicos já nas etapas iniciais do estudo e apresentaram uma redução das moléculas conjugadas de auxina. Esses dados seriam um indicativo de que as plantas estariam empenhadas em manter o *pool* de auxina em sua forma livre e assim permitir o crescimento da planta. Por outro lado, as plantas de tomate apresentaram melhoria mais evidente no desempenho fotossintético com maior tolerância ao estresse salino, afetando também os metabólitos relacionados ao estresse sintetizados na via do chiquimato.

Seguindo esta linha de estudo, Lucini et al. (2018) verificaram que a aplicação de bioestimulante à base de biopolímeros de origem vegetal em plantas de melão favoreceram o enraizamento e o crescimento aéreo dos cultivares. A análise metabolômica apontou uma maior indução na biossíntese de brassinosteroides, hormônios vegetais responsáveis pelo crescimento das plantas e que também estimulam a produção de metabólitos envolvidos nos mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos, como flavonoides, carotenoides e glucosinolatos.⁶⁰ Além disso, estas pesquisas demonstraram que os estudos metabolômicos podem fornecer conhecimentos fundamentais e a compreensão necessária para explorar novas estratégias baseadas em

bioestimulantes para melhorar a saúde e a resiliência das culturas mantidas em condições ambientais adversas.

Estudando plantas de tomate, Paul et al. (2019) verificaram que quando tratadas com hidrolisados proteicos, as plantas que eram mantidas em condições limitadas de água, também apresentaram uma maior indução de brassinosteroides quando comparadas com plantas controle (sem tratamento com bioestimulantes). Como relatado anteriormente, os brassinosteroides além de auxiliarem no crescimento das plantas, estão envolvidos na resistência ao estresse hídrico e no fechamento estomático induzido pelo estresse osmótico, bem como na mediação da formação de espécies reativas de oxigênio e na sinalização do jasmonato.⁶¹

Por fim, ao estudar a aplicação do bioestimulante Actium[®] (bioestimulante comercial contendo formulação lipocomplexa composta principalmente por polissacarídeos, polipeptídeos e vitaminas (40%), aminoácidos (2%) e óxido de potássio (5%)), em plantas de pimenta, Barrajon-Catalana et al. (2020) verificaram que os teores de flavonoides e capsianosídeos diminuíram com o amadurecimento das folhas, mas os ácidos orgânicos, monossacarídeos e carotenoides aumentaram nos frutos. Ou seja, o bioestimulante favoreceu a biossíntese de metabólitos relacionados à maturação e a coloração dos frutos da pimenta.⁶²

Apesar do potencial uso dos compostos orgânicos voláteis como bioestimulantes, não localizamos dados que indiquem os mecanismos metabólicos da atuação destas moléculas em cultivares de interesse alimentar.

2 Objetivos e visão geral



O objetivo principal com o desenvolvimento deste estudo foi avaliar se os óleos essenciais podem apresentar efeito bioestimulante e, em caso positivo, analisar quais seriam as possíveis consequências da sua aplicação no metaboloma de diferentes cultivares de tomate. No presente trabalho propusemos a utilização dos óleos essenciais de alecrim e erva-cidreira oriundos de processos de arraste a vapor, e também a utilização do óleo essencial de laranja obtido por prensagem a frio. O óleo essencial de alecrim já tem sido estudado como bioestimulante para cultivares de tomate sendo usado como referência para comparar suas respostas biológicas com as apresentadas pelos óleos de erva-cidreira e laranja. As plantas de tomate foram investigadas por nós

como planta modelo para o desenvolvimento de bioestimulantes sustentáveis, pois esta é uma das frutas mais consumida mundialmente e que tem sido extensivamente estudada para compreender as culturas agrícolas em que há a produção de frutos carnosos. Dessa forma, com este trabalho propomos um estudo sistemático de bioestimulantes contendo óleos essenciais, desde o desenvolvimento das formulações até o estudo da sua interação com as plantas.

Os objetivos específicos foram:

- Melhorar a dispersão em meio aquoso e a biodisponibilidade de óleos essenciais desenvolvendo suspensões coloidais;
- Desenvolver e validar métodos de extração e quantificação dos óleos essenciais por *headspace* e análise em cromatógrafo a gás;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas, morfológicas e de liberação controlada das suspensões coloidais;
- Desenvolver e validar métodos analíticos (extração, pré-tratamento e instrumentação) para caracterizar a composição química de folhas de tomate e identificar biomarcadores da ação bioestimulante por cromatografia de alta resolução e cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massas;
- Investigar as alterações no perfil químico de folhas de plantas de tomate após a aplicação das formulações contendo os óleos essenciais no solo das plantas;
- Aplicar ferramentas estatísticas para comparar as variações bioquímicas envolvidas com a aplicação das formulações de óleos essenciais nas plantas de tomate.

Para a apresentação dos resultados, os dados foram separados em três seções (Figura 2.1) seguindo a ordem dos objetivos específicos da tese para destacar o progresso desta investigação. A primeira seção descreve o preparo e a caracterização das suspensões coloidais contendo os óleos essenciais. Nessa

seção definimos o biopolímero e as condições ideais para a obtenção das suspensões coloidais.

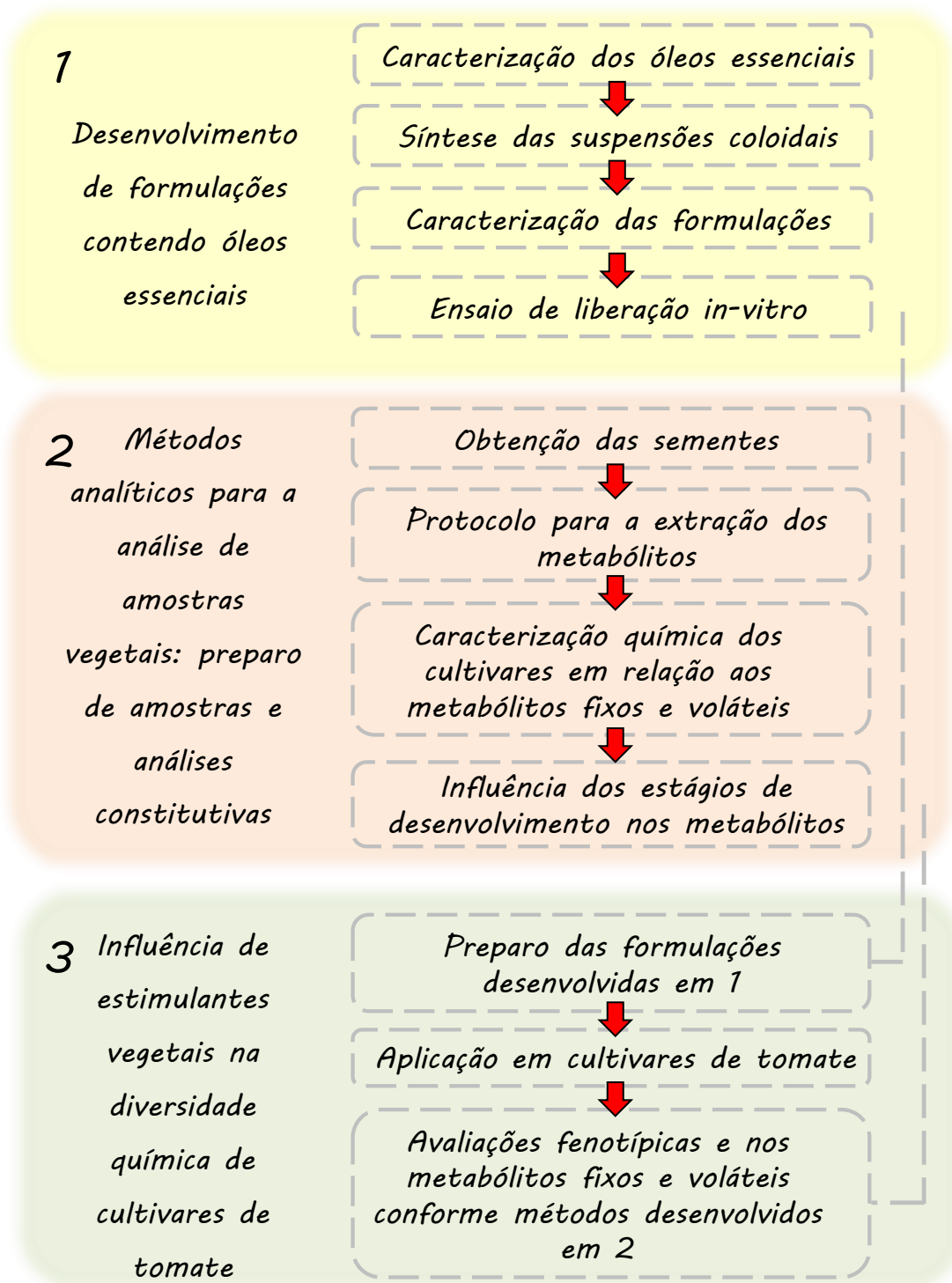



FIGURA 2. 1. Fluxograma descrevendo as etapas realizadas.

Na segunda seção, avaliamos os métodos de extração dos metabólitos fixos e voláteis presentes nas folhas de tomate. Esses métodos foram

importantes na última etapa desta pesquisa em que ocorreu a aplicação das suspensões coloidais nas plantas. Ainda na segunda seção, após o desenvolvimento dos métodos, as metodologias foram aplicadas para avaliarmos a variação no metaboloma de dois cultivares de tomate (comercial e Planta de Introdução) ao longo de três etapas de desenvolvimento das plantas. Finalmente, na terceira seção apresentamos a aplicação das suspensões coloidais em plantas de tomate (*Solanum pimpinellifolium* e *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). Nessa etapa descrevemos um estudo dos efeitos das suspensões coloidais no crescimento vegetal dos cultivares de tomate avaliando além das variações fenotípicas, as alterações no metaboloma foliar.

3 *Desenvolvimento de formulações contendo óleos essenciais*



3.1 *Introdução*

A utilização dos óleos essenciais na agricultura é muito interessante para a defesa das plantas à ação de insetos e micro-organismos fitopatogênicos⁶³ e para o controle de ervas daninhas.⁶⁴ Os efeitos dos óleos essenciais estão relacionados à sua complexa mistura de compostos orgânicos voláteis, como os terpenos e fenilpropanoides que também podem atuar em sinergia.^{63,65-67}

Embora muitos estudos tenham sido apresentados relatando os efeitos bioativos dos óleos essenciais e seus constituintes para a proteção das plantas, não podemos desconsiderar que estes estudos ocorrem em condições de laboratório.⁶³ Este fator, associado a (i) baixa persistência destas moléculas no

ambiente (degradação, biodegradação, volatilidade), que pode reduzir a sua eficácia, diminuir o tempo de ação e/ou levar a necessidade de aplicação de maiores concentrações em comparação aos produtos fixos e/ou sintéticos⁶⁷, (ii) sua natureza lipofílica que dificulta a sua distribuição em condições de campo⁶⁸ e (iii) sua fitotoxicidade que pode ocasionar severa dessecação das plantas e dificultar a sua aplicação direta nas lavouras,^{69,70} podem ser alguns dos motivos para que o uso comercial destas moléculas na agricultura seja modesto.⁷¹

Apesar da elevada biodegradabilidade dos óleos essenciais no ambiente dificultar a sua incorporação em produtos comerciais, esta característica pode ser interessante por reduzir a possibilidade de resíduos no ambiente.⁷¹ Além disso, seu curto tempo residual na folhagem e nos frutos das plantas e a sua relativa segurança para os seres humanos permite que sua aplicação seja realizada pouco antes da colheita para minimizar a contaminação residual e a permanência de pragas.⁶³

Pensando nisto, uma medida para aumentar a eficácia e a persistência destas moléculas, seria a utilização de tecnologias de encapsulamento em sistemas coloidais que protejam os constituintes do óleo essencial, permitindo ao mesmo tempo a sua liberação lenta no ambiente, a redução na necessidade de utilização de maiores concentrações e /ou reaplicações, a diminuição dos seus efeitos adversos nos tecidos vegetais e permitindo uma maior dispersibilidade e/ou solubilidade em água.^{67,71}

O encapsulamento é o processo no qual uma ou mais moléculas bioativas (denominadas de materiais revestidos, material de núcleo ou fase interna) são carregadas em uma matriz homogênea ou heterogênea (denominada de invólucro, material de parede ou material transportador) em micro (1–5000 μm) ou nano (< 1 μm) escala.⁷²

No processo de encapsulamento, a viabilidade comercial dos materiais de parede desempenha um papel importante na sua seleção.⁷³ Entre os materiais de parede utilizados, o amido, polímero composto por unidades de

amilose e amilopectina (Figura 3.1),⁷⁴ é um dos candidatos mais promissores. Este polímero é muito utilizado devido ao seu baixo custo, não toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e por ser um material amplamente disponível, comumente encontrado em plantas e grãos de cereais.^{73,75}

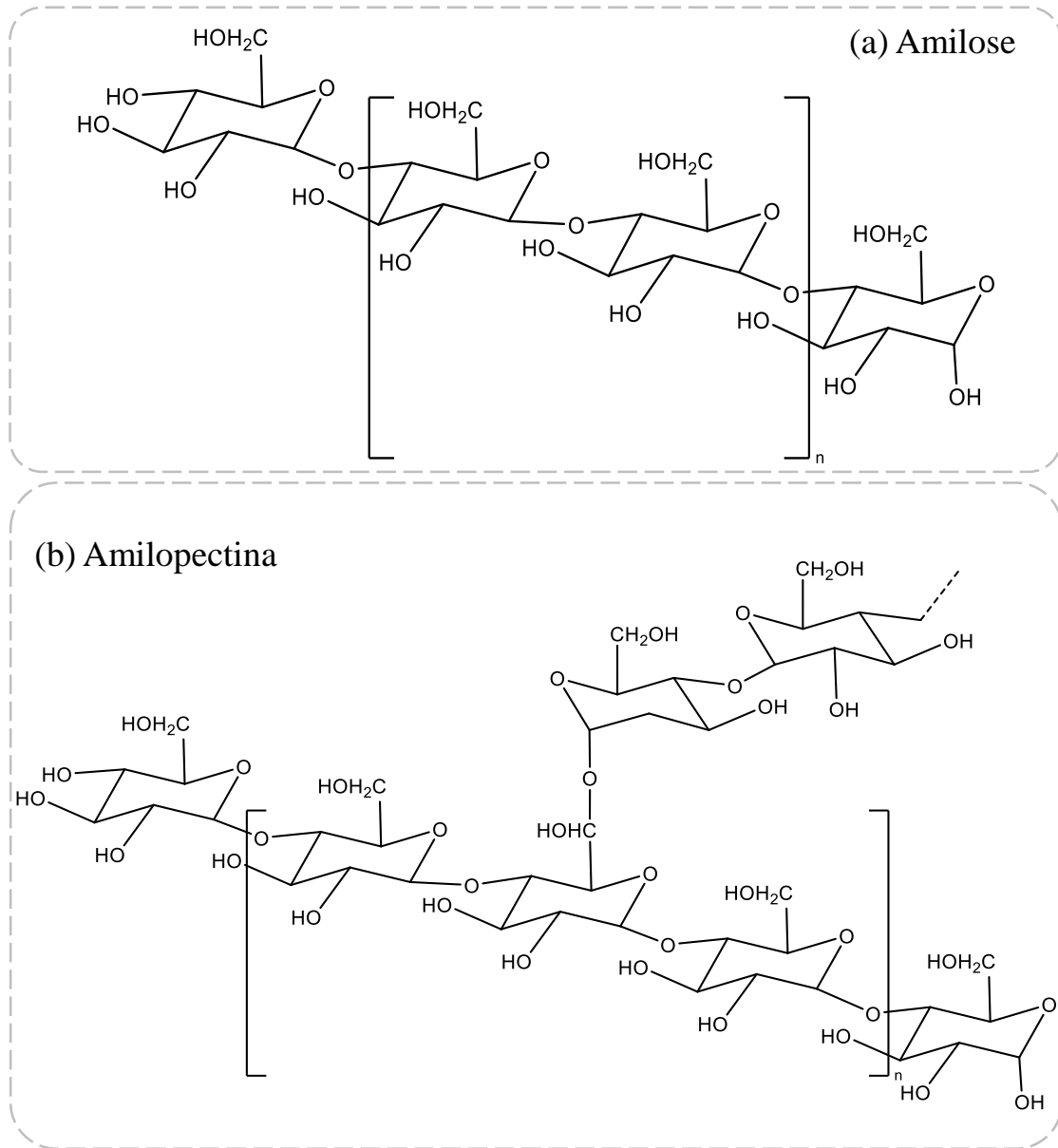


FIGURA 3.1. Estrutura química do amido. Amilose (a) e amilopectina (b).

Como verificamos na Figura 3.1, a amilopectina é uma molécula altamente ramificada que é constituída por moléculas de glicose unidas em ligações α -1,4, o que torna esta fração do amido mais resistente à penetração de

água. Por outro lado, a amilose trata-se de uma estrutura mais simples que a amilopectina por ser majoritariamente linear. As moléculas de amilose tendem a enrolar-se de forma rígida formando uma única hélice ou podem ainda formar zonas de junção de duplas hélices paralelas ainda mais rígidas, mas que permitem a penetração da água entre as suas camadas formando filmes.⁷⁶

Uma questão interessante é se o amido pode ser um biomaterial eficiente para proteger os óleos essenciais. Afinal, a principal desvantagem deste material é que os grânulos de amido nativo se hidratam pouco em água fria, possuindo assim propriedades pobres para formar emulsões em comparação com outras matérias, o que não o torna adequado para adsorver na interface de água e óleo⁷⁴ e, assim, estabilizar uma emulsão que é uma etapa intermediária para a formação de sistemas de encapsulamento de óleos essenciais.^{75,76} No entanto, o amido pode ser modificado para obter propriedades personalizadas para aplicações específicas, de modo que possam ser obtidas emulsões mais estáveis.⁷⁵

Outro ponto importante para o processo de encapsulamento, é a seleção dos surfactantes. Estas moléculas, que auxiliarão a manter a estabilidade dos sistemas pela diminuição da tensão interfacial, também devem ser quimicamente estáveis e de baixa toxicidade.⁷⁷ Dentre os surfactantes conhecidos, os ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano (polissorbitatos), também conhecidos como Tween[®]'s, são surfactantes não iônicos biocompatíveis comumente utilizados na indústria em aplicações biotecnológicas.⁷⁷ Em sistemas contendo óleo essencial e água, devido a sua natureza dupla hidrofóbica e hidrofílica, os polissorbitatos em solução tendem a orientar-se de modo que a exposição da porção hidrofóbica do surfactante à solução aquosa seja minimizada.⁷⁸ Além da estabilização de sistemas, os surfactantes também interferem no tamanho das partículas e nas propriedades mecânicas de emulsões contendo óleos essenciais.^{79,80}

Considerando todos os fatos discutidos acima, na primeira etapa deste estudo, avaliamos estratégias para encapsular os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja utilizando amido de mandioca nativo e modificado como biopolímero e o polissorbato[®] 80 como surfactante.

Há relatos na literatura científica que indicam o potencial do óleo essencial de alecrim para ser utilizado como bioestimulante vegetal como mencionamos anteriormente nos estudos de Souri e Bakhtiarizade (2019)⁴² e Chrysargyris et al. (2020)⁵¹. Por isso, ele foi selecionado para este estudo como um composto bioestimulante de referência. O óleo essencial de laranja foi selecionado por ser um coproduto da indústria de processamento de frutas apresentando um baixo custo para a sua obtenção, uma vez que pode ser extraído dos resíduos de citros.⁸¹ Além disso, o Brasil é responsável por mais de 70% da produção mundial de suco de laranja, apresentando portanto um elevado volume anual de resíduos de citros.⁸¹ Por fim, utilizamos o óleo essencial de erva-cidreira pois sua planta de origem (*Lippia alba*) é uma das mais utilizadas na medicina popular brasileira para a melhoria de sintomas respiratórios e estomacais.⁸² Além disso, apresenta ação antimicrobiana e efeitos sedativos⁸² e grande parte destes efeitos têm sido atribuídos à seus constituintes voláteis.⁸³

Para a escolha da estratégia de encapsulamento com resultados favoráveis a aplicações futuras como bioestimulantes vegetais, avaliamos metodologias para o encapsulamento, extração por *headspace* e quantificação por cromatografia gasosa. Os produtos obtidos nas melhores condições foram, posteriormente, submetidos a caracterizações microestruturais e físico-químicas.

3.2 *Materiais e métodos*

3.2.1 *Reagentes*

Soluções padrão estoque de cânfora (Arora Produtos Químicos, São Marcos, Brasil), bisabolol, linalol e limoneno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram preparadas em acetona na concentração de 500 mg mL⁻¹ e armazenadas à

temperatura de 4°C. Posteriormente, soluções padrão de trabalho na concentração de 15 mg mL⁻¹ em acetona foram preparadas para a cânfora, linalol e limoneno. O mesmo procedimento foi empregado para o preparo da solução de bisabolol a 500 mg L⁻¹ que foi utilizado como padrão interno.

Como solventes, utilizamos acetona (grau HPLC) obtida da Honeywell (Carolina do Norte, EUA) e água deionizada. Amido de mandioca nativo e modificado quimicamente de grau alimentício, ambos extraídos de raízes de mandioca utilizados como materiais encapsulantes, foram fornecidos pela Horizonte Amidos (Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil). Monooleato de polioxietileno sorbitano[®]80 – Tween[®]80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) também foi utilizado nas formulações como surfactante.

Como adjuvantes utilizamos a lignina extraída de eucalipto (Suzano, São Paulo, Brasil) e resíduos de casca de banana e polpa e casca de pequi obtidos do comércio local de São Carlos-SP e Montes Claros-MG, respectivamente. Os resíduos foram secos a 40°C em estufa de fluxo contínuo de ar circulante (Technal, São Paulo, Brasil) por dois dias. Uma vez secos, as amostras foram trituradas em moinho analítico IKA A11 Basic (Baden-Württemberg, Alemanha) e peneiradas a fim de obter tamanhos de partículas uniformes, menores do que 32 *mesh*. Posteriormente as amostras foram acondicionadas em recipiente de vidro ao abrigo de luz, umidade e calor.

3.2.2 Amostras de óleos essenciais

Os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e erva-cidreira (*Lippia alba*) obtidos por destilação por araste à vapor das folhas foram fornecidos pela Destilaria Bauru (São Paulo, Brasil) e Leggé Aromas (São Paulo, Brasil), respectivamente. O óleo essencial de alecrim apresentava densidade a 25°C de 0,903 g mL⁻¹ e índice de refração a 20°C de 1,468. O óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*), um coproduto do processo de obtenção de sucos, foi obtido pela prensagem a frio da casca de laranja e foi fornecido pela

Agroterenas (São Paulo, Brasil). O material apresentava as seguintes especificações: densidade a 25°C: 0,8442 g mL⁻¹, índice de refração a 20°C: 1,473; aldeídos: 1,25%.

3.2.3 Caracterização das matrizes

Inicialmente realizamos uma análise da composição de voláteis das amostras de óleo essencial de alecrim, erva-cidreira e laranja por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os compostos voláteis foram analisados em cromatógrafo a gás da Shimadzu (CG 2010 Plus) acoplado ao espectrômetro de massas sequencial (EM TQ8030), com coluna capilar Rtx-5MS (Restek), fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm de espessura do filme) e Hélio 5.0 como gás de arraste (1,500 mL min⁻¹).

As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor 180°C; a temperatura da coluna inicialmente a 40°C foi mantida por 1 min, posteriormente foi aquecida a uma taxa de 8°C min⁻¹ até 270°C, permanecendo nesta temperatura por 1 min. A temperatura de transferência da interface e da fonte de íons foram de 280°C e 70 eV foram utilizados para a ionização. A injeção realizada foi do tipo *split* (50:1). O volume de amostra introduzido foi de 1 µL. O analisador de massas quadrupolo foi operado com varredura na faixa de 50 a 700 Da. A identificação dos compostos voláteis foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca (NIST 17.0), com aqueles descritos por Adams (1995)⁸⁴ e por comparação com o índice de retenção proposto por Van den Dool e Kratz.⁸⁴

Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos pela análise de uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C7 a C40) aplicando-se a equação 3.1, conforme se observa a seguir.

$$IR = 100n + 100[(T_R(i) - T_R(n))/(T_R(n+1) - T_R(n))] \quad (\text{Equação 3.1})$$

Em que T_R representa o tempo de retenção, (i) o analito, (n) o número de carbonos do alcano adjacente menos retido e ($n+1$) o número de carbonos do alcano adjacente mais retido.

3.2.4 *Determinação de macro e micronutrientes nos biopolímeros e adjuvantes*

Estas análises foram realizadas em colaboração com o laboratório SG Soluções Científicas Ltda., São Carlos-SP. Resumidamente, para a determinação dos nutrientes de importância para o desenvolvimento vegetal: B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, S e Zn, as amostras foram digeridas por micro-ondas utilizando bloco digestor e mistura ácida de HNO_3 e H_2O_2 ; posteriormente, foram analisadas por ICP-OES (acrônimo do inglês para Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado). O cloro, na forma de cloreto, também foi determinado por ICP-OES após precipitação com prata. O nitrogênio total foi extraído pelo método Kjeldahl⁸⁵ e determinado por Titimetria.

3.2.5 *Sínteses das suspensões coloidais*

Testes preliminares para a seleção da matriz biopolimérica que seria utilizada para o encapsulamento dos óleos essenciais foram realizados.

Assim, as suspensões coloidais foram preparadas adicionando quantidades conhecidas dos biopolímeros em 60 mL de água deionizada em Erlenmeyer (125 mL). O sistema foi mantido sob agitação magnética (1200 rpm) e aquecimento à $90\pm 5^\circ\text{C}$ utilizando chapa de aquecimento com agitação magnética (IKA RT 10, Baden-Württemberg, Alemanha) por 60 min para promover a gelatinização dos grânulos de amido.⁸⁶ Este sistema foi denominado de A. Após a completa solubilização do biopolímero, o sistema foi mantido sob agitação à 600 rpm e sem aquecimento até atingir a temperatura de 30°C . Uma ilustração do sistema obtido e das etapas pode ser observada na Figura 3.2. A

quantidade de material utilizado para a obtenção da emulsão foi avaliada conforme Tabela 3.1.

Paralelamente, em um Erlenmeyer (50 mL) massas conhecidas de Tween[®]80 foram emulsionadas em 4000 μ L de água e 1000 μ L de uma mistura contendo os óleos essenciais de laranja, alecrim e erva-cidreira nas proporções de 1:1:1 ($m\ m^{-1}$) com agitação magnética de 1200 rpm e aquecimento à $30 \pm 5^\circ\text{C}$ por 5 min na mesma chapa de aquecimento com agitação magnética. Este sistema foi denominado de B (Figura 3.2, segunda etapa).

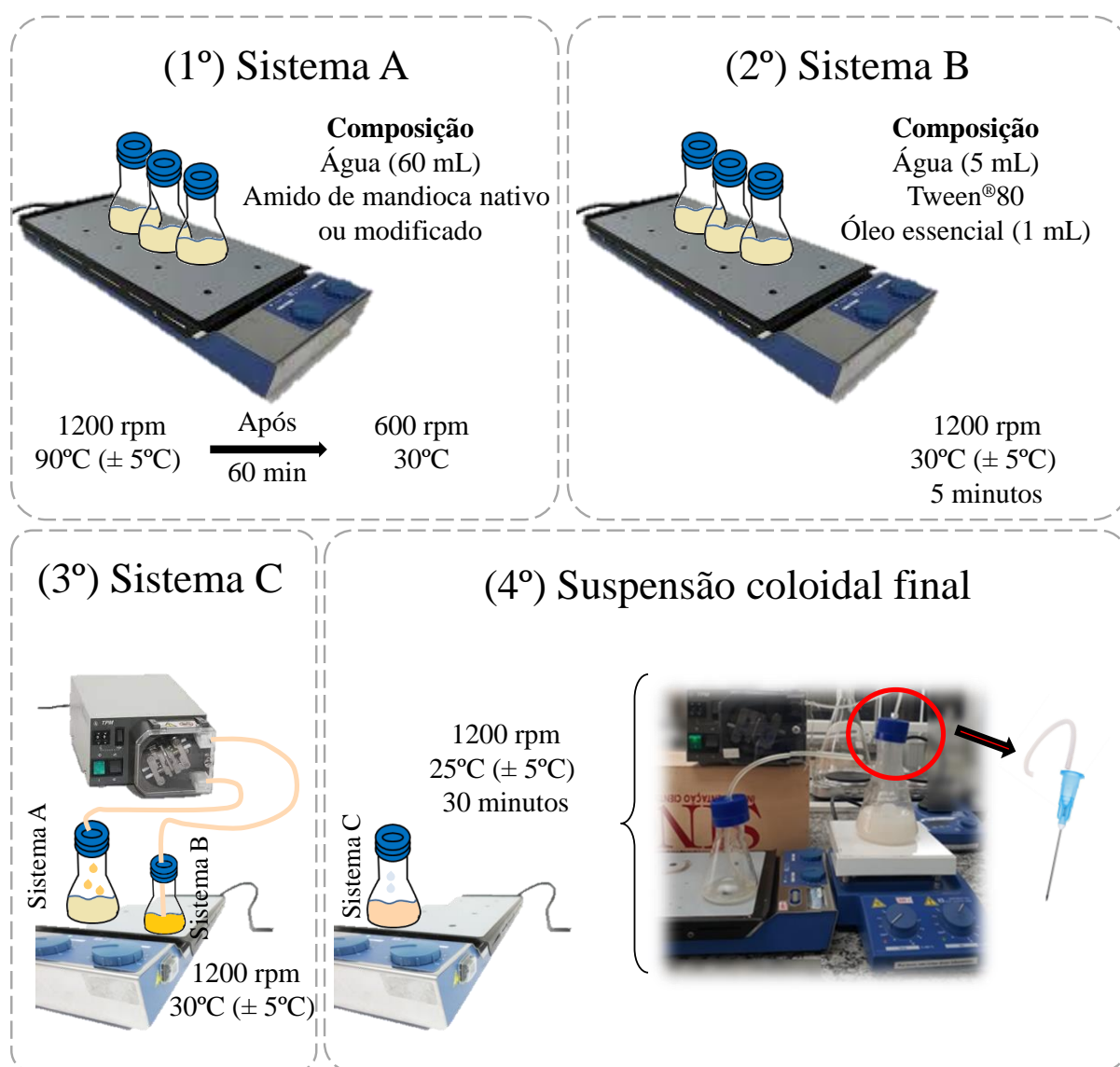


FIGURA 3.2. Ilustração representando as etapas para a síntese das suspensões coloidais contendo os óleos essenciais.

A emulsão resultante (sistema B) foi transferida gota a gota para o sistema A com o auxílio de uma bomba peristáltica e agulha hipodérmica BD (0,60 mm × 25 mm e 23G 1), para reduzir o diâmetro das partículas resultantes (veja a terceira etapa na Figura 3.2). Após a completa transferência, a suspensão coloidal resultante foi mantida sob agitação sem aquecimento por 30 min à 1200 rpm e posteriormente armazenada em temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$).

TABELA 3.1. Níveis codificados das variáveis independentes empregadas na obtenção das suspensões coloidais contendo os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
A Concentração do biopolímero (g)	0,180	0,810	1,80
B Surfactante (Tween [®] 80) (mg)	0	300	600

*Volume final de trabalho de 65 mL.

Uma otimização multivariada foi utilizada para determinar as variáveis que mais influenciaram o processo de encapsulamento dos óleos essenciais. Para isso, foi empregado o Planejamento Fatorial com duas variáveis independentes (2^2) e quatro experimentos no ponto central, totalizando oito experimentos. As variáveis avaliadas com alto e baixo incremento foram a concentração do biopolímero (A) e do surfactante (B) (Tabela 3.1) que foram selecionadas a partir de estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa e trabalhos publicados na literatura científica.^{87,88}

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória a fim de minimizar o efeito da variabilidade inesperada nas respostas observadas devido aos erros sistemáticos.⁸⁹ Como resposta (variável dependente) nós consideramos a recuperação dos óleos essenciais. Para isso, realizamos a quantificação dos marcadores selecionados para cada óleo essencial, sendo eles a cânfora, o linalol

e o limoneno as moléculas selecionadas após a caracterização química para o óleo essencial de alecrim, erva-cidreira e laranja, respectivamente.

3.2.5.1 *Recuperação dos óleos essenciais após o processo de encapsulamento*

A quantidade total dos óleos essenciais nos produtos encapsulados foi avaliada pela quantificação do teor de limoneno, cânfora e linalol presente nas formulações após a solubilização de 100 μL da suspensão coloidal em 100 μL de acetona e homogeneização em vórtex IKA MS 3 Digital (Baden-Württemberg, Alemanha) por 60 s. Posteriormente, para cada experimento, 10 μL da emulsão resultante foram adicionados a um frasco de *headspace* de 10 mL juntamente com 10 μL de solução de bisabolol (concentração final de 0,5 mg L^{-1}) utilizada como padrão interno.

As amostras foram submetidas à extração por *headspace* no modo estático em um sistema PALSyr HS 2.5 mL (Combi-PAL). Para isso, o *vial* contendo a emulsão e o padrão interno foi mantido sob agitação à 500 rpm e aquecimento à 75°C por 15 min. Posteriormente, 600 μL da fase gasosa foi injetada e analisada por Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização em Chama (CG-DIC). Uma representação do sistema de extração e de separação pode ser observado na Figura 3.3.

A recuperação (% $w w^{-1}$) foi obtida comparando a concentração do óleo nas suspensões coloidais com a quantidade de óleo essencial utilizada para o preparo de cada emulsão usando os dados de uma curva analítica obtida pela análise de soluções padrão em concentrações variando de $5,00 \times 10^{-2}$ a 5,00 mg L^{-1} . A recuperação (% $w w^{-1}$) foi calculada usando a equação 3.2.

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_{OE}/C_{OE0}) \times 100 \quad (\text{Equação 3.2})$$

Em que C_{OE0} é a concentração do óleo essencial utilizada para o preparo das emulsões e C_{OE} é a concentração do óleo essencial obtida após o preparo das emulsões.

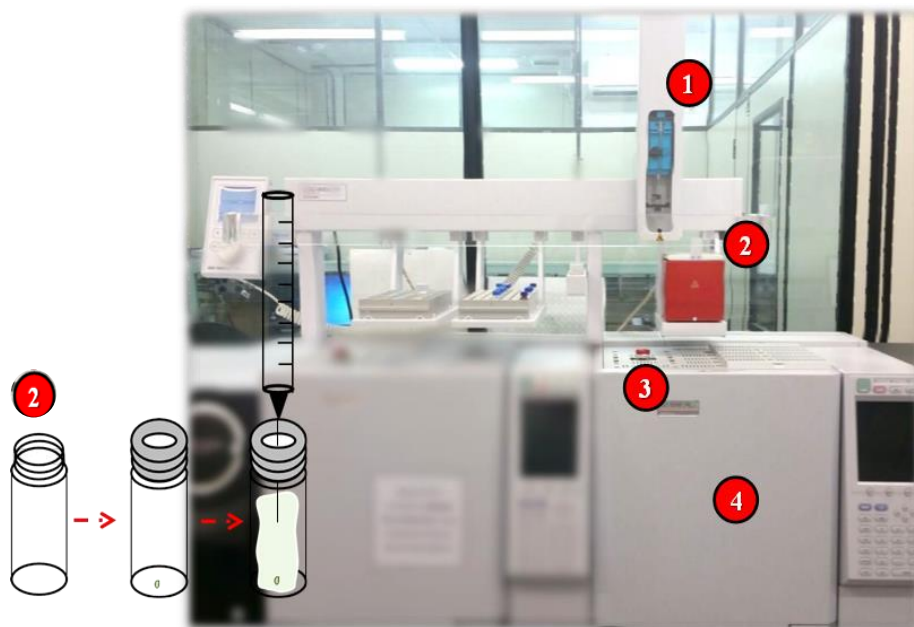


FIGURA 3.3. Representação do sistema de *headspace* estático (1) autoamostrador, (2) forno e processo de evaporação e equilíbrio que ocorre dentro do *vial*, (3) injetor e (4) compartimento para a coluna cromatográfica.

3.2.5.2 Separação por cromatografia gasosa

As suspensões coloidais foram analisadas em cromatógrafo a gás Shimadzu (CG 2010 Plus), acoplado a um detector de ionização em chama (CG-DIC). Utilizou-se coluna capilar NA-WAX (Analítica, fase estacionária de polietilenoglicol, 30 m \times 0,25 mm d.i. \times 0,25 μ m espessura do filme). Hélio 5.0 (99,999%) foi utilizado como gás de arraste (2,80 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi de 40°C por 1 min, aumentada de 10°C min⁻¹ até 240°C e mantida por 1 min; a temperatura do injetor era de 250°C. O volume da amostra introduzido foi de 600 μ L no modo de injeção com divisão de fluxo, *split* (30:1) utilizando um injetor Combi PAL 5000. Ar sintético (200 mL min⁻¹), hidrogênio (30 mL min⁻¹) e nitrogênio (30 mL min⁻¹) foram utilizados para o DIC.

3.2.6 Qualificação analítica

A seletividade, linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) são os parâmetros que foram utilizados para avaliar os métodos analíticos para a quantificação da cânfora, limoneno e linalol.

A linearidade foi avaliada preparando-se soluções padrão mista nas concentrações crescentes da cânfora, limoneno e linalol (100, 250, 500, 750, 1000, 2500 e 5000 mg L⁻¹) preparadas em extrato da matriz (suspensão coloidal sem a adição dos óleos essenciais diluído em acetona na proporção de 1:1 v v⁻¹). Para as análises cromatográficas, adicionou-se 10 µL da solução padrão em vial de *headspace* de 10 mL e, assim, as concentrações finais de cada solução padrão foram de 100, 250, 500, 750, 1000, 2500 e 5000 µg L⁻¹, utilizando bisabolol como padrão interno (500 mg L⁻¹) e preparados no extrato da matriz. Após a análise dessas soluções, foi construído um gráfico relacionando a razão entre a área dos analitos e a do padrão interno à sua respectiva concentração de calibração. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2) calculado pela regressão linear.

A seletividade foi observada avaliando-se os cromatogramas das suspensões coloidais preparadas sem a adição dos analitos em comparação com os cromatogramas da solução padrão contendo limoneno, linalol e cânfora preparada pela fortificação do extrato da matriz da formulação controle (preparado sem a adição dos óleos essenciais).

O LOD e LOQ para a cânfora, limoneno e linalol foram determinados diluindo sucessivamente a solução estoque e pelos parâmetros da curva analítica, usando as seguintes equações:

$$\text{LOD} = (3,3\delta)/S \quad (\text{Equação 3.3})$$

$$\text{LOQ} = (10\delta)/S \quad (\text{Equação 3.4})$$

Em que δ é o desvio padrão dos controles calculados pela análise do ruído de três amostras e S é a inclinação da curva de calibração.

3.2.7 Caracterizações das suspensões coloidais

3.2.7.1 Avaliação da viscosidade

Para a determinação da viscosidade, as amostras foram analisadas em viscosímetro rotacional digital MVD-5 Marte (Minas Gerais, Brasil) utilizando Spindle L0 e L4 e agitação de 60 rpm. A viscosidade foi analisada na faixa de 1 a 100.000 (mPa.s).

3.2.7.2 Características microestruturais

Para a análise por microscopia óptica, 50 μL da suspensão coloidal foram transferidos para o centro de lâminas para microscopia (26 \times 76 mm) e misturados com 25 μL de solução de Lugol contendo 0,3% (m v^{-1}) de iodo em 1,5% (m v^{-1}) de iodeto de potássio. Em seguida, o centro da lâmina foi recoberto com lamínula (22 \times 22 mm). As lâminas foram analisadas em microscópio ótico Leica DM500 (Washington, D.C., EUA) com Câmera Digital para microscópio ICC50 HD. Utilizamos ampliações de 5 a 40 \times .

A morfologia da superfície das partículas presentes na suspensão coloidal também foi visualizada usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram fixadas a uma fita adesiva de carbono dupla face montada em *stubs* de MEV com diâmetro de 12 mm (Koch, São Paulo, Brasil) e, em seguida, revestidas com uma fina camada de ouro a vácuo. As imagens foram ampliadas de 200 a 50.000 \times em um microscópio FEF XL-30 Philips (Amsterdã, Holanda) operando a 25 kV.

3.2.7.3 Análises termogravimétricas

A estabilidade térmica dos óleos essenciais nas suspensões coloidais foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA, do inglês Thermo Gravimetric Analysis) em um equipamento Shimadzu TG-DTA 50 H (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) para quantificar a perda de massa. Foram utilizados 10 mg da amostra e um cadinho de alumina a uma taxa de aquecimento de 10°C

min⁻¹ variando de 40 a 800°C sob atmosfera inerte, utilizando N₂ (5.0) com uma vazão de 50 mL min⁻¹. Os dados do TGA e sua primeira derivada foram processados pelo *software* Origin 9.0. Estas análises foram realizadas em colaboração com o Laboratório AFINKO Soluções em Polímeros Ltda. (São Carlos, SP).

3.2.7.4 *Estudos de liberação em solo*

Para esta etapa, as suspensões coloidais que apresentaram os maiores valores para a recuperação dos óleos essenciais foram preparadas de acordo com as condições do planejamento experimental. Estas suspensões coloidais foram preparadas para cada óleo essencial individualmente, mas também preparamos uma suspensão coloidal contendo uma mistura do óleo essencial de alecrim, erva-cidreira e laranja na proporção de 1:1:1. Como um comparativo para avaliarmos a influência do encapsulamento, também utilizamos emulsões contendo água, polissorbato[®]80 e os óleos essenciais sem a adição dos adjuvantes ou biopolímero. Para isto, utilizamos as mesmas proporções de água, óleo essencial e polissorbato[®]80 que foram determinadas após o planejamento fatorial.

As amostras de solo foram obtidas pela mistura de terra vegetal (composta por turfa, serragem de madeira e bagaço de cana), areia e húmus de minhoca na proporção de 3:1:1. Esta mesma proporção foi utilizada no cultivo de plantas de tomate, nas etapas posteriores. O solo preparado foi utilizado para preencher sacos de cultivo de 1 L. Três réplicas de solo foram preparadas para cada experimento.

Para avaliarmos a liberação dos ativos, após a rega do solo até atingir uma umidade de 60% (medida com medidor de umidade do solo digital, PHD-3000, SVE Super), 1000 µL das suspensões coloidais (ou óleos emulsionados em polissorbato[®]80) foram aplicados no centro dos sacos de cultivo com uma distância de 1 cm da superfície do solo utilizando pipetas

plásticas de 3 mL (Figura 3.4). Os sacos de mudas foram acondicionados em incubadora para B.O.D. (Nova Ética, São Paulo, Brasil) mantida à $40 \pm 2^\circ\text{C}$.

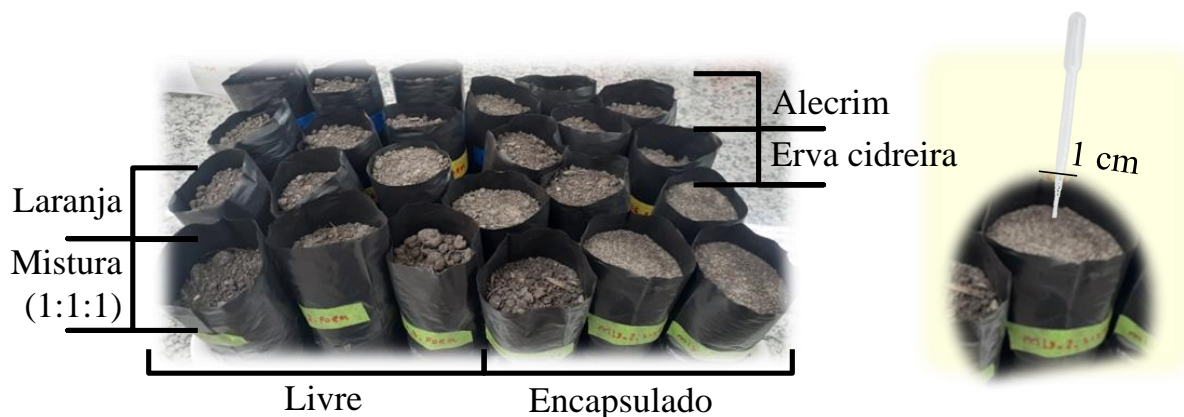


FIGURA 3.4. Ilustração esquemática de como foram realizados os experimentos para avaliar a liberação dos óleos essenciais emulsionados em água (livre) e em suspensão coloidal (encapsulado).

Após 0, 2, 4 e 6 h da aplicação, as amostragens foram realizadas com uma espátula em cinco diferentes posições do solo e considerando uma profundidade de 1 cm. A liberação dos ativos nos quatro pontos foi determinada por HS-CG-DIC. A amostra (100 mg) foi transferida para *vial* de *headspace* (10 mL) junto a 10 μL de solução padrão de bisabolol (padrão interno, concentração final de $500 \mu\text{g L}^{-1}$). O *vial* fechado foi submetido à extração por *headspace* por 15 min e temperatura de 75°C e análise por CG-DIC. A concentração dos ativos foi determinada usando a curva de calibração descritas na sessão 3.2.6 *Qualificação Analítica* e utilizando a Equação 3.5. Ao avaliar o mecanismo de liberação *in vitro* dos ativos microencapsulados, determinamos os coeficientes referentes aos modelos cinéticos de zero e primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (Equações 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9).

$$\text{Liberação dos ativos (\%)} = ([\text{Ativo}]_{\text{headspace}}/[\text{Ativo}]_{\text{formulação}})100 \quad (\text{Equação 3.5})$$

$$\text{Ordem zero} = Q_t = Q_0 - k_0t \quad (\text{Equação 3.6})$$

Em que Q_t é a quantidade do ativo liberada no tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial do ativo e k_0 é a constante de liberação de ordem zero.

$$\text{Primeira ordem} = \ln Q_t = \ln Q_0 - k_1 t \quad (\text{Equação 3.7})$$

Em que Q_t é a quantidade do ativo liberado no tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial do ativo e k_1 o constante de liberação de primeira ordem.

$$\text{Higuchi} = Q_t/Q_\infty = k\sqrt{t} \quad (\text{Equação 3.8})$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas} = Q_t/Q_\infty = kt^n \quad (\text{Equação 3.9})$$

Em que Q_t/Q_∞ é a quantidade liberada do ativo ao longo do tempo t ; k é uma constante que incorpora as características geométricas da formulação e n é o expoente da liberação, indicativo do mecanismo de liberação do ativo conforme apresentado: para $n \leq 0,43$, $0,43 > n > 0,85$, ou $n \geq 0,85$, temos difusão Fickiana, transporte anômalo ou não-Fickiano (difusão e inchaço ocorrem simultaneamente), ou transporte caso II (ordem zero) como dominante mecanismo de liberação, respectivamente.

3.2.8 Análises estatísticas

Os diferentes valores de recuperação obtidos por meio dos métodos de otimização da obtenção das formulações contendo os óleos essenciais foram avaliados por análise de variância (ANOVA), teste F (5% de probabilidade) e determinação de coeficientes de regressão. Estas análises foram realizadas com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre as variáveis estudadas nas condições de otimização da obtenção das suspensões coloidais. Para essas análises foram utilizadas as rotinas computacionais propostas por Pereira e Pereira-Filho (2018) e o *software* Octave 4.4 (2018).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Caracterização dos óleos essenciais

A caracterização dos óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja foi realizada por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM). Os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 3.4. Os tipos de compostos voláteis, assim como o tempo de retenção e a área correspondente a cada composto estão apresentados na Tabela 3.2.

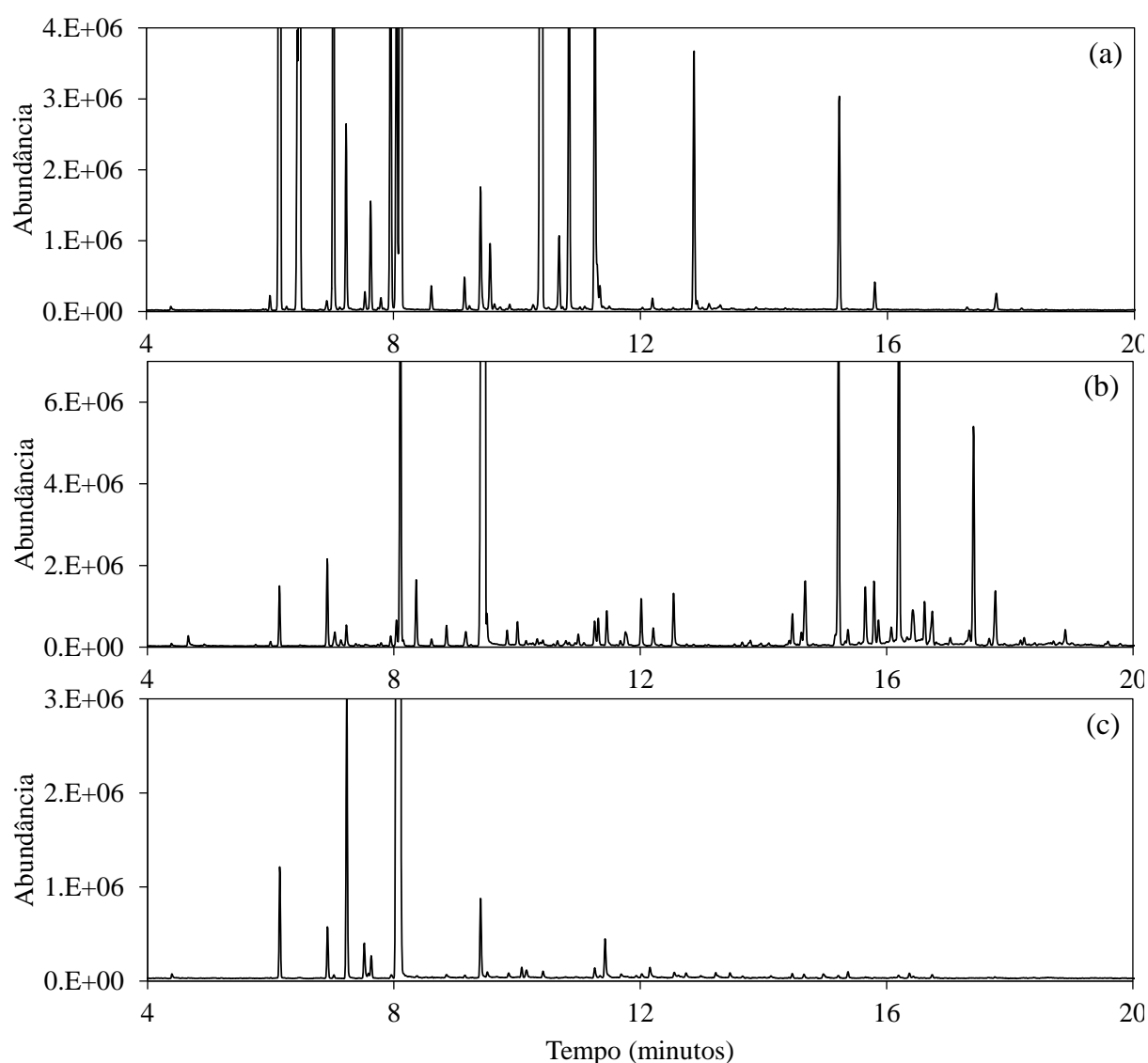


FIGURA 3.5. Cromatogramas de íons totais dos compostos voláteis dos óleos essenciais de alecrim (a), erva-cidreira (b) e laranja (c).

