



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL E  
BIOPROCESSOS

**METABOLÔMICA PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE TOMATE  
TRATADOS COM POLISSACARÍDEO ISOLADO DA MACROALGA  
*ULVA FASCIATA***

**Dora dos Santos Costa**

**Rio de Janeiro**

**Novembro de 2023**

**DORA DOS SANTOS COSTA**

**METABOLÔMICA PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE TOMATE  
TRATADOS COM POLISSACARÍDEO ISOLADO DA MACROALGA  
*ULVA FASCIATA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de doutora sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Celuta Sales Alviano e co-orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Sales Alviano Moreno e do Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva.

Rio de janeiro

Novembro de 2023

## CIP - Catalogação na Publicação

d722" dos Santos Costa, Dora  
"Metabolômica pós-colheita de frutos de tomate tratados com polissacarídeo isolado da macroalga *Ulva fasciata* / Dora dos Santos Costa. -- Rio de Janeiro, 2023.  
215 f.

Orientadora: Celuta Sales Alviano.  
Coorientador: Antonio Jorge Ribeiro da Silva.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2023.

1. Metabolômica. 2. Tratamento pós-colheita. 3. Eliciação. 4. Bioestimulação. I. Sales Alviano, Celuta, orient. II. Ribeiro da Silva, Antonio Jorge, coorient. III. Título.



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal  
e Bioprocessos

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE DORA DOS SANTOS COSTA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).**

Aos vinte e sete dias do mês de novembro de dois mil e vinte e três, às 15 horas, reuniu-se via videoconferência, a Banca Examinadora abaixo discriminada para avaliação da Tese de Doutorado da aluna **Dora dos Santos Costa** intitulada "Metabolômica pós-colheita de frutos de tomate tratados com polissacarídeo isolado da macroalga *Ulva fasciata*", desenvolvida sob a orientação da **Prof<sup>a</sup>. Celuta Sales Alviano** e coorientação do **Prof. Antonio Jorge Ribeiro da Silva** e da **Dr<sup>a</sup>. Daniela Sales Alviano Moreno**. A apresentação feita pela candidata foi acompanhada da arguição pelos componentes da Banca. Em seguida, esta se reuniu para sua avaliação e a defesa foi considerada (B) (inserir letra apropriada).

- A) Aprovado;
- B) Aprovado com pequenas modificações\* a serem combinadas com o Presidente da Banca dentro de um mês;
- C) Não aprovado ainda, é necessária a apresentação das modificações/correções\* em uma nova versão do documento para o Presidente da Banca e uma carta do Presidente com prazo de máximo 3 meses para ser aprovada; se não reprovada
- D) Não aprovado ainda, é necessária uma nova apresentação\*, oral e escrita, para a mesma ou nova banca examinadora dentro de um prazo combinado com a comissão do Programa.
- E) Reprovado, razões da reprovação\* escritas no espaço destinado.

\*As modificações/correções/razões para reprovação precisam ser discriminadas e o Presidente da Banca e o(a) aluno(a) precisam estar cientes.

E, para constar, foi lavrada a presente ata que vai devidamente assinada pelo coordenador, pelos membros da Banca Examinadora, pelo Presidente da Banca Examinadora e pelo orientadores do aluno, que ficará com uma via da ata e entregará outra para a secretaria do PBV.

Rio de Janeiro, 08 de novembro de 2023.



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde

Coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal  
e Bioprocessos

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE DORA DOS SANTOS COSTA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM CIÊNCIAS (BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS).**

Documento assinado digitalmente



BIANCA ORTIZ DA SILVA  
Data: 10/12/2023 15:44:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr<sup>a</sup>. Bianca Ortiz da Silva – Coordenadora

Documento assinado digitalmente



MAITE VASLIN DE FREITAS SILVA  
Data: 05/12/2023 11:51:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr<sup>a</sup>. Maitê Vaslin de Freitas Silva – UFRJ

*Rodrigo P. Nascimento*

Dr. Rodrigo Pires do Nascimento – UFRJ



Professor-Pesquisador (UFRJ)  
Matrícula UFRJ: 1668708  
STAPE: 1550993

Documento assinado digitalmente



JEAN LUIZ SIMOES DE ARAUJO  
Data: 08/12/2023 08:37:15-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Jean Luiz Simões de Araújo – Embrapa

Documento assinado digitalmente



FERNANDA OLIVEIRA DAS CHAGAS  
Data: 05/12/2023 15:19:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Oliveira das Chagas - UFRJ

Documento assinado digitalmente



RICARDO MOREIRA BORGES  
Data: 31/01/2024 07:24:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Ricardo Moreira Borges – UFRJ

*Celuta Sales Alviano*

Dr<sup>a</sup>. Celuta Sales Alviano (Orientadora)

Documento assinado digitalmente



ANTONIO JORGE RIBEIRO DA SILVA  
Data: 11/12/2023 09:15:44-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva (Coorientador)

*Daniela Sales Alviano Moreno*

Dr<sup>a</sup>. Daniela Sales Alviano Moreno (Coorientadora)

Documento assinado digitalmente



DORA DOS SANTOS COSTA  
Data: 13/12/2023 21:49:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dora dos Santos Costa (Doutoranda)

**LISTA DE MODIFICAÇÕES, CORREÇÕES OU RAZÕES PARA REPROVAÇÕES:**

Ciente,

Ciente,

Presidente da Banca

Aluno

Documento assinado digitalmente



MAITE VASLIN DE FREITAS SILVA  
Data: 05/12/2023 11:50:22-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Centro de Ciências da Saúde – Bloco K  
Sala K2-032 – 2º andar – Cidade Universitária  
CEP: 21941-590 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil  
Tel: +552139386676 - E-mail: [pbv@ccsdecania.ufrj.br](mailto:pbv@ccsdecania.ufrj.br)



Documento assinado digitalmente

DORA DOS SANTOS COSTA  
Data: 13/12/2023 21:47:23-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico este trabalho especialmente à minha mãe,  
minha tia Denise e a toda minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Fernando e Cláudia (*in memoriam*), por todos esses anos de amor e valores, que ao longo dos anos fizeram de mim uma pessoa melhor. Aos meus avós Adelino (*in memoriam*) e Juraci, ao meu irmão Péricles e às minhas tias Denise (*in memoriam*) e Liliane que junto com meus pais me deram toda a força e apoio para que eu me tornasse bióloga e ainda agora, para que eu continuasse os meus estudos.

Agradeço também aos meus orientadores Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Celuta Sales Alviano e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Sales Alviano Moreno por terem acreditado em mim desde o início e por todos terem me dado sempre todo o apoio e incentivo para concluir a defesa desta tese.

Gostaria de agradecer também aos colegas do laboratório de Análise Fitoquímica (LAF) Daniel Simas, Tairini Silva, Urbano de Paula, Samara Lima, Nathan e também aos colegas do Laboratório de Análise de Estruturas de Superfícies de Microrganismos (LESM) com quem pude ter o prazer de trabalhar e de sorrir em meio as nossas pesquisas nesses anos de doutoramento.

Agradeço especialmente ao pessoal do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM), especialmente Sulamita Correa e Júnia Shultz, e do Laboratório de Genética Molecular Vegetal (LGMV), especialmente ao Prof. Dr. Márcio Alves e ao Juan David pelo uso de equipamentos fundamentais para a condução dos experimentos inerentes a esta tese. Agradeço também ao Prof. Dr. Vinicius Peruzzi e ao pessoal do Laboratório Multiusuário de Análises Ambientais pelo espaço para condução dos experimentos, e especialmente à Dra. Tiphane Figueira por me apresentar o trabalho com o polissacarídeo ulvana. Além destes, gostaria de agradecer também a EMBRAPA Meio Ambiente pelo fornecimento de estirpes fúngicas. E, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia vegetal e Bioprocessos (PBV) agradeço pelo suporte e compreensão principalmente durante a pandemia e aos seus desdobramentos. Da mesma forma, agradeço às agências de fomento CAPES pela bolsa e extensão concedida e também à FAPERJ e ao CNPq que mesmo que indiretamente, fornecem o suporte financeiro para a condução de experimentos, devido ao apoio financeiro de projetos e manutenção de equipamentos.

Agradeço aos técnicos Ari Miranda e Gisele Oliveira da Central Analítica do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) por todo empenho e zelo na condução das análises de CLAE/EM e de CG/EM, respectivamente. E também às técnicas Nívea e Andrea também da Central Analítica do IPPN pelo empenho nas análises de CLAE.

Por fim, gostaria de agradecer a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), minha segunda casa nesses anos e a todos os colegas do programa com quem tive o prazer de trabalhar e de conhecer nessa caminhada.

A todos meu muito obrigada! E que venham novos tempos e novas experiências enriquecedoras e felizes nessa etapa que se avizinha!



Não existe um único território onde os seres vivos nativos estejam hoje tão adaptados uns aos outros e ao meio onde vivem que nenhum deles possa adaptar-se melhor ainda, ou ser mais aperfeiçoado.

A origem das espécies – Charles Robert Darwin (1859)

Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma  
Antoine Laurent de Lavoisier (1743-1794)

## RESUMO

O tomate é uma hortaliça amplamente consumida e um valioso sistema modelo para pesquisas sobre amadurecimento e pós-colheita. Os desafios na pós-colheita desse fruto incluem a suscetibilidade a patógenos fúngicos, como o *Botrytis cinerea* que gera perdas econômicas significativas, especialmente em países em desenvolvimento. O uso excessivo de fungicidas sintéticos levanta preocupações de segurança alimentar e resistência dos fungos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com ulvana, um polissacarídeo obtido da macroalga marinha *Ulva fasciata*, sobre o metabolismo de frutos de tomate. Assim, inicialmente a ulvana foi aplicada em concentrações de 0,5; 1; 2 e 4 mg/mL. A ulvana foi utilizada em duas formas de administração: injeção direta no fruto ou imersão em solução aquosa contendo ulvana por 30 minutos. Durante um período de nove dias, foram avaliadas as mudanças no metabolismo primário e secundário dos tomates, Compostos Orgânicos Voláteis (COVs), carotenoides e ácido ascórbico por técnicas como CG/EM, CLAE e CLAE/EM. Houve um aumento significativo nos níveis de ácidos graxos benéficos para a saúde e também para a defesa vegetal, esteroides e compostos antioxidantes nos tomates tratados com ulvana. Além disso, a emissão de COVs derivados de ácidos graxos diminuiu. A refrigeração aumentou o tempo de prateleira, com 80% de proteção após 32 dias de armazenamento em comparação com os controles. Além disso, os ensaios de desafio demonstraram que a ulvana reduziu o desenvolvimento de *B. cinerea* nos frutos. A atividade enzimática aumentada, em particular da fenilalanina amônia-liase (PAL) e catalase (CAT), sugere que a ulvana pode reforçar a parede celular vegetal. A ulvana não foi capaz de modular a concentração de vitamina C, mas aumentou a produção de esculeosídeo A. Os resultados mostraram que o uso da ulvana foi uma estratégia eficaz para melhorar a qualidade, prolongar o tempo de prateleira dos tomates e essencialmente pode atuar tanto como um bioestimulante quanto como um eliciador.

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersium* L., eliciador, bioestimulante, agricultura orgânica.

## ABSTRACT

Tomato is a widely consumed vegetable and a valuable model system for research on ripening and post-harvest processes. Post-harvest challenges for this fruit include susceptibility to fungal pathogens, such as *Botrytis cinerea*, which causes significant economic losses, especially in developing countries. The overuse of synthetic fungicides raises concerns about food safety and fungal resistance. This study aimed to evaluate the effects of treatment with ulvan, a polysaccharide obtained from the marine macroalga *Ulva fasciata*, on the metabolism of tomato fruits. Initially, ulvan was applied at concentrations of 0.5, 1, 2, and 4 mg/mL. Ulvan was used in two forms of administration: direct injection into the fruit or immersion in an aqueous solution containing ulvan for 30 minutes. Over a period of nine days, changes in the primary and secondary metabolism of tomatoes, Volatile Organic Compounds (VOCs), carotenoids, and ascorbic acid were evaluated using techniques such as GC/MS, HPLC, and HPLC/MS. There was a significant increase in levels of health-beneficial fatty acids and defense compounds, steroids, and antioxidants in tomatoes treated with ulvan. Furthermore, the emission of VOCs derived from fatty acids decreased. Refrigeration increased shelf life, providing 80% protection after 32 days of storage compared to controls. Additionally, challenge assays demonstrated that ulvan reduced the development of *B. cinerea* in fruits. Increased enzymatic activity, particularly phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and catalase (CAT), suggests that ulvan may enhance the plant cell wall. Ulvan was unable to modulate the concentration of vitamin C but increased the production of esculeoside A. The results indicated that the use of ulvan was an effective strategy to improve the quality, extend the shelf life of tomatoes, and essentially act as both a biostimulant and an elicitor.

**Keywords:** *Solanum lycopersium* L., elicitor, biostimulant, organic agriculture.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação brasileira e americana de tomates de acordo com a coloração e estado de maturação.	18
Figura 2 - Uma visão geral esquemática das conexões entre o metabolismo primário e as principais vias metabólicas secundárias dos frutos do tomate.	21
Figura 3 - Principais fitopatógenos pós-colheita do tomate.	23
Figura 4 - Exemplar de <i>U. fasciata</i> .	27
Figura 5 - Avaliação da melhor concentração de ulvan para preservação de tomates.	41
Figura 6 - Ensaio do experimento de resposta enzimática e índice de proteção (%) de tomates mediante tratamento com solução de ulvana injetada ou em imersão comparadas com controles injetados com água destilada ou em imersão.	43
Figura 7 - Ensaio do tempo de prateleira e índice de proteção (%) de tomates tratados com solução de ulvan por imersão comparadas com controles com água destilada em imersão em temperatura ambiente ou sob refrigeração.	44
Figura 8 - Ensaio de desafio e análise dos perfis dos metabolismos primário e secundário de controles em comparação com os tratados.	45
Figura 9 - Análise da PAL.	47
Figura 10 - Análise de CAT.	48
Figura 11 - Análise de APX.	49
Figura 12 - Metodologia de extração e derivatização de metabólitos polares.	50
Figura 13 - Metodologia de extração e derivatização de metabólitos apolares.	53
Figura 14 - Metodologia para análise do metabolismo secundário dos frutos de tomate.	54
Figura 15 - Metodologia de extração de carotenoides.	57
Figura 16 - Metodologia de extração para dosagem de ácido ascórbico.	59
Figura 17 - Ensaio do experimento de análise de voláteis em amostras controle, tratadas com ulvan ou inoculadas com <i>B. cinerea</i> .	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições cromatográficas CG/EM.	51
Tabela 2 - Condições cromatográficas para análise de metabólitos secundários de tomate por CLAE/EM.	56
Tabela 3 – Condições cromatográficas para análise de carotenoides em tomates por CLAE.	58
Tabela 4 – Condições cromatográficas para análise COVs em tomates por CG/EM.	62

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 Tomate</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1.1 Tomate var. <i>Sweet Grape</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 Produção mundial de tomate e perdas ao longo da cadeia de produção</b> ...	<b>17</b>
<b>1.3 Tomate, qualidade e tempo de prateleira</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4 Fitopatologias pós-colheita em tomates e perdas ao longo da cadeia produtiva</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5 Prevenção e combate de doenças pós-colheita em tomates</b> .....	<b>25</b>
<b>1.6 Elicidores e bioestimulantes</b> .....	<b>25</b>
<b>1.6.1 Ulvana</b> .....	<b>26</b>
<b>1.7 Metabolômica como ferramenta para o desenvolvimento de estratégias para melhoramento do tomate</b> .....	<b>32</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>38</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 Reagentes e solventes</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 Material vegetal e ulvana</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.1 Tomate</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.2 Macroalga <i>Ulva fasciata</i></b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.3 Preparação da solução de ulvana</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3 Desenho experimental</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3.1 Avaliação da melhor concentração de ulvan para preservação de tomates</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3.2 Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (CMI) do polissacarídeo ulvana isolado da macroalga <i>Ulva fasciata</i> sobre o fitopatógeno <i>B. cinerea</i></b> .....	<b>42</b>
<b>4.3.3 Avaliação de resposta enzimática e índice de proteção (%) de tomates mediante tratamento com solução de ulvan injetada ou em imersão comparadas com controles injetados com água destilada ou em imersão</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3.4 Avaliação do tempo de prateleira e índice de proteção (%) de tomates tratados com solução de ulvan por imersão comparadas com controles com água destilada em imersão em temperatura ambiente ou sob refrigeração</b> .....	<b>44</b>

4.3.5 Ensaio de desafio e comparação entre tomates infectados com <i>B. cinerea</i> , tratados com ulvana e infectados 3 e 6 dias após o tratamento visando avaliar efeito de eliciação	45
4.4 Análises	47
4.4.1 Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX)	47
4.4.2 Análise do perfil do metabolismo primário de compostos polares (CG/EM) em amostras tratadas e controles	50
4.4.3 Análise do perfil do metabolismo primário de compostos apolares (CG/EM) em amostras tratadas e controles	53
4.4.4. Análise do perfil do metabolismo secundário vegetal (CLAE/EM)	55
4.4.5 Análise do perfil de carotenoides (CLAE) e quantificação de carotenoides totais em amostras tratadas e controles	57
4.4.6 Quantificação de ácido ascórbico	60
4.4.7 Análise de Compostos Orgânicos Voláteis (HS-SPME-CG/EM)	61
4.5 Identificação de metabólitos por CG/EM e por CLAE/EM	63
4.6 Estatística	64
5. RESULTADOS	64
5.1 Capítulo 1	64
5.1.1 Extension of Solanaceae food crops shelf life by the use of elicitors and sustainable practices during postharvest phase	64
5.2 Capítulo 2	65
5.2.1 Ulvan polysaccharide enhances enzyme-related defense activity and modulates VOCs emission and secondary metabolism profile of postharvest <i>Solanum lycopersicum</i> cv <i>Sweet Grape</i>	65
5.3 Capítulo 3	103
5.3.1 Postharvest treatment with ulvan polysaccharide modulates lipid metabolism in tomato fruits ( <i>Solanum lycopersicum</i> cv. <i>Sweet Grape</i> )	103
6. DISCUSSÃO	145
7. CONCLUSÃO GERAL	164
7. REFERÊNCIAS	165
Apêndice 1 – Cromatogramas	186

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é originário da América do Sul (Peru, Bolívia e Chile), onde são encontradas várias espécies selvagens, tendo sido domesticada na América Central, no México. No Brasil o tomate foi introduzido pelos portugueses, tendo sua produção valorizada apenas a partir da chegada de imigrantes italianos e alemães no final do século XIX (Nascimento *et al.*, 2022). A planta pertence à família Solanaceae que inclui outras culturas alimentares de importância econômica tais como a batata (*S. tuberosum* L.), pimentão e pimentas *Capsicum*, berinjelas (*S. melongena*), melão-andino (*S. muricatum*), *naranjillas* (*S. quitoense* Lam), *tamarillos* ou tomates de árvore (*S. betaceum*) (Gebhardt, 2016).

O tomateiro possui um ciclo de vida que varia entre 90 e 110 dias aproximadamente e é plantado em praticamente todo o Brasil, com destaque para os estados de Goiás (principalmente de tomate industrial), de São Paulo (25%) e de Minas Gerais, com a maior produção de tomate de mesa (20%) (Brandão-filho *et al.*, 2018). É a segunda hortaliça ou fruto mais consumido no mundo depois da batata (*S. tuberosum* L.), sendo produzidos aproximadamente 182,3 milhões de toneladas anualmente em 4,85 milhões de hectares (Quinet *et al.*, 2019). É considerado como uma cultura de elevado risco, uma vez que está suscetível a não atingir os patamares de produtividade esperados, sendo influenciada por diversos fatores, que variam desde doenças após a colheita até perdas decorrentes de condições ambientais desfavoráveis, capazes de comprometer a produção (Fernandes *et al.*, 2007; Monte *et al.*, 2013). O fruto do tomate é sensível a temperaturas abaixo de 10°C (levando a danos por frio) e acima de 28°C (levando ao estresse térmico), o que resulta em danos. Isso limita o uso do armazenamento refrigerado por longos períodos e o transporte de longa distância durante os verões quentes, resultando em perdas significativas. Tais perdas pós-colheita representam desafios para a segurança alimentar e causam prejuízos econômicos durante o armazenamento e transporte de longa distância. A ciência da fisiologia e bioquímica pós-colheita de frutas e vegetais,



incluindo o tomate, passou por mudanças nos últimos anos com a introdução de abordagens moleculares e bioquímicas avançadas. Inclusive, justamente por apresentar um ciclo de vida rápido e perecível, essa hortaliça também se tornou um modelo estabelecido para o estudo detalhado do desenvolvimento de frutos carnosos, abrangendo as etapas de amadurecimento, pós-colheita e senescência (Anwar *et al.*, 2019).

Os frutos são ricos em compostos fenólicos, incluindo quercetina, kaempferol, ácido cafeico, naringenina, ácido clorogênico, luteína, ácido ferúlico, licopeno, resveratrol, catequina, rutina e luteolina (Ali *et al.*, 2020). Mas, em se tratando de doçura, os minitomates como as variedades cereja e uva ou *grape* têm se destacado entre os tipos de tomate que vêm apresentando alta demanda para consumo *in natura* principalmente os provenientes de híbridos especiais, como o tomate *Sweet Grape* (Guilherme *et al.*, 2014; da Paixão *et al.*, 2022). . Em comparação, um tomate médio de mesa é constituído pelos minerais sódio (56,90-80,65 mg/100g), potássio (13,63-1097,00 mg/100g), cálcio (48,47-162,07 mg/100g), magnésio (76,87-265,93), fósforo (173,00-379,31 mg/100g), cloro (517,24 µg/100 g), boro (25,84-48,59 µg/g), níquel (0,66 mg/100g), nitrato (86,21-459,00 mg/100g), ferro (1,50-6,45 mg/100g), zinco (0,17-3,17 mg/100g), cobalto (10,00-29,31 mg/100g), cobre (0,06-1,10 mg/100g), manganês (0,11-1,88 mg/100g), cromo (60,00-327,59 µg/100 g), iodo (0,18-3,97 mg/100g), flúor (413,79 µg/100 g), alumínio (1241,38 µg/100 g), silício (46,55 µg/100 g), selênio (10,00-16,90 µg/100 g), chumbo (1,15-1,27 µg/g), cádmio (0,11-0,22 µg/g), arsênico (0,19-0,20 µg/g); vitaminas A (267,33–833,00 IU/100 g), E (14,02-16,13 µg/100 g), K (98,28 µg/100 g), tiamina (0,04-0,98 mg/100g), riboflavina (0,02-0,81 mg/100g), niacina (9,68 mg/100g), ácido pantotênico (4,52-5,34 mg/100g), vitamina B6 (1,29-1,72 mg/100g), biotina (68,97 µg/100 g), folato (13,00-15,00 mg/100g); proteínas totais (10,50-25,03 g/100g), lipídios (3,62-5,39 g/100g), açúcares totais (47,00-56,45 g/100g), fibras totais (1,32-19,36 g/100g), pH (3,61-4,08), acidez (0,39-0,55%), umidade (68,03-96,17 g/100g) e energia (18,00-75,00 kcal-100g). Além disso, o tomate de mesa é rico em aminoácidos diversos, principalmente o ácido glutâmico (5,69-14,56 g/100g de proteína) e também em carotenoides, principalmente β-

caroteno (3677,42–10,206.90 µg/100 g), licopeno (5020,00–11110,00 µg/100 g) e fitoeno (430,00–1860,00 µg/100 g) (Ali *et al.*, 2020).

### 1.1.1 Tomate var. *Sweet Grape*

Entre os tipos de tomate lançados em um período relativamente recente no mercado, destacam-se os tomates do tipo cereja ou quais possuem tamanho mini, cor vermelho intenso, firmeza e um valor nutricional por vezes maior que o de outras variedades (Nellis *et al.*, 2017). Dentre os híbridos, destaca-se a cultivar *Sweet Grape*, que foi desenvolvida na Ásia pela empresa Sakata, do ramo de sementes na década de 1990, mas a espécie só chegou no Brasil no início dos anos 2000 (Junqueira *et al.*, 2011).

No Brasil, os tomates dessa variedade são produzidos majoritariamente nas regiões Sudeste e Centro-oeste, podendo ser produzidos hidroponicamente ou em substrato (Cunha *et al.*, 2014). Por tomateiro, é esperada a produção de cerca de 8 a 10 kg de tomate, dependendo das condições de cultivo (Canal Rural, 2010; Laranja, 2017). Apesar de os dados disponíveis especificamente sobre o segmento de tomates grape não serem muito recentes, estima-se que a produção brasileira da cultivar esteja em torno de quase uma centena de toneladas por ano (Junqueira, 2011; Sandri *et al.*, 2015).

Atualmente, são comercializados cerca de 20 tipos de tomate *Sweet Grape*, ao menos nos Estados Unidos (Coker *et al.*, 2008). O tomate *Sweet Grape* possui tamanho menor que o tomate cereja e apresenta massa entre 10 e 20g (podendo variar), formato alongado, coloração vermelho intenso no pericarpo fino e liso e da polpa, baixo índice de acidez, e ganhou popularidade pelo sabor mais adocicado devido à concentração elevada de açúcar, podendo ser consumido como fruta ou tira-gosto (Coker *et al.*, 2018). Enquanto o tomate tradicional de mesa possui grau Brix (concentração de sólidos solúveis totais, principalmente de açúcares) entre 4 a 6, as variedades Grape chegam entre 9 a 12 graus Brix (Junqueira *et al.*, 2011). Além disso, possui baixas calorias, altos teores de vitaminas A, B e C e também de carotenoides como, por exemplo, o licopeno (Coker *et al.*, 2018), quando comparados ao tomate de

Em relação à vitamina C, um tomate de mesa costuma apresentar uma concentração em torno de 14 mg/100g no estágio “vermelho” de maturação (Singh *et al.*, 2016), enquanto que o *Sweet Grape* apresenta entre 28-49 mg/100g (Sandri *et al.*, 2015; Eisele *et al.*, 2022).

Recentemente, carotenoides como o licopeno, na dieta e sob outras formas de administração, têm atraído atenção na comunidade científica por sua capacidade tanto de inibir quanto de prevenir o crescimento de tumores e de induzir a apoptose de células cancerígenas (Chatterjee *et al.*, 2012; Bolhassani *et al.*, 2017; Koklesova *et al.*, 2020). Os híbridos do segmento *grape* apresentam genótipos de maior resistência à perfuração e compressão do que os tomates do tipo salada que são convencionalmente os mais consumidos: por exemplo, os genótipos BRSIG, Santa West e Sweet Heaven apresentam pericarpo mais espesso (na ordem do maior para o menor, respectivamente), o que lhes garantem mais firmeza, menos perda de água e conseqüentemente uma barreira física mais resistente à entrada de patógenos e a danos pós-colheita causados por transporte e manuseio pelo consumidores (Eisele *et al.*, 2022). No mesmo estudo, Eisele *et al.* (2022) identificou que BRSIG, Dulce, *Sweet Heaven* e SCI-023 apresentaram os maiores índices de antioxidantes do maior para o menor, respectivamente; por outro lado, outro estudo (Maruyama *et al.*, 2015) identificou a variedade BRS Zamir como apresentando o maior teor de antioxidantes e inclusive um teor maior de licopeno (144 mg/kg) do que o encontrado em um estudo publicado pouco tempo depois que era de 114 mg/kg (Embrapa, 2016). Provavelmente, essas variações nos índices de qualidade estão fortemente relacionadas a diferença no genótipo e com a época de plantio (Gong *et al.*, 2022). É possível afirmar que, nutricionalmente, o teor de carotenoides como o licopeno e de vitamina C são os principais diferenciais do *Sweet Grape* em relação ao tomate de mesa convencional.

## 1.2 Produção mundial de tomate e perdas ao longo da cadeia de produção

No **Capítulo 1**, revisamos o uso de eliciadores de defesa de plantas para extensão da vida útil das quatro principais culturas alimentares de Solanaceae:

batatas (*S. tuberosum*), tomates (*S. lycopersicum*), berinjelas (*S. melongena*) e pimentões *Capsicum* (pimentas e pimentões). É fornecida uma visão geral da produção mundial e das perdas destas culturas a partir de 2006, juntamente com as atuais propostas sobre os mecanismos de colonização de plantas por patógenos e a resistência induzida no hospedeiro, bem como a fisiologia e a bioquímica envolvidas no uso de elicitores durante a fase pós-colheita. Também foi feita uma pesquisa sobre patentes e artigos publicados sobre este assunto de 2015 a 2020. O artigo foi publicado no ano de 2022.

### 1.3 Tomate, qualidade e tempo de prateleira

A legislação brasileira, de acordo com a Instrução Normativa nº 33, de 18 de julho de 2018, define como qualidade o conjunto de características extrínsecas ou intrínsecas de um produto que permitem determinar as suas especificações quantitativas, baseando-se nos aspectos relativos à tolerância de defeitos, teor de fatores essenciais de composição, características sensoriais, parâmetros higiênico-sanitários, tecnológicos ou qualquer outro aspecto que possa influenciar na utilização ou consumo do produto (Brasil, 2018). A própria legislação preconiza que, de acordo com a coloração e estado de maturação os tomates podem estar no ponto de colheita e serem classificados em cinco subgrupos: verde maduro (completamente verde, com leve amarelecimento da região apical, porém com tecidos internos formados); pintado (10 a 30% da superfície vermelha), rosado (30 a 60% da superfície vermelha), vermelho (60 a 90% da superfície vermelha) e vermelho maduro (mais de 90% da superfície vermelha) (Brasil, 2018), conforme exemplificado na Figura 1, adaptada de Shinozaki *et al.* (2018). Tal classificação em função do grau de maturação não é mesma no mundo todo. Por exemplo, de acordo com a legislação americana existem 6 estados de maturação: *green*, *breaker*, *turning*, *pink*, *light-red* e *red* (USDA, 1991), os quais assemelham-se aos parâmetros de classificação nacional exceto pelo estado *Breaker*, o qual aparentemente é um intermediário entre os nacionais verde e pintado.

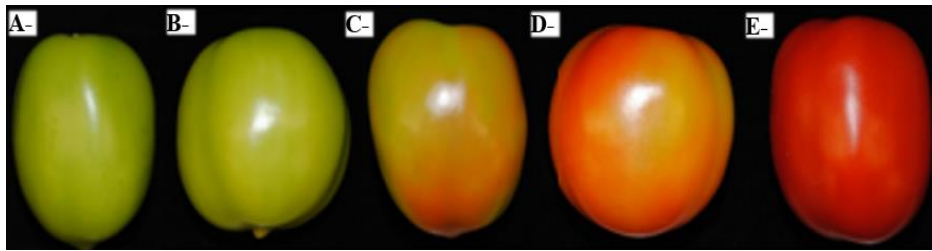


Figura 1 - Classificação brasileira e americana de tomates de acordo com a coloração e estado de maturação. A) verde maduro (completamente verde, com leve amarelecimento da região apical, porém com tecidos internos formados); B) pintado (10 a 30% da superfície vermelha); C) rosado (30 a 60% da superfície vermelha), D) vermelho (60 a 90% da superfície vermelha) e E) vermelho maduro (mais de 90% da superfície vermelha). Fonte: Adaptado de Shinozaki *et al.* (2018).

Em se tratando especificamente de tomates, os frutos deverão apresentar as características da cultivar bem definidas, sanidade vegetal e livre de podridões, estarem limpos, inteiros, firmes e com coloração uniforme, estarem livres de umidade externa anormal, de odor e de sabor que não seja o característico. Uma vez que o lote não esteja dentro desses requisitos, o mesmo não poderá ser comercializado para consumo *in natura*; no entanto, ainda pode ser rebeneficiado, dependendo de seu estado de conservação, para outros fins que não sejam o consumo *in natura* (Brasil, 2018), como por exemplo para a indústria na fabricação de derivados como molhos.

No que compete aos principais requisitos para o consumo *in natura*, as principais definições são descritas a seguir, de acordo com interpretação da legislação (Brasil, 2018):

*I-Tomate firme:* Não apresentar sinais de amadurecimento, ou seja, o pericarpo não ceder à pressão manual.

*II- Tomate inteiro:* Não apresentar manchas (menos que 5% da superfície) ou má-formações que comprometam seriamente a aparência, a conservação e a qualidade do produto, o que acaba por restringir o seu uso, tais como: danos por frio, geada, profundos, imaturidade, podridões, queimados ou golpes severos de sol ou ainda frutos extremamente maduros (sobremaduros).

*III- Tomate limpo:* fruto livre de impurezas tais como terra, areia, matéria orgânica ou qualquer outra substância que afete a sua aparência, odor ou sabor. Não

devem apresentar elementos ou agentes que comprometam a higiene do produto e devem estar livres de umidade externa anormal.

*IV- Sanidade vegetal e livre de podridões:* sem dano patológico, ou seja, causado por microrganismos (podridões) e/ou fisiológico que implique em qualquer grau de decomposição, desintegração ou fermentação dos tecidos.

Uma vez que tais características sejam preservadas, espera-se que o tempo de prateleira do fruto seja conhecido. Para fins de esclarecimento, define-se como tempo de prateleira de um alimento como o tempo em que o produto, mediante estado de conservação condições de temperatura conhecidas, desenvolve alterações consideradas aceitáveis para consumo pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar (Moura *et al.*, 2007). Particularmente, para o tomate o tempo de prateleira pode variar aproximadamente entre 10 e 22 dias (Sinha *et al.*, 2019); no entanto, existem abordagens de engenharia genética e melhoramento bem como tratamentos pós-colheita sob estudo que podem estender esse tempo por até aproximadamente 40 dias ou mais, chegando até a 90 dias, retardando o amadurecimento do fruto (Majidi *et al.*, 2014), por exemplo. Tais tecnologias serão exemplificadas e discutidas no subtópico **1.6 Elicidores e bioestimulantes**.

Para fins de curiosidade, no ano de 2022, o Ministério da Agricultura do Brasil publicou a Portaria nº 458 que dispensa a obrigatoriedade da indicação do prazo de validade em vegetais, o que altera a Instrução Normativa nº 69/2018 e entra em conformidade com a Resolução RDC nº 259/2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) a qual já sinalizava a dispensa dessa informação nos rótulos. Tal medida foi justificada como uma forma de combate ao desperdício de alimentos em razão da expiração do prazo de validade, sem que, no entanto, os produtos hortícolas estejam impróprios para o consumo. O próprio consumidor seria capaz de analisar se o vegetal está próprio ou não para consumo (Brasil, 2022).

Como o tomate é um fruto climatérico, seu processo de amadurecimento mesmo após ser colhido não cessa, o que significa que o mesmo sofre um aumento da respiração e da produção de etileno ao longo do tempo (Li *et al.*, 2019). Justamente

por ser climatérico, apresenta uma atividade metabólica acelerada e tecidos geralmente frágeis à medida que o fruto vai amadurecendo, e por isso o tomate é bastante susceptível a distúrbios fisiológicos, além dos danos mecânicos que atuam como porta de entrada para fitopatógenos e contribuindo também para que o tempo de prateleira (vida útil) pós-colheita do tomate seja curto (Teixeira *et al.*, 2022).

Durante o processo de amadurecimento, os tecidos do fruto passam a transitar de parcialmente fotossintéticos para verdadeiros tecidos heterotróficos através da diferenciação paralela de cloroplastos em cromoplastos e do acúmulo de carotenóides, entre esses principalmente de licopeno, nos frutos maduros (Carrari & Fernie, 2006). Também através do amadurecimento ocorre a ativação de vias que geralmente influenciam os níveis de pigmentos, açúcares, ácidos e voláteis associados ao aroma para tornar a fruta mais atraente e amolecida o que torna a liberação das sementes favorável para organismos realizarem sua dispersão para estas então germinarem e iniciarem um novo ciclo (Quinet *et al.*, 2019).

Mudanças metabólicas dramáticas ocorrem não só durante o desenvolvimento do fruto do tomate, mas também durante as conexões entre o metabolismo primário e as principais vias metabólicas secundárias dos frutos do tomate, como a via do mevalonato, do metileritritol-fosfato, pentose-fosfato e do chiquimato (Figura 2). Também durante a interação do vegetal com condições ambientais estressantes e fatores bióticos, tais como herbívoros e fitopatógenos essas vias podem estar mais ou menos ativadas, acarretando em eventos fisiológicos e bioquímicos distintos (Carrari & Fernie, 2006).

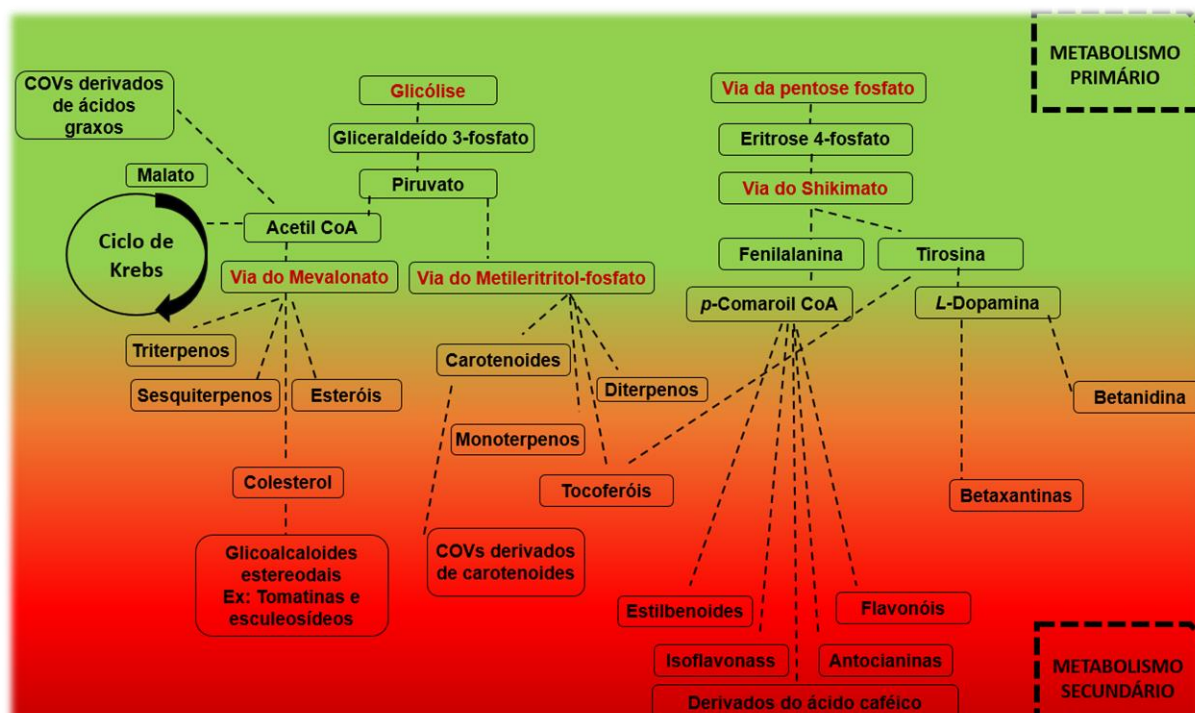


Figura 2 - Uma visão geral esquemática das conexões entre o metabolismo primário e as principais vias metabólicas secundárias dos frutos do tomate. Fonte: Adaptado de Li *et al.* (2019).

#### 1.4 Fitopatologias pós-colheita em tomates e perdas ao longo da cadeia produtiva

Entre os principais motivos de perdas estão as doenças causadas por microrganismos, que podem infectar o vegetal antes mesmo da colheita, permanecendo no mesmo de forma quiescente (Sivakumar & Bautista-Baños, 2014). Inclusive, a razão pela qual frutas frescas e outras hortaliças são tão suscetíveis, após a colheita, ao ataque de microrganismos como fungos e bactérias, é que elas perdem resistência mecânica ao amadurecer: quanto mais maduras, mais macio o vegetal e mais suscetível a danos físicos. Na natureza, quando a planta amadurece, ela não precisa mais proteger o fruto, pois nessa fase o objetivo é liberar as sementes para que se propaguem. Por outro lado, quando a planta é mantida sob cultivo, é altamente obrigatório proteger a integridade da planta para retardar os processos de maturação, a fim de estender a vida útil para os consumidores (Ferreira *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2017). A combinação de maturação progressiva com alto teor de água, nutrientes e



açúcares com condições de temperatura e umidade inadequadas para a preservação das plantas, mas extremamente favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos, configura um ambiente altamente favorável para a colonização por patógenos e posterior apodrecimento das plantas (Ippolito *et al.*, 2005). Em condições de umidade e temperatura ideais para o desenvolvimento do patógeno, lesões escuras e achatadas são formadas a partir de feridas cicatrizadas ou não cicatrizadas, geralmente em frutos muito maduros (López & Ávila, 2005).

Neste aspecto, as doenças causadas por microrganismos no pós-colheita podem ser atribuídas ainda à fase de pré-colheita (Sivakumar & Bautista-Baños, 2014), permanecendo o microrganismo quiescente até encontrar condições ambientais que favoreçam seu desenvolvimento no pós-colheita. Em se tratando de pós-colheita, a porta de entrada para o desenvolvimento de fitopatógenos é aberta mediante injúrias no pericarpo vegetal geradas por más condições de transporte e armazenamento ao longo da cadeia de abastecimento (Sivakumar *et al.*, 2016).

De acordo com Palou & Smilanick (2020), em geral, a maioria das doenças pós-colheita de Solanaceae são causadas por *A. alternata* (mofo preto) e por *Botrytis cinerea* (mofo cinzento) (Figura 3) em temperaturas de 10 a 12°C durante o armazenamento, embora possa ser quiescente até 20°C em uma umidade relativa de 90-95% (Prusky *et al.*, 2013). Em relação ao tomate, os fungos que costumam causar doenças pós-colheita são *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum coccodes*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium expansum*, juntamente com os já citados *A. alternata* e *B. cinerea*. A podridão mole bacteriana, doença causada por *Erwinia* spp., é a principal doença bacteriana do tomateiro (Palou & Smilanick, 2020).

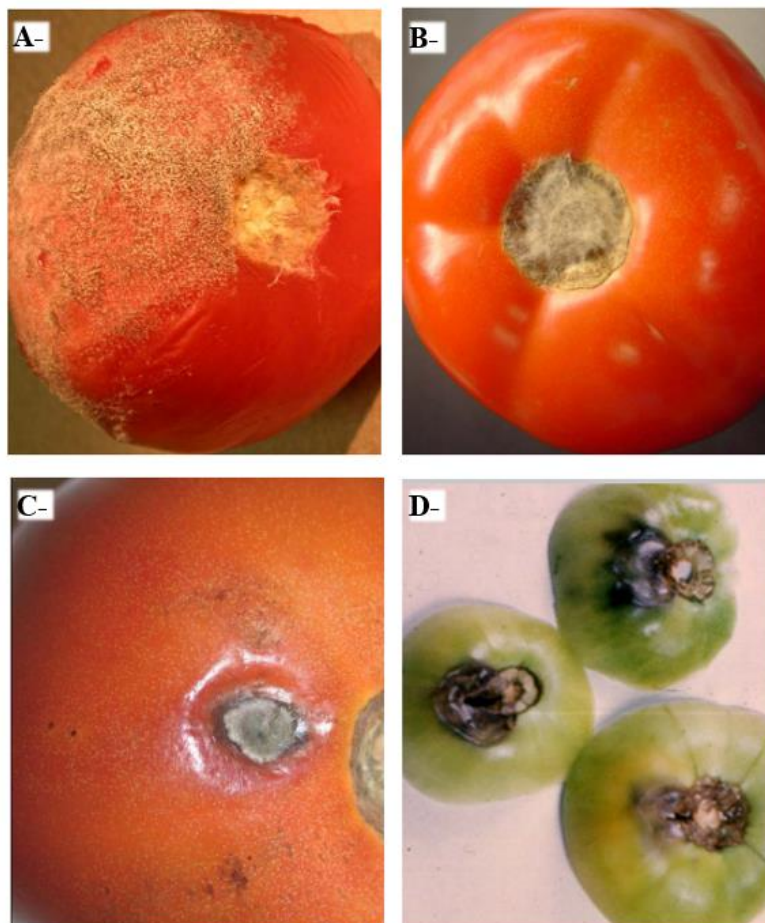


Figura 3 – Principais fitopatógenos pós-colheita do tomate. A) e B) mofo cinzento causado por *B. cinerea*; C) e D) mofo preto causado por *A. alternata*. Fonte: Jerry Bartz.

O mofo preto ou podridão de alternaria (*Alternaria* sp.) frequentemente penetra nas lesões adquiridas no campo, embora a infecção possa permanecer quiescente por alguns dias até encontrar condições ambientais adequadas. Por esta razão, é difícil controlá-la com fungicidas. Já o mofo cinzento (*B. cinerea*), cobre os frutos e está intimamente relacionado às perdas pós-colheita, causando prejuízos econômicos em diversos países do mundo. Estima-se que as perdas econômicas causadas por *B. cinerea* possam ultrapassar US\$ 10 bilhões em todo o mundo a cada ano (Hua *et al.*, 2018). Além de possuir uma ampla gama de hospedeiros vegetais, *B. cinerea* possui alta mutagenicidade e pode sobreviver como micélio ou conídios, o que contribui para dificultar seu controle (Gao *et al.*, 2018).

## 1.5 Prevenção e combate de doenças pós-colheita em tomates

As doenças no pós-colheita de horticulturas como o tomate têm sido massivamente prevenidas ou combatidas pelo uso de fungicidas sintéticos (Palou, 2018). No entanto, recomenda-se o uso cuidadoso desses fungicidas devido aos seus potenciais riscos para a saúde humana. Por isso, os eliciadores e bioestimulantes são um campo científico cujo interesse tem crescido nas últimas décadas. Mais informações sobre eliciadores e defensivos sintéticos estão melhor detalhadas no **Capítulo 1**.

## 1.6 Eliciadores e bioestimulantes

Os eliciadores podem ser definidos como agentes físicos ou moléculas pertencentes a diferentes classes que desempenham um papel no desencadeamento ou estímulo dos mecanismos de defesa vegetal, não compartilham uma estrutura química comum com o vegetal e podem induzir ou aumentar a biossíntese de metabólitos específicos (Ramakrishna & Ravishanka, 2011). Por vezes, os conceitos de eliciadores e de bioestimulantes confundem-se. Ambos podem ser de natureza biótica ou abiótica. Porém, de acordo com a literatura, são considerados como agentes bioestimulantes os microrganismos e produtos obtidos da fermentação microbiana de matérias-primas animais ou vegetais, moléculas de origem biológica, substâncias húmicas, extratos de algas, hidrolisados de proteínas, resíduos industriais e fungos e rizobactérias que promovem o crescimento vegetal (Ruzzi & Aroca, 2015). Essencialmente, a diferença entre ambos é que, enquanto os eliciadores estimulam mecanismos de defesa em plantas, os bioestimulantes são agentes que quando aplicados às plantas melhoram seu potencial nutritivo, a captação de nutrientes do solo, a qualidade e a produtividade da cultura e a tolerância ao estresse abiótico e biótico, além de melhorias nas qualidades organolépticas do vegetal (Du Jardim, 2015; Rodrigues *et al.*, 2020; Ortiz-Martínez & Ochoa-Martínez, 2023). Mediante essas definições, é possível que um eliciador possa ser, ao mesmo tempo, também um bioestimulante.

Por isso, os eliciadores também são conhecidos como indutores de resistência de plantas, ativadores de resistência de plantas ou ativadores de defesa vegetal. A interação entre um eliciador e seu respectivo receptor na membrana celular vegetal induzindo resistência local é uma reação em cadeia que ocorre intracelularmente, tornando-se intercelular e sistêmica muito rapidamente e posteriormente uma resposta molecular vegetal (Jamiołkowska, 2020). A cascata de reações geradas pela interação elicitor-célula altera o nível de expressão de vários genes reguladores da transcrição e genes limitantes da taxa das vias metabólicas resultando em aumento da síntese e acúmulo de metabólitos pelo vegetal (Halder *et al.*, 2019). A expressão de enzimas ativadas mediante a aplicação de eliciadores, é importante para a desintoxicação e degradação de fosfato, transportes de membrana, fatores de transcrição e transdução de sinal (Kharat & Pottathil, 2022). A aplicação de eliciadores ou o próprio ataque de patógenos provoca uma cascata de reações de defesa que incluem o acúmulo de uma série de metabólitos secundários relacionados com a defesa vegetal (Kharat & Pottathil, 2022). Mais informações sobre o tema estão disponíveis no **Capítulo 1**.

### 1.6.1 Ulvana

Extratos de macro e microalgas marinhas têm sido empregados como fertilizantes pulverizados em diversas culturas, com uma ampla gama de efeitos benéficos (Sbaihat *et al.*, 2015; Rachidi *et al.*, 2021). Inclusive, extratos e moléculas isoladas de algas são os principais bioestimulantes disponíveis no mercado (Rodrigues *et al.*, 2020). Tais extratos ou compostos isolados deles podem atuar tanto como biostimulantes, melhorando o rendimento da produção, quanto como eliciadores contra o estresse biótico ou abiótico e também no controle da floração e da maturação dos frutos (Sbaihat *et al.*, 2015). Porém, é possível constatar na literatura que a maior parte dos trabalhos relacionados com eliciadores ou com bioestimulantes é realizada por via sistêmica, através das raízes ou aplicação foliar desses extratos, e poucos são realizados com o vegetal na fase pós-colheita.

De maneira singular, os polissacarídeos extraídos de macroalgas marinhas marrons, vermelhas e verdes têm suscitado grande atenção devido às suas potenciais aplicações na biotecnologia. Essas aplicações abrangem terapia, cosmética e, principalmente, a agricultura e a horticultura, onde podem ser empregados como bioestimulantes, biofertilizantes e estimuladores das defesas naturais das plantas (Aitouguinane *et al.*, 2020). Nesse contexto, a ulvana obtida de algas verdes, a laminarina isolada de algas pardas e a carragenana de algas vermelhas e seus derivados de oligômeros, têm sido extensivamente estudados devido às suas capacidades de aprimorar as defesas de várias plantas (Aitouguinane *et al.*, 2020). Existe uma suposição de que as bioatividades dos polissacarídeos de algas marinhas são influenciadas pela presença e localização de grupos sulfatados na cadeia molecular desses polímeros. O grau de sulfatação, sua concentração e oxidação, em conjunto, desempenham um papel crucial nessas bioatividades, sendo muito importante a purificação desse material após a extração a fim de retirar proteínas e outras moléculas que podem atuar como contaminante (Patel *et al.*, 2022).

Há pouco mais de 20 anos, o cultivo de macroalgas para o mercado tem apresentado um processo lento de expansão no Brasil, em comparação com o restante do mundo e principalmente a Ásia. No Brasil, o cultivo é mais proeminente na região nordeste com *Gracilaria* e de *Kappaphycus alvarezii* (Simioni *et al.*, 2019), e em seguida no Rio de Janeiro e em São Paulo (Sepulveda, 2021). No entanto, o motivo principal para tal atraso do Brasil é devido a aspectos legais para pesca e aquacultura as quais apresentam uma legislação incipiente e pouco clara (Simioni *et al.*, 2019), mas é também é de ordem cultural, pois o país se concentra na produção de monoculturas agrícolas para exportação.

A partir de 1998 até agora, as descobertas em relação à diversidade de espécies de macroalgas com potencial para o desenvolvimento de produtos aumentaram em conjunto com a descoberta de vários compostos bioativos para finalidades diversas (Simioni *et al.*, 2019).

A ulvana é um polissacarídeo sulfatado extraído da parede celular de algas marinhas e que é responsável por cerca de 9 a 36% do peso seco da biomassa de algas marinhas da família de macroalgas verdes (filo Chlorophyta, ordem Ulvales,

família Ulvaceae) (Barakat *et al.*, 2022). Dentre essas macroalgas, os gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* são gêneros distribuídos por todo o mundo (Rioux & Turgeon, 2015) São algas bentônicas encontradas em costões rochosos de águas salobras e também em estuários poluídos (Baweja *et al.*, 2016). Abaixo, um exemplar da macroalga *U. fasciata* (Figura 4).



Figura 4 – Exemplar de *U. fasciata*. Coletada em janeiro de 2019 (verão) na Prainha em Arraial do Cabo / RJ no Brasil (22 57'40S/ 42 01'13W) Fonte: Elaboração própria.

Ambos os gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* possuem rápida proliferação de biomassa em águas costeiras e são conhecidos por causarem eutrofização de águas marinhas, levando à hipóxia e à morte da maioria dos organismos aquáticos. Por outro lado, justamente por apresentarem altas taxas de crescimento e perfis bioquímicos contendo moléculas exploráveis economicamente para indústria farmacêutica, de alimentos e de biocombustíveis, por exemplo, a perspectiva de cultivo de tais algas em biorrefinaria pode ser vantajosa (Dang *et al.*, 2022).

Particularmente o polissacarídeo ulvana possui uma estrutura complexa e diversa, sendo os principais constituintes a ramnose, os ácidos glucurônico e idurônico, além da xilose (Kidgell *et al.*, 2019). Este heteropolissacarídeo sulfatado é construído por sequências de duas unidades dissacarídicas principais repetidas: o ácido ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A (A3s) [ $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcA-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -L-Rha 3S-(1 $\rightarrow$ ] e tipo B (B3s) [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-IdoA-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -L-Rha 3s(1 $\rightarrow$ ] (Lahaye & Ray, 1996; Chi *et*

*al.*, 2020). Mas existem casos em que resíduos sulfatados menores contendo xilose (O-2 sulfatada ou não) denominada ulvanobiose (U3s) [ $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -d-GlcA-(1-2)- $\alpha$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ ] podem ocorrer no lugar dos ácidos urônicos (Costa *et al.*, 2012).

Fisiologicamente, é conhecido que a ulvana distribui-se homoganeamente no espaço intercelular e na parede fibrilar da macroalga a fim de manter a estabilidade osmolar e de proteger o talo do ataque de bactérias marinhas (Alves *et al.*, 2013). O que diferencia a ulvana de outros polissacarídeos sulfatados de algas, como fucóides e carragenanas, é que a mesma contém ramnose a qual é um açúcar raramente encontrado em bactérias e plantas, além de seu teor de sulfato e ácidos urônicos (Alves *et al.*, 2013). Estas propriedades estruturais distintas aliadas ao amplo potencial de atividades biológicas e propriedades físico-químicas ajustáveis, recentemente fizeram o interesse da comunidade científica pelo ulvan aumentar, já que é uma molécula promissora para aplicações terapêuticas, como antioxidante, anticoagulante, imunomodulador, anti-incrustante, capacidades anti-hiperlipidêmicas, anticâncer, antiviral e anti-adesão de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em superfícies, além de aplicações em biocombustíveis e nas indústrias de ração animal e de alimentos (Figueira *et al.*, 2020; Barakat *et al.*, 2022; Ibrahim *et al.*, 2022).

Em se tratando do setor de alimentos, em relação às propriedades de gelificação de polissacarídeos de algas verdes, essas moléculas são solúveis em água e têm uma estrutura regular que facilita as ligações de hidrogênio intercadeias, o que dá origem à gelificação (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016). Neste aspecto, a sulfatação presente no polissacarídeo é a principal responsável pelas diferenças na forma como as cadeias de polissacarídeos se juntam e assim, suas propriedades gelificantes podem variar (Stengel *et al.*, 2011).

Soluções contendo ulvana apresentam viscosidade baixa para extratos de *Ulva* (95–285 mL/g) e ainda menor para extratos de *Enteromorpha* (24 e 61 mL/g) (Lahaye & Robic, 2007; Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016). O ácido bórico é capaz de formar géis fracos com ulvana na presença de vários cátions bivalentes (ex. Ca); mas já foi observado que a formação de géis de maior elasticidade é possível através da adição de Cu, Zn, Mn, Ca (em ordem decrescente de elasticidade) para ulvan extraída *U. armoricana*, de acordo com a afinidade do polissacarídeo por esses íons; no

entanto, a adição de Mg é totalmente ineficaz para a formação de gel (Lahaye & Robic, 2007). Contudo, o mecanismo de formação do gel com ulvana não é conhecido, embora uma das teorias preconize que seja devido ao espessamento por cisalhamento que pode colapsar o polissacarídeo em *U. fasciata*, o qual possui potencial para ser uma nova fonte de gelificantes solúveis em água para a indústria de alimentos (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016) e também para a preservação de vegetais mesmos através da eliciação. Isso devido à Resistência Sistêmica Induzida (do inglês, *Induced Systemic Resistance* – ISR) por polissacarídeos isolados de algas marinhas como a própria ulvana, além de laminaranas e fucanas (Stadinik & de Freitas, 2014; Figueira *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação da ulvana como agente eliciador da resistência vegetal está relacionado à sua capacidade de induzir a atividade de enzimas relacionadas à defesa tais como peroxidases (PODs), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), fenilalanina amônia-liase (PAL) e de proteínas relacionados à patogênese (PR), além de ativar a via do ácido jasmônico, de induzir a produção de ácido salicílico e de ácido abscísico (ABA) e de poder aumentar a produção de compostos fenólicos, conferindo assim maior tolerância do hospedeiro à infecção por fitopatógenos (Jaulneau *et al.*, 2010; El Modafar *et al.*, 2012; Abouraicha *et al.*, 2015; dos S. Costa *et al.*, 2022).

Em relação a ulvanas e tratamento pós-colheira de tomates visando a eliciação, pouco há na literatura. Em relação ao tratamento pós-colheita de maçãs, a ulvana (0,1 g/L) obteve 56% de proteção contra *B. cinerea* (Montealegre *et al.*, 2010). Curiosamente, os autores observaram que o tratamento pré-colheira com ulvana mesmo na maior concentração testada (1 g/L) não obteve nenhum sucesso contra o mesmo patógeno; logo, o tratamento foi eficiente unicamente no pós-colheita. E o mesmo fenômeno foi observado com outros produtos naturais comerciais como Biorend SC (quitosana), BC-1000 EC (extrato de toranja com bioflavonoides) e ECO-100 SC (bioflavonoides, ácidos orgânicos, fitoalexinas cítricas, ácidos graxos, glicerídeos e açúcares) (Montealegre *et al.*, 2010). Recentemente, foi possível aumentar o conteúdo de carotenoides e de polifenóis em alface lisa (*Lactuca sativa* var. capitata) através da aplicação exógena de eliciadores como ácido araquidônico, ácido salicílico, metil jasmonato e harpina (Moreno-Escamilla *et al.*,



2020). A aplicação exógena por soluções em *spray* do polissacarídeo quitosana e de seus derivados em folhas de moringa (*Moringa oleifera* Lam), ácido salicílico e metil jasmonato também foi capaz de aumentar o teor de carotenoides na planta, além de estimular também a produção de tocoferóis (Saini *et al.*, 2014). Outro estudo observou o aumento muito expressivo de  $\beta$ -caroteno e luteína em uvas, mediante a aplicação de metil jasmonato e também de um *spray* a base de derivados de leveduras em videiras, de 1336 e 227  $\mu\text{g/g}$  para 7054 e 1382  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente (Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2018).

Em se tratando de extratos e moléculas de macroalgas, pouco há na literatura a respeito de tratamento com as mesmas que envolva a modulação da produção de carotenoides pelo vegetal tratado. Foi relatado que extratos de *U. rigida* e de *Sargassum latifolium* nas concentrações de 2 e 4 g/L em geral diminuíram o teor de carotenoides em trigo em comparação com o tratamento com o extrato de *Corallina elongate*; por outro lado, todos esses extratos diminuíram o teor de fenólicos e de carboidratos, ao contrário das proteínas (Ismail, 2016). Já em relação a ulvana usada como eliciadora e o teor de carotenoides em plantas, recentemente foi reportado que ulvana extraída de *U. intestinalis* Linnaeus na concentração de 1 mg/mL aumentou em aproximadamente 20% o teor de carotenoides totais e cerca de 17% o polifenóis totais em salsa pré-colheita em relação ao controle (Paulert *et al.*, 2021); contudo, o contrário foi observado pelos mesmos autores quando trataram manjeriço pré-colheita com ulvana na mesma concentração: uma queda de cerca de 11% de carotenoides totais em manjeriço tratado com ulvana em relação ao controle e praticamente o mesmo quantitativo de polifenóis entre tratados e controles para o mesmo vegetal (Paulert *et al.*, 2021). Não foram encontrados trabalhos relacionando tratamento com ulvana e modulação de carotenoides no pós-colheita.

Recentemente para a preservação de melões por eliciação, foi observado que um tratamento envolvendo *Debaryomyces hansenii*, *Stenotrophomonas rhizophila* e ulvana (5 g/L) melhorou o efeito de biocontrole na doença da podridão da fruta em meloeiro, além de ter retardado a podridão natural da fruta, reduziu as porcentagens de decomposição e perda de peso, mantiveram as atividades de enzimas

antioxidantes e relacionadas à defesa mais altas (CAT, POX, SOD e PAL) e preservam a qualidade da fruta (firmeza, SST e pH) (Rivas-Garcia *et al.*, 2022).

Para o pós-colheita de mamão, foi observado que um tratamento envolvendo *Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus amyloliquefaciens* e ulvana (2 mg/mL) foi eficiente para proteção contra antracnose por *C. gloeosporioides* (Chiquito-Contreras *et al.*, 2019). Os autores observaram que o mecanismo resultante para a defesa pelas bactérias antagonistas e ulvan foi a competição pela produção de sacarose, glicose e frutose por compostos orgânicos voláteis (COVs) e a indução de enzimas antioxidantes de defesa, como SOD, CAT e POD; no entanto não foi esclarecido quais dos atores envolvidos era respectivamente responsável pela produção de COVs ou pelo aumento da atividade enzimática (Chiquito-Contreras *et al.*, 2019). Já para o pós-colheita de maçãs, laranjas, tomates e uvas existe uma patente (Briand *et al.*, 2010) em que os autores observaram que a ulvana na concentração de 10 g/L foi capaz de reduzir em 65%, 38%, 42% e 47%, respectivamente, o dano pós-colheita desses frutos tratados com o polissacarídeo mesmo inoculados 1 semana depois com *B. cinerea*.

No geral, a questão principal do monitoramento de atividade enzimática e das variações de metabólitos primários e secundários no pós- ou no pré-colheita é justamente acompanhar como o vegetal está se comportando mediante os tratamentos e se o maquinário de defesa está sendo ativado e através de quais vias. Nesse ínterim, a metabolômica é uma ferramenta capaz de auxiliar nesse monitoramento e colaborar para o desenvolvimento de estratégias para a defesa e melhoramento vegetal.

### **1.7 Metabolômica como ferramenta para o desenvolvimento de estratégias para melhoramento do tomate**

De acordo com Alexandersson *et al.* (2016), há menos de 30 anos se iniciaram os estudos sobre mecanismos de resposta induzida em plantas, a nível molecular. Efetivamente, eles começaram após a revolução genômica no início dos anos 2000 (Alexandersson *et al.*, 2016). As ciências ômicas como genômica, proteômica,

transcriptômica, metabolômica e as ferramentas relacionadas vem desempenhando um papel fundamental para a compreensão, dos mecanismos de indução de resistência em plantas, suas vias cruzadas e até mesmo antagônicas cujos mecanismos permanecem bastante inexplorados para as culturas de Solanaceae (dos S. Costa *et al.*, 2022).

Dentre as ômicas, a metabolômica é a que mais se aproxima do fenótipo (Fujimori, 2013). O fenótipo é resultante da genética, da epigenética e do ambiente, e por isso pode apresentar uma alta plasticidade (Abdullah-Zawawi *et al.*, 2022). A metabolômica é o estudo das alterações nos níveis dos metabólitos, os quais são substâncias intermediárias ou finais do metaboloma (conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular - < 1500 Da) de uma amostra biológica (Canuto *et al.*, 2018). É uma ferramenta em desenvolvimento contínuo, baseada em dados e que tem como foco a identificação abrangente, a quantificação e a interpretação em tempo real dos níveis de metabólitos primários e secundários em um determinado sistema biológico pressionado por fatores ambientais e genéticos cuja regulação influencia seu desenvolvimento (Marchev *et al.*, 2021). O termo metabolômica (do inglês, *metabolomics*) em si foi apresentado no ano de 2001, por Oliver Fiehn, que o definiu como a análise qualitativa e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico (Fiehn *et al.*, 2002).

Essencialmente, existem três tipos de metodologias analíticas principais para a metabolômica que fornecem extensos dados estruturais e quantitativos para perfis metabólicos: espectroscopia óptica, ressonância magnética nuclear (RMN, do inglês NMR) e espectrometria de massas (EM, do inglês MS), em técnicas como cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (do inglês, GC-MS), e cromatografia em fase líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE/EM, do inglês LC-MS), ganharam ampla aceitação como métodos padrão para análise de metabólitos (Park *et al.*, 2017; Marchev *et al.*, 2021). As técnicas de metabolômica baseadas em espectrometria de massas são as mais sensíveis para a análise simultânea de um grande número de metabólitos, sendo que tanto as análises de LC-MS quanto as de GC-MS podem fornecer informações detalhadas sobre os padrões de alteração dos níveis dos metabólitos em toda uma rede metabólica e

inclusive ao longo do tempo; Já o RMN, é o único capaz de fornecer a informação estrutural dos metabólitos (Padmanabhan, 2014).

Em se tratando de análise, agrupamento e visualização de dados em pesquisas, algumas das ferramentas de maior destaque são a Análise de Componentes Principais (ACP, do inglês PCA), a Análise Hierárquica de Componentes (AHC, do inglês HCA) e os mapas de calor (*Heat maps*). Utilizar a PCA é útil porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados e na separação de informações redundantes e aleatórias das que realmente interessam. Em uma PCA, os gráficos de *scores* definem a estrutura do agrupamento dos dados, enquanto que os *loadings* fornecem informações sobre os dados que caracterizam a diferenciação entre os agrupamentos (Correia & Ferreira, 2007). A PCA, através do conjunto de *scores* e *loadings*, pode inclusive estimar a influência de cada variável em cada amostra (Panero *et al.*, 2009), enquanto que o objetivo da HCA é exibir a distância entre os pontos (amostras ou variáveis) de acordo com suas similaridades, o que é útil para determinar a semelhança entre as amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si em um tipo de gráfico chamado dendrograma (Panero *et al.*, 2009). Já os *heat maps* permitem que os usuários visualizem facilmente os padrões de mudança nas concentrações de metabólitos nas amostras e nas condições experimentais exibindo os valores dos dados usando uma escala de cores em gradiente de acordo com a concentração da substância analisada (Xia *et al.*, 2015).

As abordagens metabolômicas podem ser direcionadas (*targeted*) ou não direcionadas (*non-targeted*) (Canuto *et al.*, 2018). A abordagem *targeted* refere-se à medição quantitativa de um grupo bastante específico de metabólitos dentre os aminoácidos, lipídios, açúcares e/ou ácidos graxos para investigar vias metabólicas específicas ou para validação de biomarcadores identificados, baseando-se no conhecimento prévio de metabólitos de interesse e compostos conhecidos, em sinais específicos de metabólitos e não fazem uma cobertura total do perfil do metaboloma; por outro lado, a abordagem *non-targeted* envolve o perfil global do metaboloma, sendo normalmente utilizada em estudos de geração de hipóteses, como a descoberta de biomarcadores e por isso é a abordagem que geralmente é mais qualitativa e que

fornece mais informações em relação a metabolômica *targeted*, a qual é mais voltada para quantificação dos dados (Zhang *et al.*, 2016).

Com o advento de tecnologias mais acessíveis de espectrometria de massas de alta resolução e o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas, torna-se possível identificar e validar metabólitos envolvidos na resistência a patógenos e/ou atribuir novas funções a eles (Stam & Muñoz-Hoyos, 2023). No entanto, estudos genéticos e químicos recentes demonstram que estabelecer fronteiras claras entre diferentes classes de metabólitos não é uma tarefa simples. Em vez disso, sugere-se que muitos metabólitos possam desempenhar papéis multifuncionais, como conferir tolerância ao estresse, atuar como moléculas sinalizadoras para interações com outros organismos (alelopatia), atrair insetos para facilitar a polinização e fornecer defesa contra herbívoros e patógenos, como bactérias, fungos e vírus (Stam & Muñoz-Hoyos, 2023). Em concordância com essa perspectiva, a metabolômica tem se mostrado uma abordagem eficaz no estudo de plantas; por exemplo, tem sido utilizada para compreender processos fisiológicos no desenvolvimento de frutos submetidos a diversas condições (Colantonio *et al.*, 2022).

Particularmente, em se tratando de frutos de tomateiro, a metabolômica pode gerar *insights* valiosos para uma melhor compreensão do *priming* de defesa em frutos e mesmo no seu *flavor* em estudos diversos, embora poucos sejam os estudos relacionados com o pós-colheita, pois a maioria se concentra no metabolismo do tomateiro. Recentemente, um estudo desenvolvido por Afifah *et al.* (2019) utilizou a abordagem metabolômica do tipo *targeted* para a análise da resistência de quatro genótipos de tomateiro contra nematóides das galhas (*Meloidogyne incognita*), através do monitoramento da atividade de peroxidase e também de espectros de RMN. Nesse estudo, os autores puderam observar que tomateiros resistentes apresentaram uma atividade de peroxidase mais elevada do que plantas suscetíveis. Os compostos químicos que diferenciaram as plantas suscetíveis das resistentes foram glicose e ácido cafeico, sendo este último o composto fenólico mais provável a ter um efeito negativo sobre o nematoide (Afifah *et al.*, 2019). No pós-colheita de tomate, Tang *et al.* (2022) também observaram a atuação do aumento dos níveis de ácido cafeico e também dos ácidos clorogênico e ferúlico, os quais ou autores

denominaram como “metabólitos-chaves” na indução de *priming*, mediante a exposição à *Cryptococcus laurentii*, uma levedura que tem sido extensivamente estudada *devido a* evidências de que ela pode não apenas inibir efetiva e diretamente uma variedade de doenças fúngicas em frutos diversos, mas também de atuar como um eliciador. Ainda em se tratando de pós-coleita, conforme Meza *et al.* (2021) relataram, a aplicação de metil jasmonato em frutos de tomate resultou em alterações nos metabólitos primários, destacando os lipídios como os mais impactados, com um aumento significativo observado a partir do vigésimo primeiro dia após o tratamento, conforme indicado por análises de CG/EM. Paralelamente, as análises por CLAE revelaram um aumento nos carotenoides, incluindo licopeno,  $\beta$ -caroteno e luteína, também a partir do vigésimo primeiro dia após o tratamento (Meza *et al.*, 2021). Ainda nesse aspecto, a metabolômica de frutos de tomate no pós-colheita também permite a compreensão do que pode acontecer com o fruto mediante certas condições de armazenamento. É o caso do estudo recentemente elaborado por Bai *et al.* (2023) onde frutos de tomate foram armazenados sob refrigeração (5 °C) e também a temperatura ambiente (25 °C). De acordo com as análises feitas pelos autores, a refrigeração elevou o conteúdo de flavonoides (tilirosídeo, lonicerina, kaempferol 3-O-robinobiosídeo, rutina e luteolina 7-O-glicosídeo) nos frutos, o que teria potencializaria a ação antioxidante desses metabólitos (Bai *et al.*, 2023). Portanto, as análises de metabolômica podem revelar padrões no acúmulo de metabólitos em tomates quando expostos a bioestimulantes ou eliciadores de diferentes naturezas ou quando mantidos sobre certas condições de armazenamento. Inclusive, a partir dessas análises é possível acompanhar essas mudanças no vegetal ao longo do tempo e permitem observar quando ocorre o ápice do acúmulo de tais substâncias por parte do vegetal, as quais eventualmente podem estimular seus próprios mecanismos de defesa ou conferir características organolépticas favoráveis e/ou mais nutritivas para quem os consome.

## 2. JUSTIFICATIVA

A produção global de tomates, a segunda maior horticultura mundial, exige práticas de cultivo, manejo, controle de pragas e doenças, e condições de armazenamento pós-colheita adequadas. Tradicionalmente, o uso de fungicidas sintéticos e a refrigeração são fundamentais no controle de pragas e no armazenamento. Contudo, o uso de tais fungicidas causa preocupações crescentes com seus impactos à saúde, ao meio ambiente. Além disso, em se tratando desses fungicidas, seu uso indiscriminado leva a uma pressão seletiva que viabiliza o surgimento de fitopatógenos cada vez mais resistentes.

