

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Identificação de voláteis em castas de *Vitis vinifera*  
susceptíveis e resistentes ao ataque de cigarrinhas-verdes**

Daniel Francisco Santa Cruz Silva

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Cristina Figueiredo  
Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Teresa Rebelo

Esta dissertação é escrita ao abrigo do antigo acordo ortográfico.



## **AGRADECIMENTOS**

Às professoras Maria Teresa Rebelo e Ana Cristina Figueiredo, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela sua orientação, disponibilidade e apoio prestado durante a realização deste trabalho, que se estendeu por um período de um ano e meio.

À professora Elisabete Figueiredo do Instituto Superior de Agronomia, pela disponibilidade demonstrada para o acesso a equipamento que acabou por não ser utilizado, neste caso o olfactómetro, devido a constrangimentos de várias ordens.

À Herdade do Esporão, em especial ao Eng<sup>o</sup> Amândio Rodrigues, por ter facultado o acesso às vinhas e aos registos das intervenções realizadas durante o período do estudo.

## RESUMO

*Vitis vinifera* é uma das culturas mais importantes no mundo. *Jacobiasca lybica* é uma praga importante da videira que, através da sua alimentação, causa sintomas característicos (*hopperburn*), que incluem o amarelecimento ou o avermelhamento e o enrolamento das folhas, além da diminuição do açúcar dos bagos e das perdas na colheita. A utilização de insecticidas contra *J. lybica* e outras cigarrinhas-verdes e a ocorrência de resistências despertou o interesse por estratégias alternativas, nomeadamente a utilização de semioquímicos voláteis derivados de plantas, como atractivos ou repelentes. Com este trabalho pretendeu-se avaliar as diferenças dos perfis de voláteis de duas castas de videira com elevada e reduzida susceptibilidade ao ataque de cigarrinhas-verdes, respectivamente Alicante-Bouschet (AB) e Antão Vaz (AV). Foram colhidas folhas no Outono de 2020 (fase vegetativa) e na Primavera de 2021 (fase de plena floração), na Herdade do Esporão. Os voláteis foram extraídos por microextração em fase sólida (SPME) e isolamento de óleos essenciais por hidrodestilação, tendo os componentes obtidos sido analisados por GC e GC-MS. Os voláteis principais extraídos das folhas de Outono, em que algumas apresentavam sintomas de *hopperburn*, foram, por SPME: germacreno D,  $\beta$ -bourboneno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -ilangeno e  $\gamma$ -cadineno; e por hidrodestilação: 2-*trans*-hexenal, *cis*-3-hexen-1-ol, ácido palmítico, ácido linoleico e *cis*-2-hexen-1-ol. Salicilato de metilo apenas foi detectado em folhas de AB. Estes compostos desempenham um papel essencial na defesa das plantas, aumentando a sua emissão em resposta à herbivoria, o que pode explicar as composições percentuais significativas, com ligeiras diferenças entre as duas castas. Os componentes maioritários de folhas sãs colhidas na Primavera foram: linalol, geraniol, 2-*trans*-hexenal e acetato de fitol. Em futuros estudos, ensaios com olfactómetro devem ser realizados para observar a resposta que as cigarrinhas-verdes apresentam aos compostos voláteis presentes nestas castas de *V. vinifera*, para se propôr estratégias de gestão baseadas na utilização de semioquímicos.

**Palavras-chave:** Cromatografia Gasosa (GC), Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS), Microextração em Fase Sólida (SPME), hidrodestilação, vinha.

## ABSTRACT

*Vitis vinifera* is one of the most important crops in the world. *Jacobiasca lybica* is an important pest of the vineyards which, by feeding, causes characteristic symptoms (*hopperburn*), including yellowing or reddening and curling of the vines leaves, in addition to the decrease in the sugar of the berries and the crop losses. The use of insecticides against *J. lybica* and other green leafhoppers, and the occurrence of resistance, has sparked interest in alternative strategies, namely the use of plant-derived volatile semiochemicals as attractants or repellents. The aim of this work was to evaluate the differences in the volatile profiles of two vineyards varieties with high and low susceptibility to the attack of green leafhoppers, respectively Alicante-Bouschet (AB) and Antão Vaz (AV). Leaves were collected in Autumn 2020 (vegetative phase) and Spring 2021 (full flowering phase), at Herdade do Esporão. The volatiles were extracted by solid phase microextraction (SPME) and isolation of essential oils by hydrodistillation. The components obtained were analyzed by GC and GC-MS. The main volatiles extracted from Autumn leaves, in which some showed symptoms of *hopperburn*, were, by SPME: germacrene D,  $\beta$ -bourbonene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -ylangene and  $\gamma$ -cadinene; and by hydrodistillation: 2-*trans*-hexenal, *cis*-3-hexen-1-ol, palmitic acid, linoleic acid and *cis*-2-hexen-1-ol. Methyl salicylate was only detected in AB leaves. These compounds play an essential role in plant defense, increasing their emission in response to herbivory, which may explain the significant percentage compositions, with slight differences between the two varieties. The major components of healthy leaves harvested in Spring were: linalool, geraniol, 2-*trans*-hexenal and phytol acetate. In future studies, olfactometer tests should be carried out to observe the response that green leafhoppers present to volatile compounds present in these *V. vinifera* varieties, in order to propose management strategies based on the use of semiochemicals.

**Keywords:** Gas Chromatography (GC), Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Solid Phase Microextraction (SPME), hydrodistillation, vineyards.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A vinha e a importância da viticultura .....	1
1.2. Cigarrinhas verdes praga da vinha .....	1
1.3. Meios de Protecção .....	4
1.3.1. Semioquímicos .....	5
1.3.1.1. Compostos orgânicos voláteis .....	5
1.3.1.2. Óleos essenciais.....	8
1.4. Objectivos.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Material vegetal.....	10
2.2. Extracção da componente volátil das folhas de <i>Vitis vinifera</i> .....	10
2.2.1. Microextracção em fase sólida (SPME) .....	10
2.2.2. Hidrodestilação.....	13
2.3. Análise da componente volátil das folhas de <i>Vitis vinifera</i> .....	13
2.3.1. Microextracção em fase sólida (SPME) .....	14
2.3.1.1. Cromatografia Gasosa (GC).....	14
2.3.1.2. Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC-MS).....	14
2.3.2. Hidrodestilação.....	14
2.3.2.1. Cromatografia Gasosa (GC).....	14
2.3.2.2. Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC-MS).....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
3.1. Compostos voláteis das folhas das duas castas de videira .....	16
3.1.1. Voláteis obtidos por SPME .....	18
3.1.2. Voláteis obtidos por Hidrodestilação .....	24
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição percentual dos componentes identificados nos voláteis extraídos, por isolamento de óleo essencial e por SPME, das folhas das duas castas de videira analisadas.....	16
Tabela 3.2. Dados da literatura sobre os componentes voláteis dominantes extraídos de folhas de <i>Vitis vinifera</i> . .....	21

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Sintoma característico de <i>hopperburn</i> , neste caso avermelhamento das folhas, visível em folhas da casta tinta Alicante-Bouschet, na Herdade do Esporão, Alentejo, em Outubro de 2020 (Outono), causado pela acção das cigarrinhas-verdes (original de M.T. Rebelo).....	3
Figura 1.2. Exemplar da cigarrinha-verde <i>Jacobiasca lybica</i> , no Outono de 2020, na Herdade do Esporão, Alentejo (original de S. Rodrigues Filho). .....	4
Figura 2.1. Aspecto das videiras da casta Alicante-Bouschet, no Outono de 2020, na Herdade do Esporão, Alentejo (original de M.T. Rebelo). .....	11
Figura 2.2. Aspecto das videiras da casta Antão Vaz, no Outono de 2020, na Herdade do Esporão, Alentejo (original de M.T. Rebelo). .....	11
Figura 2.3. Folhas da casta Alicante-Bouschet (à esquerda) e da casta Antão Vaz (à direita) dentro de um exsicador tapado, no Outono de 2020, na Herdade do Esporão, Alentejo, para posterior extracção dos voláteis por SPME (originais de M.T. Rebelo).....	12
Figura 2.4. Procedimento para recolha de voláteis de folhas de videira da casta Antão Vaz (à esquerda) e da casta Alicante-Bouschet (à direita), através do método de SPME, em que as folhas são colocadas em exsicadores tapados, por aproximadamente 4 h, para homogeneização da atmosfera no interior do exsicador. Ao fim desse tempo, a fibra de SPME é inserida no septo, para recolha de voláteis, durante 1 h (original do autor).....	12
Figura 2.5. Procedimento para recolha de voláteis de folhas de videira, colhidas no Outono de 2020, da casta Antão Vaz (à esquerda) e da casta Alicante-Bouschet (à direita), com recurso a isolamento de óleo essencial, por hidrodestilação, durante 3 h, num aparelho do tipo Clevenger (original do autor). 13	13

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A vinha e a importância da viticultura

*Vitis vinifera* L. (Vitaceae) é uma espécie nativa da região mediterrânica, sendo uma das culturas mais importantes em todo o mundo no que toca à produção tanto de vinho como de uvas de mesa (Fernandes *et al.*, 2013; Pertot *et al.*, 2017). Segundo o Instituto da Vinha e do Vinho (s.d.A), a produção de vinho em Portugal em 2019 foi de 6,5 milhões de hectolitros, enquanto a nível mundial atingiu os 248 milhões. De referir que em 2019 o consumo de vinho no país foi de 5 milhões de hectolitros, enquanto a nível mundial este valor chegou aos 244 milhões (Instituto da Vinha e do Vinho, s.d.B). Na região do Alentejo, a produção média de uvas em 2019 foi de 5,8 t/ha (toneladas por hectare) e a produção total de vinho de 98,3 milhões de litros. (Instituto da Vinha e do Vinho, 2021).

Desde a antiguidade, as folhas da videira têm sido utilizadas para fins medicinais devido a várias características biológicas incluindo efeitos hepatoprotectores, hipoglicémicos e vasorelaxantes, bem como propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, antivirais e particularmente antioxidantes (Fernandes *et al.*, 2013). A rica e variada composição química das folhas de *V. vinifera* parece contribuir para o seu potencial biológico. Herráez (2018) indica que é uma planta com uma enorme plasticidade morfológica, que dá origem a uma enorme variabilidade que se manifesta nas populações silvestres e na origem de muitas das variedades cultivadas. É uma planta cultivada há mais de 5000 anos, das quais, actualmente, são conhecidas cerca de 2000 cultivares. Estas distinguem-se pelas suas características morfológicas, agronómicas e enológicas.

## 1.2. Cigarrinhas verdes praga da vinha

Auchenorrhyncha é uma sub-ordem da ordem Hemiptera que inclui cigarras, cigarrinhas e cigarrinhas-de-espuma, entre outras (Olivier *et al.*, 2012). Auchenorrhyncha foi dividida em dois grupos principais, Cicadomorpha e Fulgoromorpha, sendo muitas espécies consideradas pragas importantes de culturas. Na infraordem Cicadomorpha, as cigarrinhas são cosmopolitas e uma das maiores famílias (Cicadellidae) de insectos com aproximadamente 22.000 espécies descritas (Forero, 2008).

As cigarrinhas possuem aparelhos bucais perfuradores e sugadores, que causam danos directos às plantas ao alimentarem-se nas células do mesófilo ou da seiva do xilema ou do floema e danos indirectos pela transmissão de patógenos (Olivier *et al.*, 2012). Dependem das suas plantas hospedeiras para se alimentarem, depositarem ovos e como canal de transmissão para comunicação intraespecífica (Biedermann & Niedringhaus, 2009). São paurometábolos (com os imaturos assemelhando-se aos adultos) e os machos e as fêmeas adultos produzem sons vibracionais específicos para atracção sexual, sendo que a longevidade e a abundância dependem da área geográfica, clima, espécies de plantas e tecidos em que se alimentam (Olivier *et al.*, 2012).

A maioria das pragas de Auchenorrhyncha alimenta-se de tecidos do floema. Contudo, a sub-família Cicadellinae alimenta-se de tecidos do xilema (Olivier *et al.*, 2012) e a maioria das espécies de Typhlocibynae de células do mesófilo (Biedermann & Niedringhaus, 2009). A alimentação do mesófilo é encontrada apenas nos Typhlocybinae (Nickel, 2003) e esta sub-família compreende muitas pragas importantes das vinhas na Europa.

As fêmeas põem ovos individualmente ou poucos de cada vez, geralmente inserindo-os no tecido da planta ou depositando-os na sua superfície (nervuras das folhas), sendo que os ovos podem ou não passar por diapausa, dependendo da espécie e do clima e, após a eclosão, as ninfas passam por cinco ínstares antes de atingirem a fase adulta, o que requer algumas semanas (Dietrich, 2009).

Nickel (2003) indica que no final do Verão, a maioria dos indivíduos Typhlocybinae migram para plantas perenes, onde hibernam. Como exemplo, pode-se dar o caso da cigarrinha verde, *Empoasca vitis* (Göthe, 1875), que causa problemas nas vinhas europeias e em que os adultos hibernam em árvores

perenes e arbustos, migrando depois durante o início da primavera para as vinhas (Decante & van Helden, 2006), para se alimentarem e se reproduzirem, com uma migração mais contínua ocorrendo logo após o rebentamento dos botões das videiras (Reineke & Hauck, 2012).

A maioria das espécies de Auchenorrhyncha são relativamente sedentárias, completando o seu ciclo de vida numa pequena área. Embora a maioria das espécies tenha asas bem desenvolvidas e sejam boas voadoras, poucas parecem mover-se a mais de um quilómetro do seu local de nascimento, contudo existem algumas espécies que passam por migrações anuais que podem cobrir centenas de quilómetros (Dietrich, 2009). A maioria das espécies que ocorrem na vinha cobrem distâncias curtas, migrando dos seus locais de hibernação para as cepas, com as primeiras populações aumentando na periferia dos campos (Olivier *et al.*, 2012). Adultos de muitas espécies são quase todos excelentes saltadores (Dietrich, 2009).

As cigarrinhas desempenham um papel importante como pragas em várias culturas, por alimentação directa. No que diz respeito a espécies consideradas pragas de culturas economicamente importantes, foram listadas 17 da videira em todo o mundo devido aos seus hábitos alimentares (Nickel, 2003). Causam estragos pelo esvaziamento do conteúdo das células do mesófilo ou pela acção directa dos estiletos que provocam ruptura celular. Quando a alimentação contínua e vigorosa ocorre por cigarrinhas-verdes que se alimentam do mesófilo, as folhas de videira danificadas têm capacidade fotossintética reduzida e eventualmente caem, causando uma redução no vigor da cepa e no conteúdo em açúcar do bago (Olivier *et al.*, 2012). Importante referir que os efeitos do impacto das cigarrinhas-verdes variam de acordo com a localização geográfica, as suas densidades, cultivares de videiras, práticas culturais e localização das folhas danificadas (Olivier *et al.*, 2012).

A sub-família Typhlocybae compreende muitas pragas-chave da videira, como *Jacobiasca lybica* (Bergevin & Zanon, 1922) no Mediterrâneo e *E. vitis* na Europa, que causam, em vinhas europeias, sintomas característicos chamados de *hopperburn*, danificando gravemente as plantas. Esses sintomas incluem: clorose das folhas, como amarelecimento ou avermelhamento (dependendo da variedade), começando nas margens da folha (Reineke & Hauck, 2012) e expandindo-se posteriormente em direcção ao centro (Candolfi *et al.*, 1993), como se pode observar na Figura 1.1; e também o enrolamento das folhas (Backus *et al.*, 2005). Estes sintomas são causados pela toxicidade da saliva do insecto, e também pelos estiletos, que causam feridas nas células das plantas (Backus *et al.*, 2005). O conteúdo em açúcar dos bagos pode diminuir para 8–9%, quando o normal é situar-se entre os 20–25%, mas as perdas na colheita podem ir até 100%, ou seja, totais. Fornasiero *et al.* (2016) relatam impactos semelhantes em estudos anteriores realizados por outros autores, em que também foram registados estragos económicos devido a perdas de produção e redução no teor em açúcar dos bagos.

Olivier *et al.* (2012) indicam que, na Europa, os níveis económicos de ataque (NEA) para *Empoasca* spp. são considerados mais baixos nas regiões Sul do que no Norte. Já em Portugal, o NEA para as cigarrinhas-verdes é de 50-100 ninfas/100 folhas (Primavera) e 50 ninfas/100 folhas (Verão), o que denota a maior sensibilidade do hospedeiro a estas pragas quando as temperaturas são mais elevadas (Delrio *et al.*, 2001; DRADPC, s.d.).

De acordo com Klerks & van Lenteren (1991), *J. lybica* é um pequeno insecto sugador de seiva de plantas também da família Cicadellidae. É polífago, causa muitos danos, pois perfura a epiderme inferior e as células do mesófilo são picadas e rasgadas, provocando o fenómeno, que já foi referido anteriormente, de *hopperburn*. Lentini *et al.* (2000) indicam que a actividade trófica de *J. lybica* causa coloração vermelha das folhas de cultivares de videira vermelha (tintas) e descoloração acastanhada das folhas em cultivares brancas. Em altas densidades destas cigarrinhas-verdes, as folhas podem secar parcial ou completamente. *J. lybica* é uma praga em muitas culturas importantes, como o algodão e a videira, sendo mesmo considerada por Tsolakis (2013), uma praga-chave da videira em diferentes países europeus, nomeadamente áreas do sul da Europa (Klerks & van Lenteren, 1991), mas também pode ser encontrada no norte de África.

*J. lybica* é um insecto alongado, em forma de cunha, e que tem aproximadamente 2,5 mm de comprimento. O corpo é verde-claro (pálido) com asas cintilantes semitransparentes (Figura 1.2). Os ovos são colocados preferencialmente próximo ao ponto de inserção do pecíolo da folha ou aproximadamente a meio caminho ao longo da veia média, embutidos no córtex. São esverdeados, relativamente grandes/largos, de formato cilíndrico. A ninfa emergente é inicialmente incolor e posteriormente torna-se verde-amarelada e tem uma forma achatada (Klerks & van Lenteren, 1991). Os adultos de *J. lybica*, como os de outras cigarrinhas-verdes hibernam em árvores de folha persistente e, na Primavera, mudam-se para as vinhas, onde produzem pelo menos 3-4 gerações sobrepostas (Lentini *et al*, 2000).



