

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

**ESTUDO DA RESPOSTA DE TECIDOS DE
Citrus sinensis EM FASES ONTOGENÉTICAS
DISTINTAS À INFECÇÃO POR *CANDIDATUS*
*LIBERIBACTER ASIATICUS***

Mayara Gobetti Fernandes da Silva*

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

Orientadora: Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

***Bolsista FAPESP**

São Carlos – SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Mayara Gobetti Fernandes da Silva, realizada em 29/06/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira (UNAERP)

Profa. Dra. Valéria Regina de Souza Moraes (UFS)

Prof. Dr. Laudecir Lemos Raiol Junior (UNESP)

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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



“Dedico este trabalho a minha mãe. Sem ela nada seria possível.”

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora, a professora Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva por ter aceitado acompanhar-me neste projeto. O seu empenho foi essencial em meio as dificuldades que estou passando.

Expresso minha gratidão a todos os profissionais do Departamento de Química do curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos e Universidade de São Paulo por todo o apoio ao longo da realização do meu trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Química que me forneceram todas as bases necessárias para a realização deste trabalho, agradeço com admiração pelo vosso profissionalismo.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos fornecida, processo nº 2015/02639-4, sem a qual não teria sido possível o desenvolvimento deste trabalho (opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP).

Agradeço a CAPES, pois o presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

E a Fundecitrus pelo apoio e infraestrutura para a obtenção do material vegetal utilizado para este estudo, e a todos que direto ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese, e a Deus por me dar força.

Abreviaturas e Símbolos

ACN = acetonitrila

APCI = *Atmospheric Pressure Chemistry Ionization (Ionização Química a Pressão Atmosférica)*

Ca. L. = *Candidatus Liberibacter*

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CVC = Clorose Variegada do Citros

DAD = *Diode Arrange Detector*

EM = Espectrometria de massas

ESI = *Electrospray Ionization*

HCA = *Hierarchical Clusters Analysis*

HLB = Huanglongbing

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-UV-SPE-NMR = *High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection coupled to Solid-Phase Extraction coupled to Nuclear Magnetic Resonance*

i-PropOH = isopropanol

LC-MS/MS = *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de Quantificação

m/z = relação massa/carga

MEOH = metanol

MS = *Mass Spectrometry*

OPLS-DA = orthogonal projection to latent structures discriminant analysis

PCA = *Principal Components Analysis*

PCR = *polymerase chain reaction* (reação em cadeia pela polimerase)

ppm = partes por milhão

SPE = *Solid-Phase Extraction*

SRM = *Selected Reaction Monitoring*

THF = tetraidrofurano

TIC = *Total Ion Chromatogram*

TOF = Time of Fly

t_R = tempo de retenção

UPLC = Ultra Performance Liquid Chromatography

UHPLC = Ultrahigh-pressure (or performance) liquid chromatography

UPLC-QToF/MS = ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry

UV = *Ultraviolet Detector*

$\mu\text{g/g}$ = microgramas por grama

μm = micrometro

Listas de Tabelas

Tabela 1 - Variação do perfil químico obtido via técnica de HPLC-UV-SPENMR, entre citros doente e sadios.	13
Tabela 2 - Planejamento experimental para obtenção das mudas de citros.....	37
Tabela 3 - Planejamento experimental para obtenção das plantas de citros com HLB.	38
Tabela 4 - Cronograma do experimento: Inoculação e coleta do material vegetal....	39
Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas para UPLC-MS (linha A: H ₂ O e linha B: ACN).....	41
Tabela 6 - Resumo das plantas preparadas para o estudo do perfil químico.	50
Tabela 7 - Resultados das análises por PCR das plantas de laranja Pera estudadas.	53
Tabela 8 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras das raízes dos enxertos no gráfico S-plot, Íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.	62
Tabela 9 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras das raízes de estaquias no gráfico S-plot, Íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.	77
Tabela 10 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras do cule inferior dos tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera enxertadas em limão cravo com HLB, no gráfico S-plot; íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.....	86
Tabela 11 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras do caule superior e folhas dos tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera enxertadas em limão cravo com HLB, no gráfico S-plot; íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.	98
Tabela 12 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras do caule e folhas dos tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera em estaquia com HLB, no gráfico S-plot; íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.....	98
Tabela 13 - Substâncias que sofreram aumento na área de seu pico correspondente quando comparado tecidos maduros e jovens em enxertia e em estaquia.....	117
Tabela 14 - Dados da curva de calibração da Xantiletina.....	122