Devido às preocupações relativas a toxicidade e resistência gerada existe uma tendência para a redução global do uso de fungicidas convencionais, destacando a necessidade de abordagens alternativas a eles e/ou o manejo integrado de doenças. Por isso, a busca por tecnologias acessíveis e eficazes torna-se imperativa, uma vez que muitas opções disponíveis atualmente são dispendiosas. Nesse cenário, o uso de eliciadores e bioestimulantes, como o polissacarídeo ulvana, emerge como uma solução promissora, estimulando os mecanismos naturais de defesa das plantas. No entanto, a eficácia desses eliciadores, especialmente em termos de metabolômica pós-colheita e extensão do tempo de prateleira do tomate, carece de estudos aprofundados.

A pesquisa sobre o polissacarídeo ulvana como eliciador e como bioestimulante oferece uma perspectiva interessante, sendo inclusive patenteada em produtos. Contudo, a falta de estudos específicos sobre sua aplicação no tomate pós-colheita e sua influência na metabolômica e tempo de prateleira destaca uma lacuna no conhecimento científico. Embora o cultivo de algas marinhas no Brasil esteja em estágio inicial, países asiáticos já exploram amplamente essa prática. Estudos utilizando algas e seus derivados como alternativas aos fungicidas convencionais apresentam-se como uma via promissora. Além de oferecer uma solução potencialmente mais segura, essa abordagem pode contribuir para o desenvolvimento do setor de cultivo de macroalgas, agregando valor ao produto.

A presente tese está organizada da seguinte maneira: o **Capítulo 1** é um artigo de revisão publicado onde foi realizado um levantamento bibliográfico sobre eliciadores e práticas pós-colheita em solanáceas; o **Capítulo 2**, trata dos efeitos da ulvana como eliciador da defesa vegetal de frutos de tomate no pós-colheita (a ser submetido); já o **Capítulo 3** trata dos efeitos da ulvana na bioestimulação de frutos de tomate no pós-colheita.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estender o tempo de prateleira pós-colheita de tomates '*Sweet Grape*' contra fitopatógenos fúngicos através do tratamento dos frutos com o polissacarídeo ulvana.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração ideal de ulvana como eliciador para preservação de tomates var. *Sweet Grape* em temperatura ambiente (25 °C).
- Determinar uma eventual atividade fungicida do polissacarídeo ulvana.
- Determinar via de administração mais adequada para o tratamento com ulvana e se o tratamento com ulvana causa efeito de *priming* através da medida da atividade das enzimas de defesa vegetal (fenilalanina amônia-liase - PAL, catalase - CAT, e ascorbato peroxidase - APX).
- Determinar o tempo de prateleira e o índice de proteção do tratamento com ulvana mediante armazenamento em temperatura ambiente ou sob refrigeração.



- Realizar um ensaio de desafio comparativo entre tomates tratados com ulvana e infectados após o tratamento, à temperatura ambiente, visando avaliar o efeito de eliciação.
- Determinar os perfis dos metabolismos primário e secundário em amostras tratadas com ulvana e controles, utilizando técnicas de CG/EM e CLAE/EM.
- Determinar os perfis de carotenoides e ácido ascórbico.
- Determinar modificações nos perfis de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) entre amostras controles, tratadas com ulvana ou inoculadas com *B. cinerea*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e solventes

CH<sub>3</sub>OH, (produtos químicos SK); Adonitol (Padrão Interno, Sigma - Aldrich); Clorofórmio-d 99,8 átomos% (Sigma - Aldrich); Gás nitrogênio (Messer Gases Brasil); MSTFA, N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (Sigma-Aldrich); D-Frutose (Merck); Maltose (Empresa Científica Fisher); D-Glicose (Sigma-Aldrich); Sacarose (Nuclear); D-Galactose (Sigma - Aldrich); Mio-inositol (Sigma - Aldrich); Ácido Cítrico (Nuclear); L-Alanina (Sigma - Aldrich); L-Serina (Sigma - Aldrich); L-Prolina (Sigma - Aldrich); L-Ácido Aspártico (Sigma - Aldrich); Ácido L-Glutâmico (Sigma - Aldrich); Água ultrapura; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sulfato de Sódio (Isofar); n-tridecano (Padrão Interno, Merck); n-Hexano, 96% HPLC BASIC (Scharlau); Tolueno (Merck); HCl, ácido clorídrico, 36,5-38% ACS Básico (Scharlau); Piridina (Sigma - Aldrich); palmitato de metila (Koch-Light Labor); Lignocerato de metila (Sigma - Aldrich); Ácido beénico (Sigma - Aldrich); Estearato de metila (Sigma - Aldrich); NaCl, Cloreto de Sódio (Dinâmica Química Contemporânea); Diclorometano (Sigma-Aldrich); Acetato de etila (Scharlau); Acetona (Scharlau); C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, etanol (NÉON); trans-β-Apo-8'-carotenal (padrão interno, Fluka - Sigma-Aldrich); MTBE, éter metil ter-butílico (Tedia). Octanol-1 (Padrão Interno, Carlo Erba);

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, cloreto de cálcio (VETEC); ácido ascórbico (VETEC), ácido oxálico (Merck).

## **4.2 Material vegetal e ulvana**

### **4.2.1 Tomate**

Em todos os experimentos foram utilizados tomates var. *Sweet Grape* orgânicos certificados no estado de maturação vermelho (BRASIL, 1995) da linha de produtos orgânicos BioVida (produzido no Rancho São Francisco de Paula, Estrada Malhades, 5717 - Vale do Paquequer, Teresópolis, 22°18'14.3"S 42°52'30.0"W) comprados em supermercados locais na cidade do Rio de Janeiro (RJ-Brasil).

### **4.2.2 Macroalga *Ulva fasciata***

A macroalga *U. fasciata* foi coletada na Prainha em Arraial do Cabo / RJ no Brasil (22 57'40S/ 42 01'13W) e acondicionados em isopor com água do mar para transporte. Em seguida, os indivíduos foram lavados com água destilada para e foi realizada a remoção manual de de sedimentos e epibiontes macroscópicos. Uma amostra foi depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brasil (SPF-57877). A biomassa fresca foi seca em estufa a 50°C até e armazenada em dessecador até a extração do polissacarídeo ulvana.

### **4.2.3 Preparação da solução de ulvana**

O polissacarídeo foi extraído de acordo com o método descrito por Figueira *et al.* (2020). A biomassa seca de *U. fasciata* (96,5 g) foi triturada em pó, suspensa em água ultrapura (100 mL/10g) e autoclavada a 121°C e 1 atm por 40 min. O sobrenadante foi centrifugado (10.000 g, 4°C, 10 min) e o polissacarídeo foi

precipitado com três volumes de etanol ultrapuro (Merck®) e resfriado a – 20°C por 48 horas. Em seguida, o precipitado foi centrifugado (3500 g, 4°C, 5 min) e o *pellet* contendo a ulvana foi liofilizado (25,617 g).

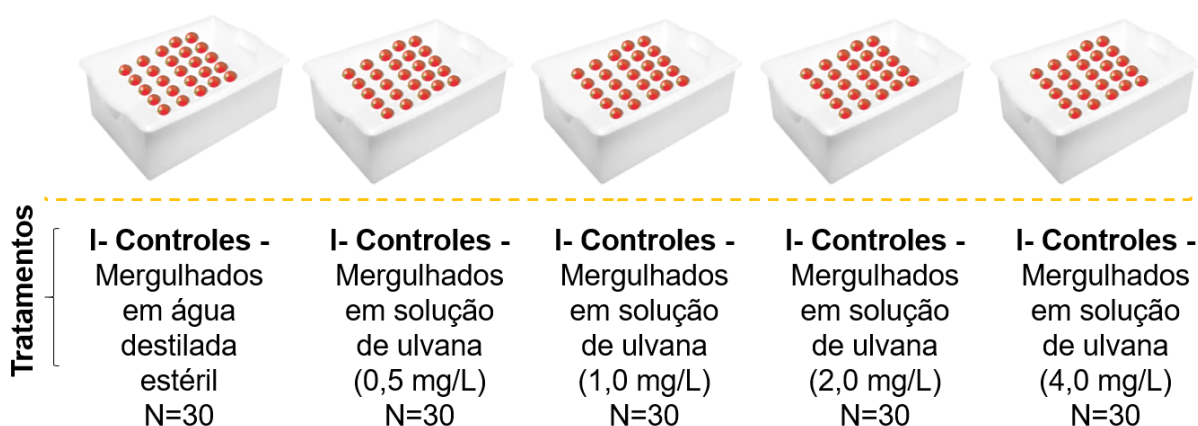
A ulvana foi purificada por membrana de diálise (12000-14000 Da) para remoção de sulfatos e novamente liofilizada (11g) para ser utilizada nos experimentos. O rendimento do polissacarídeo após a purificação foi de aproximadamente 11,39%.

### **4.3 Desenho experimental**

Este trabalho foi formulado em 4 fases experimentais interconectadas e cujos ensaios e análises são descritos nos subtópicos a seguir. A maioria dos experimentos abrangeu 9 dias de observação em função tomate ser um fruto climatérico e ter sido adquirido no estágio de maturação do tomate (vermelho), o qual é como o fruto está disponível no mercado. Além disso, buscou-se observar se a ulvana causava *priming*, eliciação e/ou bioestimulação nos frutos no pós-colheita. Logo o tempo de observação para os experimentos envolvendo o acompanhamento das variações metabólicas deveria ser relativamente curto, e também está em consonância com trabalhos semelhantes na literatura que utilizaram exatamente mesmo período ou cujos resultados foram plenamente observados até o nono dia de análise (Pinheiro *et al.*, 2015; Yokota *et al.*, 2019; Meza *et al.*, 2021).

#### **4.3.1 Avaliação da melhor concentração de ulvan para preservação de tomates**

Inicialmente foi testado um tratamento de imersão de tomates em 4 concentrações de ulvana em solução aquosa (0,5; 1; 2 e 4 mg/mL) em comparação com os controles (água destilada). Os parâmetros avaliados foram: I- a atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) após os dias 1, 3, 6 e 9 do experimento e II- o índice de proteção (%) no dia 9 após o início do experimento (Figura 5).



→ Amostras foram avaliadas e mantidas à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) por 1, 3, 6, e 9 dias após os tratamentos

-Índice de proteção (%).  
-Incidência de doenças.

Figura 5 - Avaliação da melhor concentração de ulvana para preservação de tomates. Fonte: Elaboração própria.

#### 4.3.2 Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (CMI) do polissacarídeo ulvana isolado da macroalga *Ulva fasciata* sobre o fitopatógeno *B. cinerea*

Para análise de Concentração Mínima Inibitória (CMI, ou *Minimum Inhibitory Concentration -MIC*) foi utilizada a estirpe *Botrytis cinerea*.

Amostras de *B. cinerea* foram cedidas pela Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, São Paulo, Brasil) provenientes da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) através do Portal Alelo de Recursos Genéticos da Embrapa.

A estirpe foi cultivada em meio BDA (Batata Dextrose Agar - (200g de batata, 20g de dextrose, 1000mL de água destilada), de acordo com a recomendação do curador da coleção, e incubada em estufa a temperatura ambiente (aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ ) até a realização dos experimentos pertinentes.

A determinação da CMI dos extratos orgânicos e aquosos foi realizada com base na metodologia padrão internacional do CSLI (*sigla do inglês, Clinical and laboratory Standards Institute; Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais*), descrita

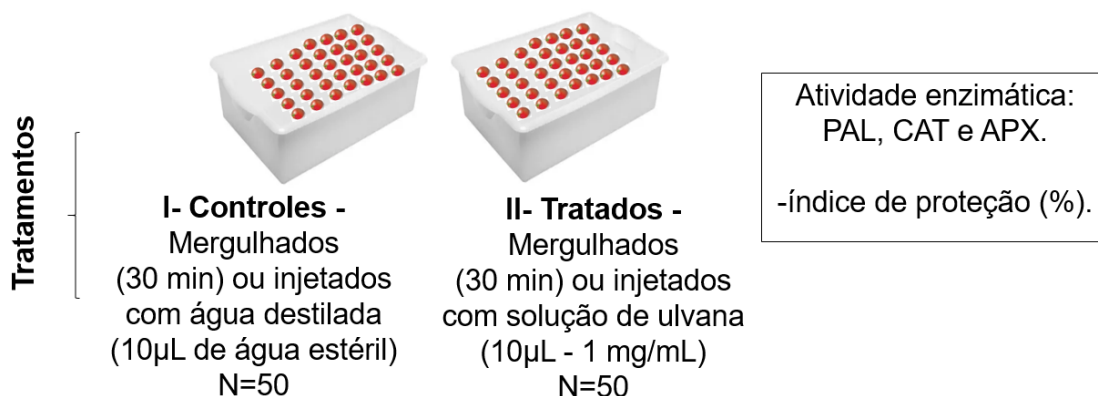
para fungos, sendo utilizada a norma M38-A2 para fungos filamentosos: a metodologia consistiu em diluições seriadas (1:2) do em meio de cultura, sendo adicionado ao primeiro poço 1  $\mu\text{L}$  da suspensão em 99  $\mu\text{L}$  de meio RPMI, gerando uma faixa de diluição de 2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 1,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em uma microplaca de titulação de 96 poços.

Os inóculos iniciais foram obtidos através de suspensão dos conídios água estéril e em seguida foi realizada a contagem na câmara de Neubauer. Os inóculos foram ajustados para  $5 \times 10^4$  UFC/mL de concentração em meio RPMI e em cada poço foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  dos inóculos em suas respectivas placas, para um volume final de 100  $\mu\text{L}$  dos meios de cultura respectivos acrescidos com o polissacarídeo ulvana (2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  à 1,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), obtendo-se a suspensão de  $5 \times 10^4$  UFC/mL.

A CMI é responsável por determinar qual a menor concentração necessária de uma substância para que ela exerça uma redução visível na multiplicação de um microrganismo (Feyaerts *et al.*, 2017). Os resultados foram avaliados visualmente de acordo com o grau de turvação e pela adição de 30  $\mu\text{L}$  de resazurina (0,005% em tampão salina fosfato (PBS) em um pH 7,2), a qual apresenta naturalmente cor azul, mas que sofre oxidação na presença de células viáveis no meio de cultura tornando-se de cor rosada por formar a resofurina. A mudança de cor de azul para a rosa indicou a presença de microrganismos (Silvestre, 2017).

#### **4.3.3 Avaliação de resposta enzimática e índice de proteção (%) de tomates mediante tratamento com solução de ulvan injetada ou em imersão comparadas com controles injetados com água destilada ou em imersão**

Tomates (N=50) foram tratados por imersão em solução de ulvan (1 mg/mL) por 30 min ou com a mesma solução injetada (N=50, 10  $\mu\text{L}$ , 2 mm de profundidade X 2 mm de largura) e foram observados por 9 dias. Indivíduos (4) foram coletados randomicamente nos dias 1, 2, 3, 6 e 9 após o experimento, congelados com  $\text{N}_2$  e armazenados em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  para posteriores análises abrangendo os seguintes parâmetros: I- a atividade enzimática (PAL, CAT e APX) e II- o índice de proteção após 9 dias de tratamento (Figura 6).



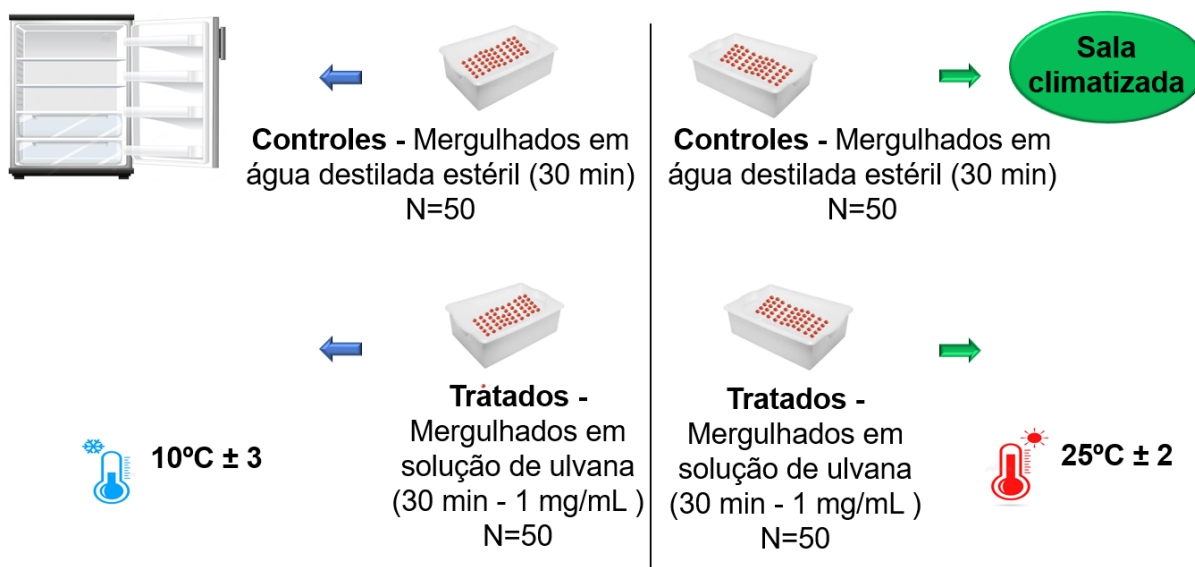
- Amostras foram retiradas para análise: 1, 2, 3, 6 e 9 dias após tratamento.
- Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ).

Figura 6 – Ensaio do experimento de resposta enzimática e índice de proteção (%) de tomates mediante tratamento com solução de ulvana injetada ou em imersão comparadas com controles injetados com água destilada ou em imersão. Fonte: Elaboração própria.

#### 4.3.4 Avaliação do tempo de prateleira e índice de proteção (%) de tomates tratados com solução de ulvan por imersão comparadas com controles com água destilada em imersão em temperatura ambiente ou sob refrigeração

Para avaliar o tempo de prateleira de tomates controles (imersão em água, 30 min) e tratados com ulvana (imersão em solução aquosa de ulvana 1mg/mL, 30 min), ambos foram armazenados separadamente em caixas plásticas vedadas com filme PVC e avaliados em duas condições de armazenamento: I- temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , 50% de umidade) e II- refrigeração a  $10^{\circ}\text{C} \pm 3$ , 52% de umidade) por 32 dias (Figura 7).

Os parâmetros avaliados foram baseados na aparência dos tomates em relação a manchas, focos de podridões e em frutos extremamente maduros os quais serviram como fatores de exclusão na composição do índice de proteção (%) referente ao tratamento e aos controles. Os tomates foram observados por 32 dias, apresentando um N=50 para ambas as condições.



→ Amostras foram avaliadas em: 10, 22 e 32 dias após os tratamentos.

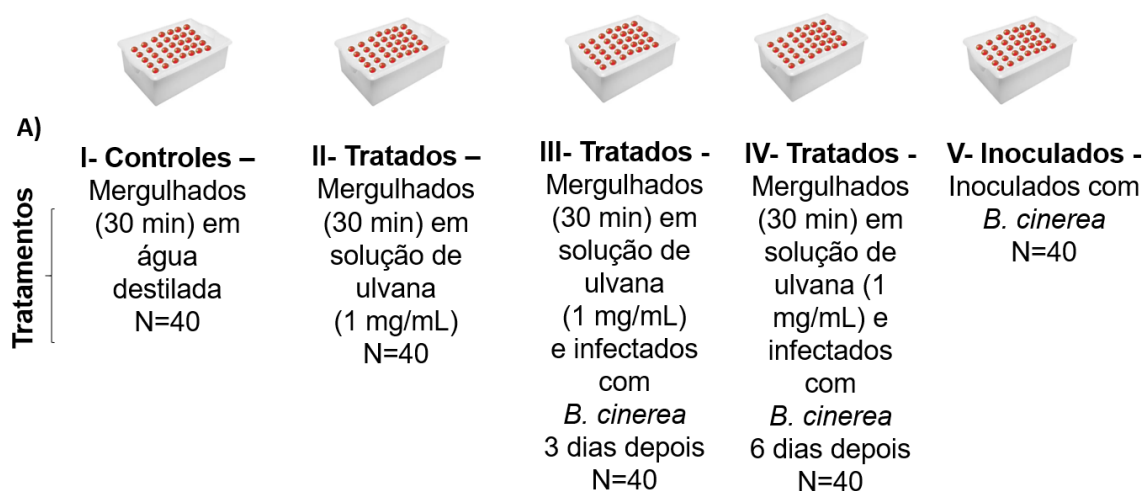
Figura 7 – Ensaio do tempo de prateleira e índice de proteção (%) de tomates tratados com solução de ulvana por imersão comparadas com controles com água destilada em imersão em temperatura ambiente ou sob refrigeração. Fonte: Elaboração própria.

#### 4.3.5 Ensaio de desafio e comparação entre tomates infectados com *B. cinerea*, tratados com ulvana e infectados 3 e 6 dias após o tratamento visando avaliar efeito de eliciação

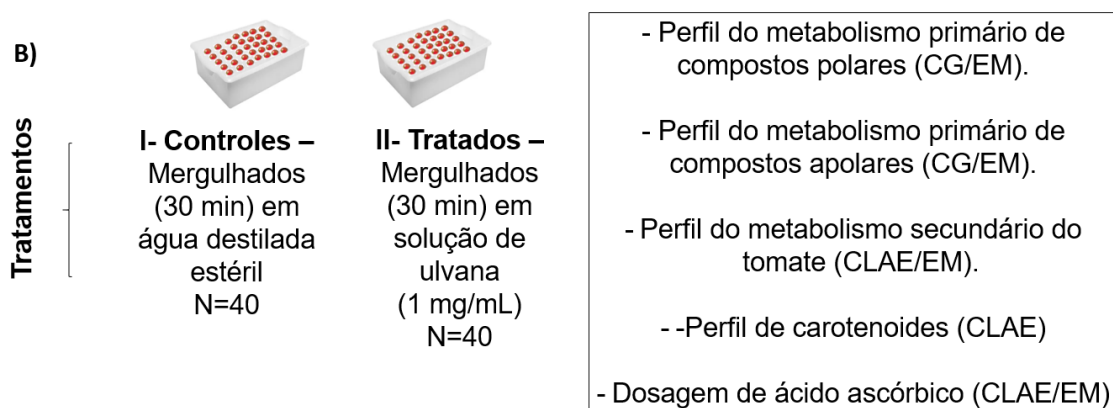
Um ensaio de desafio foi realizado a fim de comparar o índice de proteção de tomates controle (imersão em água destilada, 30 min) em comparação aos tomates tratados com ulvana (imersão em solução aquosa de ulvana 1mg/mL), inoculados com *B. cinerea* ( $5 \times 10^4$  conídios/mL), tratados com ulvana (imersão em solução aquosa de ulvana 1mg/mL) e inoculados com *B. cinerea* no terceiro e sexto dias após os tratamentos, perfazendo um N=40 para cada condição observada. Os tomates foram acondicionados em caixas plásticas de polipropileno (30,5 x 20,5 x 6cm - Comprimento x Largura x Altura; 2,2 L) e cada indivíduo foi disposto em um pote plástico tampado (2,7 x 3,8 x 5,0 - Comprimento x Largura x Altura; 30 mL) com 6 furos feitos com agulha de seringa (1 mL) nas tampas (Figura 8A).

Todo o experimento foi observado por 15 dias e amostras (4 tomates escolhidos ao acaso) foram coletadas 1, 2, 3, 6 e 9 dias após o início do experimento e

congeladas em N<sub>2</sub>, trituradas e armazenadas em freezer -80 °C. As análises dos seguintes parâmetros foram realizadas para os tomates controles e tratados: Perfil do metabolismo primário de metabólitos polares e apolares por CG/EM, o perfil do metabolismo secundário dos tomates por CLAE/MS, o perfil de carotenoides (CLAE) e também a dosagem de ácido ascórbico (vitamina C) (Figura 8B). Já o índice de proteção (%) foi acompanhado para todas as condições experimentais (Figura 8A e 8B).



→ **Análise do índice de proteção (%) 9 dias após o início do experimento**



→ **Amostras foram retiradas para análise: 1, 2, 3, 6 e 9 dias após tratamento. Experimentos foram realizados à temperatura ambiente (25°C ± 2).**

Figura 8 - Ensaio de desafio e análise dos perfis dos metabolismos primário e secundário de controles em comparação com os tratados. A) Ensaio de desafio e índice de proteção (%) e B) Análise do perfil



do metabolismo primário e secundário e dosagem de ácido ascórbico de amostras controle e tratadas com ulvana. Fonte: Elaboração própria.

## **4.4 Análises**

### **4.4.1 Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX)**

#### **4.4.1.1 Preparação dos extratos enzimáticos**

Para PAL, a extração (Figura 9) seguiu o modelo de El Modafar *et al.* (2012) através da trituração de 100 mg de amostra de massa fresca congelada com 5 mL de tampão tris-HCl (100mM, pH 8,5) com 5 mL de solução aquosa de  $\beta$ -mercaptoetanol (14mM). A mistura foi centrifugada a (13.000 g, 4°C, 30 min.) e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático.

A atividade das enzimas CAT e APX foi mensurada de acordo com Kang & Saltveit (2001). Para CAT, o extrato (Figura 10) bruto foi obtido a partir de 500 mg de massa fresca congelada de cada amostra extraída e triturada com com 4,5 mL de solução tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 7,5) com MgCl<sub>2</sub> (3 mM) e EDTA (1 mM). O homogenato foi centrifugado a 25.000 g e 4°C por 20 min e o sobrenadante foi usado como extrato bruto para atividade de da enzima.

Para APX, amostras de 500 mg de massa fresca congelada foram extraídas (Figura 11) trituradas com 1 mL de tampão de extracção [50 mM tampão de fosfato de potássio (pH 7,0), 1% Triton X-100 e 7 mM 2-mercaptoetanol] e homogeneizadas com um mixer (Turrax). O homogenato foi centrifugado a 25.000 g e 4°C por 20 min e o sobrenadante foi usado como extrato bruto para atividade de APX.

##### **4.4.1.1.1 Ensaio enzimático PAL**

O ensaio enzimático (Figura 9) com realizado de acordo com El Modafar *et al.* (2012). A mistura consistiu de 100  $\mu$ L do extrato enzimático, 1000  $\mu$ L de tampão tris-HCl (100mM, pH 8,5) e 200  $\mu$ L de solução de L-fenilalanina (100mM) e reação ocorreu através da incubação da amostra (40 °C, 1h). Após o período de incubação, a reação

foi parada com 200  $\mu\text{L}$  de HCl (5N). A atividade enzimática é calculada através da produção de ácido cinâmico, uma vez que a PAL é responsável pela desaminação da L-fenilalanina em ácido cinâmico. Logo, extraiu-se por 2 vezes o ácido cinâmico com 2 mL de éter dietílico e a porção orgânica foi analisada em espectrotômetro a 290 nm (Figura 9). A quantificação foi realizada baseada em curva padrão construída para o ácido trans-cinâmico ( $y=x+0.009221/0,1483$ ,  $R^2= 98.8$ ) e dividindo-se pela quantidade de proteínas totais por amostra. O resultado foi expresso em  $\text{nmol de ácido cinâmico}/\text{min}^{-1}/\text{mg de proteína}^{-1}$ ).

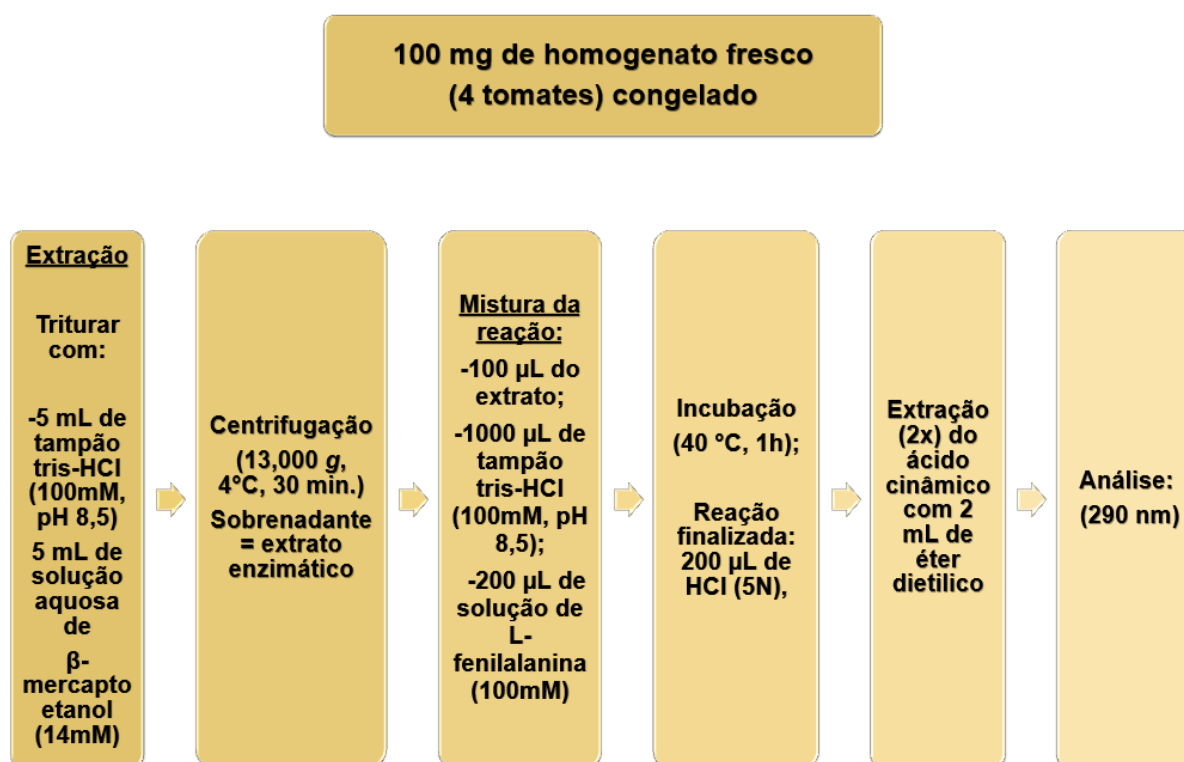


Figura 9 - Análise da PAL. Fonte: Adaptado de El Modafar *et al.* (2012).

#### 4.4.1.1.2 Ensaio enzimático CAT

A atividade de CAT (Figura 10) foi avaliada de acordo com Kang & Saltveit (2001). A mistura de reação consistiu em 2500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1%) e 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático diluído (1:5). A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ( $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) em espectrofotômetro a 240 nm (Figura 10). O cálculo de

quantificação foi realizado de acordo com Kar & Mishra (1976). O resultado foi expresso em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}^{-1}/\text{g}$  de proteína<sup>-1</sup>.

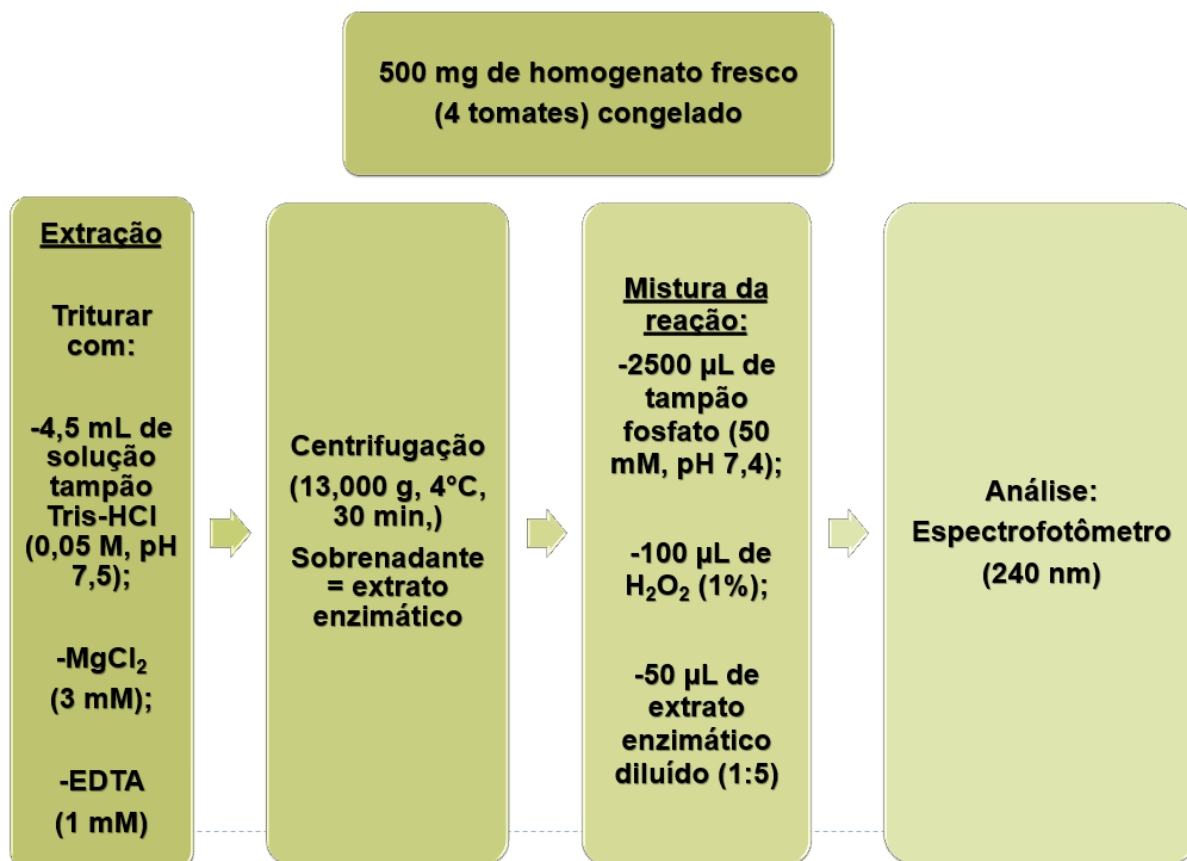


Figura 10 - Análise de CAT. Fonte: Adaptado de Kang & Saltveit (2001).

#### 4.4.1.1.3 Ensaio enzimático APX

A atividade de APX (Figura 11) também foi avaliada de acordo com Kang & Saltveit, (2001) e foi determinada utilizando-se tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo EDTA (0,1 mM), ascorbato (0,5 mM),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,54 mM) e 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto diluído (1:5). A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do ácido ascórbico ( $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) em espectrofotômetro a 240 nm (Figura 11). O cálculo da atividade específica foi realizado de forma similar à da CAT, de acordo com Kar & Mishra (1976). O resultado foi expresso em  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico/ $\text{min}^{-1}/\text{g}$  de proteína<sup>-1</sup>.

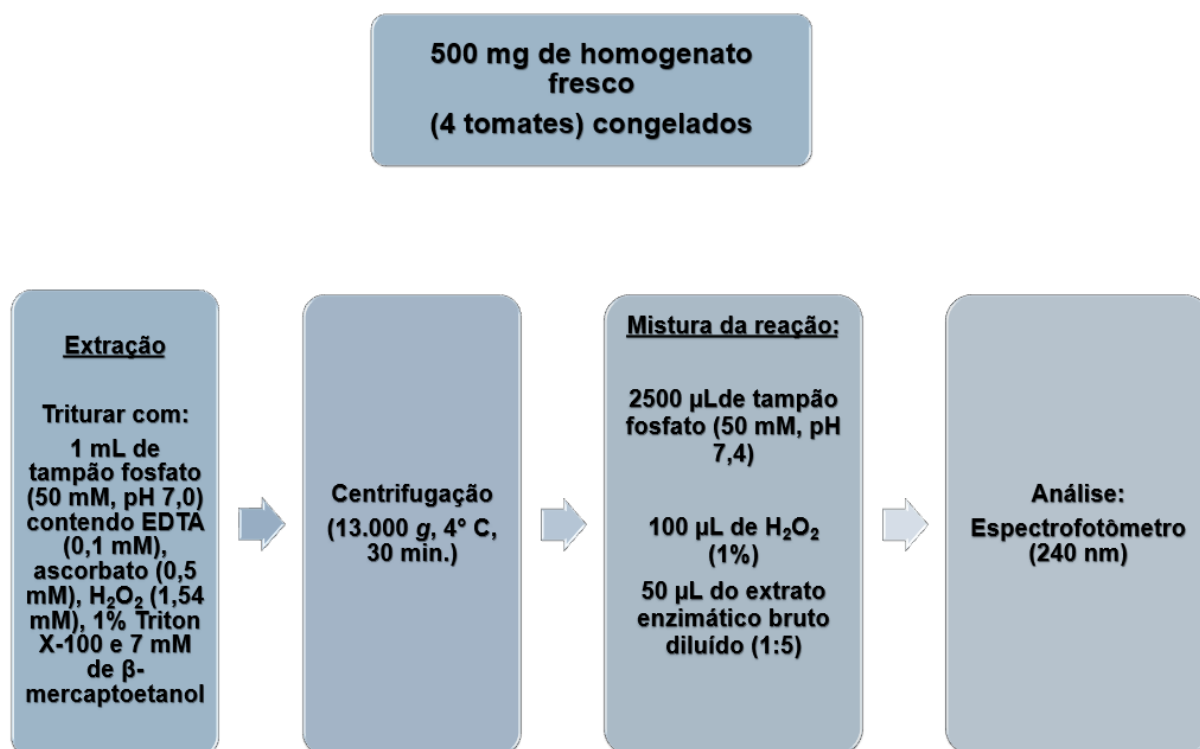


Figura 11 - Análise de APX. Fonte: Adaptado de Kang & Saltveit (2001).

#### 4.4.1.1.4 Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada baseada no teste de Bradford (Bradford, 1976) através de uma curva padrão utilizando albumina bovina sérica ( $y=0,0262x + 0,1267$ ,  $R^2= 0,93$ ). A análise de absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. O resultado foi expresso em µg de proteína.

#### 4.4.2 Análise do perfil do metabolismo primário de compostos polares (CG/EM) em amostras tratadas e controles

##### 4.4.2.1 Preparação do extrato

A extração e derivatização de metabólitos polares foi conduzida de acordo com Meza *et al.* (2021). Amostras contendo 100 mg do pó de pericarpo congelado (-80°C) do homogenato de tomates foram extraídas com metanol a -20 °C (1400 µL)

acrescidas de padrão interno ribitol (200 µg/mL, 60 µL), vortexadas e incubadas (10 min, 70 °C). Em seguida, foram centrifugadas (11000 g, 10 min) e aos sobrenadantes foram adicionados clorofórmio (20 °C, 750 µL) e água ultrapura (1500 µL) e centrifugadas (2200 g, 15 min). Os sobrenadantes (150 µL) foram secos com N<sub>2</sub>, derivatizadas com solução de hidrocloreto de metoxiamina em piridina (20 mg/mL, 40 µL) e incubadas (37 °C, 2h). Por fim, foi adicionado MSTFA (70 µL) e as amostras foram encaminhadas para análise por CG/EM (Figura 12).

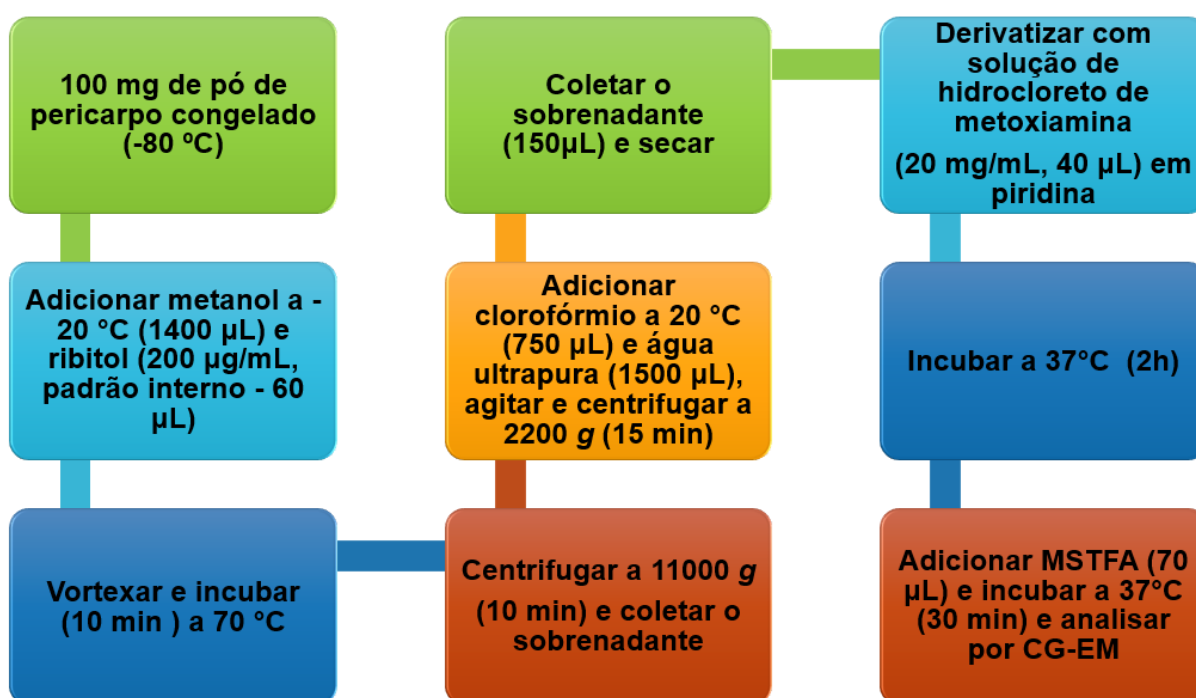


Figura 12 - Metodologia de extração e derivatização de metabólitos polares. Fonte: Adaptado de Meza *et al.* (2021).

#### 4.4.2.2 Condições cromatográficas

O perfil das substâncias polares presentes no extrato do homogenato de tomates foi obtido em um equipamento de cromatografia em fase gasosa Shimadzu 2010 equipado com um detector de massa com analisador quadrupolar em modo de ionização eletrônica a 70 eV e com hélio como gás de arraste. As condições das análises no cromatógrafo são descritas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Condições cromatográficas CG/EM.

<b>Condições cromatográficas CG/EM</b>			
Coluna	DB-5MS 30m x 0,25mm x 0,25um		
Gás de arraste	Hélio		
Temperatura da coluna	80 °C		
Temperatura do injetor	230 °C		
Modo de injeção	<i>Split (1/50)</i>		
Modo de controle de vazão	Velocidade linear		
Pressão	0.61 kgf/cm <sup>2</sup>		
Vazão total	50.6 mL/min		
Vazão da coluna	0.93 mL/min		
Velocidade linear	35.6 cm/sec		
Vazão de purga	3.0 mL/min		
<i>Split ratio</i>	50.0		
Programa de temperatura do forno	Taxa	Temperatura	Tempo de espera
	-	80	2
	15	300	12
Temperatura da fonte de íons	250 °C		
Temperatura da interface	250 °C		
Tempo de corte do solvente	3.90 min		
Modo de ganho do detector	<i>Relative to the Tuning</i>		
Ganho do detector	0.82 kV +0.00 kV		
<i>Threshold</i>	0		
<i>Start time</i>	4 min		
<i>End time</i>	28,67 min		
<i>ACQ Mode</i>	<i>Scan</i>		
Tempo do evento	0.30 s		
<i>Scan speed</i>	2000		
<i>Start m/z</i>	40		
<i>End m/z</i>	600		

### **4.4.3 Análise do perfil do metabolismo primário de compostos apolares (CG/EM) em amostras tratadas e controles**

#### **4.4.3.1 Preparação do extrato**

A extração e derivatização de metabólitos apolares também foi conduzida de acordo com Meza *et al.* (2021). Amostras contendo 1000 mg do pó de pericarpo congelado (-80°C) do homogenato de tomates foram extraídas com clorofórmio (1250 µL), metanol (2500 µL) e o padrão interno n-tridecano (800 µg/mL, 20 µL), vortexadas (10 s) e incubadas no gelo (30 min). Foram adicionados Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5%, 1250 µL), clorofórmio (1250 µL) e incubadas novamente no gelo (5 min). Em seguida, foram centrifugadas (1000 g, 4 °C, 15 min), os sobrenadantes foram secos com N<sub>2</sub> e ressuspensos em hexano (1000 µL), tolueno (200 µL), metanol (1500 µL), ácido clorídrico (8%, 300 µL). Após, foram vortexadas (10 s) e incubadas (1,5 h, 100 °C) e então foi adicionado hexano (1000 µL), água ultrapura (1000 µL), vortexadas e centrifugadas (1000 g, 4 °C, 15 min), a fim de coletar a fração hexânica. Por fim, as frações hexânicas foram secas em N<sub>2</sub> e ressuspensas em hexano (80 µL) e piridina (20 µL) e então derivatizadas com N-Metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida - MSTFA (40 µL) encaminhadas para análise por CG/EM (Figura 13).

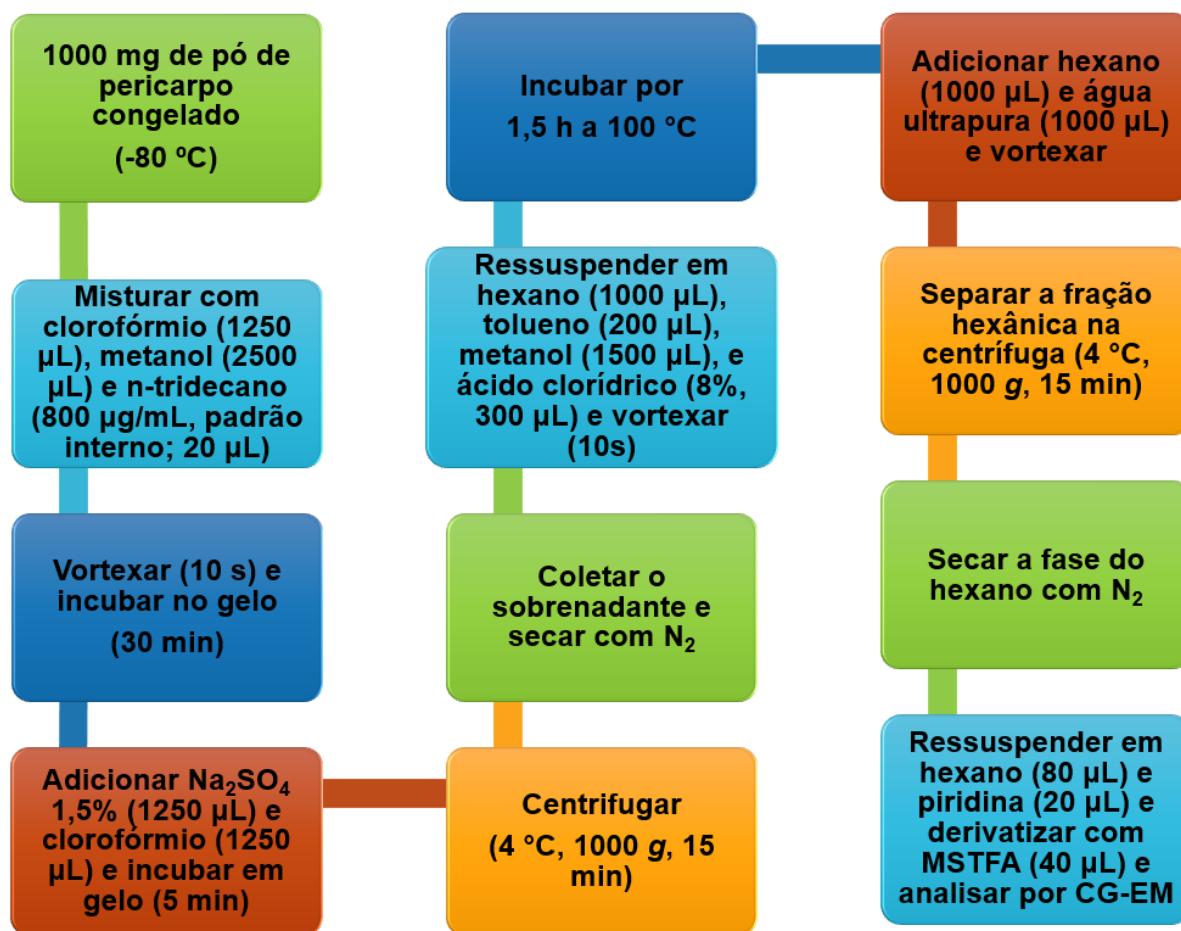


Figura 13 - Metodologia de extração e derivatização de metabólitos apolares. Fonte: Meza *et al.* (2021).

#### 4.4.3.2 Condições cromatográficas

O perfil das substâncias apolares presentes no extrato do homogenato de tomates também foi obtido em um equipamento de cromatografia em fase gasosa Shimadzu 2010 equipado com um detector de massa com analisador quadrupolar em modo de ionização eletrônica a 70 eV e com hélio como gás de arraste. As condições das análises no cromatógrafo foram as mesmas realizadas para a caracterização do perfil de metabólitos polares do subtópico anterior **4.4.2.2 Condições cromatográficas.**



#### 4.4.4. Análise do perfil do metabolismo secundário vegetal (CLAE/EM)

##### 4.4.4.1 Preparação do extrato

A extração empregada para a análise do metabolismo secundário vegetal (CLAE/EM) foi baseada na metodologia desenvolvida por Gomez-Romero *et al.* (2010). Amostras de 500 mg do pó liofilizado de homogenato de tomates (N=4) entre controles (banhados em água destilada, 30 min) e tratados (banhados em solução aquosa de ulvan - 1 mg/mL, 30 min) e em triplicata, foram extraídas com 5 mL de metanol em banho ultrassônico com 30 minutos. Após isso, as amostras foram centrifugadas (10.000 g, 10 min) e os sobrenadantes reservados. O processo de extração foi repetido mais 2 vezes com o mesmo material e os três sobrenadantes foram combinados respectivamente para cada amostra. Por fim, as amostras foram filtradas (22  $\mu$ m) para vials âmbar e mantidas sob refrigeração até serem analisadas por CLAE/EM (Figura 14).

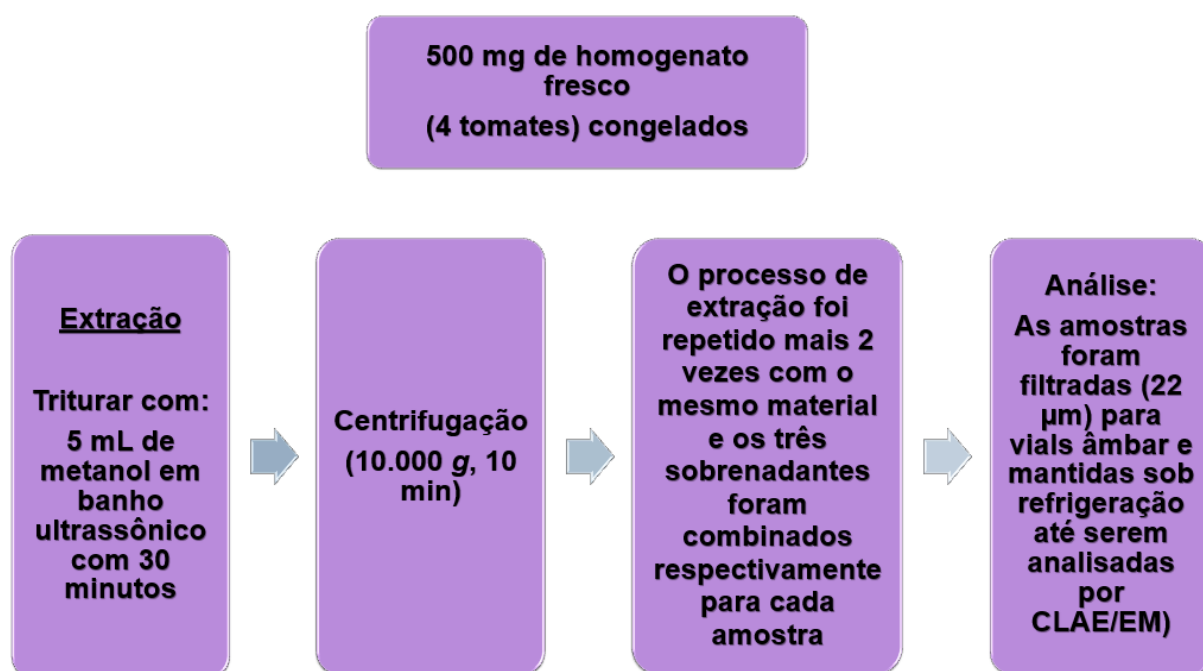


Figura 14 - Metodologia para análise do metabolismo secundário dos frutos de tomate. Fonte: Gomez-Romero *et al.* (2010).

#### 4.4.4.2 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo Agilent Infinity 1260 acoplado a um espectrômetro de massa MicrOTOF Bruker (Tabela 2). As análises de HPLC foram realizadas utilizando um ACE-3 C18 coluna (100 mm x 2,1 mm de identificação, tamanho de partícula de 3,0 µm, gradiente de metanol em ácido fórmico aquoso a 0,1% e detecção de UV a 280, 310 e 360nm). Os parâmetros do instrumento ESI CLAE – EM foram configurados para um modo de íon positivo ou negativo e espectros foram adquiridos em uma faixa de massa de 100–1200m/z. Os outros valores ótimos dos parâmetros ESI-MS foram: tensão capilar, 5000 V; temperatura do gás seco, 200 °C; fluxo de gás seco, 2,0 L/min; pressão do nebulizador, 2,0 bar e taxa de espectro, 1 Hz. A vazão do CLAE (0,3 mL/min) foi entregue diretamente no detector de espectrometria de massa (EM). O calibrante era um cluster de formato de sódio contendo Hidróxido de sódio 5 mM e ácido fórmico aquoso a 0,2% – isopropanol (1:1, v/v), injetado no início de cada corrida com Cole Palmer bomba de seringa (Vernon Hills, IL, EUA) conectada diretamente à interface. Os espectros foram calibrados antes da identificação do composto (Tabela 2).

O sistema de CLAE utilizou uma fase móvel composta por água deionizada com 0,5% de ácido acético (A) e acetonitrila (B), com uma vazão de 1,8 mL/min. O programa de eluição gradiente foi o seguinte: 0–2 minutos, 1–3% de B; 2–15 minutos, 3–9% de B; 15–32 minutos, 9–35% de B; 32–39 minutos, 35–100% de B. Em seguida, o teor de B foi reduzido às condições iniciais e a coluna foi reequilibrada por 6 minutos (tempo total de execução de 85 minutos).

Todas as operações foram controladas por um software Data Analysis 3.4 (Bruker Daltonics), que forneceu uma lista de possíveis fórmulas elementares por usando o Editor Gerar Fórmula Molecular. A identificação de compostos foi realizada com base em espectros UV e fragmentação perfis e massas medidas foram obtidas com uma resolução de 20.000 com erro padrão melhor que 10ppm.

Tabela 2 – Condições cromatográficas para análise de metabólitos secundários de tomate por CLAE/EM.

<b>Condições cromatográficas</b>	
Coluna	Fase reversa C18 (2,1 de diâmetro interno × 100 mm de comprimento, partículas de 2,7 µm, Agilent Poroshell 120 EC)
Temperatura	37 °C
Fases	Fase A - água deionizada com 0,5% de ácido acético / Fase B – acetonitrila
Método	Gomez-Romero <i>et al.</i> (2010), com modificações
Vazão da fase móvel	1,8 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Faixa de comprimento de onda	240 and 280 nm

#### **4.4.5 Análise do perfil de carotenoides (CLAE) e quantificação de carotenoides totais em amostras tratadas e controles**

##### **4.4.5.1 Perfil de carotenoides**

###### **4.4.5.1.1 Preparação do extrato**

A extração de carotenoides foi baseada na desenvolvida por Sérino *et al.* (2009) (Figura 26). Foram tomadas amostras de 200 mg do pó liofilizado de tomates controles e tratados (banhados em solução aquosa de ulvan - 1 mg/mL) em triplicata. A extração foi realizada com solução supersaturada de NaCl (5000  $\mu$ L), hexano (2500  $\mu$ L), acetato de etila (1000  $\mu$ L) e diclorometano (200  $\mu$ L) e foi adicionado como padrão interno uma solução de  $\beta$ -Apo-8'-carotenal (trans) (0,25 mg/mL - 100  $\mu$ L). Em seguida, os extratos foram vortexados por 10 segundos e colocados em banho ultrassônico por 30 min e então levados para centrifugar (5500 rpm, 4°C, 10 minutos). As amostras foram filtradas (22  $\mu$ m) para vials âmbar e mantidas sob refrigeração até serem analisadas por CLAE (Figura 15).

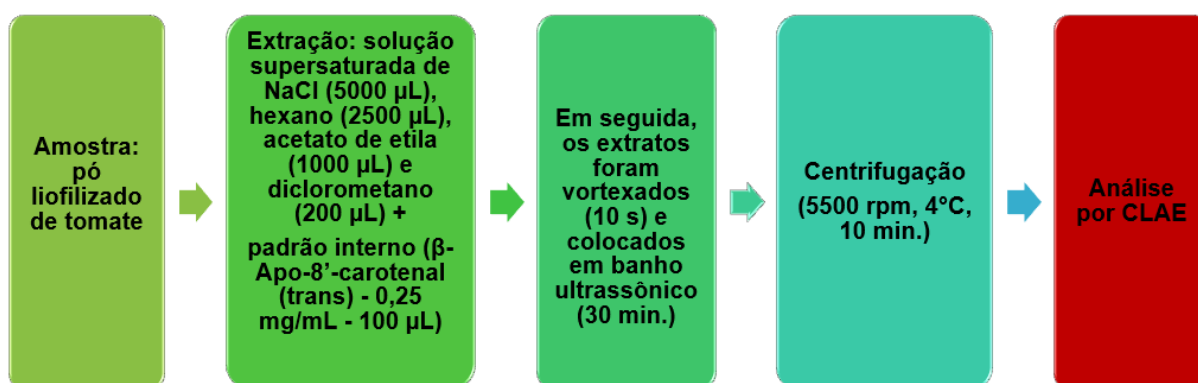


Figura 15 - Metodologia de extração de carotenoides. Fonte: Adaptado de Sérino (2009).

#### 4.4.5.1.2 Condições cromatográficas

As análises de CLAE foram realizadas de acordo com Londoño-Giraldo *et al.* (2021), em triplicata, em um cromatógrafo Shimadzu Prominence equipado com um detector DAD UV-visível, nas seguintes condições: Coluna YMC 30 *Carotenoid column* (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5  $\mu$ m), Waters, Ireland) acoplado a uma pré-coluna YMCTM *Carotenoid* (10 mm x 4 mm, tamanho de partícula de 5  $\mu$ m). A metodologia de análise foi a mesma utilizada por Londoño-Giraldo *et al.* (2021): fase A = metanol: MTBE: água (90:7:3, v:v:v) e fase B = metanol: MTBE (10:90, v:v) com um gradiente de: 0 min, 95 % A; 5 min, 70% A; 10 min, 50% A; 15 min, 20% A; 20 min, 0% A; 27 min, 95% A, em tempo de execução de 33 min e vazão de 1 mL/min. Um

volume de 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi injetado. Os cromatogramas obtidos foram integrados e as áreas dos picos foram normalizadas em relação ao pico do padrão interno trans- $\beta$ -Apo-8'-carotenal para obter áreas relativas (Tabela 3). A identificação de cada carotenóide foi realizada com base na análise espectral - nm de luteína (445, 474), fitoeno (281), all-trans- $\beta$ -caroteno (452, 477), 1,2-dihidrolícopeno (440, 468, 502) e trans-licopeno (446, 472, 503) e seus respectivos tempos de retenção por comparação com Londoño-Giraldo *et al.* (2021).

Tabela 3 – Condições cromatográficas para análise de carotenoides em tomates por CLAE.

<b>Condições cromatográficas</b>	
Coluna	YMC C30 <i>Carotenoid column</i> (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 $\mu\text{m}$ ), Waters, Ireland)
Pré-coluna	YMC Carotenoid (10 mm x 4 mm, tamanho de partícula de 5 $\mu\text{m}$ )
Temperatura	28 °C
Fases	A - metanol: MTBE: água (90:7:3, v:v:v) B - metanol:MTBE (10:90, v:v)
Método	0 min, 95% A; 5 min, 70% A; 10 min, 50% A; 15 min, 20% A; 20 min, 0% A; 27 min, 95% A
Vazão da fase móvel	1 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	20 $\mu\text{L}$
Faixa de comprimento de onda	200–750 nm

---

Comprimentos de onda de trabalho	luteína (445, 474), fitoeno (281), all-trans- $\beta$ -caroteno (452, 477), 1,2-dihidrolícopeno (440, 468, 502) e trans-lícopeno (446, 472, 503)
----------------------------------	--

---

#### 4.4.6 Quantificação de ácido ascórbico

A extração e a dosagem de ácido ascórbico nas amostras controles e nas tratadas com ulvan foi realizada de acordo com Shao *et al.* (2022), em um N= 25 tomates para cada condição (Figura 16). Tomates escolhidos ao acaso (n=5) para cada dia de análise (1, 2, 3, 6 e 9 dias após o tratamento) foram congeladas com N<sub>2</sub> e moídas com o auxílio de um moinho. Para cada 10 g desse pó congelado foram misturados 50 mL de solução aquosa de ácido oxálico a 0,5% em um erlenmeyer. Os frascos foram sonicados por 30 minutos em banho ultrassônico. As misturas foram filtradas em filtro PVDF de 0,22  $\mu$ m e 20  $\mu$ L do filtrado foram injetados para análise no cromatógrafo (CLAE).

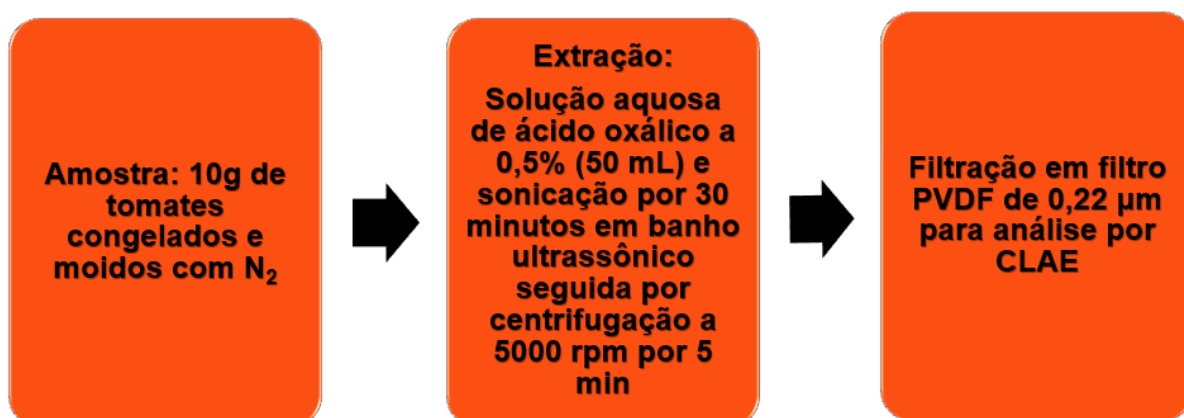


Figura 16– Metodologia de extração para dosagem de ácido ascórbico.

#### 4.4.6.1 Condições cromatográficas

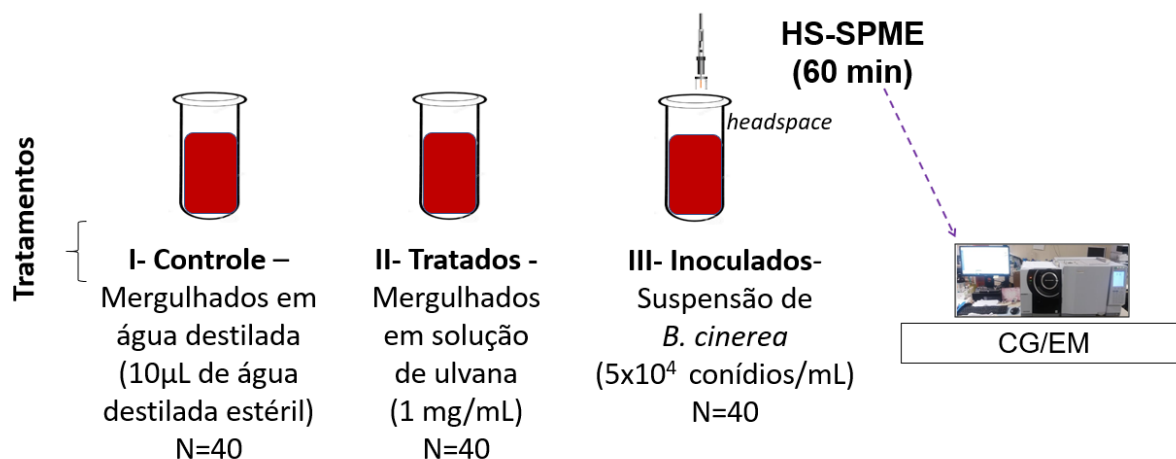
As análises foram feitas realizadas de acordo com de acordo com Shao *et al.* (2022), em triplicata, em um cromatógrafo Shimadzu Prominence equipado com um detector DAD UV-visível, com uma coluna C18 (4.6 x 250 mm x 5 µm). Foi utilizada uma única fase móvel com água ultrapura contendo 0,1% de ácido oxálico em um método isocrático em uma vazão de 1 mL/min. O comprimento de onda para as análises foi de 243 nm.

#### 4.4.7 Análise de Compostos Orgânicos Voláteis (HS-SPME-CG/EM)

##### 4.4.7.1 Preparação do extrato

O preparo dos extratos de tomates e análise por HS-SPME-CG/EM (Microextração em Fase Sólida de *Head Space* por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplado ao Espectrômetro de Massas) foi baseado em Li *et al.* (2019). As amostras congeladas foram descongeladas e colhidas em triplicado. A extração foi realizada da seguinte forma: uma fibra DVB/CAR/PDMS (50/30 µm) foi exposta por 40 minutos ao headspace de frascos de 20 mL selados com septo de silicone contendo amostras de tomate (4,5 g) acrescidas de n-octanol (8 µL, 100 mg/L) e solução saturada de CaCl<sub>2</sub> (1,7 mL) e submetida a aquecimento (40 min, 50 °C). Os conteúdos de fibra foram analisados imediatamente por CG/EM (Figura 17).

Para as tomadas de amostra foram escolhidos randomicamente 4 tomates respectivamente entre controles, tratados com ulvan (1 mg/mL) ou infectados com *B. cinerea* (5 x 10<sup>4</sup> conídios/mL). Para cada horário de análise (1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos ou inoculação), os tomates selecionados foram imediatamente congelados com N<sub>2</sub> líquido e armazenados a -80°C até o momento da análise.



- Amostras foram retiradas do *headspace* em momentos diferentes: 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h após a inoculação ou tratamento. O experimento foi repetido 3 vezes.

Figura 17 - Ensaio do experimento de análise de voláteis em amostras controle, tratadas com ulvan ou inoculadas com *B. cinerea*. Fonte: Elaboração própria.

#### 4.4.7.2 Condições cromatográficas

A análise de COVs por CLAE/EM também foi baseada na metodologia de Li *et al.* (2019) (Tabela 4). Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo QP2020 equipado com analisador quadrupolo operando em modo de ionização eletrônica (70 eV). A faixa de massa medida foi  $m/z$  60 – 600 Da. A cromatografia gasosa foi realizada utilizando uma coluna Agilent DB-5MS (5% fenilmetilsilicone) 30m x 0,2 mm, 0,25 µm com hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi fixada em 40 °C por 6 min, depois aumentada para 100 °C com uma taxa de 3 °C min<sup>-1</sup> e finalmente aumentada para 230 °C a uma taxa de 5 °C.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e da interface foram de 250 °C. O tempo de dessorção da fibra foi de 5 minutos. Os componentes foram identificados por comparação com espectros de uma biblioteca espectral de massa NIST14. As áreas dos picos foram normalizadas em relação à área do padrão interno (n-octanol).



Tabela 4 - Condições cromatográficas para análise COVs em tomates por CG/EM.

<b>Condições cromatográficas</b>	
Coluna	Agilent DB-5MS (5% fenilmetilsilicone) 30m x 0,2 mm, 0,25 µm
Temperatura	Temperaturas do injetor e da interface: 250 °C
Método	A temperatura da coluna foi fixada em 40 °C por 6 min, depois aumentada para 100 °C com uma taxa de 3 °C min <sup>-1</sup> e finalmente aumentada para 230 °C a uma taxa de 5 °C.min <sup>-1</sup>
Faixa de comprimento de onda	m/z 60 – 600 Da
Gás de arraste e vazão	He - vazão de 1 mL/min

#### 4.5 Identificação de metabólitos por CG/EM e por CLAE/EM

Para identificação dos metabólitos, foram combinadas as seguintes informações:

- a- Para CG/EM: consulta a base de dados NIST 2014. Neste caso foram consideradas identificações positivas quando o índice de similaridade fosse maior do que 800.
- b- Pra CLAE/EM: foram realizadas consultas à literatura (Moco *et al.*, 2006; Miklavčič Višnjevec *et al.*, 2021) para comparação de medidas de massa e confirmação por comparação com espectros no ultravioleta publicados.

Testes para verificação da adequação das condições de obtenção dos perfis metabólicos foram realizados preparando-se soluções de padrões (1 mg/mL) para cada uma das seguintes análises:

- a- Para as análises de substâncias polares via CG/EM: de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos (frutose, maltose, glicose, sacarose, galactose,

mio-inositol, ácido cítrico, alanina, serina, prolina, ácido aspártico e ácido glutâmico).

- b- Para as análises de substâncias apolares via CG/EM: padrões de ácidos graxos (palmitato de metila, lignocerato de metila, behenato de metila e estearato de metila).
- c- Para as análises via CLAE/EM: padrões de flavonoides (naringina, ácido *p*-cumárico, miricetina, rutina e quercetina).

Essas soluções foram injetadas no início, no meio e no final de cada sessão de análises por CG/EM e CLAE/EM. O processamento dos dados obtidos por CG/EM e por CLAE/EM foi feito mediante o uso do software ACD/Spectrus versão 2022.1.1 (Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) ACD Labs, Toronto, ON, Canada).

## 4.6 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas para todos os experimentos usando o software XLStat (*Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel*, Addinsoft, Paris, França, 2017), por meio de ANOVA (intervalo de confiança = 95%, tolerância = 0,0001 a 0,05; teste de Tukey e Fisher). Já os *heat maps* foram construídos usando o software *Orange: Data Mining Toolbox in Python* (Densar *et al.*, 2013). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi conduzida com a utilização de cinco Componentes Principais (PC), nos quais todas as variáveis e amostras foram ponderadas igualmente (com peso 1). Adicionalmente, o processo incorporou validação cruzada com uma amostra por segmento e foi realizado sem aplicação de rotação nos componentes. As análises multivariadas foram executadas através do software Unscrambler® X 10.2, desenvolvido pela Camo Software,

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Capítulo 1

#### 5.1.1 Extension of Solanaceae food crops shelf life by the use of elicitors and sustainable practices during postharvest phase



# Extension of Solanaceae Food Crops Shelf Life by the Use of Elicitors and Sustainable Practices During Postharvest Phase

Dora dos S. Costa<sup>1</sup> · Daniela S. Alviano Moreno<sup>2</sup> · Celuta S. Alviano<sup>2</sup> · Antonio Jorge R. da Silva<sup>3</sup>

Received: 5 April 2021 / Accepted: 17 September 2021 / Published online: 2 October 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

## Abstract

This review focus on the use of elicitors of plant defense for shelf life extension of the four main Solanaceae food crops: potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*S. lycopersicum*), eggplants (*S. melongena*), and *Capsicum* peppers (chillies and peppers). An overview of worldwide production and losses of these cultures from 2006 onwards is provided, along with the current proposals for the mechanisms of plant colonization by pathogens and the induced resistance in the host, as well as the physiology and biochemistry involved in the use of elicitors during the postharvest phase. A search was made on the patents and published papers on this subject from 2015 to 2020. On average, worldwide losses in storing operations may reach 14.16%, 18.96%, and 1.31% for potatoes, tomatoes, and chilli peppers, respectively, while for eggplants, the losses reach 9.85% along distribution phase. In spite of the increase of elicitor utilization, their mechanisms of action and large-scale applicability are still under investigation. It is noteworthy that the number of published research articles is greater than the number of patents related to the subject, which reflects the difficulties involved in technological developments. Biological agents and natural compounds are indistinctly used as elicitors, according to the literature and patents reviewed. The integrated management of the losses during the postharvest phase has seen the successful inclusion of the use of elicitors of plant defense as a promising trend for sustainable agriculture now and in the next years.