Figura 1.1. Sintoma característico de *hopperburn*, neste caso avermelhamento das folhas, visível em folhas da casta tinta Alicante-Bouschet, na Herdade do Esporão, Alentejo, em Outubro de 2020 (Outono), causado pela acção das cigarrinhas-verdes (original de M.T. Rebelo).

Esta espécie preocupa os viticultores sicilianos após grandes surtos registados nas vinhas do oeste da Sicília desde 2001, ainda que já estivesse presente nas vinhas da região anteriormente (Tsolakis, 2013). Os seus estragos são consideráveis, especialmente em cultivares alóctones. O mesmo autor afirma ainda que *J. lybica* é capaz de cobrir longas distâncias e espalhar a infestação rapidamente. Nos últimos anos, grandes e economicamente importantes áreas vitícolas de Espanha, Portugal e Sardenha apresentaram também surtos importantes de *J. lybica* (Rebelo & Quartau, 1993; Mazzoni *et al*, 2003).

Delrio *et al.* (2001) reportaram resultados sobre a distribuição espacial de ninfas de *J. lybica* e com base numa amostragem semanal mostraram que o insecto, no ambiente típico do Mediterrâneo no sul da Sardenha, prefere a porção de média altura dos rebentos da videira e, sobretudo, as partes mais sombreadas da copa, embora não discrimine substancialmente entre as folhas primárias e as encontradas nos rebentos secundários de videira. A distribuição dentro da vinha não difere substancialmente do observado para *E. vitis*, distribuindo-se num padrão ligeiramente agregado. Estes autores referem ainda que o conhecimento sobre a distribuição de *J. lybica* é ainda incompleto sendo usado para a monitorização destes insectos a informação conhecida sobre *E. vitis*, nomeadamente a determinação do NEA.

Em relação a Portugal, no final dos anos 80 do século passado, começou-se a observar um aumento substancial na ocorrência de cigarrinhas-verdes nas vinhas, em particular nas regiões do Ribatejo e do Alentejo (Quartau & Rebelo, 1992). A principal praga de cigarrinhas nas vinhas da região do Alentejo é *J. lybica*, sendo de notar, porém, que no Ribatejo se encontraram adicionalmente outras duas espécies,

*Empoasca decipiens* (Paoli, 1930) e *Empoasca solani* (Curtis, 1846), previamente referida como *Empoasca pteridis* (Dahlbom, 1850). Quanto à dinâmica das populações de *J. lybica* verifica-se que, segundo Quartau & Rebelo (1992) e Rebelo & Quartau (1993), é muito semelhante nas duas regiões estudadas, apesar de no Ribatejo os indivíduos surgirem normalmente com um atraso de três semanas em relação ao Alentejo, provavelmente devido às temperaturas mais baixas. O facto de se ter encontrado *E. decipiens* e *E. solani* maioritariamente no Ribatejo, onde as temperaturas são menos elevadas que no Alentejo, parece demonstrar a não tolerância destas duas espécies a temperaturas muito elevadas, o que parece já não se verificar com *J. lybica*, espécie nitidamente termófila. Finalmente é de assinalar serem as fêmeas destas espécies as primeiras a surgirem durante a Primavera na vinha, logo seguidas dos machos, pelo que, aparentemente, ambos os sexos entram em diapausa no Outono (Quartau & Rebelo, 1992).



Figura 1.2. Exemplar da cigarrinha-verde *Jacobiasca lybica*, no Outono de 2020, na Herdade do Esporão, Alentejo (original de S. Rodrigues Filho).

É importante não confundir, na videira, a sintomatologia devido a fitoplasmas com os estragos directos provocados pela picada das cigarrinhas-verdes (*E. vitis*, *E. solani*, *E. decipiens* e *J. lybica*), que não são vectores de fitoplasmoses (Pereira, 2002).

O desenvolvimento de técnicas confiáveis de amostragem e monitorização e o estabelecimento de níveis económicos de ataque são componentes essenciais dos programas de gestão integrada de pragas (Amaro, 2003). Os métodos de controlo químico continuam a ser a técnica mais comumente usada para controlar as populações de cigarrinhas-verdes, tendo como efeito colateral, as populações de inimigos naturais serem reduzidas significativamente por esses tratamentos (Klerks & van Lenteren, 1991).

### 1.3. Meios de Protecção

As medidas de protecção contra as pragas da vinha, e em particular as cigarrinhas-verdes podem ser indirectas ou directas. As indirectas são de carácter preventivo e essencialmente culturais, visando criar condições desfavoráveis para o desenvolvimento da praga e, assim, minimizar ou eliminar a sua acção negativa. Incluem o uso de cultivares resistentes ou mais tolerantes às pragas, consociação de culturas,

enrelvamento na entrelinha, eliminação de locais de hibernação da praga, entre outras (Amaro, 2003; Félix & Cavaco, 2009).

As medidas directas incluem normalmente o controlo químico e biológico. Pertot *et al.* (2017) indicam que a utilização de pesticidas é frequentemente necessária para atender aos padrões de produção vitícola. Contudo, a resistência a insecticidas e acaricidas é uma grande preocupação, embora na viticultura esse problema seja mais frequente para fungicidas, por serem os mais usados. O ressurgimento de pragas ou o aparecimento de pragas secundárias induzidas por insecticidas representaram uma preocupação elevada, pelo que estratégias de controlo biológico têm despertado o interesse de investigadores, produtores e consumidores, de forma a ser possível gerir com sucesso diversas pragas, principalmente cigarrinhas. Amaro (2003) sugere o desenvolvimento de técnicas confiáveis de amostragem e de monitorização e o estabelecimento de níveis económicos de ataque como componentes essenciais dos programas de gestão integrada de pragas de cigarrinhas-verdes e a implementação de luta biológica.

Contudo, os inimigos naturais conhecidos das cigarrinhas-verdes são poucos, sendo os himenópteros parasitóides pertencentes à família Mymaridae e ao género *Anagrus*, os mais referidos (Mosna, 2005). Medidas de protecção alternativas têm sido estudadas, nomeadamente a utilização de semioquímicos, que constitui um meio de luta biotécnica.

### **1.3.1. Semioquímicos**

O uso de semioquímicos, como referem Pertot *et al.* (2017), pode oferecer alternativas interessantes e sustentáveis aos pesticidas químicos sintéticos, em certos contextos.

Os semioquímicos, são substâncias ou misturas químicas que medeiam as interações entre os organismos, podendo ser voláteis ou não voláteis que operam em longo ou curto alcance, para modificar o comportamento do destinatário (Mauchline *et al.*, 2018; Tamiru & Khan, 2017). Podem dividir-se em feromonas, que medeiam a comunicação intraespecífica e aleloquímicos, que medeiam interações interespecíficas. Os semioquímicos voláteis são percebidos pelo olfacto, enquanto os não voláteis são detectados por quimiorrecepção de contacto (Tamiru & Khan, 2017). Semioquímicos derivados de plantas ou de insectos podem ser usados para controlo de pragas, nomeadamente atractivos/estimulantes ou repelentes/dissuasores (Mauchline *et al.*, 2018). A maioria dos semioquímicos de insectos que foram adoptados comercialmente e incluídos em programas de gestão integrada de pragas são feromonas sexuais, usadas nomeadamente para a confusão sexual. As feromonas também têm sido usadas para controlar cigarrinhas, no entanto, algumas apresentam certas limitações, como falta de aplicação significativa, persistência e estabilidade nos campos (Chen *et al.*, 2019).

#### **1.3.1.1. Compostos orgânicos voláteis**

Existe a perspectiva de melhorar a resistência directa e indirecta das culturas contra pragas de insectos economicamente importantes, explorando semioquímicos voláteis derivados de plantas, nos últimos anos, pois possuem um modo de acção não tóxico, modificando o comportamento da praga ou dos seus inimigos naturais em detrimento da praga da cultura, sendo também não persistentes, específicos da espécie, económicos e ambientalmente seguros (Tamiru & Khan, 2017).

As plantas têm vias biossintéticas complexas que conduzem à libertação de compostos orgânicos voláteis, alguns dos quais especificamente libertados após danos causados por herbívoros, e os insectos evoluíram para usar esses voláteis como pistas semioquímicas na localização de plantas hospedeiras para se alimentarem (Cai *et al.*, 2015a). Os compostos orgânicos voláteis (VOCs, do inglês *volatile organic compounds*) são emitidos por quase todos os órgãos das plantas, incluindo folhas, flores e raízes, (Weingart *et al.*, 2012), sendo componentes essenciais do repertório de defesa da planta, podendo actuar como repelentes de insectos herbívoros ou como atractivos para os seus inimigos e, como sinais de

defesa transportados pelo ar, podem preparar respostas de defesa contra patógenos em plantas distantes (Chalal *et al.*, 2015).

Tamiru & Khan (2017) referem que os semioquímicos voláteis de plantas são classes de metabolitos secundários, sendo que os VOCs constituem aproximadamente 1% dos metabolitos secundários das plantas e geralmente são moléculas lipofílicas que se podem difundir livremente para o ambiente e passar membranas biológicas, graças ao seu baixo peso molecular e alta pressão de vapor. Os mesmos autores acrescentam que as plantas estão constantemente expostas a factores de stress ambientais e desenvolveram formas complexas de se defenderem de patógenos, artrópodes fitófagos e plantas parasitas, produzindo uma grande variedade de VOCs, que desempenham um papel crucial na interacção das plantas com outros organismos e na regulação das respostas das plantas contra o stress biótico (Lazazzara *et al.*, 2018). Metabolitos voláteis presentes nas folhas das plantas foram descritos como directamente associados com stress biótico ou abiótico das plantas e por apresentarem variações sazonais importantes (Fernandes *et al.*, 2015). O aumento da emissão de voláteis de folhas verdes (GLVs, do inglês *green leaf volatiles*), como por exemplo o hexanol, é um sinal de stress nas plantas (Weingart *et al.*, 2012).

As plantas desenvolveram maneiras altamente sofisticadas de se defenderem de insectos fitófagos, por exemplo, quando atacadas por eles, respondem emitindo voláteis de defesa, referidos como voláteis de plantas induzidos por herbívoros (HIPVs, do inglês *herbivore-induced plant volatiles*) como um "grito" por ajuda. Esses sinais podem desempenhar um papel importante na resistência da planta hospedeira aos danos de pragas de insectos em virtude de atraírem inimigos naturais dos fitófagos ou repelirem o ataque de fitófagos, agindo como dissuasores de alimentação ou oviposição para pragas de insectos. As plantas intactas geralmente libertam pequenas quantidades de compostos voláteis, contudo, os perfis de voláteis mudam dramaticamente, tanto em quantidades quanto em proporções, após danos da alimentação ou da oviposição por fitófagos (Tamiru & Khan, 2017; Bian *et al.*, 2018).

O uso de voláteis de plantas para localização de hospedeiros pelos insectos depende muito da sua excelente capacidade de processarem sinais olfactivos, pois embora uma amostra volátil de planta possa conter mais de 200 compostos, o número de componentes essenciais usados para o reconhecimento do hospedeiro por um insecto está geralmente na faixa de 3 a 10 compostos (Bruce & Pickett, 2011).

O sistema olfactivo dos insectos tem uma capacidade notável de discriminar os voláteis da planta hospedeira dos voláteis de plantas não-hospedeiras (NHVs, do inglês *non-host volatiles*) num ambiente que é "ruidoso" devido a odores mistos ou conflituosos (Zhang *et al.*, 2014).

La Grange *et al.* (2017) indicam que nem todos os insectos são igualmente dependentes de pistas olfativas para localização do hospedeiro, uma vez que alguns mostram respostas relativamente fracas aos voláteis das plantas e contam mais com pistas visuais ou com uma combinação de ambas. Cigarrinhas e outros membros da subordem Auchenorrhyncha são considerados menos responsivos a produtos químicos voláteis para encontrarem hospedeiros, pois embora possam apresentar respostas, são consideradas amplamente complementares às pistas visuais, gustativas e acústicas e não constituem o modo primário de localização da planta hospedeira Coll Aráoz *et al.* (2019). No entanto, os mesmos autores, referem que o papel do olfacto em Auchenorrhyncha ainda não foi totalmente esclarecido, uma vez que se sabe que algumas cigarrinhas respondem a sinais olfactivos na ausência de estímulos visuais e que, na maioria das espécies de cigarrinhas, o efeito primário do odor do hospedeiro parece apenas melhorar a capacidade de resposta às pistas visuais.

Alguns estudos revelaram que as respostas comportamentais mais fortes dos insectos são obtidas com misturas de voláteis do que com compostos individuais, podendo-se dizer que, em termos de qualidade do odor, o todo é mais do que a soma das partes (Bruce & Pickett, 2011). As proporções e os odorantes chave numa determinada mistura podem ser críticos para o reconhecimento da planta hospedeira (Riolo *et al.*, 2017).

O *intercropping*, método de luta cultural de base ecológica muito usado em sistemas de agricultura

biológica que usa duas a três culturas diferentes no mesmo terreno simultaneamente, pode oferecer vantagens em termos de controlo de pragas. As plantas utilizadas podem mascarar pistas olfactivas e visuais usadas por herbívoros para encontrarem o seu hospedeiro ou confundir ou repelir os insectos (Zhang *et al*, 2014). Um dos sistemas mais conhecidos do *intercropping* é a estratégia *push-pull* que combina semioquímicos atractivos e repelentes para manipular pragas e populações de auxiliares (Mauchline *et al*, 2018). Esta estratégia de estímulo-dissuasão é desenvolvida explorando semioquímicos voláteis de plantas para repelir pragas de insectos da cultura principal (*push*) e atraí-los para as culturas armadilha (*pull*), fornecendo um excelente exemplo de estratégias de protecção de cultivo inovadoras e ecologicamente amigas do ambiente (Tamiru & Khan, 2017). Segundo Mauchline *et al.* (2018), as pragas são impedidas de colonizar ou são "empurradas" (*pushed*) para fora da cultura usando, por exemplo, cultivares de culturas repelentes, repelentes voláteis de plantas não hospedeiras, ou feromonas de dissuasão de oviposição. As pragas são simultaneamente "puxadas" (*pulled*) para longe da cultura ou para dentro de culturas armadilha adjacentes, usando atractivos como os voláteis da planta hospedeira ou feromonas sexuais. Uma cultura armadilha, de acordo com os mesmos autores, compreende plantas que são mais atraentes para o insecto praga do que a cultura, explorando as preferências da praga pela planta hospedeira. Uma vez que as pragas estejam concentradas na cultura armadilha, ela pode ser tratada se necessário com um insecticida sintético, e assim a área tratada é reduzida em comparação com os sistemas convencionais onde toda a área da cultura é tratada. Nesta estratégia, os efeitos combinados de semioquímicos voláteis de armadilhas atractivas e plantas repelentes na entrelinha ou adjacentes à cultura resultam numa redução significativa dos danos da praga nas culturas, levando a grandes melhorias nos ganhos de produtividade/rendimento da cultura (Tamiru & Khan, 2017).

Com o sistema *push-pull*, os insectos-praga são repelidos ou dissuadidos das plantações ou colheitas usando estímulos *push* modificadores de comportamento, como por exemplo NHVs repelentes (Zhang & Chen, 2015). Estudos mostraram que a utilização deste método na cultura do chá pode desviar as pragas, nomeadamente *E. vitis* e aumentar a diversidade e abundância de inimigos naturais (Zhang *et al*, 2014).

A planta do chá, *Camellia sinensis* (L.) Kuntze é uma importante cultura económica originária da China (Mu *et al*, 2012), sendo comprometida durante o seu processo de desenvolvimento pelo ataque de várias pragas, tais como as cigarrinhas-verdes, *Empoasca onukii* Matsuda (Chen *et al.*, 2019), *Empoasca flavescens* F. (Han *et al*, 2020) e *E. vitis* (Mu *et al*, 2012), esta última uma das pragas mais sérias do chazeiro (Cai *et al*, 2015b). Adultos e ninfas alimentam-se dos rebentos da planta usando os estiletos para perfurar e sugar a seiva (Zhang *et al*, 2014; Chen *et al*, 2019) causando sintomas característicos de *hopperburn* (Cai *et al*, 2015b).

As infestações de *E. vitis* reduzem a produção de chá e podem causar perdas económicas até 33% quando o estrago é severo (Cai *et al*, 2015b). As aplicações de insecticidas tornaram-se cada vez menos eficazes no controlo desta praga (Mu *et al.*, 2012), devido ao aparecimento de resistência e ao impacto nos artrópodes benéficos (Cai *et al*, 2015b). Assim, estratégias ou métodos alternativos de controlo passaram a ser necessários e a aplicação de semioquímicos começou a ser implementada nos últimos anos (Xin *et al*, 2017; Xu *et al*, 2017; Chen *et al*, 2019).

Por exemplo, Han *et al.* (2020) testaram dois compostos repelentes para as cigarrinhas (sendo um deles o timol) de ramos e folhas de lavanda (*Lavandula angustifolia* L.), e uma mistura dos componentes voláteis principais [hexadecano, acetato de (Z)-3-hexenilo, (Z)-3-hexen-1-ol e nonanal] de *Flemingia macrophylla* (Willd.) Merr., 1910, relatada como uma boa espécie armadilha nas plantações *intercropping* de chá, sendo capaz de atrair as cigarrinhas para longe das plantas de chá na estratégia *push-pull*. Segundo estes autores, se o timol fosse colocado dentro das linhas de chazeiros, de forma a manter as cigarrinhas afastadas, então poder-se-ia aumentar drasticamente as capturas destas nas placas adesivas que possuem iscos com atractivos (mistura de voláteis de *F. macrophylla*), que seriam

pendurados logo acima dos rebentos de chá. Assim, explorar a estratégia *push-pull* baseada em repelentes e atractivos botânicos para combater as cigarrinhas revelou ser promissora e eficaz.

