

COMPARAÇÃO DE DUAS METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAR OS METABÓLITOS VOLÁTEIS DE TOMATES (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) TRATADOS COM O POLISSACARÍDEO ULVAN OU INFECTADOS POR FITOPATÓGENOS

Samara L. da Silva¹, Dora dos S. Costa², Tiphane Andrade Figueira⁴, Daniela Sales Alviano Moreno³, Celuta Sales Alviano³, Antonio Jorge Ribeiro da Silva¹

¹Laboratório de Análise Fitoquímica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais-UFRJ, ²Programa de Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos-UFRJ, ³Laboratório de Análise de Estruturas de Superfície de Microrganismos, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes-UFRJ, ⁴Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Escola de Química – UFRJ
E-mail para contato: samaralimadasilva12@gmail.com

INTRODUÇÃO

O frescor e a qualidade de frutas e hortaliças podem ser monitorados a partir de diferentes análises, como por exemplo, a composição de perfis de compostos orgânicos voláteis (COVs). São análises rotineiras realizadas por laboratórios brasileiros e ao redor do mundo, sendo altamente relevantes tanto para a percepção positiva das características organolépticas desses alimentos pelos consumidores como também para o acompanhamento de sinalização de defesa vegetal. Nas práticas de análise por voláteis extraídos dos vegetais, podemos destacar que, na literatura, é predominante o uso de metodologia com amostra de frutos moídos e poucos trabalhos utilizando amostra de frutos íntegros. O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é um dos frutos cujas perdas apenas no pós-colheita podem chegar a mais de 30% devido a sua colonização por fungos (Vilela *et al.*, 2003). Trata-se de uma hortaliça cujas altas perdas são causadas pela sua constituição física frágil, levando a uma vida de prateleira (*shelf life*) curta (Mahajan *et al.*, 2017). Atualmente, a principal forma de combater doenças pré e pós-colheita em hortaliças como o tomate (*S. lycopersicum*) é a utilização de fungicidas sintéticos que podem ser prejudiciais à saúde do consumidor e cujo uso indiscriminado pode acelerar o processo de seleção de patógenos resistentes. O conhecimento crescente da população a respeito do tema, as tendências de consumo e atualizações legislativas favorecem claramente a redução do uso de fungicidas convencionais em prol de iniciativas que busquem a redução da necessidade do uso deles (Costa *et al.*, 2022). A busca do manejo sustentável de patógenos em tratamento pós-colheitas, por meio de iniciativas capazes de estimular a imunidade inata da planta a partir do uso de eliciadores têm sido foco de pesquisas. Eliciadores são agentes físicos ou moléculas capazes de estimular os mecanismos de defesa em uma planta. O vegetal é capaz, durante esse processo, de produzir substâncias (metabólitos) orgânicas voláteis que podem funcionar como sinalizadores na defesa contra patógenos. Tais mecanismos podem ser ativados, por exemplo, por polissacarídeos isolados de *Ulva fasciata*, que têm sido relatadas na literatura como eliciadores, atuando na ativação das vias do ácido jasmônico e dos fenilpropanóides. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivos: analisar os perfis de metabólitos voláteis em tomates pós-colheita tratados com o polissacarídeo ulvan e/ou infectados com *Botrytis cinerea* e verificar a indução de produção de voláteis pelo eliciador por meio de duas metodologias diferentes.

METODOLOGIA

Dois desenhos experimentais (DE) foram idealizados inicialmente iguais nos seguintes processos nos quais os tomates (*S. lycopersicum* var. Sweet grape) orgânicos em estágio vermelho foram submetido a três condições: I- tratados – banhado em solução de 1 mg.mL⁻¹ de ulvan, II- controle sem ulvan e sem *B. cinerea*, III- inoculado com *B. cinerea* - 10 µL de suspensão, 1 x 10⁴ conídios/mL. O DE para a extração de voláteis com tomates íntegros foi o seguinte: 40 tomates x 3 condições (sendo no total 120 tomates escolhidos randomicamente), desse modo, cada tratamento foi acondicionado em frascos de vidro herméticos de volume conhecido (1,1 L). Cada frasco contém um septo por onde foi introduzida no *headspace* por 60 min uma seringa de SPME (Fibra de DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm), marca SUPELCO. Os voláteis foram extraídos no *headspace* sob temperatura ambiente. O DE para a extração de voláteis com tomates moídos foi o seguinte: 4 tomates x 3 condições (em triplicata, sendo no total 36 tomates escolhidos randomicamente), em seguida foram congelados e armazenados em freezer a -80 °C. Para a análise de cada amostra com 4 tomates ainda congelados foram triturados e pesados 4 g além de acrescido com 1,7 mL de solução de CaCl₂ aquoso saturado e o padrão octanol em vials de 20 mL selados com septos por onde foi introduzida, por 40 min, a seringa de SPME (Fibra de DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm), marca SUPELCO. Os voláteis foram extraídos no *headspace* do vial que estava em aquecimento a 50 °C. As amostragens em ambos métodos foram coletadas em diferentes momentos: 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h após o acondicionamento, sendo esclarecido que no momento 12 horas só foi possível na metodologia de tomates moídos. Após a extração dos voláteis nos dois sistemas, a fibra foi inserida no injetor de um Sistema SHIMADZU para GC-MS onde os voláteis foram dessorvidos por um tempo de 10 min. A cromatografia em fase gasosa foi realizada utilizando a coluna HP5 (5% fenilmetilsilicone) de 30m x 0,2 mm, 0,25 µm como um gás de arraste com vazão de 1ml/min. A temperatura da coluna foi fixada em 40 °C por 6 min, depois aumentada para 100°C com uma taxa de 3°C min⁻¹, e finalmente aumentada para 230 °C a uma taxa 5°C.min⁻¹. A ionização foi obtida com elétrons a 70 eV e a faixa de massas medidas de m/z 30–450. A identificação dos componentes dos tomates inteiros e moídos foi realizada utilizando os espectros de massas, por comparação com espectros de uma biblioteca NIST 14.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises com os tomates inteiros indicaram diferenças na composição de metabólitos voláteis entre os tomates nas condições de controle e tratados com ulvan bem como observado diferenças entre os perfis metabólicos obtidos com os tomates eliciados e os tomates infectados. Desse modo, no sistema de liberação de voláteis com tomates inteiros foi observado dos 18 metabólitos identificados um perfil de metabólitos voláteis com os seguintes grupos e as respectivas