Tabela 15 - Dados da curva de calibração da Seselina.....	122
Tabela 16 - Dados da curva de calibração da 5-Metoxiseselina.....	122
Tabela 17 - Dados da curva de calibração da Hesperidina.	123
Tabela 18 - Resultados de precisão e exatidão da Xantiletina.	124
Tabela 19 - Resultados de precisão e exatidão da Seselina.	125
Tabela 20 - Resultados de precisão e exatidão da 5-Metoxiseselina.	125
Tabela 21 - Resultados de precisão e exatidão da Hesperidina.	126
Tabela 22 - Parâmetros da curva de calibração do método analítico.	127
Tabela 23 - Quantificação da Xantiletina.	128
Tabela 24 - Quantificação da Seselina.....	128
Tabela 25 - Quantificação da 5-Metoxiseselina.	129
Tabela 26 - Quantificação da Hesperidina.	129

Lista de Figuras

Figura 1 - Sintomas de HLB em laranjeiras em dois estádios de infecção (Fonte: Fundecitrus).....	5
Figura 2 - Principais sintomas nas folhas e nos frutos de citros, provocados pela doença HLB. (A): mosqueamento; (B): amarelecimento nas folhas novas; (C): engrossamento da nervura central; (D): sementes abortadas e engrossamento da casca; (E): manchas amarelas na casca (Fonte: Fundecitrus).	6
Figura 3 - Vetores do HLB, <i>Tryosa eritreae</i> (A) e <i>Diaphorina citri</i> (B). Fonte: Fundecitrus).....	8
Figura 4 - Pisilídeo <i>Diaphorina citri</i> sobre folha de citros A) e se alimentando B) (fonte: www.insectimages.org).	8
Figura 5 - Representação da rápida disseminação do HLB. Uma planta contaminada, infecta outras 3. A partir de uma única planta doente, ao final de um ano haverá mais de 260 plantas contaminadas.	11
Figura 6 - Evolução de municípios com HLB no estado de São Paulo (Fundecitrus 2008, 2009).....	11
Figura 7 - Flavonoides cujas concentrações variaram nos citros com sintoma de HLB.	14
Figura 8 - Cumarinas e Limonoides cujas concentrações variaram nos citros com sintoma de HLB.	14
Figura 9 - Diferentes estacas utilizadas para enraizamento (Fonte: SARDINHA, 2008).	17
Figura 10 - Preparo de estacas a partir de lançamento retirado da árvore-mãe (Fonte: SARDINHA, 2008).	17
Figura 11 - Desenvolvimento de uma planta enxertada.	19
Figura 12 - Enxertia por garfagem (Fonte: CÉSAR, 1996).	20
Figura 13 - Enxertia por borbulhia (Fonte: CÉSAR, 1996).....	21
Figura 14 - UHPLC Acquity/UPLC H-class acoplado a espectrômetro de massas Xevo G2-XS QToF, ambos da Waters (Fonte: Waters).	29
Figura 15 - Etapas da enxertia por borbulhia.	37
Figura 16 - Fluxograma do preparo do material vegetal.	39
Figura 17 - Fluxograma para o preparo dos extratos do material vegetal.	40
Figura 18 - Estacas de laranja Pera juvenis (nas laterais) e madura (central).	45