O odor de fundo (em inglês *background noise*) pode afectar significativamente a localização olfactiva do insecto (Xu *et al.*, 2017), pelo que o uso de compostos voláteis da própria planta do chá para capturar *E. vitis* na plantação requer que as quantidades aplicadas sejam suficientemente elevadas para evitar serem mascaradas pelo odor de fundo, o que levou Cai *et al.* (2015b) a suspeitarem que não são os melhores iscos de armadilha para *E. vitis* em campos de chá. Ao investigarem a atractividade de vários voláteis de rebentos de plantas de chá e de videira verificaram que compartilhavam compostos comumente usados para o reconhecimento do hospedeiro por muitos herbívoros, e alguns deles poderiam ser usados por *E. vitis*. Os odores de videira revelaram-se altamente atractivos para adultos desta espécie em comparação com os odores de rebentos de chá, não sendo facilmente mascarados pelo odor de fundo da plantação. Estes autores observaram também que a captura aumentou muito quando os iscos olfactivos foram combinados com armadilhas visuais, como cartões amarelos, podendo potencialmente produzir um sistema de captura mais eficaz para *E. vitis* em plantações de chá. Noutro caso, Xu *et al.* (2017) formularam um atractivo sintético [(Z)-3-hexenol e acetato de (Z)-3-hexenilo (GLVs), ocimeno e limoneno (terpenos)] para adultos de *E. onukii* e os ensaios no campo mostraram que esta mistura só era significativamente atractiva para as cigarrinhas do chá no Outono, e não no Verão, demonstrando que o odor de fundo da plantação pode perturbar a atractividade de compostos baseados em voláteis da própria planta.

Mu *et al.* (2012) num estudo com *E. vitis* realizado em campos de chá de produção biológica em Zhejiang (China), procuraram determinar a atractividade de uma mistura de compostos de rebentos de chá, que consistia nos seguintes 8 compostos, na mesma proporção: (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexen-1-ol, acetato de (Z)-3-hexenilo, 2-penten-1-ol, (E)-2-pentenal, pentanol, hexanol e 1-penten-3-ol. Em comparação com outros compostos testados, esta mistura induziu a resposta mais forte, resultando em maiores reduções da população de cigarrinhas-verdes, apresentando assim uma atracção significativa para estas.

Os voláteis, as cores das plantas, formas, tamanhos e outros factores visuais têm-se mostrado atractivos para muitos insectos herbívoros, incluindo as cigarrinhas-verdes, constituindo pistas críticas na busca por plantas hospedeiras. Assim, combinações adequadas de semioquímicos com pistas visuais coloridas podem fornecer sinergias para o melhor desempenho das armadilhas.

### 1.3.1.2. Óleos essenciais

Figueiredo *et al.* (2017) referem que um óleo essencial é uma mistura de compostos, com volatilidade distinta, extraídos de uma qualquer parte de uma planta, por um processo específico. Podem ser utilizadas diferentes metodologias para extrair a mistura de compostos voláteis existente nas plantas, no entanto, apenas os produtos obtidos por duas dessas metodologias, a destilação e a expressão (esta última apenas utilizada para frutos de espécies de *Citrus*), podem ser designados de óleos essenciais. Os voláteis das plantas correspondem a uma mistura complexa de compostos que têm a propriedade de se volatilizarem naturalmente, em condições de temperatura e humidade ambiente apropriadas, ou incluem uma mistura, igualmente complexa, de compostos que se extraem das plantas por diferentes metodologias, a nível caseiro, laboratorial ou industrial, sendo que a obtenção de um óleo essencial cabe neste último grupo. De acordo com a Farmacopeia Europeia (Council of Europe 2010), designa-se por óleo essencial, o produto obtido por destilação de uma planta, ou das suas partes e, dependendo se à escala laboratorial ou industrial, podem utilizar-se diversos tipos de destilação: hidrodestilação, destilação em água, com arrastamento de vapor e destilação com arrastamento de vapor, utilizando-se mais raramente a destilação a seco; ou por processo mecânico, designado expressão, que consiste na prensagem, ou picotagem do epicarpo de frutos de espécies de *Citrus* (por exemplo, laranjeira), e seu

arrastamento pela água. A designação de óleo essencial reserva-se assim ao produto obtido por destilação ou expressão. Existem espécies em que o teor dos principais constituintes do óleo essencial mostra acentuada variabilidade sazonal, mas também há outras em que este se mantém praticamente constante (Figueiredo *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais das plantas são uma fonte importante de NHVs repelentes (Zhang & Chen, 2015). Segundo Zhang *et al.* (2014), os óleos essenciais extraídos de várias plantas aromáticas podem exercer efeitos repelentes, anti-alimentação, tóxicos e dissuasores em insectos herbívoros e são uma fonte importante de semioquímicos repelentes como os componentes do *push* da estratégia *push-pull* para o controlo de pragas. A utilização de plantas aromáticas na entre-linha/proximidade das culturas também é uma técnica eficaz para manipular a distribuição e abundância de insectos herbívoros, por apresentarem baixa persistência ambiental e toxicidade para mamíferos, sendo que muitos óleos essenciais destas aromáticas repelem uma grande variedade de pragas agrícolas (Zhang & Chen, 2015).

Zhang & Chen (2015), mostraram a possibilidade de utilização de óleos essenciais de alecrim (repelente) numa estratégia *push-pull* em combinação com um atractivo de *E. vitis* [acetato de (Z)-3-hexenilo], para o controlo desta praga, numa plantação de chá, em Zhejiang (China). Os autores verificaram que o óleo essencial de alecrim mascarou o odor do atractivo revelando-se assim um repelente promissor com potencial utilização num programa de gestão de *E. vitis* em plantações de chá na China. Os principais VOCs do óleo de alecrim são três terpenóides [ $\alpha$ -pineno, 1,8-cineole e cânfora], já conhecidos pela actividade anti-alimentação, repelente e até tóxica contra insectos herbívoros.

#### **1.4. Objectivos**

Esta dissertação tem como principal objectivo avaliar as diferenças dos perfis de voláteis de castas de videira com elevada ou reduzida susceptibilidade ao ataque de cigarrinhas-verdes (respectivamente Alicante-Bouschet e Antão Vaz) e sugerir estratégias de gestão destas espécies pragas da vinha baseadas na utilização de semioquímicos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental incidiu especificamente sobre duas castas de vinha (*Vitis vinifera* L.), Alicante-Bouschet e Antão Vaz (Figuras 2.1 e 2.2), respectivamente mais e menos susceptíveis espécies de cigarrinhas-verdes. O trabalho de campo decorreu no Outono de 2020 e na Primavera de 2021, nas vinhas da Herdade do Esporão, em Reguengos de Monsaraz, distrito de Évora, na região do Alentejo (Latitude: 38°22'48.1"N e Longitude: 7°33'38.4"W) e nos laboratórios da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, em Lisboa.

### 2.1. Material vegetal

Foram colhidas folhas de videira das castas Alicante-Bouschet (casta tinta) e Antão Vaz (casta branca), em dois momentos temporais de análise: no Outono de 2020 (Outubro e Novembro) e na Primavera de 2021 (Maio), nas vinhas da Herdade do Esporão.

No momento em que as folhas foram colhidas no Outono, a vinha encontrava-se na fase vegetativa e algumas folhas picadas pelas cigarrinhas-verdes, apresentando já alguns sintomas de *hopperburn*, sendo mais visíveis na casta Alicante-Bouschet do que em Antão Vaz. Na Primavera, as folhas foram colhidas quando o estado fenológico da vinha era de plena floração, com os bagos jovens em crescimento, um estado fenológico totalmente diferente daquele que foi encontrado aquando da colheita de folhas realizada no Outono. Referir também que ao contrário das folhas colhidas no Outono, as folhas colhidas na Primavera eram sãs, sem qualquer ataque de cigarrinhas-verdes.

As folhas foram: a) acondicionadas, em sacos de papel, transportadas para os laboratórios da FCUL, e armazenadas a -20°C, até isolamento dos óleos essenciais, ou b) colocadas dentro de dois exsiccadores tapados, para posterior extração dos voláteis por microextração em fase sólida (SPME do inglês *Solid phase microextraction*).

### 2.2. Extração da componente volátil das folhas de *Vitis vinifera*

Foram realizados ensaios preliminares para avaliar a quantidade mínima necessária de material vegetal para o isolamento dos voláteis. O isolamento dos voláteis foi realizado com recurso a dois métodos distintos: SPME, à temperatura ambiente e por hidrodestilação.

#### 2.2.1. Microextração em fase sólida (SPME)

Para extração dos componentes voláteis das folhas das duas castas de videira, por microextração em fase sólida (SPME), utilizaram-se fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espessura de filme (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), colocadas manualmente num suporte SPME próprio (*holder* Supelco, Bellefonte, PA, EUA). As fibras foram condicionadas a 250°C até ao máximo de 20 min, antes de cada utilização. Foram realizadas análises periódicas aos exsiccadores vazios e às fibras para verificar ausência de compostos voláteis antes de serem utilizadas.

Para a extração dos voláteis, ainda na Herdade do Esporão, as folhas colhidas das duas castas de videira foram colocadas em dois exsiccadores tapados, Figura 2.3 (um para folhas de cada casta). Nas análises de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), o tempo de saturação do exsiccador com os voláteis das folhas (homogeneização da atmosfera no interior do exsiccador) foi de 4 h:30 min (3 h:30 min + 1 h de exposição à fibra). Nas análises de Cromatografia Gasosa (GC do inglês *Gas Chromatography*), o tempo de saturação do exsiccador com os voláteis das folhas foi de 5 h:30 min (4 h:30 min + 1 h de exposição à fibra). Isto explica-se pelo facto das análises de GC-MS terem sido realizadas primeiro que as análises de GC. Já no laboratório da FCUL, as fibras foram inseridas na rosca da tampa dos exsiccadores,

protegidas com septo de politetrafluoretileno (PTFE), durante 1 h, à temperatura ambiente (Figura 2.4).

Foram utilizadas duas fibras de SPME por cada exsicador, com uma sendo utilizada, posteriormente à recolha dos voláteis, para a análise quantitativa dos voláteis por GC, e outra, para a análise da composição química (identificação química) de cada amostra por GC-MS.



Figura 2.1. Aspecto das videiras da casta Alicante-Bouschet, no Outono de 2020, na Herdade do Esporão, Alentejo (original de M.T. Rebelo).



Figura 2.2. Aspecto das videiras da casta Antão Vaz, no Outono de 2020, na Herdade do Esporão, Alentejo (original de M.T. Rebelo).



Figura 2.3. Folhas da casta Alicante-Bouschet (à esquerda) e da casta Antão Vaz (à direita) dentro de um exsiccador tapado, no Outono de 2020, na Herdade do Esporão, Alentejo, para posterior extracção dos voláteis por SPME (originais de M.T. Rebelo).



Figura 2.4. Procedimento para recolha de voláteis de folhas de videira da casta Antão Vaz (à esquerda) e da casta Alicante-Bouschet (à direita), através do método de SPME, em que as folhas são colocadas em exsiccadores tapados, por aproximadamente 4 h, para homogeneização da atmosfera no interior do exsiccador. Ao fim desse tempo, a fibra de SPME é inserida no septo, para recolha de voláteis, durante 1 h (original do autor).

### 2.2.2. Hidrodestilação

Previamente à hidrodestilação, foi determinado o peso fresco, em gramas (g), de todo o material vegetal colhido, numa balança KERN 470-36 (Gottl. Kern & Sohn GmbH, D-72458 Albstadt, Alemanha).

Após a extracção de voláteis por SPME, as folhas de cada uma das castas de videira foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até ao isolamento dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais foram isolados por hidrodestilação, durante 3 h, num aparelho do tipo Clevenger, de acordo com a Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 2010), com uma velocidade de destilação de 3 ml/min (Figura 2.5). Os voláteis foram recuperados com o *n*-pentano destilado para um *vial*. Posteriormente os voláteis foram concentrados a um volume mínimo num concentrador de bancada, sob fluxo de azoto. O extracto obtido foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise por GC e por GC-MS.



Figura 2.5. Procedimento para recolha de voláteis de folhas de videira, colhidas no Outono de 2020, da casta Antão Vaz (à esquerda) e da casta Alicante-Bouschet (à direita), com recurso a isolamento de óleo essencial, por hidrodestilação, durante 3 h, num aparelho do tipo Clevenger (original do autor).

### 2.3. Análise da componente volátil das folhas de *Vitis vinifera*

Os voláteis obtidos por ambos os métodos de extracção (SPME e hidrodestilação), foram analisados por Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama (GC do inglês *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*) para quantificação dos componentes, e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) para sua identificação.

### **2.3.1. Microextração em fase sólida (SPME)**

#### **2.3.1.1. Cromatografia Gasosa (GC)**

As análises de GC dos voláteis obtidos pelo método SPME foram realizadas, imediatamente após a recolha dos voláteis, expondo a fibra de SPME no injector de um cromatógrafo PerkinElmer AutoSystem XL equipado com dois Detectores de Ionização de Chama (FIDs do inglês *Flame Ionization Detectors*), e um sistema de tratamento de dados. O injector foi mantido a 250°C sem repartição de fluxo durante 1 min, para total dessorção dos voláteis da fibra SPME. A total dessorção dos voláteis foi confirmada efectuando uma segunda injeção, nas mesmas condições operativas, revelando ausência de picos.

No injector do cromatógrafo, estão instaladas duas colunas de polaridade diferente: uma coluna de sílica fundida DB-1 (100% dimetilpolisiloxano, 30 m × 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc., Folsom, CA, EUA) e uma coluna de sílica fundida DB-17HT [(50% fenil)-metilpolisiloxano, 30 m × 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,15 µm; J & W Scientific Inc.]. A temperatura do forno foi programada de 45 a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até atingir os 300°C. Atingidos os 300°C, a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min, para um tempo total de corrida de 61 min. As temperaturas do injector e do detector foram 250°C e 300°C, respectivamente. O gás de arrastamento foi o hidrogénio (H<sub>2</sub>), ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s. A composição percentual dos voláteis foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção. Os valores apresentados das análises de GC correspondem ao valor médio do número de injeções por amostragem.

#### **2.3.1.2. Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC-MS)**

As análises de GC-MS foram realizadas imediatamente após a recolha dos voláteis por SPME. A fibra SPME foi exposta no injector de um cromatógrafo a gás PerkinElmer Clarus 600, equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (100% dimetilpolisiloxano, 30 m × 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.), ligado a um espectrómetro de massa PerkinElmer Clarus 600T (versão de software 5.4.2.1617, PerkinElmer, Shelton, CT, EUA). A temperatura do injector foi de 250°C e a do forno foi programada de 45 a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C, a temperatura foi mantida isotérmica por 10 min, para um tempo total de corrida de 61 min. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C, enquanto a temperatura da câmara de ionização foi de 220°C. O gás de arrastamento foi o hélio (He), ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s; a dessorção do analito foi alcançada sem repartição de fluxo por 1 min; energia de ionização, 70 eV; corrente de ionização, 60 µA; gama de massas, 40–300 u; tempo de varrimento, 1 s. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção (IR), em relação aos dos *n*-alcanos e espectros de massa, com os de padrões sintetizados no laboratório, padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos essenciais existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa também desenvolvida no laboratório.

### **2.3.2. Hidrodestilação**

#### **2.3.2.1. Cromatografia Gasosa (GC)**

As análises de GC dos voláteis obtidos por hidrodestilação foram efectuadas tal como acima descrito para a SPME, excepto no que diz respeito à temperatura do injector, 280°C, e a relação de repartição de fluxo, 1:40.

### **2.3.2.2. Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC-MS)**

Nas análises por GC-MS dos voláteis obtidos por hidrodestilação utilizou-se o mesmo equipamento, e as mesmas condições operativas detalhadas acima para a SPME, excepto no que diz respeito à temperatura do injector, 280°C, e a relação de repartição de fluxo, 1:40.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Compostos voláteis das folhas das duas castas de videira

Os voláteis e os óleos essenciais isolados, por SPME e hidrodestilação, das folhas das duas castas de videira, Alicante-Bouschet (AB) e Antão Vaz (AV), exibiram misturas complexas em que um número variável de compostos foi detectado e identificado. Os compostos identificados, estão listados na Tabela 3.1, de acordo com a sua ordem de eluição numa coluna DB-1.

No total, foram detectados 103 componentes voláteis, sendo possível identificar 88%, 91 componentes (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Composição percentual dos componentes identificados nos voláteis extraídos, por isolamento de óleo essencial e por SPME, das folhas das duas castas de videira analisadas.