TABELA 3.2. Áreas relativas dos compostos voláteis do óleo essencial de alecrim, erva-cidreira e laranja.

Composto	t _R (min.)	I.R.	I.R. _{Ref}	Área relativa			[M ⁺]	Principais Fragmentos m/z (%) ¹
				Alecrim	Erva-cidreira	Laranja		
1 <i>cis</i> -3-hexen-1-ol	4,66	854	850	<i>nd</i>	0,15	<i>nd</i>	100	82(48), 67(100), 55(49)
2 1-hexanol	4,92	868	863	<i>nd</i>	0,019	<i>nd</i>	102	69(34), 56(100)
3 2-metilpropil isobutirato	5,76	914	-	<i>nd</i>	0,015	<i>nd</i>	144	89(24), 71(100), 56(42)
4 <i>alfa</i> -tujona	5,99	914	924	0,085	0,053	<i>nd</i>	136	93(100), 91(69), 77(44)
5 <i>alfa</i> -pineno	6,15	934	932	21,16	0,663	0,604	136	121 (17), 105(16), 93(100), 91(72)
6 canfeno	6,47	950	946	9,525	0,007	<i>nd</i>	136	121(55), 107(26), 93(100), 77(24)
7 sabineno	6,92	973	969	0,064	1,019	0,296	136	121(6), 93(100), 77(41), 69(13)
8 <i>beta</i> -pineno	7,03	979	974	4,934	<i>nd</i>	0,019	136	121(12), 107(6), 93(100), 79(25)
9 <i>beta</i> -mirceno	7,23	989	988	1,056	0,262	1,626	136	121(5), 93(100), 69(72)
10 3-octanol	7,38	997	988	<i>nd</i>	0,023	<i>nd</i>	130	101(17), 83(62), 59(100)
11 2-careno	7,44	1000	1001	<i>nd</i>	0,01	<i>nd</i>	136	121(66), 93(100), 79(37)
12 octanal	7,52	1004	998	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0,207	128	84(63), 56(100)
13 <i>trans</i> -3-hexen-1-ol, acetate	7,54	1005	-	<i>nd</i>	0,014	<i>nd</i>	142	82(61), 67(100)
14 3-careno	7,63	1009	1008	0,655	<i>nd</i>	0,116	136	121(20), 105(14), 93(100), 79(35)
15 isopentil 2-metilpropanoato	7,74	1015	-	<i>nd</i>	0,017	<i>nd</i>	158	101(6), 88(8), 71(100), 55(23)
16 (+)-4-careno	7,79	1018	-	0,065	<i>nd</i>	<i>nd</i>	136	121(87), 105(24), 93(100), 77(33)
17 <i>para</i> -cimeno	7,95	1026	1020	3,063	0,118	0,026	134	119(100), 117(20), 91(34), 77(7)
18 limoneno	8,04	1030	1024	2,636	0,259	95,51	136	121(24), 93(81), 79(43), 68(100)
19 eucaliptol	8,11	1034	1026	20,98	5,309	<i>nd</i>	154	139(52), 108(68), 93(63), 81(100)
20 <i>trans-beta</i> -ocimeno	8,15	1036	1032	<i>nd</i>	0,013	<i>nd</i>	136	121(8), 105(16) 93(100), 79(40)
21 <i>cis-beta</i> -ocimeno	8,36	1047	1044	<i>nd</i>	0,801	<i>nd</i>	136	121(14), 93(100), 79(48)

22	<i>gama</i> -terpineno	8,61	1059	1054	0,148	0,089	<i>nd</i>	136	121(25), 105(12), 93 (100), 77(38)
23	<i>cis</i> -linalol oxido	8,86	1072	1067	<i>nd</i>	0,266	<i>nd</i>	170	155(5), 111(40), 94(53), 59(100)
24	isoterpinoleno	9,15	1087	-	0,202	<i>nd</i>	<i>nd</i>	136	121(75), 105(29), 93(100), 79(44)
25	fenchona	9,23	1091	1083	0,021	<i>nd</i>	<i>nd</i>	152	137(2), 109(6), 81(100), 69(44)
26	linalol	9,47	1103	1095	0,811	63,9	0,483	154	121(22), 93(88), 71(100), 55(65)
27	hotrienol	9,51	1105	-	<i>nd</i>	0,27	<i>nd</i>	152	82(60), 71(100), 67(38)
28	nonanal	9,52	1106	1100	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0,035	142	98 (28), 70(41), 57(100)
29	(+)- <i>cis</i> -verbenol	9,64	1112	1137	0,033	<i>nd</i>	<i>nd</i>	152	119(32), 109(54), 91(100), 67(60)
30	cosmeno	10,00	1131	-	<i>nd</i>	0,286	<i>nd</i>	134	119(79), 91(100), 77(32)
31	cânfora	10,40	1152	1141	23,47	<i>nd</i>	<i>nd</i>	152	108(49), 95(100), 81(67), 69(35)
32	citronelal	10,42	1153	1148	<i>nd</i>	0,036	0,041	154	121(35), 95(67), 69(100)
33	isoneral	10,59	1162	-	<i>nd</i>	0,012	<i>nd</i>	152	119(23), 109(73), 94(77), 67(100)
34	pinocarvona	10,66	1166	1160	<i>nd</i>	0,058	<i>nd</i>	150	135(37), 108(74), 81(100), 53(97)
35	isoborneol	10,68	1167	1155	0,488	<i>nd</i>	<i>nd</i>	154	121 (14), 110(15), 95(100), 67(17)
36	<i>beta</i> -terpineol	10,79	1172	1159	0,009	0,056	<i>nd</i>	154	136(50), 121(39), 93(65), 71(100),
37	borneol	10,85	1176	1165	2,881	<i>nd</i>	<i>nd</i>	154	110(16), 95(100), 67(12)
38	4-terpineol	10,99	1183	-	<i>nd</i>	0,123	<i>nd</i>	154	136(16), 111(41), 93(57), 71(100)
39	dihidrocarvona	11,02	1185	1191	0,011	<i>nd</i>	<i>nd</i>	152	137(5), 110(27), 95(100)
40	<i>para</i> -cimene-8-ol	11,09	1188	-	0,017	<i>nd</i>	<i>nd</i>	150	135(100), 91(28), 65(14)
41	<i>alfa</i> -terpineol	11,26	1197	1140	3,042	0,352	0,064	154	136(39), 121(51), 93(73), 59(100)
42	<i>gama</i> -terpineol	11,34	1202	1054	0,133	<i>nd</i>	<i>nd</i>	154	136(50), 121(100), 93(83), 79(32)
43	decanal	11,43	1207	1201	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0,268	156	128(4), 82(50), 57(100)
44	verbenona	11,49	1210	1204	0,017	<i>nd</i>	<i>nd</i>	150	135(65), 107(100), 91(69), 80(60)
45	<i>cis</i> -geraniol	11,76	1225	1249	<i>nd</i>	0,276	<i>nd</i>	154	121(8), 93(26), 69(100)

46	<i>cis</i> -citral	12,02	1239	-	<i>nd</i>	0,608	0,028	152	119(13), 109(28), 94(30), 69(100)
47	carvona	12,16	1247	1239	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0,078	150	135(5), 82(100), 54(49)
48	bergamol	12,19	1249	-	0,07	<i>nd</i>	<i>nd</i>	196	121(21), 93(100), 80(35)
49	<i>trans</i> -geraniol	12,21	1250	1249	<i>nd</i>	0,243	<i>nd</i>	154	123(10), 93(21), 69(100)
50	(+)-mirtenil acetato	13,53	1325	-	<i>nd</i>	0,018	<i>nd</i>	194	119(33), 91(100), 79(13)
51	<i>alfa</i> -cubebeno	13,96	1350	1345	<i>nd</i>	0,042	<i>nd</i>	204	161(75), 119(75), 105(100)
52	<i>cis</i> -geranil acetate	14,09	1358	-	<i>nd</i>	0,027	<i>nd</i>	196	121(21), 93(60), 69(100)
53	ciclosativeno	14,37	1374	1369	<i>nd</i>	0,01	<i>nd</i>	204	161(74), 119(75), 105(100), 91(59)
54	copaeno	14,47	1380	1374	<i>nd</i>	0,379	0,026	204	161(82), 119(94), 105(100)
55	<i>beta</i> -bourboneno	14,62	1389	1387	<i>nd</i>	0,182	<i>nd</i>	204	161(22), 123(62), 105(19), 81(100)
56	<i>beta</i> -elemeno	14,68	1392	-	<i>nd</i>	1,054	<i>nd</i>	204	189(15), 161(88), 105(84), 93(100)
57	dodecanal	14,97	1410	1408	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0,027	184	95(43), 82(60), 57(100)
58	<i>beta</i> -cariofileno	15,22	1426	1417	1,431	4,915	<i>nd</i>	204	189(14), 133(80), 93(100), 79(78)
59	<i>gama</i> -elemeno	15,33	1433	-	<i>nd</i>	4,915	<i>nd</i>	204	189(11), 161(29), 121(100), 93(84)
60	<i>alfa</i> -cariofileno	15,34	1434	-	0,011	0,834	<i>nd</i>	204	147(18), 121(24), 93(100), 80(33)
61	<i>beta-trans</i> -fameseno	15,65	1453	-	<i>nd</i>	0,798	<i>nd</i>	204	161(12), 133(28), 93(54), 69(100)
62	aloaromadendreno	15,87	1467	-	<i>nd</i>	0,299	<i>nd</i>	204	161(62), 133(64), 105(91), 91(100)
63	<i>gama</i> -muuroleno	16,08	1480	1478	<i>nd</i>	0,206	<i>nd</i>	204	161(100), 119(62), 105(69)
64	germacrene D	16,20	1487	1484	<i>nd</i>	6,054	0,015	204	161(100), 119(51), 105(82), 91(62)
65	<i>trans</i> -nerolidol	17,34	1562	1561	<i>nd</i>	0,134	<i>nd</i>	222	161(16), 121(20), 93(71), 69(100)
66	óxido de cariofileno	17,76	1589	-	0,13	<i>nd</i>	<i>nd</i>	220	149(17), 121(32), 91(86), 79(100)
67	Não identificados	-	-	-	2,813	8,967	0,526		

t_R = Tempo de retenção; *nd* = não detectado; *I.R.* = índice de retenção; *I.R.Ref* = índice de retenção apresentado por Adams (1995).

Pelos cromatogramas apresentados na Figura 3.4 para os óleos essenciais, conseguimos observar que eles apresentaram uma composição química bem diversa entre si. Na Tabela 3.2 esta observação é confirmada.

Verificamos que o óleo essencial de alecrim possuiu como composto majoritário a cânfora (23,47% da área relativa total), seguida do *alfa*-pineno (21,16% da área relativa total) e do eucaliptol (20,98% da área relativa total). Melito et al. (2019)⁹⁰ indicaram que a composição majoritária deste óleo essencial geralmente varia entre as porcentagens de 1,8-cineol, cariofileno, cânfora, *alfa*-pineno e borneol, o que difere um pouco dos compostos majoritários destacados em nossa amostra. Este fato pode ser justificado pelo fato de que a porcentagem destas moléculas pode variar de acordo com a estação em que as folhas de alecrim foram colhidas (perfil sazonal). Em 2022, Rathore et al.⁹¹ demonstraram, por exemplo, que uma maior porcentagem de *alfa*-pineno e cânfora como as detectadas em nossas amostras, podem indicar que as folhas de alecrim foram coletadas durante o outono.

As moléculas de verbenona, cânfora e eucaliptol podem ser correlacionadas com as notas sensoriais cítricas (cheiro fresco e leve), verde (nota botânica típica com odor fresco) e fresca (odor limpo, refrescante e novo) das folhas de alecrim.⁹² Além disso, a verbenona é um feromônio de insetos, que desempenha um papel importante no controle de besouros apresentando também propriedades repelentes.⁹³

A erva-cidreira apresentou o linalol como composto majoritário (63,90% da área relativa total), seguido do eucaliptol com 5,31% da área relativa total. Este resultado difere dos apresentados por Nonato et al. (2022)⁹⁴ em que o composto majoritário foi o geraniol. Estes dados demonstram mais uma vez que a composição química dos óleos essenciais pode ser influenciada por fatores abióticos, como sazonalidade, disponibilidade hídrica, exposição à luz, temperatura, estágio de desenvolvimento e estado nutricional da planta, bem como por fatores genéticos.

Verificamos também que o óleo essencial de erva-cidreira, assim como o de alecrim apresentou a molécula de *alfa*-tujona (Tabela 3.2), uma cetona monoterpênica que apresenta toxicidade, efeitos repelentes e dissuasores em insetos.⁹⁵

Na Tabela 3.2 também apresentamos a composição química do óleo essencial de laranja. O óleo essencial apresentou o limoneno como composto majoritário, apresentado 95,51% da área relativa total. O limoneno além de apresentar atividade repelente pode ser associado ao aumento no metabolismo de moléculas bioativas quando aplicado em frutos após a colheita.^{93,95}

Observamos também que os óleos essenciais de erva-cidreira e laranja possuíam em sua composição a molécula de germacreno D (Tabelas 4 e 5). Esta molécula pertence a classe dos hidrocarbonetos orgânicos voláteis que são produzidos em várias espécies de plantas por suas propriedades antimicrobianas e inseticidas. Além disso, também atua como feromônio de insetos.⁹³

Uma vez que conhecemos a composição química dos óleos essenciais selecionamos as moléculas que serão utilizadas como marcadores para avaliarmos a eficiência do preparo das suspensões coloidais nas etapas futuras. Para o óleo essencial de alecrim, erva-cidreira e laranja, as moléculas marcadoras selecionadas foram a cânfora, o linalol e o limoneno, respectivamente.

3.3.2 Avaliação dos biopolímeros para o encapsulamento dos óleos essenciais

Em busca da metodologia para o encapsulamento dos óleos essenciais, nós preparamos uma mistura contendo os três óleos na proporção de 1:1:1. Embora trabalhar com a mistura torne a nossa amostra mais complexa e possa suprimir respostas individuais das moléculas presentes, planejar o experimento baseado na mistura dos óleos diminui a quantidade de

experimentos sendo também de nosso interesse para avaliar o efeito bioestimulante sinérgico nas plantas de tomate. Na Tabela 3.3 apresentamos os experimentos propostos pelo planejamento experimental e as respostas correspondentes obtidas utilizando amido de mandioca nativo e modificado para o encapsulamento dos óleos essenciais.

TABELA 3.3. Representação da matriz do planejamento fatorial com os níveis codificados e as respostas obtidas em função da recuperação de limoneno, linalol, cânfora utilizando amido de mandioca nativo e modificado.

Variáveis			Recuperação (%)					
			Amido nativo			Amido modificado		
			A	B	Limoneno	Cânfora	Linalol	Limoneno
1	+1 (1,80)	+1 (600)	49,0	13,6	34,4	64,5	16,8	44,5
2	-1 (0,180)	+1 (600)	35,1	11,0	27,0	62,1	12,8	30,5
3	+1 (1,80)	-1 (0)	15,0	7,10	12,3	16,6	8,90	14,8
4	-1 (0,180)	-1(0)	7,60	6,10	8,70	10,3	8,10	15,3
5	0 (0,810)	0 (300)	23,1	8,10	17,0	37,1	13,0	32,1
6	0 (0,810)	0(300)	29,0	8,80	20,0	32,0	9,60	21,7
7	0 (0,810)	0(300)	27,4	9,20	16,3	37,7	11,5	28,1
8	0 (0,810)	0(300)	27,1	8,80	19,3	30,3	9,90	23,1

A = Concentração do biopolímero; B = Concentração do surfactante; -1 = nível inferior e +1 = nível superior das variáveis avaliadas.

Podemos verificar que a recuperação dos óleos essenciais variou de 6 a 49% para o amido nativo e de 8 a 64% para o amido modificado. Quando o amido extraído da mandioca é aquecido em presença de excesso de água e com temperaturas acima de 70°C, os seus grânulos sofrem mudanças estruturais envolvendo a ruptura das ligações de hidrogênio, responsáveis pela estabilização da estrutura cristalina interna do grânulo. Ao continuar o aquecimento, a região cristalina se desfaz e a água entra no grânulo forçando este a se romper.⁷⁶

Amidos quimicamente modificados com ácido, como o que utilizamos neste estudo, possuem grânulos que devido ao processo de hidrólise ácida se desintegram com mais facilidade durante o aquecimento com a água e podem formar géis mais reforçados e menos viscosos e, por isso, podem apresentar maior retenção dos óleos essenciais após o resfriamento do amido.⁷⁶

Na Tabela 3.3 verificamos também que, independentemente do biopolímero utilizado, ocorreu uma maior recuperação para o óleo essencial de laranja (padrão limoneno), seguido pelo óleo de erva-cidreira (padrão linalol) e com uma menor recuperação para o óleo de alecrim (padrão cânfora). Embora os terpenos tenham baixa solubilidade em meio aquoso, se considerarmos a faixa de solubilidade dos terpenos majoritários das moléculas em estudo, o linalol possui solubilidade aquosa experimental maior que a cânfora, além de possuir um grupo hidroxila (Figura 3.6) que pode auxiliar na estabilização das suspensões coloidais.⁹⁶

Em relação ao limoneno, apesar desta molécula ser mais hidrofóbica em comparação com o linalol⁹⁷, sua maior recuperação em comparação com os outros óleos pode ter relação ao fato de que o óleo essencial de laranja foi obtido pela prensagem do bagaço da laranja e, além de apresentar resíduos de água, possui pigmentos (Figura 3.6) e proteínas que podem ter auxiliado no processo de encapsulamento. Os óleos essenciais de alecrim e cânfora, por outro lado, foram obtidos por arraste a vapor o que diminui a possibilidade de apresentarem resíduos de moléculas não voláteis em comparação com a prensagem à frio.

A partir dos resultados de recuperação dos óleos essenciais obtidos, calculamos os efeitos de cada variável independente utilizando os dados da Tabela 3.3, conforme observamos na Figura 3.7.

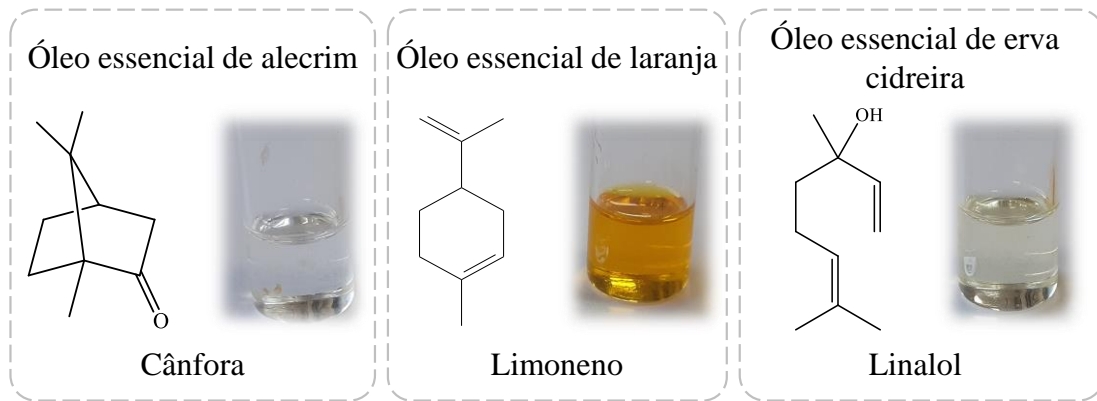


FIGURA 3.6. Estrutura dos marcadores químicos dos óleos essenciais e visualização da coloração dos óleos essenciais utilizados.

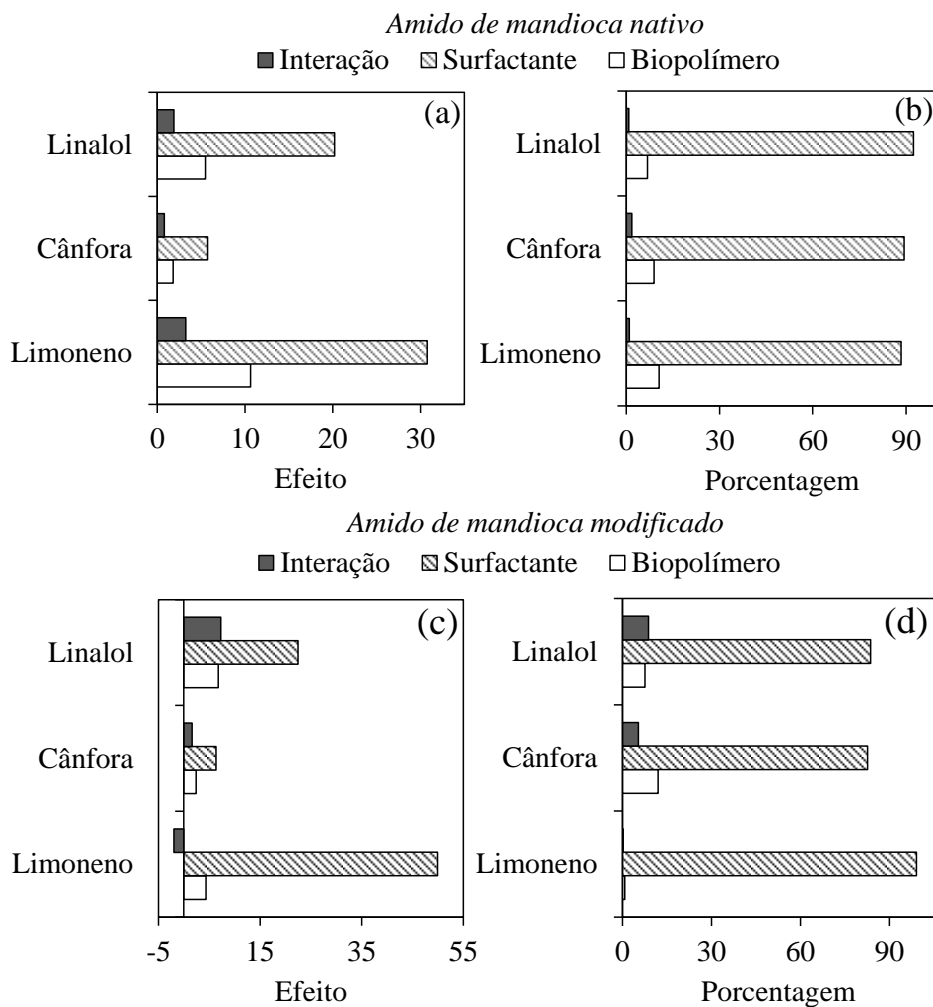


FIGURA 3.7. Representação dos efeitos das variáveis investigadas sobre o encapsulamento dos óleos essenciais de laranja, erva-cidreira e alecrim utilizando (a, b) amido nativo e (c, d) amido modificado.

Verificamos que para ambos os biopolímeros, apenas a concentração do surfactante apresentou efeito positivo significativo (superiores a 10%) sobre o processo (Figura 3.7).

O efeito positivo da adição do surfactante, para ambos os biopolímeros utilizados, indica que a sua incorporação auxiliou na maior retenção dos óleos essenciais durante o processo de encapsulamento. Os surfactantes auxiliam o processo diminuindo a energia livre necessária para a formação das suspensões coloidais (processo não espontâneo), diminuindo a tensão na interface óleo e água.⁹⁸ Barauskaite et al. (2021) também demonstraram que o aumento na concentração do polissorbato[®]80 além de favorecer a retenção do óleo essencial de orégano, tornou as emulsões mais viscosas.⁹⁹ Os dados sobre a viscosidade obtidos para os nossos experimentos estão apresentados na Figura 3.8.

Verificamos que o uso do amido com estrutura modificada proporcionou suspensões coloidais menos viscosas. Esta é uma característica esperada para amidos modificados por hidrólise ácida, uma vez que as modificações químicas podem alternar a estrutura cristalina e promover dissociação na dupla hélice de cadeias paralelas formadas pela amilose e amilipectina.⁷⁶ Alterações na estrutura cristalina do amido acarretam em alterações em suas propriedades físico-químicas, incluindo a viscosidade.¹⁰⁰

Na Figura 3.8 também observamos que o aumento na concentração do biopolímero interferiu proporcionalmente na viscosidade (experimentos 1 e 3). Estes experimentos foram os únicos a apresentar estabilidade após 2 h do preparo (ou seja, não ocorreu separação de fases). Apesar do resultado positivo, o aumento na concentração do biopolímero pode interferir no processo de homogeneização, pelo aumento na viscosidade do sistema, e reduzir a eficiência da homogeneização entre o biopolímero e o ativo, reduzindo a eficiência do processo de encapsulamento¹⁰¹, mas estes efeitos não foram observados em nosso estudo.

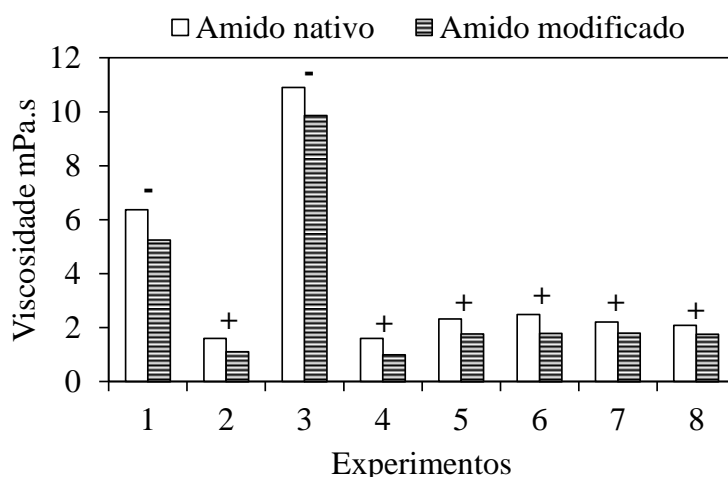


FIGURA 3.8. Avaliação da viscosidade para os experimentos de 1 a 8 propostos pelo planejamento fatorial utilizando amido e amido modificado. O sinal (-) indica que há a manutenção da estabilidade e o sinal (+) indica que há formação de fases após 12h do preparo das suspensões coloidais.

Com base nos resultados apresentados, definimos que o amido de mandioca modificado apresentou resultados mais relevantes para o encapsulamento dos óleos essenciais uma vez que apresentou maior recuperação dos óleos essenciais. Entretanto, para tornar o processo viável buscamos recuperações de pelo menos 70% para todos os ativos e sistemas que mantenham a estabilidade.

Algumas alternativas para promover o aumento na recuperação dos óleos essenciais seriam aumentar a concentração do biopolímero e do surfactante. Entretanto, como discutimos anteriormente, uma maior concentração do biopolímero pode aumentar a viscosidade do sistema, diminuindo a eficiência do processo. Pensando nisso, optamos por adicionar à suspensão coloidal moléculas adjuvantes. Neste estudo, consideramos como adjuvantes materiais que podem ser adicionados à suspensão coloidal para melhorar a recuperação dos ativos, favorecer a vida útil e as características de desempenho dos produtos.

Nós selecionamos a lignina extraída de eucalipto, o resíduo da casca de banana e da polpa e casca de pequi como potenciais adjuvantes.

A lignina é um sub produto da indústria da celulose, pois é um dos componentes da parede celular da madeira e também das plantas.¹⁰² Sua estrutura aromática com uma diversidade de grupos funcionais permitem a sua incorporação em vários processos, como a produção de biopolímeros.^{102,103} Savy et al. (2017) de mostraram que além da ação como biopolímero, o extrato aquoso de ligninas isoladas de árvores de junco gigante podem atuar como estimulantes vegetais em sementes de tomate, com efeitos semelhantes às giberelinas.¹⁰⁴

As cascas de banana também apresentam potencial para serem utilizadas como filmes biodegradáveis devido a sua composição polimérica, como as moléculas de pectina e de amido.¹⁰⁵ Assim, a reciclagem destes resíduos proporciona uma variedade de subprodutos, que são fonte de matérias-primas extremamente importantes para outros setores. Por exemplo, Sogani et al. (2023) demonstraram que as cascas de banana podem atuar como fertilizantes pelo elevado teor de nutrientes, mas também auxiliam na germinação de grama preta atuando como bioestimulante vegetal.¹⁰⁶

O último material avaliado como adjuvante foi o resíduo da casca e polpa de pequi (Figura 3.9). O pequi (*Caryocar brasiliense Camb*) é um fruto típico do cerrado brasileiro com elevado teor de riboflavina, tiamina, pró-vitamina A e óleo vegetal.¹⁰⁷ Como podemos observar na Figura 3.9, a porção consumida do fruto (mesocarpo interno) representa apenas 8,5% do fruto inteiro.¹⁰⁸ O mesocarpo externo que consiste em 76% do fruto inteiro é normalmente descartado durante o processamento do fruto¹⁰⁹, embora tenha potencial para utilização em diversas aplicações, devido a seu conteúdo de fibras, carboidratos¹¹⁰, compostos fenólicos, carotenoides¹¹¹ e pectina¹¹². Até onde sabemos, não localizamos na literatura dados que indicam o potencial do resíduo do pequi como bioestimulante vegetal.

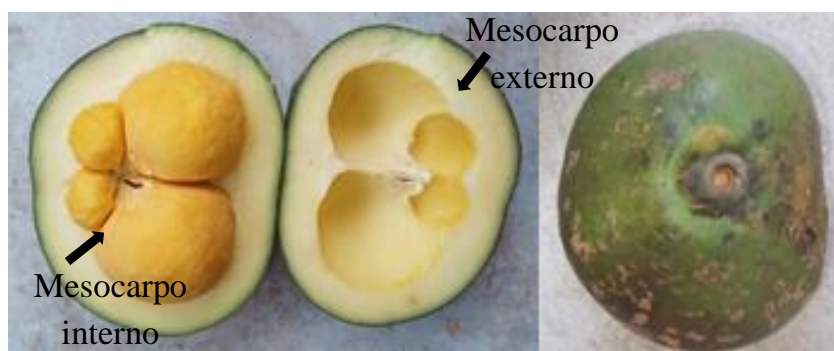


FIGURA 3. 9. Representação do fruto do pequi aberto e fechado, com destaque para o mesocarpo interno e externo.






Além de todas as vantagens já apresentadas para a utilização da lignina e dos resíduos de banana e pequi pela variedade de componentes que podem ser adicionados ao sistema coloidal, nós também realizamos uma análise dos macros e micronutrientes presentes nas amostras de lignina, casca de banana e casca e polpa de pequi. Afinal, a aplicação final do nosso produto será como bioestimulante vegetal. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 3.4. Também realizamos uma comparação com os macros e micronutrientes presentes nas amostras de amido nativo e modificado.

É interessante observar que, com exceção do cobre, a combinação dos três adjuvantes pode fornecer para as suspensões coloidais além dos metabólitos mencionados anteriormente, teores de macros e micronutrientes que são essenciais para o desenvolvimento das plantas.¹¹³

Vale destacar também que cada adjuvante fornecerá um nutriente majoritário. Assim, a casca de banana fornecerá o maior teor de fósforo (46321 mg Kg^{-1}), o resíduo de pequi fornecerá o maior conteúdo de magnésio ($688,4 \text{ mg Kg}^{-1}$), e a lignina o maior teor de ferro ($158,9 \text{ mg Kg}^{-1}$). Além disso, também verificamos que os amidos contêm resíduos de alguns macronutrientes como potássio, cálcio, enxofre e magnésio que possuem importantes funções fisiológicas no metabolismo das plantas, como a regulação enzimática, síntese

de proteínas, estabilização da membrana celular e a participação nos processos fotossintéticos.¹¹³

TABELA 3.4. Teor de macro e micronutrientes nas amostras de lignina, casca de banana, casca e polpa de pequi, amido nativo e modificado.

					
Macronutrientes mg Kg ⁻¹	Casca de Banana	Casca de Pequi	Lignina de Eucalipto	Amido ativo	Amido modificado
Nitrogênio	2965	912	392	<LQ	<LQ
Potássio	46321	5245	324,7	46,5	66,5
Fósforo	1545	417,1	<LQ	<LQ	<LQ
Cálcio	3258	970,6	80,8	388,6	258
Enxofre	532,5	291,4	12,8	12,3	14,8
Magnésio	38,1	688,4	38,1	13,8	24,5
Micronutrientes					
Boro	14,1	14,4	24,2	<LQ	<LQ
Cloro	16,7	8,2	<LQ	5,00	<LQ
Cobre	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Ferro	33,4	24,4	158,9	<LQ	<LQ
Mangânes	38,1	29,7	<LQ	<LQ	<LQ
Molibdênio	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Zinco	27,1	12,5	<LQ	<LQ	<LQ

LQ = Limite de quantificação.

Com base em todos os dados apresentados, novas formulações foram preparadas utilizando apenas o amido modificado de acordo com o protocolo apresentado na Figura 3.2 com algumas modificações. Desta vez,

junto ao amido modificado (1,80 g) foram adicionados 25 mg de cada adjuvante. O conteúdo foi solubilizado em 60 mL de água deionizada em Erlenmeyer (125 mL) e seguimos o procedimento como descrito na seção 3.2.5 *Sínteses das suspensões coloidais*). Para esta etapa, utilizamos polissorbato[®]80 em três diferentes teores (1,0; 2,5 e 5,0% m v⁻¹). Após o preparo das suspensões coloidais, realizamos a quantificação dos ativos e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.5.

TABELA 3.5. Resultados obtidos para separação de fases e recuperação dos ativos após a incorporação dos adjuvantes às formulações contendo 1,0; 2,5 e 5,0 de polissorbato.

Polissorbato [®] 80 % (m v ⁻¹)	Separação de Fases		Recuperação (%)		
	7 dias	% volume	Limoneno	Cânfora	Linalol
1,0	+	89%	30,0(±2,4)	23,8(±0,8)	23,9(±3,1)
2,5	+	98%	48,7(±2,9)	41,4(±0,5)	42,5(±1,7)
5,0	-	100%	89,8 (±9,6)	86,6(±1,0)	91,5(±2,9)

O sinal (-) indica que há a manutenção da estabilidade e o sinal (+) indica que há a formação de fases.

Verificamos que a incorporação dos adjuvantes promoveu recuperações dos ativos superiores 85%. Além disso, observamos que ao utilizarmos polissorbato[®]80 a 5% (m v⁻¹) a suspensão coloidal manteve sua estabilidade após 168 h da síntese. Assim, as formulações preparadas contendo uma maior porcentagem de surfactante e com a incorporação dos adjuvantes foram selecionadas para as próximas etapas deste estudo.

3.3.3 Caracterização microestrutural

A morfologia das suspensões coloidais foi observada por meio de microscopia óptica, como apresentado na Figura 3.10.

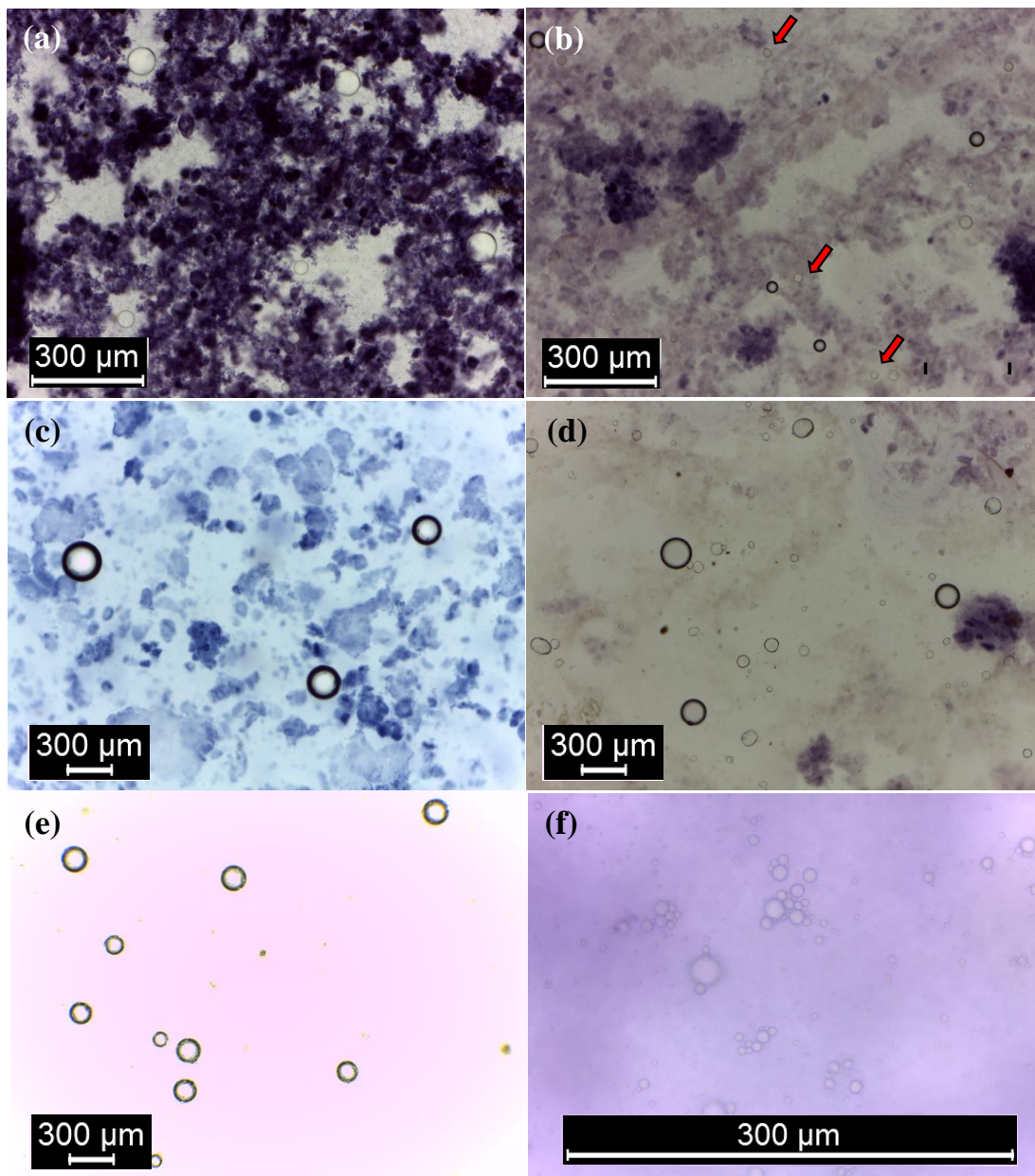


FIGURA 3.10. Imagens ópticas das suspensões coloidais preparadas com a mistura dos óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja na proporção 1:1:1. As setas vermelhas apontam para microgotículas (b).

Verificamos a coloração azul nas imagens que está relacionada ao complexo formado entre as moléculas de amilose e o iodo. Já o tom arroxeadado está relacionado ao complexo do iodo com as moléculas de amilopectina. Nas Figuras 3.10a, 3.10b e 3.10c podemos verificar que com o processo de gelatinização do amido há a formação de uma rede contínua ao invés da

formação de grânulos de amido. Este processo pode ser consequência do processo de gelatinização do amido em que há a liberação de moléculas de amilose da rede cristalina durante o processo de aquecimento, ocasionando na aparência de espalhamento do biopolímero ao invés de verificarmos a formação de grânulos de amido.⁸⁶

Verificamos também que as suspensões coloidais apresentaram forma aproximadamente esférica com distribuição das gotículas por todo o volume analisado. As Figuras 3.10b, 3.10d, 3.10e e 3.10f também indicam que há uma distribuição heterogênea do tamanho das gotículas. Estas características foram melhor visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. As imagens podem ser verificadas na Figura 3.11.

As micrografias apresentadas na Figura 3.11 confirmaram que as gotículas da mistura dos óleos essenciais foram encapsuladas individualmente com formato aproximadamente esférico, embora variações de tamanho sejam evidentes. As micropartículas apresentaram pico de frequência inferior a 18,0 μm . Além disso, mais de 70% das partículas apresentaram tamanhos entre 10 e 25 μm . Esta variação na distribuição do tamanho das partículas pode ser relacionada a força centrífuga do homogeneizador, uma vez que em distâncias maiores do centro (que seria a barra magnética) são geradas gotículas maiores devido às forças menores exercidas sobre as gotículas dos óleos.¹¹⁴

Também foi possível observar que elas eram multinucleadas (Figura 3.11e). Os defeitos superficiais, incluindo poros e saliências encontrados são resultados da secagem irregular e evaporação do líquido da emulsão das suspensões coloidais durante o processo de perda da água¹¹⁵ após a aplicação das suspensões coloidais na fita dupla face de carbono para o preparo dos *stubs*.

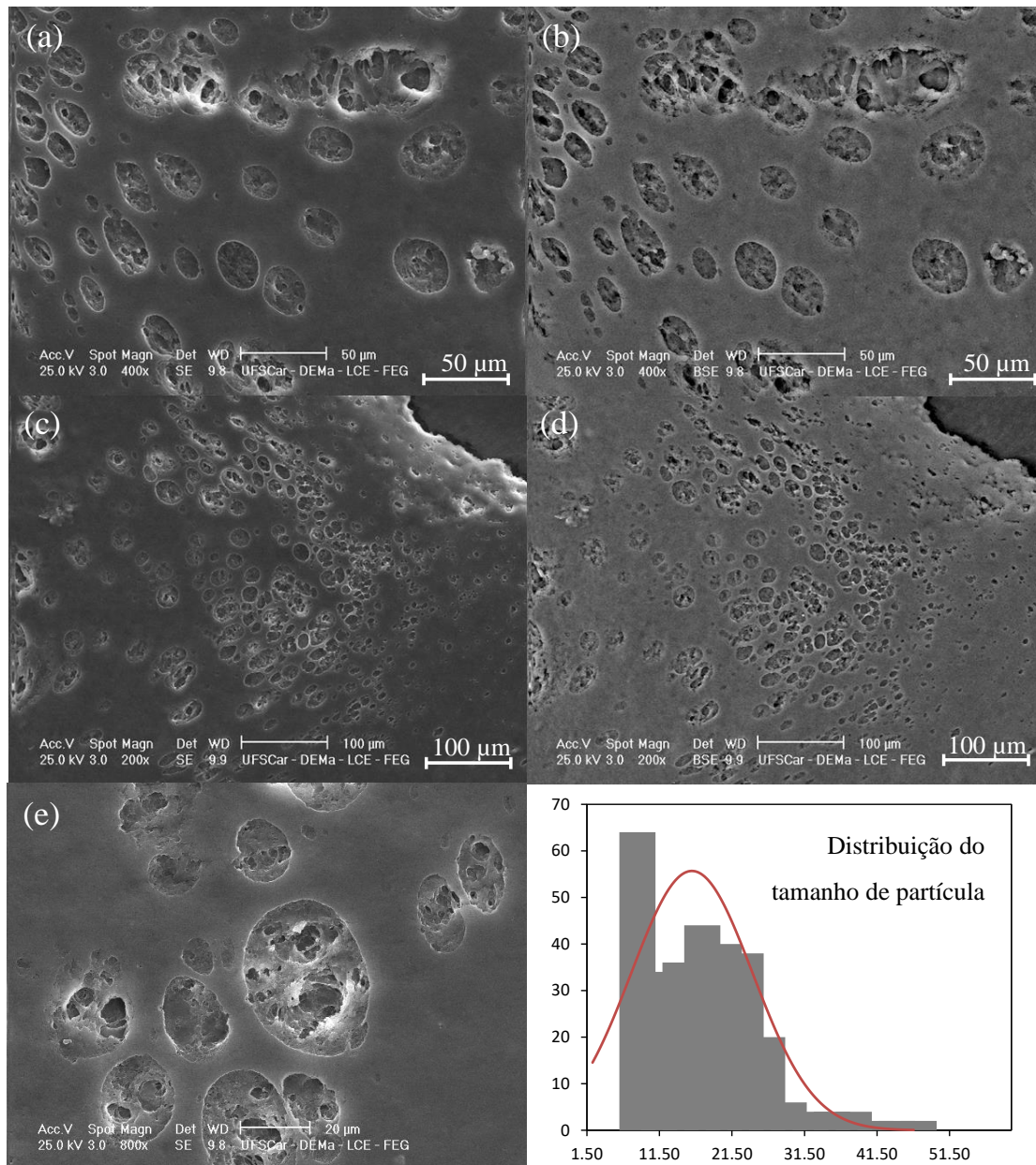


FIGURA 3.11. Imagens de microscopia eletrônica das suspensões coloidais preparas com a mistura dos óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja na proporção 1:1:1. As figuras (a), (c) e (e) foram obtidas utilizando detector SE (secondary electrons), difenciando as amostras em função da topografia e as figuras (b) e (d) detector BSE (backscattered electrons), diferenciando as amostras em função da composição química.

3.3.4 Estabilidade térmica dos óleos essenciais em suspensão coloidal

A análise termogravimétrica (TGA) nos permitiu avaliar a estabilidade térmica das suspensões coloidais contendo os óleos essenciais (Apêndice A). Na Tabela 3.6 resumimos os dados obtidos para cada amostra analisada. Observamos curvas não-isotérmicas de decomposição com perda de massa em três estágios para o biopolímero e óleos essenciais puros e curvas com quatro estágios para as suspensões coloidais (Tabela 3.6).

O primeiro estágio corresponde a perda de água, que corresponde à aproximadamente 77% do teor de massa de todas as amostras analisadas.¹¹⁵ O segundo estágio está relacionado a decomposição térmica da molécula de amido para as amostras contendo apenas o biopolímero e a degradação térmica das moléculas contidos nos óleos essenciais, considerando as amostras que tinham os óleos essenciais puros.¹¹⁶

Para os resultados da TGA das suspensões coloidais, consideramos que o segundo estágio em que há um aumento de massa, pode ser um artefato da análise não diretamente relacionado a amostra. Nas temperaturas mais altas, a linha de base do TGA indicou um aparente ganho de peso. Este fato foi previamente descrito por Zainal et al. (2021) e pode estar relacionado à flutuabilidade do gás presente no recipiente. À medida que a temperatura aumenta, o gás que envolve o recipiente da amostra sofre alterações na densidade, ocasionando em mudanças na massa que pode ser erroneamente atribuída à amostra (de acordo com o princípio de Arquimedes).¹¹⁷

Os últimos estágios de degradação podem ser relacionados à evaporação da água ligada as moléculas de amido e também a degradação do biopolímero e surfactante. Observamos também ganhos de estabilidade térmica nos óleos essenciais após o preparo das suspensões coloidais conforme indicado pela segunda perda de peso relacionada à evaporação dos constituintes voláteis mudando para temperaturas mais altas (superiores à 200°C).¹¹⁶ Isto pode estar

relacionado as propriedades do biopolímero que pode reduzir a taxa de transferência de calor no sistema coloidal.¹¹⁸

TABELA 3.6. Resumo dos dados obtidos para as análises de TGA.

Amostra	Faixa de temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo à 800 °C
Biopolímero	28 a 130	97,2	0,58
	130 a 400	1,84	
	400 a 800	0,36	
OE alecrim (suspensão coloidal)	28 a 140	96,0	0,00
	140 a 210	1,84	
	210 a 450	4,45	
OE alecrim (livre)	450 a 800	1,37	0,00
	30 a 140	95,6	
	140 a 400	3,63	
OE erva cidreira (suspensão coloidal)	400 a 800	0,77	0,22
	34 a 180	92,1	
	180 a 230	1,30	
OE erva cidreira (livre)	230 a 450	5,54	0,00
	450 a 800	3,39	
	28 a 140	96,6	
OE laranja (suspensão coloidal)	140 a 400	2,85	0,01
	400 a 800	0,58	
	23 a 150	94,8	
OE laranja (livre)	150 a 400	3,96	0,32
	400 a 800	1,26	
	31 a 140	96,4	
OE mistura (suspensão coloidal)	140 a 400	2,73	0,10
	400 a 800	0,52	
	28 a 150	92,7	
OE mistura (livre)	150 a 220	0,55	1,04
	220 a 400	4,64	
	400 a 800	3,14	
OE mistura (livre)	22 a 130	96,2	0,36
	130 a 400	2,42	
	400 a 800	0,36	

3.3.5 Estudos da cinética de liberação em solo

Os dados obtidos nos estudos de liberação das suspensões coloidais e para os óleos emulsionados em água estão apresentados na Figura 3.12. Podemos verificar que o preparo das suspensões coloidais aumentou a retenção de todos os óleos essenciais no solo, quando mantidos à 40°C.

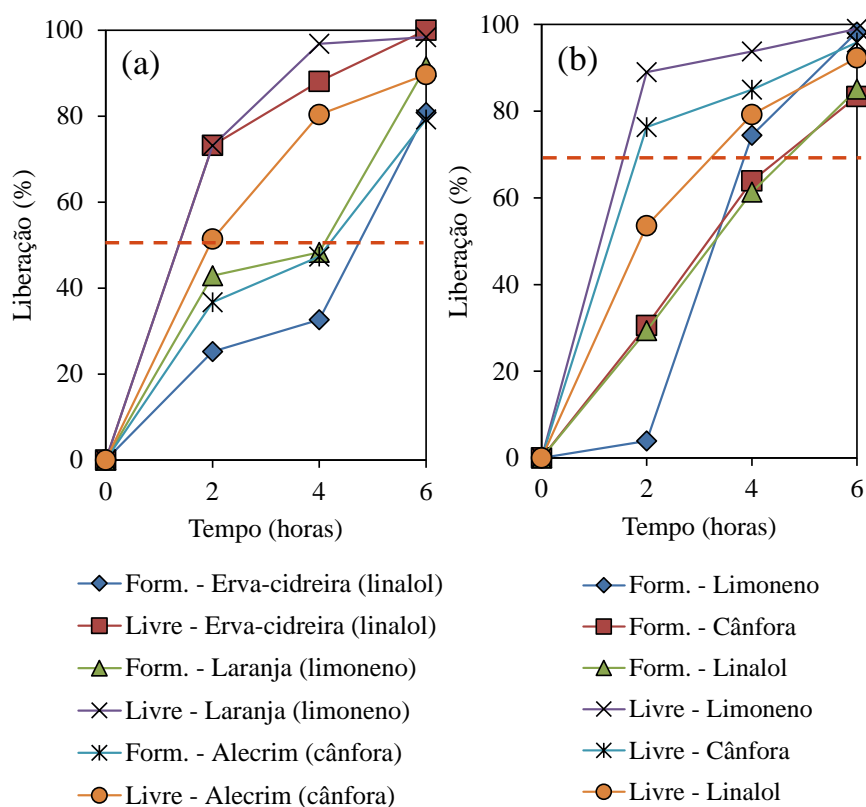


FIGURA 3.12. Curvas do monitoramento da concentração da cânfora, limoneno e linalol presente nas suspensões coloidais individuais (a) e na mistura dos óleos essenciais (b).