**Keywords** *Solanum* · *Capsicum* · Postharvest losses · Induced systemic response · Integrated management · Sustainable agriculture

## Introduction

The concept of food security is based on two main pillars: satisfactory amounts of agricultural production and universal access to food with sanitary quality (García-Flores et al., 2015; Porat et al., 2018). Overall, this means disease-free food, that is, without phytopathogens. In addition, reaching food phytosanitary standards depends on the variables

involved in the production and others of equal or greater complexity. Among them are the chemical composition of the food itself, its physical properties, and the microbiological contamination load to which the food was subjected (Lvova, 2016). These characteristics, allied to the way food is produced, to postharvest handling and storage, the type of processing, and the way it is distributed and made available for consumption by the population, are closely related to the loss and waste of food (Lipinski et al., 2013).

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2019), food loss and food waste are the main causes of reduction of the amount and/or the quality of food along the supply chain. Postharvest losses occur due to poorly executed practices from postharvest up to wholesale (Santos et al., 2020). Postharvest waste occurs from retail to consumers as a result of inappropriate actions by retailers, food service providers, and consumers who also usually discard fresh food products due to their appearance or because they were bought in amounts larger than necessary or because they are close to their expiration date. The

✉ Dora dos S. Costa  
dora.cost@hotmail.com

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Plant Biotechnology and Bioprocesses, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Structures of Surface of Microorganisms, Institute of Microbiology Professor Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Phytochemical Analysis, Natural Products Research Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

average percentage of food losses may reach 40% worldwide (FAO, 2011) between postharvest and distribution in the fruit and vegetable supply chain including horticultures such as potatoes, tomatoes, eggplants, and chilli peppers. This food category is very perishable and often has a fragile physical constitution, leading to a relatively short shelf life (Mahajan et al., 2014). Needless to say, these foods represent essential sources of vitamins, minerals and fibers (Garcia et al., 2015; Kasapidou et al., 2015; Pem & Jeewon, 2015). In general, postharvest losses of fresh products play a remarkable role in the global food loss and waste (FAO, 2011). Thus, there is still a long way to go through to reduce such losses. Only 5% of research investments annually in the sector are focused on preventing food loss (Kader, 2005; Verma et al., 2019), which has an important role within the food distribution chain.

Postharvest diseases have been massively prevented by the use of synthetic fungicides with active ingredients such as imazalil (IMZ), pyrimethanil (PYR), fludioxonil (FLU), thiabendazole (TBZ), and others as cost-effective means of postharvest decay control in conventional horticulture (Palou, 2018). Nevertheless, careful use of these fungicides is recommended due to their carcinogenicity, teratogenicity, high and acute residual toxicity, long degradation period, environmental persistence, and other side effects on human health (Tripathi & Dubey, 2004; Adss et al., 2017). Although the efficacy of many synthetic fungicides is being reduced due to the proliferation of resistant fungal strains (Palou, 2018), it is true that the most reliable means to control diseases in pre- and postharvest, including in horticultural crops, is by the use of synthetic fungicides.

Strategies to manage crop diseases such as integrated management and organic farming stands out among the tendencies of sustainable agricultural practices. Certified organic products are recognized as pesticide-free, and the practices of organic farming reduce pollution, conserve water, reduce soil erosion, increase soil fertility, and use less energy (Smith et al., 2019). Consumer trends and legislative updates clearly favor a reduction in the use of conventional fungicides. Following the current trends, in addition to reducing the use of fungicides, other strategies have been used to fight or prevent crop pathogens, such as the breeding of resistant cultivars through genetic engineering or selective breeding. However, according to Alexandersson et al. (2016), the development of a new breed may take a long time and there is a cruel fact: many pathogens adapt rapidly. Then, the resistance based on introduced resistance genes may be overcome rapidly if not combined with other strategies. This does not mean that research on genetic engineering for the development of pathogen-resistant cultivars aiming postharvest extension of shelf life is not of extreme relevance; only a broader strategy has to be used integrating the available resources to provide a more effective action slowing down the emergence of resistant pathogens. An example that has proved to be promising,

the stimulus of the plant's innate immunity is a strategy that is gaining its momentum in research (Wisniewskia et al., 2016). Many initiatives now include natural compounds that may induce plant resistance, which may be exploited, both in pre- and postharvest phase: the plant resistance inducers or elicitors.

To contextualize this review, we start the discussion by presenting the current status of production and losses of the main Solanaceae food crops: potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*S. lycopersicum*), eggplants (*S. melongena*), and *Capsicum* peppers (chillies and peppers).

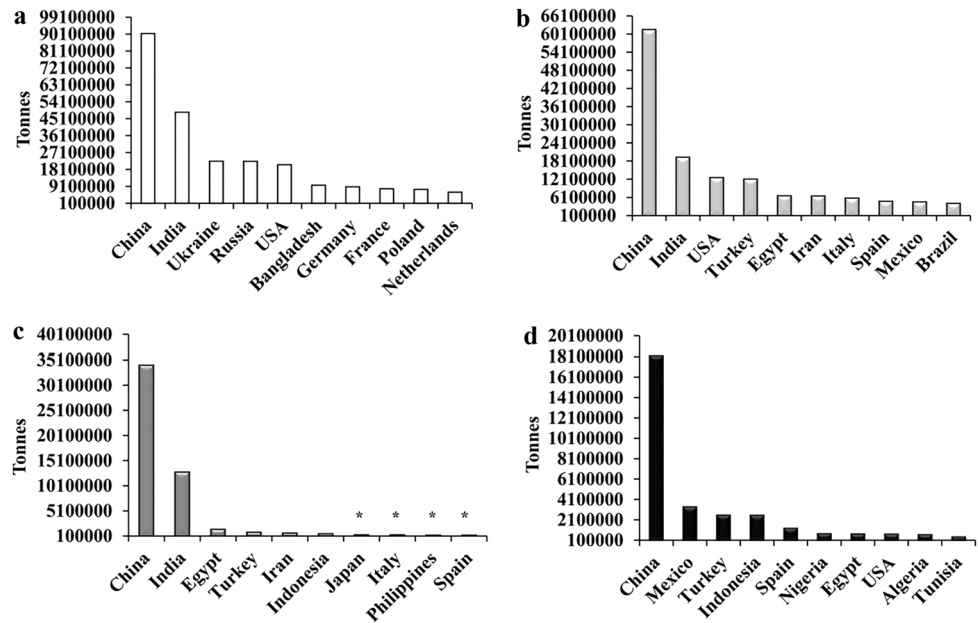
### Solanaceae Food Crops of Economical Importance: Production and Losses Worldwide Along the Supply Chain

The Solanaceae family, also known as the nightshade family, includes about four thousand species, distributed in 106 genera with a wide variety of species found in different parts of the world, where the genus *Solanum* is the largest and most representative, with about two thousand species (Coelho et al., 2017). Many of the members of this family have medicinal properties, as well as hallucinogenic, narcotic, and even poisonous activities. Such properties are due to the fact that many members of this family contain tropane alkaloids and glycoalkaloids naturally produced by defense mechanisms of the plant itself against insect predation, herbivory, and attacks by pathogenic organisms (Jerzykiewicz, 2007). Despite being highly diverse, only a few species of the Solanaceae are food crops of economic importance: potatoes, tomatoes, *Capsicum* peppers, eggplants, pepino melons, naranjillas, and tamarillos (tree tomatoes) (Gebhardt, 2016). Potatoes and tomatoes stand out among the other Solanaceae crops in postharvest conservation to ensure longer shelf life by avoiding postharvest diseases and losses. Among the main reasons for the loss of the products are diseases caused by microorganisms, which can infect the plant even before harvest (Sivakumar & Bautista-Baños, 2014). In general, these microorganisms have as their entrance door skin wounds generated by poor transport and storage conditions (Sivakumar et al., 2016).

According to FAO, the Asian continent is the largest producer of potatoes, tomatoes, eggplants, and *Capsicum* peppers (chillies and peppers because *Capsicum* and *Piper* peppers are not distinguished as individual crops in all FAO statistic databases), followed by Europe and America (Faoestat, 2018). The main world producers are shown in Fig. 1.

As observed, China and India are leading the global production of potatoes, tomatoes, and eggplants while China and Mexico are leading the production of *Capsicum* peppers (chillies and peppers) (Fig. 1).

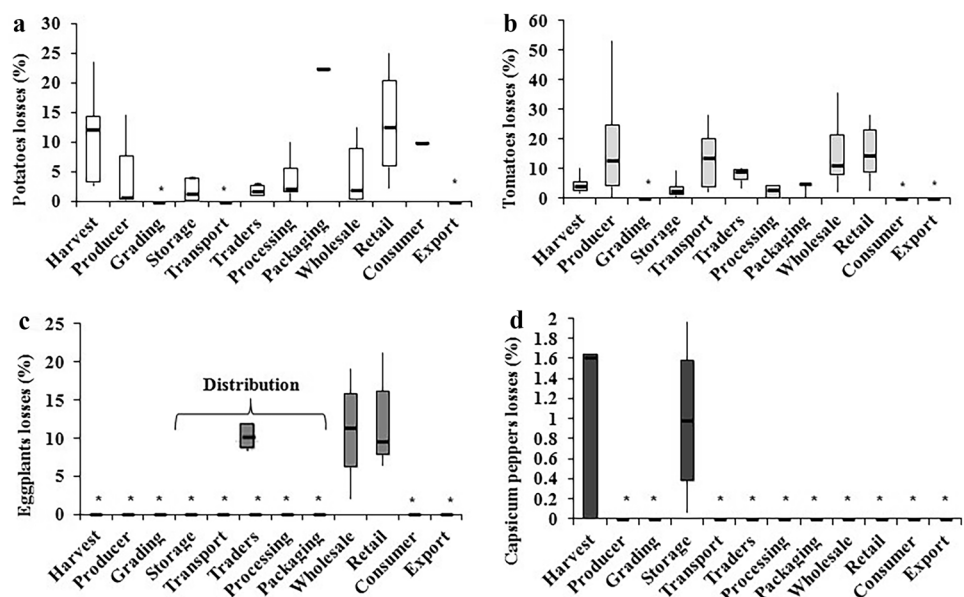
**Fig. 1** World ranking of producers of the four main Solanaceae crops. **a** Potatoes. **b** Tomatoes. **c** Eggplants. **d** *Capsicum* peppers (chillies and peppers). Data from the year 2018. Source: FAO (2018)



Despite the current global concern in reducing food losses and waste, quantifying food losses is still a task lacking adequate tools. Recently, FAO created the Food Loss and Waste Database, a public online database that provides data from open accessible reports and studies measuring food loss and waste across food production stages of the supply chain and geographical areas. This database provides, until the current year, data from the year 1945 to 2017. According to this database from 2006 to 2017, the losses in potatoes, tomatoes, eggplants and *Capsicum* peppers (chillies and peppers) throughout the whole production chain, are as shown in Fig. 2.

As can be seen in Fig. 2, although there is no data for all stages of the supply chain for all the Solanaceae food crops focused in this review, there is information on the losses at the harvest and some of the distribution phases along the supply chain. A closer examination reveals that, for potatoes and tomatoes, the period between the harvest and storage stages, also called storing operation (producer and grading stages), is critical as are also the wholesale and retail stages. It is estimated that even during the harvest phase, approximately 5–8% of the production is lost while about 15–20% of the postharvest losses occur along the storing operations, followed by transport (10–12%) and storage (5–10%),

**Fig. 2** Percentual of global losses during 2006–2017 of the four most important crops from harvest to export. **a** Potatoes. **b** Tomatoes. **c** Eggplants. **d** *Capsicum* peppers (chillies and peppers). Source: Food Loss and Waste Database (2017)



respectively (Grolleaud, 2002). Thus, the storing operation losses are the highest and may reach 14.16%, 18.96%, and 1.31% for potatoes, tomatoes, and *Capsicum* peppers (chilies and peppers), respectively. For eggplants, due to the lack of information, it is only possible to verify that the losses may reach 9.85% along the distribution phase and 11.3% in wholesale (Fig. 2).

To better understand the reasons for food loss, including Solanaceae loss, it is necessary to evaluate the interaction dynamics between plant hosts and its pathogens and which factors may potentialize the pathogen infection.

### Physiological and Biochemical Events Associated to Plant Ripening Potentiate Pathogen Infection

The diseases caused by microorganisms are among the main reasons for plant loss in the postharvest period. In this period, disease development makes a large amount of the crops unfit to be consumed (Wani, 2011). These infections can be traced to the preharvest phase (Sivakumar & Bautista-Baños, 2014) when skin wounds generated by poor transport and storage conditions along the supply chain provide the entrance door for phytopathogens to develop during the postharvest phase (Sivakumar et al., 2016).

The recognition of phytopathogens by plants triggers an array of defense responses. An incompatible interaction pathogen/plant generally induces a wealth of signaling cascades including the generation of reactive oxygen species (ROS), programmed cell death, and induction of pathogenesis-related protein (PR) genes (Alkan & Fortes, 2015). When invading plant tissues, pathogens come across layers of waxes deposited outside the cuticle, cuticle covering epidermal cell walls in aerial parts of plants and cellulose layers. Plant pathogens may penetrate the plant tissue through natural openings as lenticels, stem ends, or flowers. In response to host's changes, pathogens alter the enzymes and compounds they produce, allowing them to break down or macerate the cuticle and the cell wall of the plant tissue (Alkan & Fortes, 2015). Some fungi infect living tissues as biotrophs a while, but after a period of time can cause the host tissue to die: this is the case of endophytic *Fusarium* species. The pathogen remains quiescent for some time until the optimal temperature and humidity conditions for its development arrives, which typically occurs as the vegetable ripens and goes into senescence. Unfortunately, due to its quiescent nature and to the absence of symptoms in the early colonization stages, it is not possible to detect these pathogens by visual examination (Palou & Smilanick, 2020). In horticultural products, fungi are the main cause of losses in the production chain, impairing their nutritional value and

appearance and, therefore, their market value (Romanazzi et al., 2016).

The reason why fresh fruits and other vegetables are so susceptible, after harvesting, to attacks by microorganisms like fungi and bacteria, is that they lose mechanical resistance when ripening: the more mature, the softer the vegetable and more susceptible to physical injuries. In nature, when the plant ripens, it no longer needs to protect the fruit, because at this stage, the goal is to release the seeds to propagate itself. Conversely, when the plant is kept under cultivation, it is highly mandatory to protect the plant integrity to retard the maturation processes in order to extend the shelf life for consumers (Ferreira et al., 2005; Wang et al., 2017). The combination of progressive maturation with a high content of water, nutrients and sugars with inadequate temperature and humidity conditions for plant preservation, but extremely favorable for the development of pathogenic microorganisms, sets up a highly favorable environment for colonization by pathogens and posterior plant decay (Ippolito et al., 2005). In ideal conditions of humidity and temperatures for pathogen development, dark and flattened lesions are formed from healed or unhealed wounds, usually on very ripe fruits (López & Ávila, 2005).

According to Palou and Smilanick (2020), in general, most of the postharvest Solanaceae diseases are caused by *Alternaria alternata* (black mold) and *Botrytis cinerea* (gray mold) at temperatures of 10 to 12 °C during storage although it may be quiescent until 20 °C at a relative humidity of 90–95% (Prusky et al., 2013). Black mold or *Alternaria* rot (*Alternaria* sp.) often penetrates lesions acquired in the field, although infection may remain quiescent for a few days until it finds suitable environmental conditions. For this reason, it is difficult to control it with fungicides. Gray mold, which is caused by *B. cinerea*, covers the fruit and is intimately related to postharvest losses, causing economic losses in many countries worldwide. It is estimated that the economic losses caused by *B. cinerea* may overcome \$10 billion around the world each year (Hua et al., 2018). Besides having a wide range of plant hosts, *B. cinerea* has high mutagenicity and can survive as mycelium or conidia, which contributes making it difficult to control (Gao et al., 2018).

The main postharvest pathogens affecting potato cultures are *Fusarium* spp. and *F. solani* (*Fusarium* dry rot), *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and ssp. *atroseptica*, *Ralstonia solanacearum* (bacterial soft rot), *Phytophthora infestans* (late blight), *Phytophthora* spp. (pink rot), *Pythium* spp. (water rot), *P. fluorescens* (pink eye), and *B. cinerea* (gray mold). Regarding tomatoes, fungi that usually cause postharvest diseases are *Rhizopus stolonifer* (*Rhizopus* rot), *Colletotrichum coccodes* (anthracnose), *Geotrichum candidum* (sour rot), and *Penicillium expansum* (*Penicillium* rot), along with the already mentioned *A. alternata* and

*B. cinerea*. Bacterial soft rot, a disease caused by *Erwinia* spp., is the main bacterial disease of tomatoes (Palou & Smilanick, 2020). Also, *A. alternata* (Black Mold) and *B. cinerea* (gray mold) are important phytopathogens for eggplants (Palou & Smilanick, 2020), as well *Colletotrichum capsici* (anthracnose) and *R. solanacearum* (bacteria wilt). For chilli peppers, *R. stolonifer* (*Rhizopus* rot), *A. alternata* (black mold) and *B. cinerea* (gray mold) and the bacteria *E. carotovora* (bacterial soft rot) are essential pathogens (Mahendranathan et al., 2010; Montesano et al., 2005; Palou & Smilanick, 2020).

During fruit ripening, significant physiological changes occur: cell wall remodeling, soluble sugar accumulation, decrease in the amount of phytoanticipins and phytoalexins, decline of inducible host defense responses, cuticle biosynthesis and changes in the ambient host pH. Most of those changes are thought to be governed by complex hormonal signals other than ethylene (ET) and abscisic acid (ABA), such as jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA). Interestingly, these phytohormones are also involved in host responses to pathogens attack (Fortes et al., 2017).

Plants react to pathogens attack to survive and have their offspring and, although plants do not have an adaptive immune system, an innate immune system evolved to perceive and respond to pathogen infection (Qi & Innes, 2013).

## Plant Innate Immunity

Pathogens and their plant hosts have been co-evolving through continuous and reciprocal pressure for survival (Kim & Castroverde, 2020). Along the path of this co-evolution, plant defense shields and sensing mechanisms developed to help detect and repel pathogen invasion. The plant's innate immune system shows intriguing similarities with the immune system of vertebrate animals (Qi & Innes, 2013). Additionally, the encounter “plant-pathogen” and the plant defense responses can be modulated by the environmental conditions in several cases (Velásquez et al., 2018).

According to Qi and Innes (2013), plant innate immunity works like a two-tier resistance system: The first tier is represented by plasma-membrane localized pattern recognition receptors (PRRs), which mediate the detection of microbial molecules, also called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The plant then recognizes the presence of pathogens through the recognition of PAMPs or the pathogen effectors. The detection of PAMPs triggers the plant defense. The degree of danger of the attack and the speed and accuracy of the plant cell to mobilize its defenses are determinant to its resistance (Llorens et al., 2017). Curiously, plant PRRs, the majority of which containing extracellular leucine-rich repeats (LRR), are transmembrane receptor kinases that are similar in terms of function to the toll-like receptors of animals—a similarity with

the immunity system of vertebrates. In this level, the plant plasma membrane is itself the plant's first line of defense in which many receptors recognizes peptides and/or carbohydrates found in some microorganisms. Such invasion patterns are microbe- or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs/PAMPs), and the resulting immune response is called pattern-triggered immunity or PAMP-triggered immunity (PTI). PTI results in the production of reactive ROS, plant cell wall modifications, and the production of antimicrobial compounds mediated by complex pathways (Kim & Castroverde, 2020). Thus, MAMPs and PAMPs are the danger signals detected by host cells when plants are attacked by microbes and herbivores, or suffer physical damage (damage-associated molecular patterns (DAMPs)). The recognition of these patterns by the receptors in plants activates systemic resistance to resist pathogen invasion (Gao et al., 2015; Hou et al., 2019; Malik et al., 2020). Pathogens alter the host enzymes and compounds to infect the plant tissue (Alkan & Fortes, 2015).

The second tier of plant defense consists of intracellular receptors (Qi & Innes, 2013). Once pathogen proteins are inside the cell, these receptors detect their presence. Pathogen proteins are also called effector proteins, and that is why the second tier is known as effector triggered immunity (ETI). The largest portion of R genes encodes cytoplasmatic proteins, which have a nucleotide binding site domain (NBS) (also known as NB), and leucine-rich repeating domains (LRR), known as NLRs (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat) a superfamily of intracellular immune receptors (Balint-Kurti, 2019). NLRs are coded by NB-LRR R genes and mediate the recognition of pathogen effectors, which is a specific interaction. Its only function is associated with R-proteins (Gao et al., 2018). On the other hand, the Avr proteins are a class of pathogen effector proteins produced and secreted by the pathogen into the host cells or apoplast to allow the pathogenesis process (Lo Presti et al., 2015). Then, the NLR proteins initiate the effector-triggered immunity (ETI), which involves transcriptional reprogramming overlapping with transcriptional regulations during MAMP/PAMP triggered immunity and commonly generates localized host cell and tissue death at infection sites (Cecchini et al., 2019). This kind of mechanism aims to limit pathogen spread (Grund et al., 2019).

The gene-by-gene mechanism discovered by Flor in 1955 (Flor, 1971) and reviewed in 1971 by the same author (Balint-Kurti, 2019) allows one to determine whether the plant/pathogen interaction results in disease or resistance. In a simple description, the result of the plant/pathogen interaction depends on the fact that there is a dominant resistance gene (*R*-gene) in the host corresponding with a pathogen dominant avirulence gene (*Avr* gene). Resistance occurs if both products of the *R*-gene and the corresponding *Avr* gene product interact with each other. This fact seems to be

applicable across most of higher plants species, although it is already known that this specific interaction is not always necessary. Recent developments on NB-LRR *R* genes reveal that they are a valuable source of information for breeders to minimize disadvantages associated with NB-LRR gene responses in crops such as an improper activation of hypersensitive response (HR). Generally, the mention of these classes of genes is not frequent in literature since they do not behave according to the rules of the gene-by-gene mechanism (Ravensbergen & Kormelink, 2020). Nevertheless, in most cases, a hypersensitive response (HR) is associated with *R*-gene-mediated resistance (Balint-Kurti, 2019).

The HR is typical to all higher plants and causes a rapid cell programmed death at the point of contact with the pathogen to limit the disease. Although it is usually associated with pathogen resistance, it may have other peculiar consequences, such as pathogen susceptibility and plant growth retardation (Balint-Kurti, 2019). Possibly HR may cause speciation in evolutionary timescales in case of inappropriate activation, but it is not clear how this phenomenon occurs outside of *Arabidopsis* and its Brassicaceae relatives (Lafon-Placette et al., 2016). As HR has potential undesirable costs once activated inappropriately, plants employ multiple mechanisms to avoid its inappropriate activation and limit its function. Overall, HR is a tool that, despite its undesirable costs, is an extremely effective element of the plant immune system (Balint-Kurti, 2019).

There are three ways in which plants defend themselves, and these have been exhaustively reviewed: systemic acquired resistance (SAR), herbivore induced resistance (HIR), and induced systemic resistance (ISR) (Truman et al., 2010; Dempsey & Klessig 2012; Shah & Zeier, 2013; Carella et al., 2017; Llorens et al., 2017; Pieterse et al., 2014; Romera et al., 2019). A discussion on ISR and elicitors is in sequence.

## ISR and Elicitors

Elicitors may be defined as molecules that play a role in the triggering or stimulating of defense mechanisms in a plant. Elicitors are also known as plant resistance inducers, plant resistance activators, or plant defense activators. The interaction between an elicitor and its respective receptor in the plant cell membrane inducing local resistance is a chain reaction that occurs intracellularly, becoming intercellular and systemic very quickly and later a plant molecular response (Yu et al., 2013; Jamiółkowska, 2020).

Although SAR and ISR are both induced responses, they differ in terms of elicitor type and the regulatory pathways involved. Even so, SAR and ISR share some components. While SAR is mainly based on SA accumulation through NPR1 and activates the expression of *PR* genes involved in defense responses, ISR is also generally mediated by SA, but it comes from an SA-independent pathway, triggered by

JA and ET mainly, and without *PR* gene activation (Romera et al., 2019). Other difference is, while SAR is triggered by plant pathogens, ISR is triggered by root-colonizing mutualistic microbes, like *Pseudomonas simiae* (syn. *Pseudomonas fluorescens*) and *Paenibacillus polymyxa* (bacteria), or *Trichoderma* spp. (fungi) (Romera et al., 2019; Verbon et al., 2017). ISR may be activated by other sources such as polysaccharides isolated from algae as ulvans, laminarans, carrageenans, and fucans (Stadnik & de Freitas, 2014; Figueira et al., 2020).

Despite playing an invaluable role in plant defense, SAR is not always effective. Although SA-mediated resistance is effective against pathogens, such as fungi, bacteria and viruses, SAR appears to be more effective against biotrophic and hemibiotrophic pathogens (Hammerschmidt, 2009). HR is an effective strategy against hemibiotrophic pathogens but may allow the spread of necrotrophic pathogens such as *B. cinerea*. HR may also provide an ideal environment for necrophilic infection and disease spread because they consume nutrients from dead or dying cells. Thus, the less the plants are capable of activating HR, the more resistant to *B. cinerea* and other necrotrophic pathogens they are (Magnin-Robert et al., 2015). In time, biotrophic pathogens do not kill the plant, representing a symbiotic or parasitic relationship, depending on the microorganism, while the necrotrophic ones do it, and the hemibiotrophic ones have, depending on temporal and/or spatial conditions, both features (Spanu & Panstruga, 2017). In the beginning of the infection process, the plant generates large amounts of ROS that cause invader's DNA damages, lipid peroxidation, and protein oxidation in attempt to stop the pathogen attack. On the other hand, necrotrophic fungi like *B. cinerea* can use the host's oxidative burst to contribute to its own production of ROS to enhance the attack (Hua et al., 2018). Magnin-Robert et al. (2015) demonstrated that sphingolipids also play an important role in plant defense—i.e., some modifications on sphingolipid content might affect the plant tolerance to both hemibiotrophic and necrotrophic pathogens by modulating plant defense responses.

The responses of tomato fruits to *Botrytis*, a necrotrophic fungus like *Alternaria*, are mainly mediated by JA and ET, ROS, and programmed cell death (Alkan & Fortes, 2015), this last one caused by a hypersensitive response (Balint-Kurti, 2019). ET and ABA stimulate ripening in climacteric plants like tomatoes and thus may play a role in the host defense response (Seymour et al., 2013). Although potatoes, eggplants, and chilli peppers are non-climacteric, some Capsicum species appear to be climacteric (Hou et al., 2019), and therefore, ET and ABA may have a similar role as in tomatoes. The elevation of ET and ABA levels seems to play a dual role: on the one hand, it is correlated with resistance response, and on the other hand, it induces ripening and thus increases the susceptibility to disease. Nevertheless, ET may



also act together with JA as a defense hormone (Alkan & Fortes, 2015). The fact that elicitors activate SAR and ISR responses led to their use as products to extend food shelf life, as discussed ahead in this text.

Elicitation may be physical or chemical, caused by biotic or abiotic factors and complex or defined depending on its origin and nature. The plant under effect of elicitors have their defense mechanisms activated, making the plant competent to defend itself against phytopathogens. The plant receptors are activated and then, reversible phosphorylation and dephosphorylation occur in plasma membrane proteins. It is known that a number of elicitors play the role of avirulence determinant and thus are recognized as such. A cascade of cytosolic proteins and cytosolic  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  spiking triggers the plant plasma membrane depolarization and  $Cl^-$  and  $K^+$  efflux/ $H^+$  influx. Because of this, extracellular alkalization occurs, as well as cytoplasmic acidification, leading to the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activation. The plant cell begins to produce ROS and the early defense gene expression. Finally, the ET and JA production take their roles, the late defense genes are expressed, and secondary metabolite accumulates against pathogens (Mishra et al., 2011).

ISR is involved in plant response to elicitors because of its role in the synthesis of enhanced levels of various secondary metabolites engaged in plant defense mechanisms, such as the synthesis of phytoalexins, which are toxic to pathogens (Jeandet, 2015). In Solanaceae, phytoalexin sesquiterpenoids are synthesized to inhibit the germination of pathogen spores and retard pathogen growth and may be structurally diverse, according to the species and even cultivars (Jamiołkowska, 2020). These compounds are toxic to the pathogen and, interestingly, also to the plant. For this reason, they have to be detoxified by the plant right after neutralizing the pathogen. Some of the main Solanaceae phytoalexins are solavetivone, oxylubimin, lubimin, and rishtin, being this last one the major phytoalexin in potato tubers and tomato fruits (Camagna et al., 2019). Little progress has been made in the research with phytoalexins and their biosynthetic pathways which is unfortunate since it could help deepen the knowledge on plant-pathogen interaction and collaborate in the development of resistant individuals (Camagna et al., 2019).

Besides phytoalexins, it is also known that plant tissues with activated ISR also have enhanced activity of defense-related enzymes such as phenylalanine ammonia lyase (PAL), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and polyphenol oxidase (PPO). PAL is an enzyme related to the starting point of the phenylpropanoid biosynthesis pathway that acts catalyzing the non-oxidative deamination of phenylalanine, which is converted into trans-cinnamate. PAL leads to resistance response against biotic stress developed by pathogen infection and abiotic stress in plants triggered

by UV irradiation, extreme temperatures, nutrient deficiency, and wounding (Fatima & Anjum, 2017). This event plays a remarkable role in the passage from the primary to secondary metabolism. This enzyme is pretty involved in the biosynthesis of salicylic acid (SA) (Kim & Hwang, 2014), and, consequently, it is essential for the functioning of the entire defense cascade of SAR. On the other hand, SOD, POD, and PPO act to stop the advance of the membrane lipid peroxidation and the oxidative stress triggered by pathogen attack. SOD is the first enzyme acting against oxidative stress and is involved in the upregulation of other downstream antioxidant defense enzymes. POD also takes part in cell wall polysaccharide processes, by catalyzing the oxidation of phenols and lignification that protect the plant tissues against pathogen invasion. Finally, PPO is related to oxidation of polyphenols into quinones (Xie et al., 2017).

According to Alexandersson et al. (2016), it takes approximately 20 years since the beginning of the studies on mechanisms of induced response have been started, at molecular level. Effectively, they have begun after the genomic revolution in the early 2000's. The “-omics” sciences such as genomics, transcriptomics, metabolomics, and the related tools are helping to understand the mechanisms of resistance induction in plants, revealing their cross-linked and even antagonistic pathways since the genomes of potatoes, tomatoes, and tobacco are becoming available. These mechanisms remain fairly unexplored for Solanaceae crops.

In a not so far past, the efforts to understand the general mechanisms of plant defense were concentrated in the spatial interplay between pattern triggered immunity (PTI) and effector triggered immunity (ETI), as well as in the plant hormone-abiotic stress interaction and signalling. The co-evolution of pathogen effectors and the plant NB-LRR genes also played a major role in such efforts (Jones & Dangl, 2006). Today, although those subjects have an underestimated importance to research, the attention of researchers has been concentrated in the up-regulated factors, since it is believed that they are the most probable responsible for the mechanisms of resistance and also for plant susceptibility to pathogens. It is possible that these factors apply to responses to elicitors as downregulation of susceptibility factors. This could explain the increased resistance levels observed in plants treated with elicitors and the “-omics” science may help to understand the primary and secondary metabolites dynamics as a key to the comprehension of resistance mechanisms (Alexandersson et al., 2016).

Overall, what seems to be known with certainty so far is: the intensity of induced responses varies depending on plant species, and such responses are substantially dependent on plant genotype (Jones & Dangl, 2006; Alexandersson et al., 2016). In order to assist the development of targeted resistant crops by breeding, the identify markers for plant resistance induced responses is pretty desirable.

## Shelf Life: Practices in Preharvest and Postharvest Influence Crop Health

The term “shelf life” can be defined as a determined period of time after food production in which it can be consumed under a required level of safety pre-established by regulated storage conditions (Nicoli, 2012), cherishing the consumer’s health. Food intake under unsafe conditions or that has passed its shelf life may cause poisoning due to pathogens which can produce toxic compounds during storage or contaminants that may migrate from the packaging to food (Manzocco, 2015).

Good general culture practices in both preharvest and postharvest play a crucial role collaborating to crop health and extension of shelf life (Zheng et al., 2011). The reduction of the pathogenic microbial load due to good practices optimizes the performance of the innate plant defense system, contributing to its success. In general, synthetic pesticides can be used for that, but their reduction is advisable in case of sustainable agriculture practices. For example, in the preharvest, the selection of resistant cultivars as well as optimizing the spacing between them and the time of planting help to prevent the spread of diseases. Balanced fertilization avoids deficiency of nutrients as well as the excess of some of them—e.g., nitrogen, which can promote the densification of parts of the plant such as leaves, the occurrence of a moist microclimate, and hinders ventilation. Drip irrigation, on the other hand, drastically reduces the chances of contamination by pathogens. Conversely, this type of irrigation can contribute to the appearance of dust mites and fungi that cause powdery mildew, usually during periods of drought (Luengo et al., 2007). In terms of the postharvest, keeping storage conditions under adequate temperature and relative humidity (RH) through the use of cold chambers and suitable packaging can increase the storage time of fresh vegetables by approximately ten times. Boxes and packaging made of corrugated cardboard or plastic or wood, once they are new, smooth, and shorter to reduce possible over-stacking, reduce the chances of mechanical damage and disease entrance doors (Luengo et al., 2007). In general, tomatoes, eggplants and *Capsicum* peppers should be kept under 90–95% RH, and potatoes should be kept under an 85–95% RH because they are more resistant to dehydration. In order to extend the shelf life of vegetables, low-temperature storage (refrigeration) is the main strategy used alone or combined with other techniques. Under low temperatures, a decrease in the respiration rate of the fresh product occurs, which decreases the production of ET and also fungal disease incidence because cold storage retards the metabolism of the pathogen (Aghdam & Bodbodak, 2014; Dumont et al., 2016). The following temperatures for conservation are recommended: for

tomatoes (8–10 °C and 13–21 °C for firm green and ripe green tomatoes, respectively), potatoes (about 13 °C), eggplants (8–12 °C), and *Capsicum* peppers (9–13 °C). The low temperatures for preservation are much higher than the freezing point as these vegetables are susceptible to cold injuries and subsequent cracking. Even so, there are pathogens that can take advantage of such conditions of temperature and humidity to colonize the vegetable in the pre- and/or post-harvest phase (Luengo et al., 2007). Some examples are *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*, which may stand in a quiescent stage until postharvest, or manifesting itself still in the field (Hua et al., 2018; Prusky et al., 2013).

Dehydration, which is a conventional drying with hot air or lyophilization, is a method based on water sublimation through low pressure on frozen food in order to prevent the degradation of thermolabile compounds, are both procedures to remove excess water from food since water is a vehicle to microorganisms (Veras et al., 2012). However, one of the most important precautions in the post-harvest to reduce the pathogenic microbial load is the sanitization procedure of the crops as well as the handling and storage facilities (Pinheiro et al., 2015).

In view of the limitations imposed on the shelf life of fresh vegetables by microbial induced decay, decontamination procedures can be used to minimize the microbial charge on the surface of the vegetable (Ahmed et al., 2017). Chlorine is the most widely sanitizing compound used in the decontamination of vegetable surfaces, despite the fact of being ineffective in some cases (Ahmed et al., 2017). Additionally, there is a serious concern about the probability of this compound react with organic matter to form highly carcinogenic trihalomethanes (Ahmed et al., 2017; Richardson et al., 2007). The National Organic Program—NOP Rule established by the United States Department of Agriculture, (USDA), approves chlorine as an algicide, disinfectant and sanitizer agent and restricts the residual chlorine levels in the water. At disposal point, the maximum limit currently established by the Environmental Protection Agency (EPA) for chlorine is 4 mg/L (ppm), although the levels of chlorine used in water for sanitization of food and equipment frequently must be higher than EPA allows (EPA, 2020). In general, chlorine is employed within a range from 50 to 200 mg L<sup>-1</sup> for washing fresh vegetables (Sun et al., 2012).

For this reason, other treatments have been studied for the decontamination of fresh vegetables. Some examples are sodium hypochlorite (NaOCl), acidified NaOCl, calcium hypochlorite (Ca(ClO)<sub>2</sub>), trisodium phosphate (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), calcinated calcium, gaseous acetic acid (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H), ozone (O<sub>3</sub>) and ozonated water, electrolyzed water, acidified electrolyzed water, peroxyacetic acid (PAA) (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) (Ahmed et al., 2017), nitric oxide (NO) (Gu et al., 2014), and chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>). This last one is

a synthetic green-yellowish gas with strong oxidant power 2.5 times higher than that of diatomic chlorine used in both gaseous and aqueous formulations in postharvest processes, but it does not cause the formation of unwanted residues excessively in vegetables (Sun et al., 2019).

Overall, the benefits and harms of using a sanitizing agent have to be evaluated. Sun et al. (2019) extensively reviewed gaseous chlorine dioxide applications on postharvest of many vegetables including Solanaceae, and points out that this technology possesses disadvantages like instability and equipment requirements for on-site production. The authors also observe that despite its aqueous form is being utilized for the sanitization of fruits and vegetables; its gaseous form is more effective at reaching pathogenic cells in inaccessible plant parts because of its high diffusivity and penetrability. The use of all of the sanitization agents is frequently effective, but almost all of them may produce some toxic byproducts. One of these exceptions and one of the most used is PAA, which unlike chlorine-based sanitizers, has degradation byproducts that are easily dissolved in water and are non-toxic (Banach et al., 2015; Vandekinderen et al., 2009).

According to a recent review (Sun et al., 2019), in terms of antimicrobial control, contact time, corrosion capacity and security as compared to chlorine, the best sanitizing agents in decreasing order of efficacy are: ozone, gaseous chlorine dioxide, aqueous chlorine dioxide, peroxyacetic acid, and nitric oxide (Sun et al., 2019). Some of these substances are used for sanitization also act as elicitors (El-Shetehy et al., 2015).

During the postharvest phase, senescence and pathogen attack can be controlled using several physical, biological agents, and natural compounds directly to control pathogen infestation by activation of the plant self defenses. According to Qadri et al. (2020), physical techniques used to contain postharvest diseases spreading such as: cold atmosphere, hypobaric or hyperbaric storage, modified storage atmosphere, heat, and UV treatments (UV-C, UV-B, and UV-A) are, at the same time, stimulators of plant self defenses as fungicides/bactericides, besides fulfilling quarantine requirements for exportation being, thus, procedures recognized as a safe (Liu et al., 2012; Usall et al., 2016). Heat treatment is recognized as a safe proceeding among the physical elicitors and may also be used in combination with precooling, especially to manage fungal diseases and prevent chilling injury (Qadri et al., 2020).

Before the dissemination of the concepts of elicitation, it was already known that several of the physical techniques mentioned so far are useful to increase the shelf life. The response of crops to both biotic and abiotic stress is non-specific and occurs in several, parallel ways. This response is also cited as “priming,” referring to the ability of plants to enhance defense responses following pest or pathogen attack, or exposure to environmental stress conditions or externally applied chemicals. This reaction involves, for

example, the formation of callose in the place where there was mechanical stress that resulted in tissue perforation or the activation of defense-related enzymes and ROS under heat treatment or UV light exposure. Along with elicitation by physical means, there are biological control agents such as bacteria, chemicals and natural compounds whose examples and mode of action will be reported in the next topic of this review.

### Elicitors as Alternatives to Synthetic Defensives in Postharvest Disease Control for Solanaceae Food Crops

Farming has changed landscapes and environments around the world. Fields of crops occupy a large area of global land, and the way we culture food poses enormous pressure on nature. The increased demand for food led to extensive pollution of the world’s water, soil and air, and wild animals and plants have less space to live. According to FAO (2019), “Sustainable agriculture must nurture healthy ecosystems and support the sustainable management of land, water and natural resources, while ensuring world food security.” Nutrient cycling, carbon sequestration, pest regulation and pollination are fundamental to sustain agricultural productivity and can be viewed as components of the concept of Ecosystem Services, the services provided by biodiversity to humankind.

In contrast with the use of synthetic defensives or pesticides, the activation of defensive responses of plants by the use of elicitors is a promising tool for controlling pests in conventional agriculture. The incorporation of elicitors in integrated pest management programs, alone or in combination with classical methods, could be a reliable method for reducing environmental contamination by chemical residues. Table 1 collects examples of elicitors used to extend the shelf life of the Solanaceae crops focused on this review and also their mode of action (2008–2020). Regarding physical elicitors, heat can either increase or decrease the ripening time of tomatoes depending on the temperature, exposure time, and the tomato variety treated (e.g., for the “Soraya” variety, under immersion in water at 25 °C for 5 min the ripening time is  $22.6 \pm 0.9$  days whereas under 52 °C for 5 min the ripening time drops to  $18.0 \pm 0.6$  days for the same tomato variety) (Loayza et al., 2020). Moreover, the 16 pulse treatment (high-intensity pulsed polychromatic light) induced disease resistance in tomato fruit to *Botrytis cinerea* inoculated 10 days after treatment with a 41.7% reduction in disease progression compared to 18 a 38.1% reduction for the LIUV (low-intensity UV-C) source (Scott et al., 2017). However, UV-C has traditionally been considered one of the most efficient methods for inducing resistance in vegetables

**Table 1** Elicitors used in Solanaceae crops: mode of action and effects on postharvest

Elicitor	Mode of action	Effects	Crop	References
<i>Physical control</i>				
<b>Heat (HWRB, WHD, and HA)</b>	Under heat, the epicuticular wax on plant melts its surface and closes the possible entry points for wound pathogens, such as stomata and microcracks. Heat may lead to the inactivation or encapsulation of early-germinated spores or mycelium, preventing diseases The temperature increasing may alter membrane fluidity and activates a calcium channel. The changes may reach transcriptome, proteomic, lipodomic and metabolomic levels, which may be observed through the accumulation of chitinase, $\beta$ -1,3-glucanases, increased expression of PAL and accumulation of stress and defense proteins, mainly including: heat shock proteins (HSPs), where HSP70 plays the major role protecting cell integrity and providing thermo-tolerance Accumulation of ROS-scavenging genes (mainly ascorbate peroxidase, APX), that prevents cell damage is also observed Synthesis of compounds to reinforce plant cell wall	Softening delayment, decreased respiration and ethylene reduction Inhibition of the pathogen growth It was observed sprouting reduction in potatoes	Tomatoes Potatoes	Mahajan et al. (2014), Suzukia and Nagatab (2019), Loayza et al., (2020) Pavoncello et al. (2008), Wang et al. (2012), Spadoni et al., (2014, 2015), Sripong et al. (2015), Perotti et al. (2015), Yang et al. (2020)
<b>UV-C irradiation</b>	A low dose of radiation (190–280 nm) may promote accumulation of chitinase, $\beta$ -1,3-glucanase and PAL Synthesis of compounds to reinforce plant cell wall	Inhibits the growing of tubers, bulbs and roots Microbicidal effect	Tomatoes	Mahajan et al. (2014); Usall et al., (2016); Scott et al., (2017)
<b>Controlled and modified atmosphere (balance between O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> levels)</b>	Inhibition of enzymatic reactions Alters metabolism of some organic acids Inhibition of ethylene and reduced degradation of soluble pectin	Delay ripening of fruits and vegetables Retard plant metabolism and fungal growth Increase of carbon dioxide level, reduces oxygen tension Extend the postharvest life Changing of fruit physiology and stress responses and the enhancement of natural disease resistance	Potatoes	Shen et al. (2019)
			Eggplants Tomatoes Chilli peppers	Guideli et al. (2014); Usall et al. (2016) Dumont et al. (2016) Dumont et al. (2016)

Table 1 (continued)

Elicitor	Mode of action	Effects	Crop	References
<b>Hypobaric pressure</b>	Within a range from 0 to 100 kPa (greatest results observed at 50.7 and 25.3 kPa; time of application varies according to the crop) is applied for a short period of time to direct activity against the pathogens and to induce resistance in the host Increased activity of PAL, chitinases, and peroxidases	Changes on plant physiology and stress responses, resulting in activation of natural disease resistance Antioxidant activity decay reduction and less membrane damage	Tomatoes	Dong et al. (2013)
<b>Radiofrequency and microwave</b>	Nonthermal radiation transfers energy at resonance frequency altering plant signaling pathway and increases bioactive compounds ripening process	Improves shelf life	Tomatoes	Verma et al. (2020)
<b>Ozone</b>	Proteins involved in ripening including enzyme related to ethylene biosynthesis (ACO) are reduced and some fruit compounds changes	Improves shelf life and activates host defenses against pathogens	Tomatoes	Tzortzakis et al. (2013)
<i>Biological control</i>				
<b>Antagonists</b>	Competition for nutrients Secretion of bioactive compounds, e.g., antibiotics, enzymes to degrade pathogen cell wall, physical interaction directly with the pathogen hyphae and tolerance to ROS produced by host in response to wounding made by the pathogen	Changes on plant physiology and stress responses also resulting in activation of plant resistance Inhibition of pathogen growth Improved shelf life	Various	Wills and Golding (2015)
<i>Eco-friendly syntheticals</i>				
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Stabilizes plant cell wall	Keeps the quality of fruits and vegetables and extends shelf life Enhances metabolites as lycopene and ascorbic acid (tomatoes)	Tomatoes, potatoes	Barman et al. (2019)
<b>Methyl jasmonate</b>	Enhances total phenol, flavonoid content and activity of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), and catalase (CAT)	Activates plant defense and improves shelf life	Potatoes	Zhou et al. (2019)
<b>SA</b>	Enhances total phenol, flavonoid content and activity of polyphenol oxidase (PPO), POD, catalase (CAT), and PAL	Keeps the quality of fruits and vegetables and extends shelf life	Eggplants Peppers Various	Fan et al. (2016) Seo et al. (2020) Pétriaccq et al. (2018)
<i>Natural compounds</i>				

Table 1 (continued)

Elicitor	Mode of action	Effects	Crop	References
<b>Essential oils</b> <b>Origanum</b> <b>Citronella</b>	Increases POD and chitinase activities Microbicidal activity	Extends shelf life	Tomatoes	Tzortzakis et al. (2010), Chen et al. (2014)
<i>Natural compounds</i> <b>Chitosan and oligochitosan</b>	Increase the content of PPO, PAL, POD, $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase Forms a mechanical barrier, decreasing respiration rate and avoids water losses Causes changes on microorganism cell permeability	Keeps fruit firmness Affects the homeostasis of the pathogen, its respiration, nutrient uptake and the synthesis of proteins	Chilli peppers	González-Estrada (2020); González-Saucedo et al. (2019)
<b>Ulván</b>	Enhances PAL activity, increases phenolic compounds, activates jasmonic acid pathway and induces SA synthesis	Activates plant defense and improves shelf life	Tomatoes	El Modafar et al. (2012)

*HWRB* hot water rinse brushing, *HWD* hot water dip, *HA* hot air

(Usall et al., 2016). This experiment also observed delayed maturation progress depending on radiation intensity and orientation (Scott et al., 2017).

Application of calcium-based chemicals, mainly  $\text{CaCl}_2$ , has been successfully used to induce defense in tomatoes and potatoes. Calcium salts are less toxic to mammals than synthetic defensives. Additionally, pre- and postharvest application of calcium formulations may control the incidence of pathogens and physiological disorders, although more experiments are necessary (Barman et al., 2019). Another synthetic considered “eco-friendly” is methyl jasmonate: when fresh-cut potatoes cubes were treated with MeJA, the RT-qPCR showed that the gene expression of PAL, C4H, 4CL, PPO, POD, and CAT were significantly higher in MeJA-treated cube parenchyma tissues than that in control up to 144 posttreatment. On the other hand, more studies are still necessary in order to improve cubes firmness and color (Zhou et al., 2019).

The utilization of biological control to elicit plant defense by introducing natural enemies is a strategy that leads to restrictions in the normal growth or activity of pathogens (Lastochkina et al., 2020; Qadri et al., 2020). Research on this subject has been a source of patents, as will be shown ahead in this review in the topic: science, development and commercialization of postharvest natural elicitor products for Solanaceae. Natural volatile compounds are commonly employed in commercial scale as flavoring or seasoning agents in foods. These compounds may also be used to reduce the incidence of pathogens in food. Some volatile compounds (e.g., essential oils extracted from plants) have antimicrobial properties, and other natural compounds like polysaccharides isolated from seaweed (e.g., ulvans, laminarans, carrageenans and fucans) or animals (e.g., chitosan and oligochitosan) are often successfully reported as quite effective elicitors being considered as GRAS (Generally Recognized as Safe). They are less harmful or innocuous to mammals’ health while being ecologically safe (Liu et al., 2007; Stravopoulou et al., 2014; Edirisinghe et al., 2014; Figueira et al., 2020; Palou et al., 2016; Qadri et al., 2020). Regarding natural compounds ulvans isolated from marine algae (*Ulva* spp.) when in aqueous solution (10 g. L<sup>-1</sup>) protected 42% of submerged tomatoes for up to 1 month against *Botrytis cinerea* at 17 °C, then improving fruit shelf life (Briand et al., 2010).

A more durable, consistent, and sustainable approach to prevent postharvest diseases, decay, and subsequent losses is the use of edible coatings and waxes. Edible coatings are thin layers of external coatings or waxes applied to preserve vegetables against mechanical damages and enhance the waxy cuticle, providing a partial barrier to the external moisture and oxygen on the surface of fresh products, minimizing the moisture loss during storage. It also forms a gas barrier through a modified atmosphere around the food, which helps to retain volatile compounds, reduces respiration, senescence, and oxidation, which preserves the texture

and the color of the product. In order to control physiological damages and diseases, within the last decade, there have been many innovations on the development of edible coatings from natural or synthetic sources combining materials such as lipid-based waxes (e.g., coconut and sunflower oil and beeswax or carnauba wax) and hydrocolloid/hydrophilic gums groups, such as protein (e.g., soy protein; carboxymethyl cellulose, pectin base) or polysaccharide (e.g., chitosan, agar, alginate, psyllium) and other materials for the improvement of shelf life of many crops including Solanaceae food crops (Wang et al., 2011; Mahajan et al., 2014; Salehi, 2020; Sandri et al., 2015). Coatings can be combined with other treatments to improve shelf life. For fresh-cut eggplant, shelf life can be extended to 8 and 9 storage days by increasing the cysteine content in the original edible coating (original composition: coating composed of soy protein isolate and 0.5% cysteine from 0.5 to 1% under a modified atmosphere (80 kPa O<sub>2</sub>) (Guideli et al., 2014). This treatment with higher content O<sub>2</sub> in packaging also helped maintain the visual quality of fresh-cut eggplants while conventional packaging conditions induced browning (Guideli et al., 2014).

Table 1 displays some elicitors and their mode of action for Solanaceae food crops (2008–2020). Table 2 displays

the newest elicitors currently under investigation for the extension of Solanaceae shelf life during the postharvest phase (2015–2021), viewed as market promises. As it may be observed, in the period retrieved, antagonists for biological control are the most studied elicitors, and the microorganisms used are antagonistic bacteria against pathogenic microorganisms such as *Streptomyces*, *Flavobacterium* sp., and *Bacillus subtilis* strains (Table 2). Many actinomycetes species, particularly of the genus *Streptomyces*, are broad-spectrum antifungal biocontrol agents because of their cell wall degrading enzymes (e.g., chitinases and glucanases) and/or antifungal substances. A successful case was reported in which a *Streptomyces*-filtered supernatant was applied to potato tubers 24h before inoculation of a fungus known as *P. ultimum*, an important soil-transmitted potato disease. The treatment decreased pathogen penetration by 62% (Sellem et al., 2017), but the author did not mention improvements in shelf life, in terms of days. A similar behavior was observed (Buchholz et al., 2021) in *Flavobacterium* sp. isolated from postharvest potato tuber microbiome which was able to inhibit potato bud outgrowth and consequently, sprouting. In this case, depending on potato variety, sprouting was delayed up to 168 days after harvesting. This way these

**Table 2** Research on elicitors and their postharvest specific target pathogens in Solanaceae

Crop	Disease	Pathogen gender	Elicitor	References
Potatoes	Bacterial soft-rot	<i>Dickeya solani</i>	SA	Czajkowski et al. (2015)
Potatoes	Potato tubers leak	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Streptomyces</i> strains	Sellem et al. (2017)
Potatoes	Dry rot	<i>F. oxysporum</i> and <i>F. sambucinum</i>	CH of acetic acid-distilled water solution	Mejdoub-Trabelsi et al. (2019)
Potatoes	Mycotoxigenic diseases	Mycotoxigenic fungi (various)	CRISPR	Liu et al. (2020)
Potatoes	Late blight potato pathogen	<i>P. infestans</i>	VOCs from <i>Trichoderma</i> strains	Elsherbiny et al. (2020)
Potatoes	Various	Various	<i>Flavobacterium</i> sp. strains	Buchholz et al. (2021)
Potatoes	Dry rot	<i>F. sulphureum</i>	Ca <sup>2+</sup>	Zhang et al. (2021)
Tomatoes	Black mold rot	<i>Alternaria</i> sp.	Harpin	Zhu and Zhang (2016)
Tomatoes	Gray mold rot	<i>Botrytis</i> sp.	Harpin	Zhu and Zhang (2016)
Tomatoes	Gray mold rot	<i>Botrytis</i> sp.	Melatonin	Li et al. (2019)
Tomatoes	Soft rot	<i>R. stolonifer</i>	Thymol and SA	Kong et al. (2019)
Tomatoes	Gray mold rot	<i>Botrytis</i> sp.	Yeast flagellin	Zhao et al. (2020)
Tomatoes	Gray mold rot	<i>B. cinerea</i>	<i>Bacillus subtilis</i> strains	Bu et al. (2021)
Tomatoes	Early blight	<i>A. solani</i>	<i>Parthenocissus quinquefolia</i> and <i>Plectranthus neochilus</i> extracts	Mohamed et al. (2021)
Tomatoes	Fungal rot	<i>Aspergillus</i> and <i>Penicillium</i>	EO and CH-based coatings	Sheikh et al. (2021)
Peppers	Anthracnose	<b>Colletotrichum spp.</b>	O <sub>3</sub>	Alwi and Ali (2015)
Eggplants	Bacterial wilt	<i>R. solanacearum</i>	SA CH Riboflavin	Mandal and Gupta (2016)

Search in the title, abstract or keywords at Scopus: 1, “postharvest potatoes” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”; 2, “postharvest tomato” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”; 3, “postharvest eggplant” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”; 4, “postharvest pepper” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”

SA salicylic acid, CH chitosan, O<sub>3</sub> ozone, CRISPR clustered regularly interspaced short palindromic repeats, VOCs volatile organic compounds

bacteria increase the storage time of potato tubers by reducing wounds and fissures through which pathogens could penetrate for a long time (Buchholz et al., 2021). In case of tomatoes, a recent study (Bu et al., 2021) on *B. subtilis* L1-21, an endophyte isolated from citrus plants, showed an exceptional antagonistic effect against *B. cinerea*, although that treatment did not enhance the fruit quality and nutritional capacity. This treatment protected against pathogen colonization up to 100% until 48h after treatment (Bu et al., 2021). However, it is not only bacteria that can have antagonistic action against phytopathogenic fungi: for the first time, volatile organic compounds (VOCs) produced by *Trichoderma* fungi strains showed a percentage of inhibition of mycelial growth of *P. infestans* in vitro between 81%, and on potato tubers by 94% at least for 6 days of observation (Elsherbiny et al., 2020). According to the authors, electron microscopy revealed serious *P. infestans*' cell deformation, collapse and degradation of cytoplasmic organelles and the most abundant compounds were 3-methyl-1-butanol, 6-pentyl-2-pyrone, 2-methyl-1-propanol and acetoin (Elsherbiny et al., 2020).

Among natural compounds and small molecules, chitosan (CH), harpin, melatonin, essential oils, and plant extracts have been highlighted recently, as can be seen on Table 2. Although chitosan presents a well-known role in eliciting plant defenses, it has been used combined with other treatments like as in an acetic acid-distilled water solution in order to elicit potatoes against *F. oxysporum* and *F. sambucinum* (Mejdoub-Trabelsi et al., 2019). When this formulation was applied to potatoes inoculated with these fungi, 33.5–45.3% less wilting severity was detected as compared to the control even 21 days before treatments. Enhanced levels of phenolic compounds as well as the activities of defense-related enzymes such as peroxidase and polyphenoloxidase (Mejdoub-Trabelsi et al., 2019) were also observed. The authors reported that this formulation also has antimicrobial properties, according to in vitro trials. Chitosan has been compared to salicylic acid as both have shown similar efficacy in preventing bacterial wilt in eggplants (Mandal & Gupta, 2016). In this study, after 48 h posttreatment with CH, the phenolic compounds content increased. Otherwise, in this same study, 72 h posttreatment with SA phenolic content reached relatively higher concentrations (Mandal & Gupta, 2016). SA is also being studied for elicitation purposes against *Dickeya solani* in potatoes, although more information such as time of application and dependence on plant cultivar are still lacking (Czajkowski et al., 2015). According to Czajkowski et al. (2015), after 14 days, inoculation with bacteria did not express any disease symptoms. Edible coatings manufactured with elicitors are revealing to be promising: thymol and SA combined in an edible coating increased defense enzyme activities in tomato stimulating reactive oxygen species and then eliciting

against *R. Stolonifer* (Kong et al., 2019) and sweet orange peel essential oil (EO) and CH-based coatings against presented, at the same time, an antifungal effect in fresh tomatoes inoculated with *Aspergillus* and *Penicillium* and also enhanced the fruit shelf life for 20 days.

Harpin, melatonin, flagellin, and plant extracts have been investigated about their potentials as elicitors. Harpin is a glycine-rich and heat-stable protein secreted by pathogenic bacteria and induced chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase and phenylalanine ammonia-lyase defense enzymes as well the content of total phenolic compounds and lignin in tomatoes, first related by Zhu and Zhang (2016). In addition, authors did not observed any fungicide effect on *B. cinerea* or *A. alternata* in vitro, and thus, such effects were attributed to the elicitation in 5 days of analysis. Melatonin has been reported as an inducer of the SA signaling pathway and responsible to increase lignin, phenolic compounds, and flavonoids in cherry tomato fruits for 8 days of analysis and 0.05 and 0.1 mM melatonin concentrations delayed fruit maturation from 12 to 20 days of storage (Li et al., 2019). *Parthenocissus quinquefolia* and *Plectranthus neochilus* extracts exhibited flavonoid compounds rutin and myricetin which played a great role as antifungal activity against *A. Solani* and also stimulating tomato defenses for 21 days (Mohamed et al., 2021).

Physical control methodologies using ozone ( $O_3$ ) and eco-friendly  $Ca^{2+}$  compounds were recently reported: treatment with 3 ppm  $O_3$  exhibited double action on bell peppers quality enhancing their ascorbic acid content, flavor, and reduced anthracnose incidence after 19 days of storage (Alwi & Ali, 2015) while  $Ca^{2+}$  application on potatoes, at least until 14 days after treatment, promoted suberin polyphenolic and suberin polyaliphatic accumulations which may prevent the entrance of pathogens, its toxins, and even the passage of nutrients depriving its nutrition (Zhang et al., 2021). However, without a doubt, the newest technology and the most promising, although still poorly explored for Solanaceae horticultural crops is CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) genetical editing. Various Solanaceae crop diseases and plagues could be targeted and controlled with the use of CRISPR-based antimicrobials, which promises to deliver shelf life increments (Liu et al., 2020). Moreover, properties of probiotics, can also be enhanced using CRISPR-based genome editing, but this implementation is dependent on laws and associated with genetic manipulation of genomes which are not well established (Liu et al., 2020).

Natural elicitors, biological control agents, and physical treatments are alternatives which were relatively neglected topics in research until the 1980s, when a report by the US National Research Council (NRC) was published in 1987. According to Wisniewskia et al. (2016), this report raised the awareness of the dangerousness of pesticides for human



and animal health and that increment in the development of alternative technologies of pest management was necessary. The report paved the way for further studies, which led to the replacement fungicides or the development of less toxic formulations for the environment. This is possibly at the forefront of the emergence of research into nonsynthetic alternatives based on physical, biological, and biotechnological approaches that are trends in elicitor's research by the awareness of sustainability that has emerged in recent decades. Regarding elicitors, some of them have been already described in Tables 1 and 2.

In contrast to the strategies discussed so far, the reality is that it is not always possible to use a single strategy to prevent and combat postharvest diseases and that it is effective and eco-friendly, making it necessary to carry out a combination of two or more treatments. A strategy that follows this trend is integrated management.

In an integrated management strategy, the application of more than one biological and biotechnological methodology must be carried out, since they cause less damage to the environment. Although not a new idea in horticulture, it is often neglected by the crystallized knowledge that only pesticides are effective and of practical use, thus neglecting environmental concerns, health, and the emergence of resistant microorganisms. However, integrated management does not completely rule out the use of pesticides: they are used only when absolutely necessary and with a high level of specificity (Senhor et al., 2009).

Another strategy which, unlike integrated management, excludes the use of pesticides, follows a protocol based on four phases of treatment for postharvest, according to Wisniewskia et al. (2016). The original protocol consisted in four phases: phase 1—good practices on harvesting and handling time and then a sanitization procedure; phase 2—choice of proper heat treatment: hot water or hot air; phase 3—application of a microbial antagonist; and phase 4—use modified atmosphere for storage and/or packaging. The possibility of this protocol cited above may be modified to include other alternative methods on phase 3 like one, or a combination of those described in this review according to each plant physiology could be promising.

### **Challenges on Implementing an Integrated Farm Management for Sustainable Agriculture on Postharvest Phase**

A challenge that never ends is to match the world demand for food. The challenge for the next 30 years: to ensure food security by combining sustainable procedures in all segments of the production chain, from planting to postharvest and the arrival of food at the consumer's table. The quest for food security may be more challenging than satisfying the

demand for food as controlling emerging and re-emerging plant diseases constantly conflicts with the idea of sustainable agriculture (Doughari, 2015) even in the postharvest phase.

According to the United Nations (UN), the global population will exceed 9 billion until 2050 (United Nations, 2019) and, although there are still disagreements about how much, it is undeniable that agricultural production will have to increase. Some projections point to the need for an increase of 60% or even 100% of the current production, while others are relatively optimistic and predict that an increase between 25 and 70% will be sufficient (Hunter et al., 2017). However, we cannot put these numbers into perspective at the first impression, because it is necessary to remember that these predictions refer to world agricultural production and, therefore, subject to wide variations.

The obstacles to food production increment such as water availability (Foster & Brozović, 2018; Yang et al., 2019), soil degradation (Liu, 2013), climate changes (Ewel et al., 2019), and its influence on attacks by pests such as insects and nematodes (Donatelli et al., 2017), as well as viruses and phytopathogenic microorganisms (Fang et al., 2015), are continuously faced by the developments in technologies to deal with such variables. On the other hand, postharvest losses must be avoided in a significant extension to ensure global food security without overcharging of the environmental resources, contributing to sustainable development.

After the end of the Second World War, we have seen the development of sophisticated technologies such as intensive mechanization and the massive use of agrochemicals, mainly from the 1960s. This moment became known as Green Revolution and had as a goal the increment in the production of food to reduce hunger in the world where population started to grow dramatically (Rose et al., 2019). However, the increment in food productivity was followed by a very high environmental cost. The research and farming communities' awareness of balancing productivity with environmental outcomes emerged from expert alerts. As production increased, degradation of the environment and harms to society also increased and then, the concept of "sustainable agriculture" has been increasingly promoted (Rose et al., 2019), despite this term has only been created on 1987 when the UN World Commission on Environment and Development published the Brundtland Report, "Our Common Future." In this report a call for a new era of economic growth that, at the same time, holds a robust economy allied with social development and environmental responsibility, the three interconnected "pillars" of the sustainability. Thus, the concept is that economic growth can be the solution and no longer the trouble since the profits could finance technologies aligned to the sustainability approach (Purvis et al., 2019). In spite of the general agreement that

sustainable agriculture intensification is providential to avoid losses of natural ecosystems and damages to health, there is little dialogue about how to secure its implementation (Cassman & Grassini, 2020). Although the prevention and reduction of food loss, as well as food waste are targets tied to the food security concept, difficulties emerge when such concepts are associated with employment generation, poverty reduction and the preservation of the natural environment, difficulties related to implement the so-called green food value chain. Sometimes, the producers ignore the fact that one of the key aspects of reducing costs and increasing benefits in the green food value chain is the improvement of postharvest management strategies in order to satisfy consumer demands in a more efficient way (Kalaïtzis et al., 2016).

Implementing integrated management strategies is not a waste of money, but an investment that will profit in the medium or long term. There are examples of successful cases such as a report from 2011–2013, in which producers who implemented sustainable practices obtained an increased production up to 20%, costs reductions up to 31%, and a reduction in CO<sub>2</sub> emission in the order of 36% on average, only in preharvest phase. These numbers were reported by Barilla Sustainable Farming (BSF) who promotes more efficient cropping systems to obtain safe and quality agricultural products in agreement with sustainability concepts (Kalaïtzis et al., 2016). Following this reasoning, if an integrated management way is efficiently implemented, the final profits will also increase on postharvest phase (Smith et al., 2019).

Organic farming initiatives are often criticized from the standpoint that it is impossible to feed a country using organic agriculture due to small yields obtained with the organic culture practices and also because, with the same practices, it is not possible to control large-scale diseases and pests (Aslam & Demir, 2018). On the other hand, there are reports about the modelling of the production impacts caused by widespread conversion to organic agriculture in some countries as England and Wales (Smith et al., 2018), Turkey (Aslam & Demir, 2018) and Bhutan (Feuerbacher et al., 2018) in which the crop production was generally comparable to that under conventional farming.

The pressure for reduction of pesticide residues led to the emergence, during the last 20 years, of a new generation of products to prevent crop diseases in the pre- and postharvest phase. Some of these products are also synthetic fungicides but now with target-specific action like phenylpyrroles, anilinopyrimidines, and strobilurin analogs, which are less harmful to the environment and animal health and having, among other improved features, improved specificity (Nabi et al., 2017). In this scenario, can formulations based on natural elicitors be able to

match such pesticides in the prevention of postharvest diseases of Solanaceae horticulture?

### The Science, Development and Commercialization of Postharvest Natural Elicitor Products for Solanaceae: Current Status and Future Prospects

In a review on the development and commercialization of biocontrol products, Droby et al. (2016) pointed out that the discovery and development of this type of product seem to follow a premise in which it has to be efficient when applied to diverse crops, which may differ in terms of genetic background, physiology characteristics and susceptibility to pathogens as in the case of postharvest handling practices. Besides, the limited knowledge on the mode of action of elicitors, also included among the biocontrol agents, limits their utilization (Dzhavakhiya & Shcherbakova, 2016).

According to Droby et al. (2016), although there are effective products developed in this area, it is difficult to satisfy the commercial demand, and therefore, only a very small market share is embraced. Such hardship is due to many factors, starting in the plant susceptibility to its pathogens to the plant physiological status at the time of application of the elicitor. Once these problems are overcome, mass production and proper formulation are the challenges to be defeated to reach a market position. In this regard, Table 3 displays the positive and negative markers related to the induction of resistance by elicitors, being the positive ones the majority.

Due to the fact that there are more advantages than disadvantages regarding the use of elicitors, one could expect this to drive the development of elicitor-based products. Thus, to assess the status of product development, a patent search was made on Espacenet, a recognized patents database, from 2015 to 2020. The keywords used were as follows: “postharvest potato” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”; “postharvest tomato” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”; “postharvest eggplant” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”; “postharvest pepper” and “biological control” or “physical control” or “natural compound.” The chosen keywords were searched by title, abstract, and claims. For the published research papers, the Scopus database was used and the keywords were searched by title and abstract. For patents, the results revealed a relatively modest scenario. Overall more patents targeting elicitors for potatoes and tomatoes culture than for eggplants and *Capsicum* peppers (chilli peppers), were found, as may be observed in Fig. 3.