Componentes	IR	<i>Vitis vinifera</i>					
		AB_2020	AB_2021	AB_2020	AV_2020	AV_2021	AV_2020
		HD	HD	SPME	HD	HD	SPME
<i>n</i> -Hexanal	739		1,5			1,8	
2- <i>trans</i> -Hexenal	866	21,1	8,4		30,6	6,2	
<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	868	8,4	1,2		11,1	0,7	
<i>cis</i> -2-Hexen-1-ol	882	4,1	v		6,2	v	
<i>n</i> -Hexanol	883	2,3	0,4		3,3	0,4	
<i>n</i> -Heptanal	897	0,2	0,5			v	
2- <i>trans</i> ,4- <i>trans</i> -Hexadienal	897	0,2					
Benzaldeído	927	v					
6-Metil-5-hepten-2-ona	960	0,2					
2-Pentil furano	973	v	v			0,1	
2,4-Heptadienal	975	v					
$\delta$ -2-Careno	983		2,0			1,1	
Benzeno acetaldeído (= Fenilacetaldeído)	1002	v					
<i>p</i> -Cimeno	1003	0,1	v			v	
2,6,6-Trimetil ciclohexanona	1003	0,2	v			v	
2-Etil-1-hexanol	1004				0,5		
1,8-Cineole	1005	0,5			0,5		
Limoneno	1009	0,2	0,5		v	0,4	
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	1017		0,4			0,4	
2,2-Dimetil-5-(1-metilpropen-1-il) tetrahydrofurano	1026		v			v	
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1027		0,9			0,8	
$\gamma$ -Terpineno	1035		v			v	
<i>n</i> -Octanol	1045	0,3	0,3			0,2	
2,5-Dimetil estireno	1059	0,3					
Terpinoleno	1064	0,4	0,5		0,6	0,4	
<i>n</i> -Nonanal	1073	1,2	1,9		0,6	0,4	
Linalol	1074	1,3	31,4			37,2	
Hotrienol	1074	1,3					
Mircenol	1097		0,5			v	
Cânfora	1102	v					
Cosmeno*	1102	v					
Mentona	1120	v					
3-Metil-1H-indeno	1123		v			v	
2- <i>trans</i> -Nonen-1-al	1124	v					
Óxido de nerol	1127	0,1	v			0,4	
Óxido de <i>cis</i> -linalol (piranóide)	1132	v					
Naftaleno	1139		v			v	
<i>n</i> -Nonanol	1148	0,1	v			v	
Salicilato de metilo	1159	3,9					
$\alpha$ -Terpineol	1159	1,0	2,8		0,7	3,1	

Componentes	IR	<i>Vitis vinifera</i>					
		AB_2020	AB_2021	AB_2020	AV_2020	AV_2021	AV_2020
		HD	HD	SPME	HD	HD	SPME
Safranal	1160	1,0			v		
<i>n</i> -Decanal	1180	0,3	1,3		1,8	1,4	
Citronelol	1207		0,5			1,3	
Geraniol	1236	0,5	12,3		0,9	9,0	
2- <i>trans</i> -Decenal	1236	0,5			0,9		
Edulan II	1265	9,8	2,2		2,2	3,4	
4-Vinil guaiacol	1285	v			v		
<i>cis</i> -Teaspirano	1286	v					
2- <i>trans</i> ,4- <i>trans</i> -Decadienal	1288	0,5					
<i>trans</i> -Teaspirano	1300	0,1					
<i>n</i> -Tridecano C13	1300	0,1	v			v	
Eugenol	1327	1,1					
1,2-Dihidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	1328	1,1	1,8		2,6	2,6	
$\alpha$ -Ioneno (= 1,1,6-Trimetiltetralina)	1330	v	v		0,1	v	
$\delta$ -Elemeno	1332			3,0			
<i>trans</i> -2-Undecenal	1334	0,5	0,4		0,1	0,5	
$\alpha$ -Ilangeno	1371	0,2		9,5	0,6		21,8
$\beta$ -Bourboneno	1379	0,4	0,1	13,8	0,2	v	12,9
<i>n</i> -Dodecanal	1397	0,4	v		1,3	0,2	
$\beta$ -Cariofileno	1414	0,6	v	13,4	0,6	v	16,7
$\beta$ -Copaeno	1426			3,6			v
Geranil acetona	1434	0,9	0,1		1,8	v	
Guaia-6,9-dieno	1441			3,4			v
<i>trans</i> - $\beta$ -Ionona	1456		0,4			0,5	
Germacreno D	1474	0,2		21,9	1,8		23,3
<i>cis,trans</i> - $\alpha$ -Farneseno	1484		0,3			v	
Tridecanal	1499		v			v	
<i>trans,trans</i> - $\alpha$ -Farneseno	1500		0,4			v	
$\gamma$ -Cadineno	1500	0,2	v	6,9	1,5	v	10,8
$\delta$ -Cadineno	1505	0,5					
3- <i>cis</i> -Hexenil benzoato	1540		v			v	
<i>trans</i> -Nerolidol	1549		0,3			1,0	
<i>n</i> -Tetradecanal	1596	0,8	1,4			v	
<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	1616	0,7					
$\alpha$ -Cadinol	1626	1,1					
<i>n</i> -Pentadecanal	1688	v					
<i>trans,trans</i> -Farnesol	1693	v					
Ácido mirístico	1723		v			v	
Salicilato de octilo	1743		0,1			0,4	
Fitol	1894		0,4			0,7	
Ácido palmítico (Ácido hexadecanóico)	1908	7,6	2,9		7,9	4,7	
Acetato de fitol	2101	2,0	4,3		3,3	5,6	
Ácido linoleico	2108	5,4	2,9		3,8	4,0	
Eicosanal	2200		v			v	
<i>n</i> -Tricosano C23	2300	v	0,1		0,6	v	
<i>n</i> -Tetracosano C24	2400	v			v		
<i>n</i> -Docosanal	2426		0,6		v	v	
<i>n</i> -Pentacosano C25	2500	0,2	0,5		0,8	v	
<i>n</i> -Hexacosano C26	2600	v			0,1		
<i>n</i> -Heptacosano C27	2700	0,4	0,4		0,8	v	
<i>n</i> -Nonacosano C29	2900	0,3			v		
<b>% de identificação</b>		<b>84,8</b>	<b>86,9</b>	<b>75,5</b>	<b>87,8</b>	<b>88,9</b>	<b>85,5</b>

**Componentes agrupados**

Componentes	<i>Vitis vinifera</i>						
	IR	AB_2020	AB_2021	AB_2020	AV_2020	AV_2021	AV_2020
		HD	HD	SPME	HD	HD	SPME
<b>Ácidos gordos e derivados</b>							
Voláteis das folhas verdes (GLV)		35,9	11,5		51,2	9,1	
Ácidos gordos		13,0	5,8		11,7	8,7	
Alcanos		1,0	1,0		2,3	v	
Outros derivados de ácidos gordos		5,2	6,4		5,2	2,8	
<b>Terpenos e derivados</b>							
Hidrocarbonetos monoterpénicos		1,0	4,3		0,6	3,1	
Monoterpenos oxigenados		5,6	47,6		3,9	51,0	
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos		2,1	0,8	75,5	4,7	v	85,5
Sesquiterpenos oxigenados		1,8	0,3			1,0	
Diterpenos oxigenados		2,0	4,7		3,3	6,3	
Apocarotenóides		12,2	4,4		4,9	6,5	
<b>Derivados de aminoácidos e Fenilpropanóides</b>							
Fenilpropenos		1,1					
Derivados de ácidos benzóicos		3,9	0,1		v	0,4	
Derivados de aminoácidos aromáticos		v					
<b>Outros</b>							
			v			v	

IR: Índice de Retenção relativo a uma série de n-alcanos. v: vestigial (<0,05%). AB: Alicante-Bouschet. AV: Antão Vaz. HD: Hidrodestilação. SPME: Microextração em fase sólida.

Os componentes voláteis foram agrupados em 14 grupos, em função da sua via biossintética: Voláteis das folhas verdes (GLV), Ácidos gordos, Alcanos, Outros derivados de ácidos gordos (Ácidos gordos e derivados), Hidrocarbonetos monoterpénicos, Monoterpenos oxigenados, Hidrocarbonetos sesquiterpénicos, Sesquiterpenos oxigenados, Diterpenos oxigenados, Apocarotenóides (Terpenos e derivados), Fenilpropenos, Derivados de ácidos benzóicos, Derivados de aminoácidos aromáticos (Derivados de aminoácidos e Fenilpropanóides) e Outros. Componentes não identificados foram classificados como “Não Identificados” (Tabela 3.1).

### 3.1.1. Voláteis obtidos por SPME

Os voláteis obtidos pelo método de SPME foram extraídos de folhas das duas castas de *V. vinifera* colhidas apenas no Outono, numa fase em que as duas castas de videira se encontravam na fase vegetativa e apresentavam sintomas de *hopperburn*. Nas amostras de Alicante-Bouschet foram detectados 8 componentes voláteis e nas amostras de Antão Vaz foram detectados 7 componentes, sendo que todos foram possíveis de identificar nos dois casos. A percentagem de identificação no caso de Alicante-Bouschet foi de 76%, enquanto a de Antão Vaz foi de 86% (Tabela 3.1).

Os componentes identificados nas diferentes amostras de voláteis extraídos por SPME (Alicante-Bouschet e Antão Vaz), bem como as suas percentagens, encontram-se listados na Tabela 3.1, por ordem de eluição numa coluna DB-1.

O germacreno D, o  $\beta$ -bourboneno, o  $\beta$ -cariofileno, o  $\alpha$ -ilangeno e o  $\gamma$ -cadineno foram os compostos dominantes ( $\geq 5\%$ ) dos voláteis extraídos de Alicante-Bouschet e de Antão Vaz. Nos voláteis de Alicante-Bouschet, a maior percentagem coube ao germacreno D (22%), seguido do  $\beta$ -bourboneno (14%), do  $\beta$ -cariofileno (13%), do  $\alpha$ -ilangeno (10%), e do  $\gamma$ -cadineno (7%). Para além destes compostos dominantes, também se podem destacar o  $\beta$ -copaeno (4%), o guaia-6,9-dieno (3%), e o  $\delta$ -elemeno (3%). Nos voláteis de Antão Vaz, a maior percentagem pertenceu ao germacreno D (23%), seguido do  $\alpha$ -ilangeno (22%), do  $\beta$ -cariofileno (17%), do  $\beta$ -bourboneno (13%), e do  $\gamma$ -cadineno (11%). Relativamente aos componentes agrupados em função da sua via biossintética, o único grupo de componentes agrupados representado, quer no caso de Alicante-Bouschet quer no caso de Antão Vaz, foi o dos

Hidrocarbonetos sesquiterpénicos, ao qual pertenciam todos os compostos detectados e identificados, com 76% no caso de Alicante-Bouschet e 86% no caso de Antão Vaz (Tabela 3.1).

No que diz respeito às diferenças de composições percentuais entre as duas castas, destaca-se a ligeira maior composição percentual de germacreno D e de  $\beta$ -cariofileno, a maior percentagem de  $\gamma$ -cadineno, e a maior presença de  $\alpha$ -ilangeno, na casta Antão Vaz, em relação à casta Alicante-Bouschet, sendo que esta última apresenta uma maior composição percentual do  $\beta$ -bourboneno em relação a Antão Vaz (Tabela 3.1).

Dois componentes voláteis nas 2 castas estudadas,  $\beta$ -copaeno e guaia-6,9-dieno, foram detectados apenas no caso dos voláteis obtidos por SPME (apresentando contudo composições percentuais vestigiais no caso de Antão Vaz) sendo que, no que toca exclusivamente aos voláteis obtidos por este método, o  $\delta$ -elemeno apenas foi detectado em Alicante-Bouschet (Tabela 3.1).

Através da consulta da bibliografia disponível, é possível verificar que os compostos referidos anteriormente não são exclusivos de *V. vinifera*, sendo encontrados também noutras espécies de plantas em que o método de extracção utilizado foi a SPME. Chizzola (2013) indica que o germacreno D é muito difundido nas plantas e frequentemente encontrado nos óleos das folhas, adicionando que alguns hidrocarbonetos sesquiterpénicos são frequentemente encontrados em óleos essenciais, como são os casos do  $\beta$ -bourboneno, do  $\alpha$ -ilangeno, e do  $\beta$ -cariofileno (este último amplamente difundido nas componentes vegetativas de inúmeras plantas), todos detectados nesta dissertação. Os compostos maioritários nas duas castas estudadas, entre eles o germacreno D, o  $\beta$ -cariofileno (encontrados por Gonçalves *et al.* 2020, em pinheiro-bravo), o  $\alpha$ -ilangeno e o  $\beta$ -bourboneno foram também identificados por Oliveira *et al.* (2010) em folhas frescas de figueira [*Ficus carica* (L.)] colhidas no nordeste de Portugal, enquanto o  $\gamma$ -cadineno foi mencionado por Łyczko *et al.* (2019), como estando entre os principais constituintes voláteis de folhas frescas de lavanda [*Lavandula angustifolia* Mill.], cultivadas na Polónia. Já Bracho-Nunez *et al.* (2011) observaram que o  $\beta$ -copaeno foi emitido apenas por folhas maduras de *Cistus albidus* (L.), em Montpellier (França), fornecendo evidências de que a fase de desenvolvimento tem um impacto nas emissões de compostos orgânicos voláteis. Muitos dos compostos encontrados nas duas castas de vinha foram indicados por Giuliani *et al.* (2018) como sendo conhecidos por desempenharem um papel de defesa contra insectos fitófagos, como é o caso do germacreno D e do  $\beta$ -cariofileno, reforçando Giuliani *et al.* (2020) que ao germacreno D é atribuído um papel defensivo, enquanto que o  $\beta$ -cariofileno está envolvido tanto nas estratégias de atracção para polinizadores, como nos mecanismos de defesa contra pragas, parasitas e herbívoros, sendo esta última actividade típica dos hidrocarbonetos sesquiterpénicos, acrescentando que a biossíntese do  $\beta$ -bourboneno pode ser induzida por herbivoria. Também Oliveira *et al.* (2010) indicam que existe a hipótese do germacreno D e do  $\beta$ -cariofileno serem importantes na defesa contra insectos. Sun *et al.* (2015) observaram, em folhas frescas de *Artemisia annua* (L.) e *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Hemsl., que as emissões de  $\beta$ -cariofileno aumentaram em folhas infestadas por pulgões que se alimentam do floema, das duas espécies, quando comparadas com as folhas saudáveis, tendo verificado o mesmo para o germacreno D em *C. morifolium*. Os autores mencionam que os terpenos defendem muitas espécies de plantas contra pragas e patógenos, tendo sido demonstrado que o  $\beta$ -cariofileno pode atrair pulgões, sendo assim menos correlacionado na resistência a estes, enquanto o germacreno D é mencionado como um potente repelente de artrópodes. Klimm *et al.* (2020) observaram que a produção de  $\beta$ -bourboneno foi 3 vezes maior nas folhas com galhas de *Quercus robur* (L.) (carvalho-roble), causadas por microvespas, quando comparada à das folhas de controlo saudáveis, indicando que a regulação positiva (*upregulation*) de  $\beta$ -bourboneno ocorre normalmente em resposta a danos causados pela “mastigação” de insectos herbívoros, ou por indutores de galhas. Os autores mencionam resultados que indicam que o  $\beta$ -bourboneno pode estar envolvido na atracção de predadores. Anastasaki *et al.* (2015) observaram diferenças consideráveis na abundância do  $\delta$ -elemeno (apenas identificado em Alicante-Bouschet nesta dissertação) entre plantas do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) intactas (1%) e plantas que

possuíam ovos de uma das suas principais pragas, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), 72 h após a oviposição (4%), verificando-se que a quantidade deste composto aumentou quando as plantas possuem ovos deste insecto. Os mesmos autores indicam que os sesquiterpenos (onde se inclui o  $\delta$ -elemeno) desempenham um papel na resistência do tomate contra insectos, sendo encontradas emissões elevadas de sesquiterpenos após a exposição de plantas do tomate a stress. Também Pasquini *et al.* (2021) referem que muitos terpenos voláteis têm um importante papel na protecção contra insectos herbívoros, sendo emitidos em resposta aos ataques de herbívoros, em que os sesquiterpenos, especificamente, desempenham uma acção repelente contra insectos herbívoros, podendo também atrair predadores naturais destes ou polinizadores. Estes autores acrescentam que os terpenos podem ser considerados uma alternativa importante aos insecticidas químicos, pois os insectos não parecem desenvolver resistência a estes compostos e não contaminam os alimentos ou o meio ambiente, sendo pouco persistentes.

Assim, a presença e composição percentual expressiva de cada um dos compostos voláteis maioritários detectados e identificados nas duas castas de videira, através do método de SPME, nesta dissertação, pode ser explicada pela presença de sintomas de *hopperburn*, causados pelos ataques de cigarrinhas-verdes, em algumas das folhas colhidas no Outono, o que pode ter levado a uma emissão expressiva/elevada dos compostos voláteis maioritários mencionados para estas duas castas, como um meio de defesa contra os ataques levados a cabo pelas cigarrinhas-verdes, à semelhança do que se verifica com outras espécies referidas previamente.

A análise da bibliografia existente, Tabela 3.2, no que diz respeito aos compostos voláteis encontrados em *V. vinifera* revelou algumas similitudes, mas também há que realçar as diferenças existentes em relação aos dados obtidos. É importante realçar o facto que, neste trabalho, algumas folhas colhidas das duas castas para a extracção de voláteis por SPME, especificamente no caso de Alicante-Bouschet e num grau muito mais reduzido em Antão Vaz, apresentavam sintomas de *hopperburn*, em resultado do ataque de cigarrinhas-verdes, como é possível observar nas Figuras 2.3 e 2.4, ao contrário do que sucede na maioria dos casos referidos na bibliografia, em que as folhas utilizadas são saudáveis ou intactas. Na bibliografia consultada não houve nenhuma experiência que relacionasse folhas de *V. vinifera* atacadas por insectos e os voláteis libertados pelas folhas, tornando esta dissertação inovadora neste ponto. Como exemplo de semelhanças, o facto de na bibliografia analisada a parte da planta utilizada ter sido em todos os casos as folhas e a maioria ter recorrido à SPME (excepto Hebash *et al.*, 1991) como método de extracção (Tabela 3.2), uma técnica igual à utilizada no presente trabalho. As técnicas de análise em todas as referências bibliográficas analisadas foram a GC-MS, excepto em Hebash *et al.* (1991), em que para além da GC-MS também recorreram à GC (Tabela 3.2), exactamente como neste trabalho, em que se recorreu a ambas as técnicas. Em relação a diferenças encontradas, comparando os resultados deste trabalho com a bibliografia em que a SPME foi utilizada, detectou-se e identificou-se um menor número de compostos voláteis, apenas pertencentes ao grupo dos Hidrocarbonetos sesquiterpénicos (Tabela 3.2). Na bibliografia analisada, não foi utilizada nenhuma das duas castas alvo de análise neste estudo, Tabela 3.2. Contudo, não é possível fazer uma comparação directa entre os dados da bibliografia sobre *V. vinifera* e os obtidos neste trabalho, uma vez que as condições de análise e do material vegetal são diferentes, assim como o momento de colheita, que em qualquer das referências bibliográficas estudadas pouco coincide com o do presente trabalho e, apesar do método de extracção ser o mesmo, este também apresentou variações, em distintas referências bibliográficas, nomeadamente no que diz respeito à temperatura e à duração da extracção.

Rizvi & Raman (2017) foi a única referência onde a extracção apresentou uma duração de 60 minutos e decorreu à temperatura ambiente, ou seja, condições idênticas às utilizadas neste trabalho. Contudo, tanto a casta branca como a casta tinta (Antão Vaz e Alicante-Bouschet, respectivamente) apresentaram compostos voláteis maioritários completamente distintos (Tabela 3.1) dos de Rizvi & Raman (2017), onde os compostos voláteis maioritários de folhas não infectadas com *Botrytis cinerea* (ou seja, sãs), da

casta branca Chardonnay são, em maior percentagem, o nonanal (29%), seguido principalmente do benzaldeído (13%), do ácido acético e do hexanal (ambos com 11%), enquanto que nas folhas infectadas com *B. cinerea*, destacam-se o *trans*-2-hexen-1-ol (16%), o 2-*trans*-hexenal (12%) e o 1-hexanol (11%), compostos distintos dos encontrados em folhas não infectadas (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Dados da literatura sobre os componentes voláteis dominantes extraídos de folhas de *Vitis vinifera*.