Observamos que após quatro horas, as suspensões coloidais ainda continham pelo menos 50% do teor inicial de cada óleo essencial, quando avaliamos as formulações contendo os óleos individuais (Figura 3.12.a). Por outro lado, quando avaliamos os óleos essenciais emulsionados em água e polissorbato[®] 80, verificamos que mais de 75% do teor havia sido liberado para o

ambiente após 4 h do experimento. Portanto, estes dados sugerem que o amido modificado atuou como um material de parede, promovendo uma maior proteção ao material de núcleo volátil, diminuindo a influência da temperatura nas suspensões coloidais.

Na Figura 3.12b apresentamos a curva de liberação obtida para a suspensão coloidal contendo a mistura dos óleos essenciais. Verificamos que esta combinação torna a amostra mais complexa e, neste contexto, a volatilidade de cada molécula bioativa é determinante para a cinética de liberação. Após as primeiras duas horas iniciais, verificamos uma taxa de liberação maior para o limoneno (maior volatilidade), seguido pela liberação das moléculas de cânfora e linalol.

Para a avaliação dos mecanismos de liberação dos óleos essenciais nas suspensões coloidais, analisamos os coeficientes de determinação para diferentes modelos cinéticos (Tabela 3.7). Descobrimos que os valores dos coeficientes de determinação mostraram que o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas descreveu melhor a relação entre a liberação dos óleos essenciais nas suspensões coloidais com coeficientes de determinação (r^2) mais próximos de 1.

Nestes casos, os valores do expoente difusional (n) foram utilizados para descrever o mecanismo de liberação (Tabela 3.7). Por exemplo, o valor de $n = 0,46$ para a suspensão coloidal contendo óleo essencial de alecrim ($0,43 < n < 0,85$) indica que a taxa de liberação dos seus constituintes corresponde a fenômenos não-Fickianos ou anômalos, envolvendo uma cinética de primeira ordem em que a liberação do óleo essencial de alecrim depende simultaneamente dos fenômenos de inchaço das gotículas internas e da difusão do biopolímero. Os valores de n superiores à 0,85 obtidos para as suspensões coloidais contendo o óleo de laranja e a mistura dos três óleos indica que o processo de relaxamento das macromoléculas do biopolímero que controla a taxa de liberação dos óleos essenciais. Este processo também rege a cinética de

liberação de ordem zero que foi o melhor modelo para descrever o mecanismo de liberação das suspensões coloidais contendo o óleo essencial de erva-cidreira.^{119–121}

TABELA 3.7. Parâmetros cinéticos de liberação dos óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja livres e em suspensão coloidal.

Amostra	Coeficiente de determinação (r^2)				n
	Ordem zero	Primeira ordem	Higuchi	Korsmeyer Peppas	
OE alecrim	0,91	0,97	0,99	0,99	0,46
OE erva-cidreira	0,95	0,91	0,87	0,85	0,82
OE laranja	0,94	0,83	0,91	0,99	1,30
Cânfora	0,99	0,97	0,94	0,99	0,97
Mistura					
Linalol	0,99	0,95	0,94	0,99	0,95
Limoneno	0,90	0,89	0,74	0,97	3,32

OE = óleo essencial. n = coeficiente difusional.

3.3.6 Quantificação e qualificação analítica

Para avaliarmos o desempenho do método desenvolvido para a obtenção das suspensões coloidais e a quantificação dos ativos e garantirmos a sua confiabilidade, realizamos a investigação da seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

3.3.6.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método de encapsulamento, extração e análise por cromatografia gasosa dos óleos essenciais comparamos os cromatogramas do extrato obtido na análise da matriz de amido nativo e amido modificado isentas dos óleos essenciais (Figura 3.13a e 3.13b) com o extrato da amostra fortificada com os óleos essenciais (Figura 3.13c).

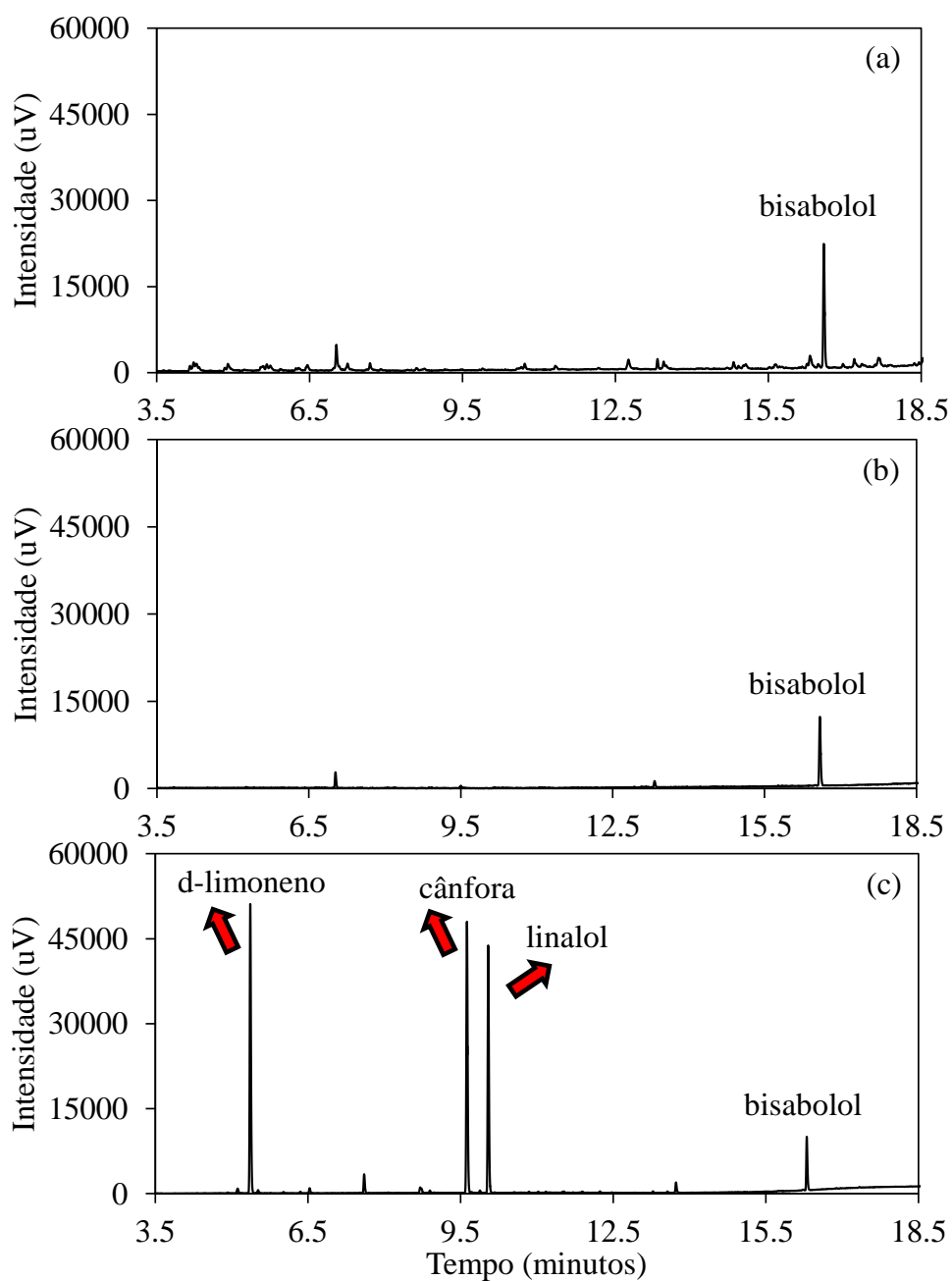


FIGURA 3.13. Representação do cromatograma do extrato da matriz de (a) amido e (b) amido modificado isentas dos óleos essenciais e (c) fortificadas com 1 mg L^{-1} de cânfora, limoneno e linalol na matriz de amido nativo e amido modificado ($t_R = 5,4 \text{ min}$: limoneno, $t_R = 9,6 \text{ min}$: cânfora, $t_R = 10,0 \text{ min}$: linalol e $t_R = 16,3 \text{ min}$: padrão interno).

Constatamos que as amostras de amido nativo e amido modificado, apesar de possuírem uma composição complexa, não apresentaram interferentes nos mesmos tempos de retenção da cânfora, limoneno e linalol ou do padrão interno, pois estes biopolímeros não possuíam compostos voláteis nas condições de análise utilizadas.

A seletividade baseia-se na capacidade de um método em quantificar com precisão o analito na presença de todos os outros componentes potenciais na amostra.¹²² Portanto, a etapa de preparo de amostra se torna determinante para a eliminação de interferências da matriz que poderiam influenciar a identificação do analito.¹²³ Neste trabalho, utilizamos a técnica de *headspace* para a extração dos óleos essenciais em suspensão coloidal que também é considerada como uma técnica de *clean-up* por garantir que em uma dada matriz, apenas as substâncias voláteis serão extraídas e analisadas.¹²⁴

Dessa forma, o método desenvolvido neste estudo mostrou-se seletivo, pois não apresentou interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção da cânfora, limoneno e linalol. Também se mostrou confiável para a análise dos analitos uma vez que produziu diferentes respostas analíticas para diferentes substâncias, possibilitando distinguir a resposta dos analitos de interesse das outras respostas produzidas por componentes da matriz (biopolímeros).¹²⁵

3.3.6.2 Linearidade da resposta do detector, LOD e LOQ

Matrizes complexas podem alterar a resposta do analito em análises cromatográficas.¹²⁶ Componentes da matriz, como metabólitos secundários, impurezas ou produtos de degradação, coeluem ou podem coeluir junto ao analito interferindo no sinal analítico como, por exemplo, na ionização do analito.¹²⁷ Além disso, a matriz pode possuir substâncias quelantes que indisponibilizam o composto ou componentes não voláteis que se acumulam no sistema cromatográfico originando novos sítios ativos.¹²⁸

O efeito de matriz pode ser positivo ou negativo, aumentando ou suprimindo o sinal analítico.¹²⁷ Contudo, independente do efeito provocado, o efeito de matriz prejudica parâmetros analíticos de validação, pois resulta em altas (>100 %) ou baixas taxas de recuperação do analito, interferindo na exatidão e gerando imprecisão dos resultados.¹²⁷

Baseados nisso e, considerando que temos trabalhado com metodologias para o encapsulamento de óleos essenciais há alguns anos^{129,130}, optamos por construir as curvas de calibração utilizando extratos de matriz, aumentando a confiabilidade dos resultados e reduzindo a quantidade de experimentos. Dessa forma, as curvas de calibração foram preparadas utilizando extrato da matriz (amido nativo e modificado solubilizado em acetona, como descrito na seção 3.2.6 *Qualificação analítica*) nas concentrações de $5,00 \times 10^{-2}$ a $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ contendo $5,00 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ do padrão interno.

Assim, a linearidade do método proposto foi avaliada em função das curvas de calibração preparadas na matriz biopolimérica (Figura 3.14). Foi utilizado o método de padronização interna, relacionando-se a concentração dos analitos com a razão das áreas (área do analito/área do padrão interno). As equações de regressão, os valores dos coeficientes de correlação determinados e a relação entre os coeficientes lineares e angulares estão apresentados na Tabela 3.8.

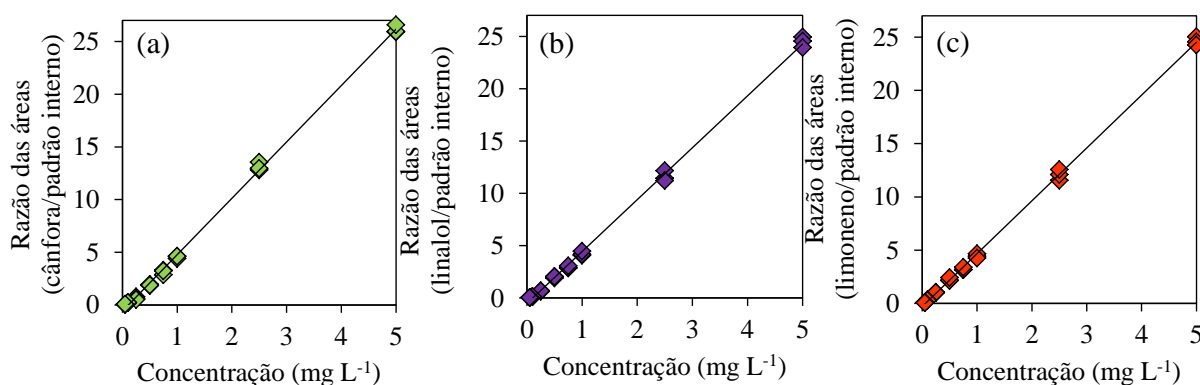


FIGURA 3.14. Curvas analíticas preparadas em extrato da matriz para a cânfora (a), linalol (b) e limoneno (c).

TABELA 3.8. Equações das retas e os respectivos coeficientes de determinação obtidos para as curvas de calibração, valores de LOD e LOQ.

Analito	Equação	r^2	LOD	LOQ
			mg L ⁻¹	
Cânfora	$y = 5,35.x - 0,581$	0,998	$1,00 \times 10^{-3}$	$15,0 \times 10^{-3}$
Linalol	$y = 4,96.x - 0,538$	0,998	$2,00 \times 10^{-3}$	$18,0 \times 10^{-3}$
Limoneno	$y = 4,97.x - 0,298$	0,999	$2,00 \times 10^{-3}$	$18,0 \times 10^{-3}$

r^2 = coeficiente de determinação; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação.

As curvas de calibração foram lineares e cobriram uma faixa de $5,00 \times 10^{-2}$ a $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ com coeficientes de determinação (r^2) maiores que 0,99 independente dos efeitos matriciais, indicando uma correlação entre a área dos picos dos analitos e a sua concentração, evidenciando um ajuste superior a 99% no modelo.¹³¹ A análise de variância (ANOVA) e os gráficos dos resíduos das amostras da curva de calibração em relação à regressão ajustada são apresentados no Apêndice B.

Os valores de LOD e LOQ relacionam-se com o desempenho do método qualificado.¹²² O limite de detecção (LOD) para métodos cromatográficos representa a menor quantidade da substância estudada que pode ser diferenciada do ruído do equipamento com segurança. Entretanto, o LOD não implica que o analito seja quantificável.¹³² O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão.

Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 3.8. A sensibilidade e linearidade do método também foram demonstradas pelos baixos valores do LOD obtidos, que foram significativamente inferiores ao mínimo necessário estabelecido na faixa de trabalho da curva de quantificação, para o controle de qualidade das suspensões coloidais carregadas com cânfora, linalol e limoneno.

3.3.6.3 Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade dos resultados. Assim, realizou-se cálculo da estimativa do coeficiente de variação (CV) de sete repetições do procedimento otimizado de encapsulamento, extração por *headspace* e quantificação por CG-DIC. Os coeficientes de variação (CV%) obtidos para as sete repetições na concentração de 3,00 mg L⁻¹ foram inferiores à 3% para todas as amostras (Tabela 3.9).

TABELA 3.9. Acurácia (%A) e coeficiente de variação (CV%).

Concentração mg L ⁻¹	Acurácia (%A) (CV%)		
	Cânfora	Linalol	Limoneno
6,00×10 ^{-2a}	97,6 (6,89)	93,1 (5,72)	102 (8,23)
2,00 ^a	89,0 (3,33)	91,8 (2,99)	101 (2,78)
3,00 ^b	99,9 (2,31)	98,0 (2,04)	101 (1,27)

a = média de três repetições; *b* = média de sete repetições; CV% = coeficiente de variação.

Estes resultados demonstraram a repetitividade do método, uma vez que os coeficientes de variação se encontraram abaixo do limite máximo aceito para amostras complexas, em que são aceitáveis CV% de até 20% para amostras complexas, como por exemplo, amostras contendo extrato de amido. Valores de CV% < 20% indicam uma baixa influência de erros aleatórios nos resultados obtidos.¹³³

A exatidão do procedimento para o preparo de suspensões coloidais contendo óleos essenciais e extração por *headspace* foi avaliada realizando ensaios de recuperação, em que a porcentagem de extração foi calculada adicionando a cânfora, linalol e limoneno em concentrações superiores ao limite de quantificação (LOQ) sendo elas 6,00×10⁻²; 2,00 e 3,00 mg L⁻¹. Assim, os

ensaios de recuperação foram realizados extraíndo as moléculas bioativas após a fortificação do extrato da matriz de amido.

Os resultados obtidos para a extração dos ativos, bem como os seus coeficientes de variação estão representados na Tabela 3.9. Os resultados apresentados na Tabela 3.9 indicam uma concordância entre os valores experimentais e teóricos e demonstram uma baixa influência de erros sistemáticos.

3.4 Conclusões

Na primeira etapa deste estudo, caracterizamos os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja e demonstramos a diversidade da sua composição química. Ficou evidente uma diferença na composição química que pode também promover diferentes respostas biológicas.

Demonstramos que as suspensões coloidais contendo os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja foram obtidas com sucesso. O planejamento fatorial indicou que a principal variável que deveria ser controlada para obter a melhor recuperação dos óleos essenciais foi a concentração do surfactante (polissorbato[®]80).

Trabalhando nas condições otimizadas e incorporando a lignina e os resíduos de banana e pequi, concluímos que é possível preparar suspensões coloidais contendo amido modificado como biopolímero obtendo valores de recuperação dos COVs superiores a 85%. Foi possível prepararmos formulações com morfologia microesférica, com tamanho médio de partícula inferior a 18 μm com teor dos óleos essenciais superiores à 85% (v v^{-1}) após o preparo das suspensões coloidais.

O desenvolvimento e validação do método de quantificação foram compatíveis com as características intrínsecas dos óleos essenciais e dos biopolímeros. Os efeitos da matriz foram abordados usando curvas de calibração

correspondentes à matriz. Com isso, o método analítico foi qualificado, apresentando linearidade, seletividade, precisão e exatidão para a análise quantitativa da cânfora, linalol e limoneno. Além disso, o método analítico apresentou vantagens como a simplicidade operacional.

A estabilidade térmica e o mecanismo de liberação controlada nas suspensões coloidais foram semelhantes, independente do óleo essencial utilizado ou da mistura dos óleos. Os mecanismos de liberação mostraram que a liberação dos óleos essenciais depende principalmente do transporte difusional e das propriedades relaxantes da cadeia do biopolímero.

Os dados apresentados nesta seção incluem o primeiro passo no desenvolvimento de sistemas de entrega controlada para a liberação lenta de produtos contendo os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja. Esses produtos foram utilizados na última seção deste estudo avaliando-se suas potenciais aplicações como bioestimulantes vegetais em plantas de tomate.

4 Métodos analíticos para a análise de amostras vegetais: preparo de amostras e análises constitutivas

4.1 Introdução

Para o estudo de moléculas com ação bioestimulante, uma etapa crucial é a investigação sobre os seus mecanismos de ação sob as plantas.⁵³ Há evidências de que os bioestimulantes podem aumentar a resistência das plantas aos estresses ambientais afetando a resposta constitutiva e os mecanismos moleculares de *priming*.¹³⁴ Neste contexto, a metabolômica é o método adequado para analisar as moléculas relacionadas as respostas das plantas sob a ação de estimulantes vegetais.¹³⁵

A caracterização da diversidade química envolve uma variedade de etapas antes de chegar à análise metabolômica (Figura 4.1)⁵³. O desenho do

estudo é essencial para a obtenção de dados de alta qualidade. Esta etapa associada ao preparo da amostra é crucial para obter a cobertura máxima do metaboloma^{53,136} e a qualidade dos métodos de extração é fundamental para a aquisição de resultados confiáveis.^{53,137} Portanto, é necessário um protocolo otimizado e padronizado para promover uma extração eficiente de metabólitos, a fim de garantir a reprodutibilidade, especialmente ao realizar experimentos que coletam informações biologicamente significativas para nos ajudar a compreender um fenótipo.¹³⁸

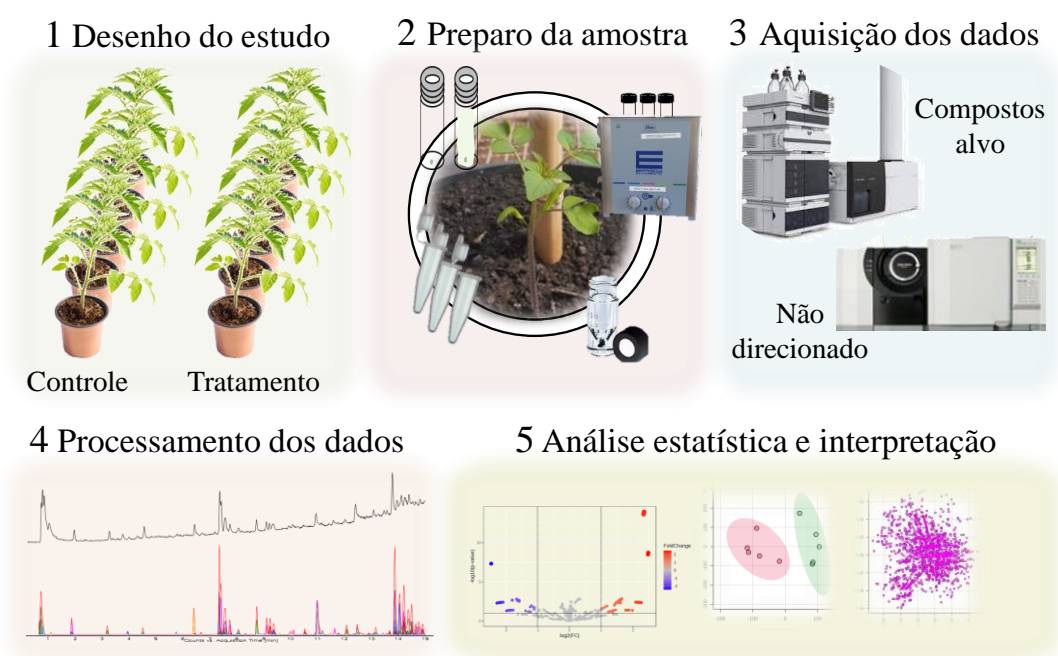


FIGURA 4.1. Representação esquemática das etapas para a realização de um estudo metabolômico.

Adaptado: Nephali et al. (2020)⁵³.

Baseados em estudos metabolômicos, Arroussi et al. (2018)¹³⁹ demonstraram que a aplicação de exopolissacarídeos de microalgas pode apresentar efeito bioestimulante em cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*) sob estresse salino. Os exopolissacarídeos, além de estimularem o crescimento das plantas (parte aérea e radicular), equilibram as proporções de

K^+/Na^+ , induzem a atividade de enzimas eliminadoras de espécies reativas de oxigênio e a biossíntese de compostos fenólicos e outras moléculas antioxidantes. Além disso, também favorecem a biossíntese de moléculas de ácido graxo de cadeia longa, como o eicosano e o heptacosano. Estas moléculas estão envolvidas na construção da cera foliar, fortalecendo as cutículas da planta e criando uma barreira eficaz contra a perda de água, infecções bacterianas e fúngicas, além de proteger os tecidos dos raios UV.¹⁴⁰

Além de permitir uma exploração dos mecanismos moleculares da ação dos bioestimulantes, a análise metabolômica pode auxiliar a relacionar as respostas agrônômicas às fases de desenvolvimento das plantas. Alfosea-Simón et al. (2022)¹⁴¹, por exemplo, conseguiram demonstrar que a fase fenológica tem um maior impacto na diferenciação metabolômica em comparação com a variação genotípica aos estudarem quatro cultivares de tomate com características agrônômicas muito distintas. Estes resultados podem auxiliar a determinar qual a fase de desenvolvimento da planta pode ser a mais adequada para a aplicação de determinado bioestimulante.

Considerando esse contexto, nós selecionamos os cultivares de tomate como modelo de matriz vegetal. A domesticação e o melhoramento do tomate têm sido impulsionados principalmente pela modificação dos fenótipos dos frutos para satisfazer os desejos dos agricultores e promover ganhos econômicos, como aumento dos frutos e da produtividade.^{142,143} Entretanto, estes processos estão associados a uma redução da diversidade genética e na perda de qualidades importantes dos frutos, como a perda do sabor e da resistência a patógenos.^{142,144}

Assim, nesta etapa da pesquisa, optamos por avaliar métodos de extração (extração sólido-líquido assistida por banho de ultrassom e extração por *headspace*) para caracterizar os metabólitos não voláteis e voláteis presentes nas folhas do tomate *Solanum pimpinellifolium* e *Solanum lycopersicum*. Com este estudo pretendemos estabelecer as condições mais adequadas para a extração

dos metabólitos e que permitam na terceira etapa determinar as variações no metaboloma do tomate após a aplicação das formulações contendo os óleos essenciais.

Análise multivariadas, como análise de componentes principais (PCA) também foi utilizada para fornecer as semelhanças e dissimilaridades entre os perfis metabolômicos e auxiliar a compreensão dos efeitos dos estágios de desenvolvimento das plantas nos metabólitos sintetizados pelos cultivares de tomate avaliados.

4.2 *Material e métodos*

4.2.1 *Reagentes*

A solução padrão estoque de cafeína (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparada em água na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenada a 8°C . O mesmo procedimento foi utilizado preparando uma solução padrão de bisabolol (Sigma-Aldrich) à $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em glicerol. Cafeína e bisabolol foram utilizados como padrões internos para Cromatografia Líquida e Gasosa, respectivamente. Metanol e diclorometano grau HPLC da Supelco (Carolina do Norte, Estados Unidos), piridina 99,8% v v⁻¹ (Sigma-Aldrich), glicerol (Synth, São Paulo, Brasil) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados como solventes.

Ácido fórmico grau LC-MS, (Fluka, Missouri, Estados Unidos) foi utilizado na fase móvel da cromatografia líquida. *N,O*-Bis (trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA) com 1% de clorotrimetilsilano (TMCS) (Sigma-Aldrich) foi utilizado para o preparo das amostras de metabólitos primários e o cloreto de sódio (Synth, São Paulo, Brasil) foi utilizado no preparo das amostras para a extração por *headspace*.

4.2.2 *Material vegetal*

Sementes da espécie de *Solanum pimpinellifolium* (acesso PI 126925) foram fornecidas pelo banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças (Brasília, Brasil). Além deste cultivar, também adquirimos em comércio local a variedade de tomate cultivada BRS Iracema (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), um híbrido do tomate cereja que apresenta alto rendimento e tolerância à patógenos. Este estudo está registrado no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) recebendo o cadastro de acesso n° AFF721B.

As plantas de tomate foram cultivadas para a obtenção da quantidade de sementes necessárias para realizarmos os ensaios de crescimento. Os procedimentos foram realizados em casa de vegetação sob telado transparente para proteger as plantas contra os agentes externos e a infestação de pragas. As sementes foram germinadas em sementeiras e após 30 dias do plantio foram transplantadas para vasos de 4,5 L preenchidos com terra vegetal (composta por turfa, serragem de madeira e bagaço de cana), areia e húmus de minhoca na proporção de 3:1:1. As plantas foram irrigadas diariamente e de forma uniforme até atingirem 60% de umidade, tomando-se o cuidado de não serem submetidas a volumes muito altos ou baixos para evitar estresse hídrico. A umidade foi determinada com medidor de umidade do solo digital, PHD-3000 (SVE Super). Como os cultivares selecionados apresentavam crescimento indeterminado e o cultivar de *Solanum pimpinellifolium* era de crescimento rasteiro, foi necessário adicionarmos tutores aos vasos (estacas de bambu de 1 m de comprimento).

4.2.3 *Coleta das amostras de folhas de tomate*

Utilizamos a primeira folha mais jovem totalmente formada (ápice do caule) e a mais velha (base do caule) das plantas de tomate nas análises. As amostras foram coletadas e congeladas com nitrogênio líquido, promovendo o

quenching metabólico, transportadas para o laboratório e particionadas em dois lotes. O primeiro lote foi liofilizado (Liotop L101, Liobras, São Paulo, Brasil), moído e posteriormente fracionado em peneira de malha 80 *mesh* e armazenado a -20°C. O segundo lote deste material, foi mantido fresco e armazenado em ultrafreezer Sanyo MDF-U56VC (Panasonic, Osaka, Japão) a -80°C.

4.2.4 *Protocolos de extração de metabólitos secundários*

Utilizamos uma amostra contendo uma mistura de folhas de todos os cultivares na mesma proporção para otimizarmos os métodos de extração. A resposta (variável dependente) considerada para medir a qualidade dos métodos de extração foi o número de compostos isolados nos extratos e a área cromatográfica total dos picos isolados. As variáveis independentes foram selecionadas com base em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa¹⁴⁵ e nos estudos de Kwon et al. (2019)¹⁴⁶ e Mun et al. (2021)¹⁴⁷. Detalhes sobre os métodos de extração são apresentados abaixo.

4.2.4.1 *Compostos orgânicos não voláteis das folhas de tomate*

Como diferentes parâmetros podem afetar a eficiência da extração sólido-líquido assistida por banho de ultrassom (EAU), um planejamento fatorial foi realizado para determinar quais variáveis apresentaram efeitos significativos na extração dos metabólitos. Foram avaliadas duas variáveis independentes: tempo (5, 20 e 35 min) e mistura extratora – solução de etanol (30%, 50% e 70% v v⁻¹) e um planejamento fatorial 2² com quatro pontos centrais foi realizado. Assim, o material botânico liofilizado (2,5 mg) foi submetido à extração em tubo de vidro (8 mL) contendo 500 µL da mistura extratora em uma frequência de 60 kHz utilizando banho de ultrassom Elma (Tovatech, Alemanha).

O processo de extração ocorreu duas vezes consecutivas. Assim, o solvente da primeira extração era substituído após o primeiro ciclo e o

sobrenadante reservado, para análises posteriores. O precipitado era submetido a uma nova extração com 500 µL da mistura extratora. Após o último ciclo de extração, os sobrenadantes foram centrifugados ($3.200 \times g$, por 30 min a 10°C) e filtrados em membrana de PVDF de 0,20 µm, e 10 µL dos extratos foram diluídos em água para um volume final de 500 µL. O padrão interno foi adicionado (10 µL de cafeína $100 \mu\text{g L}^{-1}$) e as amostras foram analisadas por UHPLC-q-TOF-MS/MS (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos, 6545 LC/Q-TOF).

Para avaliarmos os metabólitos primários presentes nos extratos, 50 µL do extrato resultante (sem a etapa da diluição em água) foram transferidos para frasco de micro reação (0,300 mL). Após a completa evaporação do solvente, foram adicionados 60 µL de piridina e, após 5 min, 100 µL do reagente de derivação (BSTFA + TMCS 1%). A mistura foi aquecida a 60°C por 30 min em estufa de secagem G4023D Gehaka (São Paulo, Brasil) para promover a trimetilsililação de álcoois, aminas, ácidos carboxílicos, entre outros.^{148,149} Em seguida, os extratos obtidos foram diluídos em diclorometano (adicionando 40 µL), filtrados em membrana de PTFE de 0,22 µm e analisados por CG-EM (Shimadzu, CG-EM TQ8040).

4.2.4.2 *Compostos orgânicos voláteis das folhas de tomate*

Para determinar a condição ideal para a extração dos metabólitos voláteis por *headspace* estático, foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 e quatro pontos centrais. Para isso, foram avaliadas duas variáveis independentes: tempo (5, 15 e 25 min) e força iônica com 500 µL solução de NaCl (0, 15 e 30% m v^{-1}).

O material botânico fresco (100 mg) foi submetido à extração por *headspace* utilizando um frasco de 10 mL. O bisabolol foi usado como padrão interno adicionando 25 µL da solução de trabalho (500 mg L^{-1} , solução preparada em glicerol) ao frasco de *headspace*. Os frascos foram selados com

tampa de alumínio e septo de PTFE/SIL e, após extração utilizando 75°C e 500 rpm os compostos voláteis foram analisados por CG-EM (Shimadzu, CG-EM TQ-8040).

4.2.5 Análises cromatográficas

A análise não-alvo dos componentes orgânicos não voláteis foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de ultra-alto desempenho (Agilent 1290) equipado com uma coluna Zorbax Eclipse Plus Penil-hexil (Rapid Resolution HD, 2,1 × 100 mm, 1,8 µm, Agilent) como fase estacionária. As temperaturas do forno da coluna e do amostrador automático foram de 40°C e 10°C, respectivamente. Um gradiente de fluxo constante (0,300 mL min⁻¹) combinando o solvente A (0,1% ácido fórmico/água) e o solvente B (0,1% ácido fórmico/metanol) foi usado nas seguintes condições: 15%-85% B (0-9 min), 90% B (9-14 min) e 15%B (14-15 min) com 5 min de pós-corrída. O volume de injeção foi de 5,0 µL. A ionização e análise dos íons foi realizada por meio de um espectrômetro de massa com tempo de voo quádruplo (Agilent 6.545 Q-TOF MS) equipado com uma fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) em modo de íon positivo e tensão capilar de 3,5 kV. A temperatura da fonte foi de 320°C e do gás de dessolvatação foi de 350°C. O fluxo de gás de dessolvatação foi de 11 L min⁻¹ e o fluxo de gás no cone foi de 8 L min⁻¹, com um fragmento de 250 V, tensão do *skimmer* de 65 V e *nozzle* de 0 V. Os dados de EM foram coletados e avaliados de 50 a 1.700 Da.

Os compostos derivatizados foram analisados em cromatógrafo a gás Shimadzu (CG 2010 Plus) acoplado a um espectrômetro de massas sequencial (EM TQ-8040). Para esta análise, utilizamos uma coluna capilar de DB-5 UI (Agilent, fase estacionária de 5% de difenil e 95% de dimetilpolissiloxano, 30 m × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme) e Hélio 5.0 como gás carreador (vazão 1,10 mL min⁻¹). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor a 280°C; a

temperatura da coluna inicialmente em 100°C foi mantida por 4 min. Em seguida, foi aquecida a uma taxa de 10°C min⁻¹ a 290°C, permanecendo nessa temperatura por 11 min. A temperatura de transferência da interface foi de 280°C e da fonte de íons foi de 200°C. A injeção foi em modo *split* (10:1) e o volume da amostra injetada foi de 1,0 µL. Os espectros de massa de impacto de elétrons foram registrados a 70 eV de energia de ionização, com a massa do quadrupolo de aquisição variando de 45 a 600 Da, no modo *scan*, com 0,3 varreduras s⁻¹. Os dados também foram coletados por meio do *software* GCMS Real Time Analysis 4.11 (Shimadzu).

Os compostos orgânicos voláteis também foram analisados por um cromatógrafo a gás Shimadzu (CG 2010 Plus). Para esta análise utilizamos uma coluna capilar VF-Wax MS (Agilent, fase estacionária de polietilenoglicol, 30 m × 0,25 mm de diâmetro interno × espessura de filme de 0,25 µm) e Hélio 5.0 como gás de arraste (vazão 1,50 mL min⁻¹). Os parâmetros cromatográficos foram os seguintes: temperatura do injetor 180°C; a temperatura da coluna inicialmente em 40°C mantida por 1 min, depois aquecida a uma taxa de 10°C min⁻¹ até 230°C mantendo essa temperatura por 4 min. A temperatura da interface foi de 230°C e da fonte de íons de 270°C. A injeção foi no modo *splitless* e o volume da amostra injetada foi de 1000 µL. O analisador de massas quadrupolar operou com uma ionização de elétrons a 70 eV e varredura variando de 45 a 500 Da com 0,3 varreduras s⁻¹.

Amostras de controle de qualidade (extratos contendo a mistura de todos os cultivares) e a solução do padrão interno também foram injetadas continuamente para monitorar a estabilidade dos sistemas.

4.2.6 Métodos de processamento de dados

Os dados de espectrometria de massas obtidos por experimentos de cromatografia líquida foram deconvoluídos e integrados usando o algoritmo “Molecular Feature Extraction” no *software* Mass Hunter Qualitative Analysis

Workflows B.08.00 (Agilent Technologies). Neste processamento ocorreu o alinhamento do tempo de retenção e definimos os “*molecular features*”, combinando o tempo de retenção, a massa (incluindo isótopos, estados de carga, adutos, perdas neutras) e informações quantitativas (área/intensidade de pico). Os dados dos “*molecular features*” resultantes foram tabelados. A identificação dos “*molecular features*” foi realizada por comparação com os dados da METLIN, do MassBank e do *m/z* cloud spectral e por comparação com dados de estudos publicados na literatura científica.

Para a análise dos dados obtidos no sistema de cromatografia gasosa, os dados brutos foram convertidos para o formato “.CSV”. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca NIST (versão 17.0) e com o *software* AMDIS GC/MS (versão 2.73).

Uma vez que as informações relevantes foram extraídas na primeira etapa para cada plataforma, os dados de cada tratamento foram combinados e analisados para melhorar a capacidade de previsão estatística e facilitar a interpretação.^{150,151} Para isto, nós utilizamos uma combinação dos dados que é baseada na fusão básica de blocos de dados de diferentes técnicas analíticas após o pré-processamento. Assim, os dados foram organizados em uma matriz composta por variáveis (colunas), como a abundância relativa do pico de cada constituinte identificado, enquanto os objetos (linhas) foram os cultivares amostrados. A matriz resultante foi dimensionada e utilizada para os cálculos estatísticos realizados no *software* Mass Profile Profinder 15.0 (Agilent Technologies). Nesta etapa do processamento de dados, os dados de alta resolução foram recalibrados com base na massa exata do padrão interno e consideramos uma variação de massa de até 2 ppm. Realizamos também o alinhamento do tempo de retenção e consideramos uma variação de até 0,15 min. A centralização dos dados na média foi a normalização escolhida como o pré-tratamento ideal para construir o modelo final. Após o tratamento estatístico

dos dados, a matriz obtida foi convertida no formato .CSV para gerarmos as figuras na plataforma MetaboAnalyst (versão 6.0).¹⁵²

4.2.7 *Análise estatística*

Os diferentes valores de área e número dos compostos obtidos por meio dos métodos de otimização das extrações foram avaliados utilizando a análise de variância (ANOVA), o teste F (5% de probabilidade) e a determinação de coeficientes de regressão. Estas análises foram realizadas com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre as variáveis estudadas nas condições de otimização das extrações. Para essas análises foram utilizadas as rotinas computacionais propostas por Pereira e Pereira-Filho (2018)¹⁵³ e o *software* Octave 4.4 (2018).

4.3 *Resultados e discussão*

4.3.1 *Obtenção das sementes e condições de cultivo*

As plantas de tomate foram cultivadas para a obtenção da quantidade de sementes necessárias para realizarmos os ensaios da avaliação do potencial bioestimulante das suspensões coloidais contendo os óleos essenciais, uma vez que a quantidade de sementes fornecidas pela Embrapa era insuficiente para a condução de todos os experimentos. Assim, cada cultivar foi germinado em triplicata. Na Figura 4.2a ilustramos a utilização de tutores nos vasos após o transplante das mudas para sustentar o caule flexível do tomateiro.

Na Figura 4.2 destacamos as diferenças fenotípicas que podem ser observadas entre os cultivares selecionados. As plantas de *S. pimpinellifolium* apresentaram maior crescimento aéreo e maior ramificação lateral em comparação com o cultivar *S. lycopersicum* (Figura 4.2a). O menor tamanho do cultivar *S. lycopersicum* pode ser compensado pela maior área foliar (Figura 4.2b e 4.2d) que propicia em um aumento na capacidade da planta de aproveitar a energia solar para a realização da fotossíntese.¹⁵⁴

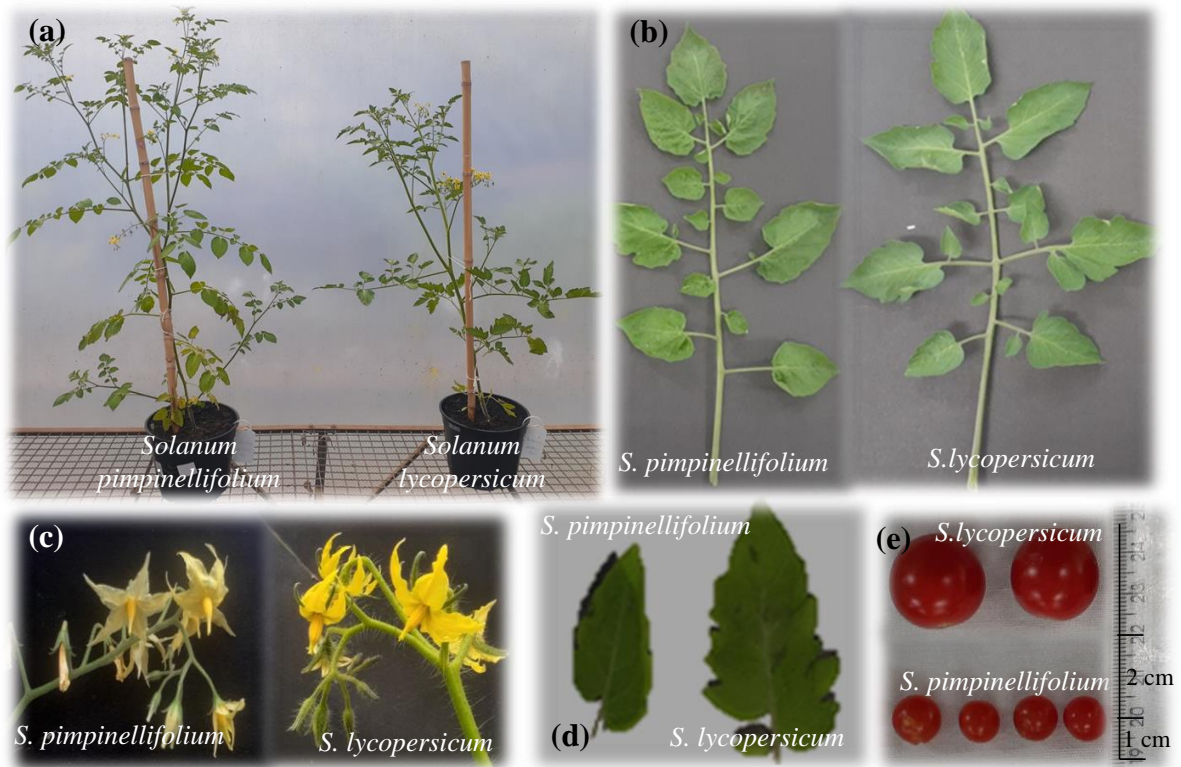


FIGURA 4.2. Etapas do crescimento das mudas de tomate. (a). Destaque para a planta contendo estaca de bambu (b). Diferenças observadas na morfologia das folhas (c) e frutos dos tomates de diferentes cultivares de tomate (d, e, f).

Na Figura 4.2c destacamos a diferença na coloração das primeiras inflorescências nos tomateiros o que também pode estar relacionado com as diferenças genéticas dos cultivares, uma vez que eles foram cultivados no mesmo ambiente e sob as mesmas condições de cultivo. Na Figura 4.2e também destacamos a diferença no tamanho entre os frutos do *S. lycopersicum*, com aproximadamente 2 cm de diâmetro, com os tomates de *S. pimpinellifolium* com frutos de aproximadamente 1 cm de diâmetro. O cultivar *S. pimpinellifolium* é considerado uma Planta de Introdução² (PI) e possui uma maior variabilidade genética para muitas características agrícolas, sensoriais e biologicamente

² A introdução de plantas consiste em levar um genótipo ou grupo de genótipos de plantas para novos ambientes onde antes não eram cultivados. A introdução pode envolver novas variedades de uma cultura já cultivada na área, parentes selvagens da espécie de cultura ou uma espécie de cultura totalmente nova.

importantes que podem ser perdidas durante os programas de melhoramento tradicionais para a obtenção dos cultivares comerciais, como o *S. lycopersicum*.¹⁵⁵

Os frutos de *S. pimpinellifolium*, por exemplo, apresentam baixo rendimento e frutos do tamanho de ervilhas que inviabilizam o seu cultivo em grande escala. Entretanto, este é considerado o progenitor selvagem do tomateiro cultivado pela alta tolerância às condições de estresse. Além disso, apresenta uma quantidade de licopeno 40 vezes maior que os tomates domesticados e um sabor intenso que foi perdido durante os processos de melhoramento no desenvolvimento do tomate cultivado.^{156,157}

Aproximadamente 100 dias após o início do plantio, os frutos foram colhidos e as sementes foram extraídas, lavadas com água e secas em temperatura ambiente em filtros de papel ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$). As sementes foram armazenadas em envelopes de papel pardo e mantidas em geladeira (14°C). Estas sementes foram utilizadas para o cultivo das plantas que foram utilizadas para avaliarmos a influência do estágio de desenvolvimento na produção dos metabólitos.

Dessa forma, foram germinadas 20 sementes para cada cultivar de acordo com o descrito na seção 4.2.2 *Material vegetal*. Após 7 dias da germinação (Figura 4.3), selecionamos as 20 plântulas que tinham as características fenotípicas mais semelhantes (altura do caule e tamanho do cotilédono). As plântulas selecionadas foram transferidas para vaso de 4,5 L e seguimos o procedimento de plantio descrito na seção 4.2.2 *Material vegetal*.

Após emergir as duas primeiras folhas verdadeiras, realizamos a coleta das amostras referentes ao estágio de crescimento inicial. Quando as plantas possuíam duas hastes laterais completas (com sete folhas cada), realizamos a coleta das folhas referentes ao crescimento vegetativo. Para isto, coletamos as folhas que estavam na primeira haste, considerando o ápice do caule, pois estas seriam as folhas mais jovens. Para avaliarmos o estágio de

floração, após a emergir a primeira florescência, coletamos as folhas mais jovens (da haste mais próxima do ápice do caule). Com exceção das plantas em crescimento inicial, para todos os outros estágios, foram coletadas três folhas por plantas e utilizamos cinco plantas para cada experimento.

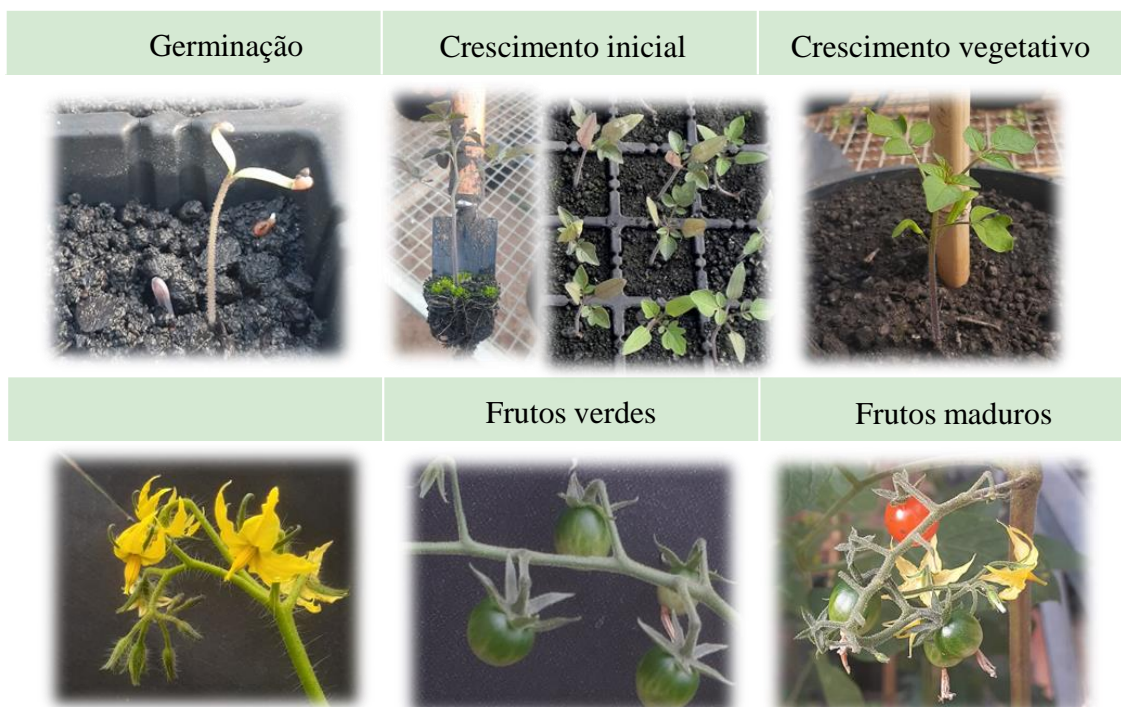


FIGURA 4.3. Ciclos do desenvolvimento das plantas de tomate: da germinação à obtenção de frutos maduros.

4.3.2 Metodologias de extração dos metabólitos

Nesta etapa da pesquisa investigamos a extração sólido-líquido assistida por banho de ultrassom (extração assistida por ultrassom - EAU) e a extração por *headspace* estático. Nosso objetivo foi melhorar as análises de diferentes metabólitos sintetizados pelas plantas de tomate nos diferentes estágios de desenvolvimento. Esta etapa é fundamental para a análise metabolômica, garantindo um perfil químico bastante diverso. Os resultados do desenvolvimento das metodologias de extração são descritos a seguir.

4.3.2.1 Compostos orgânicos não voláteis nas folhas de tomate

A extração sólido-líquido (ESL) é um dos métodos convencionais para o preparo de amostras. Para este estudo, associamos a extração sólido-líquido ao processo de ultrassom para acelerar a transferência de massa entre a amostra e a mistura extratora. Isso ocorre através da formação, crescimento e colapso de bolhas no solvente extrator (ou cavitação). Assim, avaliamos a influência da composição da mistura extratora e do tempo na transferência de massa. Para isto, avaliamos a quantidade de compostos extraídos e também o somatório total da área dos compostos. Estes dados estão apresentados na Tabela 4.1.

TABELA 4.1. Matriz do planejamento para a extração dos compostos fixos por ESL-EAU e as respostas dependentes.

Ensaio	Mistura Extratora ^a	Tempo ^b	“Molecular features”		Área total ^c		
			1 ^d	2 ^d	1 ^d	2 ^d	Soma (Σ)
1	1 (70%)	1 (35)	3165	2354	$2,19 \times 10^8$	$3,58 \times 10^9$	$3,79 \times 10^9$
2	-1 (30%)	1(35)	2632	2391	$3,15 \times 10^9$	$3,11 \times 10^9$	$6,26 \times 10^9$
3	1 (70%)	-1 (5)	2906	2682	$2,54 \times 10^8$	$2,74 \times 10^9$	$2,99 \times 10^9$
4	-1 (30%)	-1 (5)	3017	2181	$3,23 \times 10^9$	$3,30 \times 10^9$	$6,52 \times 10^9$
5	0 (50%)	0 (20)	3288	2329	$4,41 \times 10^9$	$2,99 \times 10^9$	$7,40 \times 10^9$
6	0 (50%)	0 (20)	3285	2235	$4,57 \times 10^9$	$3,20 \times 10^9$	$7,77 \times 10^9$
7	0 (50%)	0 (20)	3346	2449	$5,36 \times 10^9$	$3,88 \times 10^9$	$9,24 \times 10^9$
8	0 (50%)	0 (20)	3168	2146	$4,38 \times 10^9$	$4,08 \times 10^9$	$8,46 \times 10^9$

a = solução de etanol; b = tempo em minutos; c = somatório das áreas dos compostos obtidos no primeiro e segundo ciclo de extração; d = os números 1 e 2 se referem ao primeiro e segundo ciclo de extração.

