

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Comparação do perfil metabólico de cultivares de batateira tolerantes e suscetíveis ao nematode *Pratylenchus penetrans*

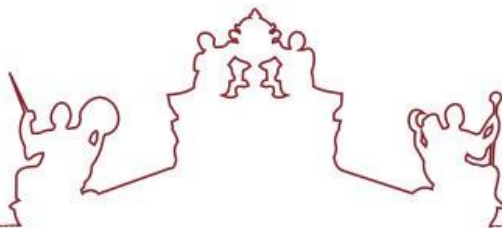
João Pedro Duarte Trindade

Orientador(es) | Dora Martins Teixeira

Cláudia S. L. Vicente

Évora 2024





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

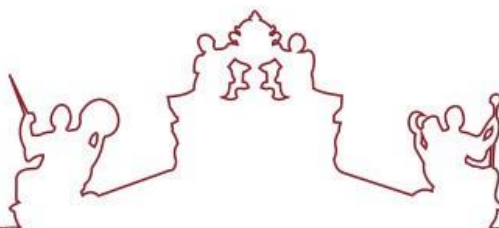
**Comparação do perfil metabólico de cultivares de batateira
tolerantes e suscetíveis ao nematode *Pratylenchus penetrans***

João Pedro Duarte Trindade

Orientador(es) | Dora Martins Teixeira

Cláudia S. L. Vicente

Évora 2024



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora)

Vogais | Dora Martins Teixeira (Universidade de Évora) (Orientador)
Jorge Miguel Silva Faria (Universidade de Évora) (Arguente)

Agradecimentos

A jornada acadêmica é uma fase que ninguém faz sozinho e que deixa de fazer completo sentido se esquecermos todas as pessoas que nos ajudaram, seja profissional, seja emocionalmente. Desta forma quero deixar esta nota de agradecimento para que se demonstre o meu apreço por todas estas pessoas:

- Às minhas orientadoras, Professora Doutora Dora Teixeira e Doutora Cláudia Vicente, por me terem guiado e pela disponibilidade não só de me acolherem neste projeto, como pela de me ajudarem em tudo o que precisei ao longo deste ano.

- À minha colega de laboratório, Marina Costa, por me ter guiado e ajudado ao longo deste trabalho, demonstrando sempre uma ética profissional inabalável e total disponibilidade.

- Aos meus pais e irmã, Guilhermina, João e Cláudia Trindade pelo apoio emocional e amor incondicionais, apesar de todos os tropeçares e cambalhotas.

- À minha companheira de vida, Ana Cardoso, porque é ela o motor da minha existência e porque sem ela não teria embarcado nesta aventura.

- Aos meus amigos, que felizmente são demasiados para nomear, que tanto me apoiaram nos momentos difíceis como festejaram comigo os sucessos.

Resumo

O nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans* é um parasita da batateira (*Solanum tuberosum*) com grande impacto económico global. Neste estudo analisou-se o perfil metabólico de dois cultivares de batata, Agria e Laura, com diferentes suscetibilidades ao *P. penetrans*, visando identificar metabolitos secundários com possível ação nematodocida. Foi otimizado o método de extração de metabolitos secundários, comparando-se a taxa de recuperação (TR) do ácido azelaico entre um método de ultrassons e um de dupla extração em metanol. O método de dupla extração mostrou-se mais eficiente (TR = 84,4%) em relação ao de ultrassons (TR = 70,7%). Análises *untargeted* por UHPLC-QTOF-MS identificaram metabolitos como ácido glucosilcafeico, acetato de farnesil, ácido 2-hidroxi-linoleico, piriferina B, (2-oxocromen-7-yl) fosfono hidrogénio fosfato, monotropitina e 7-hidroxi-6-metilcumarina em maior concentração nas raízes do cultivar tolerante (Laura) comparativamente ao cultivar suscetível (Agria). Estes metabolitos podem estar envolvidos na resposta da planta à infeção, sendo candidatos a nematodocidas de controlo.

Palavras-chave: *Pratylenchus penetrans*; *Solanum tuberosum*; Metabolitos secundários; Nematodocida; UHPLC-QTOF-MS.

Comparison of the metabolic profile of potato cultivars tolerant and susceptible to the nematode *Pratylenchus penetrans*

Abstract

The root lesion nematode *Pratylenchus penetrans* is a parasite of potato (*Solanum tuberosum*) with significant global economic impact. In this study it was analyzed the metabolic profile of two potato cultivars, Agria and Laura, with different susceptibilities to *P. penetrans*, aiming to identify secondary metabolites with potential nematicidal activity. The secondary metabolites extraction method was optimized by comparing the recovery rate (RR) of azelaic acid between an ultrasound method and a methanol double extraction method. The double extraction method proved to be more efficient (RR = 84.4%) compared to the ultrasound method (RR = 70.7%). Untargeted analyses by UHPLC-QTOF-MS identified metabolites such as glucosylcaffeic acid, farnesyl acetate, 2-hydroxy-linoleic acid, piperiferin B, (2-oxochromen-7-yl) phosphonic acid, monotropin, and 7-hydroxy-6-methylcoumarin in higher concentrations in the roots of the tolerant cultivar (Laura) compared to the susceptible cultivar (Agria). These metabolites may be involved in the plant's response to infection, making them potential candidates for nematicidal control.

Keywords: *Pratylenchus penetrans*; *Solanum tuberosum*; Secondary metabolites; Nematicide; UHPLC-QTOF-MS.

Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice de Figuras	IV
Índice de Tabelas.....	IVI
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	VII
1. Introdução.....	1
2. Fundamento teórico.....	2
2.1 Nemátodes das lesões radiculares.....	2
2.1.1 <i>Pratylenchus penetrans</i>	3
2.2 Metabolismo de plantas.....	5
2.2.1 Compostos fenólicos.....	5
2.2.2 Respostas metabólicas das plantas a diferentes stresses	8
2.2.3 Tecnologias para o estudo da Metabolómica de plantas	9
3. Metodologia experimental	13
3.1 Extração de metabolitos secundários	14
3.1.1 Método de extração com ultrassons.....	14
3.1.2 Método de dupla extração em metanol.....	14
3.1.3 Dopagem de amostras para otimização do método de extração	15
3.2 Análises por UHPLC-QTOF-MS	15
3.2.1 Condições de análise.....	15
3.3 Processamento de dados e análise estatística.....	16
4. Resultados e discussão	18
4.1. Otimização do método de extração de metabolitos secundários	18
4.2. Análises <i>untargeted</i> das amostras por UHPLC-QTOF-MS	21
5. Conclusão.....	31
6. Referências Bibliográficas.....	32
7. Anexos.....	39

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida dos NLR. Imagem adaptada de Jones & Fosu-Nyarko (2014).	2
Figura 2 - Mapa da distribuição global do <i>Pratylenchus penetrans</i> . Adaptado de https://gd.eppo.int/taxon/PRATPE/distribution	4
Figura 3 - Sintomas em 7 cultivares de batata (<i>Solanum tuberosum</i>), após 60 dias de infecção pelo nemátode das lesões radiculares <i>Pratylenchus penetrans</i> . Imagem adaptada de Figueiredo et al. (2021)	4
Figura 4 - Vias metabólicas do chiquimato/fenilpropanóides (vermelho e verde), acetato/malonato (azul) e ácidos fenólicos (roxo). Imagem adaptada de Babenko et al. (2019).	6
Figura 5 - Curva de calibração do ácido azelaico com concentrações crescentes de 25 ppb a 1 ppm.....	18
Figura 6 - Taxas de recuperação do método de extração por ultrassons e método de dupla extração em metanol para as plantas Laura 2, Laura 4 (tolerantes), Agria 1 e Agria 4 (suscetíveis).....	19
Figura 7 - Concentração de ácido azelaico ($\mu\text{g/g}$ planta) nas plantas Laura 2, Laura 4 (tolerantes), Agria 1 e Agria 4 (suscetíveis) controlos não dopados.	20
Figura 8 - Análise de componentes principais (PCA) da junção dos MS features obtidos para ambos os modos de ionização. Ac - Agria controlo; Ai - Agria infetada; Lc - Laura controlo; Li - Laura infetada.	21
Figura 9 - Volcano plots dos grupos a) Agria infetada VS Agria controlo, b) Laura infetada VS Laura controlo, c) Agria controlo VS Laura controlo, d) Agria infetada VS Laura infetada.....	23

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação de compostos fenólicos com base no número de átomos de carbono (Harborne, 1989).....	7
Tabela 2 - Índices de suscetibilidade dos diferentes cultivares 60 dias após a infeção por <i>Pratylenchus penetrans</i> . Índices de suscetibilidade seguidos de uma combinação diferente de letras (a, b, c) diferem significativamente a $p < 0.05$, de acordo com o teste Fisher LSD. Tabela adaptada de Figueiredo et al. (2022).	13
Tabela 3 – Taxas de recuperação do ácido azelaico para os métodos de ultrassons (Hu et al., 2009) e dupla extração (Rahman et al., 2021). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.	19
Tabela 4 - Número total de MS features considerados para análise nos grupos Agria infetada VS Agria controlo (Ai VS Ac), Laura infetada VS Laura controlo (Li VS Lc), Agria controlo VS Laura controlo (Ac VS Lc) e Agria infetada VS Laura infetada (Ai VS Li) para cada modo de ionização.	22
Tabela 5 – Metabolitos identificados correspondentes aos MS features selecionados do Student's t-test ($p\text{-value} \leq 0,01$ e $p\text{-value FDR} \leq 0,05$) para os grupos "Agria infetada VS Agria controlo" e "Laura infetada VS Laura controlo", com descrição da fórmula molecular, razão massa/carga (m/z), tempo de retenção (RT), modo de ionização, rácio médio infetada/controlo, classe de metabolito, classe de composto, função e PubMed CID.	25
Tabela 6 - Metabolitos identificados correspondentes aos MS features selecionados do Student's t-test ($p\text{-value} \leq 0,01$ e $p\text{-value FDR} \leq 0,05$) para os grupos "Agria controlo VS Laura controlo" e "Agria infetada VS Laura infetada", com descrição da fórmula molecular, razão massa/carga (m/z), tempo de retenção (RT), modo de ionização, rácio médio infetada/controlo, classe de metabolito, classe de composto, função e PubMed CID.	29

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ANOVA - *Analysis of variance* (análise de variância);

APCI - *Atmospheric-pressure chemical ionization* (ionização química a pressão atmosférica);

CWDE – *Cell Wall degrading enzyme* (enzimas de degradação da parede celular);

ESI - *Electrospray ionization* (ionização por eletrospray);

GC – *Gas chromatography* (cromatografia gasosa);

IS - Índice de suscetibilidade;

m/z - Razão massa/carga;

NLR - Nemátode das lesões radiculares;

LC-MS – *Liquid chromatography - mass spectrometry* (cromatografia líquida – espectrometria de massa);

PCA - *Principal components analysis* (análise de componentes principais)

Rt - *Retention time* (tempo de retenção);

TR – Taxa de recuperação;

UHPLC-QTOF-MS - *Ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry* (Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa de elevada resolução com analisador quadrupolo/tempo de voo).

1. Introdução

Os nemátodes fitoparasitas são considerados uma ameaça para a agricultura mundial, sendo responsáveis por perdas económicas muito significativas. O nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans* é uma das espécies mais devastadoras deste grupo de fitoparasitas, parasitando cerca de 400 plantas, entre elas culturas agrícolas (p. ex. milho e batata), frutícolas (p. ex. macieiras e cerejeiras) e ornamentais (p. ex. rosas e açucenas). As abordagens existentes para o controlo destas pragas baseiam-se principalmente no uso de nematodocidas de síntese e, uma vez que o uso excessivo de químicos agrícolas de síntese apresenta um risco para o meio ambiente e saúde humana, é necessário reavaliar as estratégias de combate a estes fitoparasitas.

A metabolómica de plantas é uma área de estudo que permite a deteção de um grande número de metabolitos através da extração do material vegetal, fornecendo informações importantes acerca dos eventos celulares e estado fisiológico das células. Em condições de stresse biótico, as plantas ativam vias metabólicas secundárias para a síntese de compostos envolvidos nos mecanismos de defesa inata das plantas, sendo grande parte destes da família dos compostos fenólicos. Um estudo recente (Figueiredo et al., 2022) demonstrou que diferentes cultivares comerciais de batateira apresentam diferentes índices de suscetibilidade ao *P. penetrans*. Neste estudo, pretende-se comparar o perfil metabólico de dois cultivares com índices de suscetibilidade (IS) contrastantes, nomeadamente a cultivar tolerante Laura, (menor IS), e a cultivar suscetível Agria (maior IS), com o objetivo de identificar quais os metabolitos secundários envolvidos nas propriedades nematodocidas da planta hospedeira tolerante, para a sua possível utilização como nematodocidas naturais. O trabalho foi iniciado pela otimização dos métodos de extração do material vegetal e deteção analítica do composto fenólico ácido azelaico, utilizando uma metodologia *targeted* com recurso a um equipamento de UHPLC-QTOF-MS (*ultra high performance liquid chromatography – quadrupole time-of-flight – mass spectrometer*).