Variedade	PO	PP	MC	CA	ME	TAN	UQ	Componentes maioritários ( $\geq 5\%$ , $\geq 55 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ , $\geq 3000 \mu\text{g } \text{g}^{-1}$ , $\geq 75 000 \text{ \AA} \text{rea}$ )	Referência
Baladi	EG	F		Folhas limpas	DAV, 60 min	GC e GC-MS	%	<i>cis</i> -3-hexenal 53, 2-hexenol 6, <i>trans</i> -2-nonenal 6	Hebash <i>et al.</i> (1991)
Banati	EG	F		Folhas limpas	DAV, 60 min	GC e GC-MS	%	<i>cis</i> -3-hexenal 54, 1-propanal 10, 3-metil butanal 5, 1-hexenol 5	Hebash <i>et al.</i> (1991)
Biz El-Khanza	EG	F		Folhas limpas	DAV, 60 min	GC e GC-MS	%	<i>trans</i> -2-nonenal 43, 2-metil propanal 14, 2- <i>trans</i> -hexenal 5	Hebash <i>et al.</i> (1991)
Chardonnay (branca)	AU	F	Parte aérea de plantas jovens mantidas em vaso	Folhas não infectadas, e infectadas, com <i>Botrytis cinerea</i>	HS-SPME, 60 min, 24-27°C, TA	GC-MS	%	NI: nonanal 29, benzaldeído 13, ácido acético 11, hexanal 11, 4,8-dimetil-1,( <i>trans</i> )3,7- nonatrieno 7, $\alpha$ -farneseno 5, acetofenona 5 I: <i>trans</i> -2-hexen-1-ol 16, 2- <i>trans</i> -hexenal 12, 1-hexanol 11, 3-octanona 9, nonanal 7, $\alpha$ -terpineol 6, 4,8-dimetil-1,( <i>trans</i> )3,7- nonatrieno 5	Rizvi & Raman (2017)
Gazaz	EG	F		Folhas limpas	DAV, 60 min	GC e GC-MS	%	2- <i>trans</i> -hexenal 30, <i>trans</i> -2-nonenal 30, 2-pentenal 5, 2-metil propanal 5	Hebash <i>et al.</i> (1991)
Malvasia Fina (branca)	PT	F	Julho	FC, NP / FE 5min / FCZ (EPP) por 60min, 75min e 90min	HS-SPME, 30 min, 40°C	GC-MS	$\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$	FC: <i>cis</i> -3-hexenil acetato 8672, <i>cis</i> -3-hexen-1-ol 3383, <i>cis</i> -3-hexenal 1528, <i>cis</i> -3-hexenil butanoato 878, metil ( <i>cis</i> )-3-hexenoato 647, cariofileno 390, undecano 240, 2- <i>trans</i> -hexenal 166, <i>cis</i> -3-hexenil isovalerato 150, <i>psi</i> -cumeno 86, ( <i>trans,trans</i> )-2,4-hexadienal 86, octanal 62, acetato de hexilo 57, álcool benzílico 57 FE: 6-metil-5-hepten-2-ona 1499, pentanal 502, <i>cis</i> -3-hexenil acetato 202, nonanal 196, octanal 128, undecano 91, acetato de hexilo 84, <i>cis</i> -3-hexenil butanoato 66, <i>psi</i> -cumeno 57 FCZ (60 min): pentanal 472, 6-metil-5-hepten-2-ona 358, nonanal 161, octanal 83, undecano 79, <i>p</i> -xileno 70, acetato de hexilo 61 FCZ (75 min): pentanal 350, 6-metil-5-hepten-2-ona 318, nonanal 108, undecano 100, octanal 74, <i>p</i> -xileno 59 FCZ (90 min): cariofileno 356, pentanal 324, 6-metil-5-hepten-2-ona 265, undecano 108, nonanal 107, octanal 67, <i>p</i> -xileno 64	Lima <i>et al.</i> (2017)
Moscato Bianco (branca)	IT	FJ/FJunho	M	Folhas frescas, esmagadas em azoto líquido	HS-SPME	GC-MS	$\mu\text{g } \text{g}^{-1}$	FJ: hexanal 24928, geraniol 24897, 2- <i>trans</i> -hexenal 22440, óxido de <i>cis</i> -linalol (piranóide) 4063, nonanal 3142, álcool benzílico 3032 FM: 2- <i>trans</i> -hexenal 50729, hexanal 5123, geraniol 3796	Matarese <i>et al.</i> (2014)

Variedade	PO	PP	MC	CA	ME	TAN	UQ	Componentes maioritários ( $\geq 5\%$ , $\geq 55 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ , $\geq 3000 \mu\text{g g}^{-1}$ , $\geq 75 000 \text{ \AA}rea$ )	Referência
Pinot Noir (tinta)	AT	F	Junho	Folhas do quinto nó, em pó, sujeitas, ou não, a stress hídrico	SPME, 60 min, 90°C	GC-MS	Área*	Não sujeitas a SH: 2- <i>trans</i> -hexenal 644621, $\beta$ -ionona 227660, nonanal 126965, 5,6,7,7A-tetrahydro-2(4H)-benzofuranona 120166, hexanal 85338, ( <i>trans,trans</i> )-2,4-hexadienal 76032 3-5 dias SH: 2- <i>trans</i> -hexenal 724632, $\beta$ -ionona 263707, 5,6,7,7A-tetrahydro-2(4H)-benzofuranona 120166, fenilacetaldeído 117464, hexanal 116209, nonanal 103378, ( <i>trans,trans</i> )-2,4-hexadienal 91488 6-8 dias SH: 2- <i>trans</i> -hexenal 576546, fenilacetaldeído 226350, nonanal 158019, $\beta$ -ionona 126569, geranil acetona 108890, metilbenzeno 101635, 5,6,7,7A-tetrahydro-2(4H)-benzofuranona 90921	Griesser <i>et al.</i> (2015)
Sangiovese (tinta)	IT	FM	Folhas de plantas jovens mantidas em vaso examinadas as 23 SAI	Folhas de plantas com MA; folhas frescas esmagadas em azoto líquido	HS-SPME, 35 min, 60°C	GC-MS	%	NIN: 2- <i>trans</i> -hexenal 44, 4-hexen-3-ona, 5-metil- 15, $\beta$ -ionon-5,6-epóxido 10, hexanal 7, sorbaldeído 5 IN: 2- <i>trans</i> -hexenal 59, 4-hexen-3-ona, 5-metil- 16	Velásquez <i>et al.</i> (2020)
Tinta Roriz (tinta)	PT	F	30 e 60 DAC uvassecas	Folhas sãs,	HS-SPME, 30 min, banho-maria a 50°C	GC-MS	%	30 DAC uvas: benzaldeído 88, DL-limoneno 6 60 DAC uvas: DL-limoneno 36, 6-metil-5-hepten-2-ona 21, <i>cis</i> -citral 16, eucaliptol 15, 1-undeceno 12	Fernandes <i>et al.</i> (2015)
Tinta Roriz (tinta)	PT	F	30 e 60 DAC uvasfolhas	Infusão de folhas sãs, secas, em pó (esmagadas)	HS-SPME, 30 min	GC-MS	%	30 DAC uvas: benzaldeído 69, 1,6-octadien-3-ol,3,7-dimetil 8, 6-metil-5-hepten-2-ona 7, 5,9 -undecadien-2-ona-6,10-dimetil-(5- <i>trans</i> ) 6 60 DAC uvas: 1,6-octadien-3-ol,3,7-dimetil 23, <i>cis</i> -citral 17, 6-metil-5-hepten-2-ona 17, ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletil) 15, 5,9 -undecadien-2-ona-6,10-dimetil-(5- <i>trans</i> ) 14, heptano-1,2,4,6-tetraeno 7, 1-undeceno 6	Jordão <i>et al.</i> (2017)
Touriga Franca (tinta)	PT	F	Julho	FC, NP / FE 5min / FCZ (EPP) por 60min, 75min e 90min	HS-SPME, 30 min, 40°C	GC-MS	$\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$	FC: <i>cis</i> -3-hexenil acetato 10353, <i>cis</i> -3-hexen-1-ol 4514, <i>cis</i> -3-hexenal 922, metil ( <i>cis</i> )-3-hexenoato 612, cariofileno 548, <i>cis</i> -3-hexenil butanoato 368, undecano 205, 2- <i>trans</i> -hexenal 160, <i>cis</i> -3-hexenil isovalerato 94, octanal 85, ( <i>trans,trans</i> )-2,4-hexadienal 77, álcool benzílico 73, <i>psi</i> -cumeno 70, acetato de hexilo 61	Lima <i>et al.</i> (2017)

Variedade	PO	PP	MC	CA	ME	TAN	UQ	Componentes maioritários ( $\geq 5\%$ , $\geq 55 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ , $\geq 3000 \mu\text{g g}^{-1}$ , $\geq 75 \text{ 000 \AA}^2$ )	Referência
								FE: 6-metil-5-hepten-2-ona 1173, cariofileno 719, pentanal 630, <i>cis</i> -3-hexenil acetato 627, limoneno 215, nonanal 201, octanal 170, undecano 128, heptanal 93, <i>cis</i> -3-hexenil butanoato 73, $\beta$ -citral 67, <i>psi</i> -cumeno 63 FCZ (60 min): 6-metil-5-hepten-2-ona 559, cariofileno 544, pentanal 493, nonanal 134, undecano 102, octanal 81, $\beta$ -citral 74, <i>p</i> -xileno 68, acetato de hexilo 61 FCZ (75 min): 6-metil-5-hepten-2-ona 689, pentanal 516, cariofileno 489, nonanal 143, undecano 99, $\beta$ -citral 97, octanal 89, <i>p</i> -xileno 73, acetato de hexilo 55, decanal 55 FCZ (90 min): 6-metil-5-hepten-2-ona 548, pentanal 464, cariofileno 397, nonanal 107, undecano 107, $\beta$ -citral 104, octanal 77, <i>p</i> -xileno 66	
Touriga Nacional (tinta)	PT	F	30 e 60 DAC uvassecas	Folhas sãs, 30 min, banho-maria a 50°C	HS-SPME, 30 min,	GC-MS	%	30 DAC uvas: benzaldeído 78, 6-metil-5-hepten-2-ona 8, $\beta$ -bourboneno 7 60 DAC uvas: hexanal 41, 6-metil-5-hepten-2-ona 22, DL-limoneno 15, cedrenol 14, valanceno 14, <i>cis</i> -citral 12, 1-noneno 10, 3-hexan-1-ol 9	Fernandes <i>et al.</i> (2015)
Touriga Nacional (tinta)	PT	F	30 e 60 DAC uvasfolhas secas, em pó (esmagadas)	Infusão de folhas sãs, 30 min	HS-SPME, 30 min	GC-MS	%	30 DAC uvas: benzaldeído 73, 1,6-octadien-3-ol,3,7-dimetil 11, 6-metil-5-hepten-2-ona 5, cedrenol 5 60 DAC uvas: 1,6-octadien-3-ol,3,7-dimetil 28, cedrenol 20, 5,9-undecadien-2-ona-6,10-dimetil-(5- <i>trans</i> ) 18, 6-metil-5-hepten-2-ona 16, <i>cis</i> -citral 11, heptano-1,2,4,6-tetraeno 7	Jordão <i>et al.</i> (2017)

PO: País de origem (código ISO com duas letras). PP: Partes da planta. MC: Momento de colheita (se referido pelos autores). CA: Condições de análise. ME: Método de extracção. TAN: Técnica de análise. UQ: Unidades de quantificação. EG: Egípto. AU: Austrália. PT: Portugal. IT: Itália. AT: Áustria. F: Folhas. FJ: Folhas jovens. FM: Folhas maduras. SAI: Semanas após inoculação. DAC: Dias após colheita. FC: Folhas controlo. NP: Não processadas. FE: Folhas escaldadas. FCZ: Folhas cozinhadas. EPP: Em panela de pressão. NIN: Não inoculadas. IN: Inoculadas. MA: Micorrizas arbúsculares. DAV: Destilação por arrastamento de vapor. TA: Temperatura ambiente. NI: Não infectadas. I: Infectadas. GC: Cromatografia gasosa (cromatografia gás-líquido). GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. \*: Chromatographic peak areas of extracted ion chromatograms. SH: Stress hídrico.

Se a análise for alargada a estudos em que a duração da extracção ou a temperatura a que foram realizadas as extracções são distintas, ou em que ambas são diferentes das do presente trabalho, verifica-se que os compostos dominantes são totalmente distintos dos identificados nesta dissertação (Tabela 3.2). Observa-se que em nenhuma das referências mencionadas na Tabela 3.2, nos casos em que o método de extracção utilizado foi a SPME (ou HS-SPME), existe a presença de quaisquer dos compostos detectados e identificados neste trabalho, em que o método de extracção utilizado foi idêntico (SPME), existindo apenas pequenas excepções, como é o caso do  $\beta$ -bourboneno, que se encontra presente em Fernandes *et al.* (2015) com uma percentagem de 7%, em folhas da casta tinta Touriga Nacional, 30 dias após a colheita das uvas; e o  $\beta$ -cariofileno (ou simplesmente cariofileno), presente em Lima *et al.*

(2017) nas duas castas estudadas, a branca Malvasia Fina e a tinta Touriga Franca. Na casta branca, o cariofileno é o composto maioritário quando as folhas são cozinhadas em panela de pressão durante 90 min ( $356 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), estando também presente em folhas não sujeitas a qualquer tipo de tratamento. Em relação à casta tinta, o cariofileno está presente em todos os tratamentos e em folhas não sujeitas a qualquer tratamento, apresentando concentrações em quaisquer dos casos superiores às verificadas para a casta branca (na presente dissertação ocorre o inverso, ou seja, a casta branca apresenta uma composição percentual superior deste composto em comparação com a casta tinta), sendo de assinalar que na casta tinta o cariofileno nunca é o composto maioritário (com maior concentração) em qualquer dos tratamentos, destacando-se o facto de apresentar uma concentração mais elevada nas folhas escaldadas ( $719 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e menor nas folhas cozinhadas em panela de pressão (entre 397 e  $544 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), indo diminuindo a sua concentração nestas últimas à medida que o tempo aumenta (Tabela 3.2). Importante realçar o facto de, no estudo de Fernandes *et al.* (2015) e de Lima *et al.* (2017), as folhas não terem sido esmagadas previamente à extracção, tal como nesta dissertação, ao contrário do que aconteceu noutras referências (Tabela 3.2). Contudo, em Rizvi & Raman (2017), em que as folhas da casta branca Chardonnay também não foram esmagadas e que apresentam condições de extracção bastante semelhantes às da presente dissertação, nomeadamente no que diz respeito ao tempo e à temperatura de extracção, em folhas não infectadas e em folhas infectadas, não se detectou a presença quer do  $\beta$ -bourboneno quer do cariofileno (Tabela 3.1). Destacar contudo as diferenças existentes entre Fernandes *et al.*, 2015 e Lima *et al.*, 2017 e o presente trabalho, nomeadamente o diferente momento de colheita [neste trabalho as folhas foram colhidas em Novembro, ao passo que Lima *et al.* (2017) colheram-nas em Julho], as diferentes condições de análise [as folhas neste trabalho eram frescas, enquanto que as de Fernandes *et al.* (2015) secas, e as de Lima *et al.* (2017) sujeitas a diferentes tratamentos, nomeadamente não processadas (controlo), escaldadas durante 5 min, e cozinhadas em panela de pressão durante 60, 75 e 90 min], e a duração e a temperatura a que decorreram as extracções [em Fernandes *et al.* (2015) duraram 30 min, em banho-maria a  $50^\circ\text{C}$ , e em Lima *et al.* (2017), 30 min, a  $40^\circ\text{C}$ ] (Tabela 3.2).

Diferenças nos resultados podem também ser atribuídas à idade das folhas (jovens ou maduras) ou se foram reduzidas a pó ou esmagadas [como ocorreu em Matarese *et al.* (2014), Griesser *et al.* (2015), Velásquez *et al.* (2020), e Jordão *et al.* (2017)], ou usadas infusões [como em Jordão *et al.* (2017)]. Adicionalmente, alguns dados de outros autores são baseados em folhas inoculadas com fungos (Rizvi & Raman, 2017) ou com micorrizas arbusculares (Velásquez *et al.*, 2020), e folhas sujeitas a stress hídrico (Griesser *et al.*, 2015).

### 3.1.2. Voláteis obtidos por Hidrodestilação

No presente trabalho, no que diz respeito aos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação, o rendimento obtido foi sempre inferior a 0,05 mL.

A análise da bibliografia sobre *V. vinifera* revelou que nesta dissertação se utilizou este método de extracção pela primeira vez para voláteis de folhas de videira tendo-se, no entanto, obtido alguns compostos voláteis muito semelhantes aos dos restantes autores que utilizaram outros métodos. Outros autores, como Hebash *et al.* (1991) usaram a destilação por arrastamento de vapor (metodologia de extracção também utilizada na extracção de óleos essenciais), contudo não há trabalhos equivalentes ao realizado na presente dissertação em relação às castas estudadas, às condições de análise, às condições do material vegetal, ao momento de colheita, ou ao método de extracção utilizado, não sendo possível comparar os resultados da hidrodestilação.

Os componentes identificados nas diferentes amostras de óleos essenciais isolados (Alicante-Bouschet e Antão Vaz), bem como as suas percentagens, encontram-se listados na Tabela 3.1, por ordem de eluição numa coluna DB-1.