Podemos verificar na Tabela 4.1 que a quantidade de compostos (“molecular features”) teve uma variação de 1,3 vezes entre o menor (2632) e o

maior (3346) valor obtido, independente do primeiro ou segundo ciclo de extração. Já a variação na área total quando consideramos o somatório dos dois ciclos de extração teve uma variação de mais que 3 vezes entre o menor ($2,99 \times 10^9$) e o maior valor ($9,24 \times 10^9$). A partir dos resultados obtidos, calculamos os efeitos de cada variável independente com base no número de compostos obtidos no primeiro ciclo de extração e no somatório da área dos compostos obtidos em ambos os ciclos. Nós desconsideramos a quantidade de compostos obtidos no segundo ciclo, pois comparando os cromatogramas após o processo de deconvolução, não verificamos a extração de moléculas diferentes no segundo ciclo de extração. Entretanto, vale destacar que a renovação do solvente extrator nas múltiplas extrações levou ao retorno às condições iniciais de equilíbrio sólido-líquido e favoreceu uma partição das moléculas extraíveis da matriz para o solvente. Assim, as múltiplas extrações proporcionaram uma extração mais completa do conteúdo total dos compostos químicos da matriz.¹⁵⁸ Por isso, para o cálculo dos efeitos de cada variável, consideramos o somatório das áreas dos compostos extraídos nos dois ciclos de extração.

Os valores das respostas foram transformados em um peso dimensional denominado desejabilidade individual (d_i). A desejabilidade global (D_g) foi derivada do cálculo da média geométrica dos valores de d_i de cada experimento.¹³⁹ Estes dados podem ser observados na Tabela 4.2.

Os valores de desejabilidade variam em uma escala de 0 a 1, sendo considerados desejáveis quanto mais próximos os valores forem de 1.¹⁵⁹ Baseando nisso, podemos considerar que os experimentos no ponto central apresentaram valores de desejabilidade adequados (superiores à 0,80). Os experimentos 1 e 4 apresentaram valores de desejabilidade superiores à 0,44, indicando a necessidade de alguns ajustes nos experimentos. Já os experimentos 2 e 3 apresentaram valores inferiores à 0,26 que indicam baixa eficiência para a extração. Com base nestes resultados, gráficos de efeito foram construídos a partir dos dados de D_g conforme mostrado na Figura 4.4.

TABELA 4.2. Valores de desejabilidade individual e global obtidos ao avaliarmos a mistura extratora e o tempo na ESL-EAU.

Ensaio	Mistura Extratora ^a	Tempo ^b	Mistura Extratora	Tempo	Dg
			di	di	
1	1 (70%)	1 (35)	0,75	0,13	0,44
2	-1 (30%)	1(35)	0,00	0,52	0,26
3	1 (70%)	-1 (5)	0,38	0,00	0,19
4	-1 (30%)	-1 (5)	0,54	0,57	0,55
5	0 (50%)	0 (20)	0,92	0,71	0,81
6	0 (50%)	0 (20)	0,91	0,76	0,84
7	0 (50%)	0 (20)	1,00	1,00	1,00
8	0 (50%)	0 (20)	0,75	0,87	0,81

a = solução de etanol; b = tempo em minutos; di = desejabilidade individual e Dg = desejabilidade global.

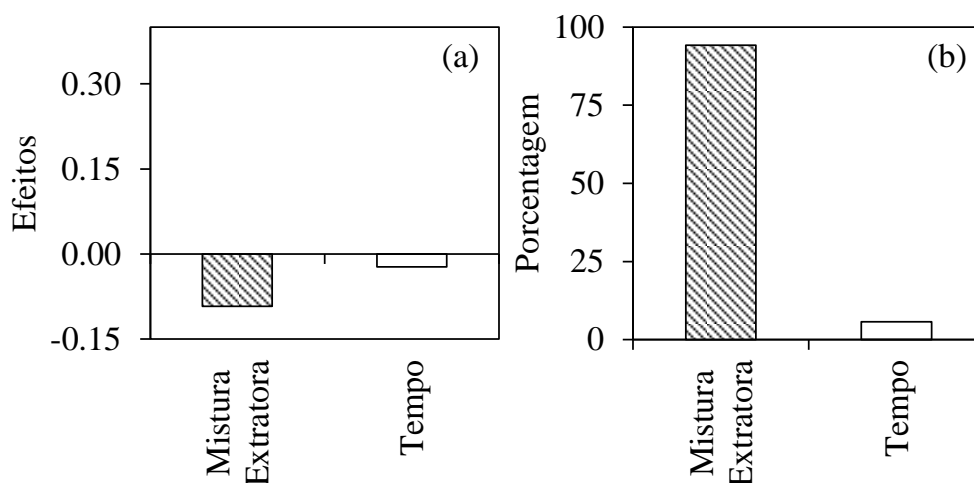


FIGURA 4.4. Representação dos efeitos das variáveis investigadas sobre a ESL-EAU. Sendo as variáveis avaliadas a mistura extratora, o tempo de extração e a interação entre as duas.

Na Figura 4.4. podemos verificar que a mistura extratora apresentou maior influência sobre o processo de extração em comparação com o tempo, que apresentou efeito negligenciável (inferior à 10%).

O efeito negativo da composição da mistura extratora (Figura 4.4) indicou menor extração dos compostos em maiores concentrações de solvente orgânico. Resultados semelhantes também foram obtidos por Li et al. (2019)¹⁶⁰ e Gao et al. (2021)¹⁶¹ utilizando proporções de etanol em torno de 60% (v v⁻¹) para a extração de polifenóis. Verificamos assim, que a mudança na polaridade do solvente interfere diretamente na eficiência da extração dos metabólitos, uma vez que a polaridade da mistura extratora deve ser compatível com a polaridade das moléculas alvo.¹⁶¹ Os nossos dados também demonstram que a diminuição na concentração do etanol para 30% (v v⁻¹) não foi favorável para a eficiência de extração, cujo o platô foi atingido com 50% (v v⁻¹) de etanol na composição. Além disso, também verificamos que mesmo que o efeito negativo do tempo possa ser negligenciado, ao utilizamos o tempo de 20 min, obtivemos as melhores eficiências de extração em comparação com os outros tempos avaliados (veja os resultados apresentados para os experimentos de 5 a 8, Tabela 4.2).

Estes resultados podem ser melhor observados ao compararmos os cromatogramas obtidos para a análise da amostra obtida de acordo com o experimento 1, 5-8. Na Figura 4.5 destacamos os *molecular features* detectados nos primeiros 5 min da eluição cromatográfica. Após o processo de deconvolução, verificamos o aumento na área dos metabólitos extraídos ao utilizarmos 60% (v v⁻¹) de etanol como mistura extratora e 20 min de extração.

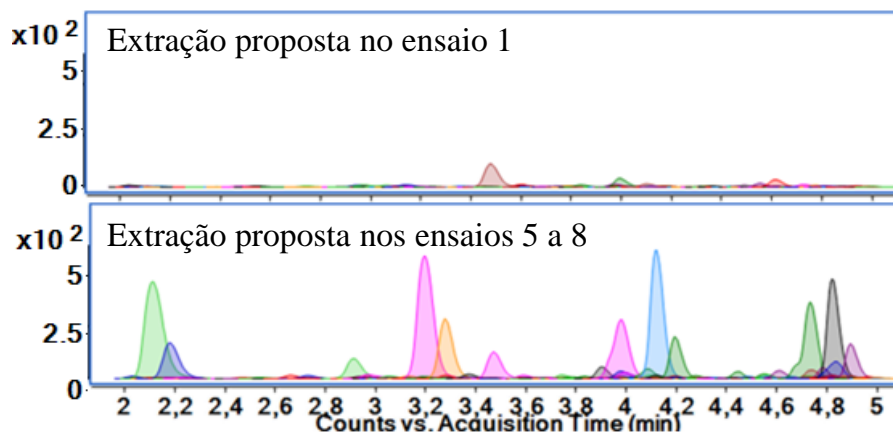


FIGURA 4.5. Cromatograma dos compostos totais extraídos para as amostras obtidas no experimento 1 e nos experimentos no ponto central (5 a 8).

Para selecionar o modelo mais adequado entre os diversos ajustes aos dados experimentais, realizamos a análise de variância dos dados que pode ser verificada na Tabela 4.5.

TABELA 4.3. Análise de variância (nível de confiança de 95%) para a ESL.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	F_{tab}
Regressão	0,0809	3	0,0270	0,2015	6,59
Resíduo	0,5354	4	0,1338		
Total	0,6163	7	0,0880		
Erro puro	0,0244	4	0,081	62,79	10,13
Falta de ajuste	0,5110	1	0,510		
r^2	0,9604				

Obtivemos um valor de r^2 de 0,9604, indicando que o modelo de regressão explicaria pelo menos 96% da variabilidade das respostas. Entretanto, uma análise mais minuciosa demonstrou que um modelo de regressão não é

adequado para prever valores. Verificamos que o valor de F foi inferior ao valor de F_{tab} . Entretanto, o valor de F devem ser cerca de 10 vezes maior do que o F_{tab} .¹⁶² Além disso houve uma falta de ajuste significativa, confirmando que os dados apresentados não se ajustam ao modelo de regressão. Estes dados indicam que para a proposição de um modelo de regressão, seria necessário ajustar os intervalos avaliados no planejamento fatorial como também incorporarmos pontos axiais em busca de um intervalo com significância estatística para propormos um modelo com maior capacidade preditiva.

Com base nos dados apresentados, optamos por realizar a extração dos metabólitos fixos utilizando solução de etanol a 50% v v⁻¹ por 20 min em banho ultrassônico. Esta metodologia tem a vantagem de permitir a extração de múltiplas amostras simultaneamente nas mesmas condições operacionais. Além disso, seguimos realizando dois ciclos de extração. Este processo foi realizado para a extração dos metabólitos das folhas de tomate em diferentes estágios de desenvolvimento. Após o preparo das amostras para as análises por UHPLC-q-TOF-MS/MS, o solvente foi evaporado e realizamos a derivatização e análise por CG-EM, como descrito em *4.2.4.1 Compostos orgânicos não voláteis das folhas de tomate*.

Uma ilustração dos cromatogramas obtidos pode ser verificada na Figura 4.6. Verificamos que o método de extração avaliado também é eficiente para a análise de moléculas do metabolismo primário, uma vez que a análise das amostras após a derivatização permitiu a identificação de moléculas pertencentes as classes dos ácidos graxos, ácidos orgânicos e carboidratos. Estas informações adicionais, nos auxiliarão na avaliação das semelhanças e diferenças entre os dois cultivares selecionados para este estudo.

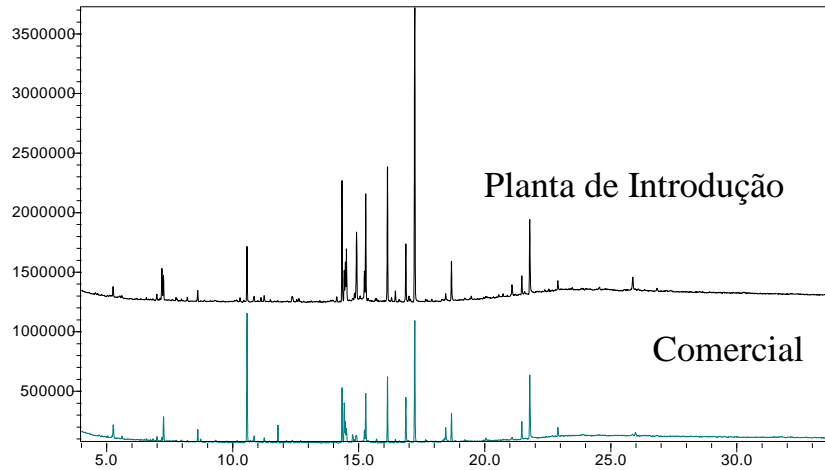


FIGURA 4.6. Representação dos cromatogramas obtidos após o processo de derivatização e análises por CG-EM.

4.3.3 Compostos orgânicos voláteis nas folhas de tomate

A extração de compostos voláteis por *headspace* estático é uma técnica automatizada que requer pouco ou nenhum preparo da amostra, diminuindo a possibilidade de contaminação, decomposição e volatilização prévia das moléculas.¹⁶³ Esta técnica também garante que apenas as moléculas voláteis sejam introduzidas no injetor do sistema cromatográfico,¹⁶⁴ minimizando o número de etapas e o efeito de matriz em comparação com os métodos tradicionalmente utilizados (por exemplo, extração sólido-líquido). Levando em consideração estas vantagens, a técnica foi avaliada neste estudo. Avaliamos a influência da força iônica e do tempo na extração das moléculas voláteis no número de compostos e na área como apresentado na Tabela 4.4.

Para a extração dos compostos orgânicos voláteis, observamos que a quantidade de compostos teve uma variação de pelo menos 3 e 12 vezes entre o maior (29 compostos e $1,09 \times 10^7$ de área total) e menor (9 compostos e $9,02 \times 10^5$ de área total) valor obtido considerando o número e o somatório da área para os compostos extraídos. Estes resultados foram convertidos em valores de desejabilidade global (Tabela 4.5) e utilizados para calcularmos os efeitos de cada variável (Figura 4.7).

TABELA 4.4. Matriz do planejamento para a extração compostos voláteis por *headspace* e as respostas dependentes.

Ensaio	Força iônica ^a	Tempo ^b	Nº de compostos	Área
1	1	1	25	4,22×10 ⁶
2	-1	1	20	2,15×10 ⁶
3	1	-1	29	1,09×10 ⁷
4	-1	-1	9	9,02×10 ⁵
5	0	0	11	1,86×10 ⁶
6	0	0	13	1,40×10 ⁶
7	0	0	10	2,06×10 ⁶
8	0	0	13	1,47×10 ⁶

TABELA 4.5. Valores de desejabilidade individual e global obtidos ao avaliarmos a força iônica e o tempo na extração por *headspace*.

Ensaio	Força iônica ^a	Tempo ^b	Nº de compostos		Dg
			di	di	
1	1	1	0,80	0,33	0,57
2	-1	1	0,55	0,12	0,34
3	1	-1	1,00	1,00	1,00
4	-1	-1	0,00	0,00	0,00
5	0	0	0,10	0,10	0,10
6	0	0	0,20	0,05	0,12
7	0	0	0,05	0,11	0,08
8	0	0	0,20	0,06	0,13

É interessante destacarmos que ao contrário do observado para a ESL, na extração por *headspace* os experimentos realizados no ponto central foram os que apresentaram valores de desejabilidade global insatisfatórios ($<0,20$). Além disso, se considerarmos o desvio padrão relativo para as replicatas no ponto central, verificamos uma distribuição nos dados de 21%. Entretanto, como a técnica de *headspace* apresenta limitações para a sua reprodutibilidade, como a qualidade do septo e a amostragem utilizando temperatura controlada, consideramos aceitáveis limites de desvio padrão relativo de até 20%.¹²⁴

Na Figura 4.7 observamos um efeito positivo da força iônica na extração dos compostos voláteis (efeito $>10\%$), indicando uma melhoria na eficiência e sensibilidade da extração com a adição de solução de NaCl.

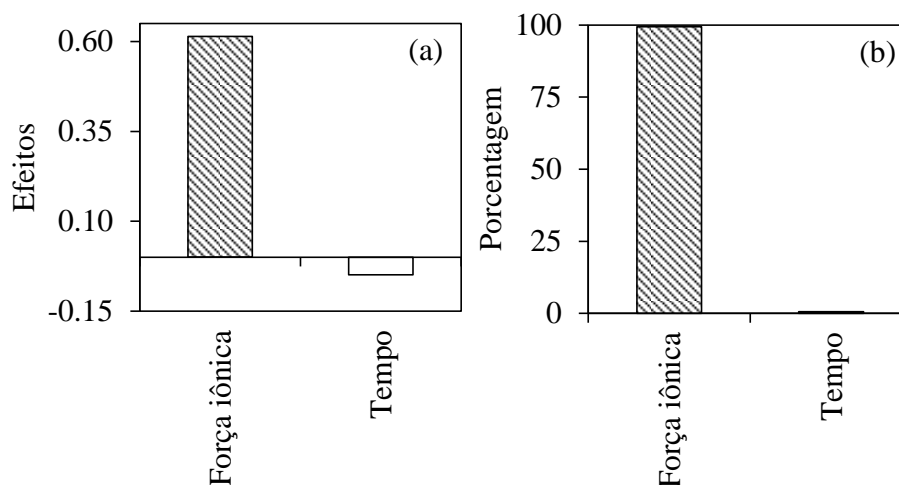


FIGURA 4.7. Representação dos efeitos das variáveis investigadas sobre a extração por headspace. Sendo as variáveis avaliadas a força iônica e o tempo de extração.

O aumento na força iônica promovido pela adição de um sal inorgânico numa solução pode reduzir a solubilidade dos compostos orgânicos na matriz (como as folhas de tomate) e acelerar a sua liberação para o *headspace* (denominado de efeito *salting out*).¹⁶⁵

Para avaliarmos um modelo de regressão adequado, realizamos a análise de variância dos dados (Tabela 4.6). Obtivemos um valor de r^2 de 0,9982. Entretanto, assim como o observado para a ESL, verificamos que um modelo de regressão não foi adequado para prever valores e há uma diferença significativa entre a falta de ajuste e o erro puro, confirmando que os dados apresentados não se ajustam ao modelo de regressão.

Com base nos resultados, selecionamos as condições de extração do experimento 3 para seguirmos com a análise dos metabólitos produzidos pelas plantas de tomate nos diferentes estágios de desenvolvimento. Assim, utilizamos solução de NaCl (30% m v⁻¹) e tempo de aquecimento de 5 min, para a extração dos compostos voláteis utilizando 100 mg de amostra e 75°C.

TABELA 4.6. Análise de variância (nível de confiança de 95%) para a extração por *headspace*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	F_{tab}
Regressão	0,5284	3	0,1761	2,5955	6,59
Resíduo	0,2714	4	0,0679		
Total	0,7998	7	0,1143		
Erro puro	0,0014	4	0,0005	566,84	10,13
Falta de ajuste	0,2799	1	0,2700		
r^2	0,9982				

4.3.4 Caracterização química das folhas de tomate

Os compostos orgânicos primários, secundários e os voláteis foram extraídos e avaliados das folhas de tomate utilizando os protocolos de extração que desenvolvemos. Uma vez selecionados os métodos de extração, a composição dos metabólitos nos cultivares foi individualmente avaliada. Os

estágios de desenvolvimento (Figura 4.9). Esta abordagem não supervisionada sugeriu uma maior diferenciação na composição química das plantas de tomate na fase de plântula em comparação com os outros estágios.

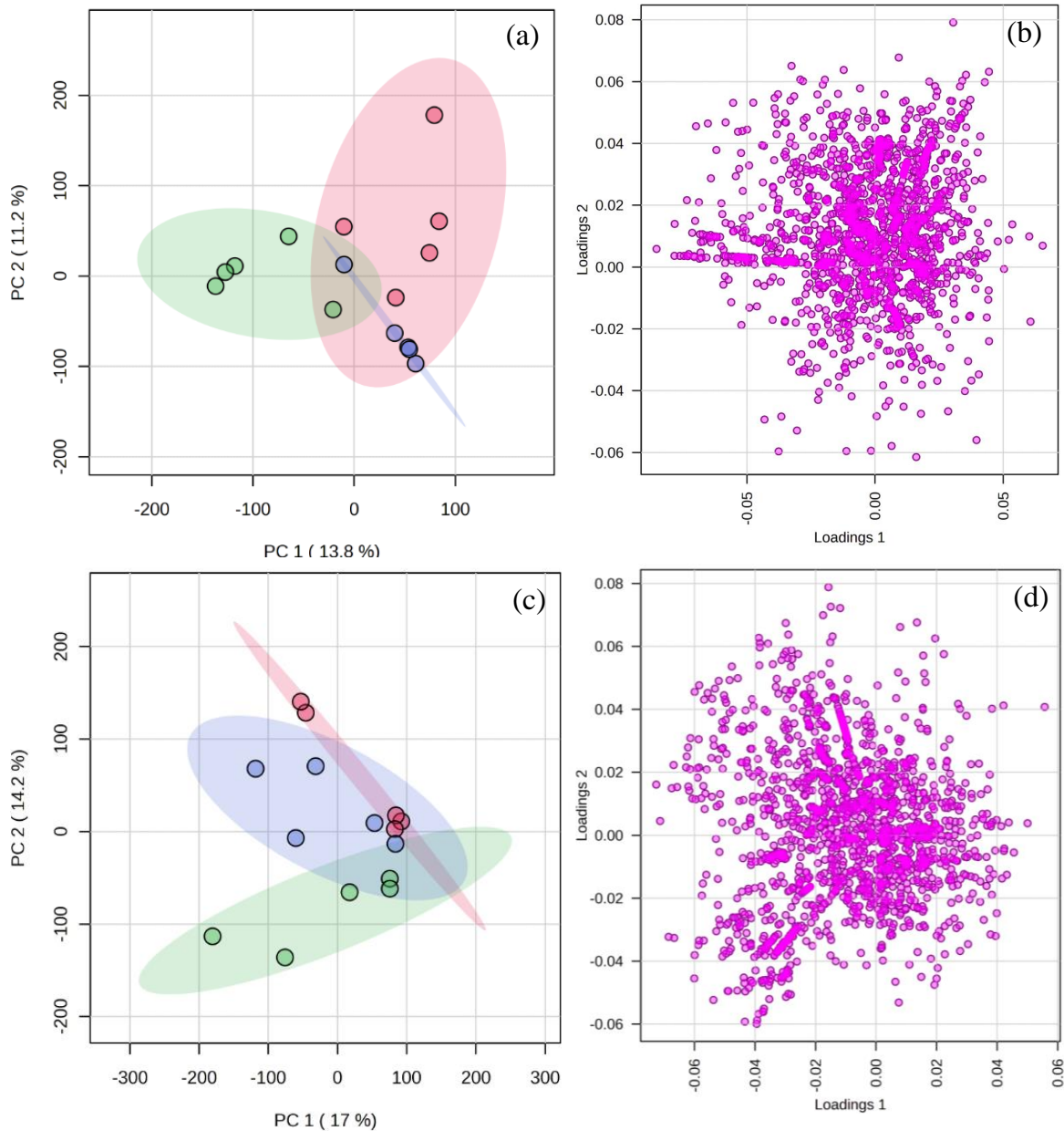


FIGURA 4.9. Gráficos de *scores* (a) e *loadings* (b) para a primeira e segunda componentes das amostras de *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* (c – *scores* e d - *loadings*) nos estágios de plântula, crescimento vegetativo e floração.

O estabelecimento da plântula (ou mudas) é uma das etapas cruciais durante o ciclo de vida das plantas.¹⁶⁶ Este estágio é caracterizado pelo rápido crescimento radicular com posterior alongamento do epicótilo (caule embrionário das plantas). Por isso, esta etapa é acompanhada por intensa e complexa atividade metabólica.^{166,167}

Avaliando os metabolitos que podem ser relacionados a esta maior diferenciação dos cultivares em estágio de plântula (Figura 4.9b), selecionamos algumas moléculas que foram identificadas na Figura 4.10.

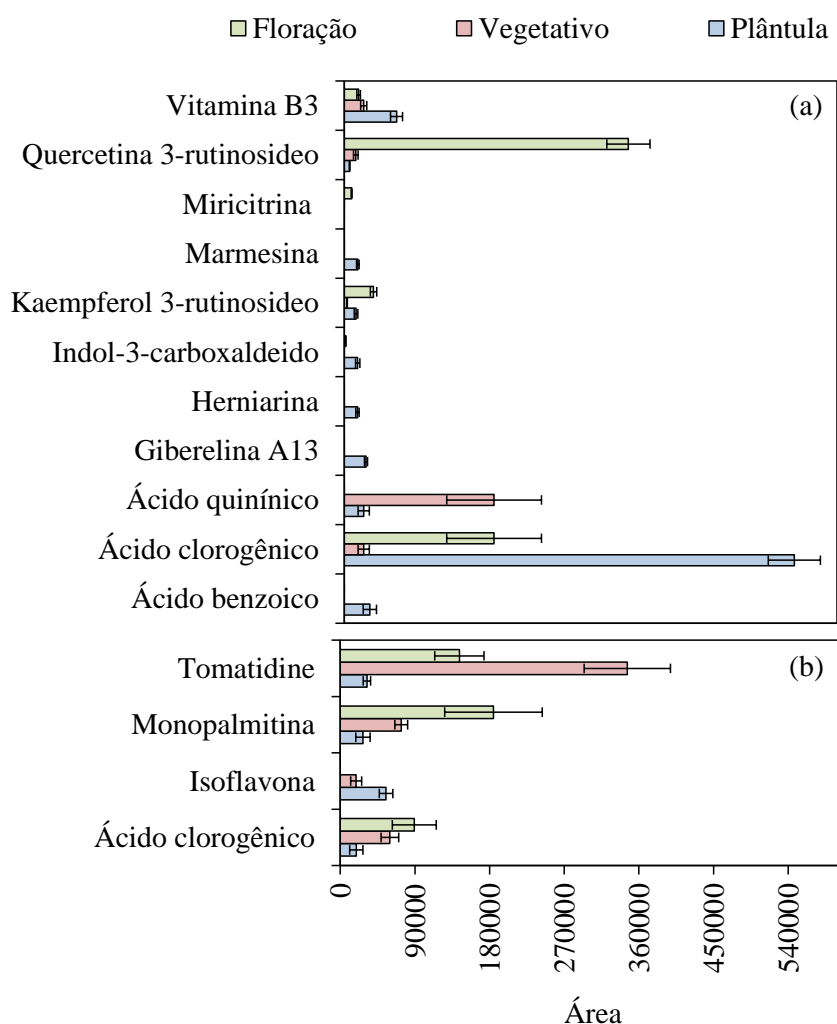


FIGURA 4.10. Compostos cuja variação na área durante os estágios de variação foram determinantes para o agrupamento na análise por PCA para o cultivo *S. pimpinellifolium* (a) e *S. lycopersicum* (b).

Dentre as moléculas apresentadas, a giberelina A13 se destaca, pois foi detectada apenas nas plantas no estágio de plântula do cultivar *S. pimpinellifolium*. Seu cromatograma, espectro de massas do pico base e estrutura química pode ser observado na Figura 4.11a.

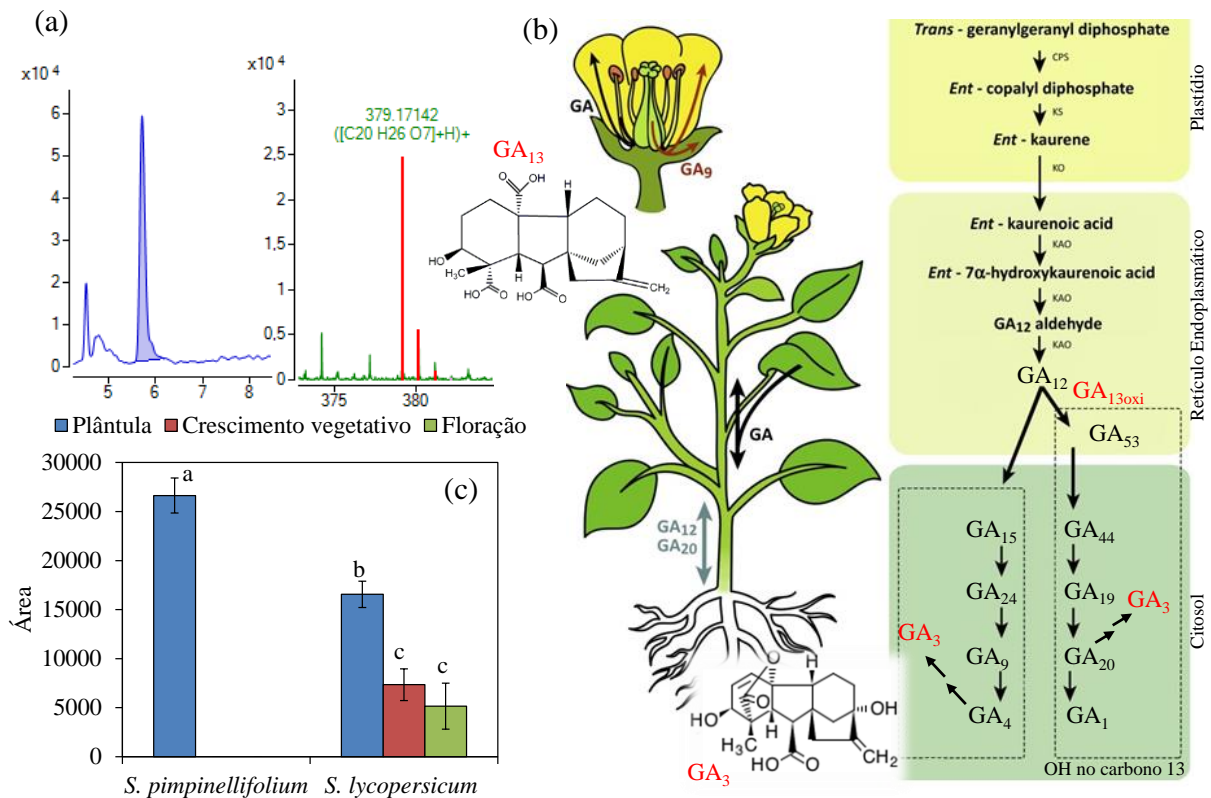


FIGURA 4.11. Cromatograma e espectro de massas com destaque para a massa do pico base da giberelina A13. Resumo da biossíntese das giberelinas (b). Variação na área da giberelina A13 em função do cultivar e do estágio de desenvolvimento (c). Letras diferentes no topo das barras representam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

Adaptado: Rota biossintética das giberelinas de Binenbaum et al. (2018).¹⁶⁸

A giberelina A13 (GA₁₃) é uma forma não biologicamente ativa do ácido giberélico (GA₃). As giberelinas são fitormônios que desempenham um papel fundamental na germinação das sementes, expansão das folhas e

alongamento dos caules.^{168,169} Características que justificam a detecção destas moléculas nas plantas em estágio de plântula. As giberelinas se movimentam ao longo das plantas por meio de seus precursores não bioativos para realizar as suas funções. Entretanto, como elas se movimentam ou onde se acumulam ainda são pontos que precisam de investigação.¹⁶⁸

A giberelina A₁₃ é um intermediário para a conversão da giberelina A₁₂ para seus derivados com hidroxilação no carbono 13, que são consideradas as formas biologicamente mais ativas.¹⁶⁸ Na Figura 4.11 observamos que para o cultivar comercial (*S. lycopersicum*) não ocorreu uma grande modulação da giberelina A₁₃, sendo esta detectada em todos os estágios de desenvolvimento das plantas. Esta diferença observada em comparação com o cultivar de *S. pimpinellifolium* (Planta de Introdução) pode ser reflexo do processo de domesticação dos cultivares de tomate. A manipulação no metabolismo das giberelinas, seja por meio de alterações genéticas ou por aplicação exógena das moléculas, é um dos caminhos utilizado pelos melhoristas de plantas para gerar plantas com características agronômicas desejáveis, como uma rápida e eficiente germinação, obtenção de plantas com maiores folhas para favorecer o processo biossintético e melhorar o rendimento das culturas.¹⁷⁰

O ácido clorogênico também foi associado ao agrupamento dos cultivares em função do estágio de desenvolvimento no gráfico de PCA apresentado na Figura 4.9 e seu impacto foi maior no cultivar de *S. pimpinellifolium*. O ácido clorogênico é um dos principais produtos da biossíntese dos fenilpropanoides e, além de contribuir com as respostas das plantas à estresses bióticos e abióticos, está relacionado ao processo de enraizamento das plantas (Figura 4.12).¹⁷¹

Um ponto interessante para se observar é que durante o estágio de floração é possível verificarmos no caule das plantas de tomate a formação de raízes adventícias (Figura 4.12). O ácido clorogênico em conjunto com outros compostos fenólicos pode estimular a auxina, atuando como cofatores para o

início do crescimento da raiz,¹⁷² mas também podem atuar como precursores da formação de lignina.¹⁷¹ Outro ponto importante para considerarmos é que o cultivar comercial apresentou maior produção de raízes adventícias. O desenvolvimento de novas raízes na parte aérea das plantas é um importante fator para estimular a sobrevivência das plantas sob condições ambientais adversas (estresses hídrico, salino e bióticos).¹⁷³ Por exemplo, a formação de raízes adventícias é frequentemente estimulada em plantas de tomate em condições de inundação.¹⁷⁴ Este processo pode ter sido estimulado nas plantas do cultivar comercial durante o processo de melhoramento das plantas. Vale destacar que o processo de enraizamento adventício é complexo e envolve uma série de moléculas além do ácido clorogênico.¹⁷³

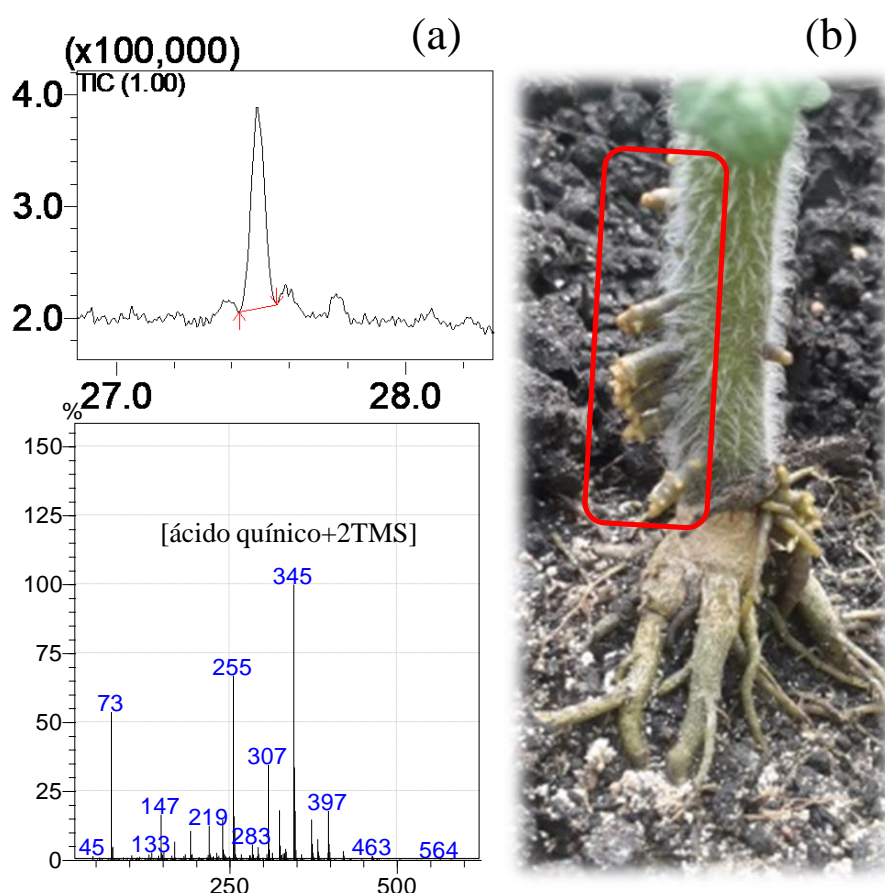


FIGURA 4.12. Cromatograma e espectro de massas para o ácido clorogênico (a). Representação de raízes adventícias no caule do tomate (b).

Ainda em relação a biossíntese dos fenilpropanoides, verificamos que as moléculas de kaempferol e quercetina glicosiladas (rutina) tiveram influência no agrupamento das plantas do cultivar de *S. pimpinellifolium* (Figura 4.13). Estas moléculas estão associadas a atividade antioxidante, proteção contra a luz UV e mecanismos de resistência entre as plantas e patógenos.¹⁷⁵ O grau de glicosilação nestas moléculas é um fator importante para determinar a sua capacidade de transporte no tecido celular.¹⁷⁶ Alguns estudos demonstraram que o processo de domesticação pode inibir a produção destas moléculas em cultivares comerciais e o cruzamento com espécies selvagens podem restaurar a via dos flavonóis.¹⁷⁷

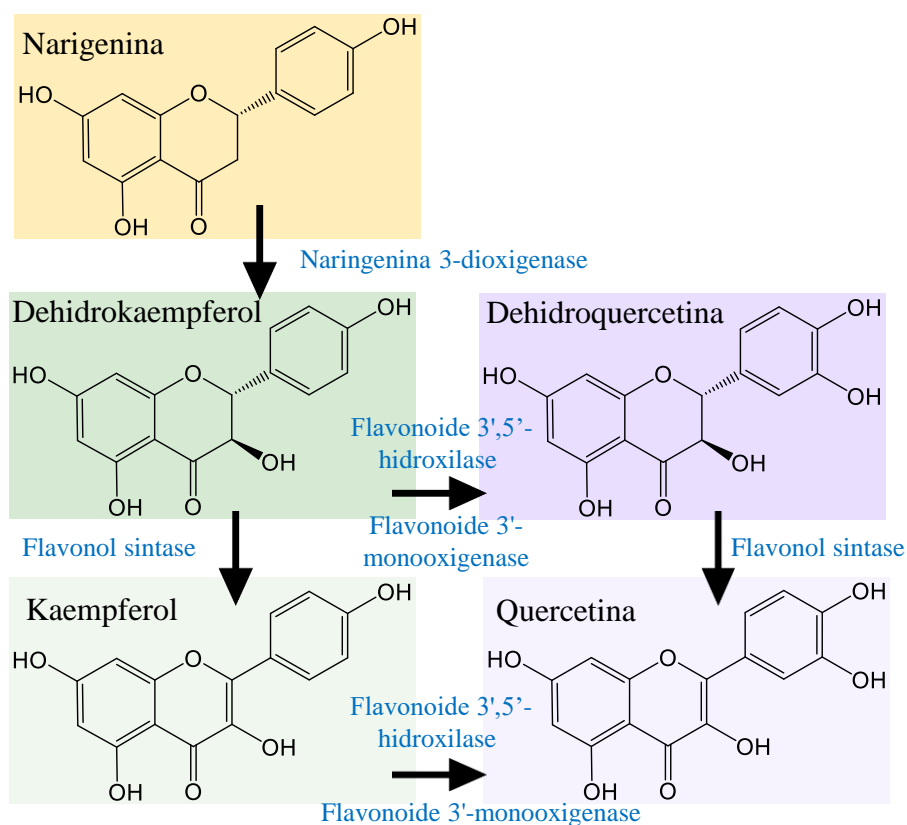


FIGURA 4.13. Obtenção das moléculas de kaempferol e quercetina a partir da molécula de narigenina (via dos fenilpropanoides).

Adaptado: KEGG Pathway Maps.

Um contraponto interessante sobre a biossíntese dos fenilpropanoides nos cultivares de tomate em estudo é que, enquanto o cultivar designado como Planta de Introdução possui uma modulação dos flavonóis glicosilados durante os estágios de desenvolvimento, o cultivar comercial (*S. lycopersicum*) apresentou uma modulação na biossíntese da cianidina (detectada em quantidades traço), uma antocianina, e da sua isoflavona precursora, a leucocianidina (veja a Figura 4.14).

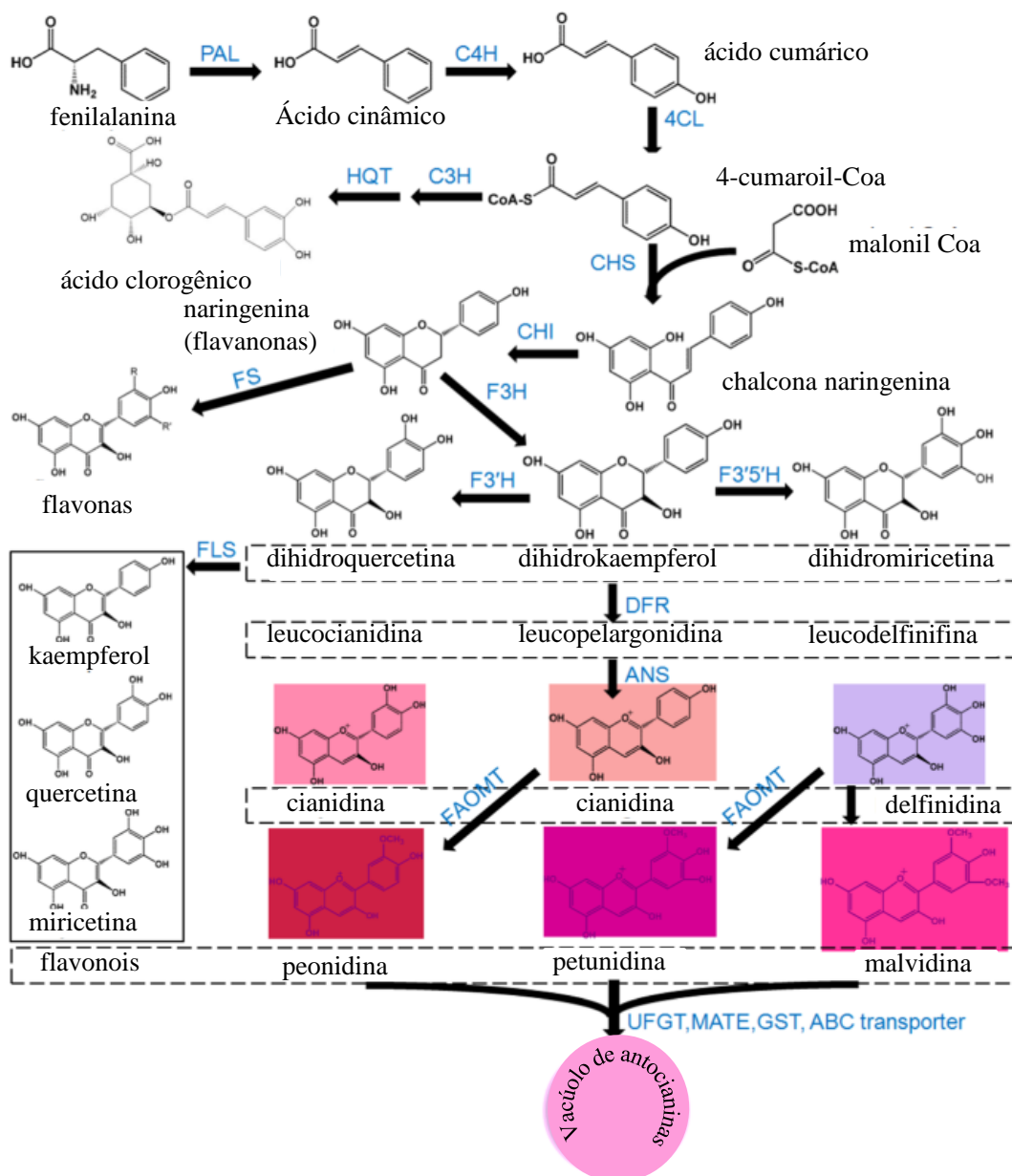


FIGURA 4.14. Representação esquemática da via dos fenilpropanoides, com destaque para a biossíntese de antocianinas.

Adaptado: Zhang et al. (2019).¹⁷⁸

O estudo apresentado por Bovy et al. (2007)¹⁷⁵ indicou que uma inibição na atividade da enzima flavonol sintase (ou do inglês *Flavonol Synthase* – FLS, como representado na Figura 4.14), pode direcionar a conversão dos flavonóis (substratos dos processos moleculares das enzimas EFS) em antocianinas, impedindo o seu acúmulo e favorecendo o fluxo metabólico. Este processo também pode influenciar na coloração das flores e frutos das plantas de tomate, como destacamos na Figura 4.3. As flores do cultivar *S. lycopersicum* apresentam uma coloração mais intensa em comparação com o cultivar *S. pimpinellifolium*.

Nós verificamos que o conteúdo da antocianina foi maior nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas de *S. lycopersium*. Durante o desenvolvimento inicial das plantas, elas passam por um intenso período de estresse bioquímico para o desenvolvimento do sistema radicular e foliar e esta pode ser uma estratégia para maximizar o acúmulo de polifenóis com alta atividade antioxidante para a proteção contra eventuais estresses abióticos e bióticos, como o estresse hídrico e salino.¹⁷⁹ Este processo já foi observado em plantas de batata-doce.¹⁸⁰

Além de seu papel no caule e nas folhas, as antocianinas nas plantas são moléculas com ação antioxidante que podem prolongar a vida útil dos frutos.¹⁶¹ Entretanto, muitas variedades de tomate, incluindo o *S. lycopersicum* não apresentam a biossíntese destas moléculas no fruto. Este fato tem sido alvo de estudos com modulação genética para favorecer o desenvolvimento de cultivares com uma maior biodisponibilidade das antocianinas nos frutos devido a suas propriedades antiescleróticas, antitumorais e antidiabéticas.¹⁸¹

Vale destacar que o processo de acúmulo de antocianinas no tecido foliar das plantas de tomate não está diretamente relacionado ao processo de domesticação, uma vez que cultivares selvagens também apresentam esta característica.¹⁷⁵ Estes dados também demonstram que o controle transcricional coordenado dos genes biossintéticos estruturais pode ser um mecanismo para

determinar a composição final dos metabólitos secundários presentes nas plantas.

Por fim, destacamos também a molécula da tomatidina, um alcaloide esteroidal derivado metabolicamente do colesterol (Figura 4.15a) que apresentou modulação durante as fases de desenvolvimento das plantas de *S. lycopersicum* e foi umas das moléculas que influenciou no agrupamento das amostras deste cultivar (Figura 4.15b).

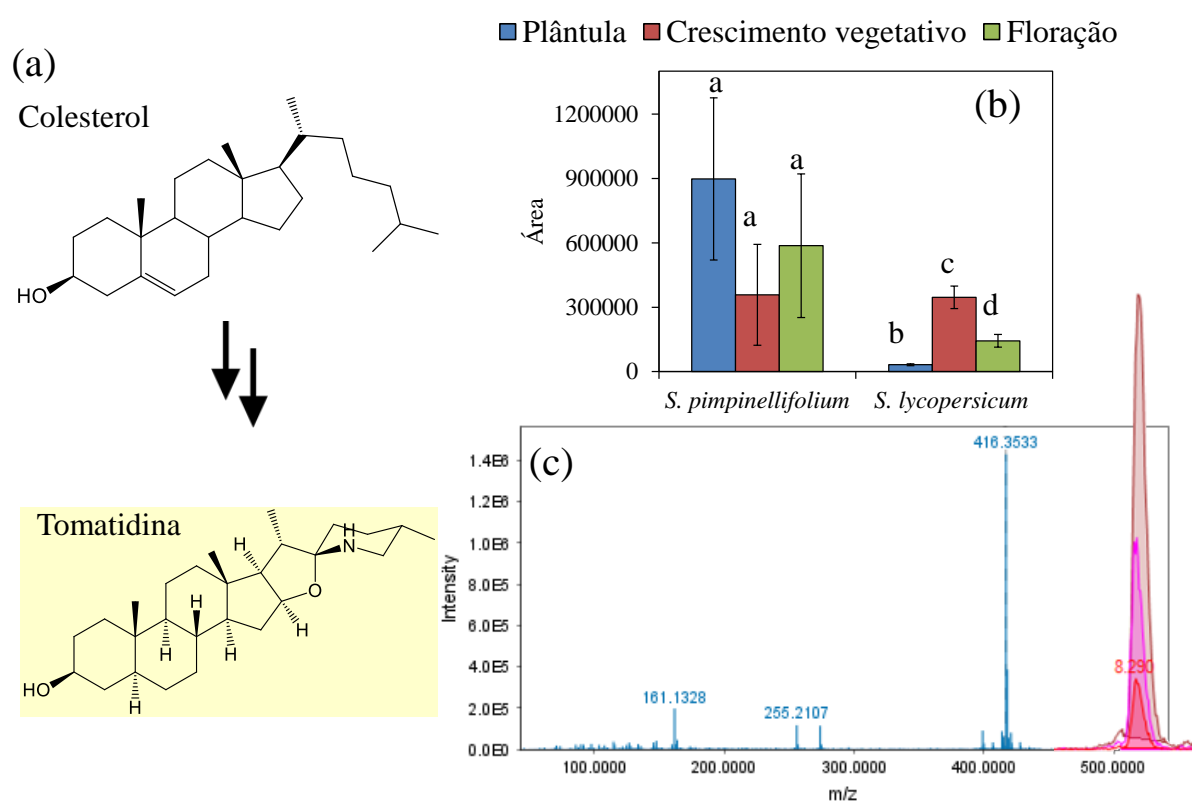


FIGURA 4.15. Resumo da biossíntese da tomatidina a partir do colesterol (a). Modulação na área da tomatidina em função das fases de desenvolvimento e do cultivar estudado. Letras diferentes no topo das barras representam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey. (b). Pico e espectro de massas da tomatidina (c).

Na Figura 4.15c apresentamos o espectro de massas para a tomatidina. O valor de m/z 416,3533 foi atribuído ao íon precursor $[M+H]^+$. Em seguida, observamos os fragmentos com valores de m/z 398,1846 (atribuído à perda de água, $[M-H_2O]^+$) e os fragmentos com m/z 273,2220, 255,2107 e 161,1328 que são atribuídos a fragmentação do núcleo espirossolano, estrutura base desta classe de alcaloides que contem um nitrogênio secundário. Sua fragmentação origina em uma série de hidrocarbonetos insaturados¹⁸², como demonstrado na Figura 4.16.

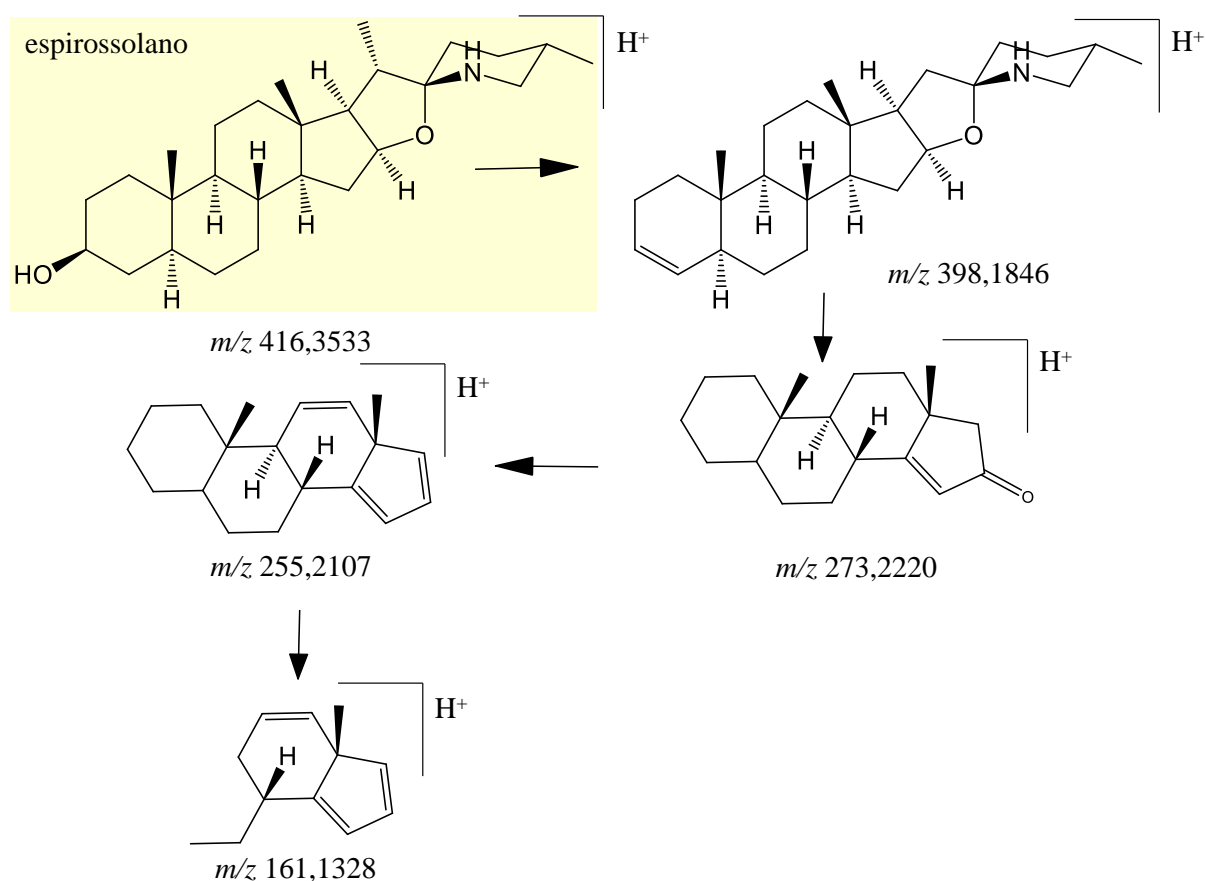


FIGURA 4.16. Etapas da fragmentação da tomatidina.