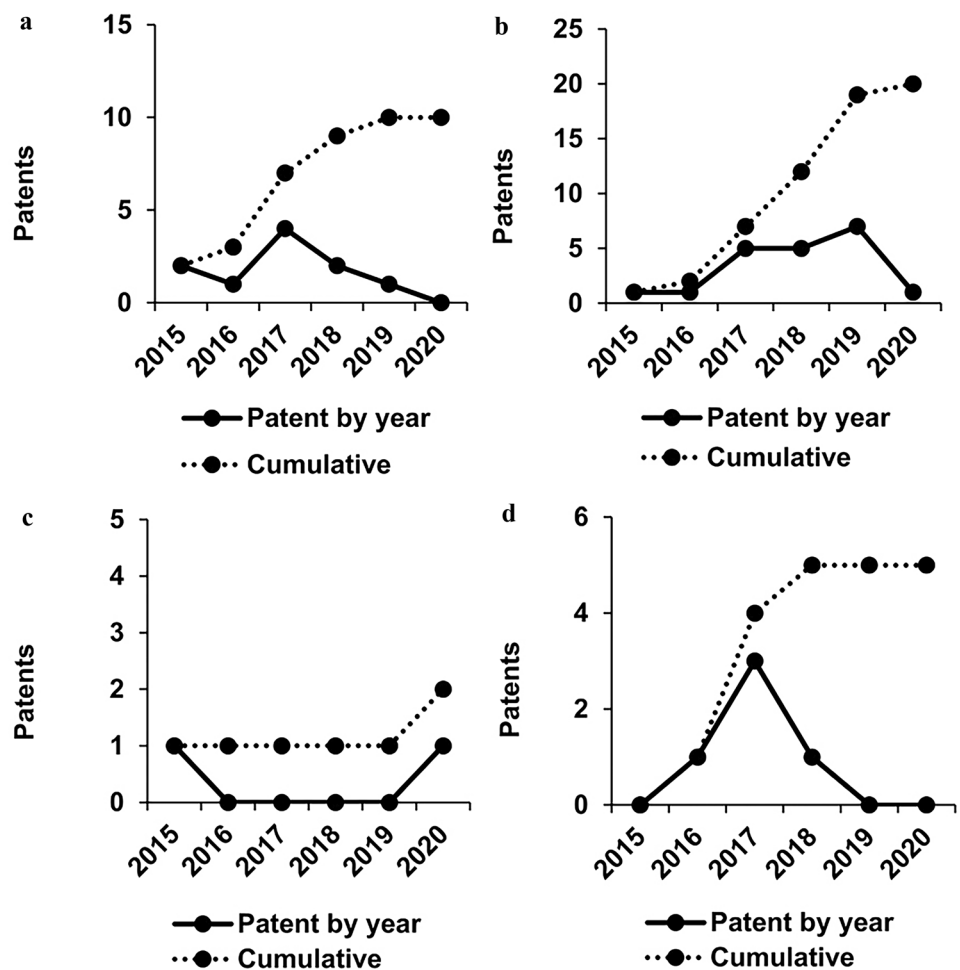
**Table 3** Positive and negative markers related to the induction of resistance by elicitors to postharvest diseases Solanaceae crops

Positive markers	Negative markers	References
It may have a large range of targets and a durable effect of resistance	Sometimes do not ensure a complete control of decay	Romanazzi et al. (2016)
Low or none side effects	Not easy to implement as part of farmer and packinghouse practices	
It could provide beneficial antioxidant compounds	There are no standardized Farmers could have difficulties to implement such practices	
Reduction of pesticide use		
Easier than pesticides in combination with biocontrol agents	Efficacy is dependent on the environmental conditions and presence of stress factors	Alexandersson et al. (2016)
It may extend resistance genes effectiveness time		
Some of them are relatively cheap		
Safety during use and lack of residues		Jamiołkowska (2020)
Some of them can be used combined with pesticides, which does not affect both effectiveness		

Although the number of patents found reveals an increasing tendency, in some years, no patents were published. The results displayed in Table 4 show that 17, 18, 2, and 5 patents related to elicitors for potatoes,

tomatoes, eggplants, and chilli peppers, respectively, were registered between 2015 and 2020. China dominates the leadership of registered patents, according to the results obtained from the Espacenet database. As can be seen in

**Fig. 3** Patents related to the use of alternative technologies to extend shelf life of **a** potatoes, **b** tomatoes, **c** eggplants, and **d** *Capsicum* peppers (chilli peppers). Data from 2015 to 2020. Database: Espacenet



**Table 4** Published patents related to the use of elicitors to extend the shelf life of Solanaceae food crops on postharvest according to Espacenet from 2015 to 2020

Crop	Product	Country	Applicant	Published year
Potatoes	Culture method of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> to produce a fermentation liquor and application on postharvest	China	Sichuan Agricultural University	2015
Potatoes	Peptides that induce a plant immunity response, but not a hypersensitive response, when applied to plant tissue, avoiding cellular death on postharvest	China	Plant Health Care Inc	2017
Potatoes	Hypersensitive-response eliciting peptides with improved solubility, stability, resistance to chemical degradation, or a combination of these properties to be used to extend plant shelf life	China	Plant Health Care Inc	2017
Potatoes	Chitosan preparation for controlling black spot on harvested sweet potatoes	China	Jiangsu Normal University	2017
Potatoes	Chitosan oligosaccharide preparation for control of black spot on postharvest sweet potatoes	China	Jiangsu Normal University	2017
Potatoes	A secondary metabolite of <i>Epicoecum nigrum</i> H5 contains antifungal substances and has strong antagonism on <i>Fusarium</i> and <i>B. cinerea</i>	China	Jiangsu Academy of Agricultural Sciences	2018
Potatoes	<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>auerofaciens</i> SPS-41 to prevent the black spot of the postharvest sweet potatoes	China	Jiangsu Normal University	2018
Potatoes	A preservative for fruits and vegetables comprising the following components: ferulate, solvent, cosolvent, an antioxidant, a surfactant and water	China	China Agricultural University	2019
Potatoes	Composition for topical application to inhibit Polyphenol Oxidase 11 (PPO11) compound, effective to suppress expression of a PPO11 gene or its ortholog, avoid browning and improving shelf life	Australia	Seminis Vegetable Seeds Inc	2015
Potatoes	Processing method of gamma-irradiation and NaDCC (Sodium Dichloroisocyanurate) on the growth of postharvest <i>Rhizopus</i> soft rot pathogen	Republic of Korea	Korea Atomic Energy Research Institute	2016
Tomatoes	<i>B. amyloliquefaciens</i> strain fermentation liquor has broad-spectrum bacteriostatic activity on sickle fruit rot germs	China	Sichuan Agricultural University	2015
Tomatoes	Blue ray or combination of multiple lights including the blue ray enhances the content of triterpenes and flavonoid	China	Shanghai Institute of Technology	2016
Tomatoes	Eliciting peptides improves postharvest quality and shelf life	China	Plant Health Care Inc	2017
Tomatoes	Eliciting peptides and improves postharvest quality and shelf life	China	Plant Health Care Inc	2017
Tomatoes	Coating composition for reducing the weight loss and improving the shelf life	China	Yissum Res Development Company of The Hebrew University of Jerusalem Ltd	2017
Tomatoes	Fresh-keeping agent (jasmonic acid methyl ester, beta-aminobutyric acid, chitosan, citric acid, calcium chloride and water) and UV irradiation	China	Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences	2017
Tomatoes	A fresh-keeping agent from <i>B. amyloliquefaciens</i> is cultured to obtain different active substances fermentation liquid, a supernatant and a bacterial suspension able to inhibit blue moulds, alternaria and other decayed fungi and with wide bacteriostasis spectrum	China	Zhejiang University	2017
Tomatoes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY21 fermentatio culture controls gray mold and aspergilliosis at the same time	China	Beijing Technology and Business University	2018

**Table 4** (continued)

Crop	Product	Country	Applicant	Published year
Tomatoes	<i>Metschnikowia fructicola</i> BY33 culture fermentation controls gray mold and aspergilliosis at the same time	China	Beijing Technology and Business University	2018
Tomatoes	<i>Photorhabdus luminescens</i> Hb1029 has a broader spectrum of prevention and control against pathogens	China	Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences	2018
Tomatoes	<i>Pichia deserticola</i> BY25 culture fermentation grey mold and aspergilliosis	China	Beijing Technology and Business University	2018
Tomatoes	Temperature-control and atmosphere-control integrated processing method for spotted wing drosophila in soft-peel fruits	China	Chinese Academy of Inspection and Quarantine	2019
Tomatoes	Preservative compound (ofnatamycin, ethyl p-hydroxybenzoate, chitosan and distilled water) to prevent gray mold	China	Zhejiang University	2019
Tomatoes	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> J-SS-CX suspension effectively control postharvest diseases	China	Zhejiang University	2019
Tomatoes	<i>Bacillus mucilaginosus</i> YN2011 preparation prevention and treatment of fruit mildew	China	Yunnan Agricultural University	2019
Tomatoes	Application of 1-aryl-4-pyridone compound to prevent gray mold	China	Hainan University	2019
Tomatoes	A preservative solution (ferulate, solvent, cosolvent, an antioxidant, a surfactant and water) inhibit postharvest disease	China	China Agricultural University	2020
Tomatoes	A sensor detects presence of volatile compounds indicating that fruits are on chilling stress and then, at least one control module will alter the storage conditioning conditions for avoiding deterioration	WIPO	Noam Alkin [IL]; US Agriculture [IL]; Ministry of Agriculture; Noam, Alkin	2018
Eggplants	Edible coating composition (hydrocolloid polymer; an edible wax; a fatty acid; an edible alkaline component free of morpholine and/or ammonia and water) for improving the shelf life of post-harvest plant	China	Yissum Res Development Company of The Hebrew University of Jerusalem Ltd	2017
Eggplants	A preservative solution (ferulate, solvent, cosolvent, an antioxidant, a surfactant and water) inhibit postharvest disease	China	China Agricultural University	2020
Peppers	<i>B. subtilis</i> P5 fermentation filtrate as a fresh-keeping agent	China	Yissum Research Development Company of The Hebrew University of Jerusalem Ltd	2016
Peppers	Eliciting peptides enhances the longevity of fruit or vegetable ripeness	China	Plant Health Care Inc of Jerusalem Ltd	2017
Peppers	Peptides induce resistance and enhances plant shelf life	China	Plant Health Care Inc	2017
Peppers	Edible coating composition morpholine-free (hydrocolloid polymer; an edible wax; a fatty acid; an edible alkaline component free of morpholine and/or ammonia and water) enhances shelf life	China	Yissum Research Development Company of The Hebrew University of Jerusalem Ltd	2017
Peppers	A sensor detects presence of volatile compounds indicating that fruits are on chilling stress and then, at least one control module will alter the storage conditioning conditions for avoiding deterioration	WIPO	Noam Alkin [IL]; US Agriculture [IL]; Ministry of Agriculture; Noam, Alkin	2018

Keywords in the title, abstract, or claims: 1, “postharvest potato” and “biological control” or “physical control”; 2, “postharvest tomato” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”; 3, “postharvest eggplant” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”; 4, “postharvest pepper” and “biological control” or “physical control” or “natural compound”

Table 4, for potatoes and tomatoes, patents focus on using secondary metabolites from cultures of microorganisms, peptides, chitosan and waxes and preservative solutions. Waxes and preservative solutions are used for eggplants and waxes, preservative solutions, and also a sensor to activate a modified atmosphere for chilli peppers, from a few days to weeks beyond the vegetable's normal shelf life. Regarding patents, the results reported after their use is sometimes misleading. However, it was possible to observe, among the few patents that describe their results in detail, that vegetable shelf life can increase from a few days to weeks under the application of the elicitor. In addition, it appears that the increase in shelf life is so much more significant depending on the type of treatment used. For example, while 15 days after blue light treatment, the total flavonoid content in tomatoes increased significantly as compared with natural light (from 0.0164 to 0.083 mg g after treatment), similar results were observed when blue light was combined with red light (Jingjing et al., 2016). Another treatment for tomatoes with culture fermentation broth extended shelf life even twice as long (Shuwen et al., 2019). This way, it is hard to evaluate the best-patented process for each crop.

On the other hand, the search for research on elicitors (Table 2) in Scopus database, for the same cultures, showed increased activity in the 5 years. The number of published scientific papers on potatoes (15 from original research and 2 reviews) and tomatoes (44 from original research and 6 reviews) exceed the number of patents, and the comparison between research and review articles reveals that research activity on the subject is increasing. China also has the leadership in papers published on the topic. In the mean time, no articles were found for eggplants and chilli peppers related to the keywords used.

Presently, there are a few commercial elicitors developed to Solanaceae cultures, most of them based on bacteria, and no product was found for application on eggplants during postharvest. Only products based on antagonists for biologic control were found, mostly based on bacteria, for example Bio-Save® (*Pseudomonas syringae*) eliciting against *R. stolonifera* and *Fusarium* spp. on potatoes and sweet potatoes, Serenade Opti® (*Bacillus subtilis*) for *Helminthosporium solani* for potatoes and Amylo-X® WG acting as a large-spectrum elicitor for tomatoes and chilli peppers. Only one commercial elicitor product based on yeasts (Shemer® by Metschnikowia Fructicola) is applied on sweet potatoes and tomatoes and enhance their defenses against *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium*, and *Aspergillus*. Only one product was found based on fungi, that is Trichodex (*Trichoderma harzianum* T39) used on potatoes against *B. cinerea* and *Colletotrichum* spp. Interestingly, a coating agent, called Naturcover P® (Decco Naturally Postharvest®, The Netherlands), to be applied on the surface of potatoes to improve

their natural shiny and delay aging by reducing transpiration and respiration. According to the manufacturer, it does not appear to have specific action against pathogens, but acts on potatoes physiology and extends their shelf life.

## Conclusions

Following current trends, strategies are currently being used to fight or prevent crop pathogens, such as the breeding of resistant cultivars through genetic engineering or selective breeding, in addition to reducing the use of synthetic fungicides. Another initiative that has proved to be promising, the stimulus of the plant's innate immunity, is gaining momentum in research. Such initiatives include natural compounds that induce plant resistance which may be exploited both in pre- and postharvest phase: the plant resistance inducers or elicitors. Elicitors are molecules or agents that play a role in the triggering or stimulating of defense mechanisms in a plant.

It is noticeable that, today, the population is more concerned with environmental issues and their effects on human health. The use of elicitors manages to attract consumers searching for food without residues of synthetic pesticides. Although not being, in fact, organic crops, it is still food cultivated with more sustainable and healthier practices. Additionally, the use of elicitors to extend shelf life, in their various formulations, does not necessarily represent an expensive strategy. Some elicitor products are already available for commercial use as reported in this review. For those crops that have a more fragile physical constitution, in addition to good harvesting, good handling practices and suitable sanitization procedures, a more enduring and sustainable approach to prevent postharvest losses due to diseases and decay would be a combination of the mentioned treatments and synthetic pesticides only in case of extreme necessity. Examples of combined treatments involve: heat treatment and/or elicitors in formulations followed by refrigeration and/or modified atmosphere for storage and packaging procedures following the crop physiology limitations.

To conclude, the increasing market claims for horticultural products free of contaminants should be envisaged. The use of elicitors to induce plant defense is a promising trend and will be well-regarded by public opinion since its use preserves health and the environment, besides ensuring the reduction of postharvest losses, thus promoting sustainable agriculture now and for the next years.

**Acknowledgements** We would like to thank to the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), to the Program on Plant Biotechnology and Bioprocesses and to the Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (Capes), Brazilian Ministry of Education. We also would like to thank to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

**Funding** *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (Capes), Brazilian Ministry of Education. This study is also supported by the *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ* and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq*.

**Availability of Data and Material** All data and material are results from research and properly referenced along with the manuscript.

**Code Availability** Not applicable.

## Declarations

**Ethics Approval** Not applicable.

**Consent to Participate** All the authors made substantial contributions to the conception, design of the work, acquisition, analysis, and data interpretation. All the authors revised it critically for important intellectual content.

**Consent for Publication** All the authors approved this manuscript version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Conflicts of Interest** The authors declare no competing interests.

## References

- Adss, I. A. A., Hamza, H. A., Hafez, E. E., & Heikal, H. M. (2017). Enhancing Tomato Fruits Post-Harvest Resistance by Salicylic Acid and Hydrogen Peroxide Elicitors Against Rot Caused by *Alternaria solani*. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.21608/jacb.2017.38409>
- Aghdam, M. S., & Bodbodak, S. (2014). Postharvest heat treatment for mitigation of chilling injury in fruits and vegetables. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 37–53. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1207-4>
- Ahmed, S., Bari, M. L., Rahman, M. A., Goffar, M. A., Acedo, A. L., Easdown, W., Hugues, J. A., & Keatinge, J. D. H. (2017). Development of novel sanitizers for fresh vegetables. *Acta Horticulturae*, 1179, 143–148. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1179.22>
- Alexandersson, E., Mulugeta, T., Lankinen, Å., Liljeroth, E., & Andreasson, E. (2016). Plant resistance inducers against pathogens in solanaceae species — from molecular mechanisms to field application. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1673. <https://doi.org/10.3390/ijms17101673>
- Alkan, N., & Fortes, A. M. (2015). Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 6, 889. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00889>
- Alwi, N. A., & Ali, A. (2015). Dose-dependent effect of ozone fumigation on physiological characteristics, ascorbic acid content and disease development on bell pepper (*Capsicum annuum* L) during storage. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 558–566. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1419-2>
- Aslam, B., & Demir, Y. (2018). Organic farming suffices to feed a country: A large-scale linear programming model to develop an organic agriculture plan for Turkey. *Sustainable Agriculture Research*, 7, 118–136. <https://doi.org/10.5539/sar.v7n1p118>
- Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: Concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, 20, 1163–1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>
- Banach, J. L., Sampers, I., Haute, S. V., & van der Fels-Klerx, H. J. (2015). Effect of disinfectants on preventing the cross-contamination of pathogens in fresh produce washing water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 8658–8677. <https://doi.org/10.3390/ijerph120808658>
- Barman, K., Sharma, S., & Siddiqui, M. (2019). Emerging postharvest treatment of fruits and vegetables. *Academic Press*. <https://doi.org/10.1201/9781351046312>
- Briand, X., Cluzet, S., Dumas, B., Esquerre-Tugaye, M. -T., & Salamagne, S. (2010). *Ulvans as activators of plant defense and resistance reactions against biotic or abiotic stresses*. Retrieved September 6, 2021, from <https://patents.google.com/patent/US7820176B2/en>
- Bu, S., Munir, S., He, P., Li, Y., Wu, Y., Li, X., Kong, B., He, P., & He, Y. (2021). *Bacillus subtilis* L1–21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 157, 104568. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104568>
- Buchholz, F., Junker, R., Samad, A., Antonielli, L., Sarić, N., Kostić, T., Sessitsch, A., & Mitter, B. (2021). 16S rRNA gene-based microbiome analysis identifies candidate bacterial strains that increase the storage time of potato tubers. *Scientific Reports*, 11(3146). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82181-9>
- Camagna, M., Ojika, M., & Takemoto, D. (2019). Detoxification of the solanaceous phytoalexins rishitin, lubimin, oxylubimin and solavetivone via a cytochrome P450 oxygenase. *Plant Signaling & Behavior*, 15, 2. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1707348>
- Carella, P., Kempthorne, C. J., Wilson, D. C., Isaacs, M., & Cameron, R. K. (2017). Exploring the role of DIR1 DIR1-like and other lipid transfer proteins during systemic immunity in Arabidopsis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 97, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.12.005>
- Cassman, K. G., & Grassini, P. (2020). A global perspective on sustainable intensification research. *Nature Sustainability*, 3, 262–268. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-0507-8>
- Cecchini, N. M., Roychoudhry, S., Speed, D. J., Steffes, K., Tambe, A., Zodrow, K., Konstantinoff, K., Jung, H. W., Engle, N. L., Tschaplinski, T. J., & Greenberg, J. T. (2019). Underground azelaic acid-conferred resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32, 86–94. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-18-0185-R>
- Chen, Q., Xu, S., Wu, T., Guo, J., Sha, S., Zheng, X., & Yu, T. (2014). Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2441–2447. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6576>
- Coelho, C. P., Gomes, D. C., Guilherme, F. A. G., & Souza, L. F. (2017). Reproductive biology of endemic *Solanum melissarum* Bohs (Solanaceae) and updating of its current geographic distribution as the basis for its conservation in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Biology*, 77, 809–819. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.01516>
- Czajkowski, R., van der Wolf, J. M., Krolicka, A., Ozymko, Z., Narajczyk, M., Kaczynska, N., & Lojkowska, E. (2015). Salicylic acid can reduce infection symptoms caused by *Dickeya solani* in tissue culture grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 545–558. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0561-z>
- Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2012). SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, 17, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.011>
- Donatelli, M., Magarey, R. D., Bregaglio, S., Willcoquet, L., Whish, J. P. M., & Savary, S. (2017). Modelling the impacts of pests and diseases on agricultural systems. *Agricultural Systems*, 155, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.01.019>

- Dong, X., Huber, D. J., Rao, J., & Lee, J. H. (2013). Rapid ingress of gaseous 1-MCP and acute suppression of ripening following short-term application to midclimacteric tomato under hypobaric. *Postharvest Biology and Technology*, *86*, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.07.020>
- Doughari, J. H. (2015). An overview of plant immunity. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, *6*(322). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000322>
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science development and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, *122*(2016), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- Dumont, M. J., Orsat, V., & Raghavan, V. (2016). Reducing postharvest losses. In C. Madramaatoo (Ed.), *Emerging technologies for promoting food security* (pp. 135–156). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-335-5.00007-x>
- Dzhavakhiya, V. G., & Shcherbakova, L. A. (2016). Editorial: Control of plant pathogens by biogenic elicitors and possible mechanisms of action. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 340. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00340>
- Edirisinghe, M., Ali, A., Maqbool, M., & Alderson, P. G. (2014). Chitosan controls postharvest anthracnose in bell pepper by activating defense-related enzymes. *Journal of Food Science and Technology*, *51*, 4078–4083. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0907-5>
- El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfaiti, R., Abouraicha, E., Zehhar, N., Petit, E., El Alaoui-Talibi, Z., & Courtois, J. (2012). Induction of natural defense accompanied by salicylic acid-dependent systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*, *138*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.011>
- Elsherbiny, E. A., Amin, B. H., Aleem, B., Kingsley, K. L., & Bennett, J. W. (2020). Trichoderma volatile organic compounds as a biofumigation tool against Late Blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest potato tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(31), 8163–8171. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03150>
- El-Shetehy, M., Wang, C., Shine, M. B., Yu, K., Navarre, D., Wendehenne, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2015). Nitric oxide and reactive oxygen species are required for systemic acquired resistance in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *10*(9), e998544. <https://doi.org/10.1080/15592324.2014.998544>
- EPA (2020). United States Environmental Protection Agency. *National Primary Drinking Water Regulations*. Retrieved July 10, 2020, from <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
- Ewel, J. J., Schreeg, L. A., & Sinclair, T. R. (2019). Resources for crop production: Accessing the unavailable. *Trends in Plant Sciences*, *24*, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.008>
- Fan, L., Shi, J., Zuo, J., Gao, L., Lv, J., & Wang, Q. (2016). Methyl jasmonate delays postharvest ripening and senescence in the non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *120*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.010>
- Fang, Y., Ramasamy, R., Fang, Y., & Ramasamy, R. (2015). Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors*, *5*, 537–561. <https://doi.org/10.3390/bios5030537>
- FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). (2011). *Global Food Losses and Waste. Extent, Causes and Prevention*. Retrieved July 10, 2020, from <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>
- FAO (Food And Agriculture Organization of United Nations) (2019). *The state of food and agriculture 2019 Moving forward on food loss and waste reduction*. Rome.
- Faoestat (2018). Retrieved July 13, 2020, from <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Fatima, S., & Anjum, T. (2017). Identification of a potential ISR determinant from *Pseudomonas aeruginosa* PM12 against fusarium wilt in tomato. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 848. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00848>
- Ferreira, M. D., Franco, A. T. O., Kasper, R. F., Ferraz, A. C. O., Honório, S. L., & Tavares, M. (2005). Post-harvest quality of fresh-marketed tomatoes as a function of harvest periods. *Scientia Agricola*, *62*, 446–451. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162005000500006>
- Feuerbacher, A., Luckmann, J., Boysen, O., Zikeli, S., & Grethe, H. (2018). Is Bhutan destined for 100% organic? Assessing the economy-wide effects of a large-scale conversion policy. *PLoS ONE*, *13*, e0199025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199025>
- Figueira, T. F., da Silva, A. J. R., Enrich-Prast, A., Yoneshigue-Valentin, Y., & de Oliveira, V. P. (2020). Structural characterization of ulvan polysaccharide from cultivated and collected *Ulva fasciata* (Chlorophyta). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *11*(05), 206–216. <https://doi.org/10.4236/abb.2020.115016>
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, *9*, 275–296.
- Food Loss and Waste Database (2017). Retrieved July 10, 2020, from <http://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw-data/en/>
- Fortes, A. M., Granelli, A., Pezzotti, M., & Bouzayen, M. (2017). Molecular and metabolic mechanisms associated with fleshy fruit quality. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1236. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01236>
- Foster, T., & Brozović, N. (2018). Simulating crop-water production functions using crop growth models to support water policy assessments. *Ecological Economics*, *152*, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2018.05.019>
- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- Gao, Y., Wang, W., Zhang, T., Gong, Z., Zhao, H., & Han, G.-Z. (2018). Out of water: The origin and early diversification of plant R-genes. *Plant Physiology*, *177*, 82–89. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00185>
- Garcia, É. L., do Carmo, E. L., de Padua, J. G., & Leonel, M. (2015). Potencialidade de processamento industrial de cultivares de batatas. *Ciência Rural*, *45*(10), 1742–1747. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140072>
- García-Flores, R., De Souza Filho, O. V., Martins, R. S., Martins, C. V. B., & Juliano, P. (2015). Using logistic models to optimize the food supply chain. In S. Bakalis, K. Knoerzer, & P. J. Fryer (Eds.), *Modeling food processing operations* (pp. 307–330). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-284-6.00011-8>
- Gebhardt, C. (2016). The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theoretical and Applied Genetics*, *129*, 2281–2294. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2804-1>
- González-Estrada, R., Blancas-Benítez, F., Velázquez-Estrada, R. M., Montaña-Leyva, B., Ramos-Guerrero, A., Aguirre-Güitrón, L., Moreno-Hernández, C., Coronado-Partida, L., Herrera-González, J. A., Rodríguez-Guzmán, C. A., Ángel-Cruz, J. A. D., Rayón-Díaz, E., Cortés-Rivera, H. J., Santoyo-González, M. A., Gutierrez-Martinez, P. (2020). Alternative eco-friendly methods in the control of post-harvest decay of tropical and subtropical fruits. In I. Kahramanoglu, N. E. Kafkas, A. Küden, & S. Çömlekçioğlu (Eds.), *Modern fruit industry*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85682>
- González-Saucedo, A., Barrera-Necha, L. L., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., & Hernández-López, M. (2019). Extension of the postharvest quality of bell pepper by applying nanostructured coatings of chitosan with Byrsonima



- crassifolia extract (L.) Kunth. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.019>
- Grolleaud, M. (2002). *Post-harvest losses: discovering the full story. Overview of the phenomenon of losses during the post-harvest system*. FAO, Agriindustries and Postharvest management Service (AGSI).
- Grund, E., Tremousaygue, D., & Deslandes, L. (2019). Plant NLRs with integrated domains: Unity makes strength. *Plant Physiology*, 179, 1227–1235. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01134>
- Gu, R. X., Zhu, S. H., Zhou, J., Liu, N., & Shi, J. Y. (2014). Inhibition on brown rot disease and induction of defence response in harvested peach fruit by nitric oxide solution. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0393-x>
- Guideli, C., Mateos, M., Rojas-Argudo, C., & Pérez-Gago, M. B. (2014). Extending the shelf life of fresh-cut eggplant with a soy protein–cysteine based edible coating and modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 95, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.04.007>
- Hammerschmidt, R. (2009). Systemic acquired resistance. In Van Loon, L. C. (Ed.), *Advances in botanical research* (pp. 173–222). Academic Press.
- Hou, S., Liu, Z., Shen, H., & Wu, D. (2019). Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00646>
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2, 111–119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Hunter, C. M., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. *BioScience*, 67, 386–391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- Ippolito, A., Nigro, F., & De Cico, V. (2005). Natural antimicrobials for preserving fresh fruit and vegetables. In W. Jongen (Ed.), *Improving the safety of fresh fruit and vegetables* (pp. 513–555). Woodhead Publishing Limited.
- Jamiołkowska, A. (2020). Alkaloids of Solanaceae (Nightshade Plants) resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy*, 10, 173. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020173>
- Jeandet, P. (2015). Phytoalexins: Current progress and future prospects. *Molecules*, 20, 2770–2774. <https://doi.org/10.3390/molecules20022770>
- Jerzykiewicz, J. (2007). Alkaloids of Solanaceae (Nightshade Plants). *Postepy Biochemii*, 53, 280–286.
- Jingjing, O., Peilong, S., Wen, T., Yuqiang, W., & Ying, W. (2016). *Method for increasing contents of triterpenes and flavonoid substances in postharvest tomato fruits during storage and transportation processes*. Retrieved September 12, 2021, from <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DCDN105533402A>
- Jones, J., & Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kader, A. A. (2005). Increasing food availability by reducing post-harvest losses of fresh produce. *Acta Horticulturae*, 682, 2169–2176. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.682.296>
- Kalaïtzis, P., Bitá, E. C., & Hilmi, M. (2016). *Innovative postharvest technologies for sustainable value chain*. Retrieved July 20, 2020, from [https://www.researchgate.net/publication/331207145\\_INNOVATIVE\\_POSTHARVEST\\_TECHNOLOGIES\\_FOR\\_SUSTAINABLE\\_VALUE\\_CHAIN](https://www.researchgate.net/publication/331207145_INNOVATIVE_POSTHARVEST_TECHNOLOGIES_FOR_SUSTAINABLE_VALUE_CHAIN)
- Kasapidou, E., Sossidou, E., & Mitlianga, P. (2015). Fruit and vegetable co-products as functional feed ingredients in farm animal nutrition for improved product quality. *Agriculture*, 5, 1020–1034. <https://doi.org/10.3390/agriculture5041020>
- Kim, D. S., & Hwang, B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 65, 2295–2306. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru109>
- Kim, J. H., & Castroverde, C. D. M. (2020). Diversity function and regulation of cell surface and intracellular immune receptors in Solanaceae. *Plants*, 9, 434. <https://doi.org/10.3390/plants9040434>
- Kong, J., Zhang, Y., Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Quek, S. Y., & Yao, W. (2019). Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. *Food Chemistry*, 1(285), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.099>
- Lafon-Placette, C., Vallejo-Marín, M., Parisod, C., Abbott, R. J., & Köhler, C. (2016). Current plant speciation research: Unravelling the processes and mechanisms behind the evolution of reproductive isolation barriers. *New Phytologist*, 209, 29–33. <https://doi.org/10.1111/nph.13756>
- Lastochkina, O., Baymiev, A. Shayahmetova, A. Garshina, D., Koryakov, I., Shpirnaya, I., Pusenkova, L., Mardanshin, I., Kasnak, C., & Palamutoglu, R. (2020). Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans* *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. *Plants (Basel)*, 9, 76. <https://doi.org/10.3390/plants9010076>
- Li, S., Xu, Y., Bi, Y., Zhang, B., Shen, S., Jiang, T., & Zheng, X. (2019). Melatonin treatment inhibits gray mold and induces disease resistance in cherry tomato fruit during postharvest. *Postharvest Biology and Technology*, 157, 110962. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110962>
- Lipinski, B., Hanson, C., Lomax, J., Kitinoja, L., & Waite, R. (2013). *Installment 2 of "Creating a Sustainable Food Future" Reducing Food Loss and Waste*. Retrieved September 28, 2021, from [http://pdf.wri.org/reducing\\_food\\_loss\\_and\\_waste.pdf](http://pdf.wri.org/reducing_food_loss_and_waste.pdf)
- Liu, C., Cai, L., Lu, X., Han, X., & Ying, T. (2012). Effect of postharvest UV-C irradiation on phenolic compound content and antioxidant activity of tomato fruit during storage. *Journal of Integrative Agriculture*, 11, 159–165. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(12\)60794-9](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(12)60794-9)
- Liu, G. (2013). Food losses and food waste in China and their implication for water and land. *Environmental Science & Technology*, 47, 10137–10144. <https://doi.org/10.1021/es401426b>
- Liu, J., Sun, Z., Zou, Y., Li, W., He, F., Huang, X., Lin, C., Cai, Q., Wisniewski, M., & Wu, X. (2020). Pre- and postharvest measures used to control decay and mycotoxigenic fungi in potato (*Solanum tuberosum* L) during storage. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1818688>
- Liu, J., Tian, S., Meng, X., & Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.12.019>
- Llorens, E., Pilar, G.-A., & Lapeña, L. (2017). Advances in induced resistance by natural compounds: Towards new options for woody crop protection. *Scientia Agricola*, 74, 90–100. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0012>
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., & Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>
- Loayza, F. E., Brecht, J. K., Simonne, A. H., Plotto, A., Baldwin, E. A., Bai, J., & Lon-Kan, E. (2020). Enhancement of the antioxidant capacity of ripe tomatoes by the application of a hot water treatment at the mature-green stage. *Postharvest Biology and*

- Technology, 161, 111054. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111054>
- Lópes, C. A., & Ávila, A. C. (2005). *Doenças do tomateiro*. Embrapa Hortaliças.
- Luengo, R. F. A., Henz, G. P., Moretti, C. L., & Calbo, A. G. (2007). *Pós-colheita de Hortaliças*. Embrapa Informação Tecnológica.
- Lvova, L. (2016). Electronic tongue principles and applications in the food industry. In M. L. R. Méndez (Ed.), *Electronic Noses and Tongues in Food Science* (pp. 151–160). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800243-8.00015-9>.
- Magnin-Robert, M., Le Bourse, D., Markham, J., Dorey, S., Clément, C., Baillieul, F., & Dhondt-Cordeller, S. (2015). Modifications of sphingolipid content affect tolerance to hemibiotrophic and necrotrophic pathogens by modulating plant defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 169, 2255–2274. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01126>
- Mahajan, P. V., Caleb, O. J., Singh, Z., Watkins, C. B., & Geyer, M. (2014). Postharvest treatments of fresh produce. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 372, 20130309. <https://doi.org/10.1098/rsta.2013.0309>.
- Mahendranathan, C., Terry, L. A., & Adikaram, N. K. B. (2010). Biological elicitation of resistance against anthracnose in aubergine. *Acta Horticulturae*, 877, 1589–1595. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2010.877.219>
- Malik, N. A. A., Kumar, I. S., & Nadarajah, K. (2020). Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 963. <https://doi.org/10.3390/ijms21030963>
- Mandal, S., & Gupta, C. K. (2016). Inducing cell wall-bound phenolic compounds by elicitors in eggplant (*Solanum melongena*). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52, 650–665. <https://doi.org/10.1134/S0003683816060120>
- Manzocco, L. (2015). The acceptability limit in food shelf life studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1640–1646. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.794126>
- Mejdoub-Trabelsi, B., Touihri, S., Ammar, N., Riahi, A., & Daami-Remadi, M. (2019). Effect of chitosan for the control of potato diseases caused by *Fusarium* species. *Journal of Phytopathology*, 168(1), 18–27. <https://doi.org/10.1111/jph.12847>
- Mishra, A. K., Sharma, K., & Misra, R. S. (2011). Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions*, 7, 95–120. <https://doi.org/10.1080/17429145.2011.59751>
- Mohamed, A. A., Salah, M. M., El-Dein, M. M. Z., El-Hefny, M., Ali, H. M., Farraj, D. A. A., Hatamleh, A. A., Salem, M. Z. M., & Ashmawy, N. A. (2021). Ecofriendly bioagents, *Parthenocissus quinquefolia*, and *Plectranthus neochilus* extracts to control the Early Blight pathogen (*Alternaria solani*) in tomato. *Agronomy*, 11, 911. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050911>
- Montesano, M., Brader, G., Ponce de León, I., & Palva, E. T. (2005). Multiple defense signals induced by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* in potato. *Molecular Plant Pathology*, 6, 541–549. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00305.x>
- Nabi, S. U., Raja, W. H., Dar, M. S., Kirmani, S. N., & Magray, M. M. (2017). New generation fungicides in disease management of horticultural crops. *Indian Horticulture Journal*, 7, 1–7.
- Nicoli, M. C. (2012). An introduction to food shelf life: Definitions, basic concepts, and regulatory aspects. In M. C. Nicoli (Ed.), *Shelf Life Assessment of Food* (pp. 1–16). CRC Press.
- Palou, L. (2018). Postharvest treatments with GRAS salts to control fresh fruit decay. *Horticulturae*, 4, 46. <https://doi.org/10.3390/horticulturae4040046>
- Palou, L., Ali, A., Fallik, E., & Romanazzi, G. (2016). GRAS, plant- and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.017>
- Palou, L., & Smilanick, J. (2020). Postharvest pathology of fresh horticultural produce. *CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/9781315209180>
- Pavoncello, D., Lurie, S., Droby, S., & Porat, R. (2008). A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. *Physiologia Plantarum*, 111, 17–22. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110103.x>
- Pem, D., & Jeewon, R. (2015). Fruit and vegetable intake: Benefits and progress of nutrition education interventions- narrative review article. *Iranian Journal of Public Health*, 44, 1309–1132.
- Perotti, V. E., Moreno, A. S., Trípodí, K., Del Vecchio, H. A., Meier, G., Bello, F., Coco, M., Vázquez, D., & Podestá, F. E. (2015). Biochemical characterization of the flavedo of heat-treated Valencia orange during postharvest cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.08.007>
- Pétriacq, P., López, A., & Luna, E. (2018). Fruit decay to diseases: Can induced resistance and priming help? *Plants*, 7, 77. <https://doi.org/10.3390/plants7040077>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Gonçalves, E. M., & Silva, C. L. M. (2015). Influence of postharvest ultrasounds treatments on tomato (*Solanum lycopersicum* cv Zinac) quality and microbial load during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2015.04.009>
- Porat, R., Lichter, A., Terry, L. A., Harker, R., & Buzby, J. (2018). Postharvest losses of fruit and vegetables during retail and in consumers' homes: Quantifications causes and means of prevention. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.019>
- Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., & Fluhr, R. (2013). Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102349>
- Purvis, B., Mao, Y., & Robinson, D. (2019). Three pillars of sustainability: In search of conceptual origins. *Sustainability Science*, 14, 681–695. <https://doi.org/10.1007/s11625-018-0627-5>
- Qadri, R., Azam, M., Khan, I., Yang, Y., Ejaz, E., Akram, M. T., & Khan, A. (2020). Conventional and modern technologies for the management of post-harvest diseases. In I. Ul Haq, & S. Ijaz (Eds.), *Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches* (pp. 137–172). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_7)
- Qi, D., & Innes, R. W. (2013). Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling. *Frontiers in Immunology*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00348>
- Ravensbergen, M., & Kormelink, R. (2020). Plant resistance to viruses: Natural resistance associated with dominant genes. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21306-X>
- Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R., & Demarini, D. M. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research*, 636, 178–242. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.001>
- Romanazzi, G., Sanzani, S. M., Bi, Y., Tian, S., Martínez, P. G., & Alkan, N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 2–94. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.003>

- Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M. A., Ramos, J., Alcántara, S., Angulo, M., & Pérez-Vicente, R. (2019). Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>
- Rose, D. C., Sutherland, W. J., Barnes, A. P., Borthwick, F., Ffoulkes, C., Hall, C., Moorby, J. M., Nicholas-Davies, P., Twining, S., & Dicks, L. V. (2019). Integrated farm management for sustainable agriculture: Lessons for knowledge exchange and policy. *Land Use Policy*, *81*, 834–842. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.11.001>
- Salehi, F. (2020). Edible coating of fruits and vegetables using natural gums: A review. *International Journal of Fruit Science*, *1*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1746730>
- Sandri, D., Rinaldi, M. M., Ishizawa, T. A., Cunha, A. H. N., Pacco, H. C., & Ferreira, R. B. (2015). ‘Sweet grape’ tomato post harvest packaging. *Engenharia Agrícola*, *35*, 1093–1104. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v35n6p1093-1104/2015>
- Santos, S. F., Cardoso, R. C. V., Borges, I. M. P., Almeida, A. C., Andrade, E. S., Ferreira, I. O., & Ramos, L. C. (2020). Post-harvest losses of fruits and vegetables in supply centers in Salvador Brazil: Analysis of determinants volumes and reduction strategies. *Waste Management*, *101*, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.007>
- Scott, G., Rupar, M., Fletcher, A. G. D., Dickinson, M., & Shama, G. (2017). A comparison of low intensity UV-C and high intensity pulsed polychromatic sources as elicitors of hormesis in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *125*, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.10.012>
- Sellem, I., Triki, M. A., Elleuch, L., Cheffi, M., Chakchouk, A., Smaoui, S., & Mellouli, L. (2017). The use of newly isolated *Streptomyces* strain TN258 as potential biocontrol agent of potato tubers leak caused by *Pythium ultimum*. *Journal of Basic Microbiology*, *57*(5), 393–401. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600604>
- Senhor, F. R., de Souza, F. A., Andrade Neto, R. C., Maracajá, P. B., & Nascimento, F. J. (2009). Manejo de doenças pós-colheita. *Revista Verde*, *4*, 0–13.
- Seo, J., Yi, G., Lee, J. G., Choi, J. H., & Lee, E. J. (2020). Seed browning in pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit during cold storage is inhibited by methyl jasmonate or induced by methyl salicylate. *Postharvest Biology and Technology*, *166*, 111210. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111210>
- Seymour, G. B., Østergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., & Martin, C. (2013). Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 219–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>
- Shah, J., & Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, *17*, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.011>
- Sheikh, M., Mehnaz, S., & Sadiq, M. B. (2021). Prevalence of fungi in fresh tomatoes and their control by chitosan and sweet orange (*Citrus sinensis*) peel essential oil coating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11291>
- Shen, X., Zhang, M., Devahastin, S., & Guo, Z. (2019). Effects of pressurized argon and nitrogen treatments in combination with modified atmosphere on quality characteristics of fresh-cut potatoes. *Postharvest Biology and Technology*, *149*, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.023>
- Shuwen, B., Pengbo, H., Pengfei, H., Yan, S., Yixin, W., & Dezhu, Z. (2019). Biological control method for postharvest cherry and/or tomato fruit mildew. Retrieved September 12, 2021, from <https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DCN110423713A>
- Sivakumar, D., & Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, *64*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Sivakumar, D., Bill, M., Korsten, L., & Thompson, K. (2016). Integrated application of chitosan coating with different postharvest treatments in the control of postharvest decay and maintenance of overall fruit quality. In S. Bautista-Baños, A. Jiménez-Aparicio, & G. Romanazzi (Eds.), *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* (pp. 127–153). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00005-7>
- Smith, L. G., Jones, P. J., Kirk, G. J. D., Pearce, B. D., & Williams, A. G. (2018). Modelling the production impacts of a widespread conversion to organic agriculture in England and Wales. *Land Use Policy*, *76*, 391–404. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.02.035>
- Smith, O. M., Cohen, A. L., Rieser, C. J., Davis, A. G., Taylor, J. M., Adesanya, A. W., Jones, M. S., Meier, A. R., Reganold, J. P., Orpet, R. J., Northfield, T. D., & Crowder, D. W. (2019). Organic farming provides reliable environmental benefits but increases variability in crop yields: A global meta-analysis. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *3*, 82. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00082>
- Spadoni, A., Guidarelli, M., Phillips, J., Mari, M., & Wisniewski, M. (2015). Transcriptional profiling of apple fruit in response to heat treatment: Involvement of a defense response during *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, *101*, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.10.009>
- Spadoni, A., Guidarelli, M., Sanzani, S. M., Ippolito, A., & Mari, M. (2014). Influence of hot water treatment on brown rot of peach and rapid fruit response to heat stress. *Postharvest Biology and Technology*, *94*, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.03.006>
- Spanu, P. D., & Panstruga, R. (2017). Editorial: Biotrophic plant-microbe interactions. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 192. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00192>
- Sripong, K., Jitareerat, P., Tsuyumu, S., Uthairatanakij, A., Srilaong, V., Wongs-Aree, C., Ma, G., Zhang, L., & Kato, M. (2015). Combined treatment with hot water and UV-C elicits disease resistance against anthracnose and improves the quality of harvested mangoes. *Crop Protection*, *77*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.004>
- Stadnik, M. J., & de Freitas, M. B. (2014). Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology*, *39*, 111–118. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000200001>
- Stravopoulou, A., Loulakakis, K., Magan, N., & Tzortzakis, N. (2014). *Origanum dictamnus* oil vapour suppresses the development of grey mould in eggplant fruit *in vitro*. *BioMed Research International*, *2014*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/562679>
- Sun, H. S., Kim, S. J., Kwak, S. J., & Yoon, K. S. (2012). Efficacy of sodium hypochlorite and acidified sodium chlorite in preventing browning and microbial growth on fresh-cut produce. *Preventive Nutrition and Food Science*, *3*, 210–216. <https://doi.org/10.3746/pnf.2012.17.3.210>
- Sun, X., Baldwin, E., & Bai, J. (2019). Applications of gaseous chlorine dioxide on postharvest handling and storage of fruits and vegetables – a review. *Food Control*, *95*, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.044>
- Suzukia, Y., & Nagatab, Y. (2019). Postharvest ethanol vapor treatment of tomato fruit stimulates gene expression of ethylene biosynthetic enzymes and ripening related transcription factors, although it suppresses ripening. *Postharvest Biology and Technology*, *152*, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.03.006>
- Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of

- fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32(3), 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.11.005>
- Truman, W. M., Bennett, M. H., Turnbull, C. G., & Grant, M. R. (2010). Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant Physiology*, 152, 1562–1573. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152173>
- Tzortzakakis, N., Taybi, T., Antony, E., Singleton, I., Borland, A., & Barnes, J. (2013). Profiling shifts in protein complement in tomato fruit induced by atmospheric ozone-enrichment and/or wound-inoculation with *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.12.005>
- Tzortzakakis, N. G., Tzanakaki, K., & Economakis, C. (2010). Effect of organum oil and vinegar on the maintenance of postharvest quality of tomato. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 974–982. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.29132>
- United Nations Department of Economic and Social Affairs Population Division. (2019). *World Population Prospects: The 2012 Revision, Volume II, Demographic Profiles*. Retrieved July 10, 2020, from <https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2012-revision.html#:~:text=The%20report%2C%20World%20Population%20Prospects,to%201.8%20billion%20in%202050>
- Usall, J., Ippolito, A., Sisquella, M., & Neri, F. (2016). Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.002>
- Vandekinderen, I., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Ragaert, P., & Van Camp, J. (2009). Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce. *Food Microbiology*, 26, 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.06.004>
- Velásquez, A. C., Castroverde, C. D. M., & He, S. Y. (2018). Plant-pathogen warfare under changing climate conditions. *Current Biology*, 28, R619–R634. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.054>
- Veras, A. O. M., Béttega, R., Freire, F. B., Barrozo, M. A. S., & Freire, J. T. (2012). Drying kinetics, structural characteristics and vitamin C retention of dedo-de-moça pepper (*Capsicum baccatum*) during convective and freeze drying. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29, 741–750. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000400006>
- Verbon, E. H., Trapet, P. L., Stringlis, I. A., Kruijs, S., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2017). Iron and immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 355–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035537>
- Verma, M., Plaisier, C., van Wagenberg, C. P. A., & Achterbosch, T. (2019). A systems approach to food loss and solutions: Understanding practices causes and indicators. *Sustainability*, 11, 1–22. <https://doi.org/10.3390/su11030579>
- Verma, S., Sharma, V., & Kumari, N. (2020). Microwave pretreatment of tomato seeds and fruit to enhance plant photosynthesis, nutritive quality and shelf life of fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 159, 111015. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111015>
- Wang, A. Y., Lou, B. G., & Xu, T. (2011). Defense responses in tomato fruit induced by oligandrin against *Botrytis cinerea*. *African Journal of Biotechnology*, 10, 4596–4601. <https://doi.org/10.5897/AJB11.290>
- Wang, H., Zhang, Z., Xu, L., Huang, X., & Pang, X. (2012). The effect of delay between heat treatment and cold storage on alleviation of chilling injury in banana fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2624–2629. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5676>
- Wang, L., Zhang, X.-L., Wang, L., Tian, Y., Jia, N., Chen, S., Shi, N.-B., Huang, X., Zhou, C., Yu, Y., Zhang, Z.-Q., & Pang, X.-Q. (2017). Regulation of ethylene-responsive SIWRKYs involved in color change during tomato fruit ripening. *Scientific Reports*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16851-y>
- Wani, A. H. (2011). An overview of the fungal rot of tomato. *Mycopathology*, 9, 1–5.
- Wills, R., & Golding, J. (2015). Advances in postharvest fruit and vegetable technology. *CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/b18489>
- Wisniewskia, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J., & Schena, L. (2016). Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.012>
- Xie, J.-H., Chai, T.-T., Xu, R., Liu, D., Yang, Y.-X., Deng, Z.-C., Jin, H., & He, H. (2017). Induction of defense-related enzymes in patchouli inoculated with virulent *Ralstonia solanacearum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.007>
- Yang, R., Han, Y., Han, Z., Ackah, S., Li, Z., Bi, Y., Yang, Q., & Prusky, D. (2020). Hot water dipping stimulated wound healing of potato tubers. *Postharvest Biology and Technology*, 167, 111245. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111245>
- Yang, X.-L., Chen, Y.-Q., Pacenka, S., Steenhuis, T. S., & Sui, P. (2019). Managing food and bioenergy crops with declining groundwater levels in the North China Plain. *Field Crops Research*, 234, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.02.003>
- Yu, K., Soares, J. M., Mandal, M. K., Wang, C., Chanda, B., Gifford, N. A., Fowler, J. S., Navarre, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2013). A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Reports*, 3, 1266–1278. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.030>
- Zhang, R., Li, L., Xue, H., Bi, Y., Raza, H., Si, M., Peng, H., Nan, M., Zong, Y., & Prusky, D. (2021). Ca<sup>2+</sup> applications affect the phenylpropanoid metabolism in potato tubers induced by T-2 toxin. *Postharvest Biology and Technology*, 180, 111616. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111616>
- Zhao, S., Guo, Y., Wang, Q., Luo, H., He, C., & An, B. (2020). Expression of flagellin at yeast surface increases biocontrol efficiency of yeast cells against postharvest disease of tomato caused by *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 162, 111112. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111112>
- Zheng, Y., Sheng, J. P., & Zhao, R. R. (2011). Preharvest L-arginine treatment induced postharvest disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6543–6549. <https://doi.org/10.1021/jf2000053>
- Zhou, F., Jiang, A., Feng, K., Gu, S., Xu, D., & Hu, W. (2019). Effect of methyl jasmonate on wound healing and resistance in fresh-cut potato cubes. *Postharvest Biology and Technology*, 157, 110958. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110958>
- Zhu, Z., & Zhang, X. (2016). Effect of harpin on control of postharvest decay and resistant responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09>

## 5.2 Capítulo 2

### 5.2.1 Ulvan polysaccharide enhances enzyme-related defense activity and modulates VOCs emission and secondary metabolism profile of postharvest *Solanum lycopersicum* cv *Sweet Grape*

#### Ulvan polysaccharide enhances enzyme-related defense activity and modulates VOCs emission and secondary metabolism profile of postharvest *Solanum lycopersicum* cv *Sweet Grape*

**Dora dos S. Costa**<sup>1</sup>, Samara L. da Silva<sup>2</sup>, Tiphane A. Figueira<sup>3</sup>, Daniel Luiz Reis Simas<sup>5</sup>; Daniela S. A. Moreno<sup>4</sup>, Celuta S. Alviano<sup>4</sup>, Antonio J. R. da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Plant Biotechnology and Bioprocesses, Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ.

<sup>2</sup>Phytochemical Analysis Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ.

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Environmental Engineering, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ.

<sup>4</sup>Laboratory of Structures of Surface of Microorganisms, Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ.

<sup>5</sup>Bio Assets Biotecnologia.

Correspondence: dora.cost@hotmail.com

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, Ulvan, Elicitation, Postharvest treatment.

This study investigated the potential of ulvan as an elicitor in enhancing tomato postharvest defense. Organic-certified tomatoes of the *Sweet Grape* variety were subjected to ulvan treatment through injection and immersion, and their protective effect against *Botrytis cinerea* was assessed. Ulvan treatment led to significant improvements in defense-related enzymatic activities, such as phenylalanine ammonia lyase (PAL), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX). Additionally, it reduced

the volatile organic compound (VOC) profile in ulvan-treated fruits compared to controls and inoculated ones. Further analysis by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) revealed changes in secondary plant metabolism, including the accumulation of potentially protective secondary metabolites, mainly caffeoylquinic acids. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination showed ulvan has no anti-fungal properties. Treatment did not modulate ascorbic acid levels.

## Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits are the second most consumed vegetable in the world after potato (*S. tuberosum* L.), producing approximately 182.3 million tons annually in 4.85 million hectares (Quinet *et al.*, 2019). Actually, China is the largest producing country with approximately 100.000.000 tons produced in 2022 (Faostat, 2023). It is considered a high-risk crop because it is more likely to not reach the expected productivity for several reasons, ranging from post-harvest diseases to losses due to environmental conditions that can cause production to decline (Fernandes *et al.*, 2007; Monte *et al.*, 2013). In relation to tomatoes, most of their postharvest diseases are caused by *Alternaria alternata* (black mold) and *Botrytis cinerea* (gray mold) fungi during storage (10 to 20 °C) at a relative humidity of 90–95% (Prusky *et al.*, 2013). Specifically, *B. cinerea* is a necrotrophic phytopathogen worldwide intimately related to postharvest losses, being responsible for economic losses which can reach \$10 billion each year (Hua *et al.*, 2018) and currently there is no natural tomato cultivars resistant to this phytopathogen. Thus the use of synthetic agrochemicals with potential harmful effects on both environmental and human health, or transgenic tomato varieties are the mainly strategies adopted. Nonetheless, *B. cinerea* exhibits elevated reproductive rates, adaptability in adverse conditions, and swift development of genomic mutations that confer resistance to fungicides, rendering these strategies insufficiently efficacious (Nawrocka *et al.*., 2023). Because of this situation, other strategies are being investigated such as physical and microbiological control, eco-friendly synthetics and natural compounds as elicitors (dos S. Costa *et al.*, 2022).

Elicitors are agents of a physical, chemical, or biotic nature that trigger plant defenses by influencing the modulation of biochemical, genetic, morphological, and anatomical compounds in the plant's primary and secondary metabolism. (Jamiołkowska *et al.*, 2020). Including, defense elicitors should not be confused with priming inducers since induced resistance in plants may occur into direct elicitation of defense responses in the absence of infection, or into a plant sensitized by a priming agent (de Borba *et al.*, 2021). Naturally, plants have evolved with an array of constitutive and induced defense mechanisms to avoid phytopathogens and abiotic stresses, but elicitors may improve or activate such mechanisms before a real stress episode. Plant-defense mechanisms encompass morphological, biochemical, and molecular signalling through Volatile Organic Compounds (VOCs) emission and activity enhancement of defense-related enzymes such as catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL), for example. Including, the accumulation of secondary specialized metabolites such as polyphenols (lignin, flavonoids, and phenolic acids), nitrogen-/sulfur-containing compounds (alkaloids, glucosinolates, and thiophenes), terpenoids (including carotenoids) (Kutty and Mishra, 2023), chemical barriers against the microbial attack (phytoanticipins) and inducible antimicrobials (phytoalexins) (Tiku, 2020) to cope with both adverse conditions, pathogens and pests.

Although nowadays the most reliable means to control diseases in crops both pre- and postharvest phase, including in horticultural crops such as tomatoes and potatoes, is by the use of synthetic fungicides the efficacy of many of them is being reduced due to the proliferation of resistant bacterial and fungal strains. And that is the one of the main reasons why elicitors are gaining scientific visibility (Palou, 2018; dos S. Costa *et al.*, 2022). Particularly, in agriculture, polysaccharides isolated from seaweed (e.g., ulvans, laminarans, carrageenans and fucans) or even from animals (e.g., chitosan and oligochitosan) are reported as quite effective elicitors being considered less harmful or innocuous to mammals' health while being and thus, safe (dos S. Costa *et al.*, 2022).

Ulvans are the chief-sulfated polysaccharides isolated from the Chlorophyceae family green seaweeds, mainly from the cosmopolitean genus *Ulva*, is distributed

homogenously within the macroalgae intercellular space and in the fibrillar wall preserving the osmolar stability and also protecting them from the attack of marine bacteria (Figueira *et al.*, 2020). Such polyssacharides present a water-soluble gelling behavior and is mainly composed of xylose and glucuronic acid but also rhamnose, iduronic acid, glucose, arabinose, galactose, and mannose (Coiai *et al.*, 2021). Because of its properties, ulvan has potential to be used in biomaterial science (e.g. biofilm prevention, and excipients), in nutraceuticals (e.g. antiviral, antioxidant, antihyperlipidemic, anticancer and immunostimulatory), as functional foods and also in agriculture (Kidgell *et al.*, 2019), as elicitors of plant defenses.

Nevertheless, the way in with the elicitor is applied (e.g. systemic, foliar, dipping, injection) possibly may influence plant's response of eliciting or priming. In the literature both strategies are investigated. Including, in a previous work, our group observed that the best concentration of ulvan as an elicitor was 1.0 mg/mL. Therefore, we aimed to evaluate the best route of administration of the ulvan elicitor (by dipping or injection), by evaluating the activity of enzymes related to plant defense (PAL, CAT and APX). Once this step was concluded, we analysed the protection level of ulvan-treated samples under *B. cinerea* inoculation. We also evaluated the ulvan-treated tomatoes VOCs profile compared to control and inoculated with the phytopathogen as well the secondary metabolism profile analysis by LC/MS of control and treated fruits.

## **Material and methods**

### ***Chemicals***

Analytical reagents and standards were procured from Sigma-Aldrich and Merck (São Paulo, Brazil). Methanol, hexane, dichloromethane, methyltertbutyl ether (MTBE), ethyl acetate and chloroform were all of HPLC or analytical grade.

### ***Plant material and phytopathogen origins***

Organic-certified tomatoes, cultivar *Sweet Grape*, at the red maturation stage



according to USDA standards (1991), were procured from local supermarkets in the city of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. These tomatoes were selected when they exhibited uniform size and showed no signs of rot or mechanical damage, ensuring their quality for subsequent analysis.

Samples of *Botrytis cinerea* were generously provided by Embrapa Meio Ambiente, located in Jaguariúna, São Paulo, Brazil. These samples were obtained from the Collection of Microorganisms of Agricultural and Environmental Importance (CMAA) through the Alelo Portal of Genetic Resources at Embrapa. The strain was cultivated on Potato Dextrose Agar (PDA) medium, consisting of 200g of potato, 20g of dextrose, and 1000mL of distilled water, following the recommendations of the collection curator. The cultivation was carried out in an incubator at room temperature, approximately 25°C, until the experiments were conducted.

For the extraction of ulvan polysaccharide, samples of *Ulva fasciata* were collected at Prainha in Arraial do Cabo, RJ, Brazil, at coordinates 22°57'40S/42°01'13W. These samples were packed in a styrofoam box containing sea water for transport. Subsequently, the fresh biomass underwent a cleaning process and was then dried in an oven at 50°C. The dried biomass was stored in a desiccator until it was ready for extraction.

### ***Ulvan polysaccharide eliciting solution***

Ulvan extraction followed Reis *et al.* (2018) method. Dried *Ulva fasciata* biomass (96.5 g) was powdered, suspended in ultrapure water (100 mL/10g), autoclaved (121°C, 1 atm, 40 min), and then centrifuged (10,000 g, 4°C, 10 min). Polysaccharide precipitation occurred with three volumes of ultrapure ethanol (-20°C, 48 hours), followed by centrifugation (3500 g, 4°C, 5 min) and lyophilization (25.617 g).

Purification involved membrane dialysis (12,000-14,000 Da), resulting in lyophilized ulvan (11g) with an approximate yield of 11.39%. Aqueous ulvan solutions (1 mg/mL) were prepared for experiments.

### **Experimental design**

Previously, all tomatoes underwent a surface decontamination process involving submersion in a 1% sodium hypochlorite (NaOCl) solution for 30 minutes, followed by a rinse in distilled water and subsequent air drying at room temperature.

The initial experimental design comprised samples of organic tomatoes (cv *Sweet Grape*) to which ulvan solutions were applied by injection or immersion (10  $\mu$ L,  $c = 1 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) and tomatoes (N=50) were treated by inclusion in ulvan solution (1 mg/mL) for 30 min or with the same injected solution (N=50, 10  $\mu$ L, 2 mm deep X 2 mm wide) and were observed for protection level (%) for 9 days. Controls were immersed in sterile distilled water for 30 min or inoculated (10  $\mu$ L of sterile water). Individuals (4) were randomly collected on days 1, 2, 3, 6 and 9 after the experiment, frozen with  $\text{N}_2$  and stored in a freezer at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  for later analyzes comprising the tomatoes protection index after 9 days of treatment as well the enzymatic-related defense activity (PAL, CAT and APX).

Following the assessment of the day displaying the highest enzymatic activity, tomatoes (N=40) were immersed in an ulvan solution with a concentration of 1 mg/mL for a duration of 30 minutes. Subsequently, they were inoculated with a 10  $\mu$ L volume of *B. cinerea* inoculum ( $5 \times 10^4$  conidia/mL), at two separate time points: 3 days and 6 days after the initial polysaccharide treatment. Also fruits were only treated with ulvan solution or inoculated with *B. cinerea* for comparative purposes. The evaluation of the protective effect (%) was conducted 15 days from the beginning of the experiment.

For the analysis of volatile organic compounds (VOCs), the tomatoes were divided into three groups (N = 56): The control group consisted of fruits immersed in distilled water for 30 minutes while a second group of fruits was treated with ulvan by immersing them in an aqueous ulvan solution at a concentration of 1 mg/mL. A third group of fruits was inoculated with *B. cinerea* at a concentration ( $5 \times 10^4$  conidia/mL). Randomly, four whole tomatoes were selected at each of the following time points: 1, 3, 6, 9, 12, 24, and 48 hours from the start of the experiment. These tomatoes were promptly frozen using liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the SPME fiber exposure phase.

### ***Minimum Inhibitory Concentration (MIC)***

The MIC of the ulvan solution was determined following CLSI's M38-A2 standard for filamentous fungi. Serial dilutions (1:2) of ulvan in RPMI medium produced a gradient (2500 µg/mL to 1.2 µg/mL) in a 96-well plate. *B. cinerea* conidia (5x10<sup>4</sup> conidia/mL) were inoculated (100 µL/well). After 4 days, wells were assessed for fungal growth.

### **Phenylalanine ammonia lyase (PAL), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activity**

#### ***Preparation of enzymatic extracts***

For PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase), the extraction protocol closely followed the method outlined by Modafar *et al.* (2012). Specifically, 100 mg of frozen fresh mass sample was ground and mixed with 5 mL of tris-HCl buffer (100mM, pH 8.5) and 5 mL of β-mercaptoethanol aqueous solution (14mM). The resulting mixture underwent centrifugation at 13,000 g, 4°C, for 30 minutes, and the supernatant was utilized as the enzyme extract.

The activity of CAT (Catalase) and APX (Ascorbate Peroxidase) enzymes was determined in accordance with the methodology described by Kang & Saltveit (2001).

For APX, 500 mg samples of fresh frozen mass were extracted and homogenized with 1 mL of an extraction buffer containing 50 mM potassium phosphate (pH 7.0), 1% Triton X-100, and 7 mM 2-mercaptoethanol, using a mixer (Turrax). This homogenate was subsequently centrifuged at 25,000 g and 4°C for 20 minutes, with the resulting supernatant serving as the crude extract for APX activity determination.

As for CAT, the crude extract was obtained from 500 mg of fresh frozen mass for each sample, which was extracted and ground with 4.5 mL of a Tris-HCl buffer solution (0.05 M, pH 7.5) supplemented with MgCl<sub>2</sub> (3 mM) and EDTA (1 mM). After homogenization, the mixture was centrifuged at 25,000 g and 4°C for 20 minutes, and the supernatant was used as the crude extract for enzyme activity assessment.

### **PAL, CAT and APX enzyme assay**

PAL Assay: enzymatic extracts (100  $\mu\text{L}$ ) were mixed with L-phenylalanine (200  $\mu\text{L}$ , 100mM) in tris-HCl buffer (100mM, pH 8.5) and incubated at 40°C for 1 hour. Reaction halted with HCl (5N, 200  $\mu\text{L}$ ). PAL activity determined by cinnamic acid production, quantified at 290 nm and expressed as nmol cinnamic acid/min<sup>-1</sup>/mg protein<sup>-1</sup>).

CAT Activity Assay: the mixture reaction comprised the diluted enzyme extract (1:5, 50  $\mu\text{L}$ ), phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%). CAT activity calculated from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (extinction coefficient 36 M<sup>-1</sup>/cm<sup>-1</sup>) at 240 nm, expressed as  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}^{-1}/\text{g protein}^{-1}$ .

APX Activity Assay: diluted enzyme extract (1:5, 50  $\mu\text{L}$ ), phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) containing EDTA (0,1 mM), ascorbate (0,5 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,54 mM). APX activity determined by measuring ascorbic acid (extinction coefficient 2.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) at 240 nm and expressed as  $\mu\text{mol ascorbic acid}/\text{min}^{-1}/\text{g protein}^{-1}$ .

All results were normalized to protein content.

### **HS-SPME**

#### **Extraction**

The HS-SPME procedure for tomato extracts followed the method described by Li *et al.* (2019). Frozen samples were allowed to thaw and were prepared in triplicate. The extraction process was as follows: a DVB/CAR/PDMS (50/30  $\mu\text{m}$ ) fiber was exposed to the headspace of 20 mL vials, which were sealed with silicone septa. These vials contained frozen tomato powder (4.5 g), along with n-octanol (8  $\mu\text{L}$ , 100 mg/L), and a saturated CaCl<sub>2</sub> solution (1.7 mL). The entire setup was then heated for 40 minutes at 50 °C. The contents of the fiber were immediately analyzed using GC/MS.

### **GC/MS conditions for VOCs analysis**

The GC/MS analysis protocol closely followed the methodology as previously described by Li *et al.* (2019). This analysis utilized a Shimadzu model QP2020 chromatograph equipped with a mass detector and a quadrupole analyzer, operating in the electronic ionization mode with an energy of 70 eV. The mass spectrometer was set to measure in the mass range of  $m/z$  60 to 600 Da.

Gas chromatography was conducted using an Agilent DB-5MS column (5% phenylmethylsilicone) with dimensions of 30m x 0.2 mm and a particle size of 0.25  $\mu\text{m}$ . Helium served as the carrier gas, flowing at a constant rate of 1 ml/min. The temperature program for the column started at 40 °C for 6 minutes, followed by a linear increase to 100 °C at a rate of 3 °C per minute, and eventually reaching 230 °C at a rate of 5 °C per minute.

Component identification was carried out by comparing the obtained mass spectra with the reference spectra from the NIST14 mass spectral library. The relative areas of the chromatographic peaks were normalized with respect to the area of the internal standard, n-octanol.

### **LC/MS analysis**

#### ***Extraction***

The extraction used for the analysis of secondary plant metabolism (LC/MS) was based on the methodology developed by Gomez-Romero *et al.* (2010). Samples of 500 mg of lyophilized tomato homogenate powder (N=4) between controls (bathed in distilled sterile water, for 30 min) and treated (bathed in aqueous ulvan solution - 1 mg/mL, 30 min) and in triplicate, were extracted with 5 mL of methanol in an ultrasonic bath for 30 minutes. After that, the samples were centrifuged (10,000 g, 10 min) and the supernatants reserved. The extraction process was repeated 2 more times with the same material and the three supernatants were combined respectively for each sample. Finally, the samples were filtered (22  $\mu\text{m}$ ) into amber vials and kept under

refrigeration until analyzed by LC/MS.

### ***Chromatographic conditions for LC/MS***

High-Performance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HPLC-ESIMS) analysis was conducted using an Agilent Infinity 1260 chromatograph connected to a MicroTOF Bruker mass spectrometer. HPLC analyses were carried out employing an ACE-3 C18 column (100 mm x 2.1 mm, 3.0  $\mu\text{m}$  particle size), with a methanol gradient in 0.1% aqueous formic acid, and UV detection at 280, 310, and 360 nm. The ESI-MS instrument parameters were configured for positive or negative ion mode, and spectra were acquired within a mass range of 100–1200 m/z. The optimal ESI-MS parameters included a capillary voltage of 5000 V, dry gas temperature of 200 °C, dry gas flow of 2.0 L/min, nebulizer pressure of 2.0 bar, and a spectrum rate of 1 Hz. The HPLC flow rate (0.3 mL/min) was delivered directly into the mass spectrometry detector.

Calibration was performed using a sodium formate cluster containing 5 mM sodium hydroxide and 0.2% aqueous formic acid–isopropanol (1:1, v/v). This was injected at the beginning of each run using a Cole Palmer syringe pump (Vernon Hills, IL, USA) connected directly to the interface. Spectra were calibrated prior to compound identification. The HPLC system utilized a mobile phase comprising deionized water with 0.5% acetic acid (A) and acetonitrile (B), at a flow rate of 1.8 mL/min. The gradient elution program was as follows: 0–2 minutes, 1–3% B; 2–15 minutes, 3–9% B; 15–32 minutes, 9–35% B; 32–39 minutes, 35–100% B. Subsequently, the B content was reduced to initial conditions, and the column was re-equilibrated for 6 minutes (total run time of 85 minutes). All operations were controlled by Data Analysis 3.4 software (Bruker Daltonics), which provided a list of possible elemental formulas using the Generate Molecular Formula Editor. Compound identification was based on UV spectra and fragmentation profiles, and measured masses were obtained with a resolution of 20,000 with a standard error less than 10 ppm.

## **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed for all experiments using the XLStat software (Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel, Addinsoft, Paris, France 2017), through ANOVA (confidence interval = 95%, tolerance = 0.05, Tukey's and Fisher's test). Heat maps were constructed using Orange: Data Mining Toolbox in Python software (Densar *et al.*, 2013). Principal Component Analysis (PCA) was carried out using five Principal Components (PCs), each assigned a weight of 1 for all variables and samples. The analysis included cross-validation with one sample per segment and was performed without rotation. The Unscrambler® X 10.2 software, developed by Camo Software in Norway, was utilized for the execution of the multivariate analyses.

## **Results**

### **MIC**

The polysaccharide ulvan did not exhibit any inhibitory effects on conidia germination at the concentrations tested.

### **Ulvan treatment by dipping is more effective than injection**

Based on our data, ulvan treatment displayed protective effects on tomatoes, mitigating both softening and fungal proliferation for up to nine days of observation, whether applied as a dipping solution (94%) or when injected directly into the fruits (92%) (Fig. 1; Table 1). In contrast, approximately 70% of the control samples treated with distilled water via injection developed rot within the same timeframe (Fig. 1; Table 1). Consequently, we opted to continue the experiments exclusively with dipping treatments for both ulvan-treated and control samples.

**Table 1.** Protection index (%) via injection or dip of control samples and ulvan-treated tomatoes

Treatment	Protection index (%)
Control – dipped in distilled H <sub>2</sub> O (30 min)	80
Control – injected with distilled H <sub>2</sub> O (10 $\mu$ L)	30
Ulvan – dipped (1mg/mL; 30 min)	94
Ulvan – injected (1mg/mL; 10 $\mu$ L)	92

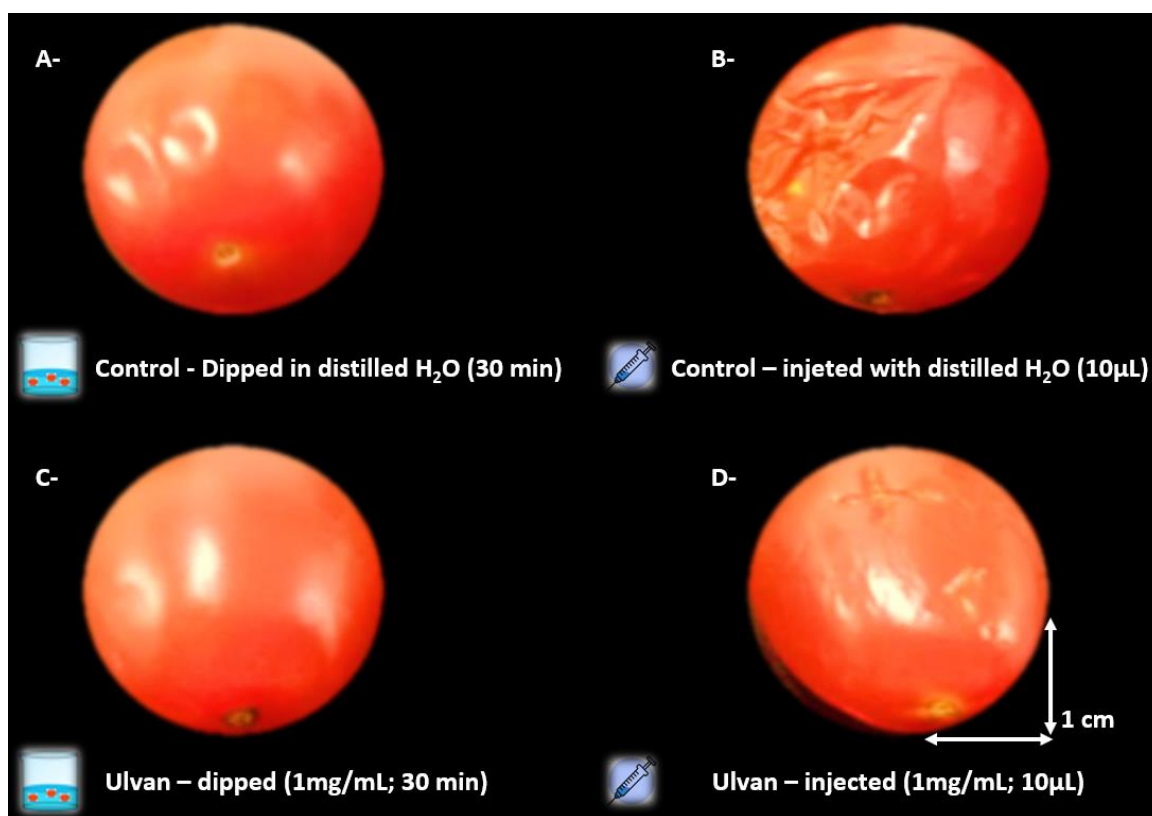
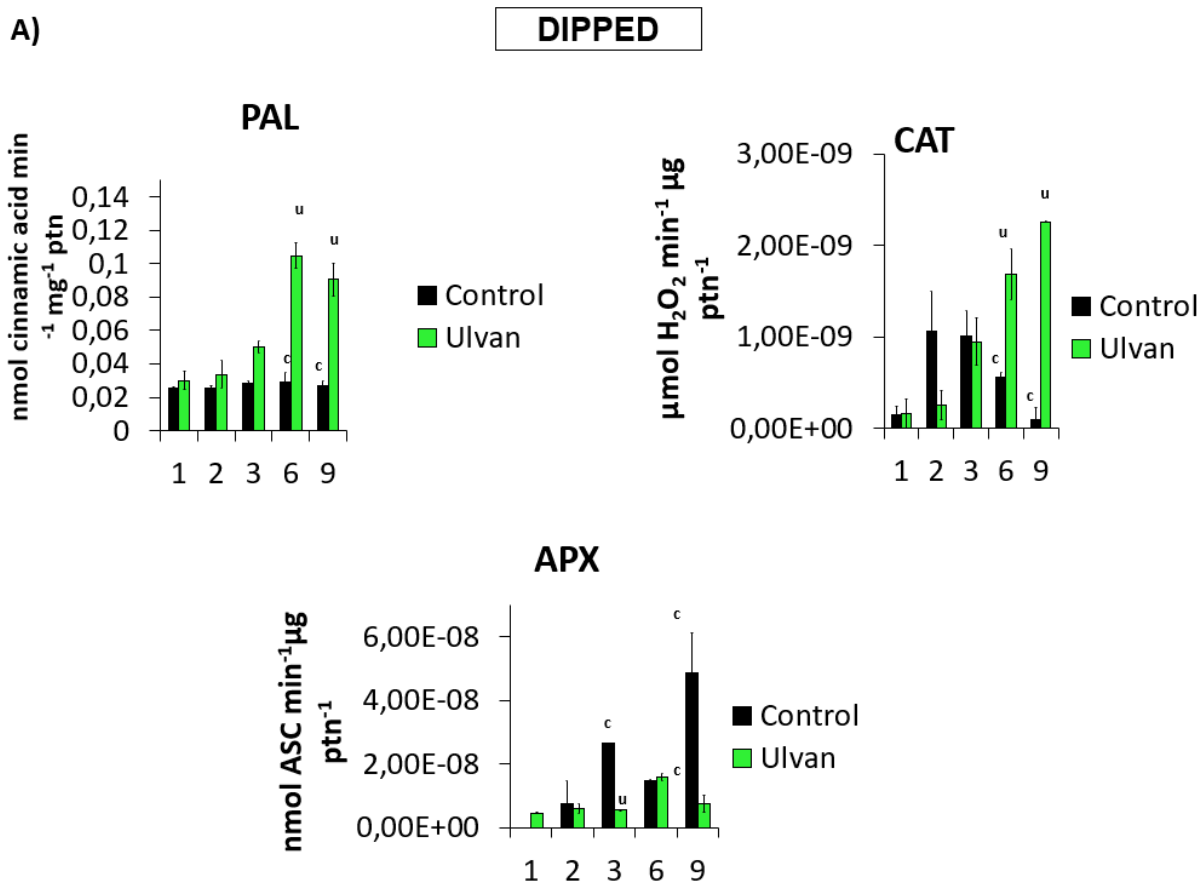


Fig.1. Comparison between control tomatoes (Groups A and B) and ulvan-treated tomatoes (Groups C and D) subjected to immersion or injection in sterile distilled water or ulvan solutions.