Nos óleos essenciais isolados de folhas de Alicante-Bouschet colhidas no Outono, foram detectados 74 componentes, dos quais foram possíveis identificar 66, totalizando uma percentagem de identificação de 85%. Para a casta Antão Vaz foram detectados 39 componentes, dos quais foram identificados 36, totalizando uma percentagem de identificação de 88% (Tabela 3.1). O *2-trans*-hexenal, o *cis*-3-hexen-1-ol e o ácido palmítico foram os compostos dominantes ( $\geq 5\%$ ) comuns dos óleos essenciais isolados de Alicante-Bouschet e de Antão Vaz, com Alicante-Bouschet a apresentar uma menor composição percentual do *2-trans*-hexenal (21%) e do *cis*-3-hexen-1-ol (8%) comparativamente com Antão Vaz: *2-trans*-hexenal (31%) e *cis*-3-hexen-1-ol (11%) (Tabela 3.1). No caso do ácido palmítico, a composição percentual foi idêntica em ambas as castas (8%) (Tabela 3.1). Outros compostos dominantes em Alicante-Bouschet foram o edulcan II (10%) e o ácido linoleico (5%) (Tabela 3.1). Em Antão Vaz, o *cis*-2-hexen-1-ol foi outro dos compostos dominantes (6%) (Tabela 3.1). O ácido linoleico também foi detectado em Antão Vaz, mas numa composição percentual menor (4%) comparativamente com Alicante-Bouschet, não sendo um composto dominante, semelhante ao que ocorreu no caso do *cis*-2-hexen-1-ol, também detectado em Alicante-Bouschet (4%), mas numa composição percentual inferior à encontrada em Antão Vaz (Tabela 3.1). No caso de Alicante-Bouschet pode ser ainda destacado o salicilato de metilo (4%), apenas detectado nos óleos essenciais desta casta, não tendo sido detectado nos óleos essenciais de Antão Vaz (Tabela 3.1). Em Antão Vaz podem ainda ser destacados, apesar de não serem compostos dominantes, o *n*-hexanol (3%) e o acetato de fitol (3%) (Tabela 3.1). Em relação aos componentes agrupados em função da sua via biossintética, o grupo de componentes agrupados em maioria foi, nas duas castas, o dos Voláteis das folhas verdes (GLV), com 36% em Alicante-Bouschet, uma composição percentual inferior à registada em Antão Vaz (51%) (Tabela 3.1). Deste grupo faziam parte o *2-trans*-hexenal, o *cis*-3-hexen-1-ol, o *cis*-2-hexen-1-ol e o *n*-hexanol. O ácido palmítico e o ácido linoleico faziam parte do grupo dos Ácidos gordos, o segundo mais representado em ambas as castas, com 13% em Alicante-Bouschet e 12% em Antão Vaz (Tabela 3.1). Em Alicante-Bouschet, o edulcan II integrou-se no grupo dos Apocarotenóides, grupo que apresentou uma percentagem de 12%, sendo o terceiro mais representado, enquanto o salicilato de metilo integrou-se no grupo dos Derivados de ácidos benzóicos, sendo o único constituinte deste, apresentando assim este grupo uma composição percentual de 4% (Tabela 3.1). Em Antão Vaz, o acetato de fitol era constituinte único do grupo dos Diterpenos oxigenados, com uma composição percentual de 3% (Tabela 3.1). Os compostos dominantes e os compostos com percentagens consideráveis, dos óleos essenciais de Alicante-Bouschet, foram semelhantes aos de Antão Vaz, diferindo apenas nas percentagens entre os compostos presentes nos óleos essenciais das 2 castas de videira, com a casta Antão Vaz a apresentar uma maior composição percentual dos componentes voláteis que estavam presentes em ambas as castas (Tabela 3.1).

Consultando a bibliografia é possível observar que os compostos voláteis mencionados anteriormente estão presentes também noutras espécies de plantas. Hassan *et al.* (2015) referem que as plantas emitem apenas quantidades vestigiais de GLVs em condições fisiológicas normais, no entanto, sob condições de stress, aumentam a sua emissão, como ocorre no caso da resposta à herbivoria, onde essa emissão induz defesas indirectas ao activar a expressão de genes relacionados com a defesa. Sun *et al.* (2015) referem que os GLVs, como o *2-trans*-hexenal e o *cis*-3-hexen-1-ol, são encontrados em tecidos verdes das plantas, agindo como moléculas de sinal para herbívoros, geralmente em resposta a ferimentos, sendo referido por Myung *et al.* (2006) que o *2-trans*-hexenal é sintetizado em resposta ao ferimento e que pode ser detectado em menos de 20 segundos após a ruptura do tecido. Hu *et al.* (2020) acrescentam que os GLVs, onde se incluem o *2-trans*-hexenal e o *cis*-3-hexen-1-ol (elemento chave em GLVs, que funciona como resposta ao ataque de insectos), podem ser induzidos por danos mecânicos, infecção fúngica ou bacteriana e até mesmo stresses abióticos. Copolovici *et al.* (2017) verificaram na floresta Lipova (Roménia), que as emissões induzidas de GLVs (entre eles o *2-trans*-hexenal e o 1-hexanol) pela alimentação de larvas de *Lymantria dispar dispar* L., que se alimentam de *Q. robur*, aumentaram com o grau de dano. Hu *et al.* (2020) observaram a acumulação do *cis*-3-hexen-1-ol e do

2-*trans*-hexenal, em folhas de chá sujeitas a stress hiperosmótico, enquanto o acetato de fitol, o linalol e o geraniol (três compostos presentes neste trabalho) apresentaram uma diminuição significativa, acrescentando que a acumulação de *cis*-3-hexen-1-ol aumentou significativamente a tolerância e a resistência ao stress hiperosmótico do chazeiro, demonstrando a sua função de resistência. Birkett *et al.* (2003) estudaram a composição de voláteis extraídos de folhas de *Phaseolus vulgaris* (L.), tendo observado que em folhas infestadas por *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, os níveis de *cis*-3-hexen-1-ol foram maiores do que nas folhas não infestadas, podendo os compostos serem considerados como resultantes da infestação da mosca-branca. Para Nie *et al.* (2020), o *cis*-3-hexen-1-ol é um dos VOCs mais importantes nas plantas sendo, por exemplo, amplamente encontrado em folhas frescas de chá como um aleloquímico importante em resposta a lesões mecânicas. No presente trabalho verificou-se que as maiores composições percentuais do 2-*trans*-hexenal, *cis*-3-hexen-1-ol, *cis*-2-hexen-1-ol e *n*-hexanol (compostos pertencentes ao grupo dos GLVs) detectadas em folhas das duas castas colhidas no Outono de 2020, comparativamente com as da Primavera de 2021, podem assim ser explicadas pelo facto de algumas folhas colhidas no Outono apresentarem sintomas de *hopperburn*, ao contrário das folhas sãs colhidas na Primavera (Tabela 3.1). Kanobe *et al.* (2015) indicam que os ácidos gordos estão envolvidos nas respostas das plantas ao stress biótico e abiótico e agem como sinais de alarme durante o ataque de insectos, referindo Sumayo *et al.* (2014) que o ácido linoleico é utilizado pelas plantas para a produção de ácido jasmónico, um importante composto de sinalização envolvido na defesa e no desenvolvimento das plantas. Conconi *et al.* (1996) observaram aumentos nas concentrações deste composto em folhas de plantas do tomate (*L. esculentum*) feridas em comparação com folhas não feridas, tal como Ryu & Wang (1998), que relataram que os níveis de ácido linoleico aumentaram nas folhas de tomate em resposta ao ferimento. Pode ser estabelecida uma comparação com as folhas de Alicante-Bouschet colhidas no Outono, uma vez que algumas apresentavam sinais de ferimentos causados pelas cigarrinhas-verdes e os óleos essenciais dessas folhas exibiram a maior percentagem de ácido linoleico (5%), quase o dobro da registada para Alicante-Bouschet na Primavera (3%), onde não existiam sinais de ferimentos nas folhas. No que diz respeito a Antão Vaz, as composições percentuais do ácido linoleico foram idênticas no Outono e na Primavera (4%). Kanobe *et al.* (2015) observaram um aumento assinalável nos níveis de ácido palmítico nas folhas de soja infestadas por pulgões em comparação com os níveis nas folhas não infestadas, revelando que a infestação de pulgões teve um forte efeito nos níveis relativos de ácido palmítico das folhas de soja. No presente trabalho, os níveis de ácido palmítico foram superiores nos óleos essenciais de folhas das duas castas colhidas no Outono (8% em Alicante-Bouschet e Antão Vaz), em que existiam sinais de infestação por cigarrinhas-verdes (nomeadamente na casta Alicante-Bouschet), ao contrário do que se verificou para folhas colhidas na Primavera, que apresentaram níveis menores de ácido palmítico nos seus óleos essenciais (3% em Alicante-Bouschet, enquanto em Antão Vaz apresentou uma composição percentual superior, com 5%) (Tabela 3.1). O salicilato de metilo (MeSA, do inglês *methyl salicylate*), segundo indicam Rowen *et al.* (2017), é frequentemente emitido por plantas sujeitas a herbivoria por insectos, atraindo diversos inimigos naturais (predadores), sendo essencial para a defesa da planta contra insectos que se alimentam do floema. Lee (2010) verificou, em campos de morango, que plantas infestadas por gorgulhos *Anthonomus rubi* (Herbst), emitiram níveis mais elevados de MeSA em comparação com plantas não atacadas, sendo que em armadilhas adesivas, uma redução de 19% foi observada para cigarrinhas nas parcelas tratadas com MeSA. Mallinger *et al.* (2011) referem que a alimentação pelo pulgão da soja, *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae) resultou na emissão de altos níveis de salicilato de metilo em plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merr.], afectando indirectamente as populações de herbívoros através da atracção natural de predadores, podendo também influenciar directamente o comportamento dos herbívoros. No entendimento de Mallinger *et al.* (2011), a capacidade de atrair inimigos naturais e repelir herbívoros sugere um papel significativo para voláteis de plantas como o MeSA na gestão de populações de pragas. Singewar *et al.* (2021) mencionam que a emissão de MeSA é um elemento do mecanismo de

defesa indirecto que é activado após o ataque de herbívoros para atrair os inimigos naturais desses herbívoros. Já Ren *et al.* (2020) indicam que o MeSA pode actuar também como um repelente para certos herbívoros e, como predadores de pragas herbívoras usam as emissões de MeSA de plantas infestadas na localização das suas presas, reduzem assim indirectamente os ataques de herbívoros. Pode-se então inferir, tendo em conta os exemplos anteriores, que uma das possíveis razões para, neste trabalho, este composto estar presente nos óleos essenciais de folhas de Alicante-Bouschet colhidas no Outono (4%) e não nos de Antão Vaz (não detectado), seja o facto de algumas das folhas colhidas desta casta nessa estação apresentarem sintomas de *hopperburn*, resultantes do ataque de cigarrinhas-verdes, numa escala superior aos sintomas observados em Antão Vaz, sendo mais susceptíveis ao ataque de cigarrinhas-verdes (Tabela 3.1).

Na bibliografia consultada sobre *V. vinifera*, o 2-*trans*-hexenal, que neste trabalho é o composto volátil maioritário em óleos essenciais isolados das duas castas de folhas colhidas no Outono, também aparece indicado em 6 das 8 referências bibliográficas citadas na Tabela 3.2. Em Matarese *et al.* (2014) é o componente volátil maioritário de folhas maduras esmagadas da casta branca Moscato Bianco, enquanto em folhas jovens esmagadas, apesar de não ser maioritário, apresenta uma concentração significativa, sendo o terceiro composto com maior concentração (Tabela 3.2). Griesser *et al.* (2015), em folhas em pó da casta tinta Pinot Noir, verificaram que o 2-*trans*-hexenal é o composto maioritário nos 3 tratamentos realizados (folhas não sujeitas a stress hídrico, folhas sujeitas a entre 3 a 5 dias de stress hídrico e folhas sujeitas a entre 6 a 8 dias de stress hídrico) (Tabela 3.2), sendo importante acrescentar que a sua presença é superior nas folhas sujeitas a entre 3 a 5 dias de stress hídrico em comparação com as folhas não sujeitas a stress hídrico e com as folhas sujeitas a entre 6 a 8 dias de stress hídrico (Tabela 3.2). Em Velásquez *et al.* (2020) é também o composto maioritário, em ambos os casos, apresentando uma maior percentagem em folhas da casta tinta Sangiovese inoculadas com micorrizas arbusculares (59%) do que em folhas não inoculadas (44%). Rizvi & Raman (2017) também indicaram a presença do 2-*trans*-hexenal (12%), em folhas da casta branca Chardonnay infectadas com *B. cinerea* (Tabela 3.2), uma composição percentual inferior à verificada nesta dissertação para as folhas das duas castas colhidas no Outono (em que algumas apresentavam sintomas de *hopperburn*, ou seja, ataques de cigarrinhas-verdes), sobretudo quando comparada com outra casta branca, neste caso Antão Vaz (Tabela 3.1). Há que referir contudo as diferenças existentes entre as referências bibliográficas mencionadas e a presente dissertação, nomeadamente o momento de colheita [em Matarese *et al.* (2014) e em Griesser *et al.* (2015) as folhas foram colhidas em Junho, sendo que Velásquez *et al.* (2020) e Rizvi & Raman (2017) também apresentaram momentos de colheita diferentes dos do presente trabalho], as castas utilizadas, as condições de análise [em Matarese *et al.* (2014) e Velásquez *et al.* (2020) as folhas foram previamente esmagadas, em Griesser *et al.* (2015) as folhas foram reduzidas a pó, e em Rizvi & Raman (2017) folhas foram infectadas com *B. cinerea*, o que não ocorreu neste trabalho], o método de extracção [em Matarese *et al.* (2014), Griesser *et al.* (2015), Velásquez *et al.* (2020) e Rizvi & Raman (2017), foi utilizada a SPME ou HS-SPME], e em alguns casos o próprio país de origem [em Rizvi & Raman (2017) é um país de um hemisfério diferente, neste caso a Austrália]. Apesar das diferenças mencionadas entre as referências citadas anteriormente e a presente dissertação, é possível encontrar algo em comum, nomeadamente o aumento das concentrações ou composições percentuais do 2-*trans*-hexenal, em folhas sujeitas a factores de stress abióticos ou bióticos, como o stress hídrico (Griesser *et al.*, 2015) e a infecção com um fungo (Rizvi & Raman, 2017), algo semelhante ao encontrado neste trabalho, em que folhas das duas castas colhidas no Outono com vestígios de ataque pelas cigarrinhas-verdes apresentaram composições percentuais do 2-*trans*-hexenal muito superiores às verificadas na Primavera, em que as folhas eram sãs (Tabela 3.1). Este aumento pode ser assim explicado pelo ataque das cigarrinhas-verdes, sendo este composto emitido numa maior percentagem e actuando como um mecanismo de defesa das videiras. Em Lima *et al.* (2017), o 2-*trans*-hexenal está presente em folhas não sujeitas a qualquer tratamento, tanto da casta branca Malvasia Fina como da casta tinta Touriga Franca,

apresentando uma concentração bastante inferior ao composto maioritário, em ambos os casos (Tabela 3.2). Diferentemente de todas as referências encontradas e expostas na Tabela 3.2, Hebash *et al.* (1991) recorreram à destilação por arrastamento de vapor, onde o *2-trans*-hexenal também foi detectado, nas castas Biz El-Khanza (com uma composição percentual de 5%, inferior às detectadas no presente trabalho para as duas castas) e Gazaz (um dos compostos maioritários com uma composição percentual de 30%, superior à das folhas colhidas no Outono de Alicante-Bouschet e ligeiramente inferior à de Antão Vaz, verificadas neste trabalho), como é indicado na Tabela 3.2. O *cis*-3-hexen-1-ol, um dos compostos maioritários em óleos essenciais isolados de folhas colhidas no Outono, está também presente em Lima *et al.* (2017), em folhas não sujeitas a qualquer tratamento, da casta branca Malvasia Fina e da tinta Touriga Franca, sendo o segundo composto com maior concentração, a uma grande distância do primeiro, em ambas as castas (Tabela 3.2). Contudo, é importante mencionar que o momento de colheita (Julho) e o método de extracção (HS-SPME) em Lima *et al.* (2017) são diferentes dos apresentados neste trabalho, assim como as próprias condições de análise e as castas (Tabela 3.2). O *cis*-2-hexen-1-ol, o edulan II, o ácido linoleico e o salicilato de metilo não foram detectados ou identificados em nenhuma das referências bibliográficas consultadas (Tabela 3.2).

Foram observadas diferenças consideráveis no que diz respeito aos componentes voláteis dominantes dos óleos essenciais isolados de folhas de Alicante-Bouschet e de Antão Vaz colhidas no Outono e de óleos essenciais isolados de folhas colhidas na Primavera.

Nos óleos essenciais isolados de folhas colhidas na Primavera, tanto de Alicante-Bouschet como de Antão Vaz, foram detectados 65 componentes, dos quais foram possíveis identificar 56, totalizando uma percentagem de identificação de 87% no caso de Alicante-Bouschet e de 89% no caso de Antão Vaz (Tabela 3.1). O linalol, o geraniol e o *2-trans*-hexenal foram os compostos dominantes ( $\geq 5\%$ ) dos óleos essenciais isolados de Alicante-Bouschet e dos óleos essenciais isolados de Antão Vaz, nos quais a maior percentagem coube ao linalol em ambas as castas, com uma composição percentual superior em Antão Vaz (37%) comparativamente com Alicante-Bouschet (31%), seguido do geraniol e do *2-trans*-hexenal, que apresentaram uma composição percentual superior em Alicante-Bouschet (12% no caso do geraniol e 8% no caso do *2-trans*-hexenal) em relação a Antão Vaz (9% no caso do geraniol e 6% no caso do *2-trans*-hexenal). No caso dos óleos essenciais isolados de Antão Vaz, o acetato de fitol (6%) e o ácido palmítico (5%) foram os outros compostos dominantes. Apesar de não serem compostos dominantes, também se podem destacar, em Alicante-Bouschet, o acetato de fitol (4%), o ácido palmítico (3%), o ácido linoleico (3%) e o  $\alpha$ -terpineol (3%), enquanto em Antão Vaz podem ser destacados o ácido linoleico (4%), o edulan II (3%), o  $\alpha$ -terpineol (3%) e o 1,2-dihidro-1,1,6-trimetil-naftaleno (3%). Em relação aos componentes agrupados em função da sua via biossintética, o grupo de componentes agrupados em maioria foi o dos Monoterpenos oxigenados, nas duas castas, com 48% em Alicante-Bouschet e uma composição percentual ligeiramente superior em Antão Vaz (51%). Neste grupo integraram-se o linalol, o geraniol e o  $\alpha$ -terpineol. Em ambas as castas, o grupo dos Voláteis das folhas verdes (GLV) foi o segundo mais representado com uma composição percentual superior em Alicante-Bouschet (12%) comparativamente com Antão Vaz (9%). O grupo dos Ácidos gordos, apresentou uma composição percentual de 6% em Alicante-Bouschet, inferior à registada em Antão Vaz (9%). Em Alicante-Bouschet, o grupo dos Diterpenos oxigenados apresentou uma percentagem de 5%, inferior à detectada em Antão Vaz (6%) (Tabela 3.1). Em Antão Vaz, o 1,2-dihidro-1,1,6-trimetil-naftaleno inseriu-se no grupo dos Apocarotenóides, grupo que apresentou uma composição percentual de 7% (Tabela 3.1). Assim, para as folhas colhidas na Primavera, o linalol, o geraniol e o *2-trans*-hexenal foram compostos dominantes ( $\geq 5\%$ ) nos óleos essenciais de folhas de ambas as castas, verificando-se apenas uma divergência nas composições percentuais (Tabela 3.1).