A tomatidina e seus glicosídeos podem ser encontrados em tecidos do tomateiro com uma cadeia ramificada de sacarídeos e são responsáveis pela defesa contra fitopatógenos, herbívoros e doenças do tomateiro. Em geral, a forma glicosilada da tomatidina apresenta melhores atividades antifúngicas.¹⁸³

Ao contrário das outras moléculas citadas anteriormente, a tomatidina é uma molécula frequentemente detectada em plantas de tomate domesticado e seus parentes selvagens.

Dentre a diversidade de moléculas encontradas em nosso estudo, os glicoalcaloides, como a tomatidina e seus derivados glicosilados também são sintetizados pelos frutos de tomate e têm sido associados à múltiplas propriedades benéficas de promoção da saúde, incluindo efeitos antibióticos, anticancerígenos, cardioprotetores, antiobesidade, antiaterosclerose e antiosteoporose.¹⁸⁴

4.3.6 *Influência dos cultivares no perfil químico das folhas de tomate*

Para auxiliar na distinção das respostas dos cultivares avaliados, nesta seção comparamos as modulações constitutivas confrontando as respostas apresentadas entre cada cultivar nos três estágios de desenvolvimento avaliados.

4.3.6.1 *Plântula*

Analisando os metabólitos produzidos por ambos os cultivares na fase de plântula, verificamos uma boa separação das amostras no gráfico de PCA (Figura 4.17a). Com base nisto, nós utilizamos o gráfico de *volcano* para identificar os metabólitos que diferiram significativamente entre os dois cultivares. O gráfico de *volcano* está apresentado na Figura 4.17b. O eixo *x* deste tipo de gráfico é o logaritmo do *fold change*, ou seja, a taxa de variação entre o valor máximo e mínimo entre as duas variáveis consideradas. O eixo *y* é o logaritmo do *p*-valor do *fold change*. Dessa forma, os pontos de interesse no gráfico são aqueles que aparecem mais próximos do topo e distantes do centro, ou seja, aqueles que têm alta significância estatística e acentuada variação de magnitude. Baseados nisto, extraímos as informações do gráfico de *volcano* e na Figura 4.17c apresentamos algumas das moléculas que tiveram uma variação significativa entre os dois cultivares.

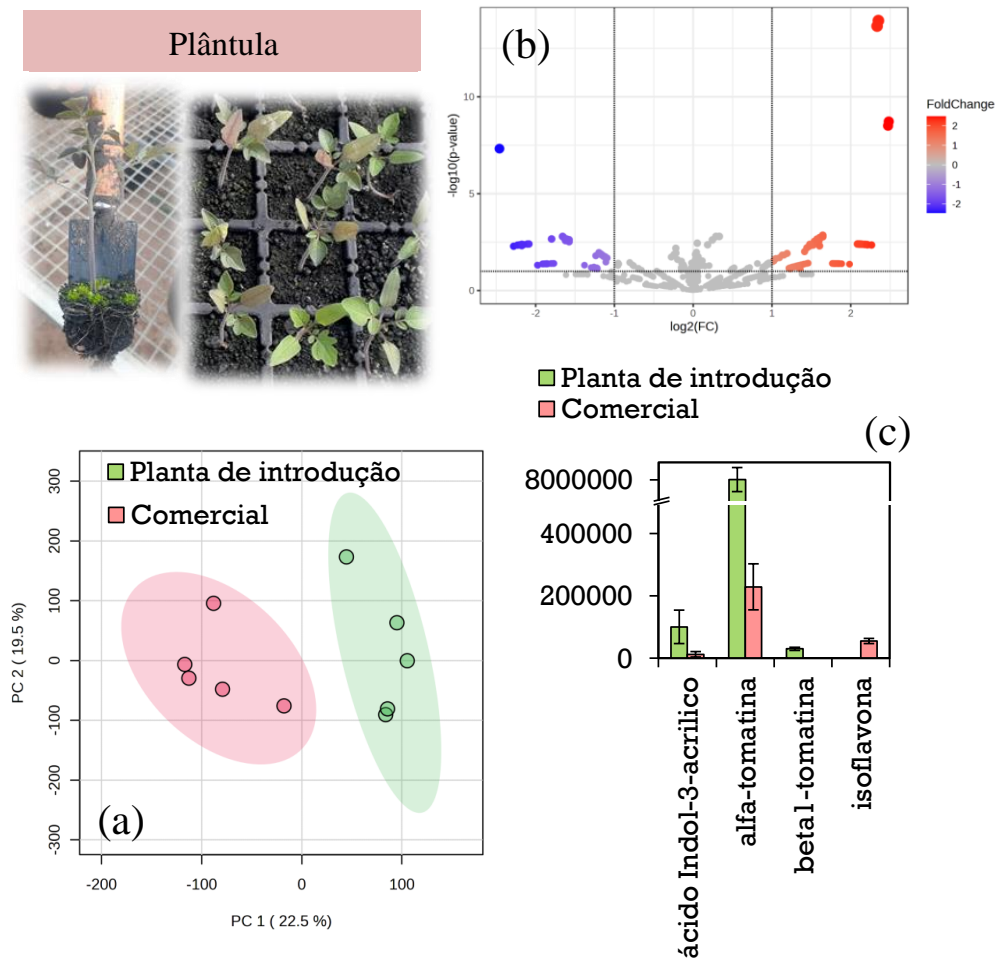


FIGURA 4.17. Fotografia das plantas em estágio de plântula. Gráfico de PCA (a) e volcano (b) obtidos comparando os metabólitos produzidos para as plantas em estágio de plântula. Moléculas diferencialmente expressas pelos cultivares (c)..

Pela Figura 4.17c, verificamos uma alteração significativa da *alfa* e *beta*-tomatina quando comparamos os dois cultivares em estágio de plântula. A *beta*-tomatina é um intermediário da biossíntese da *alfa*-tomatina (Figura 4.18), tendo, portanto uma forma biologicamente menos ativa que a *alfa*-tomatina, mas ainda colaborando na resistência à estresse abióticos em plantas de tomate.¹⁸³

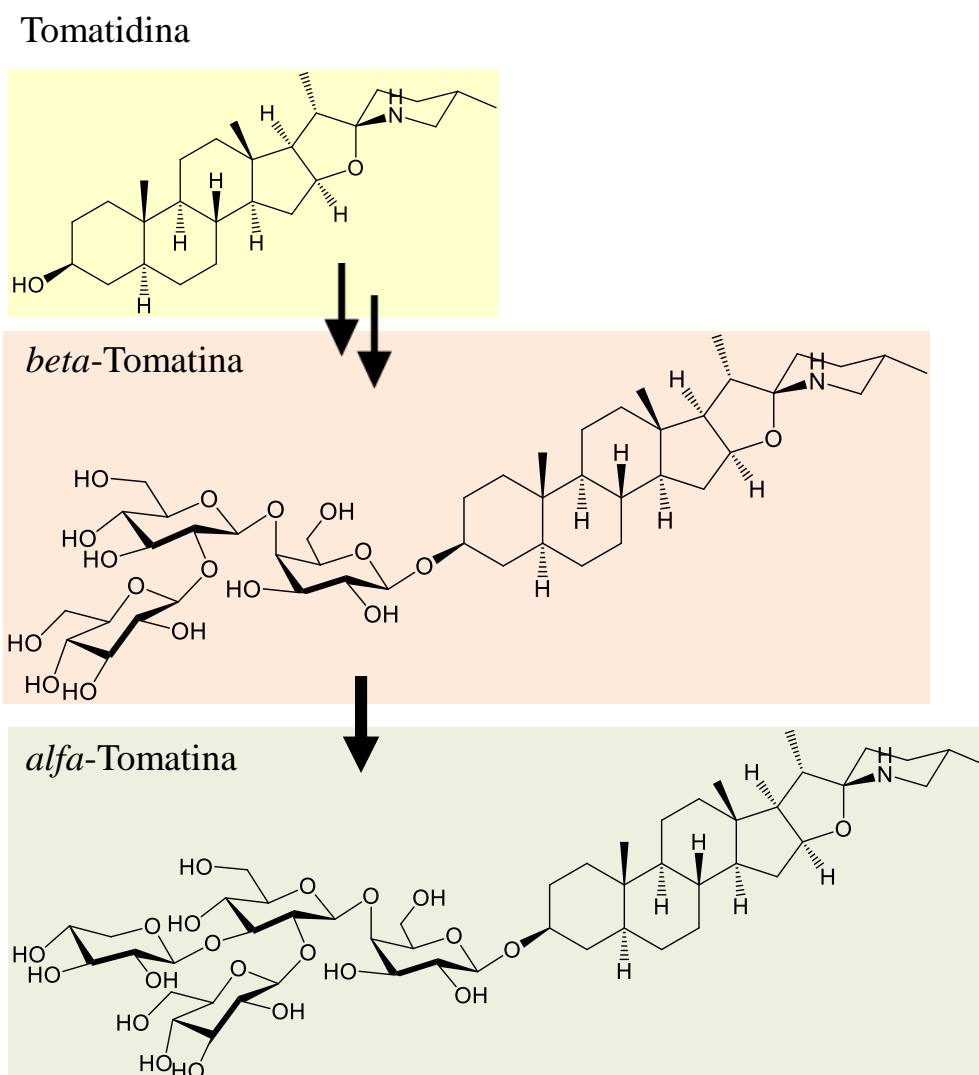


FIGURA 4.18. Biossíntese da *alfa*-tomatina e seu espectro de massas.

Na Figura 1.19 demonstramos algumas das etapas de fragmentação da molécula de *alfa*-tomatina. O valor de m/z 1034,5565 foi atribuído ao íon precursor $[M+H]^+$. Em seguida, observamos o fragmento com valor de m/z 1016, atribuído à perda de água do íon $[M+H]^+$. Em seguida, detectamos o valor de m/z 578,7749 que pode ser atribuído a perdas das duas unidades do monossacarídeo D-glicose e da unidade de xilose seguida pela perda de todas as unidades de monossacarídeos, apresentando assim o valor de m/z de 416,3537 referente a sua forma aglicona, a tomatidina. Estas estruturas podem ser observadas na Figura 4.19.^{185,186}

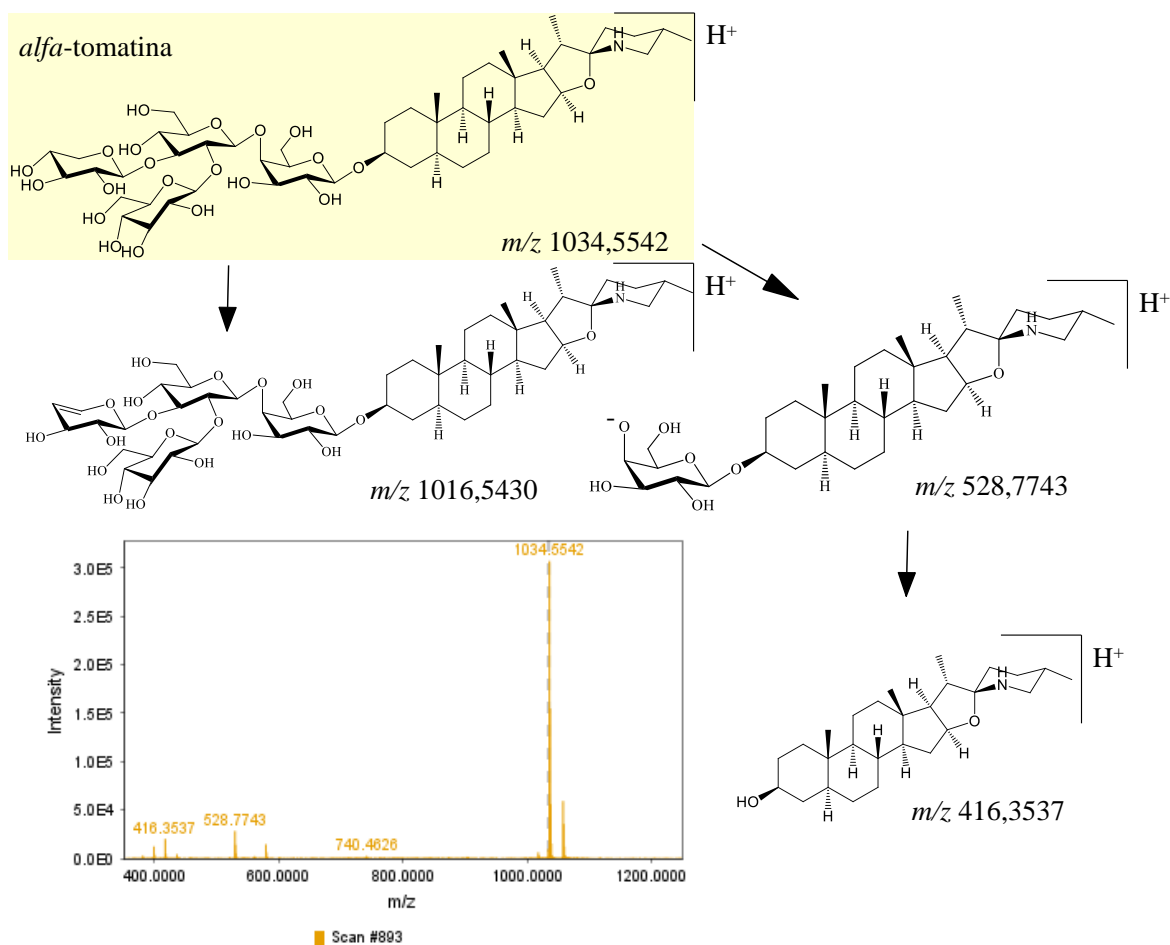


FIGURA 4.19. Etapas da fragmentação da *alpha*-tomatina.

É interessante observarmos que o cultivar comercial (*S. lycopersicum*) apresenta menor teor de *alpha*-tomatina e em geral é modulado pela tomatidina, quando comparado com o nosso cultivar considerado uma Planta de Introdução (*S. pimpinellifolium*). O processo de domesticação e melhoramento do tomate reduziu o conteúdo de glicoalcalóides para aumentar a palatabilidade dos frutos com a redução na biossíntese da *alpha*-tomatina, que tem sabor amargo.¹⁸⁴ Tal processo justificaria o maior teor destes glicoalcalóides em nosso cultivar designado como uma Planta de Introdução.

A *alpha*-tomatina é encontrada principalmente em tecidos verdes, como caules, folhas e frutos imaturos. Na fase de crescimento vegetativo e na fase inicial de crescimento e desenvolvimento reprodutivo, a *alpha*-tomatina atua

como um composto defensivo, auxiliando as plantas na resistência a doenças e infestações de insetos.¹⁸⁷ Além disso, a *alfa*-tomatina e sua aglicona secretada pelas raízes do tomate também atuam na rizosfera das plantas. Os efeitos destas moléculas nas comunidades bacterianas do solo foram avaliados *in vitro* por Nakayasu et al. (2021)¹⁸⁸, revelando que ambos os compostos influenciaram a microbiota de forma dependente da concentração. Estas moléculas modulam as comunidades bacterianas no solo e da rizosfera, favorecendo o crescimento de micro-organismos benéficos à cultura do tomate e, ao mesmo tempo, inibindo o crescimento de micro-organismos patógenos ao tomate.

Verificamos na Figura 4.20a com mais clareza a detecção da isoflavona (leucocianidina). Como discutimos anteriormente, esta isoflavona foi uma das moléculas responsáveis pela diferenciação das amostras do cultivar comercial durante os diferentes estágios de desenvolvimento das plantas. Avaliando cada estágio do desenvolvimento de maneira isolada, observamos que esta isoflavona e sua antocianina derivada foram apenas detectadas no cultivar comercial (*S. lycopersicum*). Este fato pode estar relacionado a coloração arroxeada das folhas de tomate que apenas foram detectados nas plantas do cultivar comercial (Figura 4.20a).

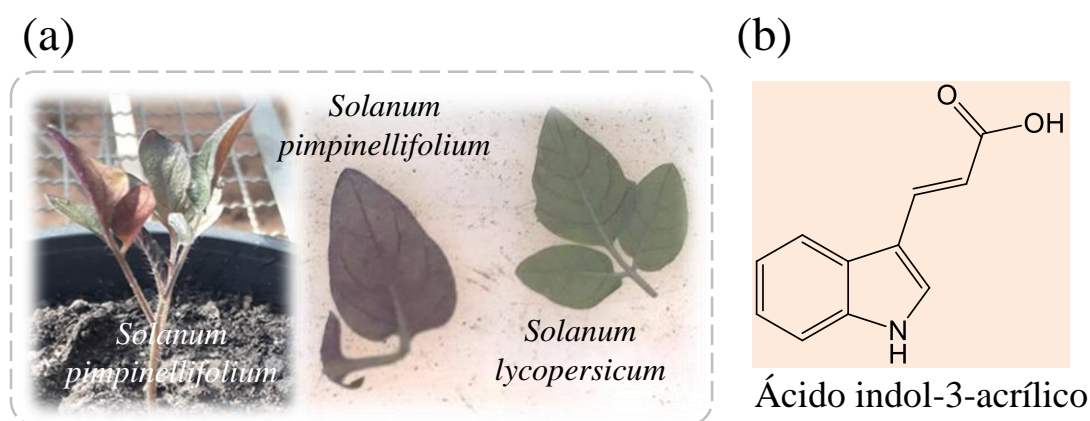


FIGURA 4.20. Fotografia demonstrando a diferença na coloração das folhas de tomate (a). Estrutura química do ácido indol-3-acrílico (b).

Na figura 4.20b também apresentamos a estrutura química do ácido indol-3-acrílico, uma das moléculas com maior indução no *S. pimpinellifolium* durante o estágio vegetativo. Esta molécula já foi isolada em plantas de tomate e pode estar relacionada ao metabolismo das auxinas. Assim, esta molécula está indiretamente relacionada ao crescimento do caule e nas alterações morfológicas das plantas.¹⁸⁹

4.3.6.2 *Crescimento vegetativo*

Na Figura 4.20 apresentamos uma ilustração das plantas em estágio de crescimento vegetativo, o gráfico de PCA (Figura 4.21a), *volcano* (Figura 4.20b) e alguns dos metabólitos diferencialmente expressos (Figura 4.21c).

Durante o crescimento vegetativo, observamos o desenvolvimento de um caule principal forte, um sistema radicular mais profundo e mais folhas e ramos, independente do cultivar estudado. Nesta etapa é importante que os tomateiros tenham bastante luz solar, água e nitrogênio para crescerem bem sendo uma das etapas em que os tomateiros consomem a maior quantidade e diversidade de nutrientes, enquanto que nas outras fases de desenvolvimento o consumo ocorre de maneira direcionada.¹⁹⁰

Nesta fase, o nitrogênio é importante para a formação da clorofila, responsável pelo desenvolvimento das raízes, caules e folhas. O nitrogênio promove o crescimento da altura das plantas, da área foliar e do número de flores.¹⁹⁰ Com o tempo, a copa foliar maior ajuda a gerar mais energia para a planta, que é necessária para as etapas seguintes. Uma molécula que pode ser relacionada ao ganho de energia na planta é o ácido glicérico, um dos produtos iniciais da fotossíntese.¹⁹¹

Esta molécula, assim como outros ácidos orgânicos estão envolvidos em inúmeras vias metabólicas em todas as plantas. O metabolismo dos ácidos orgânicos é de fundamental importância a nível celular para diversas vias bioquímicas, incluindo a produção de energia, a formação de precursores

para a biossíntese de aminoácidos e a nível de toda a planta auxiliando na modulação do metabolismo como uma estratégia de adaptação ao meio ambiente.¹⁹²

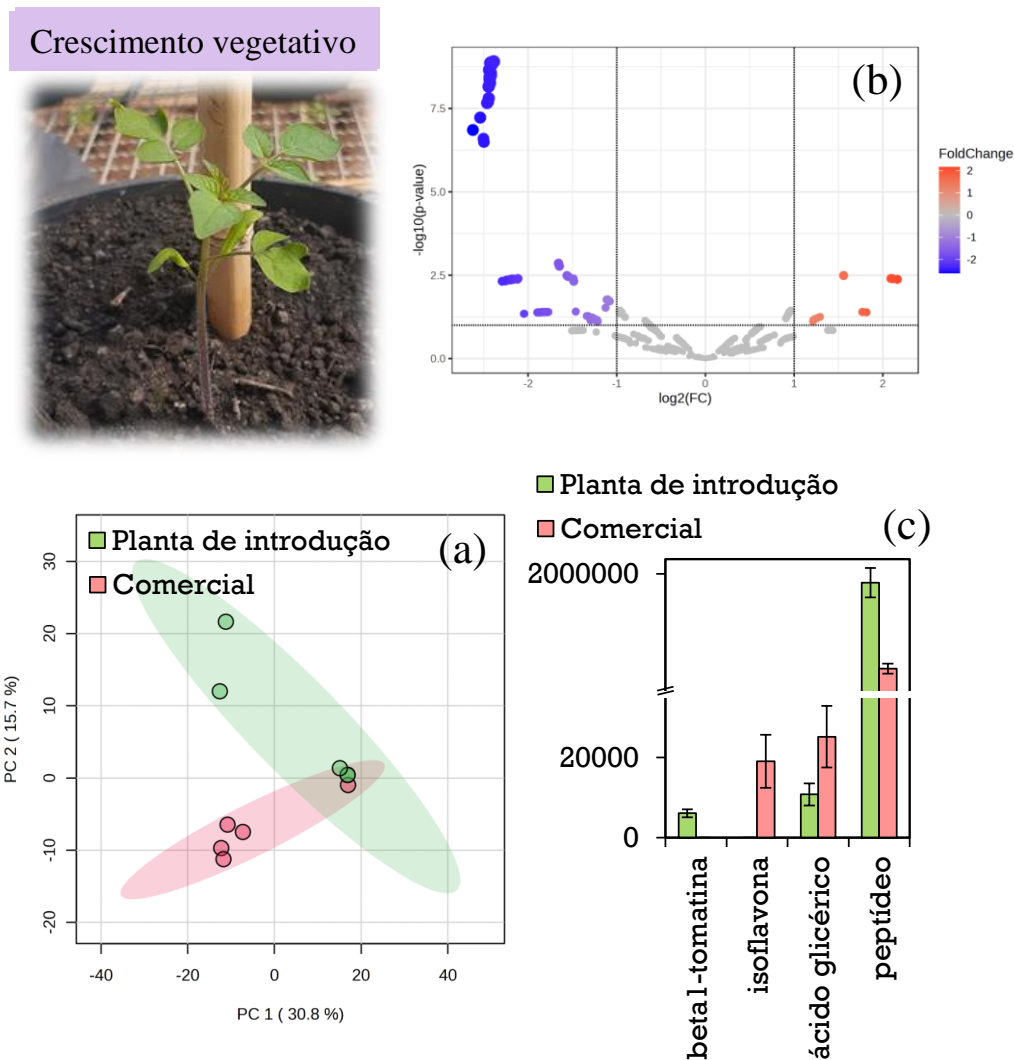


FIGURA 4.21. Fotografia das plantas em estágio de crescimento vegetativo. Gráfico de PCA (a) e volcano (b) obtidos comparando os metabólitos produzidos para as plantas em estágio de plântula. Moléculas diferencialmente expressas pelos cultivares (c).

Observando a variação no teor do ácido glicérico entre os cultivares avaliados (Figura 4.21c), encontramos uma maior indução para o cultivar comercial. As folhas das plantas geralmente ficaram maiores após a

domesticação para favorecer o processo biossintético. Por isso, ocorreu a indução de um maior acúmulo de moléculas de carbono (proveniente também dos ácidos orgânicos), dentre outras moléculas.¹⁹³

Outro ponto que podemos destacar é o peptídeo que apresentou uma maior indução no cultivar de *S. pimpinellifolium*. Durante o crescimento vegetativo das plantas, moléculas de pequenos peptídeos podem atuar como sinalizadores químicos que coordenam a comunicação intercelular em vários aspectos do desenvolvimento das plantas.¹⁹⁴ Peptídeos vegetais contendo tirosina, por exemplo, podem auxiliar no crescimento radicular.¹⁹⁵

É importante mencionar que o peptídeo mencionado em nossos dados ainda não está completamente identificado. Entretanto, é possível afirmar que ele é um composto formado majoritariamente por moléculas de tirosina ocorrendo a indução maior no cultivar considerado como uma Planta de Introdução. Esta diferença na indução entre os cultivares estudados pode ser relacionado ao processo de domesticação.¹⁹⁶

4.3.6.3 *Floração*

Na Figura 4.22 apresentamos uma fotografia das flores do cultivar de *S. lycopersicum*. Para este estágio, verificamos que não há uma boa separação das amostras no gráfico de PCA (Figura 4.22a). Nesta etapa do desenvolvimento, assim como na anterior, as plantas estão direcionando seu metabolismo para o fornecimento de carbono aos órgãos sumidouros, como raízes, flores, frutos, botões e folhas jovem.¹⁹⁷ Apesar disso, utilizamos o gráfico de *volcano* para identificar os metabólitos que poderiam diferir significativamente entre os dois cultivares.

Neste estágio conseguimos encontrar uma diferença significativa do clausarinol, uma piranocumarina linear. Esta molécula já foi detectada em frutas cítricas e em maçã.¹⁹⁸ O acúmulo de piranocumarinas é considerado raro nas plantas. Mas, quando encontrada em sua forma mais biologicamente ativa para

as plantas, as cumarinas têm sido relacionadas a um mecanismo de resistência à micro-organismos fitopatogênicos. Estas moléculas, que são majoritariamente sintetizadas pelas raízes e podem modular os micro-organismos do solo, também auxiliam na mobilização do ferro, favorecendo na sua absorção.¹⁹⁹

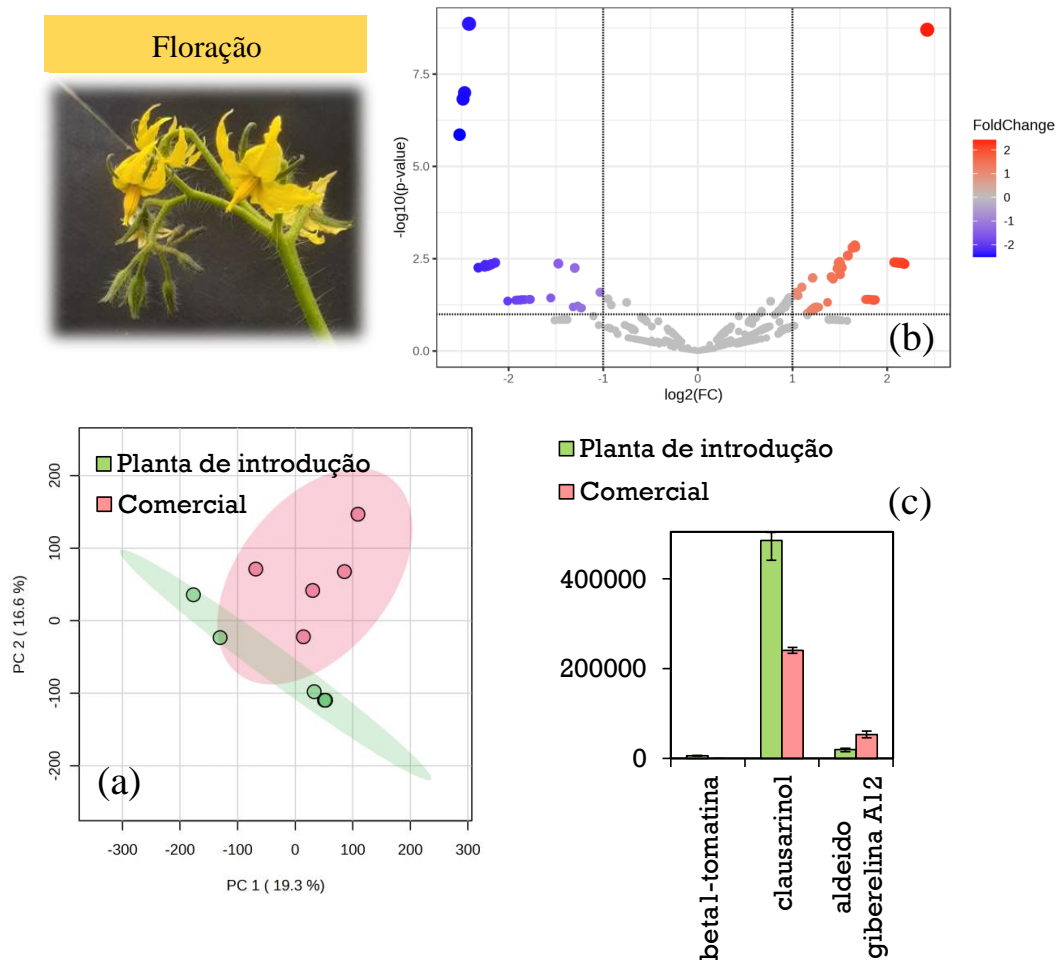


FIGURA 4.22. Fotografia das plantas em estágio de floração. Gráfico de PCA (a) e volcano (b) obtidos comparando os metabólitos produzidos para as plantas em estágio de plântula. Moléculas diferencialmente expressas pelos cultivares (c).

Uma outra molécula que apresentou modulação significativa para a diferenciação dos cultivares foi o aldeído da giberelina A12. Esta molécula faz parte da rota principal da biossíntese das giberelinas sendo a giberelina A12 precursora de todas as giberelinas.

Nas plantas com flores, a formação, desenvolvimento e funcionamento adequados das inflorescências (órgãos reprodutores) nas plantas são cruciais para manter a continuidade de uma espécie. Este processo também é regulado pelos fitormônios, como as giberelinas, jasmonatos, auxinas e citocinas, cuja a presença e equilíbrio adequado são indispensáveis para o bom desenvolvimento dessas estruturas.²⁰⁰ As giberelinas são necessárias para o crescimento normal de quase todos os órgãos das plantas por meio da promoção da divisão celular e/ou alongamento celular. Além disso, promovem mudanças de desenvolvimento ou mudanças de fase, incluindo a germinação das sementes e a transição do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo das plantas.²⁰¹

4.4 Conclusões


Nesta etapa da pesquisa demonstramos que a padronização dos métodos de extração melhorou o rendimento e a eficiência da extração das amostras, tornando-as mais eficazes para a extração de uma maior diversidade de metabólitos. Conseguimos demonstrar que os métodos avaliados foram eficazes para caracterizar as mudanças no metaboloma das plantas de tomate em diferentes estágios de desenvolvimento.

Fornecemos evidências de que a domesticação do tomate alterou o perfil dos alcaloides glicosilados, fenilpropanoídes e das giberelinas durante as fases de desenvolvimento do cultivar comercial (*S. lycopersicum*) e do cultivar considerado uma Planta de Introdução (*S. pimpinellifolium*). Além disso, verificamos um maior acúmulo de moléculas relacionadas com os mecanismos de defesa constitutivos no cultivar de *S. pimpinellifolium*, como a tomatidina e a *alfa*-tomatina. As alterações promovidas pela domesticação dos cultivares foram mais determinantes para a diferenciação entre os cultivares do que os diferentes estágios de desenvolvimento avaliados.

Estes dados podem contribuir para a compreensão molecular da diversidade fenotípica em cultivares de tomate, desde a qualidade da planta até

os mecanismos de resistência e adaptação. Além disso, utilizamos essas informações para avaliarmos os efeitos da aplicação de óleos essenciais nos cultivares de tomate e verificarmos se o uso de óleos essenciais promoveu efeito bioestimulante no desenvolvimento das plantas e ocasionou em alterações nos mecanismos constitutivos de defesa dos cultivares de tomate de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium*.

5 *Influência de estimulantes vegetais na diversidade química de cultivares de tomate*



5.1 *Introdução*

Os bioestimulantes estão entre as preparações naturais que estimulam o metabolismo, promovem o crescimento e protegem as plantas de patógenos quando aplicados em pequenas quantidades.²⁰² Entretanto, os resultados da aplicação dos bioestimulantes são dependentes da (i) espécie vegetal, (ii) tipo de cultivar, (iii) fatores ambientais, (iv) tipo de bioestimulante, (v) modo de aplicação e também da (vi) dose e do (vii) tempo de aplicação.^{202,203}

Os bioestimulantes podem ser utilizados como extratos prontos para uso em pó ou diluídos em solução aquosa. Dependendo dos resultados esperados, eles podem ser introduzidos no sistema de irrigação e absorvidos pelas plantas juntamente com a água. Além disso, os bioestimulantes podem ser aplicados na parte aérea ou radicular das plantas e, também nas sementes, dependendo de sua composição e resultados esperados.^{203,204} Por exemplo, em geral, quando aplicados nas folhas, protegem as plantas contra estresses bióticos e abióticos. Já os bioestimulantes quando aplicados no solo afetam primeiramente a estrutura da raiz, aumentando, entre outros fatores, a sua capacidade de absorção de nutrientes. Estes são apenas os primeiros efeitos observados, uma vez que os bioestimulantes podem atuar no metabolismo das plantas e influenciar a saúde e a microbiota do solo.^{203,204}

Outro ponto importante é que os bioestimulantes podem ser utilizados regularmente durante todo o período vegetativo ou de forma pontual, ou seja, aplicado uma única vez durante o declínio da atividade metabólica da planta, em uma situação de estresse por exemplo.²⁰³

Uma vez que conhecemos algumas das principais rotas moduladas pelos cultivares de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium* em condições normais de cultivo, nesta etapa da pesquisa avaliamos os efeitos da aplicação das formulações contendo o óleo essencial de alecrim, erva-cidreira, laranja e da mistura dos três óleos na mesma proporção. Para isto, avaliamos as alterações na parte aérea (área foliar, teor de clorofila A, B e total, a altura e comprimento do caule), na parte radicular (massa seca e comprimento das raízes) e na biossíntese dos metabólitos presentes nas folhas.

5.2 *Material e métodos*

5.2.1 *Reagentes*

A solução padrão estoque de cafeína (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparada em água na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenada a

8°C. O mesmo procedimento foi utilizado preparando uma solução padrão de bisabolol (Sigma-Aldrich) à 500 µg mL⁻¹ em glicerol. Cafeína e bisabolol foram utilizados como padrões internos para a análise por Cromatografia Líquida e Gasosa, respectivamente. Metanol grau HPLC da Supelco (Carolina do Norte, Estados Unidos), glicerol (Synth, São Paulo, Brasil) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados como solventes.

Ácido fórmico grau LC-MS (Fluka, Missouri, Estados Unidos) foi utilizado na fase móvel da cromatografia líquida. O cloreto de sódio (Synth, São Paulo, Brasil) foi utilizado no preparo das amostras para a extração por *headspace*.

5.2.2 Preparo das formulações bioestimulantes

As formulações com ação bioestimulante foram preparadas conforme o protocolo avaliado na sessão 3 *Desenvolvimento de formulações contendo óleos essenciais* apresentada neste estudo.

Dessa forma, as suspensões coloidais foram preparadas adicionando 1,80 g do amido de mandioca modificado, 25 mg de lignina, 25 mg de resíduo de banana e 25 mg do resíduo de pequi em 60 mL de água deionizada em Erlenmeyer (125 mL). O sistema foi mantido sob agitação magnética (1200 rpm) e aquecimento à 90±5°C utilizando chapa de aquecimento com agitação magnética (IKA RT 10, Baden-Württemberg, Alemanha) por 60 min para promover a gelatinização dos grânulos de amido. Este sistema foi denominado de A. Após a completa solubilização do biopolímero, o sistema foi mantido sob agitação à 600 rpm e sem aquecimento até atingir a temperatura de 30°C.

Paralelamente, em um Erlenmeyer (50 mL), 300 mg de Tween[®]80 foram emulsionadas em 4000 µL de água e 1000 µL do óleo essencial. O sistema foi mantido em agitação magnética de 1200 rpm e aquecimento à

30±5°C por 5 min na mesma chapa com agitação magnética. Este sistema foi denominado de B.

A emulsão resultante (sistema B) foi transferida gota a gota para o sistema A com o auxílio de uma bomba peristáltica e agulha hipodérmica BD (0,60 mm × 25 mm e 23G 1), para reduzir o diâmetro das partículas resultantes (veja a Figura 3.2, na seção 3.2.5 *Sínteses das suspensões coloidais*). Após a completa transferência, a suspensão coloidal resultante foi mantida sob agitação sem aquecimento por 30 min à 12000 rpm e posteriormente armazenada em temperatura ambiente (25±5°C). Foram preparadas formulações contendo os óleos individuais de alecrim, erva cidreira e laranja, mas também preparamos uma formulação contendo uma mistura dos óleos essenciais de laranja, alecrim e erva-cidreira nas proporções de 1:1:1 (m m⁻¹). Uma suspensão coloidal com a ausência dos óleos essenciais também foi preparada como controle.

5.2.3 *Cultivo das plantas de tomate e aplicação dos bioestimulantes*

Para cada cultivar, 60 sementes foram germinadas em outubro de 2023 (primavera) em sementeiras e, após 7 dias do plantio, 30 plântulas para cada cultivar foram transplantadas para vasos de 4,5 L preenchidos com solo, areia e húmus de minhoca na proporção de 3:1:1. As plantas foram irrigadas diariamente e de forma uniforme até atingirem 60% de umidade, tomando-se o cuidado de não serem submetidas a volumes muito altos ou baixos para evitar estresse hídrico. A umidade foi determinada com medidor de umidade do solo digital, PHD-3000 (SVE Super). Como os cultivares selecionados apresentavam crescimento indeterminado e o cultivar Planta de Introdução também era de crescimento rasteiro, foi necessário adicionarmos tutores aos vasos (estacas de bambu de 1 m de comprimento). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com telado transparente, seguindo assim o fotoperíodo natural e temperatura controlada de 30-35°C durante o dia.

Para examinar os efeitos da aplicação das soluções bioestimulantes, as plantas foram divididas em grupos de 5 plantas por grupo e foram agrupadas da seguinte forma: controle (plantas não tratadas, recebiam apenas água), biopolímero (plantas controle, tratadas apenas com formulação contendo o biopolímero, sem a adição dos óleos essenciais), alecrim (plantas tratadas com a formulação do óleo essencial de alecrim), erva-cidreira (plantas tratadas com a formulação do óleo essencial de erva-cidreira), laranja (plantas tratadas com a formulação do óleo essencial de laranja) e mistura (plantas tratadas com a formulação contendo os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja na proporção de 1:1:1 m m⁻¹). Este processo foi realizado para o cultivar de *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium*.

Após emergir a primeira dupla de folhas verdadeiras, as plantas foram tratadas uma vez por semana com 3 mL dos bioestimulantes diluídos para uma concentração de 0,3% v v⁻¹ dos ativos utilizando pipeta plástica (Figura 5.1).

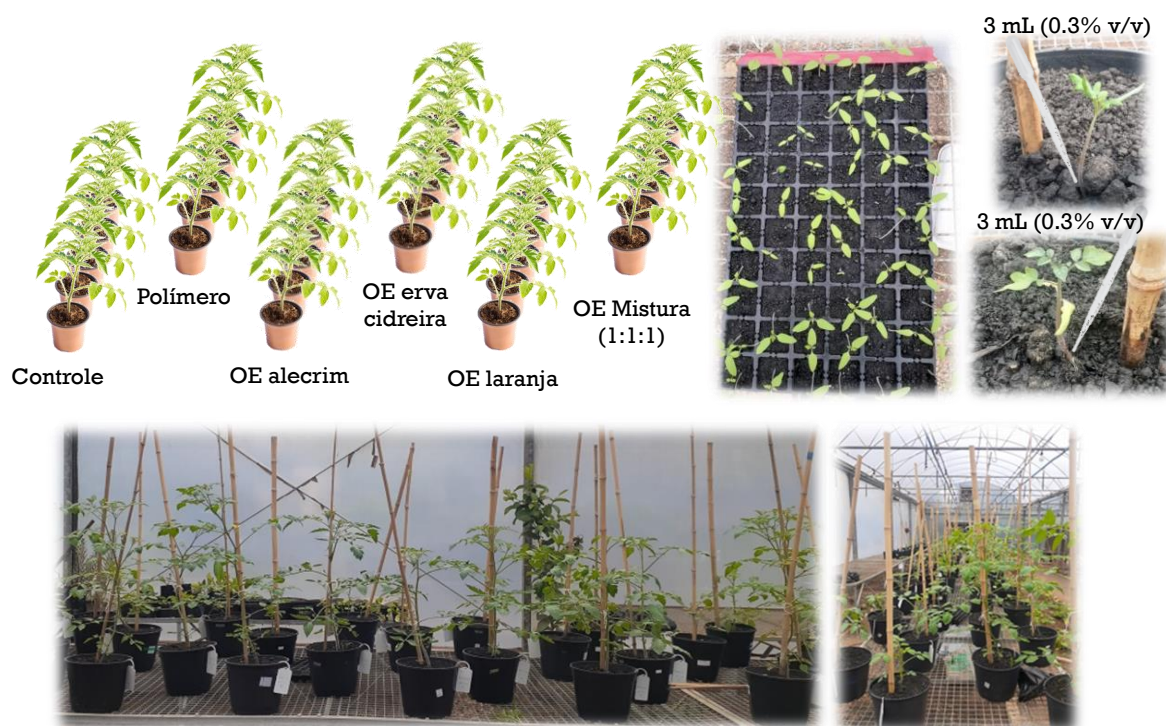


FIGURA 5.1. Representação da montagem dos experimentos de cultivo do tomate em casa de vegetação.

Para a administração do bioestimulante, uma pipeta era inserida a uma profundidade de 1 cm do solo e próxima a raiz das plantas. O processo de diluição também foi realizado para a formulação contendo apenas os biopolímeros. Dessa forma, todas as formulações foram diluídas 5 vezes. Os bioestimulantes foram aplicados no final da tarde, sempre após as 16 horas para que a temperatura ambiente da casa de vegetação fosse inferior à 30°C. Além disso, antes da aplicação as plantas também eram regadas. O processo de aplicação semanal foi realizado por sete semanas. Após este período, realizamos a coleta do material vegetal.

5.2.4 Coleta das amostras de folhas de tomate

Para as análises dos metabólitos, utilizamos as três folhas mais jovens (ápice do caule) e as três folhas mais velhas (base do caule) das plantas de tomate. Entretanto, nesta etapa folhas com diferentes idades não foram misturadas. Assim, as amostras foram congeladas com nitrogênio líquido para *quenching* metabólico, transportadas para o laboratório e particionadas em dois lotes. O primeiro lote foi liofilizado (Liotop L101, Liobras, São Paulo, Brasil), moído e posteriormente fracionado em peneira de malha 80 *mesh* e armazenado a -20°C. O segundo lote deste material, foi mantido fresco e armazenado em *ultrafreezer* Sanyo MDF-U56VC (Panasonic, Osaka, Japão) a -80°C.

5.2.5 Avaliações fisiológicas

Para medir o teor de clorofila total das plantas, foi utilizado o Medidor de Clorofila CFL 1030 (Falker, Rio Grande do Sul, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Também determinamos a altura das plantas, o diâmetro do caule, a área da superfície foliar, o comprimento das raízes e a sua respectiva massa seca. A área foliar foi medida utilizando o bloco de calibração e o aplicativo desenvolvidos pela PetiolePro[®], de maneira que conseguimos medir a área foliar sem retirá-las das plantas.

5.2.6 Extração dos metabólitos primários e secundários

Este protocolo foi realizado de acordo com os métodos avaliados na sessão 4 “*Métodos analíticos para a análise de amostras vegetais: preparo de amostras e análises constitutivas*” deste estudo. Dessa forma, o material botânico liofilizado (2,5 mg) foi submetido à extração em tubo de vidro (8 mL) contendo 500 μL da mistura extratora composta por etanol e água na proporção de 1:1 ($v v^{-1}$) em uma frequência de 60 kHz utilizando banho de ultrassom Elma (Tovatech, Alemanha) por 20 min.

O processo de extração ocorreu duas vezes consecutivas. Assim, o solvente era substituído após o primeiro ciclo e o precipitado era submetido a uma nova extração com 500 μL da mistura extratora e o sobrenadante anterior reservado. Após o último ciclo de extração, os sobrenadantes de um mesmo extrato foram misturados, centrifugados ($3.200 \times g$, por 30 min a 10°C) e filtrados em membrana de PVDF de 0,20 μm e 25 μL dos extratos foram diluídos em água para um volume final de 1000 μL . O padrão interno foi adicionado (10 μL de cafeína 10 mg L^{-1}) e as amostras foram analisadas por UHPLC-q-TOF-MS/MS (UHPLC 1290 Agilent e q-TOF-MS/MS Bruker, Estados Unidos).

5.2.7 Extração dos metabólitos voláteis

Para esta etapa, o material botânico fresco (100 mg) foi submetido à extração por *headspace* utilizando um frasco de 10 mL contendo 500 μL de solução de NaCl 30% ($m v^{-1}$). O bisabolol foi usado como padrão interno adicionando 25 μL (500 mg L^{-1} , solução preparada em glicerol) ao frasco de *headspace*. Os frascos foram selados com tampa de alumínio e septo de PTFE/SIL e, após extração por 5 min a 75°C os compostos voláteis foram analisados por CG-EM (Shimadzu, CG-EM TQ-8040). Seguimos o protocolo apresentado na sessão 4 “*Métodos analíticos para a análise de amostras vegetais: preparo de amostras e análises constitutivas*.”

5.2.8 Análises cromatográficas

A análise não-alvo dos componentes orgânicos não voláteis foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de ultra-alto desempenho (Agilent 1290 Infinity II) equipado com uma coluna Zorbax Eclipse Plus Penilhexil (Rapid Resolution HD, $2,1 \times 100$ mm, $1,8 \mu\text{m}$, Agilent) como fase estacionária. As temperaturas do forno da coluna e do amostrador automático foram de 40 e 10°C , respectivamente. Um gradiente de fluxo constante ($0,300 \text{ mL min}^{-1}$) combinando o solvente A ($0,1\%$ ácido fórmico/água) e o solvente B ($0,1\%$ ácido fórmico/metanol) foi usado nas seguintes condições: 15% - 85% B (0 - 9 min), 90% B (9 - 14 min) e 15% B(14 - 15 min) com 5 min de pós-corrída. O volume de injeção foi de $5,0 \mu\text{L}$. A ionização e análise dos íons foi realizada por meio de um espectrometro de massas com tempo de voo quadrupolo (Impact HD Bruker) equipado com uma fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) em modo de íon positivo e tensão capilar de $3,6 \text{ kV}$. A temperatura do gás de dessolvatação foi de 180°C com um fluxo de 8 L min^{-1} , com um End Plate Offset de 450 V e pressão no *nebulizer* de 4 Bar . Os dados de EM foram coletados e avaliados de 50 a 1700 Da .

Os compostos orgânicos voláteis foram analisados por um cromatografo a gás Shimadzu (CG 2010 Plus). Para esta análise utilizamos uma coluna capilar VF-Wax MS (Agilent, fase estacionária de polietilenoglicol, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$ de diâmetro interno \times espessura de filme de $0,25 \mu\text{m}$) e Hélio $5,0$ como gás de arraste ($1,50 \text{ mL min}^{-1}$). Os parâmetros cromatográficos foram os seguintes: temperatura do injetor 180°C ; a temperatura da coluna inicialmente em 40°C mantida por 1 min, depois aquecida a uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até 230°C mantendo essa temperatura por 4 min. A temperatura da interface foi de 230°C e da fonte de íons de 270°C . A injeção foi no modo *splitless* e o volume da amostra injetada foi de $1000 \mu\text{l}$. O analisador de massas quadrupolar operou com uma ionização de elétrons a 70 eV e varredura entre 45 e 500 Da com $0,3$ varreduras s^{-1} .

Amostras de controle de qualidade (extratos contendo a mistura de todos os cultivares) e a solução padrão interno também foram injetadas continuamente para monitorar a estabilidade dos sistemas.

5.2.9 Métodos de processamento de dados

Para esta etapa, os dados de EM obtidos por experimentos de cromatografia líquida foram recalibrados com base na massa exata do calibrante (1 mmol L⁻¹ de formiato de sódio em acetonitrila) usando um modo de regressão quadrática de calibração de alta precisão no *software* Bruker Profile Analysis v2.1 (Bruker Daltonics). Posteriormente, os dados foram convertidos para o formato “.mzXML”. No *software* MZMine 3, as amostras foram processadas. Assim detectamos os “*molecular features*”, selecionamos os isótopos, realizamos o alinhamento do tempo de retenção combinando a massa (incluindo isótopos, estados de carga, adutos, perdas neutras) e informações quantitativas (área/intensidade de pico) e eliminamos os valores redundantes. Os dados dos “*molecular features*” resultantes foram tabelados. A identificação dos “*molecular features*” foi realizada por comparação com os dados da METLIN, do MassBank, do *m/z* cloud spectral, com os dados da plataforma SIRIUS e por comparação com dados de estudos publicados na literatura científica. A matriz obtida foi convertida no formato .CSV para realizarmos as análises estatísticas na plataforma MetaboAnalyst (versão 6.0).¹⁵²

Para a análise dos dados obtidos no sistema de cromatografia gasosa, os dados brutos foram convertidos para o formato “.CSV”. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com os dados espectrais da biblioteca NIST (versão 17.0) e com o *software* AMDIS GC/MS (versão 2.73).

Uma vez que as informações relevantes foram extraídas na primeira etapa para cada plataforma, os dados de cada tratamento foram combinados. Para isto, os dados foram organizados em uma matriz composta por variáveis

(colunas), como a abundância relativa do pico de cada constituinte identificado, enquanto os objetos (linhas) foram os cultivares amostrados. A matriz resultante foi dimensionada, a centralização dos dados na média foi a normalização escolhida como o pré-tratamento e a matriz final foi utilizada para os cálculos estatísticos realizados na plataforma MetaboAnalyst (versão 6.0).¹⁵²

5.2.10 *Análise estatística*

Para avaliar os dados obtidos nas análises fisiológicas (área foliar, altura e comprimento do caule, comprimento e massa seca das raízes e teor de clorofila) a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (5% de probabilidade) foram realizadas com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas entre as respostas obtidas. As análises foram realizadas por meio do *software* estatístico SPSS[®].