### Ulvan increases antioxidants enzymes activities

The ulvan treatment significantly enhanced the activity of PAL and CAT enzymes, particularly evident starting from the third day onwards for PAL and from the sixth day onwards for CAT since the beginning of the experiment. With respect to APX activity, it is determined by monitoring the absorbance of the solution at 290 nm as ascorbic acid (ASC) is oxidized. Consequently, the treatment with ulvan also led to increased activity of this enzyme in the fruits.



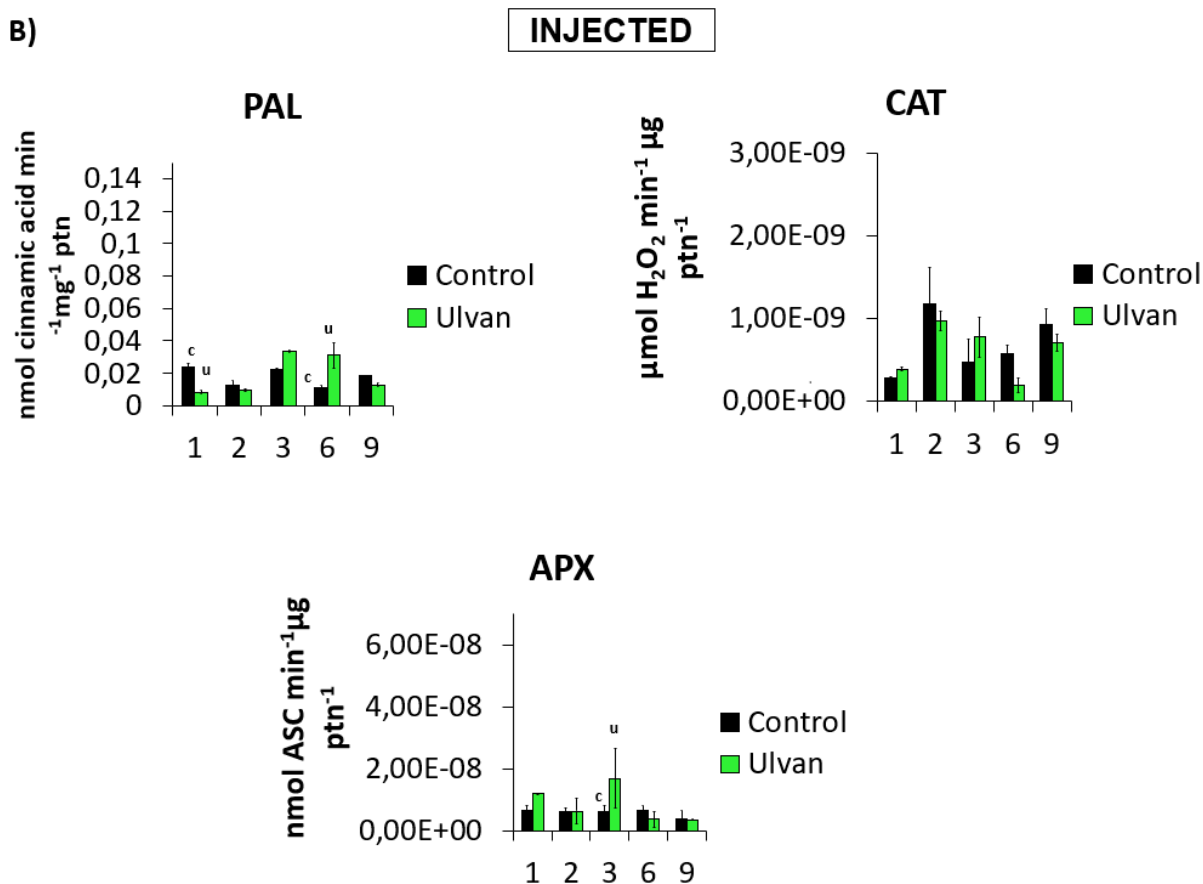
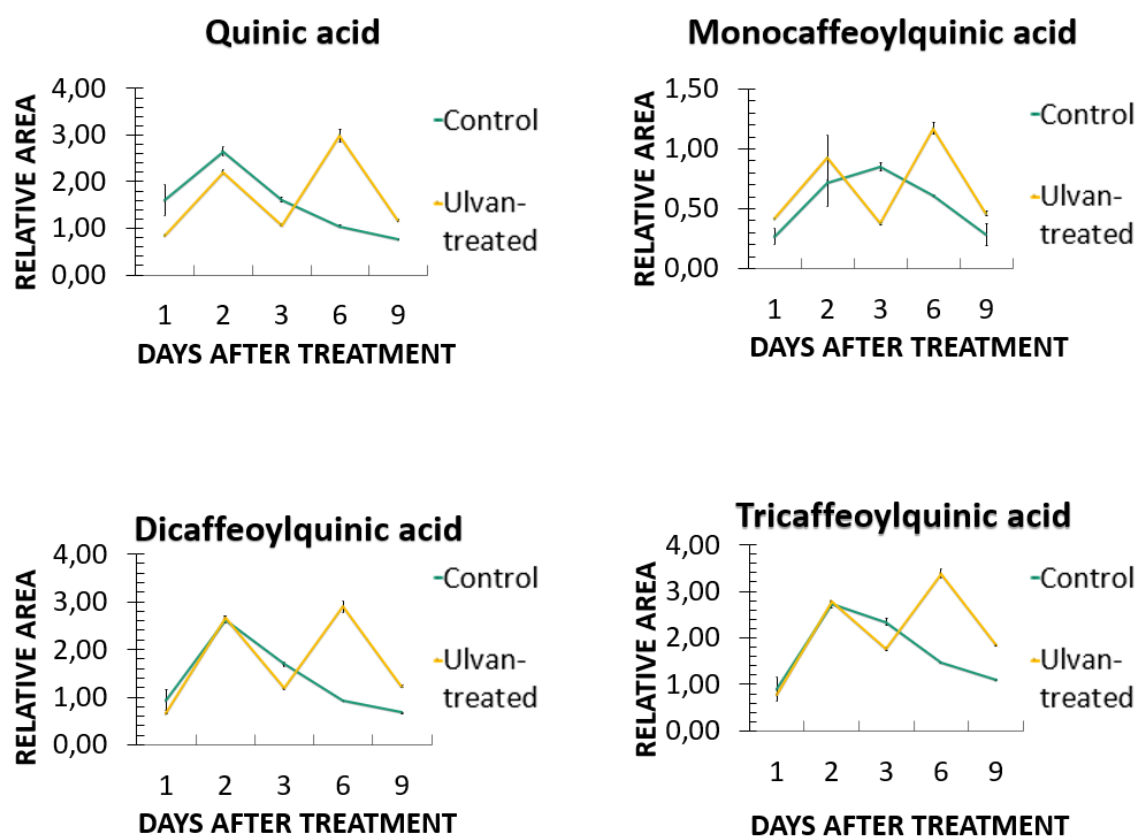


Fig. 2. Enzyme activities (PAL, CAT and APX) in tomato *Sweet Grape* – control (in black) and treated with ulvan solution (in green) (2A) dipped / 2B) injected) in 1, 2, 3, 6, and 9 days of observation. Letters C= control and U= ulvan-treated represent statistical significance  $\leq 0,05$ .

### Ulvan increases phenolic compounds and esculeoside A

The LC/MS analyses revealed a significant increase in flavonoid content in the observed fruit samples (Fig. 3) on the sixth- and ninth-days following treatment with ulvan, with the most pronounced increase occurring on the sixth day ( $p < 0.05$ ). The dataset used for the PCA biplot consisted of a 13x10 matrix, where the rows represented phenolic compounds and the columns represented analysis days, encompassing both control and ulvan-treated tomato samples. The Principal Component Analysis (PCA) results, as shown in Fig. 4, demonstrated that 76% of the total variability was explained by the first principal component (51%) and the second principal component (25%). Through PCA, it became evident that the increased phenolic activity observed on the sixth day post-treatment with the polysaccharide was

strongly correlated with the presence of monocaffeoylquinic, dicaffeoylquinic, and tricaffeoylquinic acids (Fig.4).



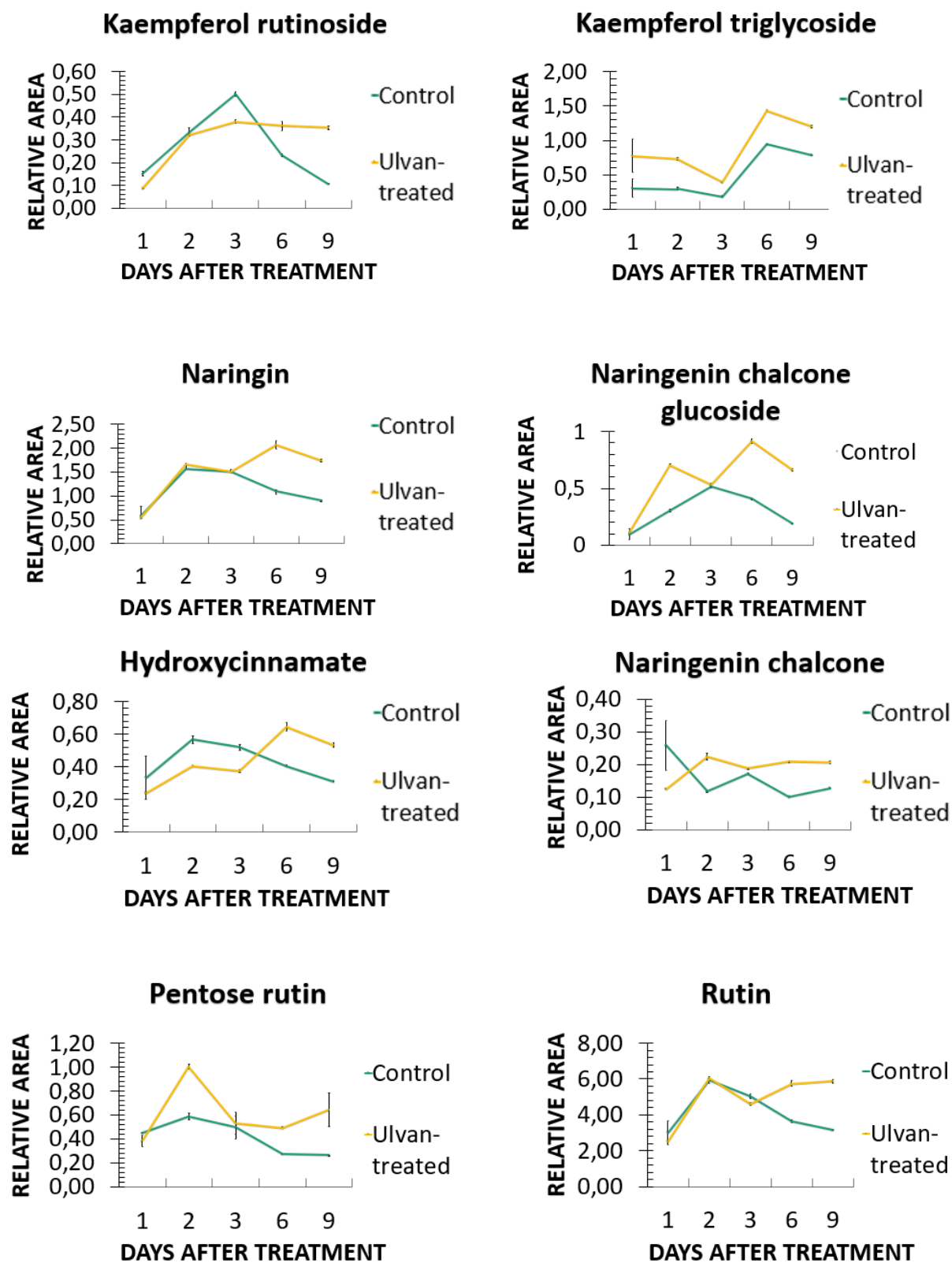


Fig. 3 Phenolic compounds in tomato *Sweet Grape* – control (in blue) and treated with ulvan solution (in yellow) in 1, 2, 3, 6, and 9 days of observation. Asterisks denote statistical differences ( $p < 0,05$ ).

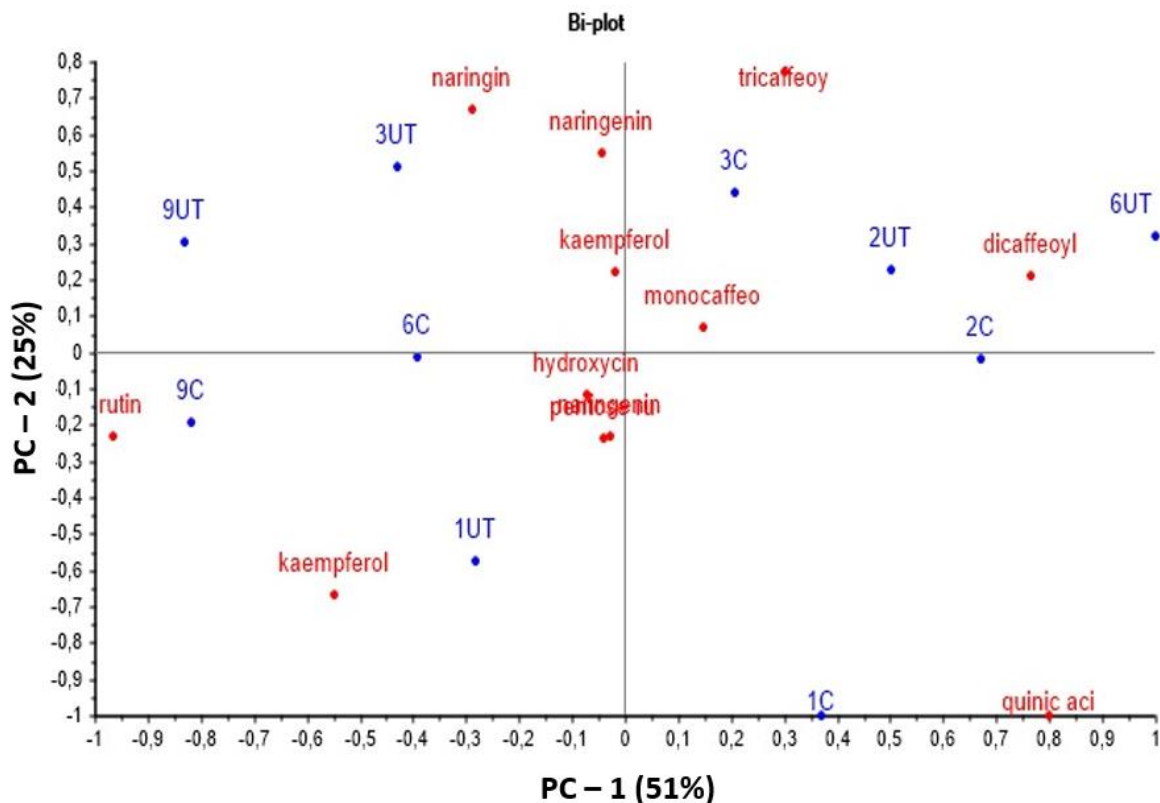


Fig. 4 Principal Component Analysis of phenolic compounds. C = control and UT = ulvan-treated tomatoes.

The levels of tomatine in both control samples and ulvan-treated fruits were significantly lower than those of esculeoside A, consistent with expectations based on the fruit's maturation stage (Fig.5). Nevertheless, on the sixth day, there was a notable increase in both tomatin and esculeoside A levels in ulvan-treated tomatoes. By the ninth day, the tomatin levels in both control samples and ulvan-treated samples had approached parity, while esculeoside A continued to exhibit a higher concentration in tomatoes treated with the polysaccharide than in control samples (Fig.5).

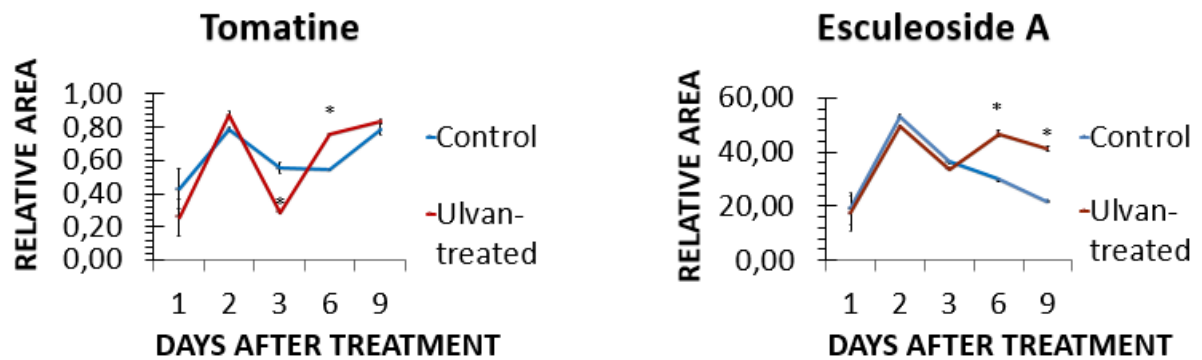


Fig. 5 Levels of tomatine and esculeoside A in control samples and ulvan-treated tomatoes were quantified. Asterisks denote statistical differences ( $p < 0,05$ ).

### Ulvan retards infection by *B. cinerea*

Photographs of the tomato plants were taken 15 days after the beginning of the experiment (Fig.6). These images were subsequently analyzed to determine the presence of visual symptoms, the progression of the disease, and the overall health status of the tomato plants within each experimental group. It is evident that tomatoes previously treated with ulvan and inoculated with *B. cinerea* six days later show a significantly lower pathogen dissemination rate (22.5%) compared to those solely inoculated with the phytopathogen (85%) within the same time frame (Fig.7). Surprisingly, in contrast, tomatoes treated with ulvan and inoculated three days after treatment displayed even worse pathogen dissemination (100%) than those solely inoculated (7.5%). The treatment with ulvan protected 100% of fruits in the period (Fig.7).

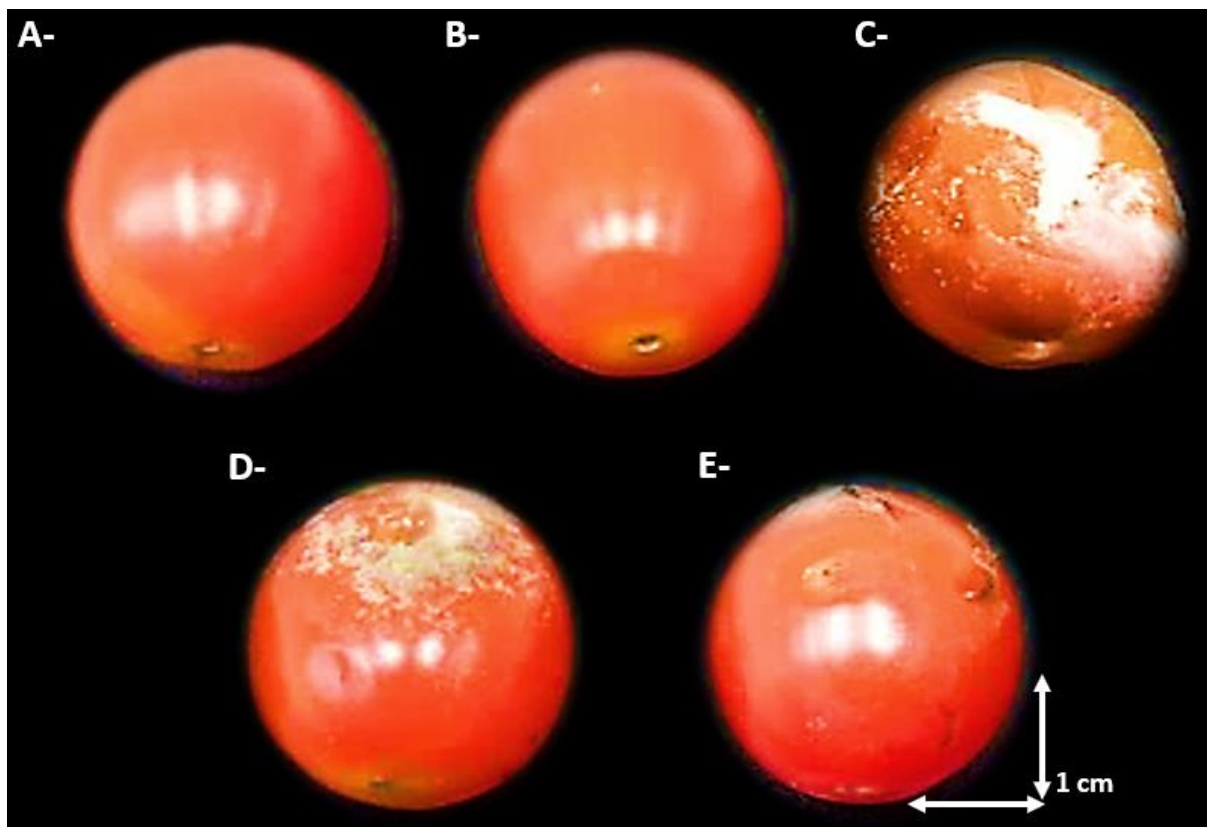


Fig. 6. Comparative study of control (A), ulvan-treated (B), control inoculated with *B. cinerea* (C), inoculated with *B. cinerea* 3 days after ulvan treatment (D), and inoculated with *B. cinerea* 6 days after ulvan treatment (E) tomato plants. Photographs were taken 15 days after the beginning of the experiment. N=40 for each experiment.

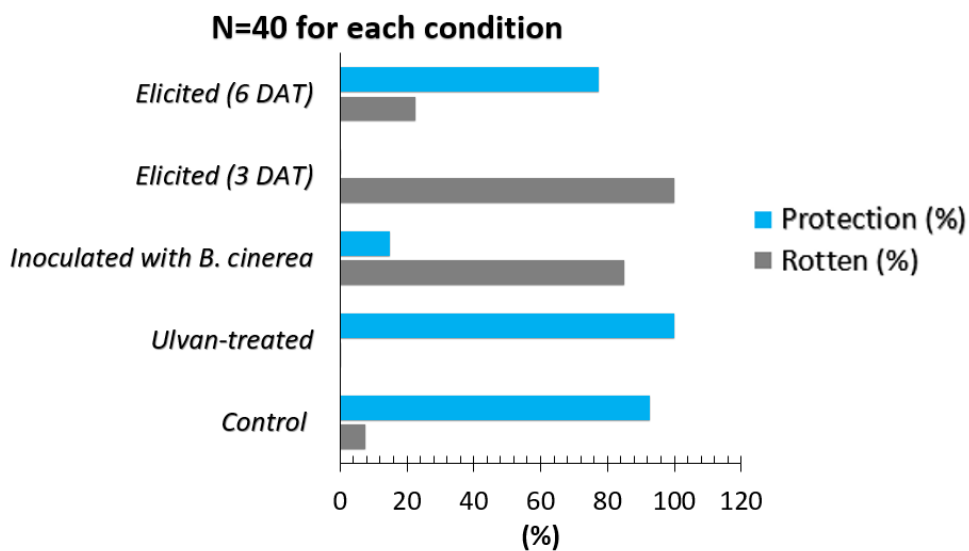
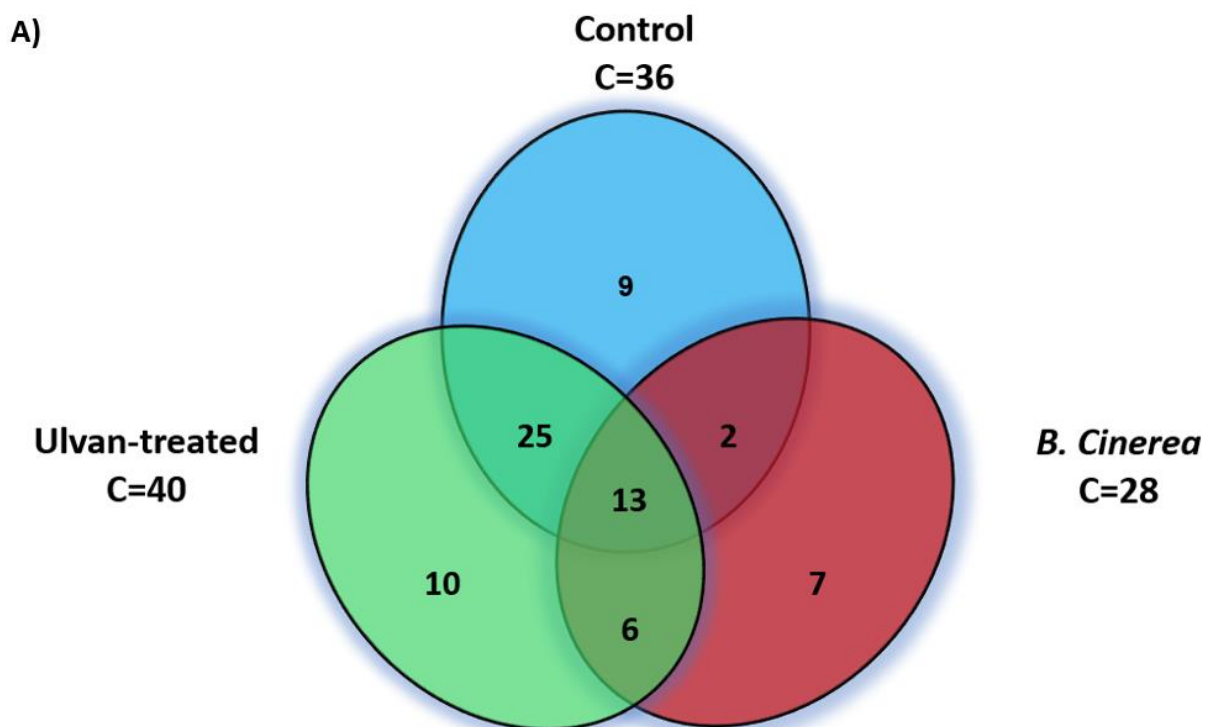


Fig. 7. Percentage (%) of protection or rotten tomatoes in the following conditions, upwards: control, ulvan-treated, control inoculated with *B. cinerea*, inoculated with *B. cinerea* 3 days after ulvan treatment, and inoculated with *B. cinerea* 6 days after ulvan treatment.

36 VOCs were counted in control samples, 40 in ulvan-treated and 28 in *B. cinerea* inoculated fruits. (Table S1, Supplementary Material). Both control and ulvan-treated tomatoes samples shared 24 compounds (Fig. 8A). 12 compounds were detected only in control samples, 16 compounds only in ulvan-treated tomatoes and 7 only in the inoculated ones (Fig. 8A).

The heat map (Fig. 8B) highlights the variation in the levels of pentenal, heptanal, ethyl acetate, 1-pentanol, 1-hexanol, phenylethyl alcohol, 1-penten-3-one, sulcatone, 2-methoxy-2-methyl-propane, hexane, and 2-ethyl-furan. The major volatiles detected were hexanal and 2-hexenal (Fig. 8C).





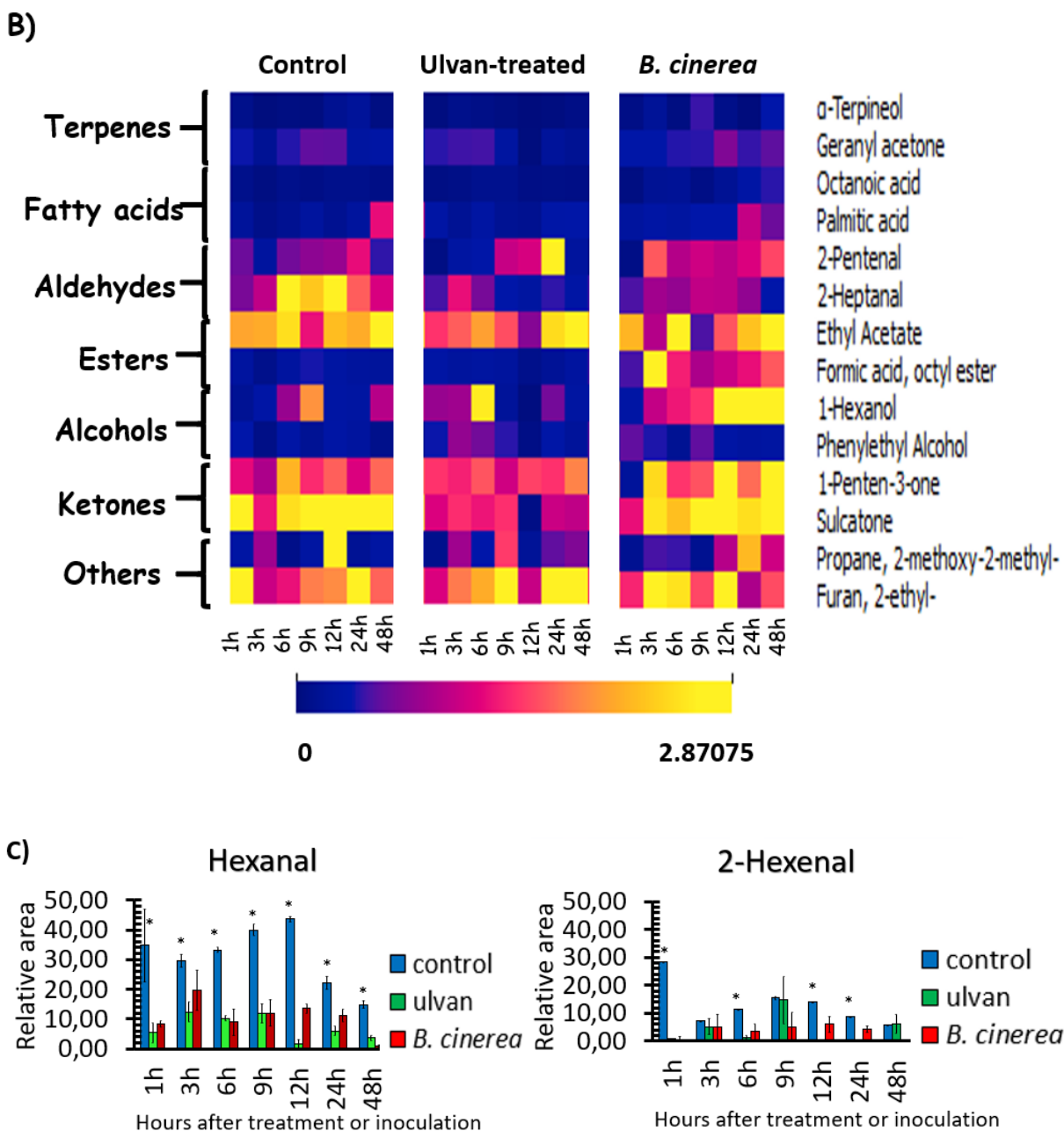


Fig. 8. A) Volatile organic compounds in tomato *Sweet Grape* – control (in blue), treated with ulvan solution (in green) and inoculated with *B. cinerea* (in red) after 1, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 hours of treatment, as well compounds emitted by both samples. B) *Sweet Grape* tomatoes volatile compounds found in control and ulvan treated samples after 1, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 hours after treatment. C) Emission levels of hexanal and 2-hexenal. Asterisks denote statistical differences ( $p < 0,05$ ).

## Discussion

Based on our results, ulvan aqueous solution (1 mg/mL) has the capacity to enhance the activity of PAL, CAT, and APX enzymes, with the sixth day emerging as a critical time point for this increased activity. Our findings align with those of El Modafar *et al.* (2012), who observed an increase in the pivotal enzyme PAL, likely due to the salicylic acid signaling pathway in tomato plants through the injection of ulvan (3 mg/mL). It was discovered that oligoulvans activate various enzyme activities, such as catalase, superoxide dismutase, peroxidase, polyphenol oxidase, and PAL, while also increasing lignin and phenolic compound levels. In tomato plants, the use of oligoulvans reduced *Fusarium oxysporum*-induced wilting, and this resistance was linked to increased PAL activity and the accumulation of salicylic acid and phenolic compounds (Siah *et al.*, 2018). Nonetheless, we did not observe a rise in ascorbic acid levels, an antioxidant, in ulvan-treated tomatoes.

Ulvan, at a concentration of 1 mg/mL, also increased the activity of CAT, SOD, CHI, and ROS enzymes in grapes, but there was no significant PAL activity (Shomron *et al.*, 2022). Ulvan and oligoulvans, at a concentration of 5 mg/mL, triggered the rapid and transient accumulation of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the activation of antioxidant-related enzymes, including catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). These algal saccharides also increased the activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD), and polyphenol oxidase (PPO), along with elevated levels of lignin and phenolic compounds, all derived from the phenylpropanoid pathway. Among the various defense-related parameters assessed, oligoulvans exhibited greater effectiveness than ulvan. The results underscore the effectiveness of oligosaccharides with a low degree of polymerization (DP) in initiating the activation of defense-related enzymes and metabolites (Abouraïcha *et al.*, 2015). Hence, the effectiveness of this polysaccharide as a plant defense stimulator varies depending on the species and dosage. Moreover, whether the fruit is treated pre-harvest or post-harvest seems to impact ulvan's activity. Furthermore, our results suggest that ulvan not only influences the lipoxygenase pathway due to increased enzyme activity but also fortifies the plant cell wall, making it more resilient. Such findings are based on

the high PAL activity in treated fruits.

In addition, recently it was observed in wheat that ulvan spraying elicits, but does not prime, pathogenesis-related proteins (e.g.  $\beta$ -1,3-endoglucanase and chitinase), reactive oxygen species metabolism (e.g. oxalate oxidase), and also the octadecanoid pathway (e.g. lipoxygenase and allene oxide synthase), but no gene markers of the phenylpropanoid pathway (e.g. phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase) (de Borba et al., 2021). Thus, it is possible that ulvan may act in more than one signaling pathway, result in multiple responses, be dependent of plant genotype and fungal species involved (Stadnik and Freitas, 2014). In this context, ulvans can act as an inducer of plant defenses through priming in monocots (Paulert et al., 2010) and as an elicitor of defense responses in dicots plants (Cluzet et al., 2004) even currently their molecular structure-function relationships nor their cellular modes of action are known (Paulert et al., 2021). Nevertheless, there are reports whose authors observed that ulvan acts through the jasmonic acid pathway (JA) in common bean, grapevine and cucumber plants (Jaulneau et al., 2011) while the expression of PR-1 which is a known marker for salicylic acid pathway (SA) has been observed in *Medicago truncatula* (Cluzet et al., 2004).

Hexanal and 2-hexenal were the major volatile compounds detected in the HS-SPME assays for control, ulvan-treated and inoculated fruits with *B. cinerea*. However, the relative area of these VOCs is much larger in controls than in inoculated and treated ones. In fact, the areas of all VOCs in tomatoes treated with ulvan are much smaller compared to the other two conditions tested. It is therefore suggested that ulvan suppresses the emission of VOCs in tomato fruits. C18 fatty acids like linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids are responsible for generating C6 aldehydes such as hexanal, cis-3-hexenal, trans-2-hexenal, 1-hexanol, and the C5 volatile compound 1-penten-3-one through lipid degradation. This process is catalyzed by enzymes like lipoxygenase and 13-hydroperoxide lyase (as described by Distefano et al., 2022). When we compared the levels of hexanal and 2-hexenal in treated tomatoes to the control group, it suggested that ulvan treatment might have inhibited these enzymes. Geranylacetone and sulcatone possess leafy and citrusy aromatic qualities. Sulcatone is also associated with the sweet, fruity taste found in many fruits, as mentioned in

Zhou *et al.* (2022). Typically, commercially available tomatoes contain lower levels of volatile organic compounds (VOCs) like these, partly because genetic mutations that extend shelf life tend to result in lower levels of such volatiles (Tieman *et al.*, 2017). Geranylacetone results from the oxidative breakdown of carotenoids such as phytoene, phytofluene,  $\delta$ -carotene, and neurosporene, which are present in only small amounts in ripe tomatoes. Conversely, sulcatone (5-hepten-2-one, 6-methyl) is a byproduct of the oxidative breakdown of lycopene, the dominant carotenoid in ripe tomatoes (as explained by Paparella *et al.*, 2021). Since these VOCs are volatile apocarotenoids, their concentrations are linked to the levels of their carotenoid precursors (as noted in Vogel *et al.*, 2010). Our VOC experiments concluded within the first 48 hours after ulvan treatment, during which we observed lower levels of these precursor carotenoids in comparison to control samples. Consequently, the VOC levels in ulvan-treated tomatoes were also lower (see Fig. 3B). In contrast, the level of 2-ethyl furan increased with ulvan treatment. Furan derivatives in foods can potentially originate from ascorbic acid and related compounds, Maillard-type reactions involving amino acids and reducing sugars, the oxidation of unsaturated fatty acids, or even carotenoids, as suggested by Vranová and Ciesarová (2009) and Gül Akıllıoğlu *et al.* (2015).

## Conclusion

Our study demonstrates the significant impact of ulvan on the activities of defense-related enzymes, mainly CAT, PAL and APX, and volatile compounds in tomatoes. Multivariate analysis (PCA) of the LC/MS data for phenolics suggests that ulvan treatment positively affected the production of phenolic compounds, mainly concerning caffeoylquinic acids and thus, probably lignin. The enhancement of phenolic compounds may be explained by the high PAL activity. In fact, the likely increase in lignin production may be one of the keys to understanding how ulvan acts in defense against *B. cinerea*, delaying its colonization in the fruit. Undoubtedly, the sixth day after treatment is a key and notable day for the increase in enzymatic activity, phenolic

compounds and even glycoalkaloids such as esculeoside A. Regarding the increase in esculeoside A levels, despite steroidal glycoalkaloids being related to plant defense, this mechanism is still poorly elucidated, but this substance may play a role in the defense of the fruit, a fact supported by other findings in the literature about this molecule. Furthermore, the inhibition of enzymes involved in lipid degradation, which leads to the formation of volatile aldehydes such as hexanal and 2-hexenal, suggests a potential mechanism through which ulvan influences the composition of volatile compounds in tomatoes. Ulvan's influence on the modulation of carotenoid precursors, such as geranylacetone and sulcatone, contributes to understanding the changes in the aroma and flavor profiles of ulvan-treated tomatoes.

Additionally, the observed suppression of volatile organic compound (VOC) emissions in ulvan-treated tomatoes and the potential impact on carotenoid precursor levels in these tomatoes offer valuable insights. These results open new perspectives for post-harvest and food production strategies aimed at enhancing both sensory and nutritional profiles. Further research is needed to comprehensively understand the underlying mechanisms of these modifications and optimize ulvan application conditions to maximize its benefits in the food industry.

Our findings indicate that ulvan may play a role in multiple signaling pathways, leading to varied responses depending on the plant species and the fungal species involved. However, the specific molecular structure-function relationships and cellular modes of action of ulvan remain to be fully elucidated.

## **Acknowledgements**

The authors thank the Brazilian funding agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We also would like to thank the technicians Gisele Oliveira and Ari Miranda.

**Declarations**

This article does not contain any study with human participants or animals performed by the authors.

**Competing interests**

The authors declare no competing interests.

## Supplementary material

### **Ulvan polysaccharide enhances enzyme-related defense activity and modulates VOCs emission and secondary metabolism profile of postharvest *Solanum lycopersicum* cv *Sweet Grape***

**Dora dos S. Costa**<sup>1</sup>, Samara L. da Silva<sup>2</sup>, Tiphane A. Figueira<sup>3</sup>, Daniel Luiz Reis Simas<sup>5</sup> ; Daniela S. A. Moreno<sup>4</sup>, Celuta S. Alviano<sup>4</sup>, Antonio J. R. da Silva<sup>2</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Plant Biotechnology and Bioprocesses, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratory of Structures of Surface of Microorganisms, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>c</sup>Phytochemical Analysis Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>d</sup>Postgraduate Program in Environmental Engineering, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>5</sup>Bio Assets Biotecnologia.

\* Corresponding authors. *E-mail address*: dora.cost@hotmail.com

**Table S1.** Volatile organic compounds in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution after 1, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 hours of treatment.

Control Compound	Days after treatment																		
	1h		3h		6h		9h		12h		24h		48h						
	Relative area																		
Propane, methoxy-2-methyl-n-Hexane	2-	0,07	± 0,01	0,20	± 0,16	0,02	± 0,02	0,06	± 0,06	0,83	± 1,36	0,04	± 0,04	0,06	± 0,05				
Ethyl Acetate		0,07	± 0,04	0,05	± 0,03	0,03	± 0,03	0,06	± 0,02	0,05	± 0,07	0,08	± 0,06	0,14	± 0,12				
Butanal, hydroxy-1-Penten-3-one	3-	0,49	± 0,32	0,50	± 0,60	0,60	± 0,66	0,31	± 0,20	0,54	± 0,38	0,51	± 0,38	1,04	± 1,60				
Furan, 2-ethyl-1-Butanol, methyl-2-Butenal, methyl-2-Pentenal		0,02	± 0,02	0,09	± 0,08	0,09	± 0,06	0,40	± 0,54	0,10	± 0,07	0,44	± 0,53	0,62	± 0,64				
1-Pentanol		0,30	± 0,05	0,22	± 0,14	0,52	± 0,39	0,34	± 0,04	0,40	± 0,14	0,28	± 0,18	0,41	± 0,20				
Hexanal		0,65	± 0,19	0,26	± 0,12	0,31	± 0,07	0,44	± 0,26	0,46	± 0,31	1,22	± 0,97	0,40	± 0,31				
2-Hexenal	3-	0,73	± 0,22	0,50	± 0,13	0,86	± 0,06	1,14	± 0,28	0,47	± 0,01	2,20	± 0,31	1,96	± 0,33				
1-Hexanol		1,08	± 0,01	0,08	± 0,01	0,26	± 0,05	0,25	± 0,02	0,16	± 0,05	0,39	± 0,32	0,12	± 0,05				
2-Heptanal	2-	0,14	± 0,04	0,05	± 7,04	0,15	± 0,02	0,18	± 0,03	0,19	± 0,04	0,30	± 0,02	0,10	± 0,07				
1-Octen-3-one		0,18	± 2,82	12,30	± 2,71	0,27	± 2,88	0,24	± 5,64	0,14	± 3,08	0,09	± 3,83	0,17	± 1,65				
5-Hepten-2-one, 6-methyl-		34,74	± 12,31	29,48	± 2,09	33,28	± 0,79	39,98	± 2,01	43,5	± 0,85	22,20	± 2,02	14,85	± 1,32				
		28,46	± 0,01	7,41	± 0,07	11,36	± 0,24	15,44	± 0,66	14,0	± 0,02	8,71	± 0,03	5,64	± 0,14				
		0,03	± 0,02	0,07	± 0,10	0,19	± 0,12	0,47	± 0,13	0,07	± 0,04	0,06	± 0,05	0,23	± 0,05				
		0,15	± 0,02	0,24	± 0,00	0,68	± 0,21	0,55	± 0,26	0,94	± 0,01	0,40	± 0,01	0,28	± 0,01				
		0,05	± 0,15	0,01	± 0,07	0,41	± 0,19	0,49	± 0,31	0,07	± 0,04	0,04	± 0,11	0,04	± 0,09				
		1,02	± 0,01	0,31	± 0,04	0,60	± 0,03	0,86	± 0,03	0,83	± 0,01	0,89	± 0,02	0,64	± 0,05				



2,4-Heptadienal	0,07	±	0,03	0,05	±	0,13	0,05	±	0,02	0,05	±	0,08	0,09	±	0,11	0,04	±	0,07	0,05	±	0,06
2-Octenal	0,09	±	0,39	0,12	±	0,82	0,09	±	0,48	0,11	±	0,47	0,14	±	0,20	0,14	±	0,13	0,11	±	0,54
Nonanal	0,03	±	0,02	0,02	±	0,02	0,02	±	0,01	0,03	±	0,03	0,03	±	0,01	0,03	±	0,01	0,02	±	0,01
Phenylethyl Alcohol	0,08	±	0,04	0,02	±	0,03	0,07	±	0,04	0,04	±	0,09	0,07	±	0,04	0,05	±	0,02	0,02	±	0,03
Formic acid, octyl ester	0,06	±	0,02	0,02	±	0,01	0,06	±	0,01	0,09	±	0,01	0,06	±	0,01	0,05	±	0,00	0,05	±	0,00
Benzyl nitrile	0,02	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,02
1-Nonanol	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,01
Octanoic acid	0,02	±	0,02	0,01	±	0,00	0,02	±	0,00	0,01	±	0,00	0,02	±	0,02	0,02	±	0,04	0,01	±	0,01
α-Terpineol	0,02	±	0,00	0,00	±	0,01	0,01	±	0,01	0,01	±	0,01	0,03	±	0,00	0,04	±	0,00	0,01	±	0,00
Decanal	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,10	0,00	±	0,46
2-Propenoic acid, 6-methylheptyl ester	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,01	0,01	±	0,00	0,06	±	0,01	0,27	±	0,04
2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-	0,01	±	0,01	0,00	±	0,01	0,01	±	0,01	0,01	±	0,04	0,01	±	0,03	0,02	±	0,02	0,04	±	0,04
2,4-Decadienal	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,03	±	0,00	0,04	±	0,00	0,04	±	0,00	0,05	±	0,01	0,04	±	0,00
2-Buten-1-one, 1-(2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadien-1-yl)-	0,01	±	0,07	0,00	±	0,05	0,01	±	0,08	0,01	±	0,12	0,01	±	0,06	0,01	±	0,01	0,00	±	0,05
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	0,09	±	0,01	0,03	±	0,00	0,10	±	0,02	0,13	±	0,01	0,13	±	0,01	0,06	±	0,01	0,07	±	0,01
Trans-β-Ionone	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,01
Naphthalene, 1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,02	±	0,01	0,02	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00

Tetradecanoic acid	0,01	±	0,01	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,07	±	0,10
Octanoic acid, octyl ester	0,03	±	0,03	0,02	±	0,03	0,09	±	0,11	0,07	±	0,05	0,05	±	0,02	0,03	±	0,01	0,02	±	0,01
Palmitoleic acid	0,01	±	0,01	0,06	±	0,03	0,00	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,02	±	0,01
Palmitic acid	0,046	±	0,06	0,019	±	0,02	0,031	±		0,054	±	0,02	0,03	±	0,02	0,051	±	0,03	0,301	±	0,32

Compound	Ulvan-treated																				
	Days after treatment																				
	1h	3h		6h		9h		12h		24h		48h									
Relative área																					
Propane, 2-methoxy-2-methyl-n-Hexane	0,022	±	0,01	0,200	±	0,31	0,085	±	0,04	0,357	±	0,29	0,041	±	0,05	0,132	±	0,14	0,163	±	0,19
Ethyl Acetate	0,347	±	0,30	0,398	±	0,18	0,487	±	0,50	0,380	±	0,04	0,167	±	0,08	0,594	±	0,75	0,682	±	0,84
1-Penten-3-one	0,349	±	0,18	0,326	±	0,08	0,388	±	0,15	0,264	±	0,22	0,364	±	0,07	0,346	±	0,21	0,446	±	0,42
Furan, 2-ethyl-	0,278	±	0,02	0,433	±	0,28	0,507	±	0,13	0,875	±	0,29	0,251	±	0,23	0,687	±	0,49	0,709	±	0,55
Pentanal	0,106	±	0,05	0,103	±	0,05	0,238	±	0,10	0,516	±	0,54	0,077	±	0,06	0,413	±	0,47	0,189	±	0,22

2-Propanone, 1-hydroxy-	0,120	±	0,16	0,086	±	0,01	0,174	±	0,11	0,205	±	0,16	0,999	±	1,37	0,297	±	0,24	0,172	±	0,20
1-Butanol, 2- methyl-, (S)-	0,063	±	0,03	0,152	±	0,06	0,341	±	0,31	0,464	±	0,45	4,906	±	6,74	0,408	±	0,28	0,260	±	0,22
2-Pentenal	0,012	±	0,00	0,061	±	0,08	0,076	±	0,05	0,252	±	0,21	0,273	±	0,46	1,365	±	2,17	0,052	±	0,04
1-Pentanol	2,844	±	4,79	0,046	±	0,02	0,009	±	0,01	0,106	±	0,15	0,053	±	0,08	0,085	±	0,13	0,099	±	0,13
Toluene	0,051	±	0,05	0,047	±	0,02	3,283	±	5,67	0,032	±	0,03	0,154	±	0,27	1,829	±	2,96	0,088	±	0,14
Hexanal	5,448	±	3,31	12,428	±	3,31	10,174	±	0,92	11,838	±	3,12	1,651	±	1,34	6,024	±	1,55	3,690	±	0,92
2-Hexenal	0,866	±	0,22	5,210	±	2,77	1,449	±	0,68	14,727	±	8,42	0,279	±	0,10	0,338	±	0,10	6,204	±	3,44
1-Hexanol	0,188	±	0,10	0,199	±	0,17	0,622	±	0,91	0,043	±	0,01	0,005	±	0,00	0,151	±	0,23	0,060	±	0,06
1-Butanol, 3- methyl-, acetate	0,058	±	0,04	0,144	±	0,17	0,066	±	0,11	0,041	±	0,03	0,001	±	0,00	0,057	±	0,07	0,016	±	0,01
2,4-Hexadienal	0,128	±	0,16	1,526	±	2,00	0,250	±	0,07	4,068	±	6,66	0,065	±	0,07	0,103	±	0,09	0,067	±	0,01
2-Heptenal, (Z)-	0,116	±	0,12	0,303	±	0,25	0,153	±	0,18	0,081	±	0,05	0,059	±	0,07	0,103	±	0,12	0,068	±	0,04
5-Hepten-2- one, 6-methyl-	0,281	±	0,24	0,340	±	0,15	0,312	±	0,32	0,344	±	0,10	0,013	±	0,02	0,257	±	0,33	0,241	±	0,09

Furan, 2- pentyl-	0,203	±	0,27	0,142	±	0,07	0,252	±	0,34	0,204	±	0,14	0,006	±	0,01	0,074	±	0,06	0,157	±	0,14
5-Hepten-2-ol, 6-methyl-	0,103	±	0,05	0,114	±	0,07	0,082	±	0,06	0,119	±	0,09	0,006	±	0,01	0,075	±	0,06	0,043	±	0,06
3-Hexenoic acid	0,011	±	0,01	0,030	±	0,03	0,091	±	0,12	0,051	±	0,04	0,014	±	0,02	0,099	±	0,11	0,013	±	0,02
1-Octen-3-one	0,012	±	0,01	0,025	±	0,02	0,046	±	0,04	0,024	±	0,02	0,013	±	0,02	0,010	±	0,01	0,009	±	0,00
2-Octenal	0,132	±	0,11	0,041	±	0,02	0,091	±	0,10	0,080	±	0,04	0,024	±	0,04	0,082	±	0,10	0,120	±	0,10
Linalool	0,046	±	0,05	0,103	±	0,11	0,073	±	0,01	0,023	±	0,02	0,004	±	0,01	0,024	±	0,00	0,065	±	0,06
Nonanal	0,032	±	0,02	0,035	±	0,02	0,029	±	0,02	0,020	±	0,00	0,000	±	0,00	0,013	±	0,02	0,039	±	0,05
Phenylethyl Alcohol	0,090	±	0,09	0,183	±	0,07	0,147	±	0,10	0,100	±	0,10	0,012	±	0,02	0,073	±	0,03	0,047	±	0,01
Formic acid, octyl ester	0,068	±	0,03	0,051	±	0,03	0,059	±	0,03	0,050	±	0,04	0,020	±	0,02	0,037	±	0,03	0,057	±	0,02
Benzyl nitrile	0,025	±	0,00	0,023	±	0,01	0,018	±	0,01	0,050	±	0,03	0,014	±	0,02	0,016	±	0,00	0,013	±	0,00
Octanoic acid	0,012	±	0,00	0,016	±	0,00	0,026	±	0,01	0,025	±	0,02	0,013	±	0,02	0,017	±	0,01	0,013	±	0,00
1-Nonanol	0,005	±	0,01	0,004	±	0,00	0,001	±	0,00	0,002	±	0,00	0,000	±	0,00	0,000	±	0,00	0,004	±	0,01
α-Terpineol	0,007	±	0,01	0,021	±	0,01	0,017	±	0,01	0,008	±	0,01	0,002	±	0,00	0,005	±	0,00	0,015	±	0,01

Decanal	0,010	±	0,00	0,010	±	0,01	0,008	±	0,00	0,003	±	0,00	0,000	±	0,00	0,002	±	0,00	0,004	±	0,00
2,4-Decadienal	0,047	±	0,03	0,020	±	0,01	0,035	±	0,02	0,025	±	0,01	0,003	±	0,01	0,014	±	0,02	0,031	±	0,02
Benzene, (2-nitroethyl)-	0,025	±	0,01	0,024	±	0,00	0,014	±	0,01	0,014	±	0,01	0,001	±	0,00	0,003	±	0,01	0,006	±	0,00
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	0,101	±	0,06	0,110	±	0,10	0,113	±	0,10	0,059	±	0,03	0,004	±	0,00	0,045	±	0,06	0,033	±	0,01
3-Buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-	0,008	±	0,00	0,010	±	0,00	0,001	±	0,00	0,001	±	0,00	0,000	±	0,00	0,006	±	0,01	0,003	±	0,01
Pentadecane	0,005	±	0,00	0,005	±	0,00	0,009	±	0,01	0,003	±	0,00	0,003	±	0,00	0,008	±	0,01	0,003	±	0,00
Hexanoic acid, octyl ester	0,006	±	0,00	0,007	±	0,01	0,005	±	0,00	0,006	±	0,01	0,003	±	0,00	0,003	±	0,00	0,004	±	0,00

---

4-Pentenoic acid, 2-methyl-, octyl ester	0,004	±	0,00	0,007	±	0,01	0,005	±	0,00	0,006	±	0,01	0,001	±	0,00	0,002	±	0,00	0,004	±	0,00
Tetradecanoic acid	0,008	±	0,01	0,001	±	0,00	0,002	±	0,00	0,002	±	0,00	0,001	±	0,00	0,005	±	0,00	0,010	±	0,01
Octanoic acid, octyl ester	0,048	±	0,03	0,040	±	0,01	0,020	±	0,01	0,021	±	0,01	0,005	±	0,00	0,013	±	0,01	0,022	±	0,01
Palmitic acid	0,067	±	0,03	0,035	±	0,02	0,063	±	0,02	0,033	±	0,05	0,029	±	0,03	0,073	±	0,06	0,076	±	0,07

---

Compound	Ulvan-treated																	
	Days after treatment																	
	1h		3h		6h		9h		12h		24h		48h					
Relative area																		
<b>Propane, 2-methoxy-2-methyl-</b>	0,031	± 0,00	0,114	± 0,16	0,108	± 0,16	0,029	± 0,04	0,228	± 0,21	0,530	± 0,88	0,261	± 0,15				
<b>Ethyl Acetate</b>	0,521	± 0,34	0,227	± 0,05	1,232	± 1,07	0,119	± 0,06	0,387	± 0,34	0,544	± 0,41	0,905	± 0,96				
<b>Cyclopentane, methyl-</b>	0,118	± 0,08	0,335	± 0,38	0,458	± 0,37	0,418	± 0,52	0,555	± 0,66	0,216	± 0,29	0,344	± 0,31				
<b>1-Penten-3-one</b>	0,046	± 0,01	0,589	± 0,42	0,351	± 0,04	0,385	± 0,20	0,793	± 0,50	0,416	± 0,24	0,877	± 0,99				
<b>Furan, 2-ethyl-</b>	0,332	± 0,04	0,697	± 0,56	0,607	± 0,36	0,373	± 0,17	0,664	± 0,16	0,216	± 0,21	0,379	± 0,39				
<b>Formic acid</b>	0,114	± 0,10	0,808	± 0,76	0,323	± 0,03	0,218	± 0,18	0,257	± 0,09	0,303	± 0,32	0,392	± 0,05				
<b>Acetic acid</b>	0,298	± 0,14	0,639	± 0,73	0,587	± 0,49	0,131	± 0,10	0,473	± 0,45	0,525	± 0,43	0,845	± 0,43				
<b>1-Butanol, 3-methyl-</b>	0,064	± 0,04	0,558	± 0,38	0,378	± 0,36	0,172	± 0,06	0,399	± 0,25	0,317	± 0,26	0,743	± 0,44				
<b>2-Pentenal, (E)-</b>	0,015	± 0,00	0,391	± 0,32	0,226	± 0,20	0,262	± 0,32	0,238	± 0,35	0,281	± 0,33	0,371	± 0,42				
<b>Toluene</b>	0,017	± 0,01	0,087	± 0,25	6,518	± 4,31	0,011	± 0,07	0,131	± 0,32	0,164	± 0,99	0,432	± 0,67				
<b>Hexanal</b>	8,335	± 0,99	19,665	± 6,86	8,908	± 4,44	12,072	± 16,8	13,515	± 1,47	11,142	± 2,12	1,057	± 0,38				

<b>2-Hexenal</b>	0,709	±	0,95	5,118	±	4,50	3,368	±	2,85	5,128	±	5,10	6,056	±	2,77	4,396	±	1,17	0,423	±	0,08
<b>1-Hexanol</b>	0,068	±	0,01	0,247	±	0,29	0,312	±	0,29	0,347	±	0,48	1,112	±	1,10	2,419	±	2,02	2,871	±	1,49
<b>Pentane, 1-nitro-</b>	0,043	±	0,03	0,059	±	0,01	0,078	±	0,01	0,170	±	0,18	0,119	±	0,04	0,329	±	0,32	0,119	±	0,04
<b>2,4-Hexadienal, (E,E)-2(5H)-</b>	0,089	±	0,09	0,279	±	0,21	0,203	±	0,16	0,162	±	0,10	0,146	±	0,04	0,188	±	0,08	0,000	±	0,00
<b>Furanone</b>																					
<b>2-Heptenal, (Z)-</b>	0,116	±	0,10	0,202	±	0,04	0,185	±	0,10	0,244	±	0,28	0,240	±	0,05	0,181	±	0,06	0,086	±	0,06
<b>5-Hepten-2-one, 6-methyl-2-</b>	0,304	±	0,18	0,607	±	0,30	0,539	±	0,23	0,643	±	0,86	0,744	±	0,38	0,599	±	0,35	0,658	±	0,48
<b>Isobutylthiazole</b>																					
<b>Linalool</b>	0,021	±	0,01	0,040	±	0,02	0,039	±	0,00	0,044	±	0,01	0,029	±	0,02	0,015	±	0,01	0,038	±	0,02
<b>Phenylethyl</b>	0,131	±	0,04	0,095	±	0,04	0,033	±	0,01	0,133	±	0,14	0,067	±	0,02	0,055	±	0,02	0,061	±	0,02
<b>Alcohol</b>																					
<b>Octanoic acid</b>	0,008	±	0,00	0,037	±	0,03	0,039	±	0,03	0,013	±	0,00	0,037	±	0,03	0,069	±	0,06	0,100	±	0,15
<b>α-Terpineol</b>	0,014	±	0,01	0,040	±	0,03	0,008	±	0,00	0,107	±	0,07	0,020	±	0,02	0,000	±	0,00	0,082	±	0,05



---

<b>Benzene, (2-nitroethyl)-</b>	0,025	±	0,01	0,024	±	0,01	0,022	±	0,02	0,045	±	0,05	0,013	±	0,01	0,012	±	0,01	0,018	±	0,01
<b>5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-</b>	0,079	±	0,09	0,078	±	0,05	0,098	±	0,03	0,100	±	0,10	0,163	±	0,13	0,105	±	0,05	0,131	±	0,11
<b>Hexanoic acid, octyl ester</b>	0,006	±	0,00	0,018	±	0,01	0,018	±	0,01	0,005	±	0,00	0,010	±	0,00	0,016	±	0,00	0,017	±	0,02
<b>4-Pentenoic acid, 2-methyl-, octyl ester</b>	0,005	±	0,00	0,015	±	0,01	0,016	±	0,01	0,008	±	0,00	0,010	±	0,01	0,011	±	0,01	0,013	±	0,01
<b>Naphthalene, 1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-n-</b>	0,010	±	0,01	0,022	±	0,00	0,021	±	0,00	0,012	±	0,01	0,015	±	0,01	0,020	±	0,01	0,022	±	0,01
<b>Hexadecanoic acid</b>	0,054	±	0,05	0,068	±	0,06	0,059	±	0,05	0,086	±	0,08	0,087	±	0,07	0,249	±	0,24	0,142	±	0,13

---

---

<b>Octadecanoic</b>	0,007	±	0,00	0,014	±	0,01	0,029	±	0,02	0,033	±	0,03	0,046	±	0,03	0,401	±	0,23	0,116	±	0,07
---------------------	-------	---	------	-------	---	------	-------	---	------	-------	---	------	-------	---	------	-------	---	------	-------	---	------

**acid**

---

## 5.3 Capítulo 3

### 5.3.1 Postharvest treatment with ulvan polysaccharide modulates lipid metabolism in tomato fruits (*Solanum lycopersicum* cv. *Sweet Grape*)

#### Postharvest treatment with ulvan polysaccharide modulates lipid metabolism in *Solanum lycopersicum* cv. *Sweet Grape* fruits

**Dora dos S. Costa**<sup>a</sup>, Daniela S. A. Moreno<sup>b</sup>, Samara L. da Silva<sup>c</sup>, Tiphane A. Figueira<sup>d</sup>, Celuta S. Alviano<sup>b</sup>, Antonio J. R. da Silva<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Plant Biotechnology and Bioprocesses, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratory of Structures of Surface of Microorganisms, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>c</sup>Phytochemical Analysis Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>d</sup>Postgraduate Program in Environmental Engineering, School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

\* Corresponding authors. *E-mail address*: dora.cost@hotmail.com

#### Competing Interests Statement

The authors have no competing interests to declare

#### Abstract

This study aimed to evaluate the changes in tomato fruit metabolism after treatment with ulvan, a polysaccharide isolated from the marine macroalga *Ulva fasciata*. Compared to controls, marked increments in the levels of myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, linoleic, and linolenic acids were observed along the period but not for oleic acid. The levels of the steroids stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, and  $\alpha$ -tocopherol

displayed similar trends. The levels of  $\beta$ -carotene and lycopene reached increments of ca. 25% compared to controls by the end of the period. The emission of fatty acids derived-VOCs like hexanal and 2-hexenal decreased upon ulvan treatment during 48h after treatment, probably due to the inhibition of the lipoxygenases involved in the production of these aldehydes by the oxidation of oleic/linoleic acids. Tomatoes treated with ulvan and kept under refrigeration ( $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ ) displayed 80% protection against rotting after 32 days of observation compared to untreated tomatoes at the same temperature. The observations made so far led us to conclude that applying ulvan to ripe tomatoes improved their shelf-life and affected their sensory attributes and nutritional value. This report is the first on the metabolomics of the effect of an algal extract (ulvan polysaccharide) on tomato fruits in the postharvest phase.

**Keywords:** tomato, biostimulation, macroalga, metabolomics

## Introduction

Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) play an important role in human nutrition because of their well-established health benefits related to their content of minerals, vitamins, proteins, essential amino acids, unsaturated fatty acids, tocopherols, carotenoids, phenolics, and phytosterols. Many of these compounds have antioxidant activities and are effective in protecting human health against various oxidative stress-related diseases. They are also reported to protect against cancer, cardiovascular diseases, cognitive function, and osteoporosis (Ali *et al.*, 2020). It is the second most extensively consumed vegetable crop in the world, after potatoes (*S. tuberosum* L.). Approximately 182.3 million tons are produced annually in 4.85 million hectares (Quinet *et al.*, 2019).

The quality of the tomato fruit is a function of its metabolite content, which is susceptible to physiological changes related to fruit development and ripening. Genetic engineering and breeding research efforts are focusing on the development of tomato fruits with improved organoleptic properties, which are the result of complex interactions between sugars, organic acids, and fatty acids directly related to taste and texture, as well as carotenoids (color/antioxidant properties) and the aroma added by volatile organic compounds (VOCs) (Erika *et al.*, 2022). Recent research points out the

possibility of increasing the content of compounds of interest for nutrition and flavoring in horticultural crops through the exogenous application of biostimulants (Baldwin, 2011; Rodrigues *et al.*, 2020; Saini *et al.*, 2014; Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2018; Moreno-Escamilla *et al.*, 2020). Biostimulants are agents that, when applied to plants, improve their nutritional potential, the uptake of nutrients from the soil, crop quality, and abiotic stress tolerance. (Du Jardin, 2015).

Polysaccharides from seaweeds (e.g., ulvans, laminarans, carrageenans, and fucans) or animals (e.g., chitosan and oligochitosan), either as isolates or as crude extracts, have been reported as effective biostimulants. Chitosan improved carotenoid and vitamin C content, promoted the emission of flavor-associated volatiles, and enhanced ethylene production and signaling in tomatoes (Shao *et al.*, 2022). Tomatoes treated with a 3% gel-coating extracted from the red algae *Kappaphycus alvarezii* displayed a reduction in ascorbic acid content, a higher level of total soluble solids/total acidity ratio and good texture compared to untreated control samples (Banu *et al.*, 2020).

Ulvan is a cell wall sulfated polysaccharide extracted from the green macroalgae *Ulva* spp. (phylum Chlorophyta, order Ulvales, family Ulvaceae) which contributes from 9 to 36% of the dry weight of seaweed biomass (Barakat *et al.*, 2022). We recently demonstrated that ulvan obtained from cultivated *U. fasciata* is similar to those reported in the literature and could be a source for obtaining this polysaccharide on a greater scale (Figueira *et al.*, 2020). To date, literature reports on the use of algal extracts as biostimulants for crops is related mainly to the preharvest phase. In our studies on the metabolomics of postharvest tomato fruits cv. *Sweet Grape* treated with the polysaccharide ulvan, we we hypothesize the potential of ulvan to modulate fatty acids, steroids, tocopherols, and carotenoids contents, as well as in the composition of emitted volatile organic compounds in postharvest phase.

## Material and Methods

### Reagents

Analytical reagents and standards were procured from Sigma-Aldrich and Merck (São Paulo, Brazil). Methanol, hexane, dichloromethane, methyltertbutyl ether (MTBE), ethyl acetate, and chloroform were all HPLC or analytical grade.

### Tomatoes

Organic certified tomatoes cv *Sweet Grape* red (USDA, 1991), maturation stage “red” 4 – 5 days after harvest, were purchased in local supermarkets in the city of Rio de Janeiro (RJ-Brazil). Fruits were selected based on similar size, color, absence of defects, and mechanical damage. All tomatoes were surface sterilized by immersion in 1% NaOCl solution for 30 min, rinsed in distilled sterile water, and dried in ambient air prior to the experiments.

### Ulvan solution

*Ulva fasciata* samples were collected in Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil (22 57'40 S/ 42 01'13 W) and packed in a styrofoam box with seawater for transport. After cleaning, the fresh biomass was dried in an oven at 50 °C and stored in a desiccator until the extraction of the polysaccharide. Ulvan was obtained according to the method described by Figueira *et al.* (2020). The dry biomass of *U. fasciata* (96.5 g) was powdered, suspended in ultrapure water (100 mL/10g), and autoclaved at 121°C and 1 atm for 40 min. The supernatant was centrifuged (10.000 g, 4°C, 10 min), and the polysaccharide was precipitated with three volumes of ultrapure ethanol after cooling at –20°C for 48 hours. The precipitate was centrifuged (3500 g, 4°C, 5 min), and the pellet containing ulvan was lyophilized (25.617 g). The polysaccharide was purified by membrane dialysis (12000-14000 Da) and lyophilized again (11g) to be used in the experiments. The polysaccharide yield after purification was approximately 11.39%. Aqueous solutions containing ulvan (1 mg/mL) were prepared for the experiments.

## Experimental design

For the evaluation of the optimal ulvan concentration for tomato preservation an immersion treatment of tomatoes was tested using four concentrations of ulvan in an aqueous solution (0.5, 1, 2, and 4 mg/mL) compared to controls (distilled water), with N=30 tomatoes for each condition. Four tomatoes were randomly selected for each concentration analyzed per day. The assessed parameters included: I- phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity on days 1, 3, 6, and 9 of the experiment, and II- the protection index (%), based on the absence of rotting, on day 9 after the start of the experiment.

For polar and non-polar compounds as well as for carotenoids analysis, fruits were separated in two lots (N = 40): 1) control (fruits immersed in distilled sterile water, for 30 min); and 2) fruits treated with ulvan (immersion in an aqueous solution of ulvan 1mg/ mL). After immersion, tomatoes were dried at room temperature and packed in plastic boxes and stored at room temperature ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). Samples for analysis of 4 tomatoes were randomly taken in each 1, 2, 3, 6, and 9 days after the beginning of the experiment, frozen with N<sub>2</sub>, crushed with a grinder, and stored at -80°C (for polar and non-polar metabolites analysis) or lyophilized (carotenoid analysis).

For shelf life analysis, fruits were separated into four lots (N = 50): 1) control 1 (fruits immersed in distilled sterile water, for 30 min) at room temperature ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ); 2) control 2 (fruits immersed in distilled sterile water, for 30 min) under refrigeration ( $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ , 52% relative humidity (RH)); 3) fruits treated with ulvan (immersion in an aqueous solution of ulvan 1mg/ mL) under room temperature ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) and 4) fruits treated with ulvan (immersion in aqueous solution of ulvan 1mg/ mL) under refrigeration ( $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ , 52% relative humidity). Tomatoes were dried at room temperature and evaluated under the above conditions for 32 days, being checked at regular intervals to see when spoil began.

For VOCs analysis, tomatoes were separated into two lots (N = 56): 1) control (fruits immersed in distilled sterile water, for 30 min); 2) fruits treated with ulvan (immersion in an aqueous solution of ulvan 1mg/ mL) and 3). Randomly, four whole tomatoes were picked up in each 1, 3, 6, 9, 12, 24, and 48 hours after the beginning of the experiment, freezed with N<sub>2</sub>, and stored at -80°C until the moment of the SPME assay.

## **Evaluation of the optimal ulvan concentration for tomato preservation**

### **PAL activity**

#### ***Sample preparation and enzyme activity***

For PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase), the extraction protocol closely followed the method outlined by Modafar *et al.* (2012). Specifically, 100 mg of frozen fresh mass sample (4 fruits) for each condition was ground and mixed with 5 mL of tris-HCl buffer (100mM, pH 8.5) and 5 mL of  $\beta$ -mercaptoethanol aqueous solution (14mM). The resulting mixture underwent centrifugation at 13,000 g, 4°C, for 30 minutes, and the supernatant was utilized as the enzyme extract. The enzymatic extracts (100  $\mu$ L) were mixed with L-phenylalanine (200  $\mu$ L, 100mM) in tris-HCl buffer (100mM, pH 8.5) and incubated at 40°C for 1 hour. Reaction halted with HCl (5N, 200  $\mu$ L). PAL activity determined by cinnamic acid production, quantified at 290 nm and expressed as nmol cinnamic acid/min<sup>-1</sup>/mg protein<sup>-1</sup>).