substâncias: Hidrocarbonetos lineares (n-hexano; n-decano; tetradecano; pentadecano), Hidrocarbonetos aromáticos (tolueno; etilbenzeno; xileno), Terpenos (cimeno; Limoneno; β -mirceno; α -Pineno), Aldeídos (n-Hexanal; Nonanal), Alcoois (1-butanol, 2-metil; 2-fenil-2-propanol), Cetonas (5-Hepten-2-ona, 6-metil-) e outros (1-nitro-3-metilbutano).

No resultado do tratamento de tomates moídos foram observadas diferenças na composição e de metabólitos voláteis entre os tomates nas condições de controles e tratados com ulvan bem como observado diferenças entre os perfis metabólicos obtidos com os tomates eliciados e os tomates infectados. Desse modo, no sistema de liberação de voláteis com tomates moídos foi observado dos 24 metabólitos identificados um perfil de metabólitos voláteis com os seguintes grupos e as respectivas substâncias: Terpenos (α -terpineol; geranyl acetona), Aldeídos (decanal; nonanal; 2,4-decadienal), Alcoois (1-pentanol; 1-hexanol; feniletil álcool; 1-nonanol) e outros (n-hexano; furano, 2-etil-; benzil nitrila; Propano, 2 metoxi-2-metil-), Ácidos Graxos (Ácido Octanoico ; Ácido Mirístico ; Ácido Palmítico), Ésteres (Ethyl Acetato; ácido fórmico, octil éster; Ácido octanoico, octil éster) e Cetonas (1-penten-3-ona; 5-hepten-2-ona, 6-metil-).

As diferenças entre os perfis de metabólitos voláteis comparando os dois métodos. Nos tomates íntegros apresentou um resultado limitado quanto à quantidade de voláteis identificados apesar de diferenças significativas em especial no grupo dos terpenos. No método com tomates moídos foi identificado um maior número de metabólitos e uma maior diversidade de grupos como os ácidos graxos e os ésteres.

Outro ponto relevante a ser destacado nas diferenças entre as duas metodologias está no gerenciamento do tempo pelos pesquisadores. Uma das vantagens na abordagem com tomates moídos foi a realização das análises em diferentes condições de forma mais eficiente incluindo o momento de 12 horas, graças a uma organização que permitiu uma atenção exclusiva às etapas de tratamento e, posteriormente, à etapa de extração dos compostos voláteis. Na etapa de extração dos voláteis a fibra e o cromatógrafo geralmente são ferramentas limitadas, dessa forma o gerenciamento do tempo ganhou importância e levando assim uma preferência pela metodologia com tomates moídos por estarem congelados e armazenados nos freezers a -80 °C.

CONCLUSÕES

Foram verificadas diferenças entre os perfis de metabólitos voláteis comparando os dois métodos. Essas metodologias diferenciam-se pela preparação do sistema de liberação de voláteis. Enquanto em método são utilizados frutos íntegros em grande quantidade e com seus tecidos ainda vivos, no outro sistema foi utilizada a partir de uma representação da amostra previamente congelada e que foi moída para extração de voláteis utilizando o calor como indutor de liberação dos voláteis. Portanto pôde ser observado um número maior de identificações no sistema de liberação de voláteis com tomates moídos, uma maior diversidade de metabólitos voláteis de diferentes grupos químicos enquanto que no sistema de tomates íntegros, a diversidade de metabólitos foi menor, além de uma composição diferente, principalmente no grupo dos terpenos.

Fomento

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Palavras-chave: Tratamento Pós-Colheita, Metabólitos voláteis, Tomates (*Solanum lycopersicum* L.).

Referências

- ENCINAS-BASURTO, DAVID et al. Alterations in volatile metabolites profile of fresh tomatoes in response to *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 1912 infection. **Chilean J. Agric. Res.** Chillán, v. 77, n. 3, p. 194-201, sept. 2017.
- DOS S. COSTA, D. Extension of Solanaceae Food Crops Shelf Life by the Use of Elicitors and Sustainable Practices During Postharvest Phase. **Food Bioprocess Technol.**, v. 15, p. 249–274, 2022.
- MAHAJAN, P. V. et al. Postharvest treatments of fresh produce. **Philos Trans Royal Soc A**, v. 372, n. 20130309, 2014.
- SHEFER, S. et al. Ulvan crude extract's chemical and biophysical profile and its effect as a biostimulant on *Arabidopsis thaliana*. **Algal Research**, v. 62, p. 102609, 2022.
- LI, J. et al. Distribution of Volatile Compounds in Different Fruit Structures in Four Tomato Cultivars. **Molecules**, 24, 2594, 2019.
- VILELA, N.J., M.M. Lana, E.F.do Nascimento, and N. Makishima. Losses in the commercialization of vegetables in a retail network of the Federal District, Brazil. **Cadernos de Ciencia and Tecnologia**, v. 20, n. 3, p.521-541, 2003.