5.3 *Resultados e discussão*

5.3.1 *Observações fenotípicas e efeitos dos bioestimulantes nos parâmetros de crescimento*

Para avaliar os efeitos da aplicação dos bioestimulantes no crescimento das plantas, uma série de parâmetros de crescimento foram medidos ao final do experimento e podem ser observadas nas Figuras 5.2 e 5.3.

A observação macroscópica das plantas não demonstrou alterações no turgor e esverdeamento das folhas em comparação com as plantas controle para os dois cultivares analisados após a aplicação dos bioestimulantes.

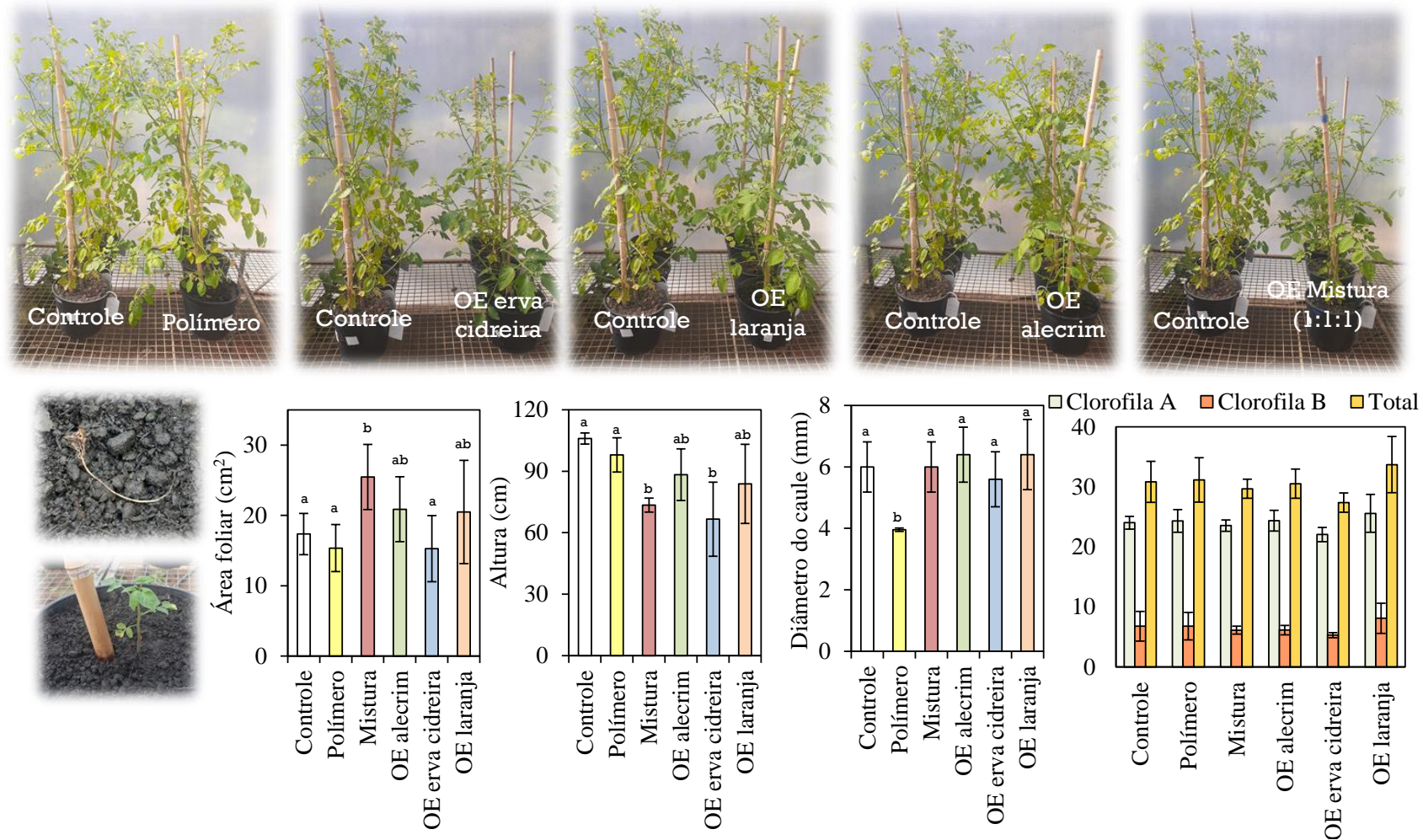


FIGURA 5.2. Efeito dos tratamentos com os bioestimulantes no crescimento das plantas de *S. pimpinellifolium*. Os parâmetros da planta estudados incluem a área foliar, altura, diâmetro do caule e teor de clorofila. Letras diferentes no topo das barras representam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

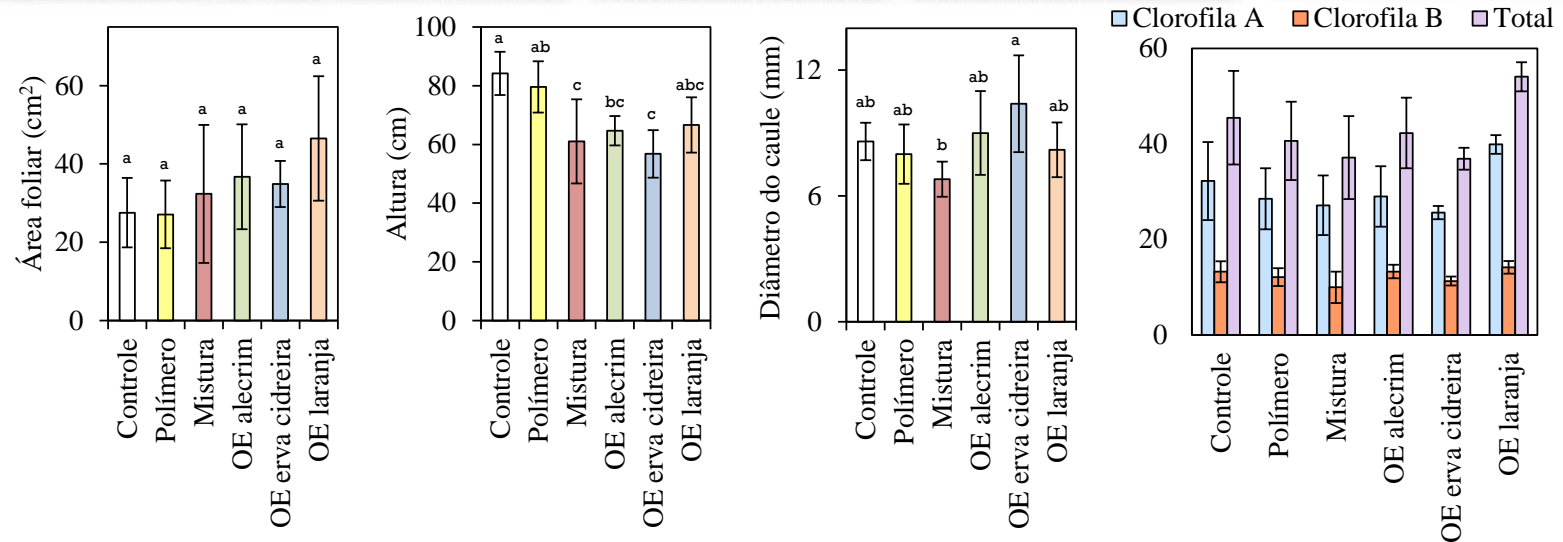
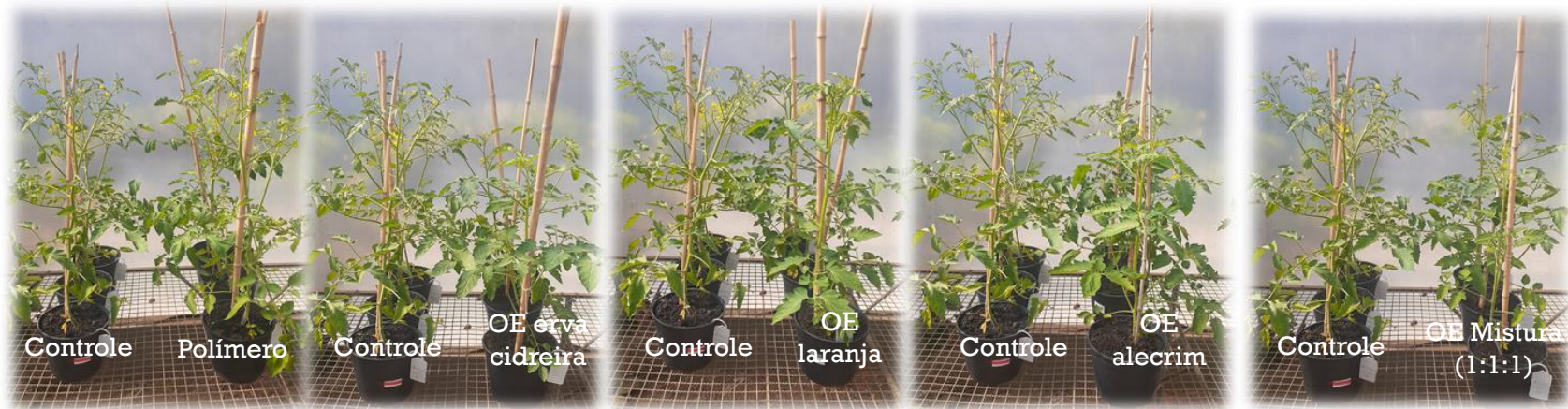


FIGURA 5.3. Efeito dos tratamentos com os bioestimulantes no crescimento das plantas de *S. lycopersicum*. Os parâmetros da planta estudados incluem a área foliar, altura, diâmetro do caule e teor de clorofila. Letras diferentes no topo das barras representam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

Verificamos que as plântulas que receberam a formulação preparada com o óleo essencial de erva-cidreira morreram após 48 h da primeira aplicação para ambos os cultivares. Por isso, apenas para este tratamento, as plântulas mortas foram substituídas por plantas reservas excedentes que foram germinadas ao mesmo tempo das plantas que morreram e que estavam condicionadas nas mesmas condições dos experimentos.

O óleo essencial de erva cidreira é composto majoritariamente pela molécula de linalol. Esta molécula já apresentou efeito fitotóxico para algumas espécies de trigo e alfafa, interferindo na germinação das sementes e inibindo o desenvolvimento radicular das plantas.²⁰⁵ Com base nisto, as novas plantas passaram a receber o bioestimulante contendo o óleo essencial de erva cidreira apenas quando já possuíam dois pares de folhas e sistema radicular mais desenvolvido. Assim, após 48 h da primeira aplicação do bioestimulantes contendo erva-cidreira não observamos a morte das plântulas e seguimos com os experimentos.

Ao final do experimento, realizamos a análise dos parâmetros de crescimento das plantas. De maneira geral as plantas do cultivar *S. pimpinellifolium* eram maiores, com área foliar e diâmetro do caule menores em comparação com o cultivar de *S. lycopersicum*. Este perfil, que foi observado independente do tratamento e foi atribuído as diferenças genéticas entre os cultivares.

Na Figura 5.2 também verificamos que a utilização da formulação contendo a mistura dos óleos essenciais reduziu de maneira significativa o crescimento das plantas do cultivar de *S. pimpinellifolium*, ao mesmo tempo em que aumentou a área superficial média das folhas. Esta poderia ser uma forma da planta de mitigar o efeito adverso da redução no tamanho, pois o aumento da área foliar ajudaria a manter as taxas fotossintéticas da planta²⁰⁶ e, conforme observamos na Figura 5.2, independente do tratamento todas as plantas mantiveram os teores de clorofila A e B. Apenas a aplicação do óleo essencial

de laranja não interferiu na altura das plantas ao compararmos os resultados com o grupo controle.

Outro ponto de destaque para as plantas do cultivar de *S. pimpinellifolium* é que embora a aplicação da formulação contendo apenas o biopolímero não tenha interferido no crescimento ou na área foliar média das folhas quando comparado ao tratamento controle, esta formulação diminuiu de maneira significativa o diâmetro do caule das plantas. Alguns estudos têm demonstrado que a redução do diâmetro do caule pode ser reflexo de plantas sob condições de estresse que podem reduzir a altura e quantidade de folhas, mas também podem direcionar seus metabólitos para outros processos, como o crescimento radicular.^{207,208}

Na Figura 5.4 apresentamos os dados obtidos para o crescimento radicular das plantas do cultivar de *S. pimpinellifolium*. Embora não tenhamos detectado diferenças estatisticamente significativas para a massa seca das raízes, verificamos algumas diferenças para o crescimento radicular. As plantas tratadas com as formulações contendo os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja apresentaram um aumento no crescimento radicular. O estímulo no crescimento das raízes pode auxiliar as plantas a aumentarem a absorção de nutrientes e favorecer a busca por água.^{203,204} Este efeito não foi observado quando utilizamos a misturas de todos os óleos, indicando que a mistura dos componentes pode acarretar em um antagonismo das moléculas bioativas presentes para o cultivar de *S. pimpinellifolium*.

Analisando os resultados apresentados pelas plantas do cultivar de *S. lycopersium* na Figura 5.3, não observamos diferenças significativas na área da superfície foliar e no teor de clorofila. Entretanto, a aplicação da formulação contendo o óleo essencial de alecrim, erva-cidreira e a mistura dos óleos reduziram de maneira significativa a altura das plantas, assim como também observado para as plantas de *S. pimpinellifolium*.

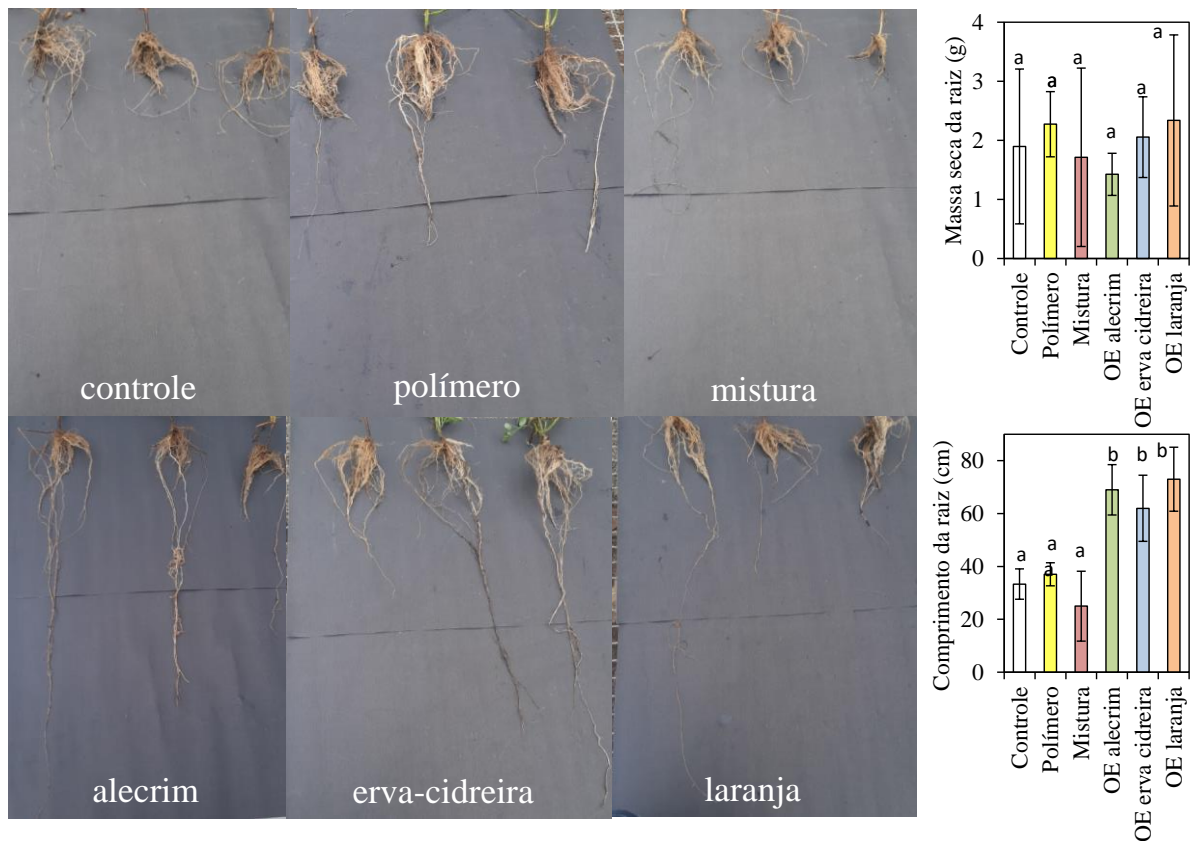


FIGURA 5.4. Efeito dos tratamentos com os bioestimulantes no crescimento das plantas de *S. pimpinellifolium*. Os parâmetros da planta estudados iguais no topo das barras indicam que não há diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

Avaliando as alterações na parte radicular das plantas do cultivar de *S. lycopersicum*, verificamos que também ocorreu um estímulo para o crescimento das raízes após a aplicação das formulações contendo os óleos essenciais. Em nosso estudo não foi possível avaliarmos se a aplicação das formulações favoreceu o desenvolvimento de raízes laterais e/ou apenas o alongamento das raízes. Entretanto, a maior expansão das raízes apresentada por ambos os cultivares após o tratamento pode ter impacto positivo na resposta das plantas em condições de estresse hídrico.²¹ Além disso, as alterações no crescimento radicular podem ser associadas a diversos efeitos no solo. Compreender os efeitos deste bioestimulante na fertilidade do solo também pode contribuir para o desenho de estratégias de fertilização mais eficientes.²⁰⁹

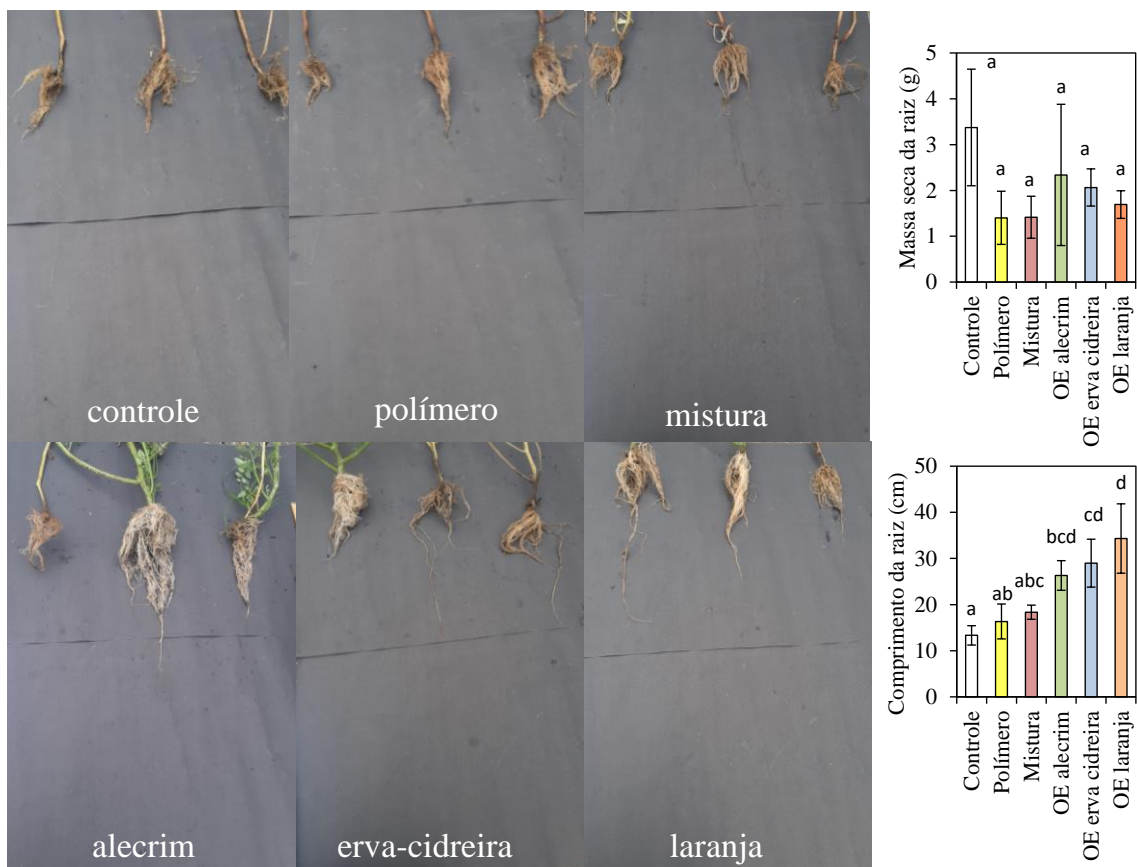


FIGURA 5.5. Efeito dos tratamentos com os bioestimulantes no crescimento das plantas de *S. lycopersicum*. Os parâmetros da planta estudados iguais no topo das barras indicam que não há diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey.

5.3.2 Efeitos dos bioestimulantes no metaboloma das plantas de tomate

Inicialmente propusemos a avaliação dos metabólitos utilizando as folhas mais velhas e mais jovens dos cultivares, para verificarmos se observaríamos alterações no metaboloma e se estas alterações seriam sistêmicas ou modulariam de maneira mais intensa as folhas mais jovens. Na Figura 5.6 apresentamos o gráfico de PCA apenas para os extratos obtidos das folhas mais velhas e dos dois cultivares.

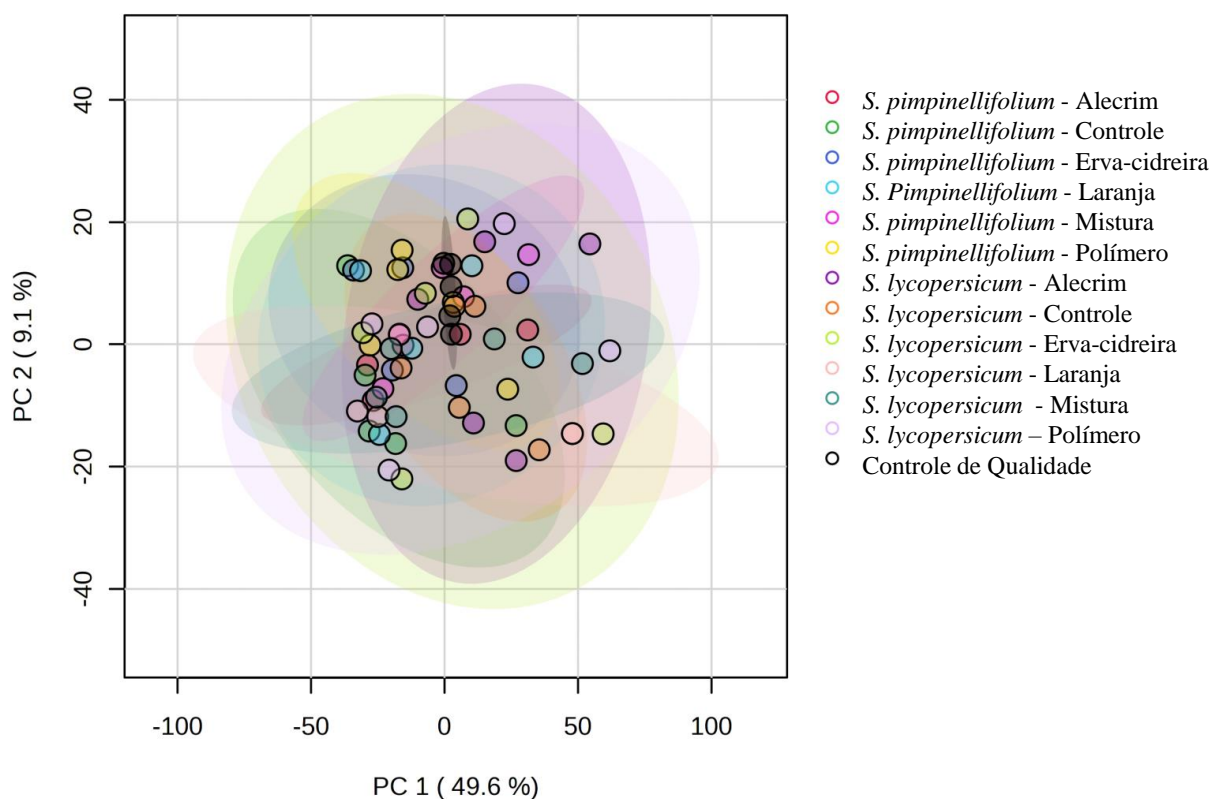


FIGURA 5.6. Gráfico de PCA obtido comparando os metabólitos extraídos após o tratamento das plantas com a aplicação das formulações contendo os óleos essenciais para o cultivar de *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum*.

Podemos observar que não houve tendências de agrupamento entre as amostras e também entre as suas respectivas réplicas ao avaliarmos as folhas mais velhas. Entretanto, o agrupamento das amostras do grupo classificado como controle de qualidade em uma região próxima ao centro dos dois eixos do PC1 e PC2 indica que a maior variabilidade dos dados pode ser relacionada as variações biológicas e não a alguma variabilidade na extração das amostras ou no instrumento de análise. Dessa forma, seguimos avaliando as amostras considerando apenas as folhas mais jovens. Na Figura 5.7 apresentamos o gráfico de *scores* e *loadings* obtidos para as plantas de *S. pimpinellifolium* após a aplicação das formulações.

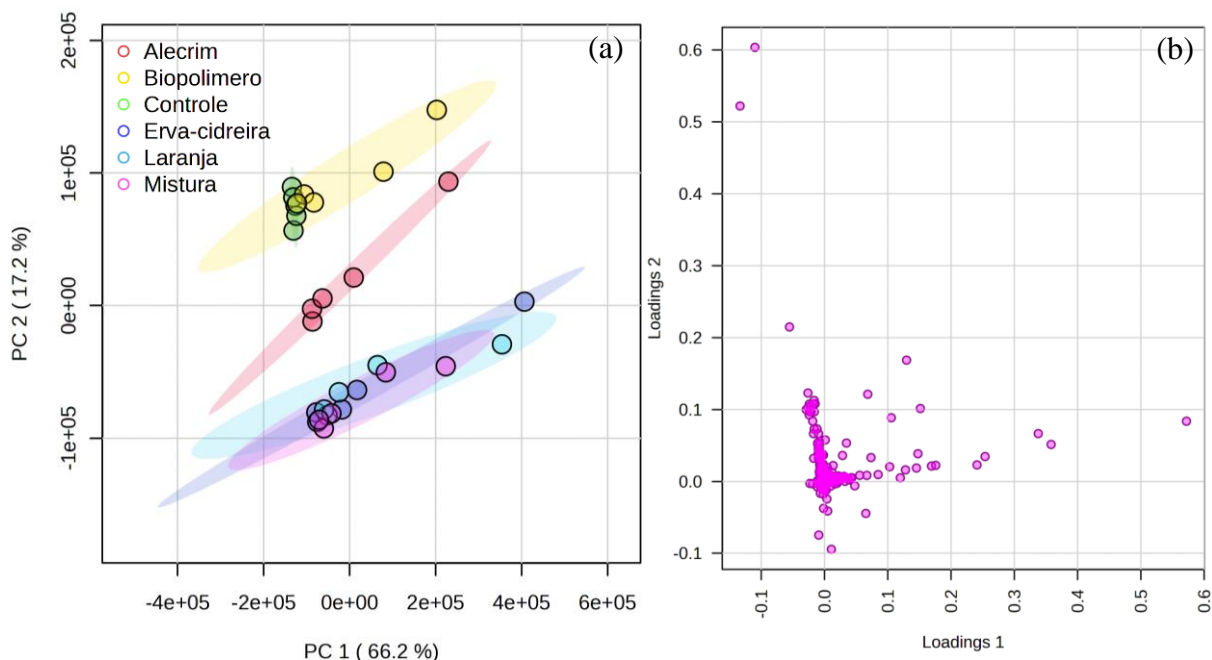


FIGURA 5.7. Gráficos de *scores* (a) e *loadings* (b) para a primeira e segunda componentes das amostras de *S. pimpinellifolium* após o tratamento com as formulações contendo óleos essenciais.

Observamos uma separação entre os tratamentos (Figura 5.7a) e as amostras controle e que receberam formulação do biopolímero. Estas amostras foram agrupadas e influenciadas principalmente por moléculas de dissacarídeos e de alcaloides glicosilados. Para estas amostras, as moléculas destas classes apresentaram maior indução (maior área) em comparação com os outros tratamentos. As amostras tratadas com a formulação contendo o óleo essencial de alecrim foram mais influenciadas por moléculas de ácidos graxos, enquanto que os cultivares que receberam a formulação contendo o óleo essencial de erva-cidreira, laranja e a mistura dos óleos essenciais apresentaram uma maior indução do ácido *gama*-aminobutírico e de nucleosídeos da purina.

O ácido *gama*-aminobutírico (GABA) é um regulador de muitos aspectos do crescimento das plantas e tem um papel fundamental na melhoria da resistência das plantas aos estresses abióticos e bióticos. Além disso, o GABA atua como uma molécula sinalizadora amplamente distribuída nas plantas e pode estar envolvido em vários processos, incluindo a regulação do pH, o

metabolismo do carbono e do nitrogênio²¹⁰ e auxiliando no crescimento das raízes principais e das raízes adventícias.²¹¹ O aumento da indução do GABA pode ser um dos fatores que favoreceram o aumento das raízes das plantas tratadas com os bioestimulantes. Na Figura 5.8 comparamos cada tratamento de maneira isolada com o grupo controle.

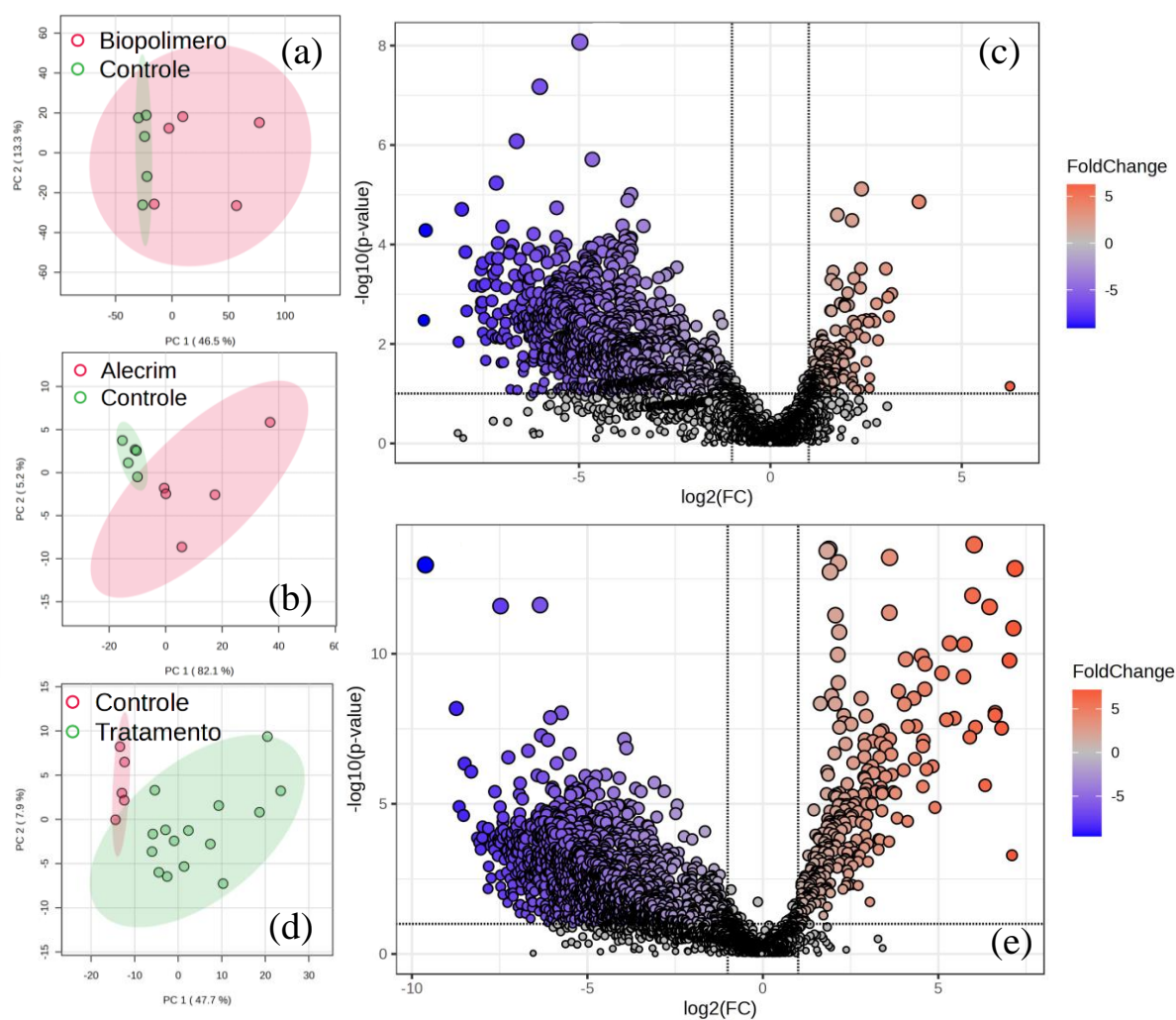


FIGURA 5.8. Gráfico de PCA comparando as amostras controle com as tratadas com biopolímero (a), com a formulação de alecrim (b) e (d) com as amostras tratadas com óleo essencial de erva-cidreira, laranja e a mistura agrupada como tratamento e seus respectivos gráficos de volcano em (c) e (e).

Confirmamos que não há uma clara separação entre as amostras que foram tratadas com as formulações contendo apenas o biopolímero (Figura 5.8a). Verificamos aqui que os metabólitos primários, secundários e voláteis que extraímos neste estudo não podem ser diretamente relacionados a redução no diâmetro do caule que observamos para as plantas de *S. pimpinellifolium*.

Na Figura 5.8b demonstramos a separação entre as amostras tratadas com as formulações de alecrim e as plantas controle, com base no gráfico de *volcano* selecionamos algumas moléculas que apresentaram variações significativas com o tratamento (Figura 5.8c).

Dentre as moléculas encontradas podemos destacar os nucleosídeos de purina e alguns compostos orgânicos derivados de carboidratos e/ou contendo carboidratos conjugados que tiveram sua biossíntese induzida durante o tratamento com o óleo essencial de alecrim. Ambas as classes de compostos são importantes como fonte de energia para o desenvolvimento das plantas e como blocos de construções para uma série de metabólitos.

Nas plantas, os nucleosídeos de purina são substratos para a biossíntese de dinucleotídeos de nicotinamida adenina (NAD e NADP), alcalóides de purina e citocinas.²¹² Este efeito tem sido mais pronunciado em plantas de tomate que foram tratados com a utilização de bioestimulantes compostos por aminoácidos, uma vez que estas estruturas são a base para a síntese de outras moléculas como as aminas e as purinas.²¹³

Os dados obtidos para os tratamentos com a aplicação das formulações de erva-cidreira, laranja e a mistura apresentaram um maior agrupamento (Figura 5.7a) e por isso foram agrupados para a análise dos metabólitos estatisticamente significativos (Figura 5.8d). Extraíndo as informações do gráfico de *volcano* (Figura 5.8e), verificamos que as plantas tratadas com os bioestimulantes (erva-cidreira, laranja e mistura de óleos) também apresentaram uma maior indução na biossíntese de carboidratos e moléculas derivadas indicando o acúmulo de fontes de carbono para o

desenvolvimento das plantas. Estas plantas também apresentaram um aumento na indução do *trans*-hex-2-enal, um aldeído que tem sido relacionado ao cheiro das folhas frescas, junto a outros compostos voláteis de folhas verdes.²¹⁴ Esta molécula também pode ser considerada um sinal químico da indução da expressão gênica associada às condições de estresse, além de proteger as plantas da ação de fungos e insetos²¹⁵, por exemplo, atraindo inimigos naturais dos insetos herbívoros.²¹⁶

Um ponto em comum que distingue todas as plantas que passaram pelo tratamento com as formulações contendo os óleos essenciais das plantas classificadas como controle ou que receberam apenas o biopolímero foi a diminuição na indução da molécula de *alfa*-tomatina e de moléculas de ácidos graxos. Este processo foi menos intenso para o tratamento com alecrim.

Uma supressão na biossíntese de glicoalcaloides foi observada por Lewis et al. (2023) ao aplicarem o extrato de *Ascophylum nodosum* como bioestimulante vegetal em plantas de tomate. Esta pode ser uma estratégia das plantas que, em condições de estresse, direcionam seu metabolismo para a síntese de moléculas de defesa específicas.²¹⁷ Além da molécula de tomatina, os ácidos graxos de maneira geral também constituem um sistema de defesa das plantas em situações de estresse biótico e abiótico. Estes dados indicam uma remodelação do metabolismo de defesa das plantas de tomate quando tratadas com os óleos essenciais.

Na Figura 5.9 apresentamos o gráfico de *scores* e *loadings* obtidos para as plantas de *S. lycopersicum* após a aplicação das formulações. É interessante observamos novamente uma tendência de agrupamento entre as amostras controle com aquelas tratadas com a formulação contendo apenas o biopolímero. Verificamos também uma maior diferenciação das amostras tratadas com a formulação contendo o óleo essencial de erva-cidreira.

Dentre as moléculas associadas a maior diferenciação, podemos destacar o ácido quínico, que apresentou maior indução na sua biossíntese nas

plantas tratadas com a formulação de erva-cidreira em comparação com todos os outros tratamentos.

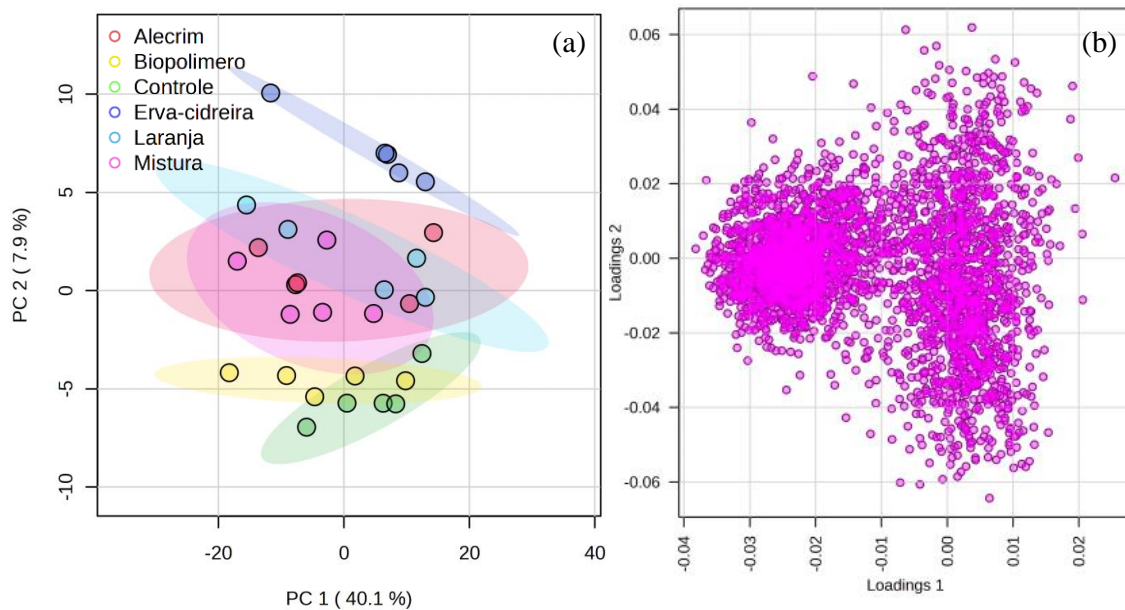


FIGURA 5.9. Gráficos de *scores* (a) e *loadings* (b) para a primeira e segunda componentes das amostras de *S. lycopersicum* após o tratamento com as formulações contendo óleos essenciais.

O ácido quínico, além de atuar como uma fonte de carbono para a biossíntese de diversas moléculas, tal como o ácido clorogênico, está relacionado aos mecanismos de defesa das plantas, além de apresentar propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Esta poderia ser uma estratégia das plantas para deixá-las preparadas para ativar o sistema de defesa.

Na Figura 5.10 comparamos cada tratamento de maneira isolada com o grupo controle. Assim como observamos para as plantas de *S. pimpinellifolium*, não há uma clara separação entre as amostras que foram tratadas com as formulações contendo apenas o biopolímero (Figura 5.10a). Verificamos que o biopolímero e os adjuvantes utilizados não apresentaram diferenças significativas nos metabólitos sintetizados pelas folhas de ambos os cultivares, nas condições utilizadas neste estudo.

Para o cultivar de *S. lycopersicum*, verificamos uma maior distinção para as amostras tratadas com o óleo essencial de erva-cidreira e, por isso, realizamos uma análise de PCA em que ele foi comparado com todos os outros tratamentos, denominados de controle na Figura 5.10b. Construimos em seguida o gráfico de *volcano* (Figura 5.10c) para detectarmos as moléculas com variações significativas entre os tratamentos.

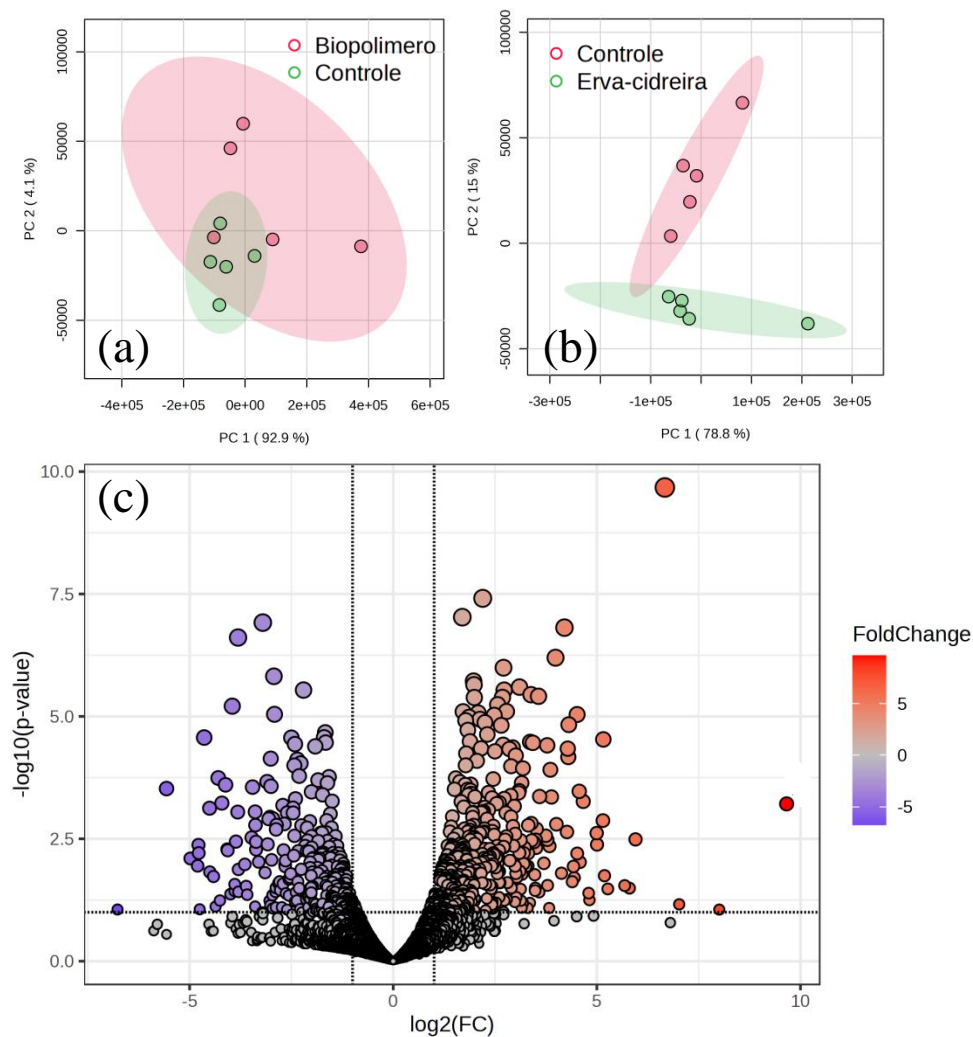


FIGURA 5.10. Gráfico de PCA comparando as amostras controle com as tratadas com biopolímero (a) e com a formulação de erva-cidreira e seu respectivo gráfico de volcano em (c).

Dentre as moléculas relacionadas a separação dos grupos, podemos destacar uma maior indução de monossacarídeos, compostos orgânicos contendo nitrogênio e ácido quínico, que tiveram um aumento significativo na sua biossíntese para as amostras tratadas com a formulação de erva-cidreira. Por outro lado, estas mesmas amostras tiveram uma redução na biossíntese do ácido piroglutâmico, nucleosídeos de purina e do *trans*-hex-2-enal.

O ácido piroglutâmico é um derivado de aminoácidos de ocorrência natural que atua nas plantas melhorando a taxa de fotossíntese e a ação antioxidante, mantendo o equilíbrio osmótico e hídrico das plantas, sendo, portanto, um metabólito que auxilia as plantas a superarem condições de estresse, como por exemplo um desequilíbrio osmótico.²¹⁸

Com base nas principais moléculas destacadas como respostas das plantas aos tratamentos, poderíamos considerar que as moléculas bioestimulantes atuam de maneira similar às mais diversas condições de estresse que ocorrem com as plantas. Assim, os bioestimulantes podem ser reconhecidos pelos sistemas de defesa das plantas como uma situação de estresse, promovendo a ativação ou fortalecimentos dos seus mecanismos de defesa e, por isso, verificamos que a maior modulação na biossíntese de metabólitos ocorre com moléculas relacionadas a defesa das plantas. Assim, alguns bioestimulantes atuam também como um *priming* de defesa das plantas.²¹⁹ Banakar et al. (2023) por exemplo, demonstraram que plantas de arroz tratadas previamente com um bioestimulante a base de algas vermelhas promoveu uma indução de defesa das plantas à brusone, uma doença fungica.²²⁰

Esta também pode ser uma estratégia desenvolvida pelas plantas quando recebem óleo essenciais e passam a apresentar tolerância ao estresse térmico. Em nosso estudo, observamos o crescimento das raízes, que auxilia a sobrevivência em ambientes adversos. Para responder a estas hipóteses seria necessário, além dos experimentos realizados promovermos estudos em

condições adversas e também avaliarmos as alterações no transcriptoma das plantas estudadas.

Por fim, também é interessante observamos que de maneira geral as plantas do cultivar *S. pimpinellifolium* apresentaram modulações na biossíntese de metabólitos secundários, principalmente na biossíntese dos glicoalcaloides. Estas são importantes moléculas de defesas¹⁸⁷ que foram moduladas nas plantas de tomate seja avaliando os estágios de desenvolvimento das plantas ou a aplicação das formulações dos óleos essenciais. As variedades de tomate selvagens possuem uma maior diversidade de mecanismo de defesa a condições adversas e muitas delas podem ser perdidas durante os processos de melhoramento.²²¹ Por outro lado, ao avaliarmos as respostas apresentadas pelas plantas do cultivar comercial *S. lycopersium* verificamos que mesmo com o aumento no crescimento radicular, outras classes de moléculas foram moduladas nas plantas. Sendo estas principalmente pertencentes ao metabolismo primário das plantas e moléculas associadas ao fornecimento de energia.

5.4 Conclusões

Demonstramos aqui que formulações contendo os óleos essenciais de alecrim, erva-cidreira e laranja podem apresentar efeito bioestimulante em plantas de *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum*, induzindo o crescimento das raízes. Entretanto, a mistura dos óleos essenciais não promove um sinergismo do efeito bioestimulante.

Verificamos que a aplicação das formulações contendo os óleos essenciais modulam principalmente o metabolismo de glicoalcaloides, ácidos graxos e ácidos orgânicos que estariam associados a mecanismos de defesa e a obtenção de energia pelas plantas de tomate.

Fornecemos evidências de que a aplicação de bioestimulantes contendo óleos essenciais alteram as respostas metabolômicas das folhas de

tomate e estimulam mecanismos de resistência relacionados a situações de estresses bióticos e abióticos.

6 *Conclusões gerais e perspectivas*



Nesse estudo demonstramos que é possível produzir bioestimulantes vegetais contendo óleos essenciais como substâncias bioativas e utilizando materiais biopoliméricos. Os sistemas coloidais preparados promoveram a retenção dos óleos essenciais e aumentaram a resistência térmica dos ativos. Podemos concluir que a utilização de amido modificado associado com adjuvantes é uma alternativa viável para o preparo de suspensões coloidais, promovendo um sistema de liberação controlada para os bioestimulantes vegetais.

Verificamos também que a padronização das técnicas de extração dos metabólitos dos materiais vegetais é uma etapa essencial para garantir a

qualidade dos dados em análises metabolômicas. Utilizando os métodos estudados, observamos que o processo de domesticação das plantas de tomate modulou o metabolismo dos alcaloides e isoflavonas.

Por fim, demonstramos que os óleos essenciais não apresentam sinergismo quando combinados, mas quando aplicados de maneira isolada estimulam o crescimento radicular das plantas, atuando como bioestimulantes do crescimento vegetal. Com base nestes resultados, podemos questionar quais os impactos da aplicação destas moléculas na rizosfera das plantas, no conteúdo nutricional do solo e também quais seriam os efeitos da aplicação destas substâncias nos frutos de tomate. Estudos baseados nestes questionamentos associados as técnicas ômicas, como a metabolômica e a transcriptômica, poderiam contribuir para compreendermos os efeitos da aplicação destas moléculas de maneira integral nas plantas.