O estudo do metaboloma das cultivares Laura e Agria infetadas com o nemátode *P. penetrans* foi realizado através de análises *untargeted* do material biológico utilizando a mesma técnica analítica de espectrometria de massa de elevada resolução.

2. Fundamento teórico

2.1 Nemátodes das lesões radiculares

Os nemátodes das lesões radiculares (NLR) do género *Pratylenchus* são nemátodes endoparasitas migratórios que ocupam o terceiro lugar na classificação mundial de nemátodes parasitas de plantas com maior impacto económico na produção agrícola (Castillo & Vovlas, 2007). A maioria dos NLR reproduz-se assexuadamente por partenogénese (embora haja alguns géneros que se reproduzam sexualmente, como é o caso do *P. penetrans*) e o seu ciclo de vida pode durar entre 22 a 46 dias, dependendo da espécie e das condições ambientais (como a temperatura). O ciclo de vida dos NLR está dividido em 6 fases (fase de ovo, 4 fases juvenis e uma fase adulta) (Figura 1). Com exceção da fase de ovo e fase juvenil 1, que completam o seu desenvolvimento no ovo, todas as restantes fases são vermiformes e móveis, pelo que apresentam capacidade de infetar plantas (Castillo & Vovlas, 2007; Fosu-Nyarko & Jones, 2016). Os nemátodes emergem do ovo como J2 e nas restantes fases podem ser encontrados na superfície da raiz, no seu interior ou no solo adjacente, embora a maior parte do seu ciclo seja feito no interior da raiz e totalmente dependente do hospedeiro. Durante o seu ciclo de vida, as fêmeas produzem 1 a 2 ovos por dia (Castillo & Vovlas, 2007).

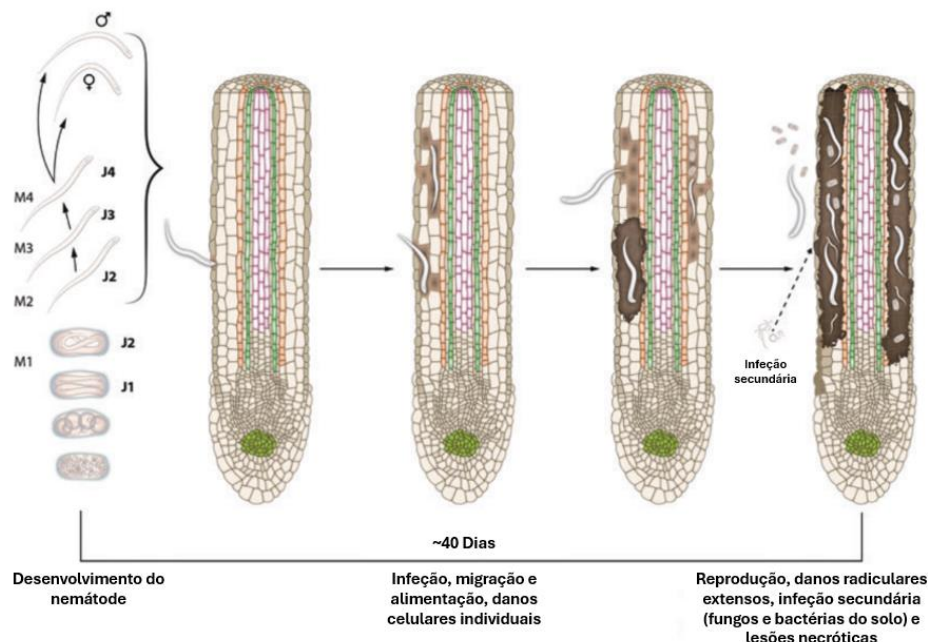


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida dos NLR. Imagem adaptada de Jones & Fosu-Nyarko (2014).

A infecção da raiz é caracterizada pelo aparecimento de lesões acastanhadas devido aos danos celulares e necroses causadas pela ação do nemátode durante a sua migração e alimentação, resultando em sistemas radiculares pequenos e/ou atrofiados e, em casos mais severos, à sua destruição completa (Vicente et al., 2021). A invasão do tecido da planta por parte destes nemátodes envolve geralmente o uso de um estilete para secreção de um cocktail de proteínas, entre as quais CWDE's (enzimas de degradação da parede celular), que se acredita facilitarem a penetração pelas paredes celulares da planta hospedeira e a migração do parasita através do tecido radicular (Castillo & Vovlas, 2007; Vieira et al., 2015). Dentro da planta hospedeira estes nemátodes alimentam-se principalmente de células epidérmicas e corticais da raiz.

Os sintomas apresentados pelas plantas hospedeiras não são específicos e podem muitas vezes ser confundidos com danos causados por outros agentes patogénicos do solo ou com deficiência nutricional ou falta de água, e a sua presença nas culturas é de difícil identificação e quantificação, uma vez que podem entrar e sair da raiz ativamente (Castillo & Vovlas, 2007; Vicente et al., 2021). Paralelamente, as lesões na raiz podem ser pontos de entrada para outros agentes patogénicos, como bactérias e fungos. A interação de espécies de *Pratylenchus* (e.g., *P. penetrans*) e o fungo patogénico *Verticillium dahliae* tem sido identificada em culturas de batateira, causando uma redução no tamanho dos tubérculos e rendimento da cultura (Fosu-Nyarko & Jones, 2016). Em condições adversas, estes nemátodes podem sobreviver por longos períodos no solo em fase de ovo ou em estado de anidrobiose (i.e., latência provocada por perda de água) (Vicente et al., 2021).

2.1.1 *Pratylenchus penetrans*

O NLR *Pratylenchus penetrans* é uma das 101 espécies mais devastadoras dentro do grupo, podendo parasitar cerca de 400 plantas, entre elas culturas agrícolas (e.g., batata, cenoura, soja), cereais (e.g., milho, trigo, arroz), culturas ornamentais (e.g., rosas, açucenas), árvores de fruto (e.g., macieiras, cerejeiras) e culturas industriais (e.g., cafeeiro) (Figueiredo et al., 2022; Vicente et al., 2021; Vieira et al., 2015). Este NLR está classificado desde 2018 como espécie de quarentena A1 na América do Sul, enquanto na União Europeia integra a lista de pragas regulamentadas não sujeitas a quarentena A2 (REGULAMENTO (UE) 2016/2031). A sua distribuição geográfica depende principalmente da prevalência de plantas hospedeiras suscetíveis (suportando a sua reprodução), fatores abióticos (principalmente temperatura) e a sua introdução a novas áreas através de material vegetal infetado (Castillo & Vovlas, 2007). Ainda assim,

o *P. penetrans* parece estar distribuído por todos os continentes (Castillo & Vovlas, 2007) (Figura 2).

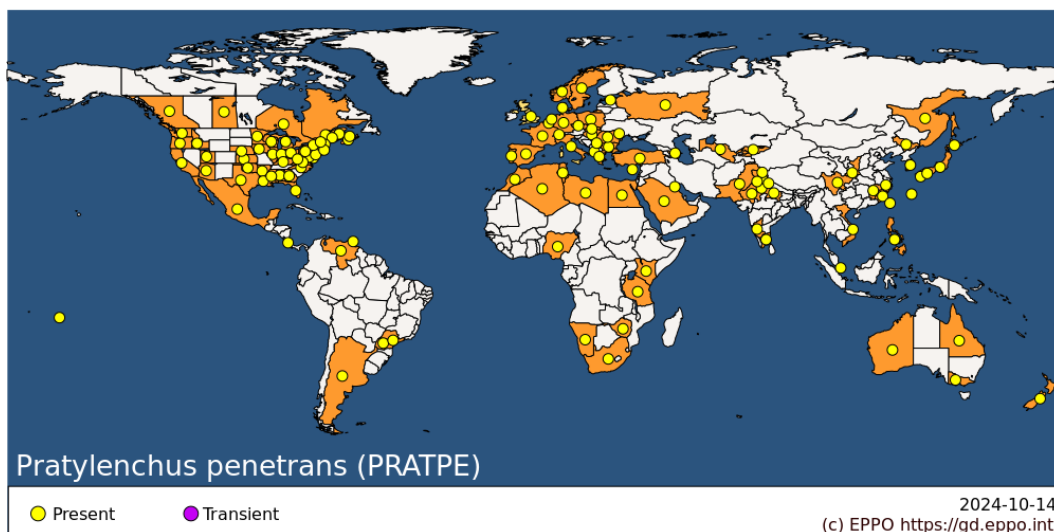


Figura 2 - Mapa da distribuição global do *Pratylenchus penetrans*. Adaptado de <https://gd.eppo.int/taxon/PRATPE/distribution>

Em Portugal há registos de infeção de *P. penetrans* em campos de batateira desde 1980 e a sua presença tem sido associada ao decréscimo do rendimento das culturas (Abrantes et al., 1987; Esteves et al., 2015). Figueiredo e coautores (2021) estudaram a sintomatologia da infeção por *P. penetrans* em diferentes cultivares de batateira 60 dias após a inoculação, identificando a presença do nemátode nas lenticelas das camadas superficiais da casca da batata, bem como tecido necrótico (Figura 3).

Cultivar	Controlos	Infetadas	Lesões
Agata			
Agria			
Camel			
Désirée			
Dirosso			
Kennebec			
Laura			

Figura 3 - Sintomas em 7 cultivares de batata (*Solanum tuberosum*), após 60 dias de infeção pelo nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*. Imagem adaptada de Figueiredo et al. (2021)

2.2 Metabolismo de plantas

O metabolismo das plantas é geralmente subdividido em metabolismo primário (ou central), que engloba reações ou vias metabólicas indispensáveis para a sobrevivência do organismo, e metabolismo secundário (ou especializado) que está envolvido num grande número de funções importantes para o crescimento e desenvolvimento, incluindo a interação da planta com o meio ambiente (Pott et al., 2019). As vias metabólicas primárias são altamente conservadas ao nível da espécie, órgão, tecido, célula e até mesmo estágio de desenvolvimento, enquanto as vias metabólicas secundárias apresentam grande variedade a todos esses níveis (Pott et al., 2019). Os metabolitos primários são geralmente açúcares, ácidos gordos, aminoácidos e ácidos nucleicos e são, como mencionado acima, essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta. Os produtos do metabolismo primário (metabolitos primários) derivados da glicólise, ciclo de *Krebs* e via do ácido chiquímico são geralmente precursores para a síntese de dezenas de milhares de metabolitos secundários já descritos (Kroymann, 2011).

Vários estudos indicam que o metabolismo secundário evoluiu através do recrutamento de enzimas e vias do metabolismo primário (Carrington et al., 2018; de Kraker & Gershenzon, 2011; Kroymann, 2011), o que sugere que as atividades enzimáticas sobre os metabolitos primários resultaram em compostos que aumentaram a capacidade de adaptação das plantas aos diferentes meios, tendo sido gradualmente convertidos em metabolitos especializados (Weng, 2014). Os metabolitos secundários, sendo muito mais diversos química e estruturalmente, são os compostos especializados que não são diretamente essenciais para o metabolismo primário da planta, mas são importantes na mediação da interação com o meio ambiente e, conseqüentemente, para a sobrevivência do organismo (Naikoo et al., 2019). No contexto deste trabalho, Vieira e coautores (2019) encontraram relação entre a infeção de *P. penetrans* em cultivares de alfafa resistentes a este nemátode e a formação de depósitos de taninos nas células da raiz, o que sugere que este tipo de metabolitos secundários possa estar envolvido na resposta da planta a esta infeção. Tendo em conta este estudo, o presente trabalho irá focar-se nos metabolitos secundários, mais especificamente em compostos fenólicos, por estarem envolvidos na regulação das defesas inatas da planta (Kroymann, 2011).

2.2.1 Compostos fenólicos

Dependendo do estímulo, as plantas produzem determinados metabolitos secundários, sendo que a maioria destes são compostos fenólicos (Anjali et al., 2023).

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, são o grupo de metabolitos secundários com importância fisiológica e morfológica com maior ocorrência em plantas (Anjali et al., 2023). São compostos aromáticos com um ou mais substituintes hidroxilo e são sintetizados através das vias metabólicas do chiquimato/fenilpropanóides ou acetato/malonato (Figura 4) (Naikoo et al., 2019). Têm um papel importante no crescimento, desenvolvimento e reprodução e um papel chave como compostos de defesa contra stresses abióticos (i.e., alta luminosidade, baixas temperaturas, radiações UV-B, metais pesados e deficiências nutricionais) e stresses bióticos, como proteção contra agentes patogênicos e herbívoros (Lattanzio, 2013), e produção de cor e características sensoriais de frutos e vegetais (Alasalvar et al., 2001).