### **Carotenoid profile analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

#### ***Sample preparation***

Carotenoid extraction methodology was based on the one developed by Sérino *et al.* (2009). Samples (200 mg) of lyophilized powder of control and treated tomatoes were taken in triplicate. The extraction was performed with a saturated aqueous solution of NaCl (5000  $\mu$ L), hexane (2500  $\mu$ L), ethyl acetate (1000  $\mu$ L) and dichloromethane (200  $\mu$ L). *trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal (200  $\mu$ L, 0.25 mg/mL) was added as an internal standard. The extracts were then vortexed for 10 seconds, placed in an ultrasonic bath for 30 min, and then centrifuged (5500 rpm, 4 °C, 10 minutes). The supernatants were filtered (0.22  $\mu$ m) into amber vials and kept under refrigeration until analysis by HPLC.

#### ***Chromatographic conditions for carotenoid analysis***



HPLC analyses were performed on a Shimadzu Prominence chromatograph equipped with a UV-visible DAD detector under the following conditions: YMC™ C30 Carotenoid column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm particle size), Waters (Ireland) coupled to a YMC™ Carotenoid pre-column (10 mm x 4 mm, 5 µm particle size). The analysis conditions were the same as used by Londoño-Giraldo *et al.* (2021): phase A = methanol:methyltertbutyl ether (MTBE):water (90:7:3, v:v:v) and phase B = methanol:MTBE (10:90, v:v) with a gradient of: 0 min, 95% A; 5 min, 70% A; 10 min, 50% A; 15 min, 20% A; 20 min, 0% A; 27 min, 95% A, in a run time of 33 min and a flow rate of 1.0 mL/min. A volume of 20 µL of each sample was injected. The obtained chromatograms were integrated, and the peak areas were normalized with respect to that of *the trans*-β-Apo-8'-carotenal peak to obtain relative areas. Identification of each carotenoid was accomplished by comparison with Londoño-Giraldo *et al.* (2021) data: spectral data: lutein (445, 474 nm), phytoene (281 nm), all-*trans*-β-carotene (452, 477 nm), 1,2-dihydrolycopene (440, 468, 502 nm) and all *trans*-lycopene (446, 472, 503 nm) and the respective retention times.

### **Primary metabolism profile analysis by Gas Chromatography with Mass Spectrometry detection (GC/MS)**

#### ***Sample preparation: polar metabolites***

Extraction and derivatization of polar metabolites were made in triplicate and were conducted according to Meza *et al.* (2021). Samples containing 100 mg of flesh frozen pericarp powder (-80°C) from tomato homogenate were extracted with methanol at -20°C (1400 µL) plus internal standard adonitol (200 µg/mL, 60 µL), vortexed, and incubated (10 min, 70°C). Samples were centrifuged (11000 g, 10 min), and then chloroform (20 °C, 750 µL) and ultrapure water (1500 µL) were added to the supernatants and centrifuged again (2200 g, 15 min). The supernatants (150 µL) were dried with N<sub>2</sub>, derivatized with a solution of methoxyamine hydrochloride in pyridine (20 mg/mL, 40 µL), and incubated (37°C, 2h). Finally, MSTFA (70 µL) was added, and samples were analyzed by GC/MS. A quality control (Qc) sample, prepared with derivatized standards of organic acids, sugars, and amino acids (fructose, maltose,

glucose, sucrose, galactose, myo-inositol, citric acid, alanine, serine, proline, aspartic acid, glutamic acid) was prepared to check the response of the GCMS system. The peak areas measured in the processed chromatograms were all relative to the area of the internal standard (adonitol).

### **Sample preparation: non-polar metabolites**

Extraction and derivatization of non-polar metabolites were made in triplicate and were also conducted, according to Meza *et al.* (2022). Samples containing 1000 mg of flesh pericarp powder frozen (-80°C) from tomato homogenate were extracted with chloroform (1250 µL), methanol (2500 µL), added the internal standard n-tridecane (800 µg/mL, 60 µL) and then vortexed (10s) and incubated on ice (30 min). Then, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.5%, 1250 µL) and chloroform (1250 µL) were added and incubated again on ice (5 min). Then, they were centrifuged (1000 g, 4 °C, 15 min), the supernatants were dried with N<sub>2</sub> and resuspended in hexane (1000 µL), toluene (200 µL), methanol (1500 µL), hydrochloric acid (8%, 300 µL). Afterwards, they were vortexed (10 s), incubated (1.5 h, 100 °C), and then added hexane (1000 µL) and ultrapure water (1000 µL) and vortexed (10s). Samples were centrifuged (1000 g, 4 °C, 15 min), and the hexane fraction was collected. Finally, the hexane fractions were dried with N<sub>2</sub> and then resuspended in hexane (80 µL), pyridine (20 µL) and then derivatized with MSTFA (40 µL) and analyzed by GC/MS. A QC sample, prepared with standards of fatty (methyl palmitate, methyl lignocerate, methyl behenate, methyl stearate) was prepared to check the response of the GCMS system. The peak areas measured in the processed chromatograms were all relative to the area of the internal standard (n-tridecane)

### **Chromatographic conditions for polar and non-polar metabolites**

Derivatized samples were analyzed by GC-MS (Shimadzu QP2020 single quadrupole GCMS system), electronic ionization at 70 eV, and a mass range of 60 to 600 m/z. GC conditions were: Column Agilent DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25um), He gas flow: 1mL.min<sup>-1</sup>; injection mode: split; split ratio 1:50, injector temperature 230°C; the column temperature ramp was 80 °C (initial temperature), held for 2 min, heated at

15 min<sup>-1</sup> to 330 °C, and held for 6 min. Ion source temperature 250 °C; interface temperature 250 °C. The obtained chromatograms for polar and non-polar samples were integrated, and the peak areas were normalized with respect to that of adonitol or n-tridecane peaks to obtain relative areas, respectively. Data files were converted to NetCDF format for processing and analyzed with AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>). Compound identification was accomplished by comparing standards and the NIST 14 mass spectral library.

## **Volatile Organic Compounds - VOCs (HS-SPME-GC/MS) analysis**

### ***HS-SPME***

HS-SPME of the tomato extracts was based on Li *et al.* (2019). Frozen samples were thawed and taken in triplicate. The extraction was carried out as follows: a DVB/CAR/PDMS (50/30 µm) fiber was exposed for 40 minutes to the headspace of 20 mL vials sealed with silicone septum containing tomato samples (4.5 g) plus n-octanol (8 µL, 100 mg/L) and saturated CaCl<sub>2</sub> solution (1.7 mL) and subjected to heating (40 min, 50 °C). The fiber contents were analyzed immediately by GC/MS.

### ***GC/MS conditions for VOCs analysis***

VOCs GC/MS analysis was also based on the methodology by Li *et al.* (2019). A Shimadzu model QP2020 chromatograph equipped with a quadrupole analyzer operating in electronic ionization mode (70 eV). The measured mass range was m/z 60 – 600 Da. Gas chromatography was performed using an Agilent DB-5MS column (5% phenylmethylsilicone) 30m x 0.2 mm, 0.25 µm with helium as a carrier gas at a 1 ml/min flow rate. The column temperature was fixed at 40 °C for 6 min, then increased to 100 °C with a rate of 3 °C min<sup>-1</sup>, and finally increased to 230 °C at a rate of 5 °C.min<sup>-1</sup>. Injector and interface temperatures were 250 °C. The fiber desorption time was 5 minutes. The components were identified by comparison with spectra from a NIST14 mass spectral library. The areas of the peaks were normalized concerning the area of the internal standard (n-octanol).

## **Ascorbic acid quantification**

The extraction and quantification of ascorbic acid in control and ulvan-treated samples were carried out following the procedure described by Shao *et al.* (2022), using N = 25 tomatoes for each condition (Figure 30). Tomatoes selected at random (n = 5) for each day of analysis (1, 2, 3, 6, and 9 days after treatment) were frozen with liquid nitrogen and ground using a mill. For every 10 grams of this frozen powder, 50 mL of a 0.5% aqueous solution of oxalic acid were added to an Erlenmeyer flask. The flasks were sonicated for 30 minutes in an ultrasonic bath. The mixtures were then filtered through a 0.22 µm PVDF filter, and 20 µL of the filtrate were injected for analysis in the high-performance liquid chromatograph (HPLC).

### ***Chromatographic conditions for ascorbic acid quantification***

The analyses were conducted in triplicate using a Shimadzu Prominence chromatograph equipped with a UV-visible Diode Array Detector (DAD), and a C18 column (4.6 x 250 mm x 5 µm). A single mobile phase was employed, consisting of ultrapure water with 0.1% oxalic acid in an isocratic method at a flow rate of 1 mL/min (Shao *et al.* (2022). The wavelength for the analyses was set at 243 nm.

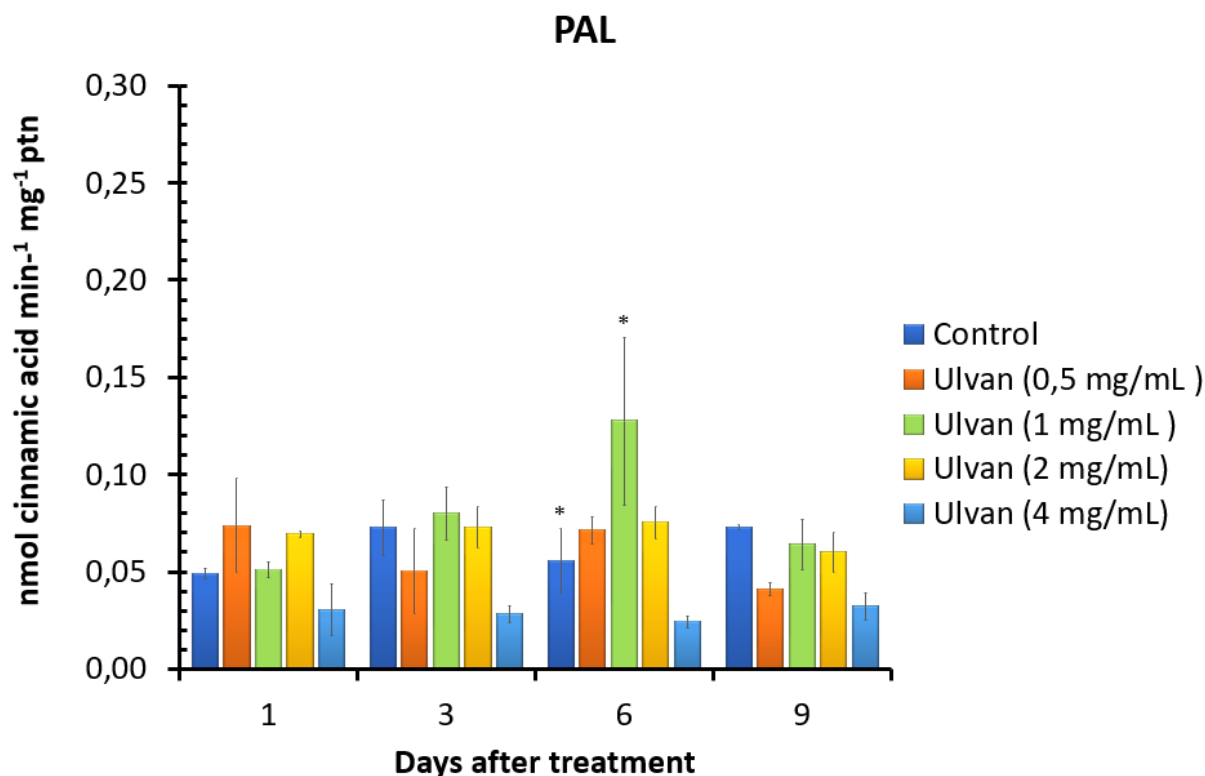
## **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed for all experiments using the XLStat software (Addinsoft, Paris, France 2017), through ANOVA (confidence interval = 95%, tolerance = 0.05, Tukey's and Fisher's test). Heat maps were constructed using Orange: Data Mining Toolbox in Python software (Demsar *et al.*, 2013).

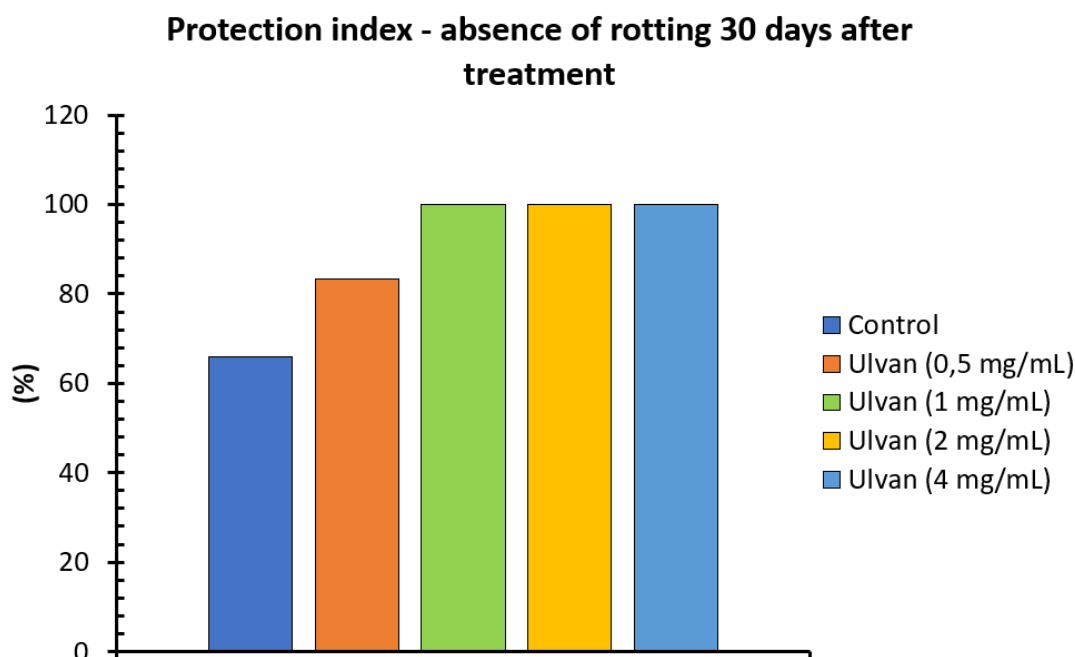
## **Results**

**The treatment with ulvan solution was the most effective for postharvest tomatoes at 1mg/mL**

According to our results, tomatoes treated with ulvan (1 mg/mL) showed the highest PAL activity on the sixth day after treatment (Fig. 1), indicating a priming effect related to plant defense. On the other hand, concerning the fruit protection index, all polysaccharide concentrations demonstrated effectiveness in preventing the onset of rot in tomatoes (Fig. 2). However, considering PAL activity and aiming for cost-effectiveness, we have decided to maintain the concentration of 1 mg/mL ulvan solution for all other tests.



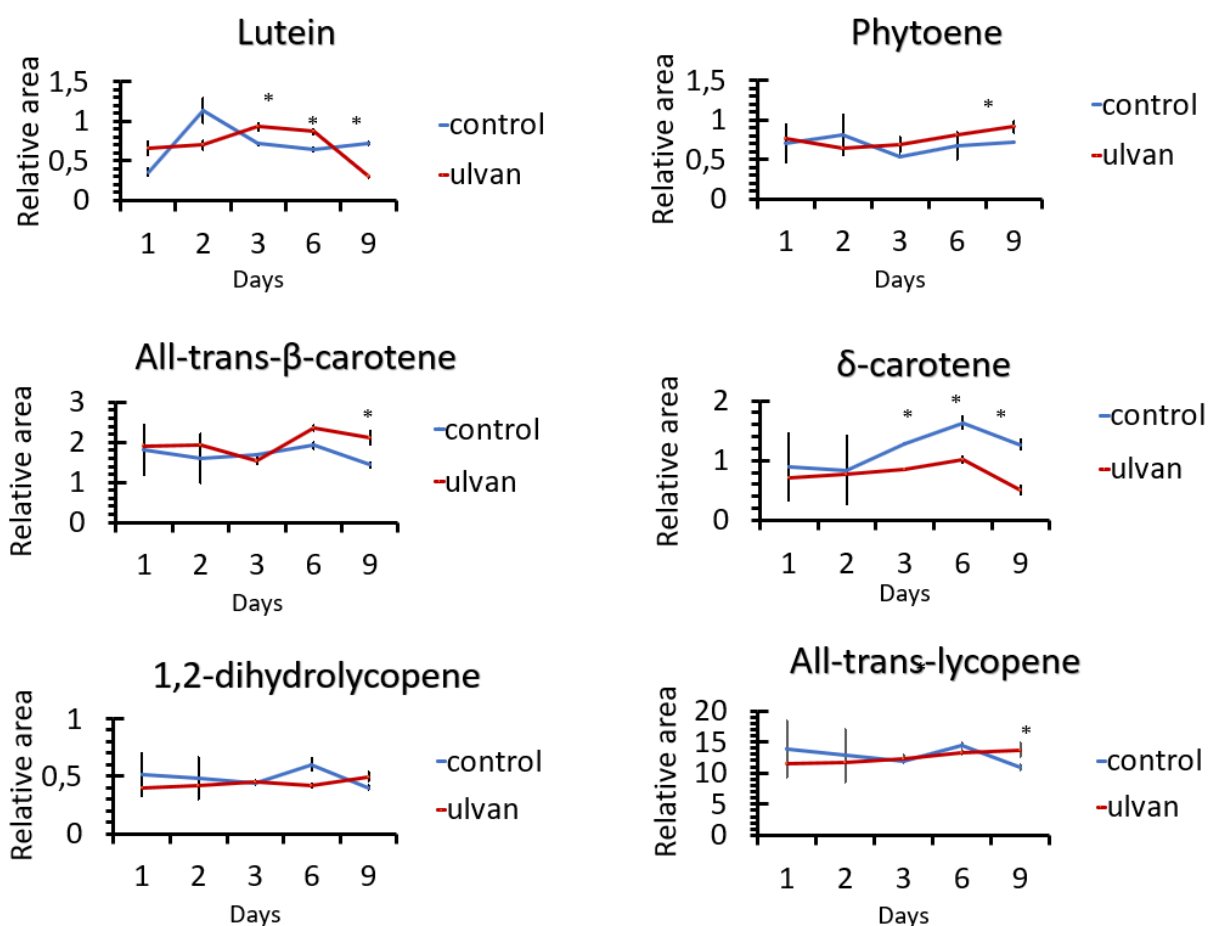
**Figure 1.** PAL activity over nine days. Asterisks denote statistical differences ( $p < 0,05$ ).



**Figure 2.** PAL activity over nine days.

### Ulvan enhances $\beta$ -carotene and lycopene content in tomato fruits

Fig. 3 displays the variation in the concentrations of lutein, phytoene, 1,2 dihydrolycopene,  $\delta$ -carotene, all-trans-lycopene, and all-trans- $\beta$ -carotene along nine days after treatment, for control and ulvan treated tomatoes samples. While the lycopene curve displays a positive increment tendency, the same is observed for phytoene levels, notably after the second day. As for 1,2-dihydrolycopene, the observed variation does not allow for a differential tendency between control and treated sample levels. For  $\beta$ -carotene, the levels in treated samples remained high relative to the control samples, although this difference was only significant on day nine ( $p < 0.010$ ). Regarding lutein, the sudden level decrement in treated samples from day 6 is noticeable while the decrease in the same compound can be seen at 3 days after harvest in untreated fruit. The curves for  $\delta$ -carotene displayed consistently lower levels in treated samples than in ulvan treated during all 9 days of observation.

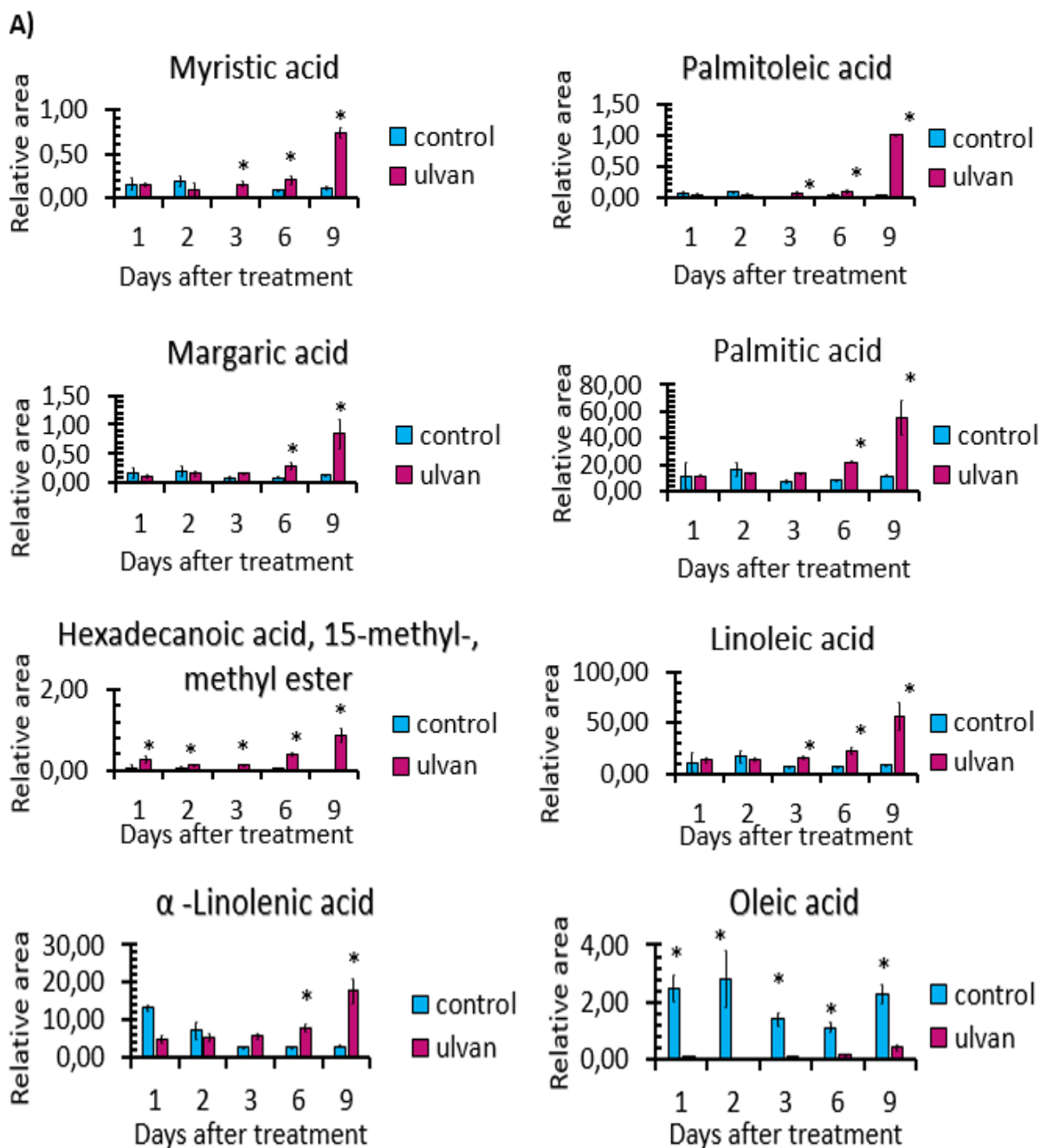


**Figure 3.** Variation in the concentrations of lutein, phytoene, all-trans-β-carotene, δ-carotene, 1,2 dihydrolycopene, and all-trans-lycopene over nine days. (blue: control, red: ulvan treated). Asterisks denote statistical differences ( $p < 0,05$ ).

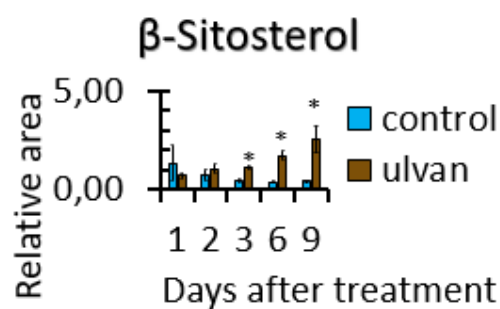
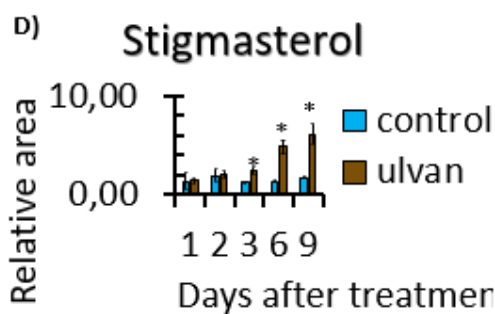
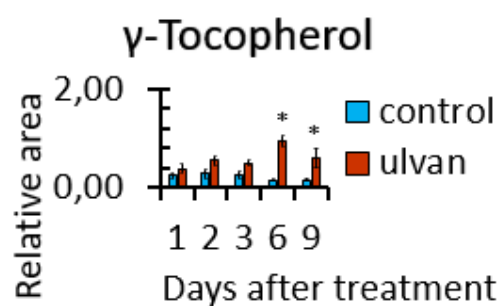
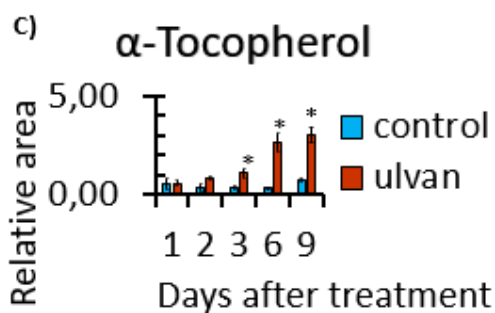
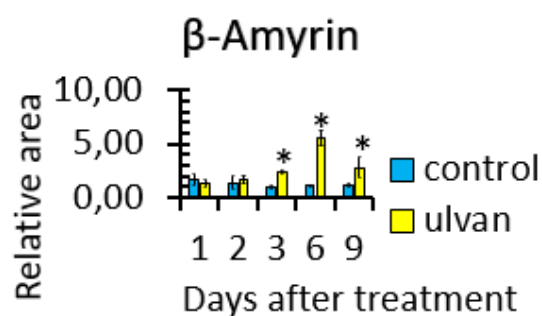
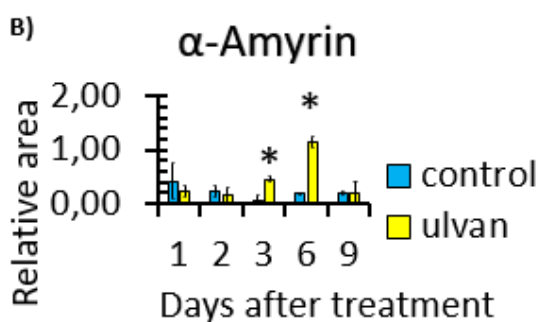
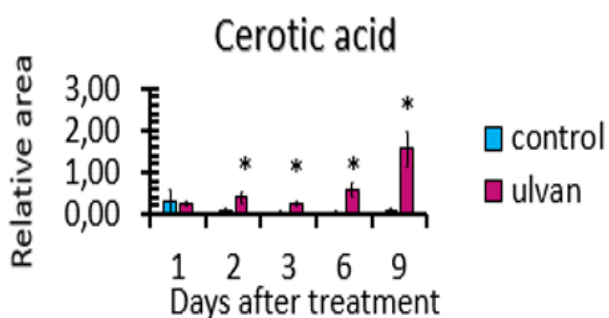
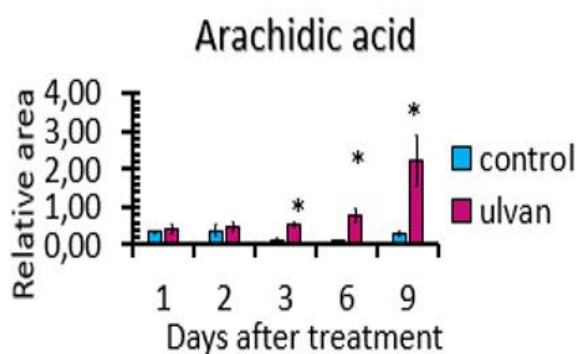
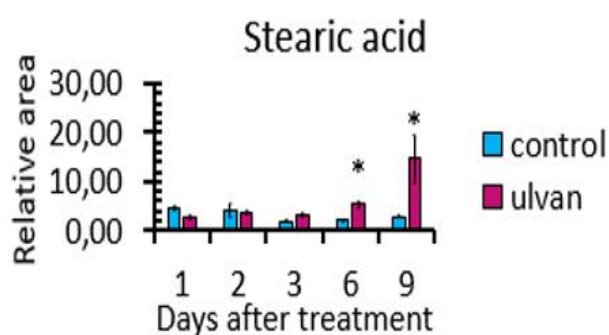
### Ulvan increased the content of fatty acids, sterols, tocopherols, and terpenes

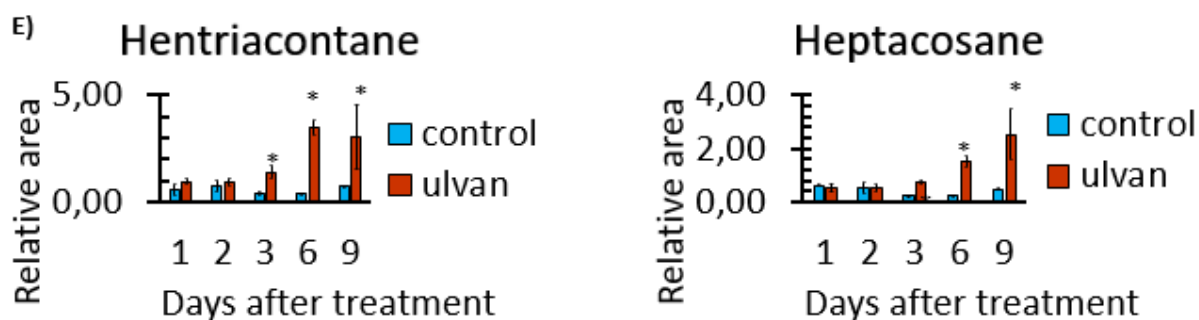
In general, tomatoes treated with ulvan exhibited increased levels of fatty acids, triterpenes, steroids, and tocopherols as well as long chain hydrocarbons as compared to control samples (see Figs. 4A, B, C, D and E). Overall, this improvement is more evident on the sixth and ninth days. Linoleic acid, followed by palmitic, linolenic, and stearic acids, were the more abundant fatty acids found (Fig. 4A). Two triterpenes were detected: α-amyrin and β-amyrin (Fig. 4B). The levels of these compounds had increments in the third and sixth days after treatment tomatoes treated with ulvan, followed by a sharp decrease on the ninth day (Fig. 4B). α-tocopherol, γ-tocopherol (Fig. 4C), as stigmasterol levels were higher in treated than in control samples since the third day after treatment, while β-sitosterol levels were higher in treated tomatoes

from the second day onwards (Fig. 4D). Ulvan treatment also strongly increased the levels of very long chain hydrocarbon contents (Fig. 4E) for hentriacontane and heptacosane.







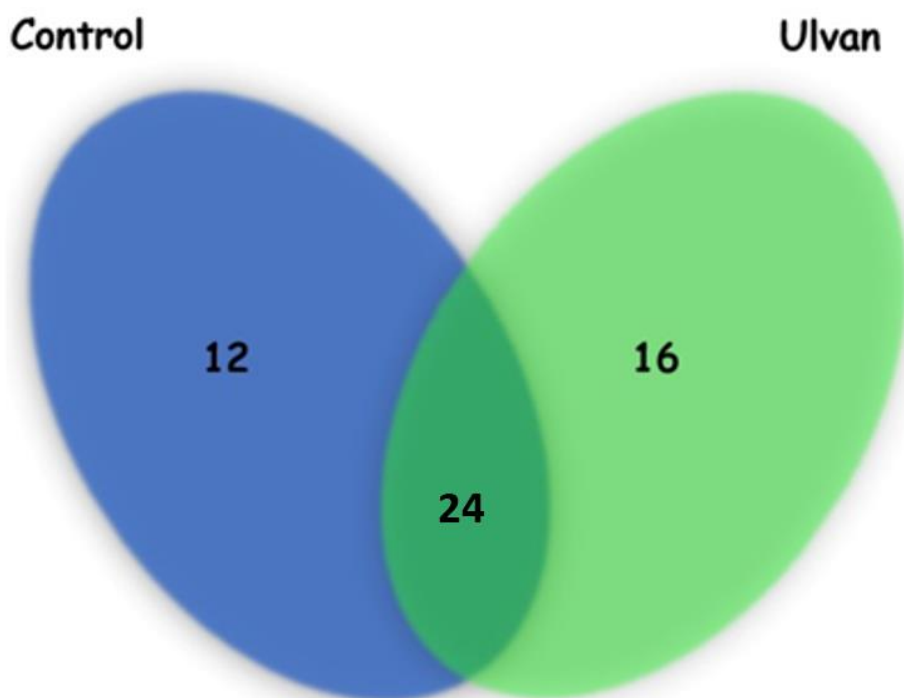


**Figure 4.** A) Fatty acids in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6, and 9 days of observation; B) Triterpenes in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6 and 9 days of observation; C) Tocopherols; D) Steroids; E) Very long chain hydrocarbons in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6 and 9 days of observation. Asterisks denote statistical differences ( $p < 0,05$ ).

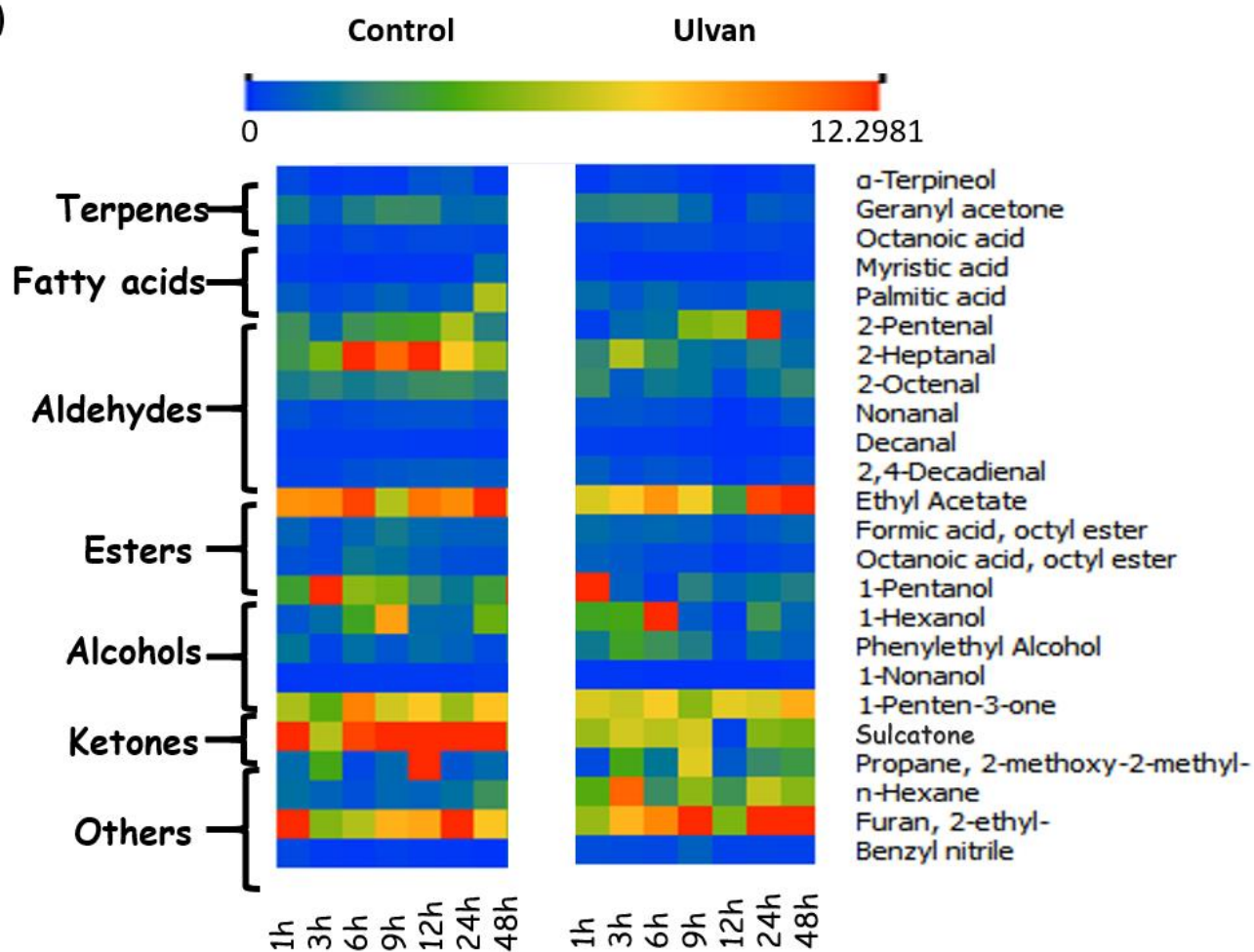
### 3.4 Volatile Organic Compounds

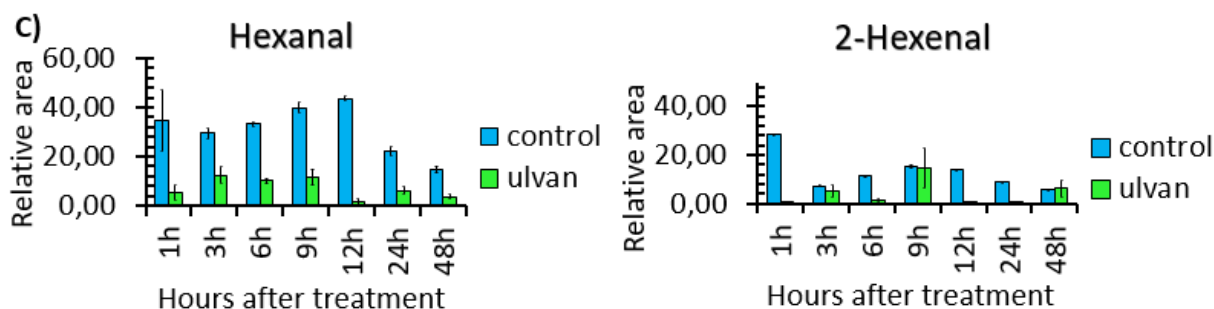
36 VOCs were counted in control samples and 40 in ulvan-treated tomatoes (Table S1, Supplementary Material). Both control and ulvan-treated tomatoes samples shared 24 compounds (Fig. 5A). 12 compounds were detected only in control samples, and 16 compounds only in ulvan-treated tomatoes (Fig. 5A). The heat map (Fig. 5B) highlights the variation in the levels of pentenal, heptanal, ethyl acetate, 1-pentanol, 1-hexanol, phenylethyl alcohol, 1-penten-3-one, sulcatone, 2-methoxy-2-methyl-propane, hexane, and 2-ethyl-furan. The major volatiles detected were hexanal and 2-hexenal (Fig. 5C).

A)



B)

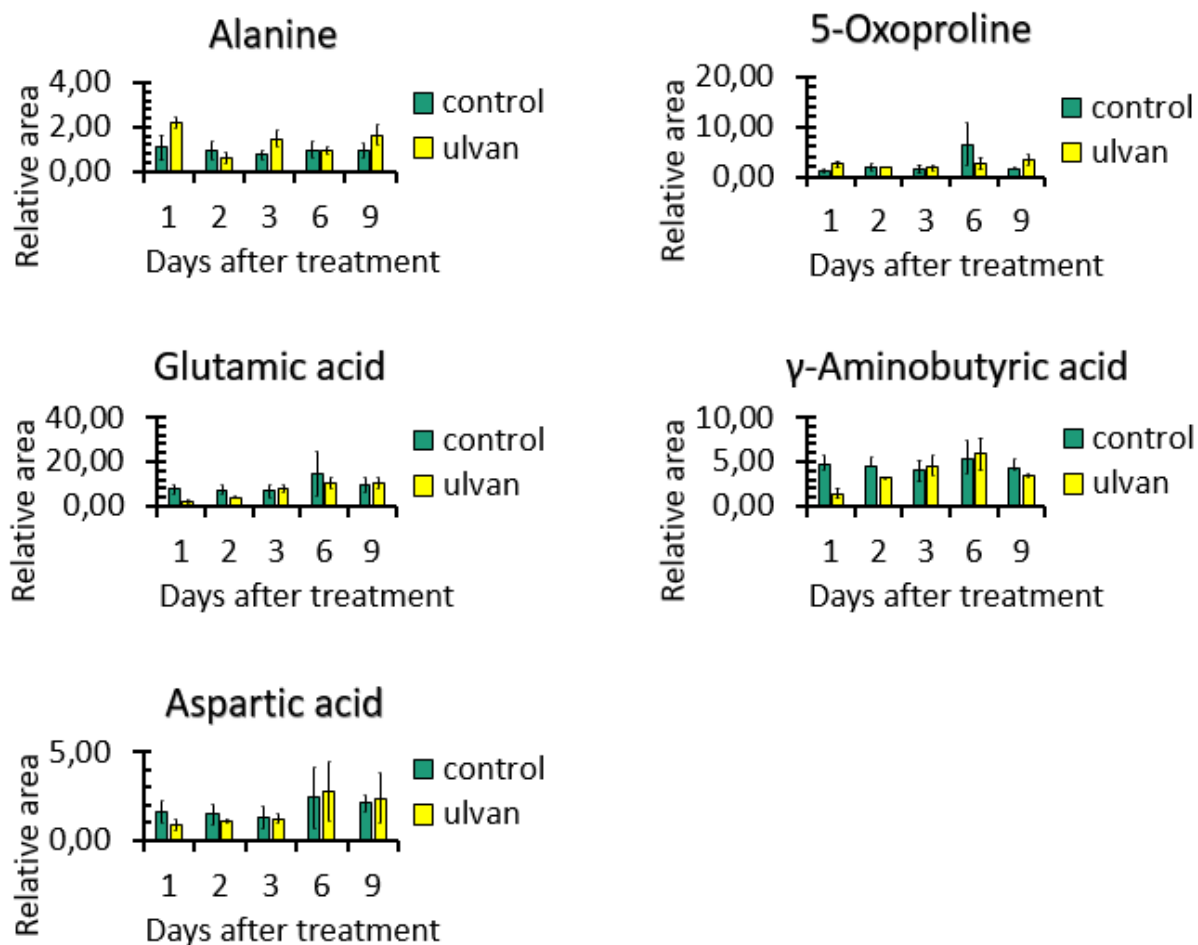




**Figure 5.** A) Volatile organic compounds in tomato *Sweet Grape* – control (in blue), treated with ulvan solution (in green) after 1, 3, 6, 9, 12, 24, and 48 hours of treatment, as well compounds emitted by both samples. B) *Sweet Grape* tomatoes volatile compounds were found in control and ulvan treated samples after 1, 3, 6, 9, 12, 24, and 48 hours after treatment. C) Emission levels of hexanal and 2-hexenal. Asterisks denote statistical differences ( $p < 0,05$ ).

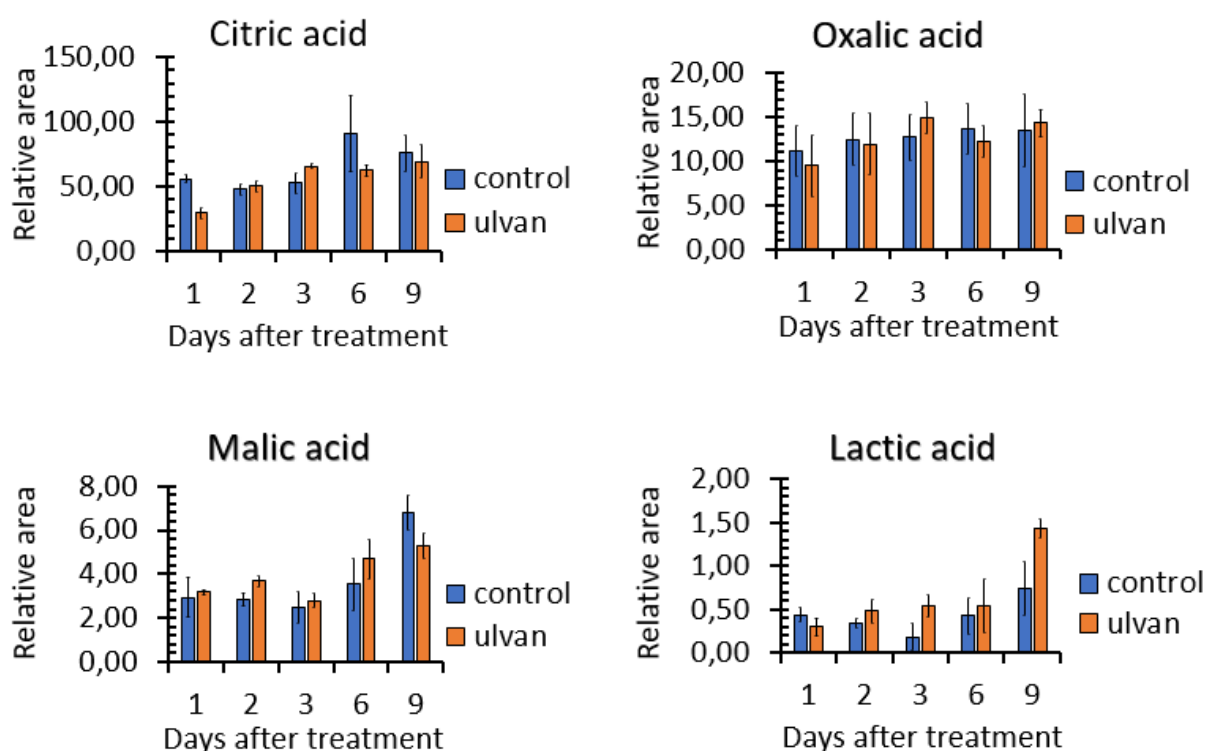
### 3.1 Amino acids, organic acids, and sugars metabolism

The profiles displayed in Fig. 6 indicate that the application of ulvan had no noticeable influence on amino acid metabolism, exception made in the case of alanine.



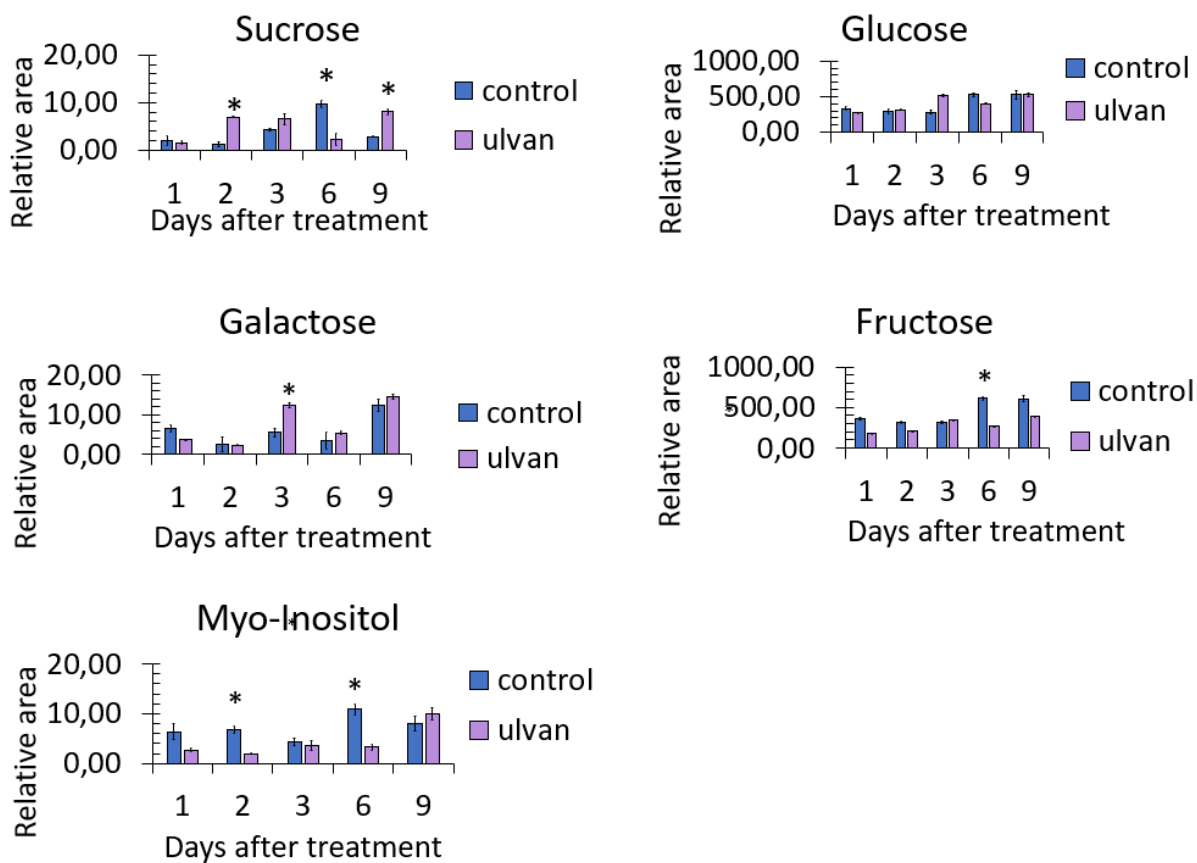
**Figure 6.** Amino acids in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6, and 9 days of observation

A similar trend was observed in the levels of organic acids (Fig. 7). Lactic acid was the exception by displaying a steady level increment along the period.

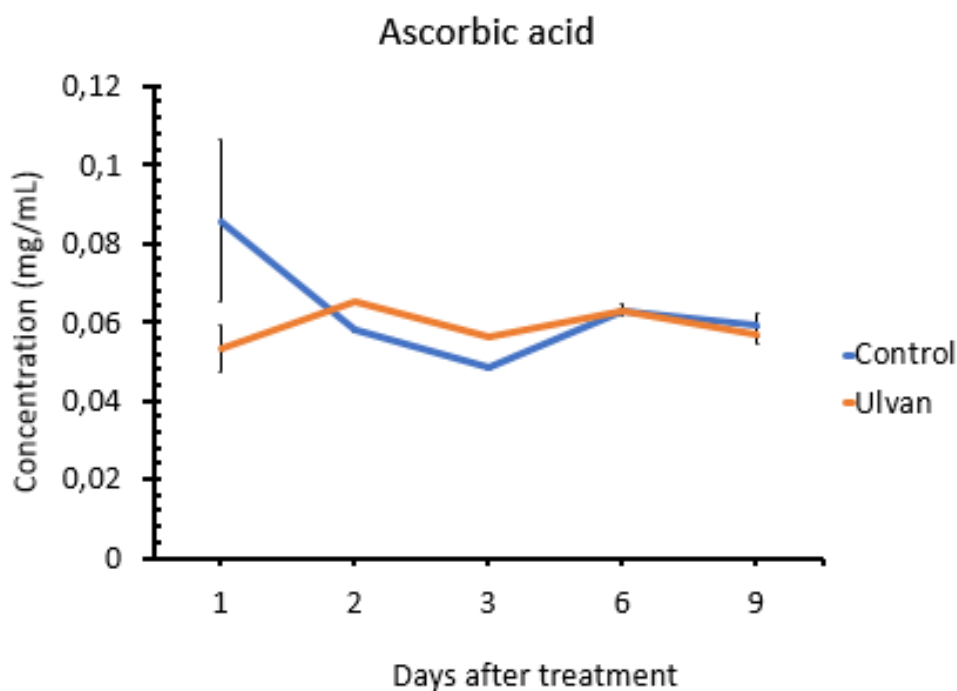


**Figure 7.** Organic acids in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6, and 9 days of observation.

Glucose and fructose appeared as the major components among the monosaccharides. There is an early increase in the sucrose and glucose contents in treated fruit. The fructose content is lower in treated fruit and galactose showed an increased content at 3 d after harvest. The recorded profiles for the other sugars and myo-inositol did not show clear trends in their variation (Fig. 8)., as well ascorbic acid (Fig. 9).



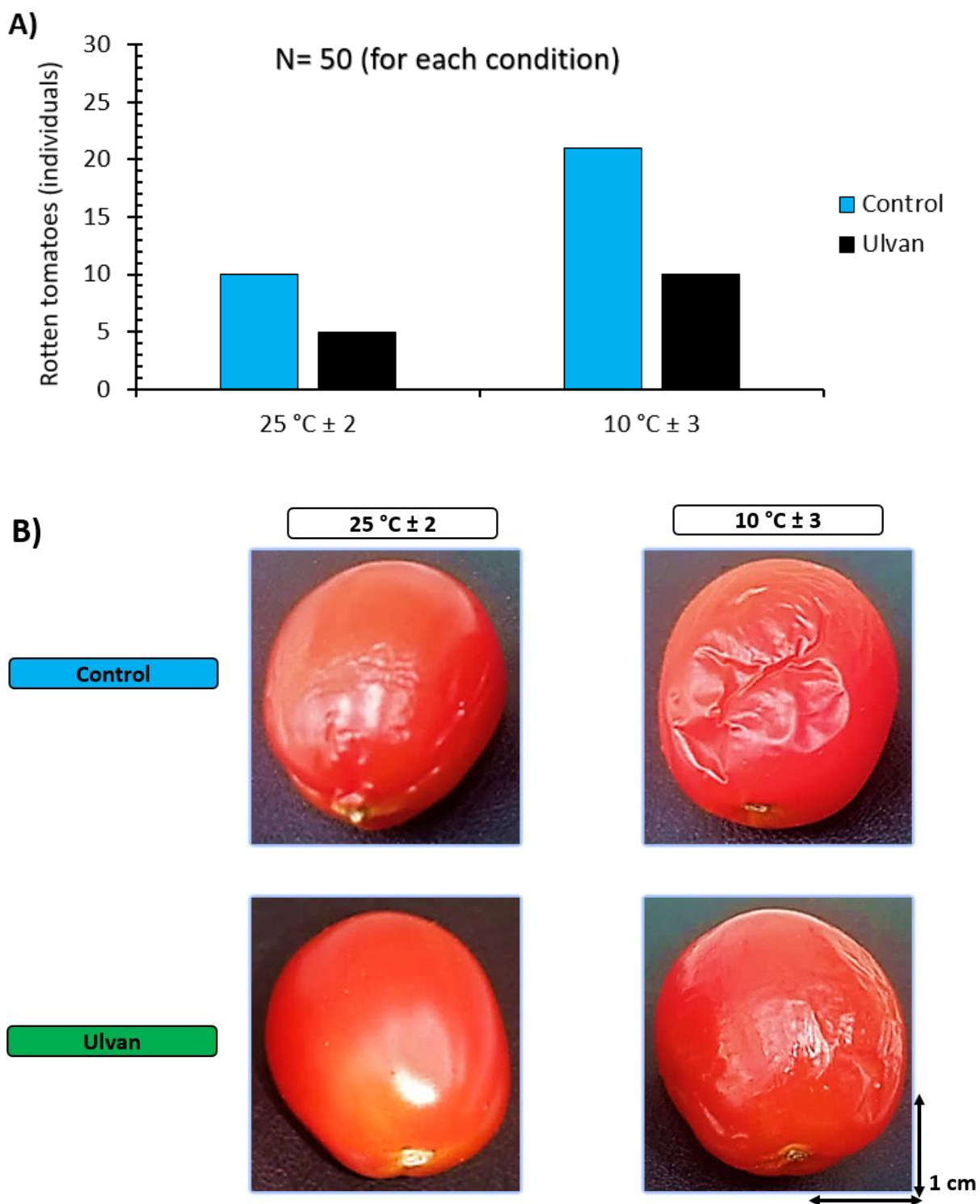
**Figure 8.** Sugars in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6, and 9 days of observation. Asterisks denote statistical differences ( $p < 0,05$ ).



**Figure 9.** Ascorbic acid concentration in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6, and 9 days of observation.

### Ulvan improved tomatoes shelf life at room temperature

The following results demonstrate that ulvan treatment increased the shelf life of tomatoes until the 32<sup>nd</sup> day of observation. At the end of this period, about 42% of the control samples under room temperature ( $25\text{ °C} \pm 2$ ) developed rot while only 20% of the tomatoes treated with ulvan under refrigeration ( $10\text{ °C} \pm 3$ ) (Fig. 10A). In contrast, at room temperature fruits appearance were better preserved under room temperature than under refrigeration both in the control samples (Fig. 10B) and treated ones (Fig. 10B) (Fig. 10B). Refrigeration made the tomatoes look more dehydrated both in the control samples (Fig. 10B) and treated ones (Fig. 10B). However, softening/less firmness was present only in control samples under refrigeration (Fig. 10B).



**Figure 10.** A) Amount of rotten tomatoes after 32 days of ulvan treatment compared to control samples; B) Tomatoes control and treated by immersion with ulvan solution (30 min) 32 days after treatments at room temperature at 25°C ± 2 or stored in refrigerator at 10°C ± 3.



## Discussion

Cherry tomatoes stand out for their mini size, intense red color, firmness, and nutritional value that is sometimes higher than other varieties (Nellis *et al.*, 2017). Among the hybrids, the cultivar *Sweet Grape*, which was developed in Asia by the company Sakata, is smaller in size than the cherry tomato and weighs between 10 and 20 g, has an elongated shape, intense red coloration in the thin and smooth pericarp and pulp, low acidity index, and gained popularity due to its flavor, sweeter due to the high concentration of sugar (Coker *et al.*, 2018). While the traditional table tomatoes have a Brix degree between 4 and 6, the Grape varieties reach between 9° and 12° Brix (Junqueira *et al.*, 2011).

During tomato ripening, the carotenoid content increases between 10 and 14 times, mostly due to the increase in lycopene levels (Quinet *et al.*, 2019). Although carotenoids are present in the whole fruit, their distribution is not regular: lycopene is found in greater concentration in the pericarp when compared to the locules, while the concentration of  $\beta$ -carotene is higher in the locules than in the pericarp (Martí *et al.*, 2016). Furthermore, the concentration of lycopene varies during the ripening process. It begins to be present in the locules at the break stage, and then its concentration increases during the ripening process (Martí *et al.*, 2016). For this reason, we have chosen to use whole fruits for the analysis. In our study, we observed an increase in all carotenoids analyzed, except for  $\delta$ -carotene for both control samples and treated tomatoes, for nine days. The increment in phytoene, lycopene, and  $\beta$ -carotene levels in treated tomatoes and lutein/ $\delta$ -carotene decline are noticeable. Saini *et al.*, 2017 observed that lutein increases until the pink stage and then decreases to the red stage, but this may vary among cultivars. According to our data (Fig 1), the measured levels of lycopene in ulvan-treated tomatoes are slightly lower than in control samples, but from the second day of analysis onwards, the levels increase, and this is also true for phytoene and  $\beta$ -carotene. Rodrigues *et al.* (2020) observed that several results support the conclusion that plant bio stimulants can improve fruit quality. Reports on the treatments with algae extracts involving the modulation of carotenoid production by the treated plant refer, in general, to the preharvest phase: an increment of the total carotenoid content by approximately 20% as compared to control upon treatment of *Petroselinum crispum* plants with 1mg.mL<sup>-1</sup> aqueous extract from *U. intestinalis* Linn

was reported (Paulert *et al.* , 2021). Carotenoids are nutritionally essential and important for human health, so the biofortification of cultures with these molecules is an important goal in carotenoid research (Sun *et al.*, 2022). Pieces of evidence there are that carotenoids provide beneficial effects on eye health (lutein e zeaxantin) because they are precursors of vitamin A ( $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin), stop microbial activity (lutein), increase bone density in young adults (lutein e zeaxantin) and also produce improvements in cognitive function (lutein e  $\beta$ -carotene) and cardiovascular health (lycopene), which may help prevent some types of cancer and has UV protection, anti-inflammatory antioxidant, hepatoprotective, antimutagenic and antiatherogenic activities ( $\beta$ -carotene, lycopene, phytoene and phytofluene) (Lin *et al.* , 2009; Kiplimo *et al.* , 2011; Bovier and Hammond, 2017; Eggersdorfer and Wyss., 2018; Meléndez-Martínez *et al.*, 2019; Stahl & Sies *et al.* , 2020). Therefore, the increment in carotenoid levels induced by ulvan application may benefit consumers of those fruits.

Myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, arachidic, behenic, cerotic, and margaric acids were the fatty acids detected in the *Sweet Grape* tomatoes analyzed. The occurrence of these and other fatty acids has already been reported (Fernandes *et al.*, 2021). Figure 2A shows the incremental influence of ulvan treatment on the levels of fatty acids and the opposite trend observed for oleic acid during the observation period. During the tomato ripening process and especially in the final stages of maturation, polyunsaturated fatty acids increase in concentration, with linoleic acid in greater quantity followed by oleic and palmitic acids. However, the proportion of oleic acid concerning linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids decreases with the advancement of the maturation process (Saini *et al.*, 2017). Our results show only minimal variations in the levels of these acids in control tomatoes, while treated tomatoes displayed increased levels of fatty acids during observation, notably of linoleic and linolenic acids, which are two essential fatty acids. Since humans or animals cannot synthesize the essential fatty acids, they must come from dietary sources, and ulvan treated tomatoes may become a good source of these acids. Jaulneau *et al.* (2010) suggested that ulvan activates the jasmonic acid signaling pathway. Meza *et al.* (2022) reported that the exogenous application of methyl jasmonate impacts lipid metabolism (carotenoids, fatty acids, tocopherols, and

phytosterols) in tomato pericarp. Farid *et al.* (2019) reported increments in the levels measured for fatty acids in tomato plants after treatment with seaweed extracts.

Phytosterols play important roles in human health. Ulvan treated tomatoes displayed increased levels of stigmasterol and its precursor  $\beta$ -sitosterol compared with controls. Tomatoes provide significant amounts of important antioxidants, including carotene, lycopene, ascorbic acid, and phenolic compounds, and  $\alpha$ -tocopherol plays a significant role among the antioxidant compounds in tomatoes. Our results demonstrate that ulvan treatment accelerated the accumulation of tocopherols, especially  $\alpha$ -tocopherol (Fig. 2C).

The content in  $\alpha$ -amyirin and  $\beta$ -amyirin was also improved in ulvan treated tomatoes (Fig. 3B). These triterpenes seem to play a yet not well-understood role as intermediates in the synthesis of complex triterpene glycosides associated with plant defense and signaling, accumulate in the epicuticular layers of fruit epidermis, stem and leaf surfaces offering protection against dehydration and herbivores (Wang *et al.*, 2011).

Hexanal and 2-hexenal were the major volatile compounds detected in the HS-SPME assays (Fig 3C). The C18 fatty acids linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids, produce C6 aldehydes such as hexanal, cis-3-hexenal, trans-2-hexenal, 1-hexanol and the C5 volatile 1-penten-3-one through lipid degradation catalyzed by lipoxygenase and 13-hydroperoxide lyase enzymes (Distefano *et al.*, 2022). A comparison of the levels measured for hexanal and 2-hexenal for treated tomatoes and controls led us to conclude that ulvan treatment may have inhibited those enzymes. Geranylacetone and sulcatone have leafy and citrusy aromatic attributes. Sulcatone is also related to the sweet fruity taste of many fruits (Zhou *et al.*, 2022). In general, commercial tomatoes are poor in VOCs like them, which has been attributed to the fact that the genetic mutations that allow the extension of shelf lives lead to poor fruits in such volatiles (Tieman *et al.*, 2017). Geranylacetone is the result of the oxidative cleavage of the carotenoids phytoene, phytofluene,  $\delta$ -carotene, and neurosporene which had a small content in ripe tomato fruits; on the other hand, sulcatone (5-hepten-2-one, 6-methyl) is derived from the oxidative cleavage of lycopene, the predominant carotenoid in ripe tomatoes (Paparella *et al.*, 2021). As these VOCs are volatile apocarotenoids, their contents are proportional to their carotenoid precursors contents (Vogel *et al.*, 2010). Since our VOC experiments were performed just until the first 48h after the treatment

with ulvan, we observe that in this same period, the levels of these precursor carotenoids are lower than in control samples. Therefore, ulvan-treated tomatoes levels of VOCs are also lower (Fig. 3B). 2-ethyl furan had increments in its level upon ulvan treatment. Ascorbic acid and related compounds, Maillard type systems containing amino acids and reducing sugars, lipid oxidation of unsaturated fatty acids, or even carotenoids are putative precursors of furan derivatives in foods (Vranová and Ciesarová, 2009; Gül Akilloğlu *et al.*, 2015). However, our results revealed a non-significant role of ulvan in the modulation of vitamin C in tomato fruits.

Based on our findings, refrigeration at a temperature of  $10^{\circ}\text{C} \pm 3$  (representative of domestic refrigerator settings) demonstrated superior efficacy in mitigating mold development on tomatoes, especially those treated with ulvan. However, this storage condition was associated with the undesirable consequence of reducing fruit firmness and inducing softening. This phenomenon aligns with the observations made by Farneti *et al.* (2010), who perceived similar softening trends in tomatoes held at temperatures ranging from  $4^{\circ}\text{C}$  (the most adverse) to  $15^{\circ}\text{C}$ . In a separate investigation conducted by british researchers (Dew *et al.*, 2016), it was determined that tomatoes exhibit enhanced physiological responses after seven days of storage when exposed to elevated temperatures exceeding  $15^{\circ}\text{C}$ , markedly surpassing the ambient temperatures encountered in the conventional UK supply chain, which typically approximates  $12^{\circ}\text{C}$ . Concurrently, refrigeration storage at the consumer level consistently exerts detrimental effects on the firmness attributes of tomatoes. However, refrigeration associated with a previous polysaccharide treatment retards decay, and thus extends the shelf life of fruits such as tomatoes as it is supported by recent reports. That fact was observed by Ali *et al.* (2024) whose findings inferred that the edible coatings CS-LVN (chitosan+levan, 30 mL LVN in 1% (w/v) CS solution), CS-MCLG (chitosan+mucilage, 30 mL MCLG in 1% (w/v) CS solution), and CS-MCLG-LVN (chitosan+mucilage+levan, 30 mL LVN and 30 mL MCLG in 1% (w/v) CS solution) effectively preserved the postharvest quality of cocktail tomatoes for a period of 30 days. This period corroborates our results with ulvan which prolonged tomato fruits shelf life for up to 32 days. According to Mushi *et al.* (2023), tomatoes coated with films made of chitin, specifically made of DeChNF (deacetylated chitin nanofibril) and plasticized with honey, demonstrated superior resistance to weight loss and an extended shelf life of up to 20 days when stored in a refrigerator at  $9^{\circ}\text{C}$ . In addition, A

study conducted by Asiamah *et al.* (2023) explored the impact of three polysaccharide edible coatings—carboxymethyl cellulose (CMC), xanthan gum (XG), and pectin—on the postharvest quality and antioxidant stability of tomato fruit. The investigation took place under both ambient conditions (25°C, RH: 80–85%) and refrigeration conditions (5°C, RH: 80–85%) over a 14-day period. The researchers found that the polysaccharide edible coating (2 g) significantly reduced water vapor permeability, preserved lycopene, ascorbic acid, color, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TTA), moisture content, and pH. Consequently, the study's results suggest that the postharvest quality attributes of tomato fruits can be enhanced by polysaccharide edible coatings, especially under refrigerated storage conditions (Asiamah *et al.*, 2023).

## Conclusion

In the course of our studies on the metabolomics of tomato fruits cv. *Sweet Grape* in mature red stage, treated with the polysaccharide ulvan, the metabolic profiles of lipids (fatty acids, carotenoids, steroids), tocopherols, sugars, amino acids, organic acids, and volatile organic compounds were monitored during a nine days period after the application of the polysaccharide. Marked increments in myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, linoleic, and linolenic acids levels relative to controls were observed along the period but not for oleic acid. The levels of the steroids stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, and  $\alpha$ -tocopherol displayed similar trends. The levels of  $\beta$ -carotene and lycopene reached increments of *ca.* 25% compared to controls by the end of the period. Comparison of the levels of sugars, amino acids, and organic acids between treated samples and controls seemingly indicates that the application of the polysaccharide did not influence their metabolism. Evaluation, along 48 hours, of the emitted volatile organic compounds led us to conclude that the noticeable reduction in the emission of hexanal and 2-hexenal, the two most abundant volatile indicates an eventual inhibition of the lipoxygenases involved in the production of these aldehydes by the oxidation of oleic/linoleic acids.

Tomatoes treated with ulvan and kept under refrigeration (10 °C) displayed 80% protection after 32 days of observation compared to untreated tomatoes at the same temperature, although firmness decay occurs.

The observations made so far led us to conclude that applying ulvan to ripe tomatoes improved their shelf-life and affected their sensory attributes and nutritional value. Additionally, the fact that we recently demonstrated that ulvan obtained from cultivated *U. fasciata* is similar to the one obtained from wild populations, being a potential source for obtaining this polysaccharide on greater scale, opens ways to the use of the *U. fasciata* polysaccharide as a sustainable biostimulant in tomato cultivation. This report is the first on the effects of ulvan as a bio stimulant for post-harvested tomatoes.

### **CRedit authorship contribution statement**

**Dora dos Santos Costa, Samara Lima da Silva, and Antonio Jorge Ribeiro da Silva** performed all the experiments metabolomic analyses, contributed to data mining, and wrote the article; **Antonio Jorge Ribeiro da Silva** also designed the research; **Tiphane Andrade Figueira** supplied ulvan samples and acted as a consultant about it. **Daniela Sales Alviano Moreno, Celuta Sales Alviano, and Antonio Jorge Ribeiro da Silva** analyzed both data article writing and oriented the research development.

### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

We want to thank the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), the Program on Plant Biotechnology and Bioprocesses, and the Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (Capes), Brazilian Ministry of Education. We also would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq and to the GC/MS technician Gisele Oliveira.

## Supplementary material

**Table S1.** Variation in the concentrations of lutein, phytoene, all-trans- $\beta$ -carotene,  $\delta$ -carotene, 1,2 dihydrolycopene and all-trans-lycopene along a nine days period.