7 Referências Bibliográficas

1. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED. "The State of Food Security and Nutrition in the World 2023"; FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO; Rome; Vol. 10.
2. SMITH, P. "Delivering Food Security without Increasing Pressure on Land". *Glob. Food Sec.*, 2 (1):18–23,2013.
3. GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. "Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People". *Science* (80-.), 327 (5967):812–818,2010.
4. HOLT-GIMÉNEZ, E.; SHATTUCK, A.; ALTIERI, M.; HERREN, H.; GLIESSMAN, S. "We Already Grow Enough Food for 10 Billion People ... and Still Can't End Hunger". *J. Sustain. Agric.*, 36 (6):595–598,2012.
5. DE SOUSA, R. A. D.; DA SILVA, I. B. "OS COMMODITIES AGRÍCOLAS E A (IN) SEGURANÇA ALIMENTAR". *OKARA Geogr. em debate*, 14 (1):4–20,2020.
6. CARVALHO, F. P. "Pesticides, Environment, and Food Safety". *Food Energy Secur.*, 6 (2):48–60,2017.
7. KAILASA, S. K.; WU, H.-F.; HUANG, S.-D. "Recent Developments on Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticides in Wastewater". In *Waste Water - Treatment Technologies and Recent Analytical Developments*; InTech; pp 1–25.
8. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. "Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos Em Alimentos - PARA"; Brasília.
9. ISHAQ, M.; SULTANA, N.; IKRAM, M.; IQBAL, A.; SHAH, F.; HAMAYUN, M.; HUSSAIN, A. "Occurrence of Heavy Metals and Pesticide Residues in Tomato Crop: A Threat to Public Health". *Arab. J. Geosci.*, 13 (14):627–637,2020.
10. DOS SANTOS, G. M. A. D. A.; TEIXEIRA, L. J. Q.; PEREIRA, O. S.; DOS SANTOS, A. R.; FRONZA, M.; DA SILVA, A. G.; SCHERER, R. "Pesticide Residues in Conventionally and Organically Grown Tomatoes in Espírito Santo (Brazil)". *Quim. Nova*, 38 (6):848–851,2015.
11. SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, R.; SHARPOV, F.; NAMIESNIK, J.; ROOINTAN, A.; KAMLE, M.; KUMAR, P.; MARTINS, N.; SHARIFI-RAD, J. "Beneficial Effects and Potential Risks of Tomato Consumption for Human Health: An Overview". *Nutrition*, 62:201–208,2019.
12. CHOI, S. H.; KIM, D.-S.; KOZUKUE, N.; KIM, H.-J.; NISHITANI, Y.; MIZUNO, M.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. "Protein, Free Amino Acid, Phenolic, β -

- Carotene, and Lycopene Content, and Antioxidative and Cancer Cell Inhibitory Effects of 12 Greenhouse-Grown Commercial Cherry Tomato Varieties". *J. Food Compos. Anal.*, 34 (2):115–127,2014.
13. INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. "Tem Veneno Nesse Pacote"; São Paulo.
 14. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. "The State of Food and Agriculture"; Rome.
 15. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. "Índice de Desperdício Alimentar Do PNUA - Relatório 2021"; Nairobi.
 16. DWIVEDI, S. L.; LAMMERTS VAN BUEREN, E. T.; CECCARELLI, S.; GRANDO, S.; UPADHYAYA, H. D.; ORTIZ, R. "Diversifying Food Systems in the Pursuit of Sustainable Food Production and Healthy Diets". *Trends Plant Sci.*, 22 (10):842–856,2017.
 17. ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. "Toward a Sustainable Agriculture Through Plant Biostimulants: From Experimental Data to Practical Applications". *Agronomy*, 10 (10):1461,2020.
 18. YAKHIN, O. I.; LUBYANOV, A. A.; YAKHIN, I. A.; BROWN, P. H. "Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective". *Front. Plant Sci.*, 7 (January):1–32,2017.
 19. ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. "Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture". *Front. Plant Sci.*, 9 (November):1–7,2018.
 20. UNIÃO EUROPEIA. "Regulamento (UE) 2019/1009 Do Parlamento Europeu e Do Conselho de 5 de Junho de 2019".
 21. CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. "Agricultural Uses of Plant Biostimulants". *Plant Soil*, 383 (1–2):3–41,2014.
 22. VAN OOSTEN, M. J.; PEPE, O.; DE PASCALE, S.; SILLETTI, S.; MAGGIO, A. "The Role of Biostimulants and Bioeffectors as Alleviators of Abiotic Stress in Crop Plants". *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 4 (1):5,2017.
 23. DU JARDIN, P. "Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation". *Sci. Hortic. (Amsterdam)*., 196:3–14,2015.
 24. BALTAZAR, M.; CORREIA, S.; GUINAN, K. J.; SUJEETH, N.; BRAGANÇA, R.; GONÇALVES, B. "Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants: An Overview". *Biomolecules*, 11 (8):1096,2021.
 25. TARANTINO, A.; LOPS, F.; DISCIGLIO, G.; LOPRIORE, G. "Effects of Plant Biostimulants on Fruit Set, Growth, Yield and Fruit Quality Attributes of 'Orange Rubis®' Apricot (*Prunus Armeniaca* L.) Cultivar in Two Consecutive Years". *Sci. Hortic. (Amsterdam)*., 239 (February):26–34,2018.
 26. EL-NEMR, M. A.; EL-DE SUKI, M.; EL-BASSIONY, A. M.; FAWZY, Z. F. "Response of Growth and Yield of Cucumber Plants (*Cucumis Sativus* L.) to Different Foliar Applications of Humic Acid and Bio-Stimulators". *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 6 (3):630–637,2012.
 27. GEDEON, S.; IOANNOU, A.; BALESTRINI, R.; FOTOPoulos, V.; ANTONIOU,

- C. "Application of Biostimulants in Tomato Plants (*Solanum Lycopersicum*) to Enhance Plant Growth and Salt Stress Tolerance". *Plants*, 11 (22):3082,2022.
28. MORALES-PAYAN, J. P. "Influence of Foliar Sprays of an Amino Acid Formulation on Fruit Yield of "Edward" Mango". *Acta Hortic.*, 1075:157–160,2015.
 29. TEJADA, M.; RODRÍGUEZ-MORGADO, B.; PANEQUE, P.; PARRADO, J. "Effects of Foliar Fertilization of a Biostimulant Obtained from Chicken Feathers on Maize Yield". *Eur. J. Agron.*, 96 (November 2017):54–59,2018.
 30. PAUL, K.; SORRENTINO, M.; LUCINI, L.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; BONINI, P.; REYNAUD, H.; CANAGUIER, R.; TRTÍLEK, M.; PANZAROVÁ, K.; COLLA, G. "Understanding the Biostimulant Action of Vegetal-Derived Protein Hydrolysates by High-Throughput Plant Phenotyping and Metabolomics: A Case Study on Tomato". *Front. Plant Sci.*, 10 (February):1–17,2019.
 31. MATTNER, S. W.; MILINKOVIC, M.; ARIOLI, T. "Increased Growth Response of Strawberry Roots to a Commercial Extract from *Durvillaea Potatorum* and *Ascophyllum Nodosum*". *J. Appl. Phycol.*, 30 (5):2943–2951,2018.
 32. ESSERTI, S.; SMAILI, A.; RIFAI, L. A.; KOUSSA, T.; MAKROUM, K.; BELFAIZA, M.; KABIL, E. M.; FAIZE, L.; BURGOS, L.; ALBURQUERQUE, N.; FAIZE, M. "Protective Effect of Three Brown Seaweed Extracts against Fungal and Bacterial Diseases of Tomato". *J. Appl. Phycol.*, 29 (2):1081–1093,2017.
 33. SHARMA, S.; CHEN, C.; KHATRI, K.; RATHORE, M. S.; PANDEY, S. P. "Gracilaria Dura Extract Confers Drought Tolerance in Wheat by Modulating Abscisic Acid Homeostasis". *Plant Physiol. Biochem.*, 136 (December 2018):143–154,2019.
 34. DE TENDER, C.; MESUERE, B.; VAN DER JEUGT, F.; HAEGEMAN, A.; RUTTINK, T.; VANDECASTEELE, B.; DAWYNDT, P.; DEBODE, J.; KURAMAE, E. E. "Peat Substrate Amended with Chitin Modulates the N-Cycle, Siderophore and Chitinase Responses in the Lettuce Rhizobiome". *Sci. Rep.*, 9 (1):9890,2019.
 35. MONDAL, M. M. A.; PUTEH, A. B.; DAFADER, N. C.; RAFII, M. Y.; MALEK, M. A. "Foliar Application of Chitosan Improves Growth and Yield in Maize". *J. Food, Agric. Environ.*, 11 (2):520–523,2013.
 36. EL AMERANY, F.; MEDDICH, A.; WAHBI, S.; PORZEL, A.; TAOURIRTE, M.; RHAZI, M.; HAUSE, B. "Foliar Application of Chitosan Increases Tomato Growth and Influences Mycorrhization and Expression of Endochitinase-Encoding Genes". *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (2):535,2020.
 37. SUN, C.; FU, D.; JIN, L.; CHEN, M.; ZHENG, X.; YU, T. "Chitin Isolated from Yeast Cell Wall Induces the Resistance of Tomato Fruit to *Botrytis Cinerea*". *Carbohydr. Polym.*, 199 (July):341–352,2018.

38. REYES-PÉREZ, J. J.; MURILLO-NOBOA, K. P.; MURILLO-AMADOR, B.; HERNÁNDEZ-MONTIEL, L. G.; MACIEL-TORRES, S. P.; RIVAS-GARCIA, T. "Edaphic Silicon Nutrition of Tomato Biostimulates Their Growth, Yield and Antioxidant Composition under Greenhouse Conditions". *Hortic. Bras.*, 42:1–7,2024.
39. AZAD, M. O. K.; PARK, B. S.; ADNAN, M.; GERM, M.; KREFT, I.; WOO, S. H.; PARK, C. H. "Silicon Biostimulant Enhances the Growth Characteristics and Fortifies the Bioactive Compounds in Common and Tartary Buckwheat Plant". *J. Crop Sci. Biotechnol.*, 24 (1):51–59,2021.
40. NOVELLO, G.; CESARO, P.; BONA, E.; MASSA, N.; GOSETTI, F.; SCARAFONI, A.; TODESCHINI, V.; BERTA, G.; LINGUA, G.; GAMALERO, E. "The Effects of Plant Growth-Promoting Bacteria with Biostimulant Features on the Growth of a Local Onion Cultivar and a Commercial Zucchini Variety". *Agronomy*, 11 (5):888,2021.
41. BONA, E.; TODESCHINI, V.; CANTAMESSA, S.; CESARO, P.; COPETTA, A.; LINGUA, G.; GAMALERO, E.; BERTA, G.; MASSA, N. "Combined Bacterial and Mycorrhizal Inocula Improve Tomato Quality at Reduced Fertilization". *Sci. Hortic. (Amsterdam)*., 234 (November 2017):160–165,2018.
42. SOURI, M. K.; BAKHTIARIZADE, M. "Biostimulation Effects of Rosemary Essential Oil on Growth and Nutrient Uptake of Tomato Seedlings". *Sci. Hortic. (Amsterdam)*., 243 (August 2018):472–476,2019.
43. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. "Biological Effects of Essential Oils – A Review". *Food Chem. Toxicol.*, 46 (2):446–475,2008.
44. HARA, M. "Potential Use of Essential Oils to Enhance Heat Tolerance in Plants". *Zeitschrift für Naturforsch. C*, 75 (7–8):225–231,2020.
45. KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. "Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints". *Biopestic. Int.*, 4 (1):63–84,2008.
46. NINKOVIC, V.; MARKOVIC, D.; RENSING, M. "Plant Volatiles as Cues and Signals in Plant Communication". *Plant. Cell Environ.*, 44 (4):1030–1043,2021.
47. HARA, M.; HARAZAKI, A.; TABATA, K. "Administration of Isothiocyanates Enhances Heat Tolerance in Arabidopsis Thaliana". *Plant Growth Regul.*, 69 (1):71–77,2013.
48. YAMAUCHI, Y.; KUNISHIMA, M.; MIZUTANI, M.; SUGIMOTO, Y. "Reactive Short-Chain Leaf Volatiles Act as Powerful Inducers of Abiotic Stress-Related Gene Expression". *Sci. Rep.*, 5 (1):8030,2015.
49. FAROUK, S.; ALMUTAIRI, A. B.; ALHARBI, Y. O.; AL-BASSAM, W. I. "Acaricidal Efficacy of Jasmine and Lavender Essential Oil or Mustard Fixed Oil against Two-Spotted Spider Mite and Their Impact on Growth and Yield of Eggplants". *Biology (Basel)*., 10 (5):410,2021.
50. CHAOUCH, R.; KTHIRI, Z.; SOUFI, S.; BEN JABEUR, M.; BETTAIEB, T. "Assessing the Biostimulant Effect of Micro-Algae and Thyme Essential

- Oil during in-Vitro and Ex-Vitro Rooting of Strawberry". *South African J. Bot.*, 162:120–128,2023.
51. CHRYSARGYRIS, A.; CHARALAMBOUS, S.; XYLIA, P.; LITSKAS, V.; STAVRINIDES, M.; TZORTZAKIS, N. "Assessing the Biostimulant Effects of a Novel Plant-Based Formulation on Tomato Crop". *Sustain.*, 12 (20):1–15,2020.
 52. KOLOMAZNÍK, K.; PECHA, J.; FRIEBROVÁ, V.; JANÁČOVÁ, D.; VAŠEK, V. "Diffusion of Biostimulators into Plant Tissues". *Heat Mass Transf.*, 48 (9):1505–1512,2012.
 53. NEPHALI, L.; PIATER, L. A.; DUBERY, I. A.; PATTERSON, V.; HUYSER, J.; BURGESS, K.; TUGIZIMANA, F. "Biostimulants for Plant Growth and Mitigation of Abiotic Stresses: A Metabolomics Perspective". *Metabolites*, 10 (12):1–26,2020.
 54. KHAN, W.; RAYIRATH, U. P.; SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M. N.; RAYORATH, P.; HODGES, D. M.; CRITCHLEY, A. T.; CRAIGIE, J. S.; NORRIE, J.; PRITHIVIRAJ, B. "Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development". *J. Plant Growth Regul.*, 28 (4):386–399,2009.
 55. VANDENKOORNHUYSE, P.; QUAISER, A.; DUHAMEL, M.; LE VAN, A.; DUFRESNE, A. "The Importance of the Microbiome of the Plant Holobiont". *New Phytol.*, 206 (4):1196–1206,2015.
 56. LEPHATSI, M. M.; MEYER, V.; PIATER, L. A.; DUBERY, I. A.; TUGIZIMANA, F. "Plant Responses to Abiotic Stresses and Rhizobacterial Biostimulants: Metabolomics and Epigenetics Perspectives". *Metabolites*, 11 (7):457–488,2021.
 57. HALL, R. D. "Plant Metabolomics: From Holistic Hope, to Hype, to Hot Topic". *New Phytol.*, 169 (3):453–468,2006.
 58. DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. "Metabolomics: Current Analytical Platforms and Methodologies". *TrAC Trends Anal. Chem.*, 24 (4):285–294,2005.
 59. SORRENTINO, M.; PANZAROVÁ, K.; SPYROGLOU, I.; SPÍCHAL, L.; BUFFAGNI, V.; GANUGI, P.; ROUPHAEL, Y.; COLLA, G.; LUCINI, L.; DE DIEGO, N. "Integration of Phenomics and Metabolomics Datasets Reveals Different Mode of Action of Biostimulants Based on Protein Hydrolysates in *Lactuca Sativa* L. and *Solanum Lycopersicum* L. Under Salinity". *Front. Plant Sci.*, 12 (February):1–18,2022.
 60. LUCINI, L.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; BONINI, P.; BAFFI, C.; COLLA, G. "A Vegetal Biopolymer-Based Biostimulant Promoted Root Growth in Melon While Triggering Brassinosteroids and Stress-Related Compounds". *Front. Plant Sci.*, 9 (April):1–11,2018.
 61. PAUL, K.; SORRENTINO, M.; LUCINI, L.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; BONINI, P.; MIRAS MORENO, M. B.; REYNAUD, H.; CANAGUIER, R.; TRTÍLEK, M.; PANZAROVÁ, K.; COLLA, G. "A Combined Phenotypic and Metabolomic Approach for Elucidating the Biostimulant Action of a Plant-Derived Protein Hydrolysate on Tomato Grown Under Limited Water Availability". *Front. Plant Sci.*, 10 (May):1–18,2019.

62. BARRAJÓN-CATALÁN, E.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BORRÁS, F.; PÉREZ, D.; HERRERO, N.; RUIZ, J. J.; MICOL, V. "Metabolomic Analysis of the Effects of a Commercial Complex Biostimulant on Pepper Crops". *Food Chem.*, 310 (September 2019):125818,2020.
63. ISMAN, M. B. "Commercial Development of Plant Essential Oils and Their Constituents as Active Ingredients in Bioinsecticides". *Phytochem. Rev.*, 19 (2):235–241,2020.
64. RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A. "Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review". *Foods*, 9 (3):365–395,2020.
65. NI, Z. J.; WANG, X.; SHEN, Y.; THAKUR, K.; HAN, J.; ZHANG, J. G.; HU, F.; WEI, Z. J. "Recent Updates on the Chemistry, Bioactivities, Mode of Action, and Industrial Applications of Plant Essential Oils". *Trends Food Sci. Technol.*, 110 (December 2020):78–89,2021.
66. VASILAKOGLU, I.; DHIMA, K.; PASCHALIDIS, K.; RITZOULIS, C. "Herbicidal Potential on *Lolium Rigidum* of Nineteen Major Essential Oil Components and Their Synergy". *J. Essent. Oil Res.*, 25 (1):1–10,2013.
67. PAVELA, R.; BENELLI, G. "Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints". *Trends Plant Sci.*, 21 (12):1000–1007,2016.
68. KRZYŻOWSKI, M.; BARAN, B.; ŁOZOWSKI, B.; FRANCIKOWSKI, J. "The Role of Dilution Mediums in Studies of Fumigant Insecticidal Activity of Essential Oils". *J. Pest Sci.* (2004)., 93 (4):1119–1124,2020.
69. KARALIJA, E.; DAHIJA, S.; PARIĆ, A.; ČAVAR ZELJKOVIĆ, S. "Phytotoxic Potential of Selected Essential Oils against *Ailanthus Altissima* (Mill.) Swingle, an Invasive Tree". *Sustain. Chem. Pharm.*, 15 (January):100219,2020.
70. IBÁÑEZ, M. D.; BLÁZQUEZ, M. A. "Phytotoxic Effects of Commercial Essential Oils on Selected Vegetable Crops: Cucumber and Tomato". *Sustain. Chem. Pharm.*, 15 (December 2019):100209,2020.
71. CAMPOLO, O.; GIUNTI, G.; LAIGLE, M.; MICHEL, T.; PALMERI, V. "Essential Oil-Based Nano-Emulsions: Effect of Different Surfactants, Sonication and Plant Species on Physicochemical Characteristics". *Ind. Crops Prod.*, 157 (April):112935,2020.
72. SINGH, M. N.; HEMANT, K. S. Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H. G. "Microencapsulation: A Promising Technique for Controlling Drug Delivery". *Res. Pharm. Sci.*, 5 (2):65–77,2010.
73. AHMED, J.; THOMAS, L.; AL-JASSAR, S.; JACOB, H.; MULLA, M.; AL-RUWAIH, N. "Encapsulation of Thyme and Cinnamon Essential Oils in Porous Corn Starch: Particle Size, Microstructure, and Antimicrobial Properties". *J. Food Meas. Charact.*, 17 (5):5390–5401,2023.
74. TIMGREN, A.; RAYNER, M.; DEJMEK, P.; MARKU, D.; SJÖÖ, M. "Emulsion Stabilizing Capacity of Intact Starch Granules Modified by Heat Treatment or Octenyl Succinic Anhydride". *Food Sci. Nutr.*, 1 (2):157–171,2013.

75. ROMERO-HERNANDEZ, H. A.; SÁNCHEZ-RIVERA, M. M.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; YEE-MADEIRA, H.; YAÑEZ-FERNANDEZ, J.; BELLO-PÉREZ, L. A. "Avocado Oil Encapsulation with OSA-Esterified Taro Starch as Wall Material: Physicochemical and Morphology Characteristics". *LWT*, 138 (2021):110629,2021.
76. FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. "Química de Alimentos de Fennema - 4a Ed. - Editora Artmed,2010. - FELLOWS, P."
77. FERREIRA LINS, R.; ROGÉRIO LUSTRI, W.; MINHARRO, S.; ALONSO, A.; DE SOUSA NETO, D. "On the Formation, Physicochemical Properties and Antibacterial Activity of Colloidal Systems Containing Tea Tree (*Melaleuca Alternifolia*) Oil". *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 497 (2016):271–279,2016.
78. CHENG, M.; ZENG, G.; HUANG, D.; YANG, C.; LAI, C.; ZHANG, C.; LIU, Y. "Advantages and Challenges of Tween 80 Surfactant-Enhanced Technologies for the Remediation of Soils Contaminated with Hydrophobic Organic Compounds". *Chem. Eng. J.*, 314 (2017):98–113,2017.
79. ARTIGA-ARTIGAS, M.; GUERRA-ROSAS, M. I.; MORALES-CASTRO, J.; SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO, O. "Influence of Essential Oils and Pectin on Nanoemulsion Formulation: A Ternary Phase Experimental Approach". *Food Hydrocoll.*, 81 (2018):209–219,2018.
80. MENDES, J. F.; NORCINO, L. B.; MARTINS, H. H. A.; MANRICH, A.; OTONI, C. G.; CARVALHO, E. E. N.; PICCOLI, R. H.; OLIVEIRA, J. E.; PINHEIRO, A. C. M.; MATTOSO, L. H. C. "Correlating Emulsion Characteristics with the Properties of Active Starch Films Loaded with Lemongrass Essential Oil". *Food Hydrocoll.*, 100 (June 2019):105428,2020.
81. PAGGIOLA, G.; STEMPVOORT, S. VAN; BUSTAMANTE, J.; BARBERO, J. M. V.; HUNT, A. J.; CLARK, J. H. "Can Bio-based Chemicals Meet Demand? Global and Regional Case-study around Citrus Waste-derived Limonene as a Solvent for Cleaning Applications". *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, 10 (6):686–698,2016.
82. HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. "Ethnopharmacology of *Lippia Alba*". *J. Ethnopharmacol.*, 116 (2):211–222,2008.
83. SÁ FILHO, J. C. F. DE; NIZIO, D. A. DE C.; OLIVEIRA, A. M. S. DE; ALVES, M. F.; OLIVEIRA, R. C. DE; LUZ, J. M. Q.; NOGUEIRA, P. C. DE L.; ARRIGONI-BLANK, M. DE F.; BLANK, A. F. "Geographic Location and Seasonality Affect the Chemical Composition of Essential Oils of *Lippia Alba* Accessions". *Ind. Crops Prod.*, 188 (May):115602,2022.
84. ADAMS, R. "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy". 459,2009.
85. POURDARBANI, R.; SABZI, S.; ROHBAN, M. H.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. L.; GALLARDO-BERNAL, I.; HERRERA-MIRANDA, I.; GARCÍA-MATEOS, G. "One-Dimensional Convolutional Neural Networks for Hyperspectral

- Analysis of Nitrogen in Plant Leaves". *Appl. Sci.*, 11 (24):11853,2021.
86. BŁASZCZAK, W.; LEWANDOWICZ, G. "Light Microscopy as a Tool to Evaluate the Functionality of Starch in Food". *Foods*, 9 (5):670,2020.
 87. VARONA, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. "Formulation of a Natural Biocide Based on Lavandin Essential Oil by Emulsification Using Modified Starches". *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, 48 (6):1121–1128,2009.
 88. DO NASCIMENTO, A.; TONETO, L. C.; LEPAUS, B. M.; VALIATI, B. S.; FARIA-SILVA, L.; DE SÃO JOSÉ, J. F. B. "Effect of Edible Coatings of Cassava Starch Incorporated with Clove and Cinnamon Essential Oils on the Shelf Life of Papaya". *Membranes (Basel)*., 13 (9):772,2023.
 89. FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. "Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods". *Anal. Chim. Acta*, 597 (2):179–186,2007.
 90. MELITO, S.; PETRETTO, G. L.; CHAHINE, S.; PINTORE, G.; CHESSA, M. "Seasonal Variation of Essential Oil in *Rosmarinus Officinalis* Leaves in Sardinia". *Nat. Prod. Commun.*, 14 (7):1–7,2019.
 91. RATHORE, S.; MUKHIA, S.; KAPOOR, S.; BHATT, V.; KUMAR, R.; KUMAR, R. "Seasonal Variability in Essential Oil Composition and Biological Activity of *Rosmarinus Officinalis* L. Accessions in the Western Himalaya". *Sci. Rep.*, 12 (1):1–13,2022.
 92. KESSLER, J. C.; VIEIRA, V.; MARTINS, I. M.; MANRIQUE, Y. A.; FERREIRA, P.; CALHELHA, R. C.; AFONSO, A.; BARROS, L.; RODRIGUES, A. E.; DIAS, M. M. "Chemical and Organoleptic Properties of Bread Enriched with *Rosmarinus Officinalis* L.: The Potential of Natural Extracts Obtained through Green Extraction Methodologies as Food Ingredients". *Food Chem.*, 384 (November 2021):132514,2022.
 93. AFIUNIZADEH, M.; KARIMZADEH, J.; IMANI, S.; MOHARRAMIPOUR, S. "Insecticidal and Oviposition Deterrent Effects of Five Medicinal Plant Extracts on the Diamondback Moth". *J. Plant Dis. Prot.*, 129 (4):805–817,2022.
 94. DE FATIMA ALVES NONATO, C.; CAMILO, C. J.; DUARTE LEITE, D. O.; LÚCIO ALBUQUERQUE DA NOBREGA, M. G.; RIBEIRO-FILHO, J.; ALENCAR DE MENEZES, I. R.; TAVARES, J. F.; MARTINS DA COSTA, J. G. "Comparative Analysis of Chemical Profiles and Antioxidant Activities of Essential Oils Obtained from Species of *Lippia* L. by Chemometrics". *Food Chem.*, 384 (September 2021):2022.
 95. SZOŁYGA, B.; GNIŁKA, R.; SZCZEPANIK, M.; SZUMNY, A. "Chemical Composition and Insecticidal Activity of *Thuja Occidentalis* and *Tanacetum Vulgare* Essential Oils against Larvae of the Lesser Mealworm, *Alphitobius Diaperinus*". *Entomol. Exp. Appl.*, 151 (1):1–10,2014.
 96. VILAS-BOAS, S. M.; DA COSTA, M. C.; COUTINHO, J. A. P.; FERREIRA, O.;

- PINHO, S. P. "Octanol–Water Partition Coefficients and Aqueous Solubility Data of Monoterpenoids: Experimental, Modeling, and Environmental Distribution". *Ind. Eng. Chem. Res.*, 61 (8):3154–3167,2022.
97. COPOLOVICI, L.; NIINEMETS, Ü. "Salting-in and Salting-out Effects of Ionic and Neutral Osmotica on Limonene and Linalool Henry's Law Constants and Octanol/Water Partition Coefficients". *Chemosphere*, 69 (4):621–629,2007.
 98. TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. "Formation and Stability of Nano-Emulsions". *Adv. Colloid Interface Sci.*, 108–109 (2004):303–318,2004.
 99. BARANAUSKAITE, J.; OCKUN, M. A.; UNER, B.; TAS, C.; IVANAUSKAS, L. "Effect of the Amount of Polysorbate 80 and Oregano Essential Oil on the Emulsion Stability and Characterization Properties of Sodium Alginate Microcapsules". *Molecules*, 26 (20):6304,2021.
 100. ZHU, F.; XIE, Q. "Structure and Physicochemical Properties of Starch". In *Physical Modifications of Starch*; pp 1–14.
 101. RIBEIRO, J. S.; VELOSO, C. M. "Microencapsulation of Natural Dyes with Biopolymers for Application in Food: A Review". *Food Hydrocoll.*, 112 (July 2020):2021.
 102. VÁSQUEZ-GARAY, F.; CARRILLO-VARELA, I.; VIDAL, C.; REYES-CONTRERAS, P.; FACCINI, M.; TEIXEIRA MENDONÇA, R. "A Review on the Lignin Biopolymer and Its Integration in the Elaboration of Sustainable Materials". *Sustainability*, 13 (5):2697,2021.
 103. RAJESH BANU, J.; KAVITHA, S.; YUKESH KANNAH, R.; POORNIMA DEVI, T.; GUNASEKARAN, M.; KIM, S.-H.; KUMAR, G. "A Review on Biopolymer Production via Lignin Valorization". *Bioresour. Technol.*, 290 (May):121790,2019.
 104. SAVY, D.; CANELLAS, L.; VINCI, G.; COZZOLINO, V.; PICCOLO, A. "Humic-Like Water-Soluble Lignins from Giant Reed (*Arundo Donax* L.) Display Hormone-Like Activity on Plant Growth". *J. Plant Growth Regul.*, 36 (4):995–1001,2017.
 105. LI, Z.; GUO, K.; LIN, L.; HE, W.; ZHANG, L.; WEI, C. "Comparison of Physicochemical Properties of Starches from Flesh and Peel of Green Banana Fruit". *Molecules*, 23 (9):2312,2018.
 106. SOGANI, M.; SONU, K.; SYED, Z.; RAJVANSHI, J. "Preparation of Biofertilizer Blend from Banana Peels along with Its Application in Agriculture and Plant Microbial Fuel Cell". *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 1151 (1):012034,2023.
 107. MONTEIRO, A. R.; BATTISTI, A. P.; VALENCIA, G. A.; DE ANDRADE, C. J. "The Production of High-Added-Value Bioproducts from Non-Conventional Biomasses: An Overview". *Biomass*, 3 (2):123–137,2023.
 108. SIQUEIRA, B. DOS S.; SOARES JÚNIOR, M. S.; FERNANDES, K. F.; CALIARI, M.; DAMIANI, C. "Effect of Soaking on the Nutritional Quality of Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.) Peel Flour". *Food Sci. Technol.*, 33 (3):500–

- 506,2013.
109. VERA, R.; SOUZA, E. R. B. DE; FERNANDES, E. P.; NAVES, R. V.; JÚNIOR, M. S. S.; CALIARI, M.; XIMENES, P. A. "CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE FRUTOS DO PEQUIZEIRO (*Caryocar Brasiliense* Camb.) ORIUNDOS DE DUAS REGIÕES NO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL". *Pesqui. Agropecuária Trop. (Agricultural Res. Trop., 37 (2):93–99,2007.*
 110. SOARES JÚNIOR, M. S.; BASSINELLO, P. Z.; CALIARI, M.; REIS, R. C. DOS; LACERDA, D. B. C. L.; KOAKUZU, S. N. "Development and Chemical Characterization of Flour Obtained from the External Mesocarp of "Pequi" Fruit". *Ciência e Tecnol. Aliment., 30 (ahead):0–0,2010.*
 111. BRITO CANGUSSU, L.; P. LEÃO, D.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. "Profile of Bioactive Compounds in Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.) Peel Flours". *Food Chem., 350 (February):129221,2021.*
 112. SIQUEIRA, B. DOS S.; ALVES, L. D.; VASCONCELOS, P. N.; DAMIANI, C.; SOARES JÚNIOR, M. S. "Pectina Extraída de Casca de Pequi e Aplicação Em Geleia Light de Manga". *Rev. Bras. Frutic., 34 (2):560–567,2012.*
 113. KOCH, M.; NAUMANN, M.; PAWELZIK, E.; GRANSEE, A.; THIEL, H. "The Importance of Nutrient Management for Potato Production Part I: Plant Nutrition and Yield". *Potato Res., 63 (1):97–119,2020.*
 114. BAGLE, A. V.; JADHAV, R. S.; GITE, V. V.; HUNDIWALE, D. G.; MAHULIKAR, P. P. "Controlled Release Study of Phenol Formaldehyde Microcapsules Containing Neem Oil as an Insecticide". *Int. J. Polym. Mater., 62 (8):421–425,2013.*
 115. SITTIPUMMONGKOL, K.; CHUYSINUAN, P.; TECHASAKUL, S.; PISITSAK, P.; PECHYEN, C. "Core Shell Microcapsules of Neem Seed Oil Extract Containing Azadirachtin and Biodegradable Polymers and Their Release Characteristics". *Polym. Bull., 76 (8):3803–3817,2019.*
 116. WEN, P.; ZHU, D. H.; WU, H.; ZONG, M. H.; JING, Y. R.; HAN, S. Y. "Encapsulation of Cinnamon Essential Oil in Electrospun Nanofibrous Film for Active Food Packaging". *Food Control, 59:366–376,2016.*
 117. ZAINAL, N. F. A.; SAITER, J. M.; HALIM, S. I. A.; LUCAS, R.; CHAN, C. H. "Thermal Analysis: Basic Concept of Differential Scanning Calorimetry and Thermogravimetry for Beginners". *Chem. Teach. Int., 3 (2):59–75,2021.*
 118. YANG, Z.; PENG, Z.; LI, J.; LI, S.; KONG, L.; LI, P.; WANG, Q. "Development and Evaluation of Novel Flavour Microcapsules Containing Vanilla Oil Using Complex Coacervation Approach". *Food Chem., 145 (2014):272–277,2014.*
 119. MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA O, J. M. "Critical Factors in the Release of Drugs from Sustained Release Hydrophilic Matrices". *J. Control. Release, 154:2–19,2011.*
 120. SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. "Modeling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)". *Adv. Drug Deliv. Rev., 64 (2012):163–174,2012.*

121. HEIDARI, F.; JAFARI, S. M.; ZIAIFAR, A. M.; MALEKJANI, N. "Stability and Release Mechanisms of Double Emulsions Loaded with Bioactive Compounds; a Critical Review". *Adv. Colloid Interface Sci.*, 299 (November 2021):102567,2022.
122. GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. "A Practical Guide to Analytical Method Validation, Including Measurement Uncertainty and Accuracy Profiles". *TrAC Trends Anal. Chem.*, 26 (3):227–238,2007.
123. PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. "QuEChERS: Um Método Moderno de Preparo de Amostra Para Determinação Multirresíduo de Pesticidas Em Alimentos Por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas". *Quim. Nova*, 32 (6):1620–1634,2009.
124. KOLB, B.; ETTRE, L. S. "Static Ssss Headspace – Gas Chromatography : Theory and Practice Second Edition", 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
125. TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. "Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance". *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 23 (8):535–552,2004.
126. DE SOUSA, F. A.; GUIDO COSTA, A. I.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; TEÓFILO, R. F.; NEVES, A. A.; DE PINHO, G. P. "Evaluation of Matrix Effect on the GC Response of Eleven Pesticides by PCA". *Food Chem.*, 135 (1):179–185,2012.
127. CHAMBERS, E.; WAGROWSKI-DIEHL, D. M.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. "Systematic and Comprehensive Strategy for Reducing Matrix Effects in LC/MS/MS Analyses". *J. Chromatogr. B*, 852 (1–2):22–34,2007.
128. GARRIDO FRENICH, A.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; FERNÁNDEZ MORENO, J. L.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. "Compensation for Matrix Effects in Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Using a Single Point Standard Addition". *J. Chromatogr. A*, 1216 (23):4798–4808,2009.
129. AGUIAR, M. C. S.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; FORIM, M. R. "Evaluation of the Microencapsulation of Orange Essential Oil in Biopolymers by Using a Spray-Drying Process". *Sci. Rep.*, 10:1–11,2020.
130. AGUIAR, M. C. S.; DENADAE, B. E.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; BITTENCOURT, P. R. S.; SCREMIN, F. R.; FORIM, M. R. "Quality Control for Lignin and Gelatin Microcapsules Loaded with Orange Essential Oil". *J. Braz. Chem. Soc.*, 33 (1):85–95,2022.
131. SHABIR, G. A.; JOHN LOUGH, W.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. "Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 30 (3):311–333,2007.
132. CHAI, M. K.; TAN, G. H. "Validation of a Headspace Solid-Phase Microextraction Procedure with Gas Chromatography-Electron Capture Detection of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables". *Food Chem.*, 117 (3):561–567,2009.
133. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. "Bioanalytical Method Validation";

- CRC Press.
134. FLEMING, T. R.; FLEMING, C. C.; LEVY, C. C. B.; REPISO, C.; HENNEQUART, F.; NOLASCO, J. B.; LIU, F. "Biostimulants Enhance Growth and Drought Tolerance in *Arabidopsis Thaliana* and Exhibit Chemical Priming Action". *Ann. Appl. Biol.*, 174 (2):153–165,2019.
 135. MZIBRA, A.; AASFAR, A.; BENHIMA, R.; KHOULOU, M.; BOULIF, R.; DOUIRA, A.; BAMOUH, A.; MEFTAH KADMIRI, I. "Biostimulants Derived from Moroccan Seaweeds: Seed Germination Metabolomics and Growth Promotion of Tomato Plant". *J. Plant Growth Regul.*, 40 (1):353–370,2021.
 136. NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. "A Review of Current Trends and Advances in Modern Bio-Analytical Methods: Chromatography and Sample Preparation". *Anal. Chim. Acta*, 656 (1–2):8–35,2009.
 137. HUIE, C. W. "A Review of Modern Sample-Preparation Techniques for the Extraction and Analysis of Medicinal Plants". *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (1–2):23–30,2002.
 138. BI, H.; KRAUSZ, K. W.; MANNA, S. K.; LI, F.; JOHNSON, C. H.; GONZALEZ, F. J. "Optimization of Harvesting, Extraction, and Analytical Protocols for UPLC-ESI-MS-Based Metabolomic Analysis of Adherent Mammalian Cancer Cells". *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (15):5279–5289,2013.
 139. EL ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; ELBAOUCHI, A.; SIJILMASSI, B.; EL MERNISSI, N.; AAFSAR, A.; MEFTAH-KADMIRI, I.; BENDAOU, N.; SMOUNI, A. "Dunaliella Salina Exopolysaccharides: A Promising Biostimulant for Salt Stress Tolerance in Tomato (*Solanum Lycopersicum*)". *J. Appl. Phycol.*, 30 (5):2929–2941,2018.
 140. MACKOVÁ, J.; VAŠKOVÁ, M.; MACEK, P.; HRONKOVÁ, M.; SCHREIBER, L.; ŠANTRŮČEK, J. "Plant Response to Drought Stress Simulated by ABA Application: Changes in Chemical Composition of Cuticular Waxes". *Environ. Exp. Bot.*, 86:70–75,2013.
 141. ALFOSEA-SIMÓN, M.; SIMÓN-GRAO, S.; ZAVALA-GONZALEZ, E. A.; NAVARRO-MORILLO, I.; MARTÍNEZ-NICOLÁS, J. J.; ALFOSEA-SIMÓN, F. J.; SIMÓN, I.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F. "Ionic, Metabolic and Hormonal Characterization of the Phenological Phases of Different Tomato Genotypes Using Omics Tools". *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, 293 (November 2021):110697,2022.
 142. SZYMAŃSKI, J.; BOCOBZA, S.; PANDA, S.; SONAWANE, P.; CÁRDENAS, P. D.; LASHBROOKE, J.; KAMBLE, A.; SHAHAF, N.; MEIR, S.; BOVY, A.; BEEKWILDER, J.; TIKUNOV, Y.; ROMERO DE LA FUENTE, I.; ZAMIR, D.; ROGACHEV, I.; AHARONI, A. "Analysis of Wild Tomato Introgression Lines Elucidates the Genetic Basis of Transcriptome and Metabolome Variation Underlying Fruit Traits and Pathogen Response". *Nat. Genet.*, 52 (10):1111–1121,2020.
 143. GROSS, B. L.; OLSEN, K. M. "Genetic Perspectives on Crop Domestication". *Trends Plant Sci.*, 15 (9):529–537,2010.

144. TIEMAN, D.; ZHU, G.; RESENDE, M. F. R.; LIN, T.; NGUYEN, C.; BIES, D.; RAMBLA, J. L.; BELTRAN, K. S. O.; TAYLOR, M.; ZHANG, B.; IKEDA, H.; LIU, Z.; FISHER, J.; ZEMACH, I.; MONFORTE, A.; ZAMIR, D.; GRANELL, A.; KIRST, M.; HUANG, S.; KLEE, H. "A Chemical Genetic Roadmap to Improved Tomato Flavor". *Science* (80-.), 355 (6323):391–394,2017.
145. AGUIAR, M. C. S.; MUELLER DE FREITAS, M.; DE FREITAS, C. A.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; CARNEIRO, R. L.; DA SILVA, M. F. DAS G. F.; FERNANDES, J. B.; FORIM, M. R. "Exploring Chemical Diversity in Glycine Max Cultivars: A Multivariate Approach in the Search for Bioactive Compounds against *Spodoptera Cosmioides*". *Front. Plant Sci.*, 13 (September):1–18,2022.
146. KWON, M. C.; KIM, Y. X.; LEE, S.; JUNG, E. S.; SINGH, D.; SUNG, J.; LEE, C. H. "Comparative Metabolomics Unravel the Effect of Magnesium Oversupply on Tomato Fruit Quality and Associated Plant Metabolism". *Metabolites*, 9 (10):231,2019.
147. MUN, H. I.; KWON, M. C.; LEE, N.-R.; SON, S. Y.; SONG, D. H.; LEE, C. H. "Comparing Metabolites and Functional Properties of Various Tomatoes Using Mass Spectrometry-Based Metabolomics Approach". *Front. Nutr.*, 8 (April):1–10,2021.
148. CATRINCK, T. C. P. G.; AGUIAR, M. C. S.; DIAS, A.; SILVÉRIO, F. O.; FIDÊNCIO, P. H.; DE PINHO, G. P. "Study of the Reaction Derivatization Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) with N,O-Bis(Trimethylsilyl)Trifluoroacetamide". *Am. J. Anal. Chem.*, 04 (11):647–652,2013.
149. ZHANG, L.; YU, Y.; YU, R. "Analysis of Metabolites and Metabolic Pathways in Three Maize (*Zea Mays* L.) Varieties from the Same Origin Using GC–MS". *Sci. Rep.*, 10 (1):1–10,2020.
150. BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRÌ, A. L.; MAGRÌ, A. D.; MARINI, F. "Data-Fusion for Multiplatform Characterization of an Italian Craft Beer Aimed at Its Authentication". *Anal. Chim. Acta*, 820:23–31,2014.
151. DAI, S.; LIN, Z.; XU, B.; WANG, Y.; SHI, X.; QIAO, Y.; ZHANG, J. "Metabolomics Data Fusion between near Infrared Spectroscopy and High-Resolution Mass Spectrometry: A Synergetic Approach to Boost Performance or Induce Confusion". *Talanta*, 189 (11):641–648,2018.
152. XIA, J.; WISHART, D. S. "Metabolomic Data Processing, Analysis, and Interpretation Using MetaboAnalyst". *Curr. Protoc. Bioinforma.*, 34 (1):1–48,2011.
153. PEREIRA, F.; PEREIRA-FILHO, E. "Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial". *Quim. Nova*, 2018 (9):1061–1071,2018.
154. REIS, L. S.; AZEVEDO, C. A. V. DE; ALBUQUERQUE, A. W.; S. JUNIOR, J. F. "Índice de Área Foliar e Produtividade Do Tomate Sob Condições de Ambiente Protegido". *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.*, 17 (4):386–391,2013.

155. SHARMA, A.; ZHANG, L.; NIÑO-LIU, D.; ASHRAFI, H.; FOOLAD, M. R. "A *Solanum Lycopersicum* × *Solanum Pimpinellifolium* Linkage Map of Tomato Displaying Genomic Locations of R-Genes, RGAs, and Candidate Resistance/Defense-Response ESTs". *Int. J. Plant Genomics*, 2008:1–18,2008.
156. NUNOO, J.; QUARTEY, E. K.; AMOATEY, H. M.; KLU, G. Y. P. "Effect of Recurrent Irradiation on the Improvement of a Variant Line of Wild Tomato (*Solanum Pimpinellifolium*)". *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, 7 (4):377–383,2014.
157. WANG, X.; GAO, L.; JIAO, C.; STRAVORAVDIS, S.; HOSMANI, P. S.; SAHA, S.; ZHANG, J.; MAINIERO, S.; STRICKLER, S. R.; CATALA, C.; MARTIN, G. B.; MUELLER, L. A.; VREBALOV, J.; GIOVANNONI, J. J.; WU, S.; FEI, Z. "Genome of *Solanum Pimpinellifolium* Provides Insights into Structural Variants during Tomato Breeding". *Nat. Commun.*, 11 (1):5817,2020.
158. MOSCA, F.; HIDALGO, G. I.; VILLASANTE, J.; ALMAJANO, M. P. "Continuous or Batch Solid-Liquid Extraction of Antioxidant Compounds from Seeds of *Sterculia Apetala* Plant and Kinetic Release Study". *Molecules*, 23 (7):2018.
159. LAZIC, Z. I. R. "Design of Experiments in Chemical Engineering A Practical Guide".
160. LI, H.-Z.; TAN, Y.-L.; ZHANG, Z.-J.; XIA, Y.-Y.; LI, X.-J.; CUI, L.-X.; CHEN, T. "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Procyanidins from *Perilla* Seed Hull and Their Antioxidant Activities in Vitro". *Food Sci. Technol.*, 39 (2):378–387,2019.
161. GAO, Y.; WANG, S.; DANG, S.; HAN, S.; YUN, C.; WANG, W.; WANG, H. "Optimized Ultrasound-Assisted Extraction of Total Polyphenols from *Empetrum Nigrum* and Its Bioactivities". *J. Chromatogr. B*, 1173 (January):122699,2021.
162. BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. "Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry". *Talanta*, 76 (5):965–977,2008.
163. SNOW, N. H.; BULLOCK, G. P. "Novel Techniques for Enhancing Sensitivity in Static Headspace Extraction-Gas Chromatography". *J. Chromatogr. A*, 1217 (16):2726–2735,2010.
164. SORIA, A. C.; GARCÍA-SARRIÓ, M. J.; SANZ, M. L. "Volatile Sampling by Headspace Techniques". *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 71:85–99,2015.
165. YANG, Y.-N.; LIANG, M.; YANG, Y.; ZHENG, F.-P.; WANG, X.-P.; YU, A.-N. "Optimization of a Headspace Solid-Phase Microextraction Method for the Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis Aroma Compounds of *Litsea Mollis* Hemsl. Immature Fruit". *Food Sci. Technol.*, 40 (4):786–793,2020.
166. DE-LA-CRUZ CHACÓN, I.; RILEY-SALDAÑA, C. A.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. "Secondary Metabolites during Early Development in Plants". *Phytochem. Rev.*, 12 (1):47–64,2013.

167. SZABLIŃSKA-PIERNIK, J.; LAHUTA, L. B. "Changes in Polar Metabolites during Seed Germination and Early Seedling Development of Pea, Cucumber, and Wheat". *Agriculture*, 13 (12):2278,2023.
168. BINENBAUM, J.; WEINSTAIN, R.; SHANI, E. "Gibberellin Localization and Transport in Plants". *Trends Plant Sci.*, 23 (5):410–421,2018.
169. HARTWECK, L. M. "Gibberellin Signaling". *Planta*, 229 (1):1–13,2008.
170. GAO, S.; CHU, C. "Gibberellin Metabolism and Signaling: Targets for Improving Agronomic Performance of Crops". *Plant Cell Physiol.*, 61 (11):1902–1911,2020.
171. VOLPIE SILVA, N.; MAZZAFERA, P.; CESARINO, I. "Should I Stay or Should I Go: Are Chlorogenic Acids Mobilized towards Lignin Biosynthesis?". *Phytochemistry*, 166 (July):112063,2019.
172. DENAXA, N.-K.; PETROS, R. A.; GEORGIOS, K. D.; STAVROS, V. N. "Chlorogenic Acid: A Possible Cofactor in the Rooting of 'Kalamata' Olive Cultivar". *J. Plant Growth Regul.*, 40 (5):2017–2027,2021.
173. ROUSSOS, P. A. "Adventitious Root Formation in Plants: The Implication of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide". *Antioxidants*, 12 (4):862,2023.
174. VIDOZ, M. L.; LORETI, E.; MENSUALI, A.; ALPI, A.; PERATA, P. "Hormonal Interplay during Adventitious Root Formation in Flooded Tomato Plants". *Plant J.*, 63 (4):551–562,2010.
175. BOVY, A.; SCHIJLEN, E.; HALL, R. D. "Metabolic Engineering of Flavonoids in Tomato (*Solanum Lycopersicum*): The Potential for Metabolomics". *Metabolomics*, 3 (3):399,2007.
176. PLUMB, G. W.; PRICE, K. R.; WILLIAMSON, G. "Antioxidant Properties of Flavonol Glycosides from Green Beans". *Redox Rep.*, 4 (3):123–127,1999.
177. WILLITS, M. G.; KRAMER, C. M.; PRATA, R. T. N.; DE LUCA, V.; POTTER, B. G.; STEPHENS, J. C.; GRASER, G. "Utilization of the Genetic Resources of Wild Species to Create a Nontransgenic High Flavonoid Tomato". *J. Agric. Food Chem.*, 53 (4):1231–1236,2005.
178. ZHANG, Y.; LI, Y.; LI, W.; HU, Z.; YU, X.; TU, Y.; ZHANG, M.; HUANG, J.; CHEN, G. "Metabolic and Molecular Analysis of Nonuniform Anthocyanin Pigmentation in Tomato Fruit under High Light". *Hortic. Res.*, 6 (1):56,2019.
179. DABRAVOLSKI, S. A.; ISAYENKOV, S. V. "The Role of Anthocyanins in Plant Tolerance to Drought and Salt Stresses". *Plants*, 12 (13):2558,2023.
180. SETOGUCHI, Y.; NAKAGAWA, S.; OHMURA, R.; TOSHIMA, S.; PARK, H.; NARASAKO, Y.; HIRANO, T.; OTANI, M.; KUNITAKE, H. "Effect of Growth Stages on Anthocyanins and Polyphenols in the Root System of Sweet Potato". *Plants*, 12 (9):1907,2023.
181. MENCONI, J.; PERATA, P.; GONZALI, S. "In Pursuit of Purple: Anthocyanin Biosynthesis in Fruits of the Tomato Clade". *Trends Plant Sci.*, xx (xx):1–16,2024.
182. CAPRIOLI, G.; CAHILL, M.; LOGRIPPO, S.; JAMES, K. "Elucidation of the

- Mass Fragmentation Pathways of Tomatidine and B1-Hydroxytomatine Using Orbitrap Mass Spectrometry". *Nat. Prod. Commun.*, 10 (4):575–576,2015.
183. BAILLY, C. "The Steroidal Alkaloids α -Tomatine and Tomatidine: Panorama of Their Mode of Action and Pharmacological Properties". *Steroids*, 176 (May):108933,2021.
 184. KOZUKUE, N.; KIM, D.; CHOI, S.; MIZUNO, M.; FRIEDMAN, M. "Isomers of the Tomato Glycoalkaloids α -Tomatine and Dehydrotomatine: Relationship to Health Benefits". *Molecules*, 28 (8):3621,2023.
 185. CAPRIOLI, G.; CAHILL, M. G.; JAMES, K. J. "Mass Fragmentation Studies of α -Tomatine and Validation of a Liquid Chromatography LTQ Orbitrap Mass Spectrometry Method for Its Quantification in Tomatoes". *Food Anal. Methods*, 7 (8):1934578X1501000,2015.
 186. MHLONGO, M. I.; PIATER, L. A.; STEENKAMP, P. A.; LABUSCHAGNE, N.; DUBERY, I. A. "Metabolic Profiling of PGPR-Treated Tomato Plants Reveal Priming-Related Adaptations of Secondary Metabolites and Aromatic Amino Acids". *Metabolites*, 10 (5):210,2020.
 187. LIU, Y.; HU, H.; YANG, R.; ZHU, Z.; CHENG, K. "Current Advances in the Biosynthesis, Metabolism, and Transcriptional Regulation of α -Tomatine in Tomato". *Plants*, 12 (18):3289,2023.
 188. NAKAYASU, M.; OHNO, K.; TAKAMATSU, K.; AOKI, Y.; YAMAZAKI, S.; TAKASE, H.; SHOJI, T.; YAZAKI, K.; SUGIYAMA, A. "Tomato Roots Secrete Tomatine to Modulate the Bacterial Assemblage of the Rhizosphere". *Plant Physiol.*, 186 (1):270–284,2021.
 189. VAN MEULEBROEK, L.; BUSSCHE, J. VANDEN; STEPPE, K.; VANHAECKE, L. "Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Orbitrap Mass Spectrometry for Metabolomic Profiling of the Endogenous Phytohormonal Status of the Tomato Plant". *J. Chromatogr. A*, 1260:67–80,2012.
 190. BODALE, I.; MIHALACHE, G.; ACHIȚEI, V.; TELIBAN, G.-C.; CAZACU, A.; STOLERU, V. "Evaluation of the Nutrients Uptake by Tomato Plants in Different Phenological Stages Using an Electrical Conductivity Technique". *Agriculture*, 11 (4):292,2021.
 191. RACUSEN, D. W.; ARONOFF, S. "Metabolism of Soybean Leaves. V. The Dark Reactions Following Photosynthesis". *Arch. Biochem. Biophys.*, 42 (1):25–40,1953.
 192. LÓPEZ-BUCIO, J.; NIETO-JACOBO, M. F.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. "Organic Acid Metabolism in Plants: From Adaptive Physiology to Transgenic Varieties for Cultivation in Extreme Soils". *Plant Sci.*, 160 (1):1–13,2000.
 193. MILLA, R.; MATESANZ, S. "Growing Larger with Domestication: A Matter of Physiology, Morphology or Allocation?". *Plant Biol.*, 19 (3):475–483,2017.
 194. HSIAO, Y.-C.; YAMADA, M. "The Roles of Peptide Hormones and Their

- Receptors during Plant Root Development". *Genes (Basel)*, 12 (1):22,2020.
195. MATSUBAYASHI, Y. "Posttranslationally Modified Small-Peptide Signals in Plants". *Annu. Rev. Plant Biol.*, 65 (1):385–413,2014.
 196. FENG, Y.-Z.; ZHU, Q.-F.; XUE, J.; CHEN, P.; YU, Y. "Shining in the Dark: The Big World of Small Peptides in Plants". *aBIOTECH*, 4 (3):238–256,2023.
 197. DESTAILLEUR, A.; POU CET, T.; CABASSON, C.; ALONSO, A. P.; COCURON, J.-C.; LARBAT, R.; VERCAMBRE, G.; COLOMBIÉ, S.; PETRIACQ, P.; ANDRIEU, M. H.; BEAUVOIT, B.; GIBON, Y.; DIEUAIDE-NOUBHANI, M. "The Evolution of Leaf Function during Development Is Reflected in Profound Changes in the Metabolic Composition of the Vacuole". *Metabolites*, 11 (12):848,2021.
 198. BRUNI, R.; BARRECA, D.; PROTTI, M.; BRIGHENTI, V.; RIGHETTI, L.; ANCeschi, L.; MERCOLINI, L.; BENVENUTI, S.; GATTUSO, G.; PELLATI, F. "Botanical Sources, Chemistry, Analysis, and Biological Activity of Furanocoumarins of Pharmaceutical Interest". *Molecules*, 24 (11):2163,2019.
 199. ROBE, K.; IZQUIERDO, E.; VIGNOLS, F.; ROUACHED, H.; DUBOS, C. "The Coumarins: Secondary Metabolites Playing a Primary Role in Plant Nutrition and Health". *Trends Plant Sci.*, 26 (3):248–259,2021.
 200. MARCINIAK, K.; PRZEDNICZEK, P. "Comprehensive Insight into Gibberellin- and Jasmonate-Mediated Stamen Development". *Genes (Basel)*, 10 (10):811,2019.
 201. MUTASA-GOTTGENS, E.; HEDDEN, P. "Gibberellin as a Factor in Floral Regulatory Networks". *J. Exp. Bot.*, 60 (7):1979–1989,2009.
 202. KUNICKI, E.; GRABOWSKA, A.; SĘKARA, A.; WOJCIECHOWSKA, R. "The Effect of Cultivar Type, Time of Cultivation, and Biostimulant Treatment on the Yield of Spinach (*Spinacia Oleracea* L.)". *Folia Hortic.*, 22 (2):9–13,2010.
 203. DROBEK, M.; FRĄC, M.; CYBULSKA, J. "Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress—A Review". *Agronomy*, 9 (6):335,2019.
 204. WADDUWAGE, J.; LIU, H.; EGIDI, E.; SINGH, B. K.; MACDONALD, C. A. "Effects of Biostimulant Application on Soil Biological and Physicochemical Properties: A Field Study". *J. Sustain. Agric. Environ.*, 2 (3):285–300,2023.
 205. JIANG, C.; ZHOU, S.; LIU, L.; TOSHMATOV, Z.; HUANG, L.; SHI, K.; ZHANG, C.; SHAO, H. "Evaluation of the Phytotoxic Effect of the Essential Oil from *Artemisia Absinthium*". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 226:112856,2021.
 206. YUNIATI, N.; KUSUMIYATI, K.; MUBAROK, S.; NURHADI, B. "Assessment of Biostimulant Derived from Moringa Leaf Extract on Growth, Physiology, Yield, and Quality of Green Chili Pepper". *Sustainability*, 15 (9):7113,2023.