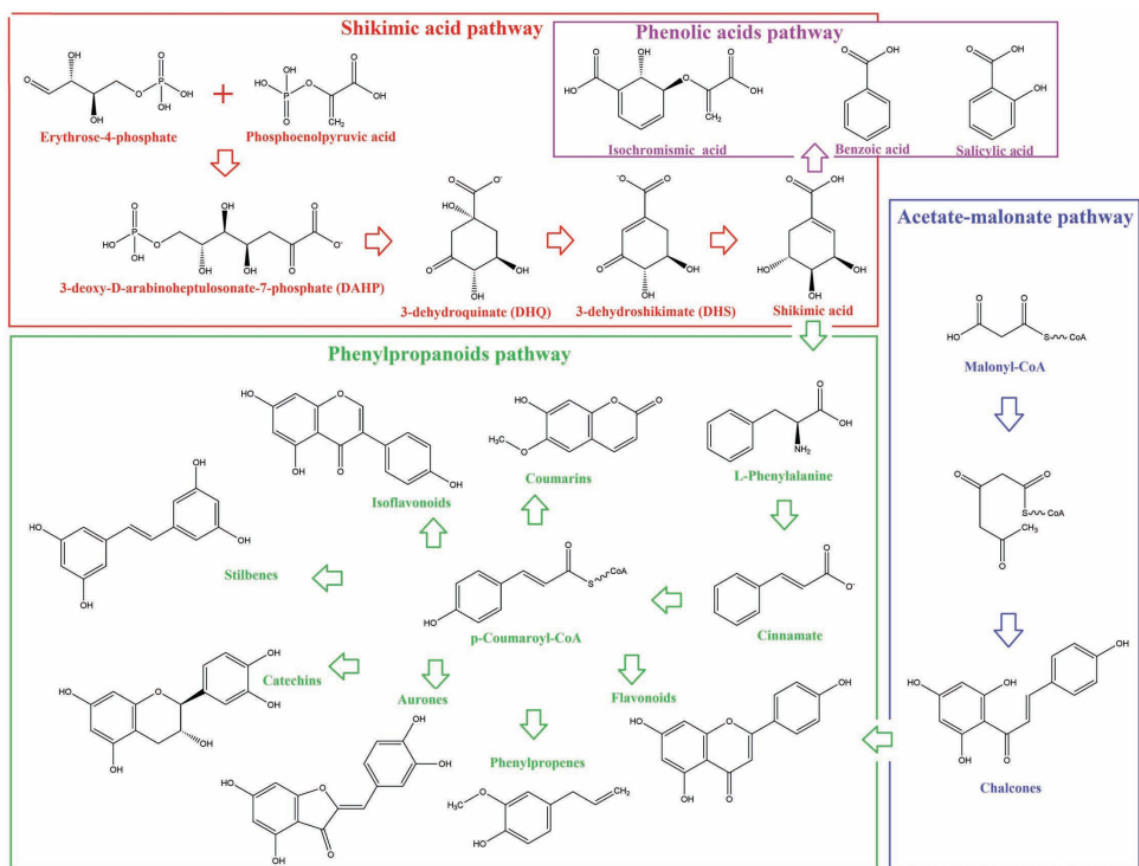


Figura 4 - Vias metabólicas do chiquimato/fenilpropanóides (vermelho e verde), acetato/malonato (azul) e ácidos fenólicos (roxo). Imagem adaptada de Babenko et al. (2019).

Apesar de ser um grupo de compostos muito amplo e complexo, os compostos fenólicos podem ser classificados de várias formas, sendo uma delas pelo número de carbonos presente na molécula, proposta por J. B. Harborne (Tabela 1) (Harborne, 1989).

Tabela 1 - Classificação de compostos fenólicos com base no número de átomos de carbono (Harborne, 1989).

Nº de átomos de Carbono	Fórmula básica	Classe
6	C ₆	Fenóis simples, benzoquinonas
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenona, ácido fenilacético
9	C ₆ -C ₃	Ácido hidroxicinâmico, coumarina, isocoumarina
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinona
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantona
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbeno, antraquinona
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides, isoflavonóides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignananas, neolignananas
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonóides
n	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas
	(C ₆) _n	Catecolmelanina
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

Diversos estudos demonstraram que infecções por microrganismos alteram a composição de compostos fenólicos em plantas. Um aumento da concentração de catecol e ácido protocatecuico em casca de cebola foi detetado após infecção por *Colletotrichum circinans* (Walker & Stahmann, 1995). Uma diminuição do conteúdo fenólico em arroz foi observada aquando da infecção por *Helminthosporium oryzae* (Dallagnol et al., 2011). A infecção por *Pseudomonas syringae* em *Nicotiana tabacum* levou a um aumento da acumulação extracelular de compostos fenólicos e consequente alteração da composição de ácidos fenólicos (Baker et al., 2005). A atividade antimicrobiana de compostos fenólicos foi também observada em bagas finlandesas contra bactérias probióticas e outras bactérias intestinais, estudo em que se demonstrou que o composto miricetina inibiu o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, principalmente bactérias gram-negativas (Puupponen-Pimia et al., 2001). Os ácidos fenólicos (ácido cafeico, verbascosídeo, oleuropeína, luteolina 7-O-glicosídeo e luteolina 4'-O-glicosídeo) de folhas de *Olea europaea* apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica (Pereira et al., 2007). Os compostos flavonas e flavononas de frutos e vegetais demonstraram atividade contra *Aspergillus* sp., *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* (Szliszka et al., 2009).

2.2.2 Respostas metabólicas das plantas a diferentes stresses

Em resposta às diversas condições de stresse ambiental, as plantas evoluíram uma série de respostas tanto a nível transcricional como pós-transcricional que levam à reconfiguração de vias regulatórias, com o objetivo de manter a homeostase (Verslues et al., 2006). Quando a planta é exposta a stresses bióticos/abióticos, dá-se a expressão de genes de resposta ao stresse e, subsequentemente, são biosintetizados metabolitos especializados (principalmente metabolitos secundários) que vão regular a resposta de adaptação (Nakabayashi & Saito, 2015).

Consequentemente, a identificação destes compostos ajuda na pesquisa por novos candidatos a químicos de combate aos diferentes agentes de stresse biótico que, entretanto, são utilizados como marcadores metabólicos (Hong et al., 2016). Por exemplo, foram identificados 16 ácidos gordos (p.e. ácido linoleico) e dois aminoácidos (glutamina e fenilalanina) como sendo componentes principais da tolerância de cultivares de arroz tolerantes ao mosquito da bílis (Agarwal et al., 2014). Quando sujeitos a mancha bacteriana das folhas (BLB), causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), cultivares suscetíveis e tolerantes de arroz apresentam diferenças contrastantes em vários metabolitos, tais como acetofenona, xantofilas, alcaloides, hidratos de carbono e lípidos (Sana et al., 2010). A acumulação de fenilpropanóides e compostos fenólicos foi também encontrada em resposta a *Fusarium graminearum* no trigo (Gunnaiah et al., 2012). Os fenilpropanóides, precursores da lignina, constituem um componente importante no mecanismo de defesa das plantas que modula a composição e rigidez das paredes celulares das raízes (Gunnaiah et al., 2012).

Relativamente às infeções por nemátodes fitoparasitas, apenas recentemente a metabolómica de plantas tem sido explorada para entender a interação nemátode-planta. Rahaman e coautores (2021) investigaram a diferença da resposta de cultivares de trigo resistentes e suscetíveis à infeção por *Pratylenchus thornei* e concluíram que o cultivar resistente apresentava concentrações significativamente maiores de alguns metabolitos secundários de diversas famílias (flavonóides, ácidos gordos, glicerolípidos, alcaloides e glucosinolatos), que estão potencialmente envolvidos no aumento da rigidez das paredes celulares da raiz, inibindo a penetração e/ou reduzindo a motilidade do nemátode (Rahaman et al., 2021).

2.2.3 Tecnologias para o estudo da Metabolómica de plantas

A metabolómica de plantas apresenta a possibilidade de detetar um vasto número de metabolitos através da extração do material vegetal, permitindo obter uma visão compreensiva dos diferentes eventos celulares, representando dessa forma o estado fisiológico das células (Yonekura-Sakakibara & Saito, 2006). A investigação metabolómica de plantas mutantes e transgénicas tem o potencial de desvendar vias metabólicas complexas e identificar genes candidatos, bem como a forma como um determinado gene afeta as diferentes vias metabólicas, ajudando a perceber a regulação e interações das mesmas (Kumar et al., 2017).

Os resultados da metabolómica de plantas dependem da metodologia e instrumentos de análise utilizados e torna-se desafiante devido à diversidade das características metabólicas e abundância das diferentes moléculas. As plataformas de metabolómica modernas baseiam-se na criação de dados metabolómicos com recurso a duas técnicas, nomeadamente ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS) (Kumar et al., 2017). A RMN é um método de análise não destrutivo que utiliza as propriedades magnéticas dos núcleos dos átomos quando submetidos a um campo magnético, e é utilizado principalmente para identificação de metabolitos com baixo peso molecular (<50 kDa) (Winning et al., 2009). A sensibilidade reduzida desta técnica faz com que não seja amplamente utilizada na metabolómica, ainda que seja muito útil pela sua capacidade de identificar propriedades físicas de ligandos, locais de ligação em proteínas e estruturas de complexos proteicos (Kumar et al., 2017). Por sua vez, a elevada sensibilidade da MS, resultante do desenvolvimento de métodos de ionização como a ionização química a pressão atmosférica (APCI), ionização por eletrospray (ESI) e MALDI-TOF, permite a análise de um grande número de metabolitos, facilitando a compreensão de vias e redes metabólicas complexas (Issaq et al., 2009; Kumar et al., 2017).

Ao longo dos anos tem havido a necessidade de desenvolver os espectrómetros de massa de forma que estes se adaptem à necessidade de aumentar a sua resolução e sensibilidade para análises metabolómicas. Desta necessidade surgiu a espectrometria de massa de elevada resolução, cujos instrumentos se diferenciam da espectrometria de massa convencional em termos de velocidade de análise, alcance, resolução e precisão no cálculo das massas e maior capacidade de fragmentação molecular (Geer Wallace & McCord, 2020). Foram desenvolvidos instrumentos tais como o TOF (*time-of-flight mass spectrometer*), que permite medições de massa precisas com base no tempo que um ião com energia cinética conhecida demora a percorrer uma certa distância ao longo de um campo elétrico (Xian et al., 2012), e os espectrómetros de massa de transformada

de *Fourier*, tais como o Orbitrap e FT-ICR (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*). No *Orbitrap* os íões oscilam axialmente entre uma placa electrostática e um elétrodo interno, à oscilação do ião medida é aplicada uma transformada de *Fourier* para determinar a frequência, que é diretamente proporcional à massa (Eliuk & Makarov, 2015). Por sua vez, o FT-ICR baseia as suas medições nas oscilações cíclicas dos íões num campo magnético. A esta oscilação dos íões é, tal como no *Orbitrap*, aplicada uma transformada de *Fourier* de forma a determinar a frequência e calcular a massa do ião (Brown et al., 2005).

Neste trabalho utilizou-se um espectrómetro de massa com analisador QTOF-MS (Figura 5), um instrumento híbrido que combina dois quadrupolos (Q1 e Q2) com um analisador de massa *time-of-flight*. O primeiro quadrupolo (Q1) tem a capacidade de filtrar íões específicos com base na razão massa/carga (m/z), mas também opera em modo RF (*radio frequency*), onde todos os íões passam pelo quadrupolo. O segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma célula de colisão onde os íões são bombardeados por moléculas de gases neutros, tais como nitrogénio e árgon, resultando na fragmentação dos mesmos por um processo chamado dissociação induzida por colisão (CID). Após a sua passagem pelo Q2, os íões são acelerados até à região de modulação de íões do analisador *time-of-flight*, onde são pulsados por um campo elétrico e acelerados ortogonalmente (Allen & McWhinney, 2019). Os íões, que adquiriram a mesma energia cinética, entram no tubo de voo onde ocorre a separação por massas. Íões que exibem massas mais pequenas terão um tempo de voo mais pequeno em comparação com íões mais pesados, pelo que chegam primeiro ao detetor (Allen & McWhinney, 2019). No topo da coluna de voo está também um dispositivo refletor que serve para corrigir dispersões de energia cinética e espaciais entre íões que exibam a mesma m/z , mas que tenham diferentes velocidades. Este dispositivo aumenta também a distância de voo dos íões, aumentando a resolução das massas (Figura 5) (Allen & McWhinney, 2019).