Ulvan-treated															
Days															
Compound	1			2			3			6			9		
Relative area															
Lutein	0,663	±	0,09	0,699	±	0,07	0,931	±	0,05	0,873	±	0,03	0,302	±	0,00
Phytoene	0,757	±	0,04	0,640	±	0,09	0,687	±	0,10	0,805	±	0,05	0,915	±	0,07
All-trans- $\beta$ -carotene	1,929	±	0,06	1,935	±	0,04	1,536	±	0,08	2,356	±	0,08	2,116	±	0,18
$\delta$ -carotene	0,701	±	0,04	0,780	±	0,01	0,853	±	0,01	1,013	±	0,05	0,506	±	0,06
1,2-dihydrolycopene	0,399	±	0,01	0,419	±	0,01	0,450	±	0,02	0,419	±	0,01	0,494	±	0,04
All-trans-lycopene	11,470	±	0,18	11,755	±	0,27	12,356	±	0,58	13,337	±	0,35	13,729	±	1,11

Control															
Days															
Compound	1			2			3			6			9		
Relative area															
Lutein	0,356	±	0,05	1,136	±	0,17	0,715	±	0,01	0,639	±	0,02	0,724	±	0,02
Phytoene	0,702	±	0,24	0,809	±	0,25	0,540	±	0,02	0,675	±	0,17	0,714	±	0,01
All-trans- $\beta$ -carotene	1,808	±	0,63	1,585	±	0,62	1,702	±	0,02	1,918	±	0,09	1,442	±	0,06
$\delta$ -carotene	0,891	±	0,56	0,840	±	0,57	1,284	±	0,00	1,628	±	0,10	1,263	±	0,08
1,2-dihydrolycopene	0,514	±	0,19	0,484	±	0,19	0,441	±	0,01	0,602	±	0,05	0,403	±	0,03

All-trans-lycopene 13,766 ± 4,58 12,810 ± 4,34 11,859 ± 0,23 14,504 ± 0,39 10,902 ± 0,41

**Table S2.** Non-polar metabolites in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6 and 9 days of observation.

Control Compound	Days														
	1		2		3		6		9		Relative area				
Glycerol	0,13	± 0,05	0,08	± 0,03	0,14	± 0,04	0,08	± 0,01	0,10	± 0,03					
Myristic acid	0,15	± 0,07	0,19	± 0,06	0,00	± 0,00	0,08	± 0,01	0,11	± 0,02					
Palmitoleic acid	0,06	± 0,03	0,08	± 0,02	0,00	± 0,00	0,04	± 0,01	0,04	± 0,00					
Hexadecanoic acid, 15- methyl-, methyl ester	0,06	± 0,05	0,04	± 0,03	0,00	± 0,00	0,01	± 0,01	0,00	± 0,00					
Margaric acid	0,16	± 0,08	0,20	± 0,08	0,08	± 0,02	0,10	± 0,01	0,14	± 0,01					
Palmitic Acid	11,36	± 9,61	16,02	± 5,49	7,10	± 0,82	8,19	± 0,51	11,60	± 0,85					
Linoleic acid	11,23	± 9,76	16,63	± 5,81	6,93	± 0,93	6,93	± 0,59	8,70	± 0,76					
α -Linolenic acid	13,14	± 0,63	7,13	± 2,38	2,58	± 0,24	2,69	± 0,17	2,94	± 0,21					
Oleic acid	2,49	± 0,48	2,81	± 0,99	1,41	± 0,24	1,12	± 0,15	2,25	± 0,33					
Stearic acid	4,57	± 0,44	4,11	± 1,41	1,89	± 0,15	2,08	± 0,14	2,87	± 0,16					
11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	0,15	± 0,06	0,16	± 0,10	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00					
Methyl 18- methylnonadecanoate	0,44	± 0,26	0,62	± 0,22	0,23	± 0,03	0,28	± 0,01	0,40	± 0,04					
Oleamide	0,35	± 0,25	0,31	± 0,11	0,13	± 0,03	0,09	± 0,03	0,12	± 0,07					
Arachidic acid	0,36	± 0,01	0,36	± 0,15	0,09	± 0,08	0,12	± 0,02	0,30	± 0,04					
1,4-Pentadiene, 2,3,4- trimethyl-	0,17	± 0,06	0,21	± 0,09	0,07	± 0,07	0,12	± 0,02	0,20	± 0,04					
1-Heptanol	0,15	± 0,05	0,13	± 0,05	0,09	± 0,01	0,07	± 0,01	0,17	± 0,01					
Behenic acid	0,40	± 0,11	0,44	± 0,15	0,16	± 0,03	0,16	± 0,00	0,28	± 0,02					
1-Monopalmitin	0,41	± 0,22	0,51	± 0,19	0,27	± 0,05	0,20	± 0,03	0,68	± 0,04					
Cerotic acid	0,31	± 0,27	0,11	± 0,04	0,02	± 0,04	0,05	± 0,00	0,11	± 0,02					



Methyl hydroxydocosanoate	2-	0,12	±	0,05	0,07	±	0,00	0,00	±	0,00	0,04	±	0,04	0,06	±	0,06
1-Monolinolein		0,40	±	0,10	0,64	±	0,31	0,16	±	0,04	0,07	±	0,01	0,50	±	0,02
Glycerol monostearate		0,18	±	0,10	0,28	±	0,15	0,16	±	0,10	0,11	±	0,03	0,24	±	0,02
Heptane, 2,2,3,3,5,6,6-heptamethyl-		0,10	±	0,11	0,10	±	0,11	0,02	±	0,03	0,02	±	0,03	0,01	±	0,02
Lignoceric acid		0,29	±	0,18	0,23	±	0,06	0,18	±	0,06	0,16	±	0,02	0,21	±	0,09
Heptacosane		0,62	±	0,03	0,54	±	0,19	0,22	±	0,02	0,24	±	0,03	0,48	±	0,05
Methyl hydroxytetracosanoate	2-	0,40	±	0,20	0,21	±	0,09	0,04	±	0,06	0,10	±	0,01	0,22	±	0,06
γ-Tocopherol		0,23	±	0,05	0,27	±	0,10	0,25	±	0,06	0,15	±	0,02	0,15	±	0,02
Hentriacontane		0,60	±	0,27	0,78	±	0,27	0,39	±	0,08	0,36	±	0,03	0,71	±	0,05
α-Tocopherol		0,50	±	0,31	0,37	±	0,19	0,31	±	0,07	0,30	±	0,02	0,70	±	0,07
Stigmasterol		1,27	±	0,89	1,83	±	0,66	1,15	±	0,14	1,28	±	0,09	1,67	±	0,13
β-Sitosterol		1,32	±	0,94	0,72	±	0,26	0,43	±	0,06	0,37	±	0,03	0,39	±	0,03
β-Amyrin		1,63	±	0,48	1,38	±	0,57	0,91	±	0,19	1,05	±	0,14	1,16	±	0,16
α-Amyrin		0,41	±	0,33	0,22	±	0,10	0,05	±	0,09	0,18	±	0,03	0,19	±	0,05

<b>Ulvan-treated</b>		<b>Days</b>														
<b>Compound</b>																
	<b>1</b>			<b>2</b>			<b>3</b>			<b>6</b>			<b>9</b>			
<b>Relative area</b>																
Glycerol	0,09	±	0,01	0,17	±	0,05	0,14	±	0,02	0,26	±	0,02	0,74	±	0,12	
3-Octanol, 3,7-dimethyl-	0,07	±	0,01	0,10	±	0,03	0,10	±	0,02	0,14	±	0,04	1,29	±	0,05	
Dodecane, 2,7,10-trimethyl-	0,15	±	0,06	0,11	±	0,02	0,28	±	0,08	0,33	±	0,08	0,64	±	0,14	
Myristic acid	0,14	±	0,02	0,09	±	0,08	0,15	±	0,03	0,20	±	0,05	0,74	±	0,06	
Palmitoleic acid	0,04	±	0,01	0,02	±	0,03	0,06	±	0,02	0,09	±	0,02	1,02	±	0,00	
Palmitic Acid	11,46	±	0,38	13,26	±	0,39	13,47	±	0,32	22,04	±	0,39	55,60	±	12,80	
Lauric acid	0,06	±	0,02	0,02	±	0,03	0,93	±	0,14	0,10	±	0,02	0,64	±	0,82	
Margaric acid	0,12	±	0,03	0,16	±	0,04	0,16	±	0,02	0,28	±	0,06	0,84	±	0,24	
Linoleic acid	13,52	±	2,57	13,97	±	2,00	15,39	±	1,93	22,47	±	2,99	56,11	±	14,16	

$\alpha$ -Linolenic acid	4,60	± 1,08	5,24	± 0,98	5,63	± 0,84	7,68	± 0,98	17,69	± 3,28
Oleic acid	0,09	± 0,01	0,00	± 0,00	0,11	± 0,01	0,17	± 0,00	0,44	± 0,10
Stearic acid	2,71	± 0,45	3,48	± 0,50	3,34	± 0,52	5,30	± 0,53	14,72	± 4,94
Cetane	0,02	± 0,02	0,03	± 0,06	0,17	± 0,04	0,22	± 0,02	0,17	± 0,11
Arachidic acid	0,44	± 0,13	0,47	± 0,11	0,55	± 0,08	0,79	± 0,16	2,24	± 0,64
Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	0,09	± 0,03	0,09	± 0,08	0,07	± 0,02	0,17	± 0,04	0,40	± 0,14
Enanthic acid	0,02	± 0,02	0,00	± 0,00	0,09	± 0,04	0,10	± 0,02	0,38	± 0,20
1-Heptanol	0,08	± 0,01	0,13	± 0,03	0,09	± 0,02	0,17	± 0,02	0,99	± 0,14
11-(3,4-Dimethyl-5-pentyl-2-furyl)-dodecanoic methyl ester	0,28	± 0,07	0,33	± 0,20	0,15	± 0,04	0,32	± 0,08	0,00	± 0,00
Cerotic acid	0,27	± 0,05	0,40	± 0,15	0,25	± 0,04	0,59	± 0,16	1,57	± 0,42
1-Monopalmitin	0,77	± 0,17	0,75	± 0,21	0,38	± 0,10	0,98	± 0,18	1,17	± 0,09
Tridecanoic acid, methyl ester	0,08	± 0,02	0,05	± 0,06	0,08	± 0,02	0,20	± 0,01	0,39	± 0,13
Behenic acid	0,10	± 0,02	0,13	± 0,03	0,14	± 0,03	0,34	± 0,05	0,24	± 0,08
Chrysophanol	0,03	± 0,03	0,00	± 0,00	0,09	± 0,01	0,17	± 0,06	0,32	± 0,08
Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester	0,27	± 0,08	0,11	± 0,02	0,12	± 0,02	0,38	± 0,03	0,86	± 0,17
1-Monooleoylglycerol	1,43	± 0,31	0,31	± 0,09	0,17	± 0,04	0,48	± 0,10	0,70	± 0,05
Glycerol monostearate	0,23	± 0,08	0,30	± 0,05	0,22	± 0,00	0,42	± 0,05	0,66	± 0,27
Methyl 2-hydroxytetracosanoate	0,16	± 0,07	0,17	± 0,05	0,22	± 0,06	0,47	± 0,06	0,45	± 0,04
Heptacosane	0,53	± 0,11	0,52	± 0,13	0,75	± 0,09	1,53	± 0,19	2,53	± 0,97
$\gamma$ -Tocopherol	0,38	± 0,09	0,55	± 0,09	0,50	± 0,07	0,95	± 0,12	0,60	± 0,20
Hentriacontane	0,94	± 0,15	0,91	± 0,19	1,38	± 0,30	3,48	± 0,34	3,06	± 1,49
$\alpha$ -Tocopherol	0,56	± 0,17	0,81	± 0,11	1,09	± 0,24	2,67	± 0,47	3,03	± 0,40
Stigmasterol	1,37	± 0,34	2,04	± 0,43	2,43	± 0,38	4,82	± 0,66	6,14	± 1,13
$\beta$ -Sitosterol	0,69	± 0,14	1,02	± 0,24	1,08	± 0,11	1,71	± 0,26	2,56	± 0,66
$\beta$ -Amyrin	1,36	± 0,33	1,71	± 0,37	2,28	± 0,18	5,59	± 0,70	2,76	± 1,00
$\alpha$ -Amyrin	0,22	± 0,10	0,15	± 0,14	0,45	± 0,05	1,14	± 0,12	0,20	± 0,19

**Table S3.** Volatile organic compounds in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution after 1, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 hours of treatment.

Control Compound	Days after treatment																					
	1h		3h		6h		9h		12h		24h		48h									
	Relative area																					
Propane, 2-methoxy-2-methyl-n-Hexane	0,07	± 0,01	0,20	± 0,16	0,02	± 0,02	0,06	± 0,06	0,83	± 1,36	0,04	± 0,04	0,06	± 0,05								
Ethyl Acetate	0,07	± 0,04	0,05	± 0,03	0,03	± 0,03	0,06	± 0,02	0,05	± 0,07	0,08	± 0,06	0,14	± 0,12								
Butanal, 3-hydroxy-1-Penten-3-one	0,49	± 0,32	0,50	± 0,60	0,60	± 0,66	0,31	± 0,20	0,54	± 0,38	0,51	± 0,38	1,04	± 1,60								
Furan, 2-ethyl-1-Butanol, 3-methyl-2-Butenal, 2-methyl-2-Pental	0,02	± 0,02	0,09	± 0,08	0,09	± 0,06	0,40	± 0,54	0,10	± 0,07	0,44	± 0,53	0,62	± 0,64								
1-Pentan-3-one	0,30	± 0,05	0,22	± 0,14	0,52	± 0,39	0,34	± 0,04	0,40	± 0,14	0,28	± 0,18	0,41	± 0,20								
1-Pentanol	0,65	± 0,19	0,26	± 0,12	0,31	± 0,07	0,44	± 0,26	0,46	± 0,31	1,22	± 0,97	0,40	± 0,31								
Hexanal	0,73	± 0,22	0,50	± 0,13	0,86	± 0,06	1,14	± 0,28	0,47	± 0,01	2,20	± 0,31	1,96	± 0,33								
2-Hexenal	1,08	± 0,01	0,08	± 0,01	0,26	± 0,05	0,25	± 0,02	0,16	± 0,05	0,39	± 0,32	0,12	± 0,05								
1-Hexanol	0,14	± 0,04	0,05	± 7,04	0,15	± 0,02	0,18	± 0,03	0,19	± 0,04	0,30	± 0,02	0,10	± 0,07								
2-Heptanal	0,18	± 2,82	12,30	± 2,71	0,27	± 2,88	0,24	± 5,64	0,14	± 3,08	0,09	± 3,83	0,17	± 1,65								
1-Octen-3-one	34,74	± 12,31	29,48	± 2,09	33,28	± 0,79	39,98	± 2,01	43,59	± 0,85	22,20	± 2,02	14,85	± 1,32								
5-Hepten-2-one, 6-methyl-2,4-Heptadienal	28,46	± 0,01	7,41	± 0,07	11,36	± 0,24	15,44	± 0,66	14,01	± 0,02	8,71	± 0,03	5,64	± 0,14								
2-Octenal	0,03	± 0,02	0,07	± 0,10	0,19	± 0,12	0,47	± 0,13	0,07	± 0,04	0,06	± 0,05	0,23	± 0,05								
	0,15	± 0,02	0,24	± 0,00	0,68	± 0,21	0,55	± 0,26	0,94	± 0,01	0,40	± 0,01	0,28	± 0,01								
	0,05	± 0,15	0,01	± 0,07	0,41	± 0,19	0,49	± 0,31	0,07	± 0,04	0,04	± 0,11	0,04	± 0,09								
	1,02	± 0,01	0,31	± 0,04	0,60	± 0,03	0,86	± 0,03	0,83	± 0,01	0,89	± 0,02	0,64	± 0,05								
	0,07	± 0,03	0,05	± 0,13	0,05	± 0,02	0,05	± 0,08	0,09	± 0,11	0,04	± 0,07	0,05	± 0,06								
	0,09	± 0,39	0,12	± 0,82	0,09	± 0,48	0,11	± 0,47	0,14	± 0,20	0,14	± 0,13	0,11	± 0,54								

Nonanal	0,03	±	0,02	0,02	±	0,02	0,02	±	0,01	0,03	±	0,03	0,03	±	0,01	0,03	±	0,01	0,02	±	0,01
Phenylethyl Alcohol	0,08	±	0,04	0,02	±	0,03	0,07	±	0,04	0,04	±	0,09	0,07	±	0,04	0,05	±	0,02	0,02	±	0,03
Formic acid, octyl ester	0,06	±	0,02	0,02	±	0,01	0,06	±	0,01	0,09	±	0,01	0,06	±	0,01	0,05	±	0,00	0,05	±	0,00
Benzyl nitrile	0,02	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,02
1-Nonanol	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,01
Octanoic acid	0,02	±	0,02	0,01	±	0,00	0,02	±	0,00	0,01	±	0,00	0,02	±	0,02	0,02	±	0,04	0,01	±	0,01
α-Terpineol	0,02	±	0,00	0,00	±	0,01	0,01	±	0,01	0,01	±	0,01	0,03	±	0,00	0,04	±	0,00	0,01	±	0,00
Decanal	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,10	0,00	±	0,46
2-Propenoic acid, 6-methylheptyl ester	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,01	0,01	±	0,00	0,06	±	0,01	0,27	±	0,04
2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-	0,01	±	0,01	0,00	±	0,01	0,01	±	0,01	0,01	±	0,04	0,01	±	0,03	0,02	±	0,02	0,04	±	0,04
2,4-Decadienal	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,03	±	0,00	0,04	±	0,00	0,04	±	0,00	0,05	±	0,01	0,04	±	0,00
2-Buten-1-one, 1-(2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadien-1-yl)-	0,01	±	0,07	0,00	±	0,05	0,01	±	0,08	0,01	±	0,12	0,01	±	0,06	0,01	±	0,01	0,00	±	0,05
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	0,09	±	0,01	0,03	±	0,00	0,10	±	0,02	0,13	±	0,01	0,13	±	0,01	0,06	±	0,01	0,07	±	0,01
Trans-β-Ionone	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,01	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,01

Naphthalene, 1,6-dimethyl-4- (1- methylethyl)-	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,02	±	0,01	0,02	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00
Tetradecanoic acid	0,01	±	0,01	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,07	±	0,10
Octanoic acid, octyl ester	0,03	±	0,03	0,02	±	0,03	0,09	±	0,11	0,07	±	0,05	0,05	±	0,02	0,03	±	0,01	0,02	±	0,01
Palmitoleic acid	0,01	±	0,01	0,06	±	0,03	0,00	±	0,00	0,01	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,02	±	0,01
Palmitic acid	0,046	±	0,06	0,019	±	0,02	0,031	±		0,054	±	0,02	0,030	±	0,02	0,051	±	0,03	0,301	±	0,32

**Ulvan-treated****Days after treatment****Compound****1h****3h****6h****9h****12h****24h****48h****Relative area**

Propane, 2- methoxy-2- methyl- n-Hexane	0,022	±	0,01	0,200	±	0,31	0,085	±	0,04	0,357	±	0,29	0,041	±	0,05	0,132	±	0,14	0,163	±	0,19
Ethyl Acetate	0,213	±	0,27	0,558	±	0,42	0,137	±	0,03	0,267	±	0,17	0,152	±	0,12	0,324	±	0,22	0,261	±	0,14
1-Penten-3- one	0,347	±	0,30	0,398	±	0,18	0,487	±	0,50	0,380	±	0,04	0,167	±	0,08	0,594	±	0,75	0,682	±	0,84
	0,349	±	0,18	0,326	±	0,08	0,388	±	0,15	0,264	±	0,22	0,364	±	0,07	0,346	±	0,21	0,446	±	0,42

Furan, 2-ethyl-	0,278	±	0,02	0,433	±	0,28	0,507	±	0,13	0,875	±	0,29	0,251	±	0,23	0,687	±	0,49	0,709	±	0,55
Pentanal	0,106	±	0,05	0,103	±	0,05	0,238	±	0,10	0,516	±	0,54	0,077	±	0,06	0,413	±	0,47	0,189	±	0,22
2-Propanone, 1-hydroxy-	0,120	±	0,16	0,086	±	0,01	0,174	±	0,11	0,205	±	0,16	0,999	±	1,37	0,297	±	0,24	0,172	±	0,20
1-Butanol, 2- methyl-, (S)-	0,063	±	0,03	0,152	±	0,06	0,341	±	0,31	0,464	±	0,45	4,906	±	6,74	0,408	±	0,28	0,260	±	0,22
2-Pentenal	0,012	±	0,00	0,061	±	0,08	0,076	±	0,05	0,252	±	0,21	0,273	±	0,46	1,365	±	2,17	0,052	±	0,04
1-Pentanol	2,844	±	4,79	0,046	±	0,02	0,009	±	0,01	0,106	±	0,15	0,053	±	0,08	0,085	±	0,13	0,099	±	0,13
Toluene	0,051	±	0,05	0,047	±	0,02	3,283	±	5,67	0,032	±	0,03	0,154	±	0,27	1,829	±	2,96	0,088	±	0,14
Hexanal	5,448	±	3,31	12,428	±	3,31	10,174	±	0,92	11,838	±	3,12	1,651	±	1,34	6,024	±	1,55	3,690	±	0,92
2-Hexenal	0,866	±	0,22	5,210	±	2,77	1,449	±	0,68	14,727	±	8,42	0,279	±	0,10	0,338	±	0,10	6,204	±	3,44
1-Hexanol	0,188	±	0,10	0,199	±	0,17	0,622	±	0,91	0,043	±	0,01	0,005	±	0,00	0,151	±	0,23	0,060	±	0,06
1-Butanol, 3- methyl-, acetate	0,058	±	0,04	0,144	±	0,17	0,066	±	0,11	0,041	±	0,03	0,001	±	0,00	0,057	±	0,07	0,016	±	0,01
2,4-Hexadienal	0,128	±	0,16	1,526	±	2,00	0,250	±	0,07	4,068	±	6,66	0,065	±	0,07	0,103	±	0,09	0,067	±	0,01
2-Heptenal, (Z)-	0,116	±	0,12	0,303	±	0,25	0,153	±	0,18	0,081	±	0,05	0,059	±	0,07	0,103	±	0,12	0,068	±	0,04

5-Hepten-2-one, 6-methyl-	0,281	±	0,24	0,340	±	0,15	0,312	±	0,32	0,344	±	0,10	0,013	±	0,02	0,257	±	0,33	0,241	±	0,09
Furan, 2-pentyl-	0,203	±	0,27	0,142	±	0,07	0,252	±	0,34	0,204	±	0,14	0,006	±	0,01	0,074	±	0,06	0,157	±	0,14
5-Hepten-2-ol, 6-methyl-	0,103	±	0,05	0,114	±	0,07	0,082	±	0,06	0,119	±	0,09	0,006	±	0,01	0,075	±	0,06	0,043	±	0,06
3-Hexenoic acid	0,011	±	0,01	0,030	±	0,03	0,091	±	0,12	0,051	±	0,04	0,014	±	0,02	0,099	±	0,11	0,013	±	0,02
1-Octen-3-one	0,012	±	0,01	0,025	±	0,02	0,046	±	0,04	0,024	±	0,02	0,013	±	0,02	0,010	±	0,01	0,009	±	0,00
2-Octenal	0,132	±	0,11	0,041	±	0,02	0,091	±	0,10	0,080	±	0,04	0,024	±	0,04	0,082	±	0,10	0,120	±	0,10
Linalool	0,046	±	0,05	0,103	±	0,11	0,073	±	0,01	0,023	±	0,02	0,004	±	0,01	0,024	±	0,00	0,065	±	0,06
Nonanal	0,032	±	0,02	0,035	±	0,02	0,029	±	0,02	0,020	±	0,00	0,000	±	0,00	0,013	±	0,02	0,039	±	0,05
Phenylethyl Alcohol	0,090	±	0,09	0,183	±	0,07	0,147	±	0,10	0,100	±	0,10	0,012	±	0,02	0,073	±	0,03	0,047	±	0,01
Formic acid, octyl ester	0,068	±	0,03	0,051	±	0,03	0,059	±	0,03	0,050	±	0,04	0,020	±	0,02	0,037	±	0,03	0,057	±	0,02
Benzyl nitrile	0,025	±	0,00	0,023	±	0,01	0,018	±	0,01	0,050	±	0,03	0,014	±	0,02	0,016	±	0,00	0,013	±	0,00
Octanoic acid	0,012	±	0,00	0,016	±	0,00	0,026	±	0,01	0,025	±	0,02	0,013	±	0,02	0,017	±	0,01	0,013	±	0,00

1-Nonanol	0,005	±	0,01	0,004	±	0,00	0,001	±	0,00	0,002	±	0,00	0,000	±	0,00	0,000	±	0,00	0,004	±	0,01
α-Terpineol	0,007	±	0,01	0,021	±	0,01	0,017	±	0,01	0,008	±	0,01	0,002	±	0,00	0,005	±	0,00	0,015	±	0,01
Decanal	0,010	±	0,00	0,010	±	0,01	0,008	±	0,00	0,003	±	0,00	0,000	±	0,00	0,002	±	0,00	0,004	±	0,00
2,4-Decadienal	0,047	±	0,03	0,020	±	0,01	0,035	±	0,02	0,025	±	0,01	0,003	±	0,01	0,014	±	0,02	0,031	±	0,02
Benzene, (2-nitroethyl)-	0,025	±	0,01	0,024	±	0,00	0,014	±	0,01	0,014	±	0,01	0,001	±	0,00	0,003	±	0,01	0,006	±	0,00
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	0,101	±	0,06	0,110	±	0,10	0,113	±	0,10	0,059	±	0,03	0,004	±	0,00	0,045	±	0,06	0,033	±	0,01
3-Buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-	0,008	±	0,00	0,010	±	0,00	0,001	±	0,00	0,001	±	0,00	0,000	±	0,00	0,006	±	0,01	0,003	±	0,01
Pentadecane	0,005	±	0,00	0,005	±	0,00	0,009	±	0,01	0,003	±	0,00	0,003	±	0,00	0,008	±	0,01	0,003	±	0,00
Hexanoic acid, octyl ester	0,006	±	0,00	0,007	±	0,01	0,005	±	0,00	0,006	±	0,01	0,003	±	0,00	0,003	±	0,00	0,004	±	0,00



4-Pentenoic acid, 2-methyl-, octyl ester	0,004	±	0,00	0,007	±	0,01	0,005	±	0,00	0,006	±	0,01	0,001	±	0,00	0,002	±	0,00	0,004	±	0,00
Tetradecanoic acid	0,008	±	0,01	0,001	±	0,00	0,002	±	0,00	0,002	±	0,00	0,001	±	0,00	0,005	±	0,00	0,010	±	0,01
Octanoic acid, octyl ester	0,048	±	0,03	0,040	±	0,01	0,020	±	0,01	0,021	±	0,01	0,005	±	0,00	0,013	±	0,01	0,022	±	0,01
Palmitic acid	0,067	±	0,03	0,035	±	0,02	0,063	±	0,02	0,033	±	0,05	0,029	±	0,03	0,073	±	0,06	0,076	±	0,07

**Table S4.** Polar metabolites in tomato *Sweet Grape* – control and treated with ulvan solution in 1, 2, 3, 6 and 9 days of observation.

Control Compound	Days									
	1		2		3		6		9	
	Relative area									
Lactic Acid	0,43	± 0,1	0,33	± 0,1	0,18	± 0,2	0,42	± 0,2	0,73	± 0,3
L-Alanine	1,08	± 0,6	0,93	± 0,4	0,74	± 0,2	0,98	± 0,4	0,94	± 0,4
Oxalic acid	11,17	± 2,8	12,44	± 3,0	12,75	± 2,6	13,68	± 2,9	13,50	± 4,2
Pentitol	0,71	± 0,2	0,68	± 0,2	0,84	± 0,0	0,75	± 0,0	0,83	± 0,2

Malic acid	2,93	± 0,9	2,83	± 0,3	2,47	± 0,7	3,52	± 1,2	6,78	± 0,8
L-Aspartic acid	1,59	± 0,6	1,47	± 0,6	1,33	± 0,6	2,41	± 1,7	2,12	± 0,5
L-5-Oxoproline	1,20	± 0,4	1,89	± 0,8	1,51	± 0,7	6,52	± 4,3	1,66	± 0,2
γ-Aminobutyric acid	4,60	± 1,1	4,58	± 1,0	3,99	± 1,2	5,38	± 2,0	4,27	± 1,0
L-Glutamic acid	7,49	± 2,0	7,26	± 2,2	6,69	± 2,6	14,32	± 10,0	9,65	± 3,1
Putrescine	0,12	± 0,21	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,11	± 0,19	0,37	± 0,12
D-(-)-Tagatofuranose	18,93	± 1,4	9,17	± 8,5	9,71	± 3,5	31,76	± 9,1	27,24	± 3,6
Citric acid	56,09	± 3,0	47,57	± 4,7	52,78	± 8,2	90,66	± 29,2	76,00	± 14,2
D-(-)-Ribofuranose	12,01	± 3,3	5,40	± 0,7	4,49	± 2,2	2,86	± 1,2	18,81	± 11,4
D-Xylofuranose	7,24	± 1,6	3,90	± 2,1	2,67	± 1,6	11,10	± 2,1	12,08	± 5,4
Quinic acid	5,35	± 1,9	2,54	± 0,5	5,50	± 1,2	11,53	± 4,8	10,12	± 3,0
D-(-)-Fructose	366,76	± 17,62	315,56	± 20,29	318,56	± 18,92	611,54	± 25,59	605,18	± 37,76
D-Glucose	333,76	± 28,0	295,22	± 31,2	279,26	± 29,7	525,50	± 30,8	529,87	± 58,5
3-α-Mannobiose	2,10	± 0,5	1,92	± 0,6	2,09	± 1,1	2,87	± 1,3	3,81	± 1,4
Talose	43,69	± 5,0	20,73	± 23,8	19,15	± 8,3	38,91	± 20,8	60,78	± 26,1
Myo-Inositol	6,37	± 1,6	6,78	± 0,7	4,30	± 0,7	10,84	± 1,2	8,11	± 1,5
Galactose	6,49	± 1,0	2,70	± 1,9	5,51	± 1,1	3,41	± 2,2	12,38	± 1,6
D-Mannitol	0,74	± 0,3	0,54	± 0,1	0,47	± 0,2	0,85	± 0,8	3,82	± 0,6

D-Glucuronic acid	0,57	± 0,2	0,65	± 0,5	0,54	± 0,2	0,57	± 0,6	1,04	± 0,2
Sucrose	2,03	± 0,9	1,34	± 0,5	4,25	± 0,3	9,73	± 0,8	2,86	± 0,2

Ulvan-treated Compound	Days									
	1		2		3		6		9	
	Relative area									
Lactic Acid	0,30	± 0,1	0,47	± 0,1	0,54	± 0,1	0,53	± 0,3	1,43	± 0,1
L-Alanine	2,22	± 0,3	0,62	± 0,3	1,47	± 0,4	0,95	± 0,2	1,63	± 0,4
Oxalic acid	9,50	± 3,5	11,95	± 3,5	14,90	± 1,8	12,29	± 1,8	14,34	± 1,5
Pentitol	0,38	± 0,1	0,62	± 0,1	0,82	± 0,1	0,54	± 0,1	0,78	± 0,1
Malic acid	3,17	± 0,1	3,67	± 0,3	2,80	± 0,3	4,67	± 0,9	5,29	± 0,6
L-Aspartic acid	0,87	± 0,3	1,09	± 0,1	1,25	± 0,3	2,79	± 1,7	2,40	± 1,4
L-5-Oxoproline	2,43	± 0,4	1,99	± 0,0	1,77	± 0,6	2,74	± 1,1	3,49	± 1,1
γ-Aminobutyric acid	1,44	± 0,5	3,12	± 0,0	4,55	± 1,1	5,86	± 1,8	3,45	± 0,1
L-Glutamic acid	1,87	± 0,6	3,95	± 0,5	7,82	± 1,9	10,32	± 2,4	10,15	± 2,6

Putrescine	0,07	± 0,12	0,00	± 0,00	0,39	± 0,11	0,36	± 0,06	0,35	± 0,12
D-(-)-Tagatofuranose	14,77	± 3,5	15,15	± 8,0	102,75	± 13,4	17,59	± 0,5	28,15	± 16,0
Citric acid	29,36	± 4,6	50,33	± 4,0	65,54	± 1,7	62,49	± 4,4	69,29	± 13,0
D-(-)-Ribofuranose	2,89	± 0,0	1,13	± 2,0	14,55	± 1,4	13,25	± 9,3	22,13	± 11,1
D-Xylofuranose	2,96	± 0,5	3,90	± 0,8	11,39	± 3,2	6,31	± 0,3	11,73	± 6,1
Quinic acid	3,10	± 1,9	3,70	± 1,0	16,28	± 0,6	7,42	± 0,9	11,21	± 5,8
D-(-)-Fructose	184,07	± 3,01	208,92	± 2,93	348,05	± 2,02	268,16	± 1,30	385,05	± 9,74
D-Glucose	273,92	± 6,04	313,70	± 6,92	518,07	± 16,64	398,72	± 11,91	529,15	± 24,92
3- $\alpha$ -Mannobiose	1,79	± 0,7	1,44	± 0,1	2,83	± 0,2	2,83	± 0,6	3,79	± 1,2
Talose	13,42	± 7,2	19,99	± 0,0	64,19	± 8,1	40,58	± 11,9	60,47	± 29,2
L-Rhamnose	2,42	± 0,3	3,29	± 0,3	6,64	± 0,8	5,11	± 1,0	5,10	± 0,7
Myo-Inositol	2,66	± 0,3	1,97	± 0,2	3,69	± 1,0	3,33	± 0,6	10,01	± 1,3
Galactose	3,73	± 0,2	2,35	± 0,2	12,29	± 0,7	5,36	± 0,5	14,64	± 0,6
D-Mannitol	0,52	± 0,2	0,64	± 0,1	0,61	± 0,1	0,61	± 0,3	0,52	± 0,3
Sucrose	1,57	± 0,3	6,93	± 0,2	6,55	± 1,2	2,32	± 1,3	8,17	± 0,6

## 6. DISCUSSÃO

Ao longo do curso de nossos estudos sobre a metabolômica de frutos de tomates cv. *Sweet Grape* maduros na fase vermelha pós-colheita, buscamos avaliar os efeitos do tratamento com o polissacarídeo ulvana. Inicialmente, buscamos encontrar a melhor concentração e via de administração do polissacarídeo a fim de avaliar um possível efeito de biostimulação e/ou de eliciação mediante a determinação das atividades das enzimas relacionadas a defesa vegetal, como a PAL, CAT e APX. No decorrer da pesquisa, foram monitorados os perfis de metabólitos primários, tais como lipídios (ácidos graxos, esteroides, tocoferóis) e de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, carotenoides, e Compostos Orgânicos Voláteis (COVs), em uma abordagem metabolômica do tipo *non-targeted*, durante um período de nove dias após a aplicação do polissacarídeo. Também foi analisado o perfil do metabolismo secundário (flavonoides e carotenoides) em uma abordagem do tipo *targeted*, além da dosagem de vitamina C dos frutos tratados durante o mesmo período. Todas as determinações foram feitas mediante o uso de técnicas hífenadas, tais como: cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM), cromatografia de alta eficiência acoplada a um detector de diodos em rede (CLAE/DAD). Também foi acompanhado o efeito de aplicação de ulvana sobre tomates mantidos sob refrigeração e à temperatura ambiente. Por fim, foi realizado um ensaio de desafio onde o fruto foi tratado com o polissacarídeo e inoculado com o fitopatógeno *B. cinerea* três e seis dias após o tratamento, onde o objetivo era saber em que medida os frutos resistiam à contaminação.

Na literatura existem várias vias de administração em que eliciadores de diferentes naturezas ou coberturas comestíveis, as quais podem também ter função eliciadora, bioestimulante ou antimicrobiana em si, podem ser utilizadas em frutas. As vias de administração mais comuns são imersão, *spray*, escovação e, como uma das abordagens mais recentes o uso de impressoras 3D para depositar camada por camada a cobertura ou mesmo melhorar a aparência do vegetal e evitando o desperdício (Ungureanu *et al.*, 2023). Porém, em ensaios de laboratório para fins científicos, a administração desses agentes por vezes é feita via injeção direta no tecido vegetal. Existem trabalhos envolvendo a injeção de concentrações de óleos essenciais diversos (tomilho, sálvia, noz-moscada, eucalipto e cássia) contra *A.*

*alternata* (Feng & Zheng, 2007), ou de diferentes concentrações de óleo de citronela em frutos de tomates no pós-colheita contra o mesmo fitopatógeno (Chen *et al.*, 2014). Por essa razão, uma vez conhecida a melhor concentração de ulvana para o tratamento pós-colheita dos tomates, decidimos avaliar duas vias de administração: a imersão e a injeção. Inclusive, a melhor concentração de ulvana (1 mg/mL) é menor do que a testada para o pós-colheita de tomate, de acordo com patente desenvolvida por Briand *et al.* (2010). Os autores Briand *et al.* (2010) observaram que a ulvana (10 g/L) protegeu 42% dos tomates tratados por imersão por até 1 mês contra *B. cinerea* a 17 °C (Briand *et al.*, 2010). De acordo com nossos resultados a concentração de 1 mg/mL obteve uma taxa de cerca de 80% de proteção contra podridões a 10 °C  $\pm$  3 e de 90-100% sob 25 °C  $\pm$  2. Contudo, acreditamos que o maior diferencial da nossa pesquisa é a metabólica do processo, o que explica o ineditismo do trabalho.

A imersão, pela praticidade e visando uma aplicação industrial e abrangência de uma maior área de superfície de contato com o fruto, e a injeção como um contraponto de aspecto local. De maneira satisfatória, pudemos observar o sucesso da imersão frente a injeção, tanto pelo aspecto do fruto após o período de observação quanto pela atividade enzimática aumentada principalmente de PAL e de CAT no sexto e no nono dia após o tratamento, e APX inibida nos frutos tratados. Por outro lado, também observamos o aumento de atividade de PAL também no sexto dia, e de APX no terceiro dia nos frutos tratados. Porém, nada comparável com a intensidade observada no tratamento por imersão. A indução de resistência de vegetais, como o tomate, está associada a enzimas de defesa como  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase (CHI), quitosanase (CSN) e a fenilalanina amônia-liase (PAL), além das enzimas do sistema redox como a superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferases (GST), dehidroascorbato redutase (DHAR), as quais formam um conjunto complexo de mecanismos para minimizar, tamponar e eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS) de forma eficiente (Anand *et al.*, 2007; Appu *et al.*, 2021; Rajput *et al.*, 2021). Os antioxidantes são a primeira linha de defesa contra os danos causados pelos radicais livres e são essenciais para a integridade celular vegetal, pois a produção e o acúmulo de ROS promovem destruição severa de organelas e funções celulares causando peroxidação e danos na membrana celular, degradação molecular e morte celular. Dessa forma, eliminar

ROS é um dos determinantes mais importante para a tolerância e defesa vegetal a estresses (Miller *et al.* 2010; Rajput *et al.*, 2021).

Já a PAL, é uma enzima relacionada ao ponto de partida da via de biossíntese dos fenilpropanóides que atua catalisando a desaminação não oxidativa da fenilalanina, que é convertida em trans-cinamato. A PAL leva à resposta de resistência contra o estresse biótico desenvolvido pela infecção por patógenos e estresse abiótico em plantas desencadeada por irradiação UV, temperaturas extremas, deficiência de nutrientes e ferimentos (Fatima & Anjum, 2017). Este evento desempenha um papel notável na passagem do metabolismo primário para o secundário. Essa enzima está bastante envolvida na biossíntese do ácido salicílico (SA) e, conseqüentemente, é essencial para o funcionamento de toda a cascata de defesa da SAR. Por outro lado, SOD, POD e PPO agem para impedir o avanço da peroxidação lipídica da membrana e o estresse oxidativo desencadeado pelo ataque de patógenos (Cuéllar-Torres *et al.*, 2023). Por outro lado, a CAT é uma enzima antioxidante existente em todos os organismos aeróbicos e possui a função de catalisar a reação de conversão de  $H_2O_2$  em água e oxigênio de maneira energeticamente eficiente nas células expostas ao estresse ambiental. Esta enzima está presente em todos os principais locais de produção de  $H_2O_2$  como peroxissomos, mitocôndrias, citosol e cloroplastos, sendo essencial para o vegetal uma vez que a modulação de  $H_2O_2$  interfere direta ou indiretamente na transdução de sinais em plantas (Sharma & Ahmad, 2014). A reação de catálise ocorre em duas etapas (Rajput *et al.*, 2021): na primeira, o  $H_2O_2$  oxida o Fe presente na molécula de CAT, formando um peróxido de ferro intermediário (composto I) e a enzima pode então permanecer em repouso se a concentração de  $H_2O_2$  for baixa ou em um segundo momento se a concentração de  $H_2O_2$  for maior, o  $H_2O_2$  serve como um redutor para este peróxido intermediário regenerando a enzima e liberando água e oxigênio na segunda etapa. O peróxido de hidrogênio tem meia-vida longa em comparação com as outras ROS, sendo sintetizado após a dismutação do  $O_2^-$  pela SOD e também é gerado pela glicolato oxidase no peroxissomo (Mhamdi *et al.*, 2010). Tanto a CAT quanto a APX ajudam as plantas a lidar com os danos celulares induzidos pelo  $H_2O_2$ , mas a CAT é mais ativa mediante uma alta concentração de  $H_2O_2$  do que APX, pois CAT apresenta um  $K_M$  maior (Rajput *et al.*, 2021). Como o APX está presente em vários locais subcelulares, ele ajusta a atividade de eliminação (Palma *et al.*, 2020). A ascorbato peroxidase (APX) também é uma peroxidase a qual utiliza ascorbato (ácido ascórbico ou vitamina C) como um doador

de elétrons específico para eliminar  $H_2O_2$  em água e oxigênio (Rajput *et al.*, 2021). O ascorbato é um cofator bem conhecido em muitas reações enzimáticas, além de ser importante na defesa contra o estresse oxidativo, mas é continuamente oxidado por ROS geradas por estressores ambientais, como seca, salinidade, luz ultravioleta e temperaturas extremas. Por isso entra em ação a dehidroascorbato redutase (DHAR) que é considerada como uma enzima chave envolvida na reciclagem do ascorbato, que catalisa a redução dependente da glutathiona (GSH) do ascorbato oxidado, gerando ascorbato reduzido e desintoxicando as espécies reativas de oxigênio (ROS). O sistema de regeneração do ascorbato, o qual já é um antioxidante, é muito importante para manter a homeostase do mesmo contra estímulos externos (Do *et al.*, 2016). Contudo, nós observamos que a ulvana em geral reduz a atividade de APX. Existem certos bioestimulantes que demonstraram efeitos de redução na atividade da ascorbato peroxidase (APX), como evidenciado por um hidrolisado de proteína de alfafa (*Medicago sativa* L.) em milho (Ertani *et al.*, 2013) e da bactéria *Pseudomonas putida* no crescimento do trigo (*Triticum* spp.) sob estresse térmico (Ali *et al.*, 2011) em condições de estresse salino e térmico, respectivamente.

Popular como fruta ou aperitivo, o tomate *Sweet Grape* destaca-se por sua composição nutricional, sendo rico principalmente em açúcares, carotenoides como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno, vitamina C e outras vitaminas, além de minerais. Em comparação com o tomate de mesa tradicional, a cada 100g, o tomate médio de mesa inclui principalmente água, minerais e vitaminas. Em especial, a vitamina C em um tomate de mesa costuma apresentar uma concentração de 14 mg/100g no estágio “vermelho” de maturação (Singh *et al.*, 2016), enquanto que em nossas análises o tomate *Sweet Grape*, no estágio de maturação “vermelho” e ao longo de 9 dias de observação, apresentou em torno de 50 mg/100g tanto nos tomates tratados com ulvana quanto nos controles.

Essa rica composição nutricional, principalmente no que tange aos carotenoides, tem despertado interesse científico devido à possível capacidade de inibir o crescimento de tumores e induzir a apoptose em células cancerígenas. Os carotenóides são pigmentos produzidos por vegetais, macro e microalgas, fungos, leveduras e bactérias (Herrero *et al.*, 2012) que possuem cores amarela, laranja e vermelha que são compostos por um esqueleto de 40 carbonos de unidades de isopreno (C5) ligadas covalentemente, formando várias ligações duplas conjugadas e instáveis ocorrendo predominantemente ocorrem na forma *trans*, sendo alguns dos



principais em tomates o fitoeno, o licopeno, o  $\beta$ -caroteno e a luteína (Miller, 2014; Sun *et al.*, 2022). Dentre esses carotenoides, o mais abundante em tomate é o licopeno, seguido normalmente pelo fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, neurosporeno e luteína (Khachik *et al.*, 2002; Martí *et al.*, 2016). Essas moléculas possuem diversas funções, tais como: contribuem para a pigmentação de sementes, frutos e flores, tendo coevoluído com dispersores de sementes e polinizadores; são substratos para a produção de fitormônios derivados como o ácido abscísico (ABA) e a estrigolactona (SL); A sinalização de apocarotenóides, os quais são resultantes da degradação enzimática de carotenoides ou de reações iniciadas por espécies reativas de oxigênio, afeta o crescimento, o desenvolvimento e a resposta ao estresse vegetal, apesar de as moléculas de sinalização e as vias envolvidas não serem bem compreendidas (Yanishlieva *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2022). Os carotenóides também são indiretamente responsáveis pelo sabor e o *flavour* de vegetais como o tomate, atuando como precursores de compostos associados ao aroma, enquanto uma maior quantidade de clorofilas estimula a produção de açúcares por meio da fotossíntese, mas tais relações entre esses pigmentos ainda não são claras (Aono *et al.*, 2021). O *flavour* é caracterizado como a soma de uma complexa interação entre os receptores gustativos, os sistemas olfativos orto e retronasal, a textura na boca e a aparência visual do alimento (Shepherd, 2006). Além disso, os carotenoides também são precursores de compostos orgânicos voláteis (VOCs) que contribuem para o amadurecimento de frutos (Vogel *et al.*, 2010). No entanto, os carotenoides desempenham duas funções majoritárias: são pigmentos acessórios para fotossíntese e para a fotoproteção vegetal (Herrero *et al.*, 2012).

Como pigmento acessório para fotossíntese, os carotenoides absorvem energia luminosa e transferem para as moléculas de clorofilas no espectro 450-550 nm, o qual representa uma faixa que as clorofilas não absorvem, expandindo assim a faixa de comprimento de onda de luz para fotossíntese (Hashimoto *et al.*, 2016). Entretanto, os carotenoides desempenham papel fotoprotetor pois podem evitar danos causados pelo oxigênio singleto através da transferência de energia da porfirina excitada para o próprio carotenóide formando um carotenóide tripleto que, por ter uma energia muito baixa para transferência dessa energia adquirida retorna ao estado fundamental. Além desse mecanismo, também é possível a transferência de energia diretamente do oxigênio singleto para o carotenóide, formando também um carotenóide tripleto, o qual dissipa o calor e retorna ao estado fundamental (Burri,

2013). Os carotenoides são divididos em duas classes: os carotenos (exclusivamente hidrocarbonetos) e as xantofilas (possuem oxigênio) (Miller *et al.*, 2014). A respeito dessa via, tanto a incidência de luz quanto a produção de hormônios vegetais, como auxinas e etileno, têm sido relacionados com a regulação da produção de carotenoides durante o amadurecimento do fruto (Cruz *et al.*, 2018).

O amadurecimento do tomate está tradicionalmente associado às mudanças na cor do pericarpo devido ao acúmulo de pigmentos carotenoides e flavonoides (Shinozaki *et al.*, 2018), cuja concentração é dependente do grau de maturação, do genótipo e das condições ambientais a que o fruto é exposto (Martí *et al.*, 2016). Especificamente no fruto, a cor vermelha característica é resultado do acúmulo do carotenoide licopeno tanto na casca quanto na polpa da fruta (D'Ambrosio *et al.*, 2018). No entanto, apesar dos carotenoides estarem presentes no fruto inteiro, sua distribuição não é regular: o licopeno é encontrado em maior concentração no pericarpo quando comparado aos lóculos, enquanto a concentração de  $\beta$ -caroteno é maior nos lóculos do que no pericarpo. Por essa razão, escolhemos realizar nossas análises para esse estudo com frutos inteiros, congelados e moídos, a fim de obter uma amostragem mais fiel e representativa dos níveis de carotenoides. Além disso, a concentração de licopeno varia durante o processo de amadurecimento. Inicialmente começa a estar presente nos lóculos no estágio de quebra, e então sua concentração aumenta durante o processo de amadurecimento (Martí *et al.*, 2016). Normalmente, o teor de licopeno em tomates vermelhos maduros varia de 30-80  $\mu\text{g g}^{-1}$  de produto fresco, chegando a 150 a 300  $\mu\text{g g}^{-1}$  em espécies híbridas selecionadas (Stahl & Sies, 1999). Durante o amadurecimento do tomate, o teor de carotenóides aumenta entre 10 e 14 vezes, principalmente devido ao acúmulo de licopeno o qual aumenta de acordo com a progressão do amadurecimento do fruto (Quinet *et al.*, 2019). Em nossas análises, pudemos observar que o tratamento com ulvana aumentou os níveis de carotenoides em relação aos controles ao longo dos nove dias de análises, principalmente de licopeno,  $\beta$ -caroteno e fitoeno. Majoritariamente, os níveis de  $\beta$ -caroteno e licopeno aumentaram cerca de 25% em relação aos controles ao final do período de observação. Tendo em vista que um dos principais focos do melhoramento e engenharia genética vegetal é produzir alimentos com maiores conteúdos de carotenoides devido aos seus benefícios para a saúde de quem os consome, curiosamente tem sido reportado que é possível aumentar os conteúdos de carotenoides através da aplicação exógena de eliciadores.

Os principais fatores que regulam a produção de carotenoides vão desde o potencial genético e fatores transcricionais aos fatores ambientais, tais como intensidade de radiação, concentração de CO<sub>2</sub>, temperatura (Liu *et al.*, 2015), fitormônios e inclusive o metabolismo de açúcares, lipídios, chaperonas moleculares, transporte de energia/metabólitos e sistemas redox podem estar relacionados com o acúmulo desses terpenos (Egea *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2015; Heng *et al.*, 2019). Já entre os fatores ambientais que influenciam o metabolismo de carotenóides, um agente estressante em doses moderadas pode ser bastante eficaz e não promover senescência ou necrose (Poiroux-Gonord *et al.*, 2010), estresse esse que pode ser causado por um eliciador como a ulvana. O estresse influencia o acúmulo de carotenóides em tomates porque muitos carotenóides são antioxidantes e em alguns casos, é possível que libere energia no ciclo das xantofilas (Garcia-Plazaola *et al.*, 2012).Essencialmente, os carotenoides são moléculas nutricionalmente essenciais e importantes para a saúde, sendo a biofortificação de culturas com carotenóides sendo o alvo principal na pesquisa de carotenóides e, atualmente, as principais fontes para alimentação concentram-se em vegetais de folhas verdes e frutas coloridas como o próprio tomate (Sun *et al.*, 2022); Adicionalmente, os carotenoides tendem a ser mais biodisponíveis quando são incorporados em alimentos que possuem uma base lipídica ou quando aquecidos ou macerados, procedimentos esses que quebram a parede celular vegetal (Hammond & Renzi, 2013).

De acordo com nossas observações, o tratamento com ulvana promoveu aumentos significativos nos níveis de lipídios em geral nos tomates, principalmente de ácidos mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, linoleico e linolênico em relação aos controles ao longo de 9 dias, mas não para o ácido oleico. Durante o próprio processo de amadurecimento do fruto do tomate e principalmente nos estágios finais de maturação, é esperado que os ácidos graxos poliinsaturados aumentem sua concentração, estando o ácido linoléico (C18:2n6c) em maior quantidade (42,3 - 49,2%), seguido dos ácidos oléico (C18:1n9c; 20,1 - 26,6%) e palmítico (C16:0; 16,6 - 17,7%); contudo, a proporção de ácido oleico em relação aos ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolênico, vai decaindo com o avançar do processo de maturação (Saini *et al.*, 2017). Especificamente, os níveis de ácido oleico (C18:1) em tomates decrescem durante a maturação porque esse ácido é convertido em ácido linoléico (C18:2) no retículo endoplasmático, sendo essa fase crítica para o acúmulo de ácidos graxos poliinsaturados em sementes e outros tecidos, e esta reação é catalisada por uma

$\Delta$ 12-dessaturase, ÁCIDO GRAXO DESATURASE2 (FAD2) (Lee *et al.*, 2020). Como o tratamento com ulvana reduziu drasticamente os níveis de ácido oleico nos tomates em relação aos controles, provavelmente o polissacarídeo aumente a atividade dessa enzima e, portanto, o acúmulo de ácido linoleico e também do ácido  $\alpha$ -linolênico, que também é seu produto de conversão.

Entre os esteróides presentes em tomates, os mais importantes são o estigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol. Em tomates, esteróis como estigmasterol aumentam normalmente com o amadurecimento do fruto devido ao aumento do fator de transcrição LeSD1 e tradução, o que também acelera a dessaturação C-22 do seu precursor o  $\beta$ -sitosterol (Whitaker & Gapper, 2008). Esse aumento é de ocorrência esperada em frutos climatéricos, cuja respiração intensa e a produção de etileno estão associadas com o aumento de  $H_2O_2$ , peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e, a fim de equilibrar esse desbalanço oxidativo o aumento ou manutenção dos níveis de tocoferol pode ajudar, devido a esses compostos possuírem atividade de vitamina E e serem potentes antioxidantes lipossolúveis (Quadrana *et al.*, 2013). Os níveis dos estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e de  $\alpha$ -tocoferol apresentaram tendências semelhantes de aumento pronunciado, e por isso, sugerimos que o tratamento com ulvana acelere a atividade do fator de transcrição LeSD1 e tradução. Dentre os tocóis, o  $\alpha$ -tocoferol é o principal tocoferol em tomates em todos os seus estágios de desenvolvimento, principalmente nos estágios finais, tendendo a aumentar o seu teor (Moco *et al.*; 2007; Saini *et al.*, 2017). Inclusive, a degradação da clorofila em função do amadurecimento do fruto também favorece a biossíntese de tocóis, uma vez que o fitil-difosfato derivado da degradação da clorofila é utilizado na biossíntese de tocoferol (Almeida *et al.*, 2015).

Por outro lado, a comparação dos níveis de açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos entre as amostras tratadas e os controles aparentemente indica que a aplicação do polissacarídeo não influenciou, de forma perceptível, o metabolismo dessas moléculas. O acúmulo de açúcares resultantes do metabolismo da sacarose é regulado por três enzimas principais: sacarose-fosfato sintase (SPS), sacarose sintase (SS) e invertase (Ivr). A SPS catalisa catalisa a reação entre uridina difosfato glicose (UDPG) e frutose 6-fosfato para sintetizar sacarose 6-fosfato a qual é hidrolisada por sacarose fosfato fosfatase (SPP) para produzir sacarose; o antisenso da sacarose sintase1 do fruto do tomate (SuSy1) reduz a capacidade de descarga de sacarose e afeta o acúmulo de amido e o desenvolvimento do fruto; já as invertases

catalisam irreversivelmente a degradação da sacarose em glicose e frutose (Zhu *et al.*, 2022). Notavelmente, as quantidades tanto de açúcares quanto de ácidos orgânicos dependem do estágio de maturação dos frutos, onde uma série de processos bioquímicos estimulam a conversão do tomate verde e, portanto, de sabor ácido, em uma fruta de sabor doce (Padmanabhan *et al.*, 2016). Em condições normais, a glicose é o açúcar predominante nas frutas verdes, enquanto as frutas maduras apresentam relativamente mais frutose e então os açúcares totais diminuem novamente (Andelini *et al.*, 2023). Porém, aparentemente há uma inibição do metabolismo da sacarose logo nos primeiros dias após o tratamento com o polissacarídeo, retardando a sua conversão. Já o mio-inositol (MI), é um poliol sintetizado a partir da glicose, e está envolvido na via de sinalização, na produção de moléculas relacionadas ao estresse, na biossíntese da parede celular e é um precursor do ácido ascórbico (Munir *et al.*, 2020). Uma vez que, a via de oxidação do mio-inositol o consome, é considerado um passo importante para a síntese de polissacarídeos da parede celular (Ye *et al.*, 2016). Além disso, em plantas superiores, o mio-inositol é integrado ao fosfato de fosfatidilinositol, polifosfatos de MI e certas moléculas sinalizadoras de esfingolípídeos. Essas substâncias desempenham papéis diversos em processos como síntese de solutos (como galactinol e oligossacarídeos da família da rafinose), tolerância ao estresse e regulação da morte celular. O ácido D-glucurônico (GlcA), produto da oxidação do mio-inositol, é empregado na síntese de pectina da parede celular e em compostos não celulósicos (Hu *et al.*, 2020). Na via de oxidação do mio-inositol, uma enzima monooxigenase conhecida como mio-inositol oxigenase (MIOX), produzida sob condições de privação de açúcar para gerar fontes alternativas de açúcar, catalisa o processo de conversão de mio-inositol em ácido D-glucurônico (Munir *et al.*, 2020). Esse fato ajudaria também a explicar os baixos níveis de mio-inositol nos frutos tratados, se este estiver sendo consumido para uma maior síntese de parede celular vegetal, colaborando com a resistência do tecido do fruto contra o fungo *B. cinerea* em nossos experimentos de desafio.

A avaliação, ao longo de 48 horas, dos COVs emitidos nos levou a concluir que a redução perceptível na emissão de hexanal e 2-hexenal, os dois compostos voláteis aldeídicos mais abundantes, nos frutos tratados indica uma eventual inibição das lipoxigenases envolvidas na produção deles pela oxidação de ácidos oleico e linoleico, respectivamente. Dentre os COVs que são derivados de ácidos graxos, os principais que aumentam a concentração durante o amadurecimento são do tipo C6 (1-hexanol,

(Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenal, hexanal, e em menor quantidade os do tipo C5 (1-penten-3-one) e são conhecidos como voláteis de folhas verdes devido ao seu aroma que remete ao da grama cortada (Klee, 2010; Rambla *et al.*, 2014). Os ácidos C18 linoléico e linolênico através da sua degradação lipídica catalisada pelas enzimas lipoxigenase (TomLoxC) e 13-hidroperóxido liase (13-HPL) produzem os voláteis C<sub>6</sub> de cadeia curta aldeídos como hexanal, cis-3-hexenal, 1-hexanol e o C5 1-penten-3-ona (Rambla *et al.*, 2014). Outros voláteis derivados de ácidos graxos, tais como 1-penten-3-ona, 1-penten-3-ol, trans-2-pentenal, pentanal e pentanol são sintetizados através do envolvimento de uma isoforma da lipoxigenase do tomate (Shen *et al.*, 2014). A biossíntese desses voláteis propriamente dita ocorre quando a separação entre esses substratos e algumas enzimas é perdida devido à ruptura dos tecidos celulares e também durante o amadurecimento (Chen *et al.*, 2004). Existem mais de 400 compostos orgânicos voláteis (COVs) detectados nesses frutos, mas apenas cerca de 15 a 20 deles estão em quantidades suficientes para serem perceptíveis pelo olfato humano (Mathieu *et al.*, 2009; Zanor *et al.*, 2009). O papel natural dos COVs está essencialmente relacionado à comunicação, seja para atrair polinizadores, ou em resposta ao ataque de herbívoros ou colonização por microrganismos patogênicos ou não, ou ainda a própria sinalização e comunicação entre plantas (Bouwmeester *et al.*, 2019). Existem estudos que mostram que a liberação dessas moléculas pode ativar ou estimular, um estado conhecido como *priming*, respostas de defesa (Heil & Karban, 2010; Ameye *et al.*, 2018). Inclusive, é possível que plantas próximas expostas a voláteis de vizinhos danificados fiquem mais resistentes a herbívoros (Karban *et al.*, 2014).

Já foi observado que é possível utilizar os VOCs na agricultura para diferentes finalidades: os isoprenoides emitidos pelas folhas podem estimular um efeito protetor contra estresses abióticos, suprimindo espécies reativas de oxigênio (ERO ou do inglês, ROS) ou fortalecendo as membranas celulares; podem inibir o crescimento de fitopatógenos *in vitro*; repelir herbívoros e atrair de parasitas de herbívoros; induzir a síntese de proteínas de defesa e metabólitos vegetais como as fitoalexinas para inibir a colonização de patógenos; podem atuar como indutores de *priming* para o acúmulo de fatores de transcrição que facilitem a expressão mais rápida das defesas vegetais aumentando assim a resistência a um possível futuro episódio de estresse; podem interagir com o mecanismo de maturação ou serem explorados na alelopatia para o controle de plantas daninhas, por exemplo (Brilli *et al.*, 2019).

Já dentre os COVs derivados de aminoácidos, existe a categoria dos fenólicos (derivados de fenilalanina) e dos de cadeia ramificada (baixo peso molecular e alta volatilidade) (Rambla *et al.*, 2014). Como os níveis de aminoácidos dos tomates tratados com ulvana estão ligeiramente mais baixos ou nos mesmos níveis dos controles, é compreensível também os níveis baixos desses COVs. De maneira geral, a biossíntese de voláteis fenólicos ocorre partindo de aminoácidos aromáticos descarboxilases que descarboxilam a fenilalanina em feniletilamina, que é então convertida em 2-fenilacetonitrila, 1-nitro-2-feniletano ou 2-fenilacetaldeído por meio de uma série de reações ainda não completamente compreendidas. Em seguida, o 2-fenilacetaldeído é reduzido para 2-feniletanol através de enzimas da família das fenilacetaldeído redutases (LePAR1 e LePAR2) cuja síntese não é constante durante a maturação do tomate (Tieman *et al.*, 2007). Ambos 2-feniletanol e 2-fenilacetaldeído são voláteis fenólicos importantes que conferem notas frutadas e de nozes aos frutos do tomate, enquanto que o 1-nitro-2-fenetano apresenta um aroma terroso (Wang *et al.*, 2017). Por outro lado, a via biossintética dos fenólicos derivados de aminoácidos de cadeia ramificada ainda não é bem elucidada (Distefano *et al.*, 2022). No entanto, é possível que se inicie a partir de um  $\alpha$ -cetoácido ou de um aminoácido (Klee *et al.*, 2010), da seguinte forma: aminotransferases localizadas nos cloroplastos, mitocôndrias e citoplasma catalisam a transaminação de valina, leucina e isoleucina em  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (Gonda *et al.*, 2010), produzindo voláteis como 3-metilbutanal/ol, 2-metilbutanal/ol e 2-isobutil-tiazol os quais emitem notas terrosas, de tomateiro, verdes e também que remetem a mofo (Kochevenko *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017).

Por fim, a classe dos voláteis derivados de carotenoides deriva justamente da degradação dos carotenóides, os chamados apocarotenoides, e está correlacionada com a progressão do amadurecimento dos frutos do tomateiro (Distefano *et al.*, 2022). Esses voláteis, possuem uma produção não linear e sua concentração em geral é baixa, sendo resultante principalmente do acúmulo de licopeno (Rambla *et al.*, 2014). Embora em concentrações bastante baixas, os mesmos são conhecidos por conferirem notas florais e frutadas ao tomate e aumentar a valorização do produto pelos consumidores (Simkin *et al.*, 2021). A síntese desses voláteis em particular inicia-se em tomates maduros, através das enzimas LeCCD1A e LeCCD1B, presentes no citoplasma, que realizam a clivagem oxidativa de vários carotenóides lineares, nas posições 5,6, 7,8 ou 9,10 e de carotenóides cíclicos na posição 9,10. Levando a

formação de dialdeídos e cetonas e de vários voláteis C13, como por exemplo a pseudoionona, a  $\beta$ -ionona, a 6-metil-5-hepten-2-ona, a  $\beta$ -damascenona e a geranilacetona, que são geradas pela clivagem oxidativa de fitoeno, fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno e neurosporeno (Simkin *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2017). Em tomates, a clivagem LeCCD1 do licopeno na posição 5,6 leva a formação de 6-metil-5-hepten-2-ona, ao qual são associados o sabor de tomate e o aroma floral doce dos tomates (Vogel *et al.*, 2010). Curiosamente, apesar de LeCCD1A e LeCCD1B sejam as principais enzimas responsáveis pela formação de apocarotenóides, as dioxigenases de clivagem de carotenóides CCD4 e CCD7, presentes nos plastídeos, podem gerar voláteis a partir de  $\beta$ -caroteno, de luteína e de violaxantina (Rottet *et al.*, 2016).

Por tudo o que foi exposto, é importante salientar que os voláteis emitidos pelo vegetal são dependentes tanto do seu *background* genético, quanto das práticas pré-colheita (enxertia, local de plantio, época de colheita, fertilização e irrigação) e pós-colheita (condições de armazenamento e adição de defensivos) a que foi submetido (Distefano *et al.*, 2022). A respeito da genética, a variabilidade de voláteis derivados de ácidos graxos entre os genótipos de tomate é bastante; por outro lado, o conhecimento sobre a síntese e regulação dessa classe é ainda prematuro (Distefano *et al.*, 2022). A inibição observada na emissão de compostos orgânicos voláteis (VOCs) em tomates tratados com ulvana e o impacto nos níveis de carotenoides como licopeno e  $\beta$ -caroteno, bem como a modulação positiva nos lipídios, nesses tomates oferecem informações valiosas que abrem perspectivas importantes para estratégias de defesa pós-colheita e produção de alimentos com perfis sensoriais e nutricionais aprimorados. São necessárias mais pesquisas para compreender completamente os mecanismos subjacentes dessas modificações e otimizar as condições de aplicação da ulvana para maximizar seus benefícios na indústria de alimentos.

Observamos também o papel da refrigeração como colaborador no tratamento com ulvana, reduzindo o surgimento de podridões. Os tomates tratados com ulvana e mantidos sob refrigeração ( $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ ) apresentaram 80% de proteção contra o aparecimento de podridões após 32 dias de observação em comparação com os controles (58%). Já os tomates tratados e mantidos sob temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) obtiveram um índice de proteção ligeiramente maior (90%) que os controles (80%). Com base em nossas descobertas, observou-se que a refrigeração a  $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$  (configuração típica de geladeiras domésticas) apresentou eficácia muito parecida na



prevenção do desenvolvimento de mofo em tomates com a da temperatura ambiente. Contudo, essa condição de armazenamento acarretou na indesejável redução da firmeza das frutas e no conseqüente amolecimento. Essa observação alinha-se com as conclusões de Farneti *et al.* (2010), os quais notaram padrões semelhantes de amolecimento em tomates mantidos em temperaturas entre 4°C (a mais desfavorável) e 15°C. Uma pesquisa conduzida por Dew *et al.* (2016) revelou que tomates manifestam respostas fisiológicas aprimoradas após sete dias de armazenamento quando submetidos a temperaturas superiores a 15°C, ultrapassando as temperaturas ambientais típicas na cadeia de abastecimento convencional do Reino Unido, geralmente em torno de 12°C. Simultaneamente, o armazenamento refrigerado no nível do consumidor frequentemente compromete os atributos de firmeza dos tomates. Entretanto, a refrigeração, quando precedida por um tratamento com polissacarídeo, retarda o processo de decomposição, prolongando, assim, a vida útil de frutas como os tomates, conforme respaldado por relatos recentes. Essa constatação foi observada por Ali *et al.* (2024), cujas conclusões indicaram que revestimentos comestíveis CS-LVN (quitosana+levana, 30 mL de LVN em solução de CS 1% (p/v)), CS-MCLG (quitosana+mucilagem, 30 mL de MCLG em solução de CS 1% (p/v)), e CS-MCLG-LVN (quitosana+mucilagem+levana, 30 mL de LVN e 30 mL de MCLG em solução de CS 1% (p/v)) efetivamente preservaram a qualidade pós-colheita de tomates tipo cocktail por até 30 dias. Esse período coincide com nossos resultados com ulvana, que estendeu a vida útil dos tomates por até 32 dias. Conforme relatado por Mushi *et al.* (2023), tomates revestidos com filmes feitos de quitina, especialmente aqueles feitos de DeChNF (nanofibrilas de quitina desacetilada) e plastificados com mel, demonstraram resistência superior à perda de peso e uma vida útil prolongada de até 20 dias quando armazenados em uma geladeira a 9°C. Adicionalmente, um estudo realizado por Asiamah *et al.* (2023) investigou o impacto de três revestimentos comestíveis de polissacarídeos - carboximetil celulose (CMC), goma xantana (GX) e pectina - na qualidade pós-colheita e na estabilidade antioxidante de frutas de tomate. O estudo ocorreu em condições ambiente (25°C, umidade relativa: 80–85%) e em condições refrigeradas (5°C, umidade relativa: 80–85%) ao longo de um período de 14 dias. Os pesquisadores concluíram que o revestimento comestível de polissacarídeo (2g) reduziu significativamente a permeabilidade ao vapor d'água, preservou licopeno, ácido ascórbico, cor, sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), teor de umidade e pH. Dessa forma, os resultados do estudo sugerem que os

atributos de qualidade pós-colheita de frutas de tomate podem ser aprimorados por meio de revestimentos comestíveis de polissacarídeos, especialmente em condições de armazenamento refrigerado (Asiamah *et al.*, 2023). E de acordo com nossos resultados, o tratamento dos tomates via imersão em solução de ulvana também. Embora a diferença na proteção contra podridões não seja muito alta, é necessário trazer esses fatos para o cotidiano, o que o experimento do desafio com o *B. cinerea* pode exemplificar melhor: nesse experimento criamos uma porta de entrada através da inoculação do fitopatógeno, mimetizando condições reais que acontecem durante o transporte e armazenamento; e o que observamos foi que os tomates tratados com ulvana resistiam a infecção, impedindo que o fungo se alastrasse. Observamos também que no sexto dia após o tratamento, essa resposta de resistência era mais efetiva do que quando inoculamos o fungo no terceiro dia após o tratamento. Dessa forma, em condições controladas e sem exposição a fissuras que facilitem a entrada do fitopatógeno, é razoável que não haja uma diferença tão grande entre tratados e controles, ao menos em temperatura ambiente.

Durante nossos estudos, também percebemos que o tratamento com ulvana estimula a produção de polifenóis nos frutos de tomate, sendo os polifenóis típicos dessa solanácea os flavonoides, derivados de fenilpropanoides, derivados do ácido quínico, ácidos fenólicos livres e derivados do ácido hidroxibenzóico (Cruz-Carrión *et al.*, 2022). Já as antocianinas, estas estão mais presentes em tecidos como o hipocótilo e também no caule e nas folhas, mediante estresse por luz ou frio em concentrações mais baixas que a dos carotenoides (Martí *et al.*, 2016). No geral, os polifenóis estão em ordem da maior para a menor concentração, desta forma: naringenina chalcona > rutina > quercetina > ácido clorogênico > ácido cafeico e derivados > naringenina > caenferol-3-rutinosídeo > ácido *p*-cumárico > ácido ferúlico > kaempferol > miricetina > cianidina > pelargonidina > delphinidina (Martí *et al.*, 2016). Além desses, os ácidos e derivados hidroxibenzóicos, derivados de fenilpropanoides e ácidos hidroxicinamoilquínicos, como os mono-, di e tricafeoilquínicos, estando estes dois últimos em elevadas concentrações em tomates de variedades diferentes (Cruz-Carrión *et al.*, 2022). Os flavonóides são compostos secundários comumente encontrados em frutas, ervas, caules, cereais, nozes, vegetais, flores e sementes (Ullah *et al.*, 2020). A biossíntese natural dos flavonoides ocorre pela via dos fenilpropanoides enquanto a fenilalanina é sintetizada pela via do chiquimato (Liu *et al.*, 2021). Possuem um esqueleto de carbono C6-C3-C6 formado por dois anéis

benzênicos de 6 carbonos ligados por um anel heterocíclico de 3 carbonos, e que podem ser classificados em 12 subgrupos: chalconas, estilbenos, auronas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flobafenos, diidroflavonóis, flavonóis, leucoantocianidinas, proantocianidinas e antocianinas (Liu *et al.*, 2021) e sua atividade biológica depende de como são absorvidos e de sua biodisponibilidade (Ullah *et al.*, 2020).

No tomate, os principais flavonoides incluem uma chalcona, a naringenina chalcona, e um flavonol, a rutina (quercetina-rutinosídeo), além de kaempferol, quercetina e miricetina (Bovy *et al.*, 2007; Vela-Hinojosa *et al.*, 2019). Esses compostos têm sido extensivamente utilizados devido às suas propriedades anticancerígenas, antimicrobianas, antivirais, antiangiogênicas, antimaláricas, antioxidantes, neuroprotetoras, antitumorais e antiproliferativas (Ullah *et al.*, 2020). Além disso, desempenham papéis em uma ampla gama de processos biológicos. Isso inclui a contribuição para a pigmentação de flores, frutos e sementes, atraindo polinizadores e ajudando na disseminação das sementes; protegem as plantas contra os danos causados pela exposição à luz ultravioleta; influenciam a fertilidade das plantas e desempenham um papel na germinação do pólen, bem como atuam como moléculas sinalizadoras nas interações entre plantas e microrganismos; além disso, funcionam como mecanismos de defesa contra microrganismos patogênicos (Bovy *et al.*, 2007), cujas principais estratégias encontram-se descritas. Através da Análise de Componentes Principais, observamos que o tratamento com ulvana afetou positivamente a produção de compostos fenólicos, principalmente relacionados aos ácidos cafeoilquínicos e, provavelmente, à lignina. De acordo com Ghitti *et al.* (2022), os flavonoides são capazes de atuar como antimicrobianos e como agentes iniciadores das respostas de defesa das plantas para reagir rapidamente à percepção da infecção. Como antimicrobianos, a contribuição dos flavonoides para fortalecer a defesa das plantas é evidenciada por sua atuação como fitoalexinas ou como fitoanticipinas. As fitoalexinas são moléculas de defesa produzidas em resposta a patógenos com propriedades antibacterianas e antifúngicas, enquanto que as fitoanticipinas são moléculas pré-existentes produzidas e armazenadas antes do contato com o patógeno, prontas para uma resposta de defesa rápida quando necessária pela planta (De Coninck *et al.*, 2015); contudo, mediante a presença de um eliciador microbiano, é possível que uma fitoanticipina possa ser convertida em fitoalexina (Gutiérrez-Albanchez *et al.*, 2020). De fato, os flavonoides têm a

capacidade de atuar como inibidores do *quorum-sensing* (QSI) através de diversos mecanismos, como a diminuição na produção de moléculas sinalizadoras, a interrupção da comunicação entre células, a formação de biofilme e a competição por locais de ligação nos receptores, simulando moléculas sinalizadoras (Ghitti *et al.*, 2022). Como agentes pró-oxidantes, os flavonoides podem desencadear uma explosão oxidativa e deposição calosa nas células hospedeiras, embora como esses mecanismos podem aumentar a resistência das plantas aos patógenos ainda não seja bem esclarecido (Ghitti *et al.*, 2022).