207. LAHIVE, F.; HADLEY, P.; DAYMOND, A. J. "The Physiological Responses of Cacao to the Environment and the Implications for Climate Change Resilience. A Review". *Agron. Sustain. Dev.*, 39 (1):5,2019.
208. TOP, S.; VANDOORNE, B.; PAUWELS, E.; PERNEEL, M.; VAN LABEKE, M.-C.; STEPPE, K. "Plant Sensors Untangle the Water-Use and Growth Effects of Selected Seaweed-Derived Biostimulants on Drought-Stressed Tomato Plants (*Solanum Lycopersicum*)". *J. Plant Growth Regul.*, 42 (9):5615–5627,2023.
209. YOUSFI, S.; MARÍN, J.; PARRA, L.; LLORET, J.; MAURI, P. V. "A Rhizogenic Biostimulant Effect on Soil Fertility and Roots Growth of Turfgrass". *Agronomy*, 11 (3):573,2021.
210. ZARBAKSH, S.; SHAHSAVAR, A. R. "Exogenous γ -Aminobutyric Acid Improves the Photosynthesis Efficiency, Soluble Sugar Contents, and Mineral Nutrients in Pomegranate Plants Exposed to Drought, Salinity, and Drought-Salinity Stresses". *BMC Plant Biol.*, 23 (1):543,2023.
211. LI, L.; DOU, N.; ZHANG, H.; WU, C. "The Versatile GABA in Plants". *Plant Signal. Behav.*, 16 (3):1862565,2021.
212. ASHIHARA, H.; STASOLLA, C.; FUJIMURA, T.; CROZIER, A. "Purine Salvage in Plants". *Phytochemistry*, 147:89–124,2018.
213. FRANCESCA, S.; ARENA, C.; HAY MELE, B.; SCHETTINI, C.; AMBROSINO, P.; BARONE, A.; RIGANO, M. M. "The Use of a Plant-Based Biostimulant Improves Plant Performances and Fruit Quality in Tomato Plants Grown at Elevated Temperatures". *Agronomy*, 10 (3):363,2020.
214. HOLOPAINEN, J. K.; GERSHENZON, J. "Multiple Stress Factors and the Emission of Plant VOCs". *Trends Plant Sci.*, 15 (3):176–184,2010.
215. KUNISHIMA, M.; YAMAUCHI, Y.; MIZUTANI, M.; KUSE, M.; TAKIKAWA, H.; SUGIMOTO, Y. "Identification of (Z)-3:(E)-2-Hexenal Isomerases Essential to the Production of the Leaf Aldehyde in Plants". *J. Biol. Chem.*, 291 (27):14023–14033,2016.
216. WU, Y.; HAN, S.; WANG, M.; ZHANG, Q.-H.; HAN, B. "Control of Tea Aphids via Attracting the Parasitic Wasp, *Aphelinus* Sp. with Synthetic Semiochemicals". *Front. Ecol. Evol.*, 10:1–14,2022.
217. LEWIS, D. C.; VAN DER ZWAN, T.; RICHARDS, A.; LITTLE, H.; COAKER, G. L.; BOSTOCK, R. M. "The Oomycete Microbe-Associated Molecular Pattern, Arachidonic Acid, and an *Ascophyllum Nodosum* -Derived Plant Biostimulant Induce Defense Metabolome Remodeling in Tomato". *Phytopathology®*, 113 (6):1084–1092,2023.
218. JIMÉNEZ-ARIAS, D.; GARCÍA-MACHADO, F. J.; MORALES-SIERRA, S.; LUIS, J. C.; SUAREZ, E.; HERNÁNDEZ, M.; VALDÉS, F.; BORGES, A. A. "Lettuce Plants Treated with L-Pyroglutamic Acid Increase Yield under Water Deficit Stress". *Environ. Exp. Bot.*, 158 (October 2018):215–222,2019.
219. PEREIRA, R. V.; FILGUEIRAS, C. C.; DÓRIA, J.; PEÑAFLOR, M. F. G. V.; WILLETT, D. S. "The Effects of Biostimulants on Induced Plant Defense". *Front. Agron.*, 3 (July):1–9,2021.

220. BANAKAR, S. N.; PRASANNAKUMAR, M. K.; PARIVALLAL, P. B.; PRAMESH, D.; MAHESH, H. B.; SARANGI, A. N.; PUNEETH, M. E.; PATIL, S. S. "Rice-Magnaporthe Transcriptomics Reveals Host Defense Activation Induced by Red Seaweed-Biostimulant in Rice Plants". *Front. Genet.*, 14 (June):1–15,2023.
221. CARRILLO, J.; INGWELL, L. L.; LI, X.; KAPLAN, I. "Domesticated Tomatoes Are More Vulnerable to Negative Plant–Soil Feedbacks than Their Wild Relatives". *J. Ecol.*, 107 (4):1753–1766,2019.

Apêndice A

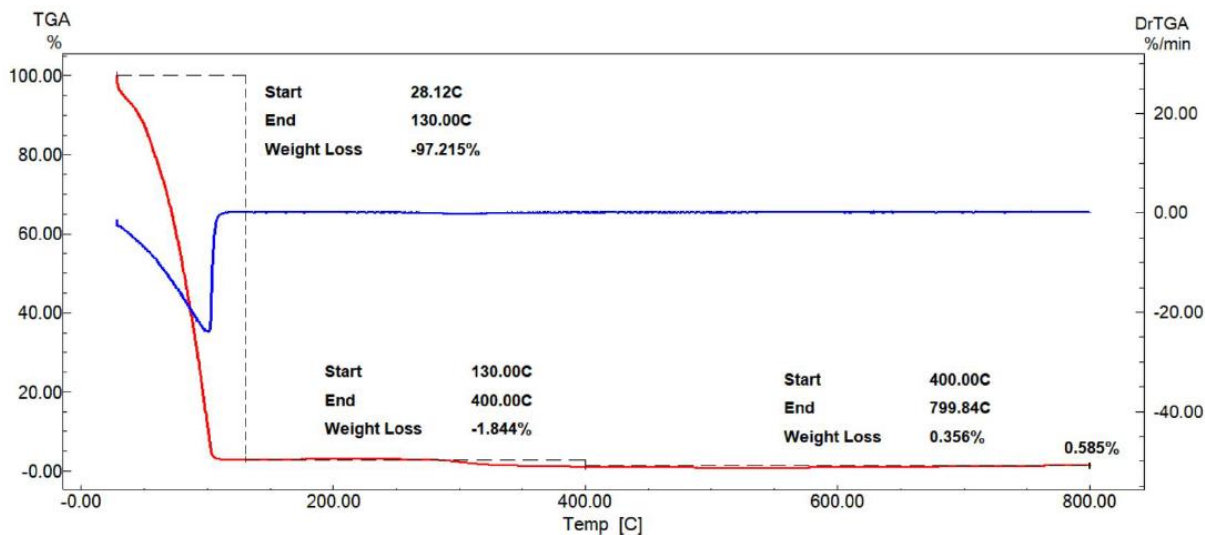


FIGURA A1. Curvas de TGA e DTG referentes ao biopolímero (amido modificado).

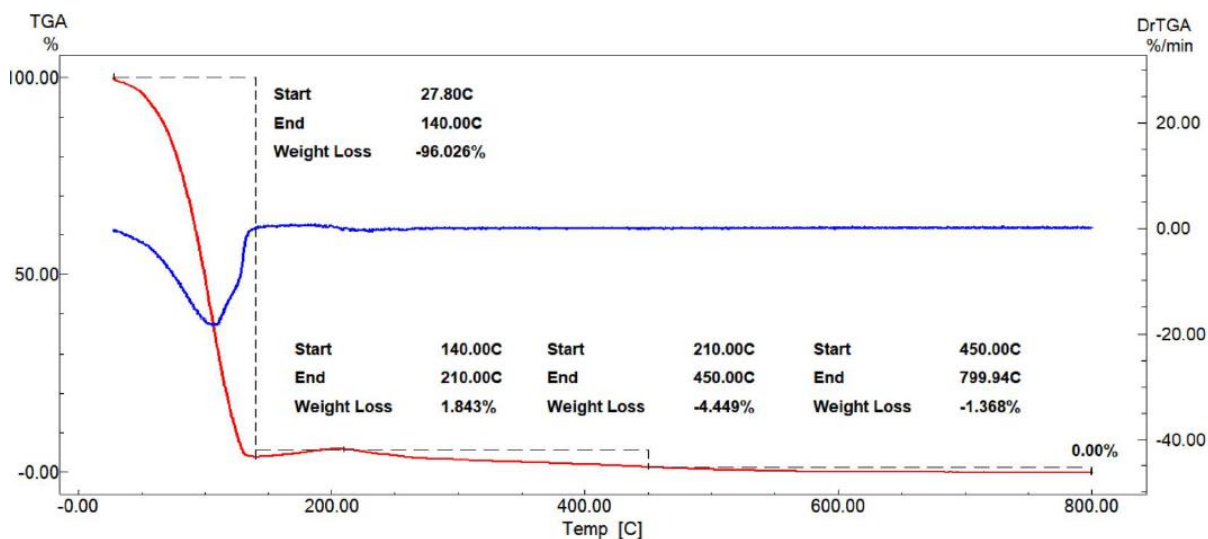


FIGURA A2. Curvas de TGA e DTG referentes ao óleo essencial de alecrim (livre).

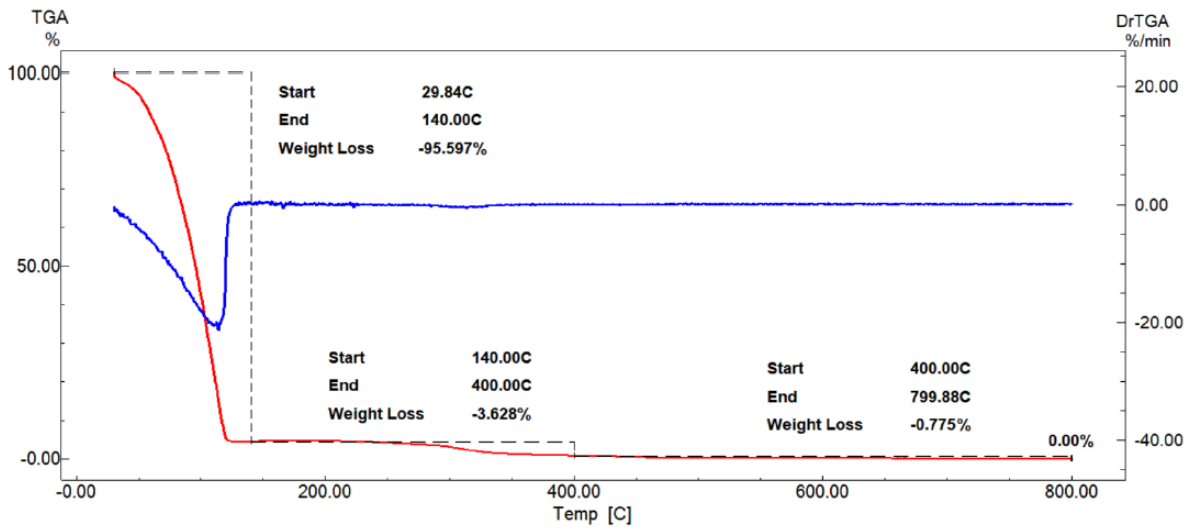


FIGURA A3. Curvas de TGA e DTG referentes ao óleo essencial de alecrim (suspensão coloidal).

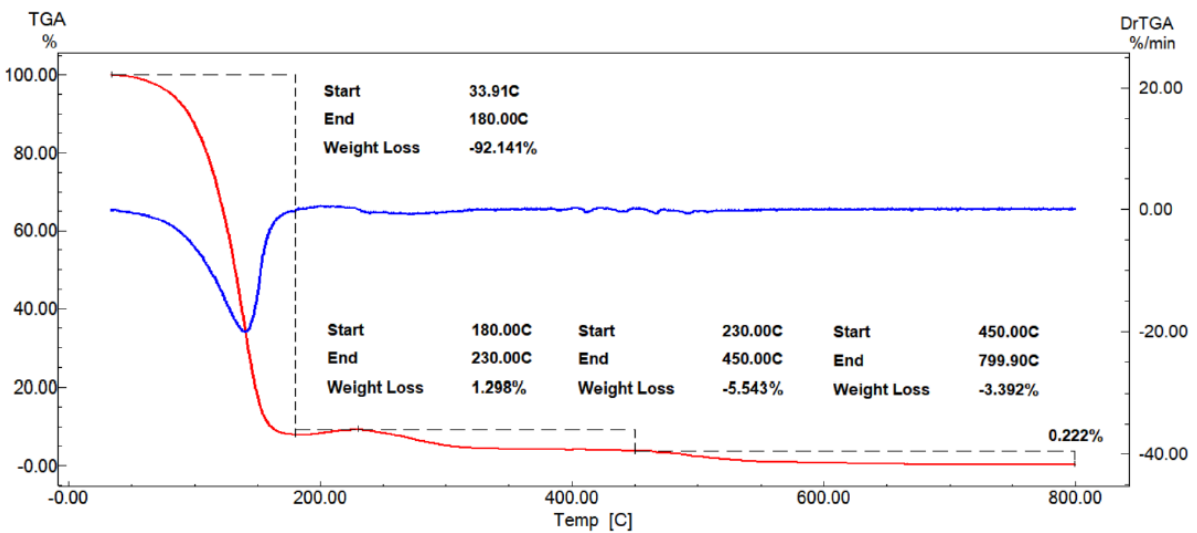


FIGURA A4. Curvas de TGA e DTG referentes ao óleo essencial de erva cidreira (livre).

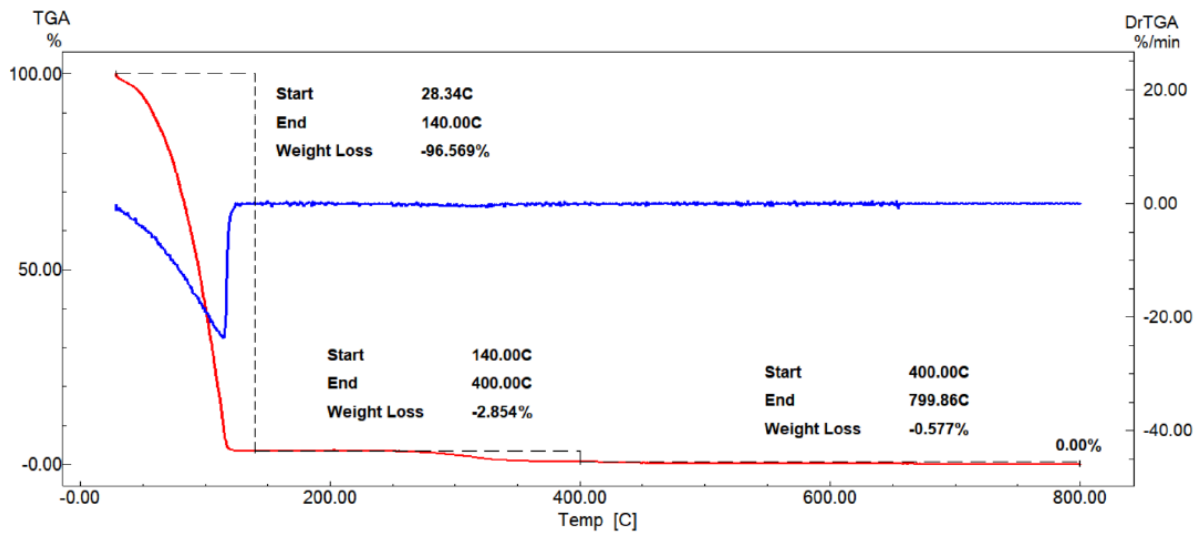


FIGURA A5. Curvas de TGA e DTG referentes ao óleo essencial de erva cidreira (suspensão coloidal).

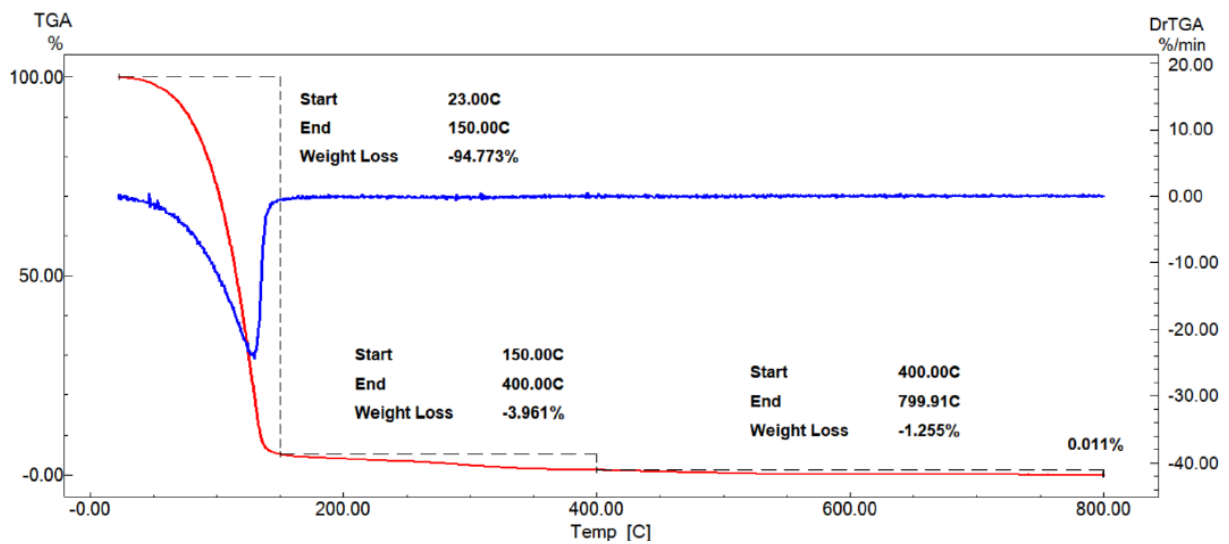


FIGURA A6. Curvas de TGA e DTG referentes ao óleo essencial de laranja (livre).

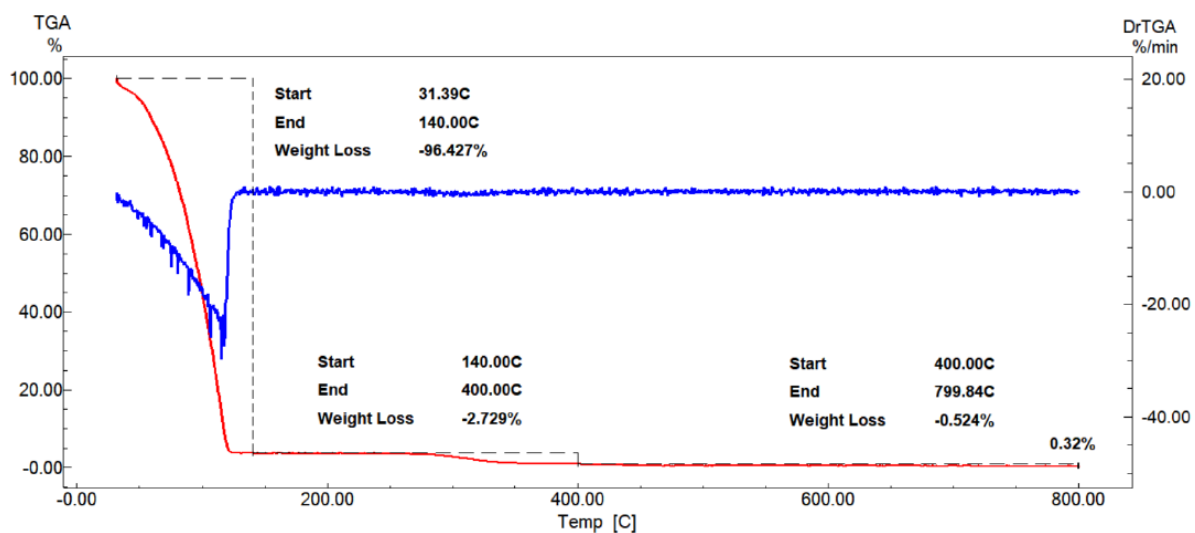


FIGURA A7. Curvas de TGA e DTG referentes ao óleo essencial de laranja (suspensão coloidal).

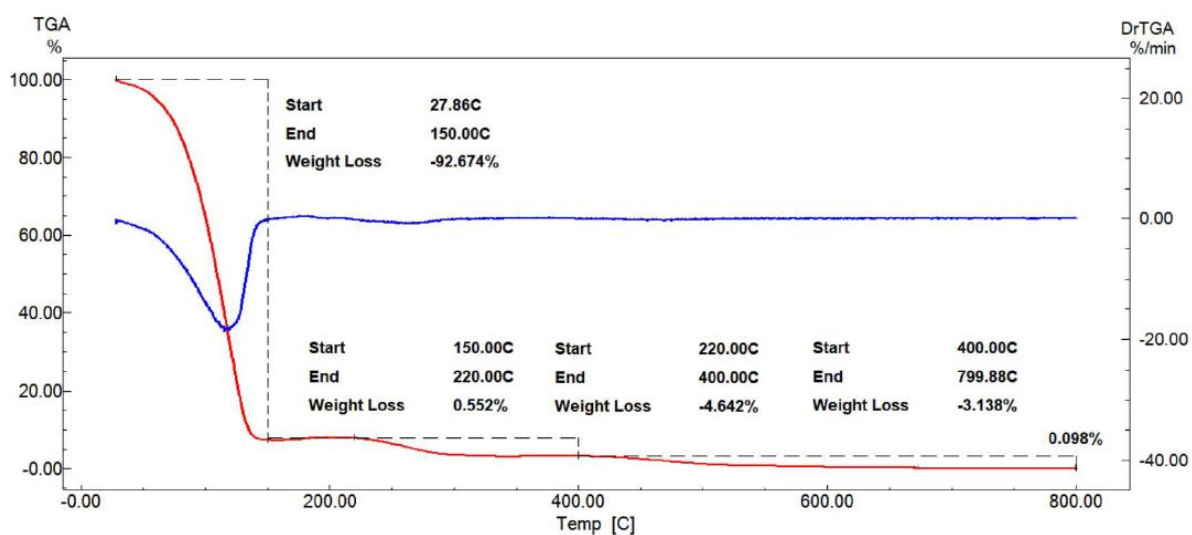


FIGURA A8. Curvas de TGA e DTG referentes a mistura dos óleos essências de alecrim, erva cidreira e laranja 1:1:1 (livre).

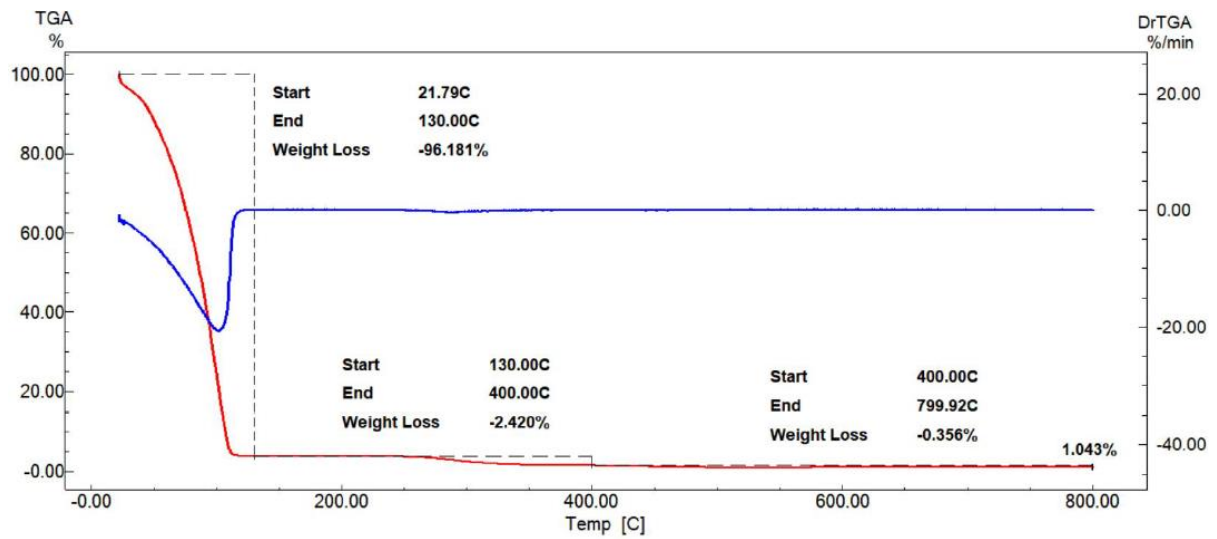


FIGURA A9. Curvas de TGA e DTG referentes a mistura dos óleos essências de alecrim, erva cidreira e laranja 1:1:1 (suspensão coloidal).

Apêndice B

TABELA B1. Análise de variância para o ajuste linear dos modelos (nível de confiança de 95%).

Curva	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrada	F	F _{tab}
Cânfora	Regressão	2198,87	1	2198,87	28706,27	4.49
	Resíduo	1,69	22	0,08		
	Total	2207,85	23			
	Erro puro	0,78	16	0,05	3,07	3.26
	Falta de ajuste	0,90	6	0,15		
Linalol	Regressão	1877,45	1	1877,45	23512,35	4.30
	Resíduo	1,76	22	0,08		
	Total	1884,81	23			
	Erro puro	1,12	16	0,07	1,52	2,74
	Falta de ajuste	0,64	6	0,11		
Limoneno	Regressão	1885,50	1	1885,50	32134,02	4,30
	Resíduo	1,29	22	0,06		
	Total	1889,41	23			
	Erro puro	0,99	16	0,06	0,83	2,74
	Falta de ajuste	0,31	6	0,05		

Apêndice C

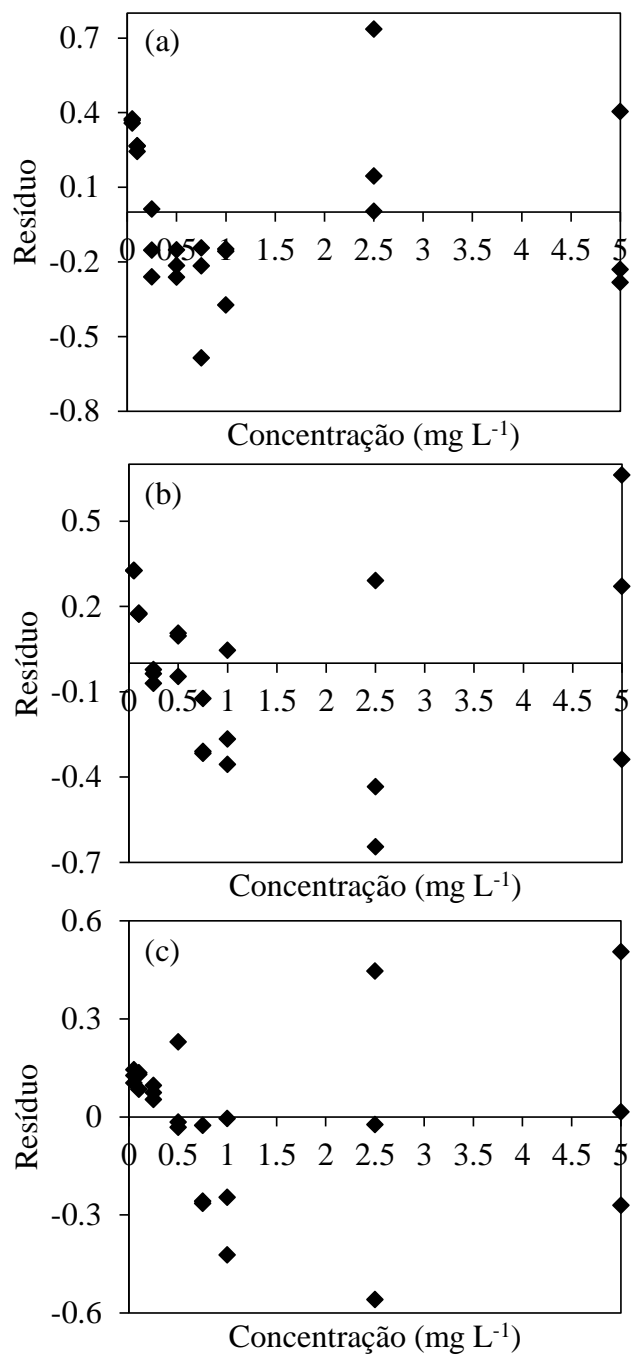
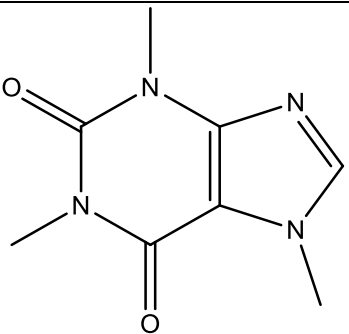
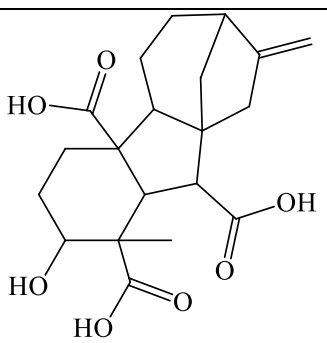
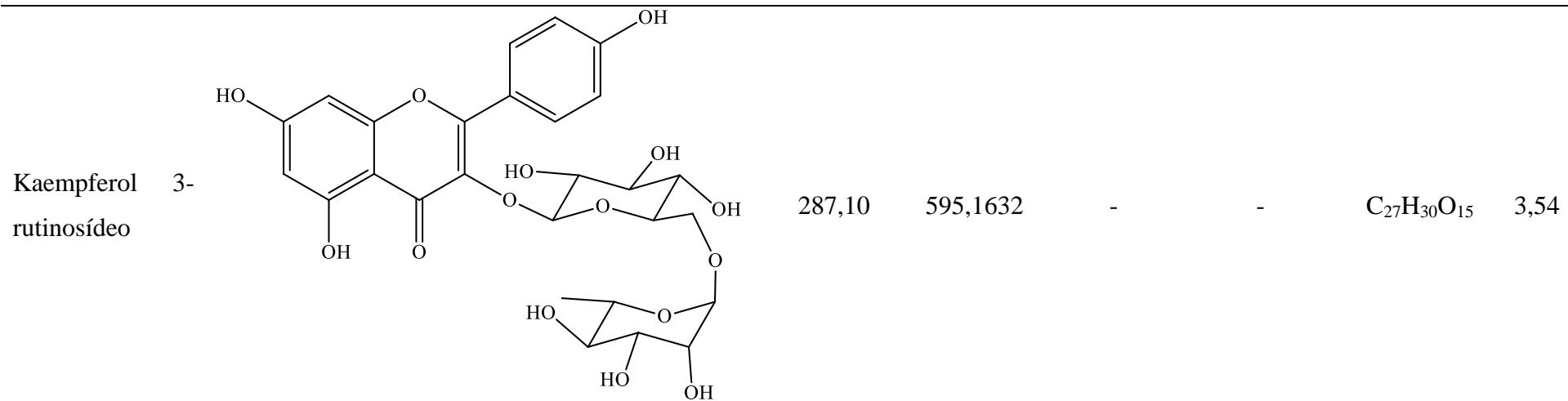
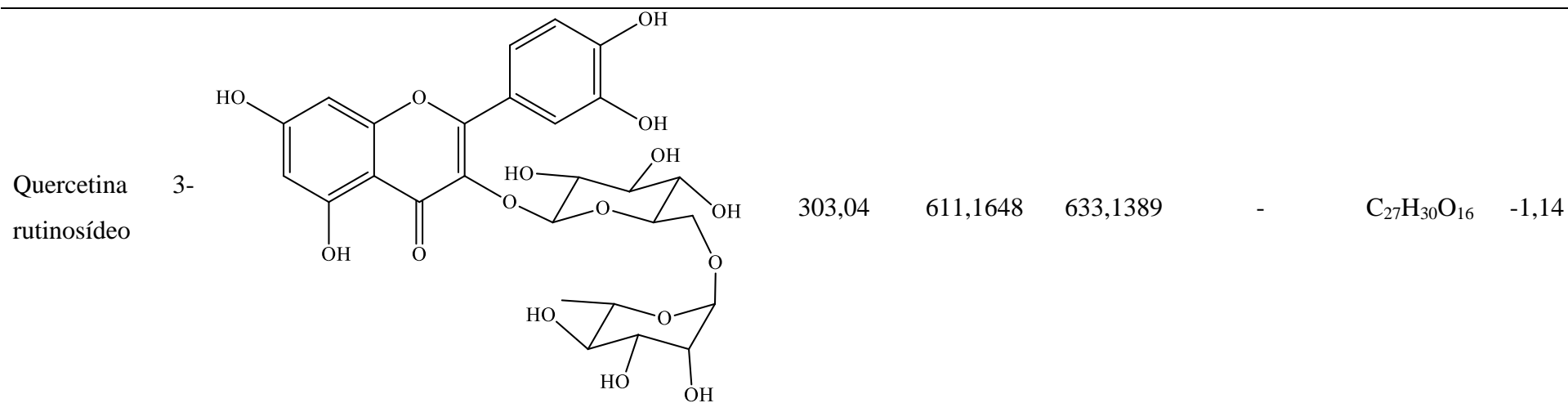


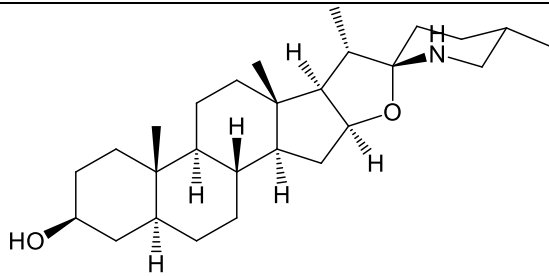
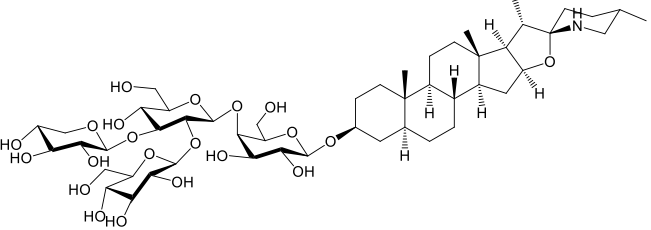
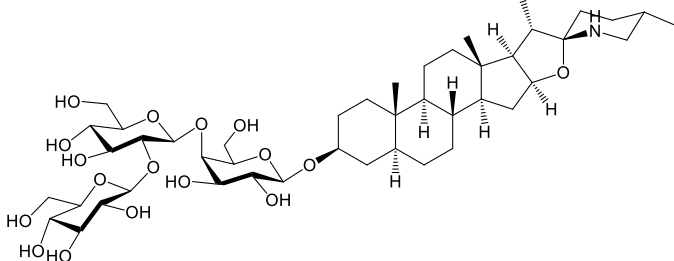
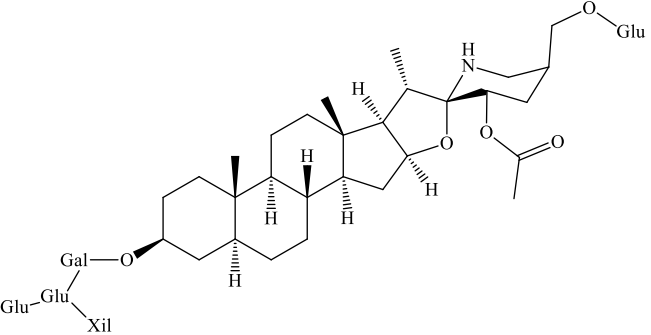
FIGURA C1. Gráficos dos resíduos para as curvas de calibração da cânfora (a), linalol (b) e limoneno (c).

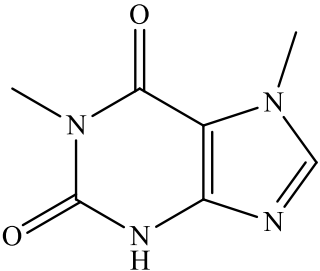
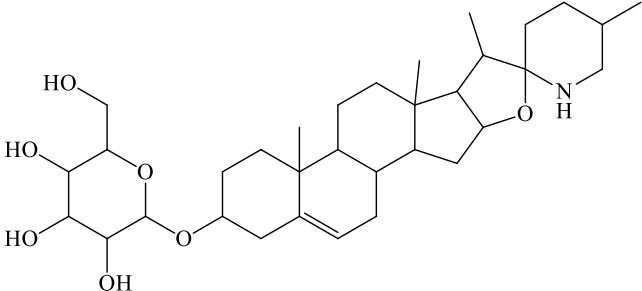
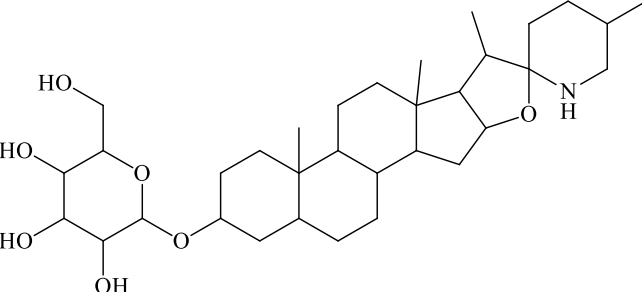
Apêndice D

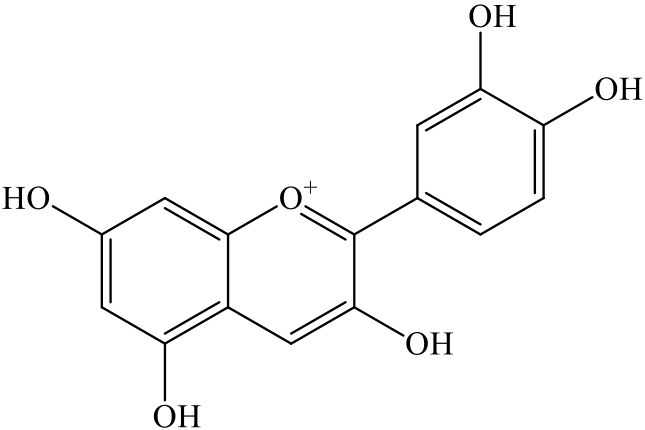
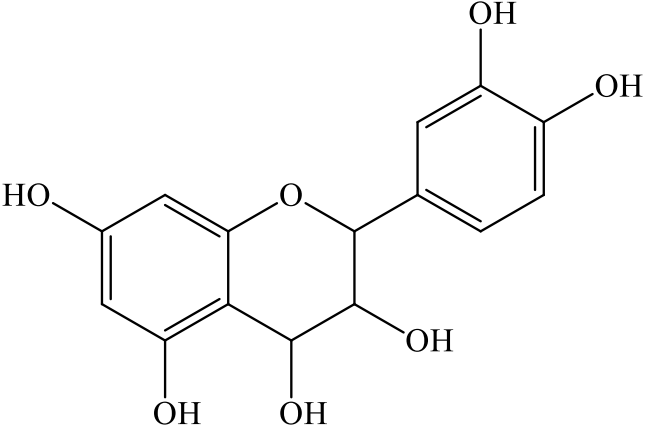
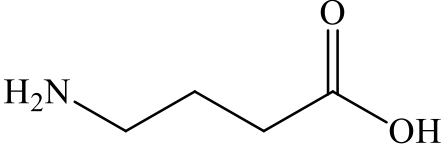
Tabela D1. Compostos detectados em folhas de tomate utilizando UHPLC-q-TOF-MS/MS.

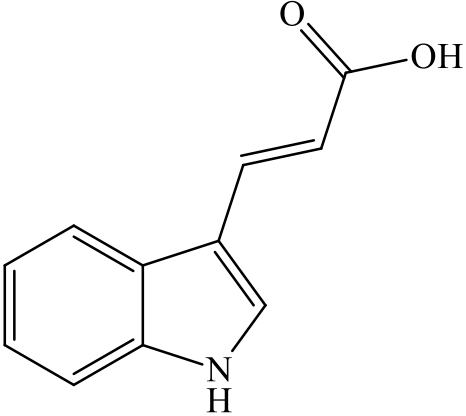
Compostos	Principais fragmentos	Íons precursores detectados			Fórmula molecular	Erro (ppm)
		(M+H) ⁺	(M+Na) ⁺	(M+K) ⁺		
Caféina (padrão interno) 	138,06	195,0873	217,0645	-	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	1,41
Giberelina A13 	333,14 287,10	379,1450	-	-	C ₂₀ H ₂₆ O ₇	1,67



Tomatidina		398,18 273,22 255,21 161,13	416,3516	-	-	C ₂₇ H ₄₅ NO ₂	2,17
<i>alfa</i> -Tomatina		1016,54 528,77 416,35	1034,5609	1056,5359	-	C ₅₀ H ₈₃ NO ₂₁	0,52
<i>beta</i> -Tomatina		416,35	902,5117	-	-	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₇	1,24
Esculeosídeo A		-	1270,6068	1292,5856	-	C ₅₈ H ₉₅ NO ₂₉	0,50

Xantina		200,04	145,04	-	-	219,0265	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	-1,36
Glucosídeo de solasodina		253,19	157,10	576,3898	-	-	C ₃₃ H ₅₃ NO ₇	0,32
O-glucosil-tomatidina		255,21	161,13	578,4067	-	-	C ₃₃ H ₅₅ NO ₇	1,57

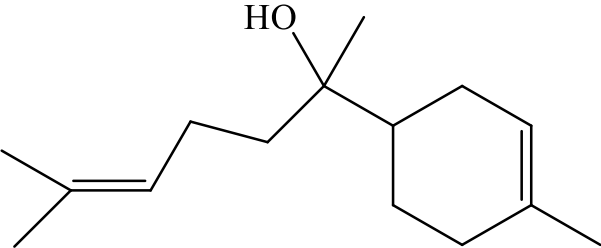
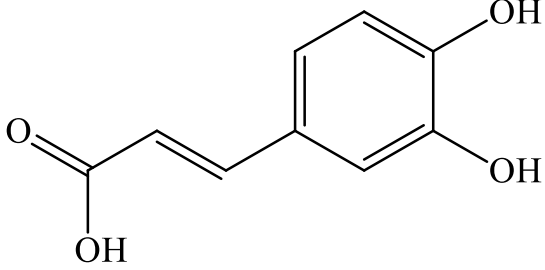
Cianidina		241,04 213,05	287,0560	-	-	$C_{15}H_{11}O_6^+$	1,74
Leucocianidina		163,04 155,04	307,0813	-	-	$C_{15}H_{14}O_7$	0,32
Ácido <i>gamma</i> -aminobutírico		86,06 69,03	104,0709	-	-	$C_4H_9NO_2$	2,88

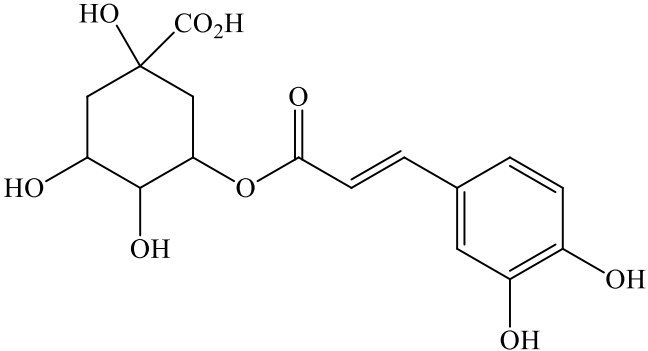
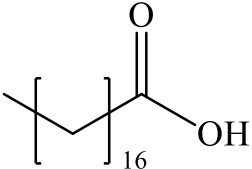
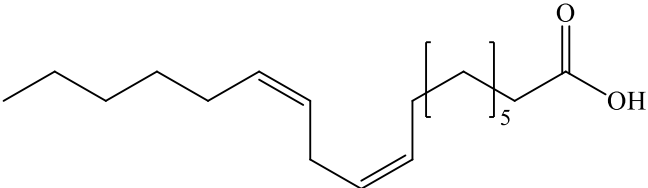
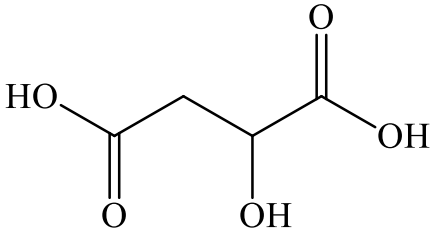
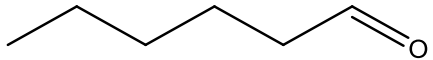
Ácido indol 3- acrílico		170,06 132,08	188,0703	-	-	C ₁₁ H ₉ NO ₂	2,32
Nucleosídeo de purina	-	152 136 124 113	268,1038	-	-	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	-0,27
Peptídeo pequeno	-	101	-	-	119,0192	CH ₆ NO ₄	0,28
Peptídeo pequeno	-	119 101 74	137,0298	-	-	CH ₄ N ₄ O ₄	-0,71
Peptídeo pequeno	-	132 114 105 86	-	-	151,0090	CH ₆ NO ₆	0,26

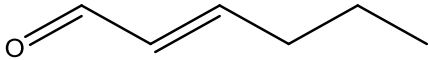
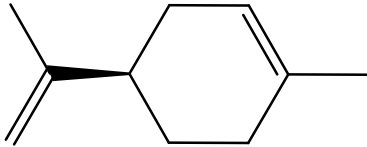
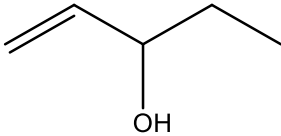
Peptídeo pequeno	-	-	296,1239	-	-	$C_{13}H_{17}N_3O_5$	1,29
---------------------	---	---	----------	---	---	----------------------	------

Apêndice E

Tabela E1. Compostos detectados em folhas de tomate utilizando CG-EM.

Compostos	Principais fragmentos	Fórmula molecular
Bisabolol Padrão Interno	204, 161, 119, 109, 69	$C_{15}H_{26}O$
		
Ácido cafeico (TMS)	396, 381, 307, 249, 219, 191, 73	$C_{18}H_{32}O_4Si_3$
		

Ácido clorogênico (6TMS)		345, 255, 73	$C_{16}H_{18}O_9$
Ácido esteárico (TMS)		341, 297, 145, 129, 117, 73	$C_{21}H_{44}O_2Si$
Ácido linoleico (TMS)		337, 262, 129, 117, 95, 81, 73, 55	$C_{21}H_{40}O_2Si$
Ácido málico (3TMS)		149, 148, 147, 115, 99, 75, 73	$C_{13}H_{30}O_5Si_3$
Hexanal		72, 57, 44	$C_6H_{12}O$

<i>trans</i> -Hex-2-enal		97, 83, 69, 41	C ₆ H ₁₀ O
D-Limonene		121, 94, 79, 67, 68	C ₁₀ H ₁₆
1-Penten-3-ol		57, 41, 43	C ₅ H ₁₀ O