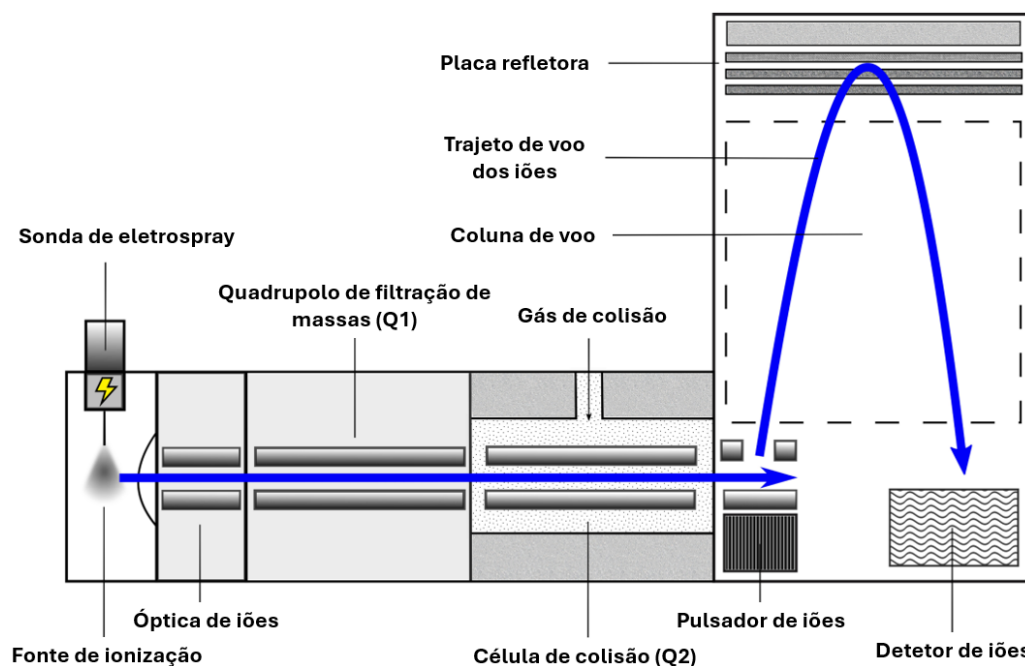


Figura 5 - Diagrama esquemático do espectrômetro quadrupolo tempo-de-voo. Imagem adaptada de Allen & McWhinney (2019)

De forma a aumentar a sensibilidade das técnicas de espectrometria de massa, esta é geralmente combinada com uma técnica cromatográfica, tal como cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) (Kumar et al., 2017). A técnica acoplada GC-MS é amplamente utilizada para análises *untargeted* e implica a derivatização das amostras, tornando os compostos voláteis, mas faz com que os compostos subivatizados não sejam incluídos na análise (Dutta et al., 2012). A técnica LC-MS, principalmente com fontes de ionização ESI e APCI, tem sido usada em análises *target* e *untargeted* para deteção de metabolitos primários e secundários de massa mais elevada (<1500 Da) (Turner et al., 2016). Em adição, a combinação de UHPLC (*ultra high performance liquid chromatography*) com QTOF-MS (*quadrupole time-of-flight mass spectrometry*) (Figura 6) aumentou a resolução dos picos cromatográficos, precisão das massas e tem permitido a identificação de centenas de metabolitos num curto período de tempo (Chawla & Ranjan, 2016).



Figura 6 - Equipamento ultra-high performance quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS) utilizado neste trabalho.

3. Metodologia experimental

No âmbito do projeto de investigação financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) – “Metabolómica de plantas para o controlo do nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*” (PTDC/ASP-PLA/0197/2020), foram realizados dois ensaios (2021 e 2022) experimentais de infeção do NLR *P. penetrans* em duas cultivares de batateira. Os ensaios foram realizados pela equipa do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra. A escolha das cultivares foi efetuada com base num primeiro estudo em que foram selecionados dez cultivares comerciais de batateira (Agata, Agria, Camel, Désirée, Dirosso, Kennebec, Laura, Picasso, Royata e Stemster) (Figueiredo et al., 2022). Foram realizados ensaios de cultivo para todos os cultivares e o índice de suscetibilidade (SI) foi calculado 60 dias após a inoculação do nemátode *P. penetrans*. Como resultados, verificaram que o SI foi significativamente mais baixo no cultivar Laura (0,4 – 0,6) e mais elevado nos cultivares Agria e Dirosso (2,3 e 2,4 respetivamente) (Tabela 2) (Figueiredo et al., 2022).

Tabela 2 - Índices de suscetibilidade dos diferentes cultivares 60 dias após a infeção por *Pratylenchus penetrans*. Índices de suscetibilidade seguidos de uma combinação diferente de letras (a, b, c) diferem significativamente a $p < 0.05$, de acordo com o teste Fisher LSD. Tabela adaptada de Figueiredo et al. (2022).

Assay	Potato Cultivar	Susceptibility Index (SI)
1	Laura	0.4 ^{b,c}
	Picasso	0.9 ^{a,b,c}
	Kennebec	1.0 ^{a,b,c}
	Désirée	1.0 ^{a,b,c}
	Stemster	1.1 ^{a,b,c}
	Agria	2.3 ^{a,b}
2	Laura	0.6 ^b
	Camel	0.8 ^b
	Kennebec	1.0 ^a
	Royata	1.3 ^b
	Agata	1.6 ^b
	Dirosso	2.4 ^b

Com base neste estudo, realizou-se um ensaio no qual se utilizaram os cultivares Laura (cultivar tolerante) e Agria (cultivar suscetível). Foram realizados ensaios de reprodução para as 2 cultivares em vasos de 2 L inoculados com 4 *P. penetrans*/g de solo e mantiveram-se controlos sem inoculação do nemátode. Os ensaios foram mantidos em condições de crescimento controladas (24°C, 16h de luz). Após 30 dias, foram recolhidas as raízes das plantas e enviadas, em gelo seco, para as equipas do

laboratório de Nematologia e do laboratório HERCULES da Universidade de Évora. Após receção, as raízes foram armazenadas a -80°C até serem utilizadas. Numa primeira fase, realizou-se a otimização do método de extração do material vegetal, através da testagem de dois distintos métodos de extração. Após seleção do método mais adequado, realizou-se as análises *untarget*, com o objetivo de comparar o perfil metabólico global dos diferentes cultivares, como se descreve em seguida.

3.1 Extração de metabolitos secundários

As raízes de batata, armazenadas a -80°C após a receção, foram primeiramente maceradas em azoto líquido para a testagem dos 2 métodos de extração e posterior análise metabolómica.

3.1.1 Método de extração com ultrassons

Foram pesadas 3 alíquotas de 100 mg de cada planta para microtubos de 1,5 mL, adicionou-se 0,5 mL de metanol (99,9%) *UHPLC-MS grade* (VWR, Portugal) e agitou-se no vórtex. De seguida as amostras foram submetidas a ultrassons durante 30 min, centrifugadas a 12000 rpm durante 20 min, recolheu-se o sobrenadante, filtrou-se com um filtro de 0,45 µm (*hydrophilic PTFE 13 mm 0,45 µm*, VWR, Portugal) para um *vial* de 1,5 mL e conservou-se a -18°C. Este método teve por base o procedimento desenvolvido por Hu et al., 2009.

3.1.2 Método de dupla extração em metanol

Foram pesadas 3 alíquotas de 30 mg de cada planta para *ependorfs* de 1,5 mL, adicionou-se 0,5 mL de metanol (99,9%) *UHPLC-MS grade* (VWR, Portugal) e agitou-se no vórtex. De seguida as amostras foram colocadas num termobloco durante 15 min. a 800 rpm e 20°C e centrifugadas a 13000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e o *pellet* foi utilizado para uma segunda extração pela adição de 0,5 mL de metanol (99,9%) *UHPLC-MS grade* (VWR, Portugal). Os microtubos foram novamente agitados no vortex e centrifugados a 13000 rpm durante 15 min. O sobrenadante das duas extrações foi combinado (1 mL), agitado no vortex e filtrado com um filtro de 0,45 µm (*hydrophilic PTFE 13 mm 0,45 µm*, VWR, Portugal) para frascos de 1,5 mL, que foram posteriormente conservados a -18°C. Este método teve por base o procedimento desenvolvido por Rahaman et al., 2021.

3.1.3 Dopagem de amostras para otimização do método de extração

De forma a perceber qual o procedimento que melhor se adequa à extração de metabolitos secundários das amostras de raiz de batateira, doparam-se três replicados técnicos de duas plantas controlo (não infetadas com *P. penetrans*) de cada cultivar em estudo, escolhidas ao acaso (Laura 2 e 4, Agria 1 e 4), com uma solução metanólica de ácido azelaico (500 ng/ml), com o objetivo de o quantificar e calcular a respetiva taxa de recuperação para cada um dos métodos. Tanto a solução metanólica de ácido azelaico para dopagem das amostras (500 ng/ml), como as utilizadas para construção da curva de calibração (25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml e 1 µg/ml), foram preparadas através de diluição consecutiva de uma solução mãe de 1000 µg/ml.

3.2 Análises por UHPLC-QTOF-MS

3.2.1 Condições de análise

As análises químicas foram realizadas utilizando um espectrómetro de massa de elevada resolução (*Bruker Impact II UHR-QqTOF*, Alemanha), acoplado a um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (*Bruker UHPLC Elute*, Alemanha) equipado com uma coluna *Bruker Intensity Solo 2 C18* (100 x 2,1 mm, partículas de 2,1 µm).

As análises *targeted* para identificação e quantificação de ácido azelaico (ácido nonadióico) foram realizadas com recurso ao *software TASQ®* (*Bruker*, Alemanha) utilizando o modo de ionização positiva. Foram injetados 5 µL no sistema LC-MS utilizando uma temperatura do forno de 40°C e um fluxo de 0,4 mL min⁻¹ com um gradiente de solvente A (água ultra-pura (VWR, Portugal) com 0,05% de ácido fórmico) e solvente B (metanol UHPLC-MS *grade* (VWR, Portugal) com 0,05% de ácido fórmico), começando a 2% B durante 0,5 minutos, seguido de um gradiente linear até 100% B até aos 12 minutos, voltando aos 2% B aos 13 minutos durante outros 2 minutos.

As análises *untargeted* para identificação de compostos de interesse foram realizadas com recurso ao *software MetaboScape®* (*Bruker*, Alemanha) utilizando os modos de ionização positiva e negativa. Para as análises *untargeted* em modo de ionização positiva utilizou-se um volume de injeção de 5 µL, temperatura do forno de 40°C e fluxo de 0,4 mL min⁻¹ com um gradiente de solvente A (água ultra-pura (VWR, Portugal) com 0,05% de ácido fórmico) e solvente B (metanol UHPLC-MS *grade* (VWR, Portugal) com 0,05% de ácido fórmico), começando a 2% B durante 0,5 minutos, seguido de um gradiente linear até 100% B até aos 12 minutos, voltando aos 2% B aos

13 minutos durante outros 2 minutos. Para as análises *untargeted* em modo de ionização negativa utilizou-se um volume de injeção de 5 µL, temperatura do forno de 40°C e fluxo de 0,4 mL min⁻¹ com um gradiente de solvente A (água ultra-pura (VWR, Portugal)) e solvente B (metanol UHPLC-MS *grade*, VWR, Portugal), começando a 2% B durante 0,5 minutos, seguido de um gradiente linear até 100% B até aos 12 minutos, voltando aos 2% B aos 13 minutos durante outros 2 minutos.

3.3 Processamento de dados e análise estatística

O processamento dos dados da otimização do método de extração, nomeadamente a construção da curva de calibração do ácido azelaico e cálculo da área dos picos para extrapolação das concentrações, foi realizado com recurso ao *software* TASQ® (*Bruker*, Alemanha). Para a análise estatística dos dados realizou-se análise de estatística descritiva e análise de variância ANOVA com verificação de pressupostos, com recurso ao *software* Jamovi 2.6.13 (<https://www.jamovi.org>).

As taxas de recuperação de ácido azelaico foram calculadas através da seguinte equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{[\text{Ácido azelaico recuperado}]}{[\text{Ácido azelaico dopado}]} \times 100$$

Os dados das análises *untargeted* das amostras de raiz de batateira foram processados através do *software* *MetaboScape*® (*Bruker*, Alemanha). A anotação dos sinais detetados pelo espectrómetro de massa, que correspondem a uma combinação única de razão massa/carga e tempo de retenção e que se designam de MS *features*, resultantes foi feita com recurso às bases de dados *MassBank* (<https://massbank.eu/MassBank/>), *MetaboBASE Plant Library* (*Bruker*, Alemanha) e *NIST 2020 MSMS Spectral Library* (*Bruker*, Alemanha).

Do total dos MS *features* detetados, excluíram-se aqueles para os quais não foi gerado o espectro MS/MS e, conseqüentemente, não são possíveis de identificar. Aos restantes MS *features* aplicou-se a análise de componentes principais (PCA) e *two-tailed Student's t test* para cada um dos seguintes conjuntos de dados: “Agria Infetada VS Agria Controlo”, “Laura Infetada VS Laura Controlo”, “Agria Controlo VS Laura Controlo” e “Agria Infetada VS Laura Infetada”, com o objetivo de identificar MS *features* com abundância significativamente diferente entre plantas, pelo que se excluíram aqueles com *p-value* superior a 0.01 e *p-value FDR (False Discovery Rate)* superior a 0.05. Em último lugar identificaram-se os MS *features* de interesse com recurso aos

softwares *SmartFormula* (Bruker, Alemanha), *Compound Crawler* (Bruker, Alemanha) e *MetFrag* (Bruker, Alemanha).