Consultando a bibliografia disponível constata-se que os compostos voláteis indicados previamente estão presentes também noutras espécies de plantas, não estando apenas presentes em *V. vinifera*. Nessa mesma bibliografia são observadas, em alguns casos, diferenças de concentrações ou composições

percentuais consoante o estado fenológico da planta. O geraniol, segundo Mączka *et al.* (2020), é um componente importante de muitos óleos essenciais de plantas, sendo indicado por Chen & Viljoen (2010) como tendo um odor característico de rosa. Foi detectado em óleos essenciais de folhas colhidas de *Pelargonium graveolens* (L'Hér.) Dum. Cours. submetidas a hidrodestilação: em Szutt *et al.* (2019), estava entre os componentes em maior quantidade (16%); e em Boukhris *et al.* (2013), em que as folhas foram colhidas na fase de floração no sudeste da Tunísia, era também um dos principais constituintes (15%). Moldão-Martins *et al.* (1999) detectaram-no como um dos constituintes mais abundantes, em partes aéreas de *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout. colhidas na região de Trás-os-Montes (Portugal), submetidas a destilações num aparelho de Clevenger, variando a sua composição no óleo essencial: durante a dormência (valores mínimos), período de floração (18%), pós-floração (22%), apresentando assim grandes variações ao longo do ciclo vegetativo. Variações devido à fase do ciclo vegetativo também foram detectadas na presente dissertação, uma vez que se observaram grandes diferenças nas composições percentuais de geraniol, assim como de linalol, entre as folhas das duas castas colhidas no Outono (fase vegetativa) e as colhidas na Primavera (fase de floração), apresentando estas últimas composições percentuais de geraniol e de linalol muito superiores nos seus óleos essenciais, sendo os dois compostos principais nas duas castas, ao contrário do que se verifica com as folhas das duas castas colhidas no Outono, onde apresentam composições percentuais mínimas, não estando sequer entre os principais compostos, sendo que o linalol não é sequer detectado na casta Antão Vaz (Tabela 3.1). O linalol, segundo Chizzola (2013), também é encontrado em muitos óleos essenciais, sendo por exemplo o principal composto nos óleos de lavanda (*L. angustifolia*). Soulimani & Joshi (2020) indicam que constitui um dos principais aromas florais da natureza, sendo encontrado nos óleos essenciais de mais de 200 espécies de plantas, pertencentes a diferentes famílias, sendo biossintetizado em tecidos florais e não florais. Miguel *et al.* (2004) detectaram, em óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas frescas de *Thymus albicans* Hoffmanns. & Link colhidas na Quinta do Lago (Algarve) durante a fase de floração, quantidades importantes de linalol (30%), enquanto Pereira *et al.* (2009) detectaram este composto em folhas de murta (*Myrtus communis* L.) colhidas em Sintra (Portugal), onde atingiu o seu pico na fase de pré-floração (Maio) (8%) e, a partir daí, as suas quantidades começaram a diminuir até atingir o mínimo na fase de floração (Julho) (6%), subindo novamente até à fase de frutos verdes (Setembro) (9%), e descendo depois até à fase de frutos maduros (Outubro) (8%).

A bibliografia consultada sobre *V. vinifera* revela que o geraniol foi também detectado e identificado em Matarese *et al.* (2014), onde apresentou uma concentração muito superior em folhas jovens (onde é o segundo composto em termos de concentração, com 24897  $\mu\text{g g}^{-1}$ , estando muito próximo do primeiro) comparativamente com as folhas maduras (concentração bastante inferior, com 3796  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), como se observa na Tabela 3.2. É, no entanto, importante referir que Matarese *et al.* (2014) recolheram as folhas jovens e maduras em Junho, ou seja, final da Primavera a início do Verão, ao contrário do que aconteceu neste trabalho, em que as folhas de Primavera foram colhidas em Maio, existindo assim diferentes momentos de colheita, para além de outras diferenças já mencionadas anteriormente (Tabela 3.2). Já o linalol, o composto maioritário nas folhas colhidas na Primavera, não foi detectado ou identificado nos outros estudos da bibliografia consultada (Tabela 3.2). O ácido palmítico, o acetato de fitol e o ácido linoleico são outros compostos que se destacam em folhas colhidas na Primavera e no Outono, pela sua composição percentual, contudo, nenhum dos três compostos foi detectado ou identificado nas referências bibliográficas sobre *V. vinifera* consultadas (Tabela 3.2). Esta dissertação também foi inovadora e original devido ao facto de não existir nenhum estudo em que fosse realizada uma distinção entre os compostos detectados e identificados em folhas colhidas na fase vegetativa e na fase de floração. Os que mais se aproximam da procura de uma diferença entre diferentes momentos de colheita são os estudos de Fernandes *et al.* (2015) e de Jordão *et al.* (2017), que colheram folhas em dois momentos distintos, 30 dias e 60 dias após a vindima, e encontraram também diferenças entre os compostos. Também não foram encontrados trabalhos que tivessem estudado uma casta branca e a uma casta tinta

em simultâneo, de forma a comparar os resultados obtidos para as duas castas, excepto Lima *et al.* (2017), que recorreram a uma casta branca (Malvasia Fina) e a uma casta tinta (Touriga Franca), tendo observado a existência de algumas diferenças ao nível dos compostos voláteis maioritários e das concentrações de certos compostos voláteis (Tabela 3.2).

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho procurou avaliar as diferenças dos perfis de voláteis de castas de videira com elevada (Alicante-Bouschet) ou reduzida (Antão Vaz) susceptibilidade ao ataque de cigarrinhas-verdes, neste caso *Jacobiasca lybica*, em dois momentos de colheita distintos: no Outono, mais concretamente em Novembro, na fase vegetativa da vinha e quando tinha sido sujeita às picadas dos insectos; e na Primavera, especificamente em Maio, quando a vinha se encontrava na fase de plena floração, com os bagos jovens em crescimento, ainda sem ter sido sujeita às picadas.

Existiram diferenças apreciáveis nos compostos identificados, em particular nos compostos maioritários, consoante o método de extracção utilizado (SPME ou hidrodestilação), destacando-se o facto de terem sido detectados um número de compostos voláteis bastante superior na hidrodestilação comparativamente com a SPME, para além dos compostos maioritários serem completamente distintos. Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes condições operativas (temperatura de extracção muito superior no caso da hidrodestilação), a duração das extracções (também superior no caso da hidrodestilação), mas essencialmente o facto da hidrodestilação ser um processo de extracção invasivo que requer calor e humidade, enquanto na SPME os voláteis apenas são extraídos do “headspace” do recipiente onde se encontra o material.

Os voláteis obtidos pelo método de SPME foram extraídos de folhas colhidas no Outono das duas castas estudadas e observou-se que os compostos detectados e identificados são praticamente idênticos, havendo apenas algumas diferenças no que diz respeito às composições percentuais de determinados compostos, e à detecção do  $\delta$ -elemeno apenas em Alicante-Bouschet. Tanto no caso da casta Alicante-Bouschet como da casta Antão Vaz, as composições percentuais dos compostos pertencentes ao grupo dos hidrocarbonetos sesquiterpénicos pode dever-se ao facto das folhas utilizadas para a extracção dos voláteis por SPME terem sido picadas pelas cigarrinhas-verdes e, como uma das actividades típicas dos hidrocarbonetos sesquiterpénicos é o seu envolvimento nos mecanismos de defesa contra insectos fitófagos, isso justificaria os aumentos observados nas emissões destes compostos em resposta a folhas picadas por insectos fitófagos, quando comparadas com as folhas saudáveis. Assim, a presença dos compostos voláteis identificados em folhas de Alicante-Bouschet e Antão Vaz é um mecanismo comum a várias espécies de plantas, onde se inclui *V. vinifera*, sendo os valores expressivos que esses compostos apresentam neste trabalho resultado do facto de algumas das folhas colhidas apresentarem evidências de terem sido atacadas por cigarrinhas-verdes, apresentando sintomas de *hopperburn*, mais visíveis em folhas de Alicante-Bouschet do que em folhas de Antão Vaz.

Nos óleos essenciais obtidos de folhas das duas castas por hidrodestilação, verificou-se essencialmente uma diferença nas composições percentuais dos seus compostos principais, nos dois momentos de colheita (Outono e Primavera). Os compostos dominantes e os compostos com composições percentuais importantes nos óleos essenciais de folhas colhidas no Outono foram essencialmente os mesmos nas duas castas, diferindo apenas nas composições percentuais, sendo que a principal diferença residiu no salicilato de metilo, apenas detectado em Alicante-Bouschet. Os voláteis das folhas verdes (GLVs) são importantes na defesa da planta e produzidos por estas geralmente em resposta a ferimentos, apresentando um aumento das suas emissões com o grau de dano ou ferimento, o que pode ajudar a explicar a maior composição percentual apresentada por compostos maioritários identificados neste trabalho, que pertenciam a esse grupo (GLVs), em folhas colhidas das duas castas no Outono (Novembro), uma vez que algumas dessas folhas apresentavam indícios de ataque (picadas) por parte das cigarrinhas-verdes, manifestando-se através de sintomas de *hopperburn*. As folhas das duas castas colhidas na Primavera eram sãs, não tendo sido alvo de ataques por parte das cigarrinhas-verdes, o que pode ajudar a explicar as menores composições percentuais destes compostos detectadas. Os ácidos linoleico e palmítico, envolvidos na defesa das plantas, registam aumentos das suas concentrações em folhas sujeitas a ferimentos ou infestadas por insectos, em comparação com folhas

não sujeitas a esses ferimentos ou infestações, algo semelhante ao ocorrido nesta dissertação, uma vez que os óleos essenciais das folhas de Alicante-Bouschet colhidas no Outono (algumas picadas pelas cigarrinhas-verdes), apresentavam quase o dobro da composição percentual em comparação com os óleos essenciais das folhas da mesma casta colhidas na Primavera, sendo também mencionado que o estado fenológico da planta pode influenciar os níveis deste composto. Também o ácido palmítico apresentou composições percentuais superiores em folhas das duas castas colhidas no Outono, comparativamente com as registadas na Primavera em folhas sãs. Uma das grandes diferenças entre as duas castas de videira prendeu-se com a presença exclusiva do salicilato de metilo em óleos essenciais de folhas de Alicante-Bouschet colhidas no Outono, composto não exclusivo de *V. vinifera*, que desempenha também um papel fundamental na defesa da planta, sendo emitido em níveis mais elevados por plantas danificadas em comparação com plantas não danificadas, em resposta a ataques por parte de insectos fitófagos. A capacidade de atrair inimigos naturais e repelir herbívoros sugere um papel importante para o salicilato de metilo na gestão de populações de pragas. Na Primavera, em que as folhas colhidas eram sãs, os componentes maioritários foram distintos aos detectados no Outono, sendo de assinalar que os componentes dominantes e outros que apresentaram percentagens assinaláveis, não variaram muito entre as duas castas nas folhas colhidas na Primavera, existindo apenas uma divergência ao nível das composições percentuais. Dois dos compostos com as maiores composições percentuais (geraniol e o linalol) estão também presentes em óleos essenciais de várias plantas como dois dos compostos mais abundantes. No presente trabalho, estes compostos apresentaram uma grande variação entre as folhas colhidas na fase vegetativa (Outono) e a fase de plena floração (Primavera), em relação às composições percentuais, uma vez que as percentagens observadas na Primavera são bastante superiores às registadas no Outono.

Regra geral, a comparação entre o presente trabalho e a bibliografia existente sobre os compostos voláteis presentes em folhas de *V. vinifera* mostrou grandes diferenças no que diz respeito aos compostos maioritários, existindo apenas algumas excepções, que se devem provavelmente a diferentes metodologias, regiões geográficas, estados fenológicos, etc.

Na presente dissertação, para além de terem sido avaliadas as diferenças dos perfis de voláteis de duas castas de videira com elevada e reduzida susceptibilidade ao ataque de cigarrinhas-verdes, era também um dos objectivos iniciais estudar a resposta das cigarrinhas-verdes aos voláteis principais em ensaios com olfactómetro dinâmico de múltipla escolha. Contudo, estes ensaios não foram realizados, uma vez que durante o ano de 2021, pelo menos na região Centro e Sul do país, locais onde foi realizado este trabalho, a densidade de cigarrinhas-verdes no Outono foi muito reduzida, ao contrário do ocorrido em anos anteriores, não tendo permitido colectar exemplares em tempo útil. Assim, no futuro devem ser realizados ensaios com olfactómetro dinâmico de múltipla escolha, para caracterizar eventuais chaves químicas usadas pelas cigarrinhas-verdes na selecção da casta de videira, podendo-se assim desenvolver estratégias de gestão baseadas na utilização de semioquímicos voláteis derivados de plantas, que alteram o comportamento da praga ou o dos seus inimigos naturais, através de um modo de acção não tóxico, não persistente, específico da espécie, económico e sem danos para o ambiente. Adicionalmente, poderá até ser implementado o *intercropping*, empurrando (*pushed*) as cigarrinhas-verdes para fora das vinhas através do recurso a repelentes voláteis de plantas não hospedeiras e, simultaneamente atraí-las (*pulled*) para culturas armadilha adjacentes. Uma vez que as cigarrinhas-verdes estejam concentradas na cultura armadilha, esta pode ser tratada se necessário com um insecticida sintético, sendo a área tratada reduzida em comparação com os sistemas convencionais onde toda a área da cultura é sujeita a tratamento químico. Nesta estratégia, os efeitos combinados de semioquímicos voláteis de armadilhas atractivas e plantas repelentes na entrelinha ou adjacentes à cultura podem resultar numa redução significativa dos prejuízos das cigarrinhas-verdes nas vinhas, levando a grandes melhorias nos ganhos de produtividade/rendimento da cultura.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaro, P. (2003). *A Protecção Integrada*. Lisboa: ISA/Press, pp.19-301.
- Anastasaki, E., Balayannis, G., Papanikolaou, N.E., Michaelakis, A.N. Milonas, P.G. (2015). Oviposition induced volatiles in tomato plants, *Phytochem. Lett.* 13: 262–266.
- Backus, E.A., Serrano, M.S., Ranger, C.M. (2005). Mechanisms of *hopperburn*: an overview of insect taxonomy, behavior, and physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 125-151.
- Bian, L., Cai, X. M., Luo, Z. X., Li, Z. Q., Xin, Z. J., Chen, Z. M. (2018). Design of an attractant for *Empoasca onukii* (Hemiptera: Cicadellidae) based on the volatile components of fresh tea leaves. *J. Econ. Entomol.* 111: 629-636.
- Biedermann, R., Niedringhaus, R. (2009). *The Plant- and Leafhoppers of Germany – Identification Key to all Species*; Scheeßel: WABV. ISBN 978-3-939202-01-1 (978-3-00-023535-1). 409 pp.
- Birkett, M.A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Yasuda, T. (2003). Volatiles from whitefly-infested plants elicit a host-locating response in the parasitoid, *Encarsia Formosa*. *J. Chem. Ecol.* 29: 1589–1600.
- Boukhris, M., Bouaziz, M., Sayadi, S. (2013). Comparative essential oil composition and antioxidant activity of flowers, leaves and stems of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) from Tunisia. *Acta Hort.* 997: 111–116.
- Bracho-Nunez, A., Welter, S., Staudt, M., Kesselmeier, J. (2011). Plant-specific volatile organic compound emission rates from young and mature leaves of Mediterranean vegetation. *J. Geophys. Res.: Atmos.* 116, D16304.
- Bruce, T. J. A., Pickett, J. A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects — Finding the right mix. *Phytochemistry.* 13: 1605–1611.
- Cai, X. M., Xu, X. X., Bian, L., Luo, Z. X., Chen, Z. M. (2015a). Measurement of volatile plant compounds in field ambient air by thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 407: 9105–9114.
- Cai, X. M., Xu, X.X., Bian, L., Luo, Z.X., Xin, Z.J., Chen, Z.M. (2015b). Attractiveness of host volatiles combined with background visual cues to the tea leafhopper, *Empoasca vitis*. *Entomol. Exp. Appl.* 157: 291–299.
- Candolfi, M.P., Jermini, M., Carrera, E., Candolfi-Vasconcelos, M.C. (1993). Grapevine leaf exchange, plant growth, yield, fruit quality and carbohydrate reserves influenced by the grape leafhopper, *Empoasca vitis*. *Entomol. Exp. Appl.* 69: 289–296.
- Chalal, M., Winkler, J.B., Gourrat, K., Trouvelot, S., Adrian, M., Schnitzler, J.P., Jamois, F., Daire, X. (2015). Sesquiterpene volatile organic compounds (VOCs) are markers of elicitation by sulfated laminarine in grapevine. *Front. Plant Sci.* 6: 350.
- Chen, K., Huang, M.X., Shi, Q.C., Xie, X., Jin, L.H., Xu, W.M., Li, X.Y. (2019). Screening of a potential leafhopper attractants and their applications in tea plantations. *J Environ Sci Health, Part B*, 54 (10): 858-865.
- Chen, W., Viljoen, A.M. (2010). Geraniol – a review of a commercially important fragrance material. *S. Afr. J. Bot.* 76: 643–651.
- Chizzola, R. (2013). Regular monoterpenes and sesquiterpenes (Essential oils). In *Natural Products*; Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; pp. 2973–3008.
- Coll Aráoz, M.V., Jacobi, V.G., Fernandez, P.C., Luft Albarracin, E., Virla, E.G., Hill, J.G., Catalan, C.A.N. (2019). Volatiles mediate host-selection in the corn hoppers *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Bull. Entomol. Res.* 109: 633–642.
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A., Ryan, C.A. (1996). Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiology* 111: 797-