Figura 19 - Estacas de laranja Pera juvenis (A) e maduras (B) e adaptação em câmara úmida, (foto da autora da tese).	46
Figura 20 - Mudanças obtidas por estaquia de laranja Pera juvenis e maduras, as placas em cada vaso identificam cada uma, (foto da autora da tese).....	46
Figura 21 - Mudanças obtidas por enxertia de laranja Pera juvenis e maduras em limão cravo de 6 meses de idade (A, B). A : detalhe da hastes do porta-enxerto curvadas, (foto da autora da tese).....	47
Figura 22 - Mudanças obtidas por enxertia de laranja Pera juvenis e maduras em limão cravo, após o corte copa do porta-enxerto (A, B). B : detalhe do corte do porta-enxerto permanecendo somente a brotação da laranja Pera, (foto da autora da tese).	47
Figura 23 - Mudanças obtidas por enxertia de laranja Pera com 2, 4 e 6 semanas, respectivamente, deflorando sempre que necessário o porta-enxerto de limão cravo, sobressaindo somente o crescimento da laranja, (foto da autora da tese).	48
Figura 24 - Mudanças obtidas por enxertia de laranja Pera madura (A) e juvenil (B), na juvenil espinhos indicado pela seta.	48
Figura 25 - Mudanças obtidas por enxertia de laranja Pera maduras (A) e juvenis (B), prontas para a inoculação de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> , (foto da autora da tese)....	49
Figura 26 - Sequência de fotos demonstrando a inoculação de <i>Ca. L. asiaticus</i> em laranja Pera, pelo método de borbulha, (foto da autora da tese).	50
Figura 27 - Separação das folhas, caule superior, caule inferior e raízes das plantas de laranja Pera citadas na tabela 6. A : amostras para estudo químico; B : amostra para análise por PCR, (foto da autora da tese).	51
Figura 28 - Ilustração da análise de PCR nas plantas de laranja Pera estudadas....	52
Figura 29 - Gráfico de score em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: Análises das raízes; A : laranja Pera madura/limão Cravo controle (---) e inoculado (---); B : laranja Pera juvenil/limão Cravo controle (---) e inoculado (---).....	56
Figura 30 - Gráfico de score em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: Análises das raízes; A : estaquias laranja Pera madura controle (---) e inoculado (---), B : laranja Pera juvenil controle (---) e inoculado (---), C : limão Cravo controle (---) e inoculado (---).....	57
Figura 31 - Gráfico de score em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA, comparando idades ontogenéticas distintas. Análises das raízes; A : laranja Pera juvenil/limão Cravo (---) inoculado e Pera madura/limão Cravo (---) inoculado, B : laranja Pera juvenil (---) inoculado e laranja Pera madura (---) inoculada.....	58

Figura 32 - Gráficos de dispersão (S-plot) em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: Análise das raízes de enxertos de laranja Pera madura/limão Cravo e laranja Pera juvenil/limão Cravo inoculados.	59
Figura 33 - Comparação dos cromatogramas de íons totais de amostras das raízes dos enxertos de laranja Pera madura/limão Cravo e laranja Pera juvenil/limão Cravo inoculados (vermelho tecido juvenil e em azul tecido maduro).	60
Figura 34 - As fotos exemplificam como estas plantas foram separadas para o estudo químico usando UPLC-QTOF-MS.	61
Figura 35 - A foto exemplifica como estas plantas foram separadas para o estudo químico usando UPLC-QTOF-MS.	61
Figura 36 - Espectro de massas para o íon m/z 163,1351 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 163.	63
Figura 37 - Espectro de massas para o íon m/z 229,0164 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 229.	64
Figura 38 - Espectro de massas para o íon m/z 229,0380 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 229.	65
Figura 39 - Espectro de massas para o íon m/z 245,0894 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 245.	67
Figura 40 - Espectro de massas para o íon m/z 245,1234 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 245.	68
Figura 41 - Espectro de massas para o íon m/z 259,0916 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 259.	69
Figura 42 - Espectro de massas para o íon m/z 259,1245 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 259.	71
Figura 43 - Espectro de massas para o íon m/z 261,1125 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 261.	72
Figura 44 - Espectro de massas para o íon m/z 279,1279 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 279.	73
Figura 45 - Espectro de massas para o íon m/z 313,1451 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 313.	74
Figura 46 - Espectro de massas para o íon m/z 243,2635 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 243.	78
Figura 47 - Espectro de massas para o íon m/z 245,1643 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 245.	79