4. Resultados e discussão

4.1. Otimização do método de extração de metabolitos secundários

De forma a perceber que abordagem experimental apresenta melhor eficácia na extração de metabolitos secundários das amostras de raiz de batateira, foram testados dois métodos de extração, nomeadamente o método ultrassons (Hu et al., 2009) e o método de dupla extração com metanol (Rahaman et al., 2021). As amostras foram dopadas com uma solução metanólica de ácido azelaico a uma concentração de 500 ng/ml, com o objetivo de quantificar este composto por UHPLC-QTOF-MS *target screening* e calcular a taxa de recuperação do mesmo. O ácido azelaico foi escolhido para dopagem das amostras por ser um metabolito secundário produzido por diversas plantas e estar envolvido em mecanismos de defesa das mesmas (Dinler & Cetinkaya, 2024).

Da curva de calibração do ácido azelaico com concentrações crescentes de 25 ng/ml a 1 µg/ml ($y = 456,51x + 14616$; $R^2 = 0,9992$) (Figura 5), extrapolou-se a sua concentração nas amostras.

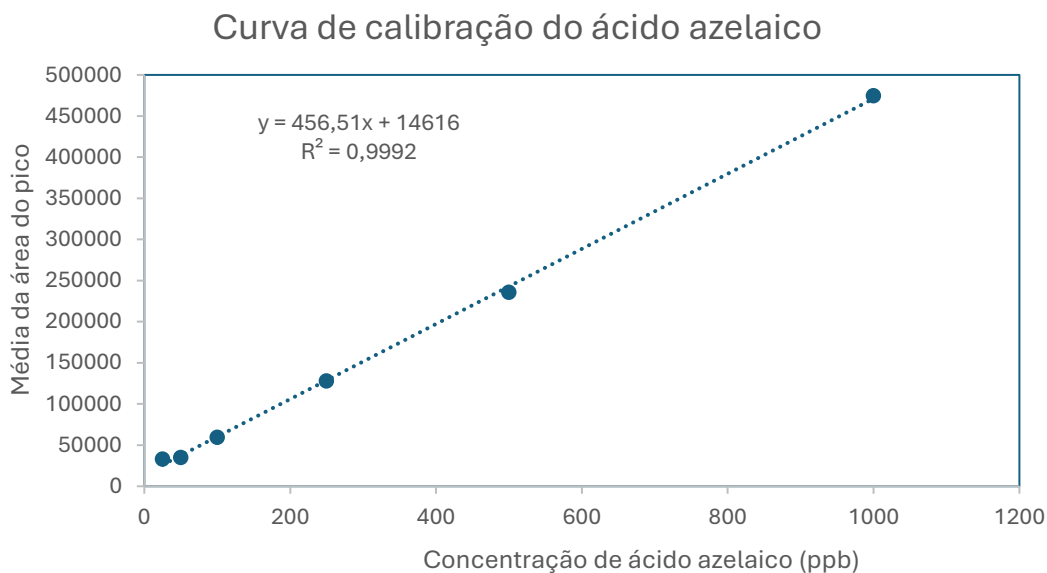


Figura 5 - Curva de calibração do ácido azelaico com concentrações crescentes de 25 ppb a 1 ppm.

O limite de deteção (LOD) determinado foi de 15,564 µg/ml, e o limite de quantificação (LOQ) foi de 126,587 µg/ml. Os dois métodos de extração apresentam

diferenças altamente significativas (p -value < 0,001), tendo o método de dupla extração em metanol apresentado uma taxa de recuperação superior ao método de ultrassons (84,4% e 70,7% respetivamente) (Tabela 3). A taxa de recuperação foi consistentemente superior no cultivar suscetível Agria comparativamente ao cultivar tolerante Laura (Figura 6).

Tabela 3 – Taxas de recuperação do ácido azelaico para os métodos de ultrassons (Hu et al., 2009) e dupla extração (Rahman et al., 2021). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.

Método de extração	N	Taxa de Recuperação (%)
Ultrassons	8	70.7 ± 7.29
Dupla extração	8	84.4 ± 5.23

De referir que as plantas selecionadas também apresentavam diferenças significativas (p -value = 0,038) (Anexo 2).

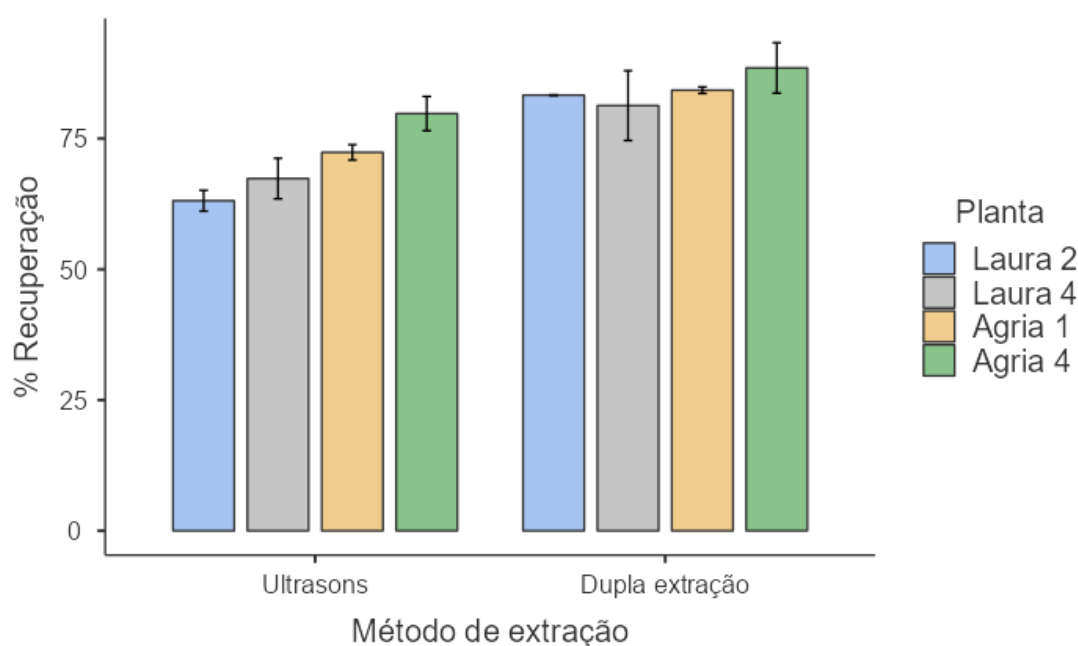


Figura 6 - Taxas de recuperação do método de extração por ultrassons e método de dupla extração em metanol para as plantas Laura 2, Laura 4 (tolerantes), Agria 1 e Agria 4 (suscetíveis).

Observou-se ainda que nas plantas controlo (plantas não infetadas pelo *P. penetrans*) não dopadas, que o cultivar Agria produz ácido azelaico em maior concentração (3,92 μ g/g planta) que o cultivar Laura (3,04 μ g/g planta) (Figura 7). Uma vez que o ácido azelaico é um metabolito secundário envolvido nos mecanismos de defesa da planta

contra stresses bióticos, seria de esperar que a cultivar Laura (tolerante) o produzisse em maior quantidade. Uma vez que se observou o contrário, conclui-se que este metabolito não é o responsável pelo menor índice de suscetibilidade da cultivar à infeção pelo NLR *Pratylenchus penetrans*.

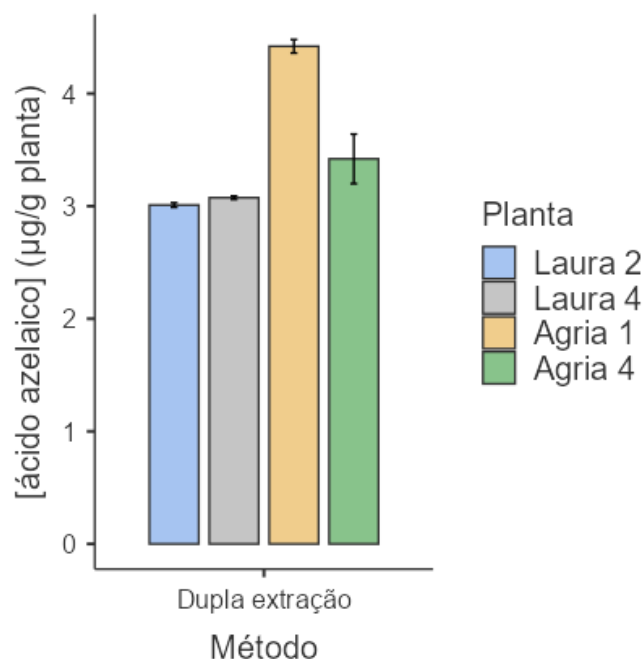


Figura 7 - Concentração de ácido azelaico ($\mu\text{g/g}$ planta) nas plantas Laura 2, Laura 4 (tolerantes), Agria 1 e Agria 4 (suscetíveis) controlos não dopados.

Neste sentido, verificou-se que o método de dupla extração em metanol é aquele que apresenta maior eficiência para extração do ácido azelaico de raiz de batateira, pelo que na etapa seguinte se adotou esta metodologia para a extração de metabolitos secundários.

No método de dupla extração em metanol, o material vegetal interage com o solvente em duas etapas distintas, o que aumenta o tempo de exposição ao mesmo. Ocorre também a renovação do solvente, criando-se um gradiente de concentração mais favorável à extração e evitando que o mesmo sature. Por sua vez, a técnica de ultrassons gera calor, o que pode levar à degradação dos metabolitos. Estes poderão ser alguns dos fatores que contribuíram para que o método de dupla extração em metanol se mostrasse mais eficiente.

4.2. Análises *untarget* das amostras por UHPLC-QTOF-MS

As amostras foram analisadas tanto no modo de ionização positivo como negativo, de forma a maximizar o número de compostos identificados. Pela análise de componentes principais (PCA) da junção dos MS *features* obtidos para os dois modos de ionização, podemos observar o agrupamento das diferentes amostras, que nos indica que possuem características similares dentro de cada grupo (Agria infetada, Agria controlo, Laura infetada e Laura controlo) (Figura 8).

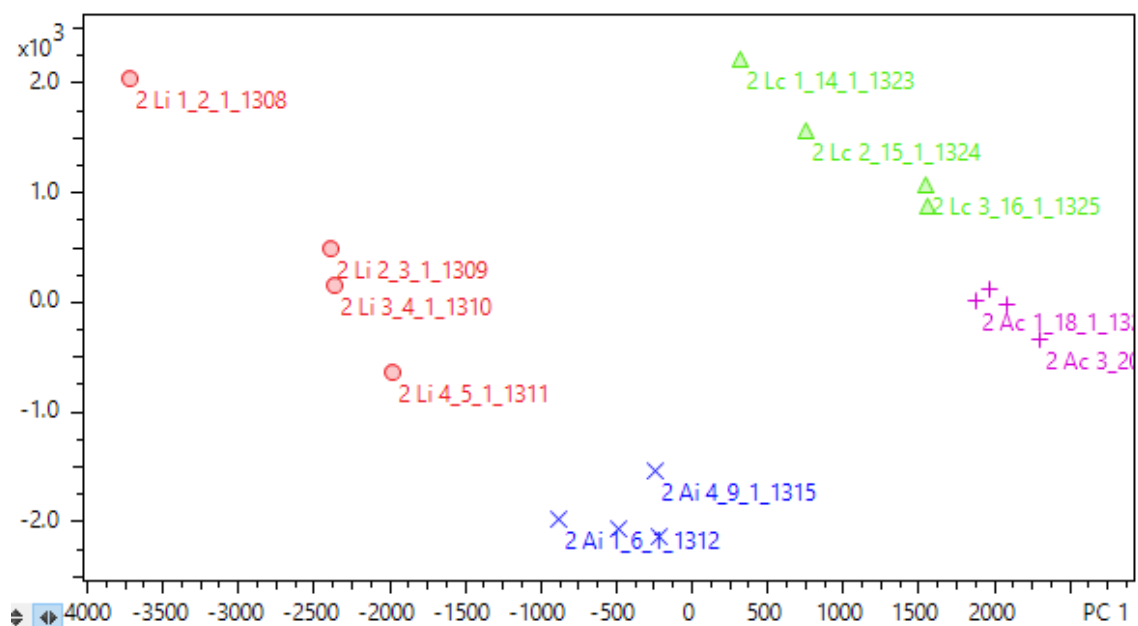


Figura 8 - Análise de componentes principais (PCA) da junção dos MS *features* obtidos para ambos os modos de ionização. Ac - Agria controlo; Ai - Agria infetada; Lc - Laura controlo; Li - Laura infetada.

No modo de ionização positiva obteve-se um total de 9291 MS *features*. Após exclusão dos MS *features* sem espectro MS/MS gerado, obteve-se 2353 MS *features*, dos quais apenas 90 foram possíveis de anotar pelas bases de dados *MassBank*, *MetaboBASE Plant Library* (Bruker, Alemanha) e *NIST 2020 MSMS Spectral Library* (Bruker, Alemanha). Em relação ao modo de ionização negativa, obteve-se um total de 5975 MS *features*. Após exclusão dos *features* MS sem espectro MS/MS gerado, obteve-se 2074 MS *features*, dos quais apenas 170 foram possíveis de anotar pelas bases de dados *MassBank*, *MetaboBASE Plant Library* (Bruker, Alemanha) e *NIST 2020 MSMS Spectral Library* (Bruker, Alemanha).