Ainda em se tratando de defesa vegetal, o primeiro passo geral na via dos fenilpropanoides é desencadeado pela fenilalanina amônia-liase (PAL), através da desaminação da fenilalanina para ácido trans-cinâmico. Além disso, a PAL desempenha um papel fundamental na regulação do fluxo de carbono do metabolismo primário para o secundário nas plantas (Liu *et al.*, 2015). Já a segunda etapa da via dos fenilpropanoides envolve a atividade do C4H, uma monooxigenase de citocromo P450 em plantas, que catalisa a hidroxilação do ácido trans-cinâmico para gerar ácido *p*-cumárico, que é também a primeira reação de oxidação na via de síntese de flavonoides. A expressão do gene C4H em plantas como o *Populus trichocarpa* e a *Arabidopsis thaliana* está associada ao teor de lignina, um importante metabólito fenilpropanoide (Liu *et al.*, 2015). A lignina é o segundo maior recurso de biomassa do planeta (atrás apenas da celulose), sendo um polissacarídeo essencial e majoritário da parede celular vegetal, proporcionando fortalecimento e atuando como uma barreira física contra patógenos (Zhang *et al.*, 2022). Inclusive, tanto a atividade da PAL quanto de C4H são necessárias para a síntese de lignina (Shi *et al.*, 2022). Logo, pode-se inferir que uma atividade aumentada dessas enzimas está relacionada com um aumento do reforço de lignina na parede celular do vegetal, conferindo maior resistência à mesma. Já na terceira etapa da via fenilpropanoide, a CoA ligase (4CL) catalisa a formação de *p*-cumaroil-CoA pela adição de uma unidade de coenzima A (CoA) ao ácido *p*-cumárico. O gene 4CL em plantas normalmente existe como uma família, com diferentes membros exibindo principalmente especificidades de substrato. Em resposta ao estresse, a atividade da 4CL em plantas também está positivamente correlacionada com o conteúdo de antocianinas e flavonóis (Liu *et al.*, 2015). O aumento de compostos fenólicos pode ser explicado pela alta atividade da PAL e possivelmente de lignina. Na verdade, o provável aumento na produção de lignina (Giménez *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2023) pode ser uma das chaves para

entender como a ulvana atua na defesa contra *B. cinerea*, atrasando sua colonização nos frutos. O acúmulo de flavonóides em tomates, concentra sua produção principalmente no epicarpo, enquanto que no mesocarpo, a via dos flavonóides está inativa pela falta de expressão dos genes de biossíntese dos flavonoides (Colliver *et al.*, 2002). Logo, assim como os carotenoides, sua produção não é homogênea em todo o fruto, o que também nos ajudou a decidir por trabalhar com frutos inteiros de tomate. De forma semelhante, a presença de quercetina e de glicosídeos de kaempferol é estimada em aproximadamente 98% no pericarpo do fruto (Stewart *et al.*, 2000). Inclusive, a síntese dos flavonoides nesses frutos é desenvolvida em estágios específicos: um exemplo disso é a naringenina chalcona, a qual se acumula predominantemente na casca simultaneamente ao acúmulo de carotenóides e consequente degradação de clorofilas, atingindo o pico em pericarpos maduros (Muir *et al.*, 2001). Porém, também é possível incrementar ou reduzir esse acúmulo de flavonoides através de bioestimulação em tomates, mediante aplicação exógena de substâncias cuja eficiência varia dependendo da espécie tratada e da dosagem aplicada (Klokić *et al.*, 2020).

Sem dúvida, o sexto dia após o tratamento é um dia-chave e notável para o aumento da atividade enzimática, compostos fenólicos e até glicoalcaloides, como o esculeosídeo A. Em relação ao aumento nos níveis de esculeosídeo A, embora os glicoalcaloides esteroidais estejam relacionados à defesa das plantas (Panda *et al.*, 2022), esse mecanismo ainda não está bem elucidado, mas essas substâncias podem desempenhar um papel na defesa do fruto, um fato apoiado por outras descobertas recentes na literatura sobre essa molécula (Fabian *et al.*, 2023). Por outro lado, o esculeosídeo A possui sabor adocicado e seu aumento possivelmente infere um aumento na doçura desses frutos. Alcaloides são compostos básicos orgânicos de origem vegetal ou microbiana. Para alcaloides cíclicos a classificação está baseada no precursor biossintético (principalmente aminoácidos), sendo classificados em diversas categorias, como por exemplo indólicos, purínicos, quinolínicos, isoquinolínicos, tropânicos, imidazólicos, entre outros (Dey *et al.*, 2020). Do ponto de vista medicinal, os alcaloides são notáveis por atuarem como anestésicos, cardioprotetores e agentes anti-inflamatórios, além de alguns possuírem propriedades alucinógenas; por outro lado, nos vegetais os alcaloides têm a função de protegê-las contra predadores, regular seu crescimento (Heinrich *et al.*, 2021) e também de proteção contra fungos, bactérias, vírus, e insetos (Friedman, 2002). Tais moléculas

são predominantes nas seguintes famílias botânicas: Apocynaceae, Annonaceae, Amaryllidaceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Gnetaceae, Liliaceae, Leguminosae, Lauraceae, Loganiaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Rutaceae, Rubiaceae, Ranunculaceae e Solanaceae, à qual o tomate pertence (Dey *et al.*, 2020).

No tomate, ocorre a predominância de alcaloides esteroidais como o esculeosídeo A e a tomatina, os quais exibem propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas e anti-hiperlipidêmicas. À medida que o fruto amadurece, a tomatina presente no tomate imaturo se converte em esculeosídeo A (Ngo *et al.*, 2022); inclusive, o aumento da produção de etileno regula o aumento do acúmulo desse esculeosídeo (Iijima *et al.*, 2009). Tomates verdes imaturos podem conter até 500 mg de  $\alpha$ -tomatina por quilograma de peso da fruta fresca. Conforme o tomate amadurece, o composto sofre uma degradação considerável, chegando a níveis de cerca de 5 mg por quilograma de peso da fruta fresca em tomates vermelhos maduros (Friedman, 2002). De uma forma mais detalhada, a  $\alpha$ -tomatina é uma saponina glicoalcaloide esteroide que passa por um processo de transformação à medida que o tomate amadurece, sendo sintetizada a partir do colesterol, cuja biossíntese e metabolismo tem sido estudado extensivamente (Sawai *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023). Pesquisas recentes sugerem que a  $\alpha$ -tomatina é armazenada nos vacúolos, e sua conversão em esculeosídeo A ocorre no citosol. A proteína transportadora GORKY, localizada na membrana do tonoplasto, é responsável por transportar a  $\alpha$ -tomatina do vacúolo para o citosol, facilitando a conversão metabólica e tornando o fruto mais palatável, sendo por isso indispensável para barrar o amargor do fruto (Kazachkova *et al.*, 2021). Essencialmente, para o vegetal, a tomatina atua como um antimicrobiano, sendo considerada prevalentemente como uma fitoanticipina, principalmente através da disrupção da membrana plasmática do patógeno, apesar de haver questionamento se esse seria seu único modo de ação (You & van Kan, 2020). Mas pode também atuar como uma fitoalexina, sendo eliciada através do ataque de fungos fitopatogênicos, como a *Alternaria solani* (Shinde *et al.*, 2017). Como possui sabor amargo, previne o ataque de insetos herbívoros; apesar disso, existem enzimas nesses insetos, as CAZimas – GH3, GH10 ou GH43, que removem a porção terminal de glicose, a porção terminal de xilose ou todo o grupo licotetraose, respectivamente – fornecem um belo exemplo de evolução independente e

convergente em várias bactérias e fungos patogênicos para a desintoxicação de um potente antimicrobiano.

De acordo com You & van Kan (2020), vale ressaltar que os produtos resultantes da degradação enzimática da  $\alpha$ -tomatina, como  $\beta$ 2-tomatina, tomatidina e licotetraose, têm a capacidade de influenciar a resposta imune em plantas. Isso sugere que a remoção de partes de açúcar beneficia um microrganismo patogênico de duas maneiras: diminuindo a atividade de permeabilidade da membrana da  $\alpha$ -tomatina e reduzindo o mecanismo de defesa da planta. Esses autores, em sua revisão de literatura concluem que o impacto dos metabólitos antimicrobianos das plantas na resposta imune das plantas, através de mecanismos além de sua toxicidade direta para os microrganismos, merece uma análise mais aprofundada. Observou-se que a glicosilação de esteróis em tomates torna as próprias plantas mais tolerantes à toxicidade da  $\alpha$ -tomatina. Isso levanta a questão de se os microrganismos, especialmente os patógenos que afetam os tomates, poderiam proteger suas membranas através da glicosilação de seus esteróis, seja como um mecanismo constitutivo ou em resposta à presença da  $\alpha$ -tomatina (You & van Kan, 2020). Embora a  $\alpha$ -tomatina seja reconhecida na defesa contra fitopatógenos, pouco se sabe sobre as contribuições de glicoalcaloides esteroidais, como o esculeosídeos e derivados, nessa temática em tomates; contudo, existem evidências que apoiam o papel de esculeosídeos e derivados na defesa contra antracnose causada por *Colletotrichum* no tomate maduro (Fabian *et al.*, 2023).

As observações feitas até o momento indicam que a aplicação de ulvana em tomates maduros estendeu o tempo de prateleira e afetou seus atributos sensoriais e valor nutricional de forma positiva, exceto em relação aos COVs. O fato de termos demonstrado recentemente que o ulvan obtido a partir de *U. fasciata* cultivada é semelhante ao obtido de populações selvagens, sendo uma fonte potencial para obter esse polissacarídeo em maior escala (Figueira *et al.*, 2020), abre caminhos para o uso do polissacarídeo de *U. fasciata* como um bioestimulante/eliciador sustentável no cultivo de tomates. Este relato é o primeiro sobre os efeitos da ulvana como eliciador e bioestimulante para frutos do tomate no pós-colheita.

## 7. CONCLUSÃO GERAL

- A concentração mais eficaz do polissacarídeo ulvana para a preservação de tomates *Sweet Grape* foi estabelecida.
- O polissacarídeo não possui atividade direta contra *B. cinerea*, conforme evidenciado pelo ensaio de Concentração Mínima Inibitória (CMI).
- A administração mais adequada do polissacarídeo foi a imersão em solução aquosa, demonstrando o desencadeamento da atividade de enzimas relacionadas com a defesa vegetal (PAL, CAT e APX).
- O tratamento com ulvana sob imersão prolongou o tempo de prateleira dos tomates, especialmente quando associado à refrigeração.
- A ulvana causou aumentos notáveis em ácidos graxos, esteroides, terpenos, hidrocarbonetos de cadeia longa e na maioria dos carotenoides avaliados, sugerindo seu papel como bioestimulante. No entanto, o ácido ascórbico, os aminoácidos e os açúcares não foram significativamente afetados.
- O aumento da atividade da PAL impactou a produção de compostos fenólicos, principalmente dos ácidos cafeoilquínicos e possivelmente na síntese de lignina, contribuindo para a defesa contra *B. cinerea* no ensaio de desafio a partir do sexto dia após o tratamento.
- A ulvana influenciou positivamente os níveis de esculeosídeo A e tomatina, possivelmente afetando o sabor do fruto de maneira mais doce.
- O sexto dia após o tratamento é o dia emblemático para o estabelecimento do *priming*, vide o aumento da atividade das enzimas relacionadas com a defesa vegetal, do perfil lipídico e de polifenóis e glicoalcaloides esteroidais.



- A emissão de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) foi inibida nos tomates tratados com ulvana, especialmente hexanal e 2-hexenal, mais do que nos frutos inoculados com *B. cinerea*.
- Em resumo, a ulvana mostrou eficácia como bioestimulante e eliciadora em frutos de tomate no pós-colheita, especialmente a partir do sexto dia após o tratamento.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDULLAH-ZAWAWI, M. R. *et al.* Multi-Omics Approaches and Resources for Systems-Level Gene Function Prediction in the Plant Kingdom. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2614, 1 out. 2022. DOI: 10.3390/plants11192614.

ABOURAÏCHA, E. *et al.* Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 121–128, jan. 2015. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.11.002.

AFIFAH, E. N. *et al.* Metabolomics approach for the analysis of resistance of four tomato genotypes (*Solanum lycopersicum* L.) to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). **Open Life Sciences**, v. 14, n. 1, p. 141–149, 6 abr. 2019. DOI: 10.1515/biol-2019-0016.

AITOUGUINANE, M. *et al.* Induction of natural defenses in tomato seedlings by using alginate and oligoalginates derivatives extracted from moroccan brown algae. **Marine Drugs**, v. 18, n. 10, 1 out. 2020. DOI: 10.3390/md18100521.

ALEXANDERSSON, E. *et al.* Plant resistance inducers against pathogens in Solanaceae species-from molecular mechanisms to field application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1673, 1 out. 2016. DOI: 10.3390/ijms17101673.

ALFOSEA-SIMÓN, M. *et al.* Physiological, nutritional and metabolomic responses of tomato plants after the foliar application of amino acids aspartic acid, glutamic acid and alanine. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 581234, 7 jan. 2021. DOI: 10.3389/fpls.2020.581234.

ALI, M. Y. *et al.* Nutritional composition and bioactive compounds in tomatoes and their impact on human health and disease: a review. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 1, 26 dez. 2020. DOI: 10.3390/foods10010045.

ALI, Q. *et al.* Shelf life of cocktail tomato extended with chitosan, chia mucilage and levan. **Scientia Horticulturae**, v. 323, p. 112500–112500, 1 jan. 2024. DOI: 10.1016/j.scienta.2023.112500.

ALI, S. Z. *et al.* Effect of inoculation with a thermotolerant plant growth promoting *Pseudomonas putida* strain AKMP7 on growth of wheat (*Triticum* spp.) under heat stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, n. 4, p. 239–246, dez. 2011. DOI: 10.1080/17429145.2010.545147.

ALMEIDA, J. *et al.* Fruits from ripening impaired, chlorophyll degraded and jasmonate insensitive tomato mutants have altered tocopherol content and composition, **Phytochemistry**, v. 111, p. 72–83, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.11.007.

ALVES, A. *et al.* A practical perspective on ulvan extracted from green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 407–424, 1 abr. 2013. DOI: 10.1007/s10811-012-9875-4. DOI: 10.1007/s10811-012-9875-4.

AMEYE, M. *et al.* Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. **New Phytologist**, v. 220, p. 655–658., 1 nov. 2018. DOI: 10.1111/nph.14671.

ANAND, T. *et al.* Association of some plant defense enzyme activities with systemic resistance to early leaf blight and leaf spot induced in tomato plants by azoxystrobin and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Plant Interactions**, v. 2, n. 4, p. 233–244, dez. 2007. DOI: 10.1080/17429140701708985.

ANDELINI, M. *et al.* Sugar and organic acid content is dependent on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) peel color. **Horticulturae**, v. 9, n. 3, 1 mar. 2023. DOI: 10.3390/horticulturae9030313.

ANWAR, R. *et al.* Tomatoes - A model crop of solanaceous plants. **Oxford University Press**. p. 1-50, 2019. DOI: 10.1093/acrefore/9780199389414.013.223.

AONO, Y. *et al.* High-throughput chlorophyll and carotenoid profiling reveals positive associations with sugar and apocarotenoid volatile content in fruits of tomato varieties in modern and wild accessions. **Metabolites**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2021. DOI: 10.3390/metabo11060398.

APPU, M. *et al.* An overview of plant defense-related enzymes responses to biotic stresses. **Plant Gene**, v. 27, p. 100302, set. 2021.

ASIAMA, E. *et al.* Enhancing the functional and physicochemical properties of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit through polysaccharides edible dipping technique coating under various storage conditions. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 30, p. 100373–100373, 1 nov. 2023. DOI: 10.1016/j.bcdf.2023.100373.

BAI, C. *et al.* Transcriptomics and metabolomics analyses provide insights into postharvest ripening and senescence of tomato fruit under low temperature. **Horticultural Plant Journal**, v. 9, n. 1, p.109-121, 2023. DOI: 10.1016/j.hpj.2021.09.001.

BALDWIN, E. *et al.* Effect of 1-methylcyclopropene on tomato flavour components, shelf life and decay as influenced by harvest maturity and storage

temperature. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 6, p. 969–980, 18 fev. 2011. DOI: 10.1002/jsfa.4281.

BANU A, T. *et al.* Effect of seaweed coating on quality characteristics and shelf life of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Food Science and Human Wellness**, v. 9, n. 2, p. 176-183, jun. 2020. DOI: 10.1016/j.fshw.2020.03.002.

BARAKAT, K. M. *et al.* Chemical characterization and biological activities of ulvan extracted from *Ulva fasciata* (Chlorophyta). **Rendiconti lincei. Scienze fisiche e naturali**, v. 33, n. 4, p. 829–841, 13 out. 2022. DOI: 10.1007/s12210-022-01103-7.

BARTZ, J. **Disease management: Postharvest Diseases of Tomato**. IPM Florida. Disponível em: [https://ipm.ifas.ufl.edu/pdfs/Postharvest\\_Disorders.pdf](https://ipm.ifas.ufl.edu/pdfs/Postharvest_Disorders.pdf). Acesso: 20 out. 2023.

BAWEJA, P. *et al.* Biology of seaweeds. In: Fleurence, J.; Ira Levine, I. (Eds.). **Seaweed in Health and Disease Prevention** (pp. 41-106). Elsevier Inc. 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-802772-1.00003-8.

BOLHASSANI, A. *et al.* Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1290, 2017. DOI: 10.1111/bph.v174.11/issuetoc.

BOUWMEESTER, H. *et al.* The role of volatiles in plant communication. **Plant Journal**, v. 100, n. 5, p. 892–907, 1 dez. 2019. DOI: 10.1111/tpj.14496.

BOVIER, E.; HAMMOND, B. The Macular Carotenoids Lutein and Zeaxanthin Are Related to Increased Bone Density in Young Healthy Adults. **Foods**, v. 6, n. 9, p. 78, 7 set. 2017. DOI: 10.3390/foods6090078.

BOVY, A., SCHIJLEN, E., HALL, R. D. Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): The potential for metabolomics. **Metabolomics**, v. 3, p. 399–412, set. 2007. DOI: 10.1007/s11306-007-0074-2.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7; n. 72, p. 248-54, 7 mai. 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

BRANDÃO-FILHO, J. U. T. *et al.* Solanaceas. **Hortaliças-fruto**, EDUEM, 2018. p. 37–70. DOI: 10.7476/9786586383010.0004.

BRASIL. **Instrução normativa nº 33, de 18 de julho de 2018(\*)**. Disponível em: <https://portal-homol.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-33-de-18-de-julho-de-2018-34026719#:~:text=MERCADO%20COMUM%20RESOLVE%3A,Art.,eles%20e%20C3%A0s%20importa%C3%A7%C3%B5es%20extrazona>. Acesso: 12 de jul. 2021.

BRASIL. **Portaria MAPA Nº 458, de 21 de julho de 2022. Altera a Instrução Normativa nº 69, de 6 de novembro de 2018, que estabelece o Regulamento Técnico definindo os requisitos mínimos de identidade e qualidade para**

**Produtos Hortícolas.** 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mapa-n-458-de-21-de-julho-de-2022-417054494>. Acesso em: 16 out. 2023.

BRIAND, X. *et al.* **Ulvan as activators of plant defense and resistance reactions against biotic or abiotic stresses.** 2010. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US7820176B2/en>. Acesso em: 15 mai. 2018.

BRILLI, F. *et al.* Exploiting plant volatile organic compounds (VOCS) in agriculture to improve sustainable defense strategies and productivity of crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–8, 7 mar. 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00264.

BURRI, B. J., Carotenoids: chemistry, sources and physiology. In: **Encyclopedia of Human Nutrition**, Elsevier Inc., 2012. v. 1–4. p. 283–291. DOI: 10.1016/B978-0-12-375083-9.00044-1.

CANAL RURAL. **Variedade de tomate conquista produtores e consumidores.** 2010. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/agricultura/variedade-tomate-conquista-produtores-consumidores-20586/>. Acesso: 13 mai. 2022.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, 1 jan. 2018. DOI: 10.21577/0100-4042.20170134.

CARRARI, F., FERNIE, A. R. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. 57, jun. 2006. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 9, p. 1883–1897, jun. 2006. DOI: 10.1093/jxb/erj020.

CHATTERJEE, M. *et al.* Biological activity of carotenoids: its implications in cancer risk and prevention. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 180-90, jan. 2012. DOI: 10.2174/138920112798868683.

CHEN, G. *et al.* Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. **Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 2641–2651, 2004. DOI: 10.1104/pp.104.041608.

CHEN, Q. *et al.* Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2441–2447, 2014. DOI: 10.1002/jsfa.6576.

CHI, Y. *et al.* Structural characterization of ulvan extracted from *Ulva clathrata* assisted by an ulvan lyase. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, 1 fev. 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115497.

CHIQUITO-CONTRERAS, R. G. *et al.* Effect of marine bacteria and ulvan on the activity of antioxidant defense enzymes and the bio-protection of papaya fruit against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, 1 dez. 2019. DOI: 10.3390/antiox8120580.

CLUZET, S. *et al.* Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, n. 7, p. 917–928, jul. 2004. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01197.x.

COIAI, S. *et al.* Rosmarinic acid and ulvan from terrestrial and marine sources in anti-microbial bionanosystems and biomaterials. **Applied Sciences**, v. 11, n. 19, p. 9249, 5 out. 2021. DOI: 10.3390/app11199249.

COKER, C. *et al.* Grape tomatoes as a potential crop for growers and consumers in the southeastern United States. **Journal of Horticulture**, v. 05, n. 01, 2018. DOI: 10.4172/2376-0354.1000225.

COLANTONIO, V. *et al.* Metabolomic selection for enhanced fruit flavor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 7, 15 fev. 2022. DOI: 10.1073/pnas.2115865119.

COLLIVER, S. *et al.* Improving the nutritional content of tomatoes through reprogramming their flavonoid biosynthetic pathway. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 113–123, 2002. DOI: 10.1023/A:1015848724102.

CORREIA, P. R. M., FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, abr. 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200042.

COSTA, C. *et al.* Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 537–546, 2 abr. 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.12.041.

CRUZ, A. B. *et al.* Light, ethylene and auxin signaling interaction regulates carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening, **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 18 set. 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01370.

CRUZ-CARRIÓN, Á. *et al.* (Poly)phenolic composition of tomatoes from different growing locations and their absorption in rats: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 388, 15 set. 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132984.

CUÉLLAR-TORRES, E. A. *et al.* Molecular aspects revealed by omics technologies related to the defense system activation in fruits in response to elicitors: a review. **Horticulturae**, v. 9, n. 5, p. 558, 1 maio 2023. DOI: 10.3390/horticulturae9050558.

CUNHA, A. H. N. *et al.* Sweet Grape mini tomato grown in culture substrates and effluent with nutrient complementation. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 4, p. 707–715, jul. 2014. DOI: 10.1590/S0100-69162014000400010.

D'AMBROSIO, C. *et al.* CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato. **Transgenic Research**, v. 27, n. 4, p. 367–378, 1 ago. 2018. DOI: 10.1007/s11248-018-0079-9.

DA PAIXÃO, C. F. C. *et al.* Quality of sweet-grape tomatoes grown under different nitrogen rates and sources. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 34, n. 6, p. 480–486, 2022. DOI: 10.9755/ejfa.2022.v34.i6.2824.

DANG, B. T. *et al.* Current application of algae derivatives for bioplastic production: A review. **Bioresource Technology**, v. 347, p. 126698, 1 mar. 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.126698.

DE BORBA *et al.* The Algal Polysaccharide Ulvan Induces Resistance in Wheat Against *Zymoseptoria tritici* Without Major Alteration of Leaf Metabolome. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 6 set. 2021.

DE CONINCK, B. *et al.* What lies beneath: belowground defense strategies in plants. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 2, p. 91-101 1 fev. 2015. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.09.007.

DEMSAR, J. *et al.* Orange: data mining toolbox in Python. **Journal of Machine Learning Research**, v. 14, p. 2349–2353, 2013. DOI: 10.5555/2567709.2567736.

DEY, P. *et al.* Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). **Recent Advances in Natural Products Analysis**, p. 505–567, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9.

DEW, R. *et al.* Effects of temperature conditions during transport and storage on tomato fruit quality. **Acta Horticulturae**, n. 1120, p. 317–322, jul. 2016.

DISTEFANO, M. *et al.* Aroma volatiles in tomato fruits: the role of genetic, preharvest and postharvest factors. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 376, 2 fev. 2022. DOI:10.3390/agronomy12020376.

DO, H. *et al.* Structural understanding of the recycling of oxidized ascorbate by dehydroascorbate reductase (OsDHAR) from *Oryza sativa* L. japonica. **Scientific Reports**, v. 6, 18 jan. 2016. DOI: 10.1038/srep19498.

DOS S. COSTA *et al.* Extension of solanaceae food crops shelf life by the use of elicitors and sustainable practices during postharvest phase. **Food and Bioprocess Technology**, v. 15, n. 2, p. 249–274, 2 out. 2021. DOI: 10.1007/s11947-021-02713-z.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, nov. 2015. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.021.

EGEA, I. *et al.* Chromoplast differentiation: Current status and perspectives, **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 10, p. 1601–1611, out. 2010. DOI: 10.1093/pcp/pcq136.

EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, p. 18–26, ago. 2018. DOI: 10.1016/j.abb.2018.06.001.

EISELE, T. G. *et al.* Genotyping and phenotyping of grape tomato hybrids aiming at possible genitors for breeding program, **Horticultura Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 352–359, 2022. DOI: 10.1590/s0102-0536-20220401.

EL MODAFAR, C. *et al.* Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**, 138: 55-63. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.02.011.

EMBRAPA. **BRS Zamir: tomate híbrido cereja 'grape' rico em licopeno**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1058570/brs-zamir-tomate-hibrido-cereja-grape-rico-em-licopeno>. Acesso: 15 set. 2023.

ERIKA, C. *et al.* Flavor and Other Quality Traits of Tomato Cultivars Bred for Diverse Production Systems as Revealed in Organic Low-Input Management. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 14 jul. 2022.. DOI: 10.3389/fnut.2022.916642.

ERTANI, A. *et al.* Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant and Soil**, v. 364, n. 1-2, p. 145–158, 11 jul. 2012. DOI: 10.1007/s11104-012-1335-z

FABIAN, M. L. *et al.* Steroidal glycoalkaloids contribute to anthracnose resistance in *Solanum lycopersicum*, **Journal of Experimental Botany**, v. 74, n. 12, p. 3700–3713, 27 jun. 2023. DOI: 10.1093/jxb/erad108.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023. Crops and livestock products. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 16 out. 2023.

FARID, R. *et al.* Effect of microalgae polysaccharides on biochemical and metabolomics pathways related to plant defense in *Solanum lycopersicum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 1, p. 225–240, mai. 2019. DOI: 10.1007/s12010-018-2916-y.

FARNETI, B. *et al.* Effect of home-refrigerator storage temperature on tomato quality. **Acta Horticulturae**, n. 877, p. 1191–1196, nov. 2010. DOI: 10.17660/ActaHortic.2010.877.162.

FATIMA, S., ANJUM, T. Identification of a potential ISR determinant from *Pseudomonas aeruginosa* PM12 against fusarium wilt in tomato, **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 31 maio 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00848.

FENG, W.; ZHENG, X. D. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v. 18, p. 1126–1130, 2007. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.05.017.

FERNANDES, A. A. *et al.* Cultivo sucessivo de plantas de tomate oriundas de sementes e propagação vegetativa em sistema hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1013–1019, 1 jul. 2007. DOI: 10.1590/S0100-204X2007000700014.

FERNANDES, I. A. *et al.* Influence of crop system fruit quality, carotenoids, fatty acids and phenolic compounds in cherry tomatoes. **Agricultural Research**, v. 10, n. 1, p. 56–65, 17 out. 2021. DOI: 10.1007/s40003-020-00478-z.

FERREIRA, M. *et al.* Post-harvest quality of fresh-marketed tomatoes as a function of harvest periods qualidade do tomate de mesa em função da época de colheita. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 446–451, set. 2005. DOI: 10.1590/S0103-90162005000500006.

FEYAERTS, A. F. *et al.* Assay and recommendations for the detection of vapour-phase-mediated antimicrobial activities. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 32, n. 5, p. 347–353, 2017. DOI: 10.1002/ffj.3400.

FIEHN, O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1-2, p. 155-171, jan. 2002.

FIGUEIRA, T. A, DA SILVA, A. J. R., PRAST, A. E., *et al.* Structural characterization of ulvan polysaccharide from cultivated and collected *Ulva fasciata* (Chlorophyta). **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 11, p. 206-216, 2020. DOI: 10.4236/abb.2020.115016.

FRIEDMAN, M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5751–5780, 9 out. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf020560c>.

FUJIMORI, T. Measuring Tools for Metabolomics. In: Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, KH., Yokota, H. (eds). **Encyclopedia of Systems Biology**. Springer, New York, NY. 2013. Disponível em: [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4419-9863-7\\_1153](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4419-9863-7_1153). Acesso: 13 de nov. 2022.

GAO, Y. *et al.* Out of water: The ORI in and earl diversification of plant R-genes. **Plant Physiology**, v. 177, n. 1, p. 82–89, 2018. DOI: 10.1104/pp.18.00185.

GEBHARDT, C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, p. 2281–2294, 2016. DOI: 10.1007/s00122-016-2804-1.

GHITTI, E. *et al.* Flavonoids are intra-and inter-kingdom modulator signals. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2479, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10122479

GIMÉNEZ, E. *et al.* Functional analysis of the arlequin mutant corroborates the essential role of the ARLEQUIN/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. **PLOS ONE**, v. 5, n. 12, p. e14427–e14427, 23 dez. 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0014427.

GÓMEZ-ROMERO, M. *et al.* Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 71, n. 16, p. 1848–1864, 2010. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.08.002.



GONDA, I. *et al.* Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit, **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 4, p. 1111–1123, fev. 2010. DOI: 10.1093/jxb/erp390.

GONG, T. *et al.* Tomato fruit quality is more strongly affected by scion type and planting season than by rootstock type, **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 15 dez. 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.948556.

GUILHERME, D. O. *et al.* Análise sensorial e físico-química de frutos tomate cereja orgânicos. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 1, p. 181 – 186, jan. – mar., 2014.

GÜL AKILLIOĞLU, H. *et al.* Investigation and kinetic evaluation of furan formation in tomato paste and pulp during heating. **Food Research International**, v. 78, p. 224–230, dez. 2015. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.10.005.

GUTIÉRREZ-ALBANCHEZ, E. *et al.* Elicitation with *Bacillus* QV15 reveals a pivotal role of F3H on flavonoid metabolism improving adaptation to biotic stress in blackberry. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, 1 maio 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0232626.

GUTIÉRREZ-GAMBOA, G. *et al.* Effects on chlorophyll and carotenoid contents in different grape varieties (*Vitis vinifera* L.) after nitrogen and elicitor foliar applications to the vineyard. **Food Chemistry**, v. 269, p. 380–386, 15 dez. 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.019.

HALDER, M. *et al.* Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 12, p. 880-895, 25 jul. 2019. DOI: 10.1002/elsc.201900058.

HAMMOND, B. R., RENZI, L. M. Carotenoids. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 474–476, 2013. DOI: 10.3945/an.113.004028.

HASHIMOTO, H. *et al.* Carotenoids and photosynthesis. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 79, p. 111–139, 1 ago. 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-39126-7\_4.

HEIL, M.; KARBAN, R. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 3, p. 137–144, mar. 2010. DOI: 10.1016/j.tree.2009.09.010.

HEINRICH, M. *et al.* Alkaloids used as medicines: Structural phytochemistry meets biodiversity—An update and forward look. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1836, 25 mar. 2021. DOI: 10.3390/molecules26071836.

HENG, Z. *et al.* Integrated proteomic and metabolomic analysis suggests high rates of glycolysis are likely required to support high carotenoid accumulation in banana pulp. **Food Chemistry**, v. 297, 1 nov. 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125016.

HU, L. *et al.* Myo-inositol mediates reactive oxygen species-induced programmed cell death via salicylic acid-dependent and ethylene-dependent pathways in apple. **Horticulture Research**, v. 7, n. 1, 1 set. 2020.

HUA, L. *et al.* Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 3, p. 111–119, 1 set. 2018. DOI: 10.1093/fqsafe/fyy016.

IBRAHIM, M. I. A. *et al.* Considerable production of ulvan from *Ulva lactuca* with special emphasis on its antimicrobial and anti-fouling properties. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 7, p. 3097–3118, 1 jul. 2022. DOI: 10.1007/s12010-022-03867-y.

IJJIMA, Y. *et al.* Involvement of ethylene in the accumulation of esculeoside A during fruit ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3247–3252, 22 abr. 2009. DOI: 10.1021/jf8037902.

IPPOLITO, A. *et al.* Natural antimicrobials for preserving fresh fruit and vegetables. **Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables**, Elsevier Inc., 2005. p. 513–555. DOI: 10.1533/9781845690243.3.513.

ISMAIL, M. A. Physiological responses of seaweeds extracts, benzyl adenine and paclobutrazol of wheat (*Triticum aestivum* L. cultivar Misr 1) plants. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 4, p. 1657–1668, 2016. DOI: 10.21474/IJAR01.

JAMIOŁKOWSKA, A. Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. **Agronomy**, v. 10, n. 2, p. 173, 1 fev. 2020. DOI: 10.3390/agronomy10020173.

JAULNEAU, V. *et al.* Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway, **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 525291, 2010. DOI: 10.1155/2010/525291.

JUNQUEIRA, A. H., PEETZ, M. S., ONODA, S. M. **Sweet Grape: um modelo de inovação na gestão da cadeia de produção e distribuição de hortaliças diferenciadas no Brasil**. São Paulo: Central de Cases, 2011. 19 p. Disponível em: <[http://www.organicnet.com.br/wp-content/uploads/sweet\\_grape.pdf](http://www.organicnet.com.br/wp-content/uploads/sweet_grape.pdf)>. Acesso em: 13 ago. 2020.

NAWROCKA, J. *et al.* Toward the analysis of volatile organic compounds from tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) Treated with *Trichoderma virens* or/and *Botrytis cinerea*. **Cells**, v. 12, n. 9, p. 1271–1271, 27 abr. 2023. DOI: 10.3390/cells12091271.

LARANJA, B. **Manejo nutricional aumenta produtividade e qualidade do tomate Sweet Grape**. 2017. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/noticias/manejo-nutricional-aumenta-produtividade-e-qualidade-do-tomate-sweet-grape>. Acesso: 13 de mai. 2022.

KANG, H.; SALTVEIT, M.E. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 548–556, 2001. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1130414.x.

KARBAN, R. *et al.* Volatile communication between plants that affects herbivory: A meta-analysis, **Ecology Letters**, v. 17, n. 1, p. 44–52, 2014. DOI: 10.1111/ele.12205.

KAZACHKOVA, Y. *et al.* The GORKY glycoalkaloid transporter is indispensable for preventing tomato bitterness. **Nature Plants**, v. 7, n. 4, p. 468–480, 1 abr. 2021. DOI: 10.1038/s41477-021-00865-6.

KHACHIK, F. *et al.* Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 227, n. 10, p. 845-51, 2002. DOI: 10.1177/153537020222701002.

KHARAT, K. R.; POTTATHIL, R. Chemically defined elicitors activate priming in tomato seedlings. **Plant Signaling and Behavior**, v. 17, n. 1, 2022. DOI: 10.1080/15592324.2022.2095143.

KIDGELL, J. T. *et al.* Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. **Algal Research**, v. 39, p. 101422, maio 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101422.

KIPLIMO, J.J. *et al.* Novel polyene from *Vernonia urticifolia* (Asteraceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 17, p. 4202–4211, 9 set. 2011.

KLEE, H. J. Improving the flavor of fresh fruits: Genomics, biochemistry, and biotechnology. **New Phytologist**, v. 187, p. 44–56, jul. 2010. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03281.x.

KLOKIĆ, I., KOLEŠKA, I., HASANAGIĆ, D., *et al.* Biostimulants' influence on tomato fruit characteristics at conventional and low-input NPK regime. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 70, n. 3, p. 233–240, 2 abr. 2020. DOI: 10.1080/09064710.2019.1711156.

KOCHEVENKO, A. *et al.* Catabolism of branched chain amino acids supports respiration but not volatile synthesis in tomato fruits. **Molecular Plant**, v. 5, n. 2, 366-375, 2012. DOI: 10.1093/mp/ssr108.

KOKLESOVA, L. *et al.* Carotenoids in cancer apoptosis—the road from bench to bedside and back. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2425, 1 set. 2020. DOI: 10.3390/cancers12092425.

KUTTY, N. N.; MISHRA, M. Dynamic distress calls: volatile info chemicals induce and regulate defense responses during herbivory. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 19 jun. 2023. DOI: 10.3389/fpls.2023.1135000.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta) — NMR analysis of ulvan oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 283, p. 161–173, mar. 1996. DOI: 10.1016/0008-6215(95)00407-6.

LAHAYE, M., ROBIC, A. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765–1774, jun. 2007. DOI: 10.1021/bm061185q.

LEE, M. W. *et al.* The FATTY ACID DESATURASE2 family in tomato contributes to primary metabolism and stress responses. **Plant Physiology**, v. 182, n. 2, p. 1083–1099, 25 nov. 2020. DOI: 10.1104/pp.19.00487.

LI, J.; DI, T.; BAI, J. Distribution of volatile compounds in different fruit structures in four tomato cultivars. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2594, 2019. DOI: 10.3390/molecules24142594.

LI, S., CHEN, K., GRIERSON, D. A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening. **New Phytologist**, v. 221, n. 4, p. 1724-1741, 1 mar. 2019. DOI: 10.1111/nph.15545.

LIN, J. *et al.* Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 1, p. 14–23, 30 dez. 2009. DOI: 10.1093/jnci/djn438.

LIU, L. *et al.* Regulation of carotenoid metabolism in tomato. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 28-39, 5 jan. 2015. DOI: 10.1016/j.molp.2014.11.006.

LIU, W. *et al.* The flavonoid biosynthesis network in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12824, 1 dez. 2021. DOI: 10.3390/ijms222312824.

LIU, Y. *et al.* Current advances in the biosynthesis, metabolism, and transcriptional regulation of  $\alpha$ -tomatine in tomato. **Plants**, v. 12, n. 18, p. 3289, 17 set. 2023. DOI: 10.3390/plants12183289.

LONDOÑO-GIRALDO, L. M. *et al.* HPLC-DAD-APCI-MS as a tool for carotenoid assessment of wild and cultivated cherry tomatoes. **Horticulturae**, v. 7, n. 9, p. 272, 31 ago. 2021. DOI: 10.3390/horticulturae7090272.

MAJIDI, H. *et al.* Tomato quality in controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and cold storage. **Journal of Food Science and Technology** v. 51 n. 9, p. 2155–2161, 2014. DOI:10.1007/s13197-012-0721-0.

MARCHEV, A. S., VASILEVA, L. V., AMIROVA, K. M., *et al.* Metabolomics and health: from nutritional crops and plant-based pharmaceuticals to profiling of human biofluids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, p. 6487–6503, 1 out. 2021. DOI: 10.1007/s00018-021-03918-3.

MARTÍ, R. *et al.* Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. **Cancers**, v. 8, n. 6, p. 58, 20 jun. 2016. DOI: 10.3390/cancers8060058.

MARUYAMA, S. A. *et al.* Evaluation of lipophilic antioxidant capacity and lycopene content in Brazilian tomatoes, **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1163–1173, 1 jul. 2015. DOI: 10.5935/1984-6835.20150065.

MATHIEU, S. *et al.* Flavour compounds in tomato fruits: Identification of *loci* and potential pathways affecting volatile composition, **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 1, p. 325–337, jan. 2009. DOI: 10.1093/jxb/ern294.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. *et al.* Skin Carotenoids in Public Health and Nutricosmetics: The Emerging Roles and Applications of the UV Radiation-Absorbing Colourless Carotenoids Phytoene and Phytofluene. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1093, 1 maio 2019. DOI: 10.3390/nu11051093.

MEZA, S. L. R. *et al.* Post-Harvest treatment with methyl jasmonate impacts lipid metabolism in tomato pericarp (*Solanum lycopersicum* L. cv. Grape) at different ripening stages. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 877, 16 abr. 2021. DOI: 10.3390/foods10040877.

MEZA, S. L. R. *et al.* Induction of metabolic changes in amino acid, fatty acid, tocopherol, and phytosterol profiles by exogenous methyl jasmonate application in tomato fruits. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 366, 28 jan. 2022. DOI: 10.3390/plants11030366.

MHAMDI, A. *et al.* Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, v. 15, p. 4197-220, 2010. DOI: 10.1093/jxb/erq282.

MIKLAVČIČ VIŠNJEVEC, A. *et al.* HPLC-DAD-qTOF compositional analysis of the phenolic compounds present in crude tomato protein extracts derived from food processing. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 21, p. 6403, 2021. DOI: 10.3390/molecules26216403.

MILLER, D. D. *et al.* Antioxidants and phytochemicals. **Reference Module in Biomedical Sciences**, [S.l.], Elsevier, 2014. DOI: 10.1016/b978-0-12-801238-3.00236-1.

MILLER, G. *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 4, p. 453–467, abr. 2010. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x.

MOCO, S. *et al.* A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. **Plant Physiology**, v. 141, n. 4, p. 1205–1218, 2006. DOI: 10.1104/pp.106.078428.

MOCO, S. *et al.* Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15–16, p. 4131–4146, dez. 2007. DOI: 10.1093/jxb/erm271.

MONTE, J. A. *et al.* Growth analysis and yield of tomato crop under different irrigation depths. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 9, p. 926–931, set. 2013. DOI: 10.1590/S1415-43662013000900003.

MONTEALEGRE, J. R. *et al.* Control of grey rot of apple fruits by biologically active natural products. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 271–276, 2010. DOI: 10.1590/S1982-56762010000500001.

MORENO-ESCAMILLA, J.O. *et al.* Effect of elicitation on polyphenol and carotenoid metabolism in butterhead lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata). **ACS Omega**, v. 5, p. 11535-11546, 2020. DOI: 10.3390/10.1021/acsomega.0c00680.

MOURA, S. C. S. R. DE *et al.* Determinação da vida-de-prateleira de maçã-passa por testes acelerados. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 141–148, jan. 2007.

MUIR, S. R. *et al.* Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 470–474, 2001. DOI: 10.1038/88150.

MUNIR, S. *et al.* Genome-wide analysis of Myo-inositol oxygenase gene family in tomato reveals their involvement in ascorbic acid accumulation, **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, 6 abr. 2020. DOI: 10.1186/s12864-020-6708-8.

MUSHI, N. E. *et al.* Effective enhancement of post-harvest tomato storage through wrapping using deacetylated chitin nanofibril-plasticized honey films. **Tanzania Journal of Science**, v. 49, n. 3, p. 711–724, 30 set. 2023.

NASCIMENTO, I. P DO *et al.* Condução de tomateiro gaúcho (*Solanum lycopersinum*) em diferentes tipos de tutoramento, **Revista Nativa Americana de Ciências**, v. 2 n. 1, p. 74-83, 2022.

NELLIS, S. C. *et al.* Extração e quantificação de carotenoides em minitomate desidratado (*Sweet Grape*) através da aplicação de diferentes solventes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 22 maio 2017. DOI: 10.1590/1981-6723.15616.

NGO, T. H. *et al.* Content of two major steroidal glycoalkaloids in tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) mutant lines at different ripening stages, **Plants**, v. 11, n. 21, 1 nov. 2022. DOI: 10.3390/plants11212895.

ORTIZ-MARTÍNEZ, L. E. *et al.* Elicitors in the production of tomato crop infected with Tomato brown rugose fruit virus and pepino mosaic virus. **Research Square**, 2023. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3143816/v1.

PADMANABHAN, P. *et al.* Solanaceous fruits including tomato, eggplant, and peppers. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 24–32, 2016. DOI:10.1016/b978-0-12-384947-2.00696-6.

PADMANABHAN, S. **Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine**. Academic Press, 2014.

PALMA, J. M. *et al.* Plant catalases as NO and H<sub>2</sub>S targets. **Redox Biology**, v. 34, n. 101525, jul. 2020, 1 jul. 2020. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101525.

PALOU, L. Postharvest Treatments with GRAS Salts to Control Fresh Fruit Decay. **Horticulturae**, v. 4, n. 4, p. 46, 1 dez. 2018. DOI: 10.3390/horticulturae4040046.

PALOU, L.; SMILANICK, J. **Postharvest pathology of fresh horticultural produce**. CRC Press. 2020. DOI: 10.1201/9781315209180.

PANDA, S. *et al.* Steroidal alkaloids defence metabolism and plant growth are modulated by the joint action of gibberellin and jasmonate signalling. **New Phytologist**, v. 233, n. 3, p. 1220–1237, 3 dez. 2022. DOI: 10.1111/nph.17845.

PANERO, F. S. *et al.* Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 33–40, 2009. DOI: 10.1590/S0100-46702009000300004.

PAPARELLA, A. *et al.*  $\beta$ -Ionone: its occurrence and biological function and metabolic engineering. **Plants**, v. 10, n. 4, p. 754, 12 abr. 2021. DOI: 10.3390/plants10040754.

PARK, Y. J. *et al.* Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of tagetes flowers, **Molecules**, v. 22, n. 2, 1 fev. 2017. DOI: 10.3390/molecules22020313.

PAULERT, R. *et al.* Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 634–642, 25 fev. 2010. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02300.x

PAULERT, R. *et al.* The non-sulfated ulvanobiuronic acid of ulvans is the smallest active unit able to induce an oxidative burst in dicot cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 270, p. 118338–118338, 1 out. 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118338.

PAULERT, R. *et al.* *Ulva intestinalis* Extract acts as biostimulant and modulates metabolites and hormone balance in basil (*Ocimum basilicum* L.) and parsley (*Petroselinum crispum* L.). **Plants**, v. 10, n. 7, p. 1391, 7 jul. 2021. DOI: 10.3390/plants10071391.

PINHEIRO, J. *et al.* Use of UV-C postharvest treatment for extending fresh whole tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. Zinac) shelf-life. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 8, p. 5066–5074, 2015. DOI: 10.1007/s13197-014-1550-0.

POIROUX-GONORD, F. *et al.* Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12065–12082, 8 dez. 2010. DOI: 10.1021/jf1037745.

PRUSKY, D. *et al.* Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development, **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 155–176, ago. 2013. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102349.

QUADRANA, L. *et al.* Transcriptional regulation of tocopherol biosynthesis in tomato. **Plant Molecular Biology**, v. 81, n. 3, p. 309–325, 18 dez. 2013. DOI: 10.1007/s11103-012-0001-4.

QUINET, M. *et al.* Tomato fruit development and metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 29 nov. 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.01554.

RACHIDI, F. *et al.* Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches, **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021. DOI: 10.1038/s41598-020-78820-2.

RAJPUT, V. D. *et al.* Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. **Biology**, v. 10, n. 4, p. 267, 1 abr. 2021. DOI: 10.3390/biology10040267.

RAMAKRISHNA, A., RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, nov. 2011. DOI: 10.4161/psb.6.11.17613.

RAMBLA, J. L. *et al.* The expanded tomato fruit volatile landscape. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 16, p. 4613–4623, ago. 2014. DOI: 10.1093/jxb/eru128.

REIS, R. P. *et al.* Direct effects of ulvan and a flour produced from the green alga *Ulva fasciata* Delile on the fungus *Stemphylium solani* Weber. **Algal Research**, v. 30, p. 23–27, mar. 2018.

RIOUX, L.E.; TURGEON, S.L. Seaweed carbohydrates. In: **Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications**; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 141–192. ISBN 9780124199583. DOI: 10.1016/B978-0-12-418697-2.00007-6.

RIVAS-GARCIA, T. *et al.* *Debaryomyces hansenii*, *Stenotrophomonas rhizophila*, and ulvan as biocontrol agents of fruit rot disease in muskmelon (*Cucumis melo* L.), **Plants**, v. 11, n. 2, 1 jan. 2022. DOI: 10.3390/plants11020184.

RODRIGUES, M. *et al.* Organic plant biostimulants and fruit quality—a review. **Agronomy**, v. 10, n. 7, p. 988, 10 jul. 2020. DOI: 10.3390/agronomy10070988.

ROTTET, S. *et al.* Identification of plastoglobules as a site of carotenoid cleavage, **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1855, 8 dez. 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.01855.

RUZZI, M.; AROCA, R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 124-134, 30 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.08.042.

SAINI, R. K. *et al.* Elicitors, SA and MJ enhance carotenoids and tocopherol biosynthesis and expression of antioxidant related genes in *Moringa oleifera* Lam.



leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 10, p. 2695–2704, 8 ago. 2014. DOI: 10.1007/s11738-014-1640-7.

SAINI, R. K. *et al.* Ripening improves the content of carotenoid,  $\alpha$ -tocopherol, and polyunsaturated fatty acids in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, 1 maio 2017. DOI: 10.1007/s13205-017-0666-0.

SANDRI *et al.* ‘Sweet Grape’ tomato post harvest packaging. **Revista Engenharia Agrícola**, v. 35, n.6, p.1093-1104, nov./dez. 2015.

SAWAI, S. *et al.* Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. **Plant Cell**, v. 26, n. 9, p. 3763–3774, 1 set. 2014. DOI: 10.1105/tpc.114.130096.

SBAIHAT, L. *et al.* Induced resistance in *Solanum lycopersicum* by algal elicitor extracted from *Sargassum fusiforme*, **Scientific World Journal**, v. 2015, 24 fev. 2015. DOI: 10.1155/2015/870520.

SEPULVEDA, M. The Potencial of seaweed farming in Brazil. **Insights in Aquaculture Biotechnology**, v. 5, n. 2, 2021.

SÉRINO, S. *et al.* HPLC assay of tomato carotenoids: validation of a rapid microextraction technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8753–8760, 14 out. 2009. DOI: 10.1021/jf902113n.

SHAO, Z. *et al.* Chitosan oligosaccharide treatment improves quality attributes of tomato fruit stored under room temperature. **Postharvest Biology and Technology**, v. 189, p. 111914–111914, 1 jul. 2022. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2022.111914.

SHARMA, I.; AHMAD, P. Catalase: a versatile antioxidant in plants. **Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling**, [S.l.], Elsevier Inc., 2014. p. 131–148. DOI: 10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6.

SHEN, J. *et al.* A 13-lipoxygenase, TomloxC, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato, **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 2, p. 419–428, fev. 2014. DOI: 10.1093/jxb/ert382.

SHI, J., YAN, X., SUN, T., *et al.* Homeostatic regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in phenylpropanoid pathway of transgenic tobacco, **Gene**, v. 809, 30 jan. 2022. DOI: 10.1016/j.gene.2021.146017.

SHINDE, B. A. *et al.* Dynamic metabolic reprogramming of steroidal glycol-alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis may impart early blight resistance in wild tomato (*Solanum arcanum* Peralta), **Plant Molecular Biology**, v. 95, n. 4–5, p. 411–423, 1 nov. 2017. DOI: 10.1007/s11103-017-0660-2.

SHINOZAKI, Y. *et al.* High-resolution spatiotemporal transcriptome mapping of tomato fruit development and ripening, **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018. DOI: 10.1038/s41467-017-02782-9.

SHOMRON, A. *et al.* Extract from the macroalgae *Ulva rigida* induces table grapes resistance to *Botrytis cinerea*. **Foods**, v. 11, n. 5, p. 723, 28 fev. 2022. DOI: 10.3390/foods11050723.

SIAH, A. Natural agents inducing plant resistance against pests and diseases. In: MÉRILLON, J. M.; RIVIERE, C. (Eds.). **Natural Antimicrobial Agents. Sustainable Development and Biodiversity**. Cham: Springer, 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-67045-4\_6

SILVESTRE, J. S. Atividade antifúngica de óleos essenciais do gênero *Citrus*. 2017. 77p. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SIMIONI, C. *et al.* Seaweed resources of Brazil: What has changed in 20 years? **Botanica Marina**. v. 62, n. 5, 2019. DOI: 10.1515/bot-2019-0021.

SIMKIN, A. J. Carotenoids and apocarotenoids in planta: Their role in plant development, contribution to the flavour and aroma of fruits and flowers, and their nutraceutical benefits. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 11, p. 2321, 1 nov. 2021. DOI: 10.3390/plants10112321.

SINGH, M., GUJJAR, R. S., KARKUTE, S. G. Biology of *Solanum lycopersicum* (Tomato). **Series of Crop Specific Biology Documents. Phase II Capacity Building Project on Biosafety**. 2016. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/336319341\\_Biology\\_of\\_Solanum\\_lycopersicum\\_Tomato](https://www.researchgate.net/publication/336319341_Biology_of_Solanum_lycopersicum_Tomato). Acesso: 13 out. 2023.

SINHA, S. R. *et al.* Post-harvest assessment of fruit quality and shelf life of two elite tomato varieties cultivated in Bangladesh, **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, dez. 2019. DOI: 10.1186/s42269-019-0232-5.

SIVAKUMAR, D., BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 27-37, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2014.05.012.

SIVAKUMAR, D., BILL, M., KORSTEN, L., THOMPSON, K. Integrated application of chitosan coating with different postharvest treatments in the control of postharvest decay and maintenance of overall fruit quality. In: BAUTISTA-BAÑOS, S.; JIMÉNEZ-APARICIO, A.; ROMANAZZI, G. **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**. Cambridge: Academic Press, Cap. 5, p. 127-153. 2016.

STADNIK, M. J., DE FREITAS, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 111–118, 2014. DOI: 10.1590/S1982-56762014000200001.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids: occurrence, biochemical activities, and bioavailability. In: PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. (Eds.). **Antioxidant food supplements in human health**. Academic Press; San Diego, 1999. DOI:10.1016/B978-012543590-1/50014-7.

STAHL, W.; SIES, H. Nutritional protection against photooxidative stress in human skin and eye. In: LINSLEY, P. B. (Ed.). **Oxidative Stress**. [s.l.] Elsevier Inc, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-818606-0.00020-1.

STAM, R.; MUÑOZ-HOYOS, L. Metabolomics in Plant Pathogen Defense: From Single Molecules to Large-Scale Analysis. **Phytopathology**, v. 113, n. 5, p. 760–770, 1 maio 2023.

STENGEL, D. B. *et al.* Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 483-501, 29 set-out. 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.016.

STEWART, A. J. *et al.* Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2663–2669, jul. 2000. DOI: 10.1021/jf000070p.

STIGER-POUVREAU, V.; BOURGOUGNON, N; DESLANDES, E. Carbohydrates from seaweeds, In: FLEURENCE, J. LEVINE, I. (Eds). **Seaweed in health and disease prevention**. 2016, Academic Press. p. 223-274. DOI: 10.1016/B978-0-12-802772-1.00008-7.

SUN, T. *et al.* Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. **Molecular Horticulture**, v. 2, n. 1, 21 jan. 2022. DOI: 10.1186/s43897-022-00023-2.

TANG, Q. *et al.* Metabolomics reveals key resistant responses in tomato fruit induced by *Cryptococcus laurentii*. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 4, p. 100066–100066, 1 jul. 2022. DOI: 10.1016/j.fochms.2021.100066.

TEIXEIRA, I. S. *et al.* Causas de perdas pós-colheita em cultivares de tomates comercializados na Ceasa, Ceará, **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 17, n. 2, p. 135–142, 1 abr. 2022. DOI: 10.18378/rvads.v17i2.9286.

TIEMAN, D. *et al.* A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. **Science**, v. 355, n. 6323, p. 391–394, 26 jan. 2017. DOI: 10.1126/science.aal1556.

TIEMAN, D. M. *et al.* Tomato phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma volatile 2-phenylethanol, **Phytochemistry**, v. 68, n. 21, p. 2660–2669, nov. 2007. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.06.005.

TIKU, A. R. Antimicrobial compounds (phytoanticipins and phytoalexins) and their role in plant defense. In: MÉRILLON, J. M.; RAMAWAT, K. (Eds.). Co-Evolution of secondary metabolites. Reference series in phytochemistry. Cham: Springer, 2020. DOI: 10.1007/978-3-319-76887-8\_63-1.

ULLAH, A. *et al.* Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5243, 1 nov. 2020. DOI: 10.3390/molecules25225243.

UNGUREANU, C. *et al.* Bio-coatings for preservation of fresh fruits and vegetables. **Coatings**, v. 13, n. 8, p. 1420–1420, 13 ago. 2023. DOI: 10.3390/coatings13081420.

USDA. **Standards for Grades of Fresh Tomatoes**. United States Department of Agriculture, Agricultural Marketing Service, Washington DC. 1991. Disponível em: <http://www.ams.usda.gov/standards/Tomato%20Greenhouse%20Standards.pdf>, Acesso em 16 mai. 2020.

VELA-HINOJOSA, C. *et al.* Antioxidant balance and regulation in tomato genotypes of different color, **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 144, n. 1, p. 45–54, 1 jan. 2019. DOI: 10.21273/JASHS04525-18.

VOGEL, J. T. *et al.* Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 13, p. 2233–2240, 26 jul. 2010. DOI: 10.1002/jsfa.4076.

VRANOVÁ, J.; CIESAROVÁ, Z. Furan in food – a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, n. No. 1, p. 1–10, 11 fev. 2009. DOI: 10.17221/2843-CJFS.

WANG, L. *al.* Difference in volatile composition between the pericarp tissue and inner tissue of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit, **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 1, 1 jan. 2017. DOI: 10.1111/jfpp.13387.

WANG, Z. *et al.* Identification and analysis of lignin biosynthesis genes related to fruit ripening and stress response in banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 22 mar. 2023. DOI: 10.3389/fpls.2023.1072086.

WANG, Z. *et al.* Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato fruit cuticular triterpenoids. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 540–552, 1 jan. 2011. DOI: 10.1104/pp.110.162883.

WHITAKER, B. D., GAPPER, N. E. Ripening-specific stigmasteryl increase in tomato fruit is associated with increased sterol C-22 desaturase (CYP710A11) gene expression. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3828–3835, 28 mai. 2008. DOI: 10.1021/jf7037983.

XIA, J. *et al.* MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251–W257, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv380.

YE, W. *et al.* Transcriptomic profiling analysis of *Arabidopsis thaliana* treated with exogenous myo-Inositol. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 1 set. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0161949.

YOKOTA, Y. *et al.* Effect of the storage atmosphere on metabolomics of harvested tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). **Food Science & Nutrition**, v. 7, p. 773–778, 2019. DOI:10.1002/fsn3.923

YOU, Y.; VAN KAN, J. A. L. Bitter and sweet make tomato hard to (b)eat. **New Phytologist**, v. 230, n. 1, p. 90-100, 1 abr. 2021. DOI: 10.1111/nph.17104.

YUAN, H. *et al.* Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. **Horticulture Research**, v. 2, n. 15036, 26 ago. 2015. DOI: 10.1038/hortres.2015.36.

ZANOR, M. I. *et al.* Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 7, p. 2139–2154, maio 2009. DOI: 10.1093/jxb/erp086.

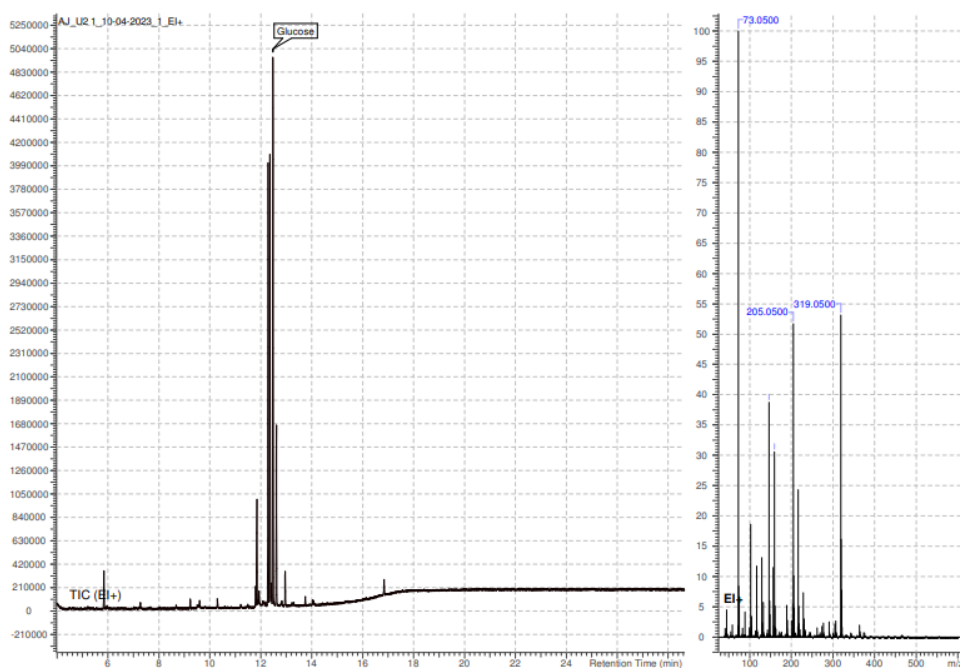
ZHANG, X. *et al.* Insights into the defense mechanisms involved in the induction of resistance against black spot of cherry tomatoes by *Pichia caribbica*, **LWT**, v. 169, 1 nov. 2022. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113973.

ZHANG, X. *et al.* Non-targeted and targeted metabolomics approaches to diagnosing lung cancer and predicting patient prognosis. **Oncotarget**, v. 7, n. 39, p. 63437–63448, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.11521.

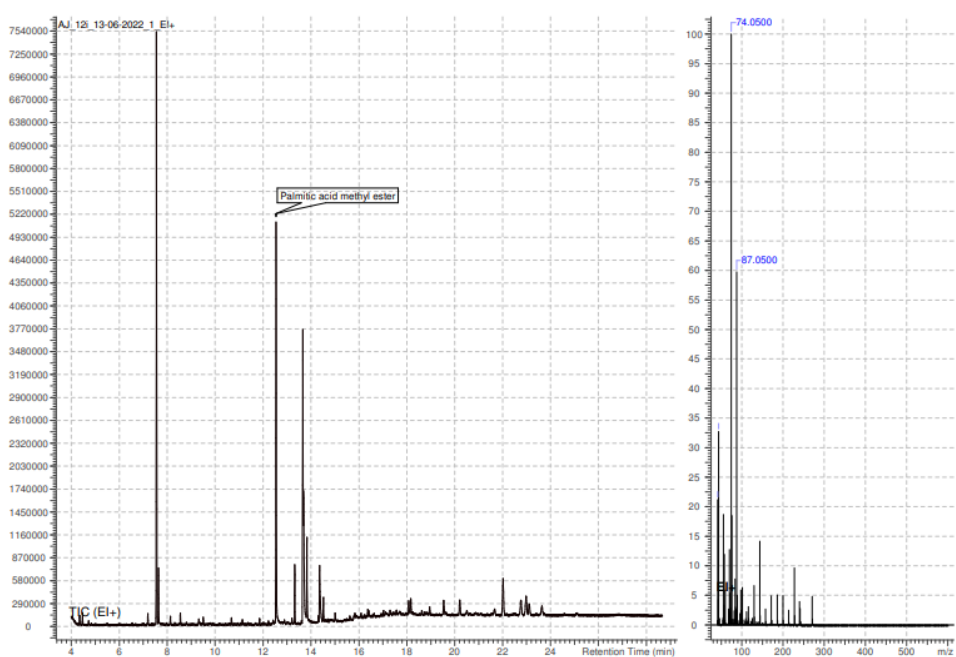
ZHOU, Z. *et al.* Rapid determination of 6-methyl-5-hepten-2-one in fruit with LLE-GC-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 60, n. 3, p. 280–286, 23 mar. 2022. DOI: 10.1093/chromsci/bmab071.

ZHU, F. *et al.* The metabolic changes that effect fruit quality during tomato fruit ripening. **Molecular Horticulture**, v. 2, n. 1, p. 2, 1 dez. 2022. DOI: 10.1186/s43897-022-00024-1

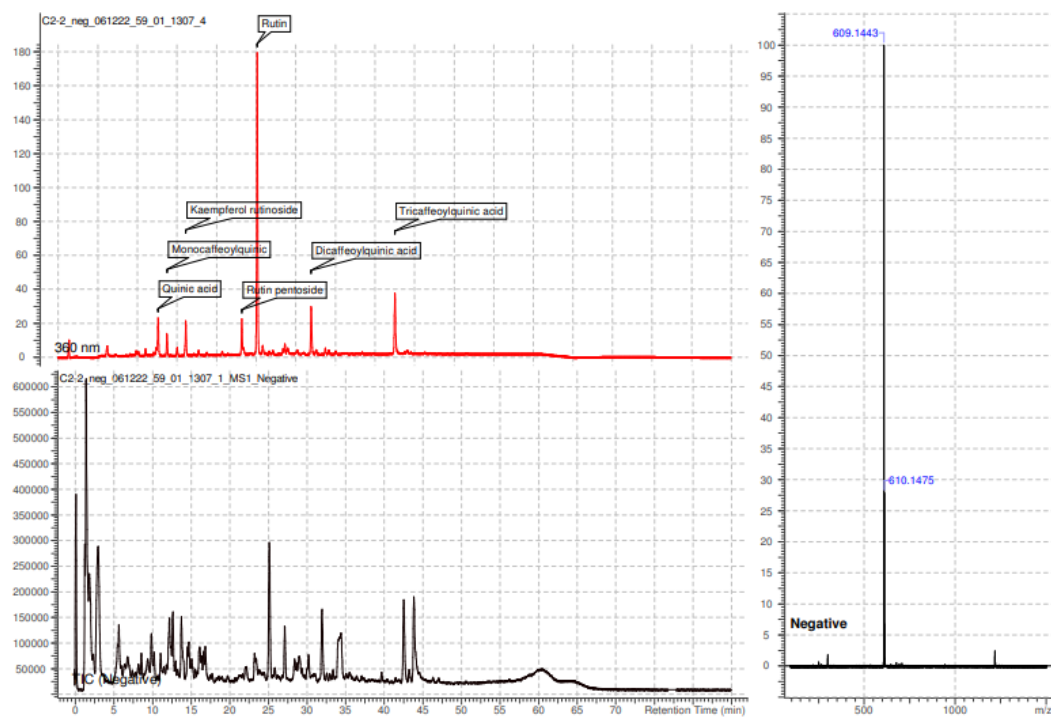
## Apêndice 1 – Cromatogramas



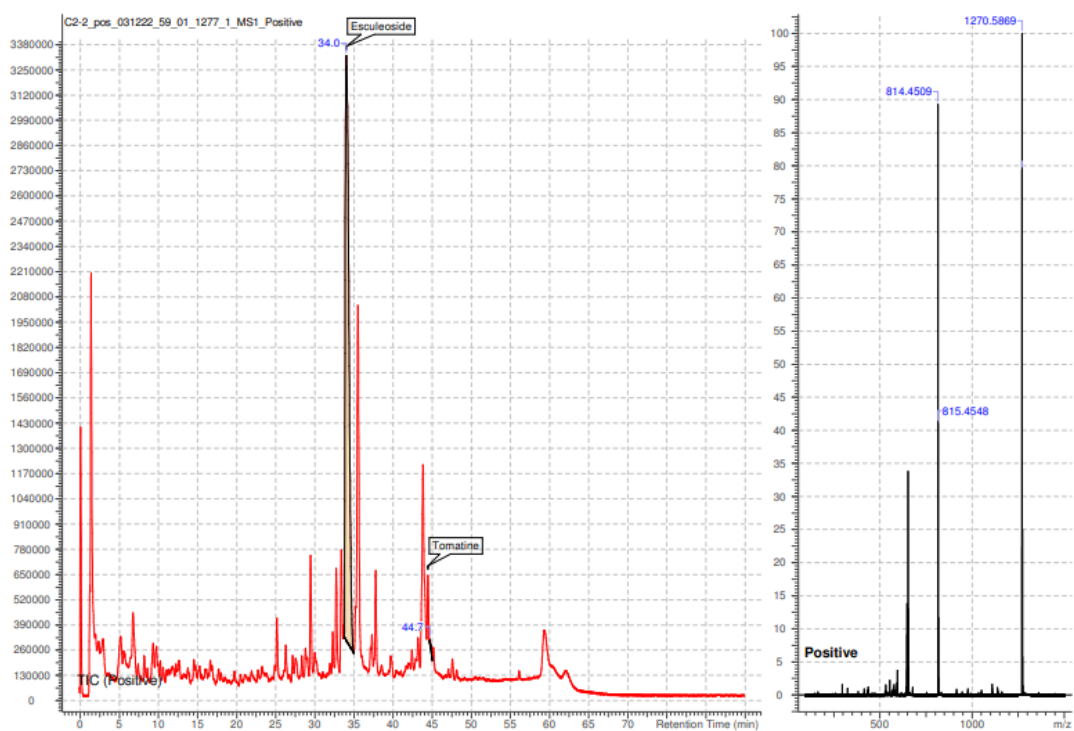
Perfil cromatográfico típico de metabólitos polares do tomate var. *Sweet Grape* obtido por CLAE/EM.



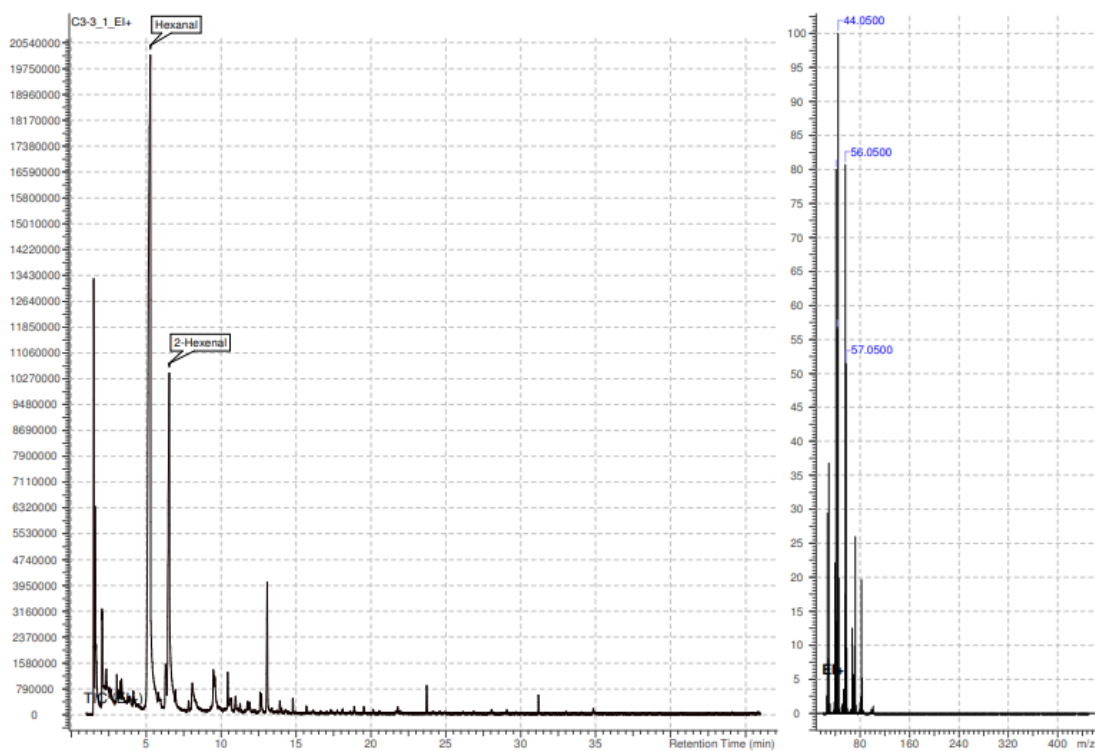
Perfil cromatográfico típico de metabólitos apolares do tomate var. *Sweet Grape* obtido por CLAE/EM



Perfil cromatográfico típico de fenólicos do tomate var. *Sweet Grape* obtido por CLAE/EM.



Perfil cromatográfico típico de alcaloides do tomate var. *Sweet Grape* obtido por CLAE/EM.



Perfil cromatográfico típico de COVS do tomate var. *Sweet Grape* obtido por CLAE/E