Figura 48 - Espectro de massas para o íon m/z 263,2931 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 263.	81
Figura 49 - Espectro de massas para o íon m/z 263,1584 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 263.	83
Figura 50 - Espectro de massas para o íon m/z 263,2817 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 263.	84
Figura 51 - Espectro de massas para o íon m/z 217,1721 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 217.	88
Figura 52 - Espectro de massas para o íon m/ 381,0393 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 381.	90
Figura 53 - Espectro de massas para o íon m/ 403,1281 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 403.	92
Figura 54 - Espectro de massas para o íon m/ 373,0164 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 373.	94
Figura 55 - Espectro de massas para o íon m/ 471,1636 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 471.	96
Figura 56 - Espectro de massas para o íon m/ 245,0309 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 245.	99
Figura 57 - Fragmentações características de flavonoides O-glicosilados (ABLAJAN et al., 2006; CUYCKENS & CLAEYS, 2005).	101
Figura 58 - Fragmentações características de flavonoides C-glicosilados (LI et al., 1992; CUYCKENS & CLAEYS, 2005).	102
Figura 59 - Espectro de massas para o íon m/z 593,1206 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 593.	104
Figura 60 - Espectro de massas para o íon m/z 593,1181 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 593.	107
Figura 61 - Espectro de massas para o íon m/ 632,0178 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 623.	109
Figura 62 - Espectro de massas para o íon m/ 607,1055 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 607.	113
Figura 63 - Espectro de massas para o íon m/z 609,0109 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 609.	115

Figura 64 - Cumarinas que sofreram aumento na área de seu pico cromatográfico quando comparado tecidos maduros e jovens em enxertia e em estaquia com HLB.	118
Figura 65 - Limonoide que sofreu aumento na área de seu pico cromatográfico quando comparado tecidos maduros e jovens em enxertia e em estaquia com HLB.	119
Figura 66 - Flavonoides que sofreram aumento na área de seu pico cromatográfico quando comparado tecidos maduros e jovens em enxertia e em estaquia com HLB.	120
Figura 67 - Curva analítica das soluções padrões (----- Xantiletina, ----- Seselina, ----- 5-Metoxiseselina, ----- Hesperidina).	123

Lista de Esquemas

Esquema 1. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos da umbelliferona protonada.....	64
Esquema 2. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos da xantiletina protonada.....	65
Esquema 3. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos da seselina protonada.....	66
Esquema 4. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos da suberenona protonada.....	66
Esquema 5. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de ostol protonado.....	68
Esquema 6. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de 5-metoxiseselina protonada.....	70
Esquema 7. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de xantoxiletina protonada.....	70
Esquema 8. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de tamarina protonada.....	72
Esquema 9. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de ulopterol protonado.....	74
Esquema 10. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de nordentatina protonada.....	75
Esquema 11. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de citrubuntina protonada.....	79
Esquema 12. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de suberosina protonada.....	80
Esquema 13. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de decursinol protonado.....	82
Esquema 14. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de xantoarnol protonado.....	82
Esquema 15. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de diidrosuberenol protonado.....	85
Esquema 16. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de bergapteno protonado.....	89

Esquema 17. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de clausarina protonado.....	91
Esquema 18. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de nobiletina protonado.....	93
Esquema 19. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de tangeretina protonado.....	95
Esquema 20. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de limonina protonado.....	97
Esquema 21. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de 7-demetilisotamarina desprotonado.....	100
Esquema 22. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS ² , característicos de vicenina-2 desprotonada.....	105
Esquema 23. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) no espectro MS ² , característicos de didimina desprotonada.....	107
Esquema 24. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS ² , característicos de poncirina desprotonada.....	108
Esquema 25. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS ² , característicos de diosmetin-6,8-di-C-glucosídeo desprotonado.....	110
Esquema 26. Proposta para a formação do íon 632 pela reação de duas unidades do íon <i>m/z</i> 327.....	111
Esquema 27. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS ² , característicos de diosmina desprotonado.....	113
Esquema 28. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS ² , característicos de neodiosmina desprotonado.....	114
Esquema 29. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS ² , característicos de hesperidina desprotonado.....	115