No grupo Agria infetada VS Agria controlo obteve-se um total de 276 MS *features* significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre plantas, dos quais 7 obtidos através do modo de ionização positivo e 269 pelo modo negativo. No grupo Laura infetada VS

Laura controlo obteve-se um total de 272 MS *features* significativamente diferentes entre plantas, todos eles obtidos pelo modo de ionização negativo. No grupo Agria controlo VS Laura controlo obteve-se um total de 28 MS *features* significativamente diferentes entre plantas, dos quais 25 obtidos pelo modo de ionização positivo e 3 pelo modo negativo. No grupo Agria infetada VS Laura infetada obteve-se um total de 160 MS *features* significativamente diferentes entre plantas, dos quais 121 obtidos pelo modo de ionização positivo e 39 pelo modo negativo (Tabela 4).

Tabela 4 - Número total de MS features considerados para análise nos grupos Agria infetada VS Agria controlo (Ai VS Ac), Laura infetada VS Laura controlo (Li VS Lc), Agria controlo VS Laura controlo (Ac VS Lc) e Agria infetada VS Laura infetada (Ai VS Li) para cada modo de ionização.

Comparação entre grupos	Número de MS features por modo de ionização		Total
	Positivo	Negativo	
Ai VS Ac	7	269	276
Li VS Lc	0	272	272
Ac VS Lc	25	3	28
Ai VS Li	121	39	160

Pela análise do rácio dos MS *features* de cada grupo, observou-se que no grupo Agria infetada VS Agria controlo, 104 dos 276 MS *features* apresentaram maior intensidade na Agria infetada; No grupo Laura infetada VS Laura controlo, apenas 45 dos 272 MS *features* apresentaram maior intensidade na Laura infetada; No grupo Agria controlo VS Laura controlo, 18 dos 28 MS *features* apresentaram maior intensidade na Laura controlo; no grupo Agria infetada VS Laura infetada, 116 dos 160 MS *features* apresentaram maior intensidade na Laura infetada. Em seguida apresentam-se os *volcano plots* para cada um dos grupos, onde se pode observar a distribuição dos MS *features* com base na intensidade dos picos cromatográficos e, conseqüentemente, concentração nas amostras (Figura 9).

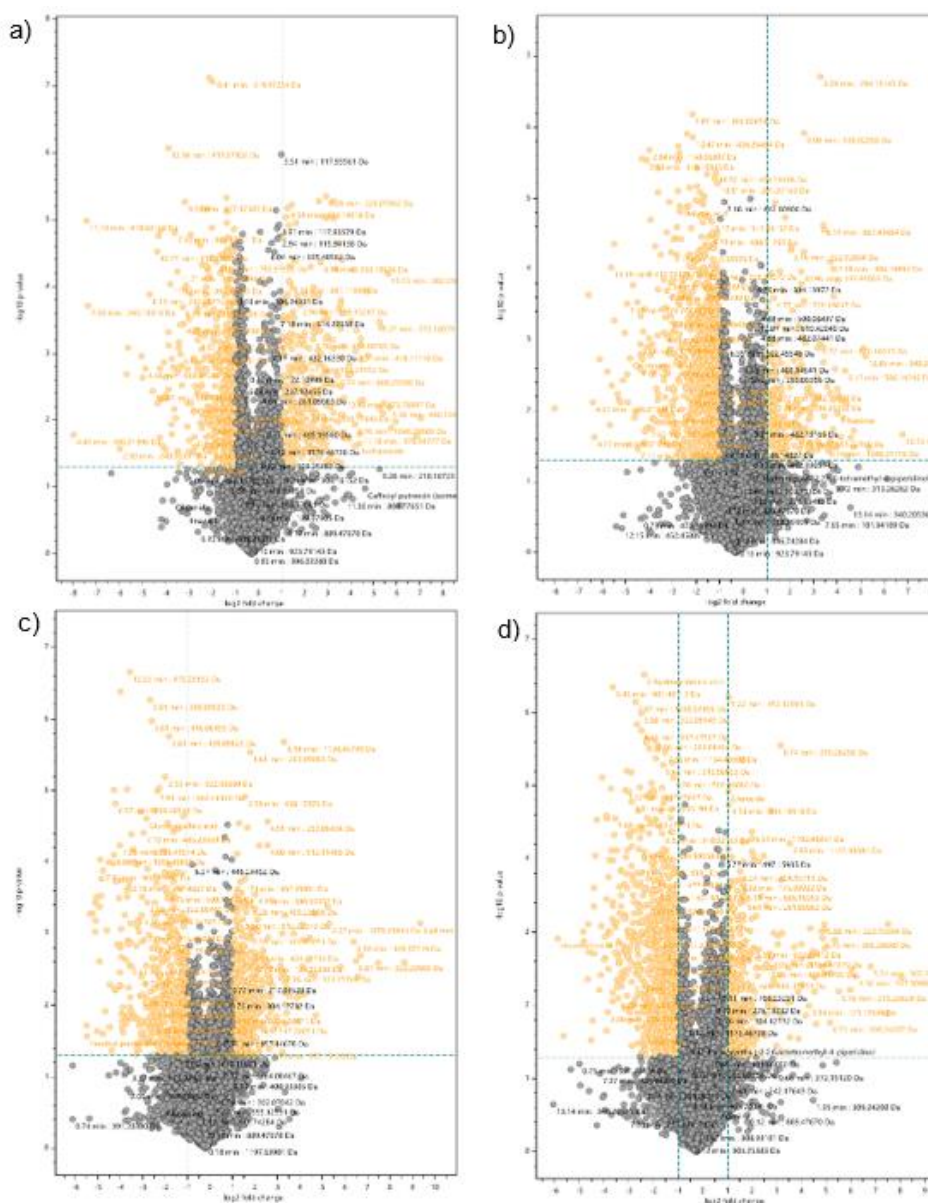


Figura 9 - Volcano plots dos grupos a) *Agria infetada* VS *Agria controle*, b) *Laura infetada* VS *Laura controle*, c) *Agria controle* VS *Laura controle*, d) *Agria infetada* VS *Laura infetada*.

Nas tabelas seguintes (5 e 6) estão descritos os metabolitos identificados correspondentes aos MS *features* selecionados do *Student's t-test* com base no seu *p-value* (≤ 0.01) e *p-value FDR* (≤ 0.05). No grupo “*Agria infetada* VS *Agria controle*” foi possível identificar 9 metabolitos, dos quais 2 são primários, com rácios significativamente diferentes entre plantas. Seis deles estão em maior concentração nas plantas infetadas do cultivar *Agria* e 3 em maior concentração nas plantas controle do cultivar *Agria* (Tabela 5). Dos metabolitos que estão em maior concentração nas plantas infetadas do cultivar *Agria*, identificou-se o asperulosídeo, um glicosídeo iridóide; 7-demetoxilegonol-2-metilbutanoato, um sesquiterpeno; Ácido 3-[(1-

carboxivinil)oxi]benzóico, um composto fenólico; majorenolídeo, uma lactona; 4,7-dihidroxycumarina, uma coumarina; (S)-1'-metilhexil cafeato, um éster fenólico, todos eles de função desconhecida (Tabela 5). Dos metabolitos que estão em maior concentração nas plantas controlo do cultivar Agria, identificaram-se 2 metabolitos primários, o ácido etanesulfónico e o ácido pantoténico. O ácido pantoténico está envolvido no metabolismo de ácidos gordos e carboidratos (Coxon et al., 2005); ácido 3,5-Di-tert-butil-4-hidroxibenzóico, um composto fenólico de função desconhecida (Tabela 5).

No grupo “Laura infetada VS Laura controlo” foi possível identificar 13 metabolitos, dos quais 2 são primários, com rácios significativamente diferentes entre plantas. Cinco deles estão em maior concentração nas plantas infetadas do cultivar Laura e 8 em maior concentração nas plantas controlo do cultivar Laura (Tabela 5). Dos metabolitos que estão em maior concentração nas plantas infetadas do cultivar Laura identificou-se o 1-(3,4-dihidroxibenzoil)-beta-D-glucopiranoose, um polifenol envolvido na coloração de frutos em *Capsicum annuum L.* (Liu et al., 2020); ácido glutaroilquínico, um derivado do ácido quínico de função desconhecida; 1-O-sinapoil- β -D-glucose e 4-hidroxi-3-metilacetofenona, dois compostos fenólicos, dos quais está descrito que o 4-hidroxi-3-metilacetofenona está envolvido no mecanismo de defesa contra agentes patogénicos (Narayanan et al., 2023); ácido 9-hidroxi-10,12,15-octadecatrienóico, um derivado do ácido linoleico de função desconhecida (Tabela 5). Dos metabolitos que estão em maior concentração nas plantas controlo do cultivar Laura identificaram-se 4 metabolitos primários, ácido etanesulfónico, ácido benzóico, ácido malónico e ácido quínico; ácido 3-O-p-cumaroilquinico, ácido 3-O-feruloilquinico, ácido 3,5-Di-tert-butil-4-hidroxibenzóico e ácido clorogénico, todos eles compostos fenólicos, dos quais está descrito que o ácido clorogénico está envolvido, por exemplo, nos mecanismos de defesa contra herbívoros (Kundu & Vadassery, 2019) (Tabela 5).

Tabela 5 – Metabolitos identificados correspondentes aos MS features selecionados do Student's t-test (p -value $\leq 0,01$ e p -value FDR $\leq 0,05$) para os grupos "Agria infetada VS Agria controlo" e "Laura infetada VS Laura controlo", com descrição da fórmula molecular, razão massa/carga (m/z), tempo de retenção (RT), modo de ionização, rácio médio infetada/controlo, classe de metabolito, classe de composto, função e PubMed CID.

Características MS features				Identificação dos metabolitos				
Fórmula molecular	m/z _RT (Da_min.)	Ionização	Rácio médio "infetada/controlo"	Composto	Classe de metabolito	Classe de composto	Função	PubMed CID
Agria infetada versus Agria controlo								
C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	414,11618_4,77	-	7,09	Asperulosídeo	Secundário	Glicosídeo iridóide	Desconhecida	84298
C ₂₃ H ₂₄ O ₅	380,16293_11,65	-	5,23	7-demetoxilegonol-2-metilbutanoato	Secundário	Sesquiterpeno	Desconhecida	56673143
C ₁₀ H ₈ O ₅	208,03728_3,33	-	4,69	Ácido 3-[(1-Carboxivinil)oxi]benzoico	Secundário	Fenol	Desconhecida	23844017
C ₁₇ H ₂₈ O ₃	280,20353_10,50	-	2,97	Majorenolideo	Secundário	Lactona	Desconhecida	124391
C ₉ H ₆ O ₄	178,02666_3,51	-	2,86	4,7-Dihidroxicoumarina	Secundário	Coumarina	Desconhecida	54679630
C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,15157_10,06	-	2,82	(S)-1'-metilhexil cafeato	Secundário	Ester fenólico	Desconhecida	50901245
C ₂ H ₆ O ₃ S	110,00352_7,44	-	0,42	Ácido etanossulfónico	Primário	Ácido sulfónico		11668
C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250,15677_9,83	-	0,19	Ácido 3,5-Di-tert-butil-4-hidroxibenzóico	Secundário	Fenol	Desconhecida	15007
C ₉ H ₁₇ NO ₅	219,11066_2,34	-	0,11	Ácido pantoténico	Primário	Vitamina do complexo B	Metabolismo de ácidos gordos e carboidratos (Coxon et al., 2005)	6613

Características MS features				Identificação dos metabolitos				
Fórmula molecular	m/z_RT (Da_min.)	Ionização	Rácio médio "infetada/controlo"	Composto	Classe de metabolito	Classe de composto	Função	PubMed CID
Laura infetada versus Laura controlo								
C ₁₃ H ₁₆ O ₉	316.07935_2.65	-	13,20	1-(3,4-dihidroxibenzoil)-beta-D-glucopiranosose	Secundário	Polifenol	Coloração de frutos (Liu et al., 2020)	101712127
C ₁₉ H ₂₆ O ₁₃	462.13699_2.65	-	8,16	Ácido glutaroilquinico	Secundário	Derivado do ácido quinico	Desconhecida	129716296
C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	386.12108_3.35	-	4,69	1-O-sinapoil-beta-D-glucose	Secundário	Fenol	Desconhecida	5280406
C ₉ H ₁₀ O ₂	150.06825_3.36	-	4,43	4-hidroxi-3-metilacetofenona	Secundário	Fenol	Defesa contra agentes patogénicos (Narayanan et al., 2023)	70135
C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.21926_10.67	-	3,40	Ácido 9-Hidroxi-10,12,15-octadecatrienóico	Secundário	Derivado do ácido linoleico	Desconhecida	6439873
C ₂ H ₆ O ₃ S	110.00352_7.63	-	0,34	Ácido etanossulfónico	Primário	Ácido sulfónico	Desconhecida	11668
C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	360.10540_2.02	-	0,20	Ácido benzoico	Primário	Ácido monocarboxílico	Desconhecida	14132345

Características MS features				Identificação dos metabolitos				
Fórmula molecular	m/z_RT (Da_min.)	Ionização	Rácio médio "infetada/controlo"	Composto	Classe de metabolito	Classe de composto	Função	PubMed CID
Laura infetada Laura controlo (continuação)								
C ₃ H ₄ O ₄	104.01102_2.91	-	0,14	Ácido malónico	Primário	Ácido dicarboxílico	Intermediário na produção de energia e biossíntese de metabolitos secundários	867
C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.10000_3.96	-	0,14	Ácido 3-O-p-cumaroilquinico	Secundário	Fenol	Desconhecida	9945785
C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.11049_4.27	-	0,13	Ácido 3-O-feruloilquinico	Secundário	Fenol	Desconhecida	6451331
C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250.15677_9.83	-	0,11	Ácido 3,5-Di-tert-butil-4-hidroxibenzóico	Secundário	Fenol	Desconhecida	15007
C ₇ H ₁₂ O ₆	192.06331_3.35	-	0,06	Ácido quinico	Primário	Ácido hidroxicarboxílico	Envolvido na via chiquimato	6508
C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.09472_3.32	-	0,03	Ácido clorogénico	Secundário	Fenol	Defesa contra herbivoros (Kundu & Vadassery, 2019)	1794427

No grupo “Agria controlo VS Laura controlo” foi possível identificar 2 metabolitos secundários com rácios significativamente diferentes entre plantas, ambos em maior concentração nas plantas controlo do cultivar Laura (Tabela 6). Foi identificado o ácido 3,4-Dioxo-8-fenilcinolina-5-carboxílico, um derivado da cinolina de função desconhecida e o ácido glucosilcafeico, um composto fenólico também ele de função desconhecida mas, como referido anteriormente, se assume que esteja envolvido em mecanismos de defesa contra stresse oxidativo e infeções microbianas (Tabela 6).