- Copolovici, L., Pag, A., Kännaste, A., Bodescu, A., Tomescu, D., Copolovici, D., Soran, M.L., Niinemets, Ü. (2017). Disproportionate photosynthetic decline and inverse relationship between constitutive and induced volatile emissions upon feeding of *Quercus robur* leaves by large larvae of gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Environm Exp Botany* 138: 184–192.
- Council of Europe – COE. (2010). *European Directorate for the Quality of Medicines*. Europ. Pharm. 7th Edition. Strasbourg.
- Dietrich, C.H. (2009). Chapter 15 - Auchenorrhyncha: (Cicadas, Spittlebugs, Leafhoppers, Treehoppers, and Planthoppers), In *Encyclopedia of Insects* (Second Edition).; Vincent H. Resh, Ring T. Cardé, Academic Press. pp. 56-64, ISBN 9780123741448.
- Decante, D., van Helden, M. (2006). Population ecology of *Empoasca vitis* (Göthe) and *Scaphoideus titanus* (Ball) in Bordeaux vineyards: Influence of migration and landscape. *Crop Protection*, 25, 7, pp. 696-704, ISSN 0261-2194.
- Delrio, G., Lentini, A., Serra, G. (2001). Spatial distribution and sampling of *Jacobiasca lybica* on grapevine. *Integrated Control in Viticulture. IOBC/WPRS Bull.* 24 (7): 211 – 216.
- DRAPC. (s.d.).  
[https://www.drapc.gov.pt/base/geral/files/relatorio\\_actividades\\_eab\\_2008\\_anexo\\_doencas\\_vinha.pdf](https://www.drapc.gov.pt/base/geral/files/relatorio_actividades_eab_2008_anexo_doencas_vinha.pdf).  
 (Consultado em Junho 2021).
- Félix, A.P., Cavaco, A.M. (2009). *Manual de protecção fitossanitária para protecção integrada e agricultura biológica da vinha*. Direcção Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural/Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa, Portugal. 126 pp.
- Fernandes, B., Correia, A.C., Cosme, F., Nunes, F.M., Jordão, A.M. (2015). Volatile components of vine leaves from two Portuguese grape varieties (*Vitis vinifera* L.), Touriga Nacional and Tinta Roriz, analysed by solid-phase microextraction. *Nat. Prod. Res.* 29: 37–45.
- Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentão, P., Andrade, P., Bento, A., Pereira, J.A. (2013). *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Ind. Crops Prod.*, 43: 434–440.
- Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Barroso, J.G. (2017). Voláteis e óleos essenciais. Parte I/II. *Agrotec*, 24: 14 – 17.
- Forero, D. (2008). The systematics of the Hemiptera. *Rev. Col. Entomol.*, 34(1): 1-21.
- Fornasiero, D., Pavan, F., Pozzebon, A., Picotti, P., Duso, C. (2016). Relative infestation level and sensitivity of grapevine cultivars to the leafhopper *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.* 109(1): 416–25.
- Giuliani, C., Ascrizzi, R., Lupi, D., Tassera, G., Santagostini, L., Giovanetti, M., Flamini, G., Fico, G. (2018). *Salvia verticillata*: linking glandular trichomes, volatiles and pollinators. *Phytochem.* 155: 53–60.
- Giuliani, C., Bottoni, M., Ascrizzi, R., Santagostini, L., Papini, A., Flamini, G., Fico, G. (2020). *Scutellaria brevibracteata* subsp. *subvelutina* (Rech.f.) Greuter & Burdet: morphological and phytochemical characterization. *Nat. Prod. Res.* 36(1): 54-62.
- Gonçalves, E., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Henriques, J., Sousa, E., Bonifácio, L. (2020). Effect of *Monochamus galloprovincialis* feeding on *Pinus pinaster* and *Pinus pinea*, oleoresin and insect volatiles. *Phytochem.* 169:112159.
- Griesser, M., Weingart, G., Schoedl-Hummel, K., Neumann, N., Becker, M., Varmuza, K., Liebner, F., Schuhmacher, R., Forneck, A. (2015). Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). *Plant Physiol. Biochem.*, 88: 17–26.
- Han, S.J., Wang, M.X., Wang, Y.S., Wang, Y.G., Cui, L., Han, B.Y. (2020). Exploiting push-pull strategy to combat the tea green leafhopper based on volatiles of *Lavandula angustifolia* and

- Flemingia macrophylla*, *J. Integr. Agric.* 19(1): 193-203.
- Hassan, M.N., Zainal, Z., Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnol J*, 13: 727–739.
- Hebashi, K.A.H.; Fadel, H.M.; Soliman, M.M.A. (1991). Volatile components of grape leaves. *J. Isl. Acad. Sci.*, 4: 26–28.
- Herráez, E.F.T. (2018). *Plagas y patologías emergentes del viñedo: Enfermedad de Pierce & Empoasca Vitis*. Grau de Enginyeria Agroalimentari i del Medi Rural. Memòria del Treball de Fi de Grau. Escola Politècnica Superior. Universitat de les Illes Balears.
- Hu, S., Chen, Q., Guo, F., Wang, M., Zhao, H., Wang, Y., Ni, D., Wang, P. (2020). (Z)-3-Hexen-1-ol accumulation enhances hyperosmotic stress tolerance in *Camellia sinensis*. *Plant Mol. Biol.* 103, 287–302.
- Instituto da Vinha e do Vinho. (2021). [https://www.ivv.gov.pt/np4/754/%7B\\$clientServletPath%7D/?newsId=9543&fileName=Alentejo\\_2021.pdf](https://www.ivv.gov.pt/np4/754/%7B$clientServletPath%7D/?newsId=9543&fileName=Alentejo_2021.pdf). (Consultado em Junho 2021).
- Instituto da Vinha e do Vinho. (s.d.A). <https://www.ivv.gov.pt/np4/6953.html>. (Consultado em Junho 2021).
- Instituto da Vinha e do Vinho. (s.d.B). <https://www.ivv.gov.pt/np4/9570.html>. (Consultado em Junho 2021).
- Jordão, A.M., Correia, A.C., Nunes, F.M., Cosme, F. (2017). Influence of harvest date on volatile and sensory profile of vine leaves infusions from two Portuguese red grape varieties. *BIO Web Conf.* 9, 04007.
- Kanobe, C., McCarville, M.T., O’Neal, M.E., Tylka, G.L., MacIntosh, G.C. (2015). Soybean Aphid Infestation Induces Changes in Fatty Acid Metabolism in Soybean. *PLoS One*, 10(12): e0145660.
- Klerks, W., van Lenteren, J.C. (1991). Natural enemies of *Jacobiasca lybica* (De Berg): A literature survey. *Proc. Exper. and Appl. Entomol.* 2: 208-213.
- Klimm, F.S., Weinhold, A., Volf, M. (2020). Volatile production differs between oak leaves infested by leaf-miner *Phyllonorycter harrisella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and galler *Neuroterus quercus baccarum* (Hymenoptera: Cynipidae). *Eur. J. Entomol.* 117: 101–109.
- La Grange, R., Schröder, M., Glinwood, R., Ignell, R., Krüger, K. (2017). Leafhopper interactions with host plants – a role for volatile cues? *IOBC-WPRS Bull.* 126: 22–26.
- Lazazzara, V., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R., Perazzolli, M. (2018). Downy mildew symptoms on grapevines can be reduced by volatile organic compounds of resistant genotypes. *Sci. Rep.* 8:1618.
- Lee, J.C. (2010). Effect of methyl salicylate-based lures on beneficial and pest arthropods in strawberry. *Environ. Entomol.* 39: 653–60.
- Lentini, A., Delrio, G., Serra, G. (2000). Observations on the infestations of *Jacobiasca lybica* on grapevine in Sardinia. *IOBC/WPRS Bull.* 23(4): 127-129.
- Lima, A., Pereira, J.A., Baraldi, I., Malheiro, R. (2017). Cooking impact in color, pigments and volatile composition of grapevine leaves (*Vitis vinifera* L. var. Malvasia Fina and Touriga Franca). *Food Chem.* 221: 1197-1205.
- Łyczko, J., Jałoszyński, K., Surma, M., Masztalerz, K., Szumny, A. (2019). HS-SPME analysis of true lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) leaves treated by various drying methods. *Molecules*, 24: 764.
- Mączka, W., Winska, K., Grabarczyk, M. (2020). One hundred faces of geraniol, *Molecules*, 25: 3303.
- Malik, U., Barik, A. (2015). Free fatty acids from the weed, *Polygonum orientale* leaves for attraction of the potential biocontrol agent, *Galerucella placida* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biocontrol. Sci. Tech.* 25: 593–607.

- Mallinger, R.E., Hogg, D.B., Gratton, C. (2011). Methyl salicylate attracts natural enemies and reduces populations of soybean aphids (Hemiptera: Aphididae) in soybean agroecosystems. *J. Econom. Entom.* 104: 115–124.
- Matarese, F., Cuzzola, A., Scalabrelli, G., D’Onofrio, C. (2014). Expression of terpene synthase genes associated with the formation of volatiles in different organs of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*, 105: 12–24.
- Mauchline, A.L., Hervé, M.R., Cook, S.M. (2018). Semiochemical-based alternatives to synthetic toxicant insecticides for pollen beetle management. *Arthropod-Plant Inter.* 12: 835–847.
- Mazzoni, V., Lucchi, A., Varner, M., Mattedi, L., Bacchi, G., Bagnoli, B. (2003). First remarks on the leafhopper population in a vine-growing area of South-Western Sicily. *IOBC/WPRS Bull.* 26: 227-231.
- Miguel, M.G., Duarte, F., Venâncio, F., Tavares, R.J. (2004). Composition of the essential oils from Portuguese *Thymus albicans* collected at different regions of Ria Formosa (Algarve). *Journal of Essential Oil Research*, 16: 308-311.
- Moldão-Martins, M., Bernardo-Gil, M.G., Beirão da Costa, M.L., Rouzet, M. (1999). Seasonal variation in yield and composition of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* essential oil. *Flavour Frag J*, 14: 177–182.
- Mosna, A. (2005). *Dinamica di popolazione e parassitizzazione di Empoasca vitis Göthe in vigneti trentini a conduzione biologica*. MSc. Istituto Agrario di San Michele all'Adige.
- Mu, D., Cui, L., Ge, J., Wang, M.X., Liu, L.F., Yu, X.P., Zhang, Q.H., Han, B.Y. (2012). Behavioral responses for evaluating the attractiveness of specific tea shoot volatiles to the tea green leafhopper, *Empoasca vitis*. *Insect Sci.* 19: 229–238.
- Myung, K., Hamilton-Kemp, T.R., Archbold, D.D. (2006). Biosynthesis of *trans*-2-hexenal in response to wounding in strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1442–1448.
- Nickel, H. (2003). *The Leafhoppers and Planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects*. Co-published by Pensoft Publishers, Sofia-Moscow (ISBN 954-642-169-3) and Goecke & Evers, Keltern (ISBN 3-931374-09-2). 460 pp.
- Nie, C., Gao, Y., Du, X., Bian, J., Li, H., Zhang, X., Wang, C., Li, S. (2020). Characterization of the effect of *cis*-3-hexen-1-ol on green tea aroma. *Sci. Rep.* 10, 15506.
- Oliveira, A.P., Silva, L.R., de Pinho, P.G., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Silva, B.M., Pereira, J.A., Andrade, P.B. (2010). Volatile profiling of *Ficus carica* varieties by HS-SPME and GC-IT-MS. *Food Chem.* 123: 548–557.
- Olivier, C., Vincent, C., Saguez, J., Galka, B., Weintraub, P.G., Maixner, M. (2012). Leafhoppers and planthoppers: their bionomics, pathogen transmission and management in vineyards. In: *Arthropod management in vineyards: pests, approaches, and future directions*; Bostanian, N.J., Vincent, C., Isaacs, R., Editors. pp. 253-270. Springer.
- Pasquini, D., Detti, C., Ferrini, F., Brunetti, C., Gori, A. (2021). Polyphenols and terpenes in Mediterranean plants: an overview of their roles and possible applications. *Italus Hortus*, 28(1): 3-31.
- Pereira, A.M.N. (2002). Fitoplasmas associados à videira. *Vinidea.net - Revista Internet Técnica Do Vinho*. 1: 1-11.
- Pereira, P.C., Cebola, M.J., Bernardo-Gil, M.G. (2009). Evolution of the yields and composition of essential oil from portuguese myrtle (*Myrtus communis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules*, 14: 3094–3105.
- Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M.S., Gary, C., Lafond, D., Duso, C., Thiéry, D., Mazzoni, V., Anfora, G. (2017). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for implementation of IPM in

- viticulture. *Crop. Protec.* 97: 70–84.
- Quartau, J. A., Rebelo, M. T. (1992). Estudos preliminares sobre os cicadelídeos que constituem pragas das vinhas em Portugal (Homoptera, Cicadellidae). *Bol. San. Veg. Plagas.* 18(2): 407-417.
- Rebelo, M.T., Quartau, J.A. (1993). Estudo sobre o complexo de espécies do género *Empoasca* S.L. (Homoptera, Cicadellidae). Infestantes da vinha em Portugal. *Anais UTAD.* 5(1): 387-395.
- Reineke, A., Hauck, M. (2012). Larval development of *Empoasca vitis* and *Edwardsiana rosae* (Homoptera: Cicadellidae) at different temperatures on grapevine leaves. *J Appl Entomol.* 136: 654–664.
- Ren, Y., McGillen, M.R., Daële, V., Casas, J., Mellouki, A. (2020). The fate of methyl salicylate in the environment and its role as signal in multitrophic interactions. *Sci. Total Environ.* 749, 141406.
- Riolo, P., Minuz, R.L., Peri, E., Isidoro, N. (2017). Behavioral responses of *Hyalesthes obsoletus* to host-plant volatiles cues. *Arthropod-Plant Inter.* 11(1): 71–78.
- Rizvi, S., Raman, A. (2017). *Botrytis cinerea* (Helotiales Sclerotiniaceae)-induced changes in *Vitis vinifera* (Vitales Vitaceae) leaves influence the oviposition behaviour and life history of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera Tortricidae). *Ethol. Ecol. Evol.* 29: 574–588.
- Rowen, E., Gutensohn, M., Dudareva, N., Kaplan, I. (2017). Carnivore attractant or plant elicitor? Multifunctional roles of methyl salicylate lures in tomato defense. *J. Chem. Ecol.* 43: 573–585.
- Ryu, S.B., Wang, X. (1998). Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 1393: 193–202.
- Singewar, K., Fladung, M., Robischon, M. (2021). Methyl salicylate as a signaling compound that contributes to forest ecosystem stability. *Trees*, 35: 1755–1769.
- Soulimani, R., Joshi, R.K. (2020). Toxicological aspects and pharmaco-therapeutic properties of linalool, a natural terpene derivative of essential oils: *Literature studies. Am. J. Essent. Oil Nat. Prod.* 8(4): 24-34.
- Sumayo, M.S., Kwon, D.K., Ghim, S.Y. (2014). Linoleic acid-induced expression of defense genes and enzymes in tobacco, *J. Plant Physiol.* 171: 1757–1762.
- Sun, H., Zhang, F., Chen, S., Guan, Z., Jiang, J., Fang, W., Chen, F. (2015). Effects of aphid herbivory on volatile organic compounds of *Artemisia annua* and *Chrysanthemum morifolium*. *Biochem. Syst. Ecol.* 60: 225-233.
- Szutt, A., Dołhańczuk-Sródka, A., Sporek, M. (2019). Evaluation of chemical composition of essential oils derived from different *Pelargonium* species leaves. *Ecol. Chem. Eng. S*, 26: 807–816.
- Tamiru, A., Khan, Z.R. (2017). Volatile semiochemical mediated plant defense in cereals: a novel strategy for crop protection. *Agronomy* 7(3): 58.
- Tsolakis, H. (2013). Observations on population dynamics of leafhoppers in Western Sicily vineyards. Integrated Protection and Production in Viticulture. *IOBC/WPRS Bull.* 85: 197-202.
- Velásquez, A., Valenzuela, M., Carvajal, M., Fiaschi, G., Avio, L., Giovannetti, M., D’Onofrio, C., Seeger, M. (2020). The arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* induces changes and increases the concentration of volatile organic compounds in *Vitis vinifera* cv. Sangiovese leaf tissue. *Plant Physiol. Biochem.* 155: 437–443.
- Weingart, G., Kluger, B., Forneck, A., Krska, R., Schuhmacher, R. (2012). Establishment and application of a metabolomics workflow for identification and profiling of volatiles from leaves of *Vitis vinifera* by HS-SPME-GC-MS. *Phytochem Anal.* 23(4): 345-58.
- Xin, Z. J., Li, X. W., Bian, L., Sun, X. L. (2017). Tea green leafhopper, *Empoasca vitis*, chooses suitable host plants by detecting the emission level of (3Z)-hexenyl acetate. *B. Entomol. Res.* 107: 77–84.
- Xu, X., Cai, X., Bian, L., Luo, Z., Li, Z., Chen, Z. (2017). Does background odor in tea gardens mask attractants? Screening and application of attractants for *Empoasca onukii* Matsuda. *J. Econ.*

*Entomol.* 110: 2357–2363.

Zhang, Z., Chen, Z. (2015). Non-host plant essential oil volatiles with potential for a ‘push-pull’ strategy to control the tea green leafhopper, *Empoasca vitis*. *Entomol. Exp. Appl.* 156: 77–87.

Zhang, Z., Luo, Z., Gao, Y., Bian, L., Sun, X., Chen, Z. (2014). Volatiles from non-host aromatic plants repel tea green leafhopper *Empoasca vitis*. *Entomol. Exp. Appl.* 153: 156–169.