RESUMO

ESTUDO DA RESPOSTA DE TECIDOS DE *CITRUS sinensis* EM FASES ONTOGENÉTICAS DISTINTAS À INFECÇÃO POR *CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS* – O objetivo foi desenvolver métodos analíticas para avaliar a variação do perfil químico entre exemplares de tecidos juvenis e maduros de laranja Pera (*C. sinensis*) em estaquia e enxertadas em limão cravo (*C. limonia*) com sintomas de HLB, e sem a bactéria, visando entender a resistência das plantas juvenis em relação ao tecido maduro na estaquia e no enxerto. As mudas foram preparadas a partir de semente e estas posteriormente forneceram estacas as quais foram enraizadas. As mudas maduras foram obtidas de segmentos de copas de mudas de laranja Pera produzidas em enxerto com limão Cravo, e renderam estacas, as quais foram enraizadas. Após 30 dias na câmara úmida as estacas enraizadas foram transplantadas para vasos onde permaneceram por 6 meses. Os enxertos foram obtidos retirando borbulhas das plantas de laranjeira pera sadias juvenis e maduras obtidas como acima. As plantas que sofreram o enxerto eram mudas de limoeiro Cravo com 6 meses de idade também sadias. Borbulhas foram retiradas de plantas de laranjeira Pera sintomáticas (com *Ca. L. asiaticus*) e enxertadas nas plantas sadias citadas acima. Após a inoculação da bactéria por borbulhas, as plantas foram avaliadas por PCR a 10, 30, 60 e 120 dias. Após 120 dias as plantas maduras apresentaram PCR positivo para raiz, caule inferior, caule superior e folhas, enquanto as juvenis também tiveram as mesmas respostas, porém, as folhas destas o PCR indicou ausência da bactéria. O estudo do perfil químico foi realizado com as plantas após 120 dias de inoculação da bactéria. Estas plantas foram coletadas e separadas em raiz, caule inferior, caule superior e folhas, secas e trituradas. Esse material seco foi estocado em freezer à -80 °C. Estes materiais secos foram extraídos com MeOH:H₂O (1:1) e analisados por UPLC-QToF/MS individualmente. Os dados obtidos foram comparados por meio de análise multivariada por PCA e OPLS-DA/S-Plot, e estes indicaram as frações a serem estudadas, ou seja, aquelas onde houve variação do perfil químico na presença da bactéria. Um método analítico usando UPLC-QToF/MS foi desenvolvido para identificar os principais compostos e determinar suas quantidades relativas em todas as frações sugeridas pela análise multivariada. Os estudos mostraram que as cumarinas estão sempre presentes em maior concentração nos tecidos maduros, e estão presentes nas partes inferiores do enxerto. Somente uma cumarina foi detectada no caule superior e nas folhas, a 7-demetilisotamarina, e também com a concentração maior nos tecidos maduros. Somente dois flavonoides foram detectados na base do enxerto (caule inferior), nobiletina e tangeretina. Nas demais partes superiores vários outros flavonoides foram detectados, e todos em maior concentração nos tecidos juvenis. Um método analítico usando HPLC-UV foi desenvolvido para quantificar as cumarinas xantiletina, seselina e 5-metoxiseselina, e o flavonoide hesperidina. Este estudo confirmou seselina com um aumento elevado na presença da bactéria, enquanto o flavonoide hesperidina tem sua concentração reduzida drasticamente na presença da bactéria. Os dados sugerem economia de energia, e esta ser canalizada na biossíntese de mais cumarinas. As cumarinas estão presentes nas partes inferiores do enxerto e devem ter potencial bactericida a *