No grupo “Agria infetada VS Laura infetada” foi possível identificar 12 metabolitos, todos eles secundários, com rácios significativamente diferentes entre plantas, dos quais 7 estão em maior concentração nas plantas infetadas do cultivar Laura e 5 em maior concentração nas plantas infetadas do cultivar Agria (Tabela 6). Dos metabolitos que estão em maior concentração nas plantas infetadas do cultivar Laura identificou-se o ácido glucosilcafeico, um composto fenólico de função desconhecida mas que, por ser um derivado do ácido cafeico, se assume que esteja envolvido nos mecanismos de defesa contra o stresse oxidativo e contra infeções microbianas; o acetado de farnesil, um terpenóide que está envolvido nos mecanismos de defesa contra herbívoros (Divekar et al., 2022); o ácido 2-hidroxi-oleico, um ácido gordo que apresenta propriedades inseticidas (Gao et al., 2023); A piriferina B, um alcalóide com função desconhecida; (2-oxocromen-7-yl) fosfono hidrogénio fosfato e 7-hidroxi-6-metilcoumarina, ambos coumarinas de funções desconhecidas; monotropitina, um glicosídeo fenólico com função desconhecida (Tabela 6).

Dos metabolitos que estão em maior concentração nas plantas infetadas do cultivar Agria identificou-se a monocrotalina, um alcaloide que já foi descrito como metabolito secundário envolvido nos mecanismos de defesa de plantas contra predadores (Williams & Molyneux, 1987); glucosídeo e coniferina, ambos glicosídeos, dos quais está descrita a função da coniferina (síntese de lignina) (Tsuyama et al., 2013); 6-tuliposídeo B, glicosídeo fenólico descrito como parte integrante dos mecanismos de defesa contra agentes patogénicos (Shigetomi et al., 2010); Ácido 5-galloyloxi-3,4-dihidroxipentanóico, composto fenólico envolvido nos mecanismos de defesa contra espécies reativas de oxigénio (Miyajima et al., 2004) (Tabela 6).

Tabela 6 - Metabolitos identificados correspondentes aos MS features selecionados do Student's t-test (p -value $\leq 0,01$ e p -value FDR $\leq 0,05$) para os grupos "Agría controlo VS Laura controlo" e "Agría infetada VS Laura infetada", com descrição da fórmula molecular, razão massa/carga (m/z), tempo de retenção (RT), modo de ionização, rácio médio infetada/controlo, classe de metabolito, classe de composto, função e PubMed CID.

Características MS features				Identificação dos metabolitos identificados				
Fórmula molecular	m/z _RT (Da_min.)	Ionização	Rácio médio "Agría/Laura"	Composto	Classe de metabolito	Classe de composto	Função	PubMed CID
Agría controlo versus Laura controlo								
C ₁₅ H ₈ N ₂ O ₄	280.04743_3.88	+	0,12	Ácido 3,4-Dioxo-8-fenilcinolina-5-carboxílico	Secundário	Derivado da cinolina	Desconhecida	68863885
C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.09358_3.81	+	0,14	Ácido glucosilcafeico	Secundário	Fenol	Desconhecida	129710650
Agría infetada versus Laura infetada								
C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.09358_3.81	+	0,14	Ácido glucosilcafeico	Secundário	Fenol	Desconhecida	129710650
C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264.20837_9.74	+	0,15	Acetato de farnesil	Secundário	Terpenóide	Defesa contra herbívoros (Divekar et al., 2022)	638500
C ₁₈ H ₃₂ O ₃	296.23555_9.72	+	0,19	Ácido 2-hidroxilinoico	Secundário	Ácido gordo	Propriedades inseticidas (Gao et al., 2023)	21158511
C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₆	338.14794_2.03	+	0,20	Piriferina B	Secundário	Alcaloide	Desconhecida	139583680
C ₉ H ₈ O ₉ P ₂	321.96266_0.88	+	0,27	(2-oxocromen-7-yl) fosfono hidrogénio fosfato	Secundário	Coumarina	Desconhecida	22457423
C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	446.14269_4.83	+	0,29	Monotropitina	Secundário	Glicosídeo fenólico	Desconhecida	5315244

Características MS features				Identificação dos metabolitos identificados				
Fórmula molecular	m/z_RT (Da_min.)	Ionização	Rácio médio "Agria/Laura"	Composto	Classe de metabolito	Classe de composto	Função	PubMed CID
Agria infetada versus Laura infetada (continuação)								
C ₁₁ H ₁₈ O ₉	294.09494_4.84	-	0,29	6-tuliposídeo B	Secundário	Glicosídeo fenólico	Defesa contra agentes patogénicos (Shigetomi et al., 2010)	25034024
C ₁₀ H ₈ O ₃	176.04816_3.07	+	0,31	7-hidroxi-6-metilcoumarina	Secundário	Coumarina	Desconhecida	5412913
C ₁₆ H ₂₃ NO ₇	341.14778_3.35	+	2,09	Monocrotalina	Secundário	Alcaloide	Defesa contra predadores (Williams & Molyneux, 1987)	9415
C ₁₅ H ₂₄ O ₈	332.14590_3.90	+	2,11	Glucosídeo	Secundário	Glicosídeo	Desconhecida	180538
C ₁₆ H ₂₂ O ₈	342.13177_3.90	+	2,74	Coniferina	Secundário	Glicosídeo	Síntese de lignina (Tsuyama et al., 2013)	5280372
C ₁₂ H ₁₄ O ₉	302.06368_3.58	-	3,05	Ácido 5-galloyloxi-3,4-dihidroxipentanóico	Secundário	Fenol	Propriedades antioxidantes (Miyajima et al., 2004)	91159573

5. Conclusão

Do presente estudo comparativo do metabolismo global de cultivares de batateira suscetíveis e tolerantes ao nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*, resultou a identificação de metabolitos com distribuições diferentes ao nível da sua concentração na raiz da planta. Foi possível identificar compostos com maior expressão no cultivar tolerante infetado (Laura) comparativamente ao cultivar suscetível infetado, nomeadamente ácido glucosilcafeico, acetato de farnesil, ácido 2-hidroxi-linoleico, piriferina B, (2-oxocromen-7-yl) fosfono hidrogénio fosfato, monotropitina e 7-hidroxi-6-metilcoumarina. No grupo “Laura infetada VS Laura controlo” identificaram-se compostos com maior expressão nas plantas do cultivar Laura infetadas, nomeadamente 1-(3,4-dihidroxibenzoil)-beta-D-glucopiranosose, ácido glutaroilquinico, 1-O-sinapoil-beta-D-glucose, 4-hidroxi-3-metilacetofenona e ácido 9-hidroxi-10,12,15-octadecatrienóico. Estes compostos podem estar envolvidos nos mecanismos de defesa da planta contra o nemátode, pelo que seria interessante estudar as suas possíveis capacidades nematodocidas.

Apesar de terem sido identificados alguns compostos de interesse para o combate deste nemátode, muitos dos MS *features* não foram possíveis de identificar, pois será necessário construir uma base de dados mais robusta de metabolitos secundários de plantas para o software utilizado, que é relativamente recente e foi desenvolvido para pesticidas e compostos farmacêuticos. Assim, uma das perspetivas futuras para este trabalho será a construção da mesma, de forma a aumentar o número de metabolitos identificados. Outra perspetiva futura seria a quantificação destes metabolitos nas raízes de batateira em diferentes fases da infeção pelo *Pratylenchus penetrans* por UHPLC-QTOF-MS.

6. Referências Bibliográficas

- Abrantes, I., Faria, C., & Santos, S. (1987). *Root-lesion nematodes (Pratylenchus spp.) in Portugal. Nematologia Mediterranea, 15, 375-378.*
- Agarwal, R., Bentur, J. S., & Nair, S. (2014). Gas chromatography mass spectrometry based metabolic profiling reveals biomarkers involved in rice-gall midge interactions. *Journal of Integrative Plant Biology, 56(9), 837–848.* <https://doi.org/10.1111/jipb.12244>
- Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., & Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(3), 1410–1416.* <https://doi.org/10.1021/jf000595h>
- Allen, D. R., & McWhinney, B. C. (2019). Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *Clinical Biochemist Reviews, 40(3), 135–146.* <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00023>
- Anjali, Kumar, S., Korra, T., Thakur, R., Arutselvan, R., Kashyap, A. S., Nehela, Y., Chaplygin, V., Minkina, T., & Keswani, C. (2023). Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. In *Plant Stress (Vol. 8)*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100154>
- Babenko, L. M., Smirnov, O. E., Romanenko, K. O., Trunova, O. K., & Kosakivska, I. V. (2019). Phenolic compounds in plants: Biogenesis and functions. In *Ukrainian Biochemical Journal (Vol. 91, Issue 3, pp. 5–18)*. Palladin Institute of Biochemistry of the NASU. <https://doi.org/10.15407/ubj91.03.005>
- Baker, C. J., Whitaker, B. D., Roberts, D. P., Mock, N. M., Rice, C. P., Deahl, K. L., & Aver'Yanov, A. A. (2005). Induction of redox sensitive extracellular phenolics during plant-bacterial interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 66(3), 90–98.* <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.05.002>
- Brown, S. C., Kruppa, G., & Dasseux, J. L. (2005). Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry. In *Mass Spectrometry Reviews (Vol. 24, Issue 2, pp. 223–231)*. <https://doi.org/10.1002/mas.20011>
- Carrington, Y., Guo, J., Le, C. H., Fillo, A., Kwon, J., Tran, L. T., & Ehrling, J. (2018). Evolution of a secondary metabolic pathway from primary metabolism: shikimate and quinate biosynthesis in plants. *Plant Journal, 95(5), 823–833.* <https://doi.org/10.1111/tpj.13990>

- Castillo, P., & Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus*, (Nematoda, Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. *Nematology Monographs and Perspectives*, 6, 194-200. ISBN 978 90 04 15564 0
- Chawla, G., & Ranjan, C. (2016). Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.2174/1874842201603010001>
- Coxon, K. M., Chakauya, E., Ottenhof, H. H., Whitney, H. M., Blundell, T. L., Abell, C., & Smith, A. G. (2005). Pantothenate biosynthesis in higher plants. *Coenzymology: biochemistry of vitamin biogenesis and cofactor-containing enzymes*. 33 (4), 743-6. <https://doi.org/10.1042/BST0330743>
- Dallagnol, L. J., Rodrigues, F. A., Damatta, F. M., Mielli, M. V. B., & Pereira, S. C. (2011). Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-Bipolaris oryzae interaction. *Phytopathology*, 101(1), 92–104. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0105>
- de Kraker, J. W., & Gershenzon, J. (2011). From amino acid to glucosinolate biosynthesis: Protein sequence changes in the evolution of methylthioalkylmalate synthase in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23(1), 38–53. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079269>
- Dinler, B. S., & Cetinkaya, H. (2024). An overview on Azelaic Acid: Biosynthesis, signalling and the action under stress conditions in plants. *Journal of Plant Stress Physiology*, 8–12. <https://doi.org/10.25081/jpsp.2024.v10.8725>
- Divekar, P. A., Narayana, S., Divekar, B. A., Kumar, R., Gadratagi, B. G., Ray, A., Singh, A. K., Rani, V., Singh, V., Singh, A. K., Kumar, A., Singh, R. P., Meena, R. S., & Behera, T. K. (2022). Plant Secondary Metabolites as Defense Tools against Herbivores for Sustainable Crop Protection. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23052690>
- Dutta, A., Shetty, P., Bhat, S., Ramachandra, Y., & Hegde, S. (2012). A mass spectrometric study for comparative analysis and evaluation of metabolite recovery from plasma by various solvent systems. *Journal of Biomolecular Techniques*, 23(4), 128–135. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2304-001>
- Eliuk, S., & Makarov, A. (2015). Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. In *Annual Review of Analytical Chemistry* (Vol. 8, pp. 61–80). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325>

- Esteves, I., Maleita, C., & Abrantes, I. (2015). Root-lesion and root-knot nematodes parasitizing potato. *European Journal of Plant Pathology*, *141*(2), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0551-1>
- Figueiredo, J., Vieira, P., Abrantes, I., & Esteves, I. (2021). Detection of the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans* in potato tubers. *Plant Pathology*, *70*(8), 1960–1968. <https://doi.org/10.1111/ppa.13425>
- Figueiredo, J., Vieira, P., Abrantes, I., & Esteves, I. (2022). Commercial Potato Cultivars Exhibit Distinct Susceptibility to the Root Lesion Nematode *Pratylenchus penetrans*. *Horticulturae*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030244>
- Fosu-Nyarko, J., & Jones, M. G. K. (2016). Advances in Understanding the Molecular Mechanisms of Root Lesion Nematode Host Interactions. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 54, pp. 253–278). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100257>
- Gao, Q., Du, W. X., Lv, S. T., Li, Y., Meng, S. A., & Chen, G. (2023). Insecticidal effect of green walnut husks and its active basis digesting targeting to insect phenoloxidase using UPLC-Q-TOF-MS coupled with PLS analysis. *Phytoparasitica*, *51*(5), 1105–1122. <https://doi.org/10.1007/s12600-023-01103-9>
- Geer Wallace, M. A., & McCord, J. P. (2020). High-resolution mass spectrometry. In *Breathborne Biomarkers and the Human Volatilome* (pp. 253–270). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819967-1.00016-5>
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S., & Somers, D. J. (2012). Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat qtl (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, *7*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040695>
- Hong, J., Yang, L., Zhang, D., & Shi, J. (2016). Plant metabolomics: An indispensable system biology tool for plant science. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17060767>
- Hu, F., Deng, C., Liu, Y., & Zhang, X. (2009). Quantitative determination of chlorogenic acid in Honeysuckle using microwave-assisted extraction followed by nano-LC-ESI mass spectrometry. *Talanta*, *77*(4), 1299–1303. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.003>
- Issaq, H. J., Van, Q. N., Waybright, T. J., Muschik, G. M., & Veenstra, T. D. (2009). Analytical and statistical approaches to metabolomics research. In *Journal of*

- Separation Science* (Vol. 32, Issue 13, pp. 2183–2199).
<https://doi.org/10.1002/jssc.200900152>
- Jones, M. G. K., & Fosu-Nyarko, J. (2014). Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. In *Annals of Applied Biology* (Vol. 164, Issue 2, pp. 163–181). <https://doi.org/10.1111/aab.12105>
- Kroymann, J. (2011). Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 246–251). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.021>
- Kumar, R., Bohra, A., Pandey, A. K., Pandey, M. K., & Kumar, A. (2017). Metabolomics for plant improvement: Status and prospects. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01302>
- Kundu, A., & Vadassery, J. (2019). Chlorogenic acid-mediated chemical defence of plants against insect herbivores. *Plant Biology*, 21(2), 185–189. <https://doi.org/10.1111/plb.12947>
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds: Introduction. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1543–1580). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57
- Liu, Y., Lv, J., Liu, Z., Wang, J., Yang, B., Chen, W., Ou, L., Dai, X., Zhang, Z., & Zou, X. (2020). Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals the mechanism of color formation in pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125629>
- Miyajima, Y., Kikuzaki, H., Hisamoto, M., & Nakatani, N. (2004). Antioxidative polyphenols from berries of *Pimenta dioica*. In *BioFactors*, 21 (1-4), 301-303. <https://doi.org/10.1002/biof.5520220159>.
- Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., Khan, F. A., & Naushin, F. (2019). Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. In *Plant Signaling Molecules: Role and Regulation under Stressful Environments* (pp. 157–168). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>
- Nakabayashi, R., & Saito, K. (2015). Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 24, pp. 10–16). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.01.003>

- Narayanan, M., Vijay, A., Kandasamy, S., Nasif, O., Alharbi, S. A., Srinivasan, R., & Kavitha, R. (2023). Phytochemical profile and larvicidal activity of aqueous extract of *Ocimum americanum* against mosquito vectors. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 13(5), 3369–3381. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-02087-w>
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, 12, 1153–1162. www.mdpi.org/molecules
- Pott, D. M., Osorio, S., & Vallarino, J. G. (2019). From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Ka, M., Hko È Nen, È., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2001). *Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries*. *J Appl Microbiol.* 90 (4), 494-507. <https://doi.org/j.1364-2672.2001.01271.x>
- Rahaman, M. M., Zwart, R. S., Rupasinghe, T. W. T., Hayden, H. L., & Thompson, J. P. (2021). Metabolomic profiling of wheat genotypes resistant and susceptible to root-lesion nematode *Pratylenchus thornei*. *Plant Molecular Biology*, 106(4–5), 381–406. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01156-6>
- REGULAMENTO (UE) 2016/2031 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO - de 26 de Outubro de 2016 - Relativo a Medidas de Proteção Contra as Pragas Dos Vegetais (2016).
- Sana, T. R., Fischer, S., Wohlgemuth, G., Katrekar, A., Jung, K. hong, Ronald, P. C., & Fiehn, O. (2010). Metabolomic and transcriptomic analysis of the rice response to the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Metabolomics*, 6(3), 451–465. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0218-7>
- Shigetomi, K., Shoji, K., Mitsuhashi, S., & Ubukata, M. (2010). The antibacterial properties of 6-tuliposide B. Synthesis of 6-tuliposide B analogues and structure-activity relationship. *Phytochemistry*, 71(2–3), 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.10.008>

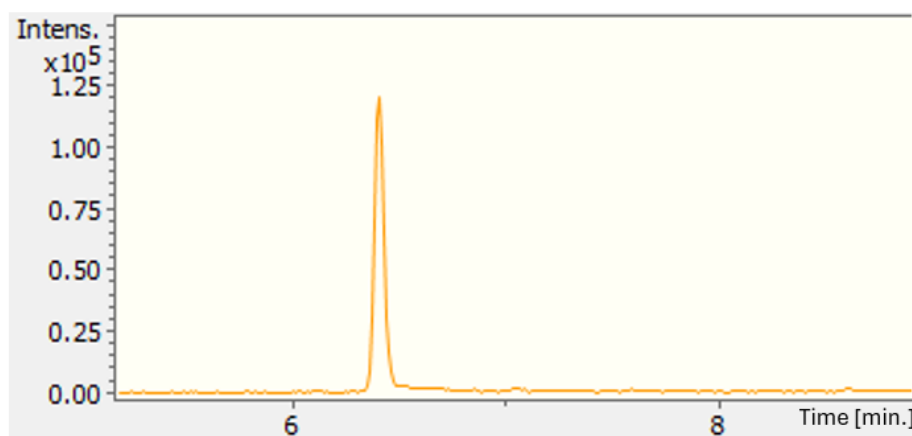
- Szliszka, E., Czuba, Z. P., Domino, M., Mazur, B., Zydowicz, G., & Krol, W. (2009). Ethanol extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules*, *14*(2), 738–754. <https://doi.org/10.3390/molecules14020738>
- Tsuyama, T., Kawai, R., Shitan, N., Match, T., Sugiyama, J., Yoshinaga, A., Takabe, K., Fujita, M., & Yazaki, K. (2013). Proton-dependent coniferin transport, a common major transport event in differentiating xylem tissue of woody plants. *Plant Physiology*, *162*(2), 918–926. <https://doi.org/10.1104/pp.113.214957>
- Turner, M. F., Heuberger, A. L., Kirkwood, J. S., Collins, C. C., Wolfrum, E. J., Broeckling, C. D., Prenni, J. E., & Jahn, C. E. (2016). Non-targeted metabolomics in diverse sorghum breeding lines indicates primary and secondary metabolite profiles are associated with plant biomass accumulation and photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, *7*(JULY2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00953>
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, *45*(4), 523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>
- Vicente, C., Lurdes Inácio, M., Mota, M., & Vieira, P. (2021). O nemátode-das-lesões-radiculares, *Pratylenchus penetrans*. *Vida Rural, Abril*, 79–82.
- Vieira, P., Eves-Van Den Akker, S., Verma, R., Wantoch, S., Eisenback, J. D., & Kamo, K. (2015). The *pratylenchus penetrans* transcriptome as a source for the development of alternative control strategies: Mining for putative genes involved in parasitism and evaluation of in planta RNAi. *PLoS ONE*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144674>
- Walker, J. C., & Stahmann, M. A. (1995). *Chemical nature of disease resistance in plants*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.06.060155.002031>
- Weng, J. K. (2014). The evolutionary paths towards complexity: A metabolic perspective. In *New Phytologist* (Vol. 201, Issue 4, pp. 1141–1149). <https://doi.org/10.1111/nph.12416>
- Williams, M. C., & Molyneux, R. J. (1987). Occurrence, Concentration, and Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria* Seeds. *Weed Science*, *35*(4), 476–481. <https://doi.org/10.1017/s0043174500060410>

- Winning, H., Roldán-Marín, E., Dragsted, L. O., Viereck, N., Poulsen, M., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., & Engelsen, S. B. (2009). An exploratory NMR nutri-metabonomic investigation reveals dimethyl sulfone as a dietary biomarker for onion intake. *Analyst*, *134*(11), 2344–2351. <https://doi.org/10.1039/b918259d>
- Xian, F., Hendrickson, C. L., & Marshall, A. G. (2012). High resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *84*(2), 708–719. <https://doi.org/10.1021/ac203191t>
- Yonekura-Sakakibara, K., & Saito, K. (2006). Review: Genetically modified plants for the promotion of human health. In *Biotechnology Letters* (Vol. 28, Issue 24, pp. 1983–1991). <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9194-4>

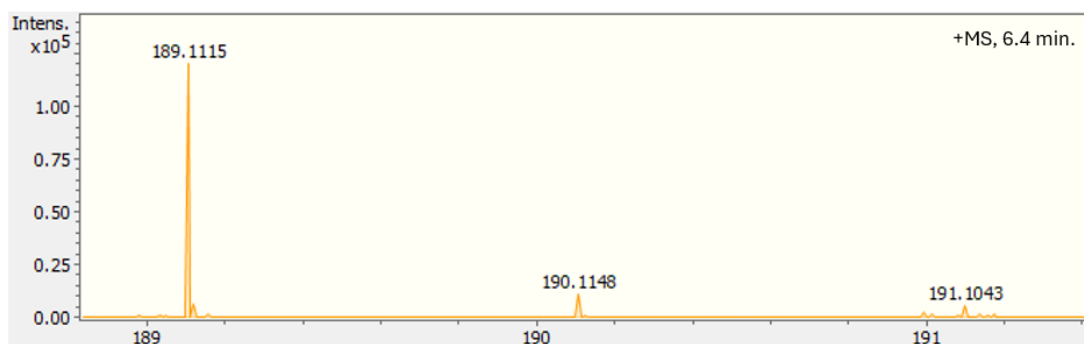
7. Anexos

Anexo 1: a) Pico cromatográfico obtido para o ácido azelaico a uma concentração de 100 ppb; b) Espectro de massa obtido para o ácido azelaico.

a)



b)



Anexo 2: Análise estatística do ensaio de otimização do método de extração. a) Análise de estatística descritiva; b) Análise de variância ANOVA com verificação de pressupostos.

a) Estatística descritiva:

	Método de extração	Planta	N	Média	Erro-padrão	Mediana	Desvio-padrão
% Recuperação	Ultrassons	Laura 2	2	63.1	1.9900	63.1	2.8143
		Laura 4	2	67.4	3.8800	67.4	5.4871
		Agria 1	2	72.4	1.4750	72.4	2.0860
	Dupla extração	Agria 4	2	79.8	3.2750	79.8	4.6315
		Laura 2	2	83.3	0.0450	83.3	0.0636
		Laura 4	2	81.3	6.6750	81.3	9.4399
		Agria 1	2	84.3	0.6250	84.3	0.8839
		Agria 4	2	88.5	4.8200	88.5	6.8165

Descritivas de Grupo

	Método de extração	N	Média	Desvio-padrão	Erro-padrão
% Recuperação	Ultrassons	8	70.7	7.29	2.58
	Dupla extração	8	84.4	5.23	1.85

b) ANOVA:

ANOVA - % Recuperação

	Soma de Quadrados	gl	Quadrado médio	F	p
Método de extração	750	1	750.3	30.53	< .001
Planta	293	3	97.7	3.97	0.038
Resíduos	270	11	24.6		

Verificação de pressupostos:

Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene)

F	gl1	gl2	p
1.50	7	8	0.290

Teste à Normalidade (Shapiro-Wilk)

Estatística	p
0.959	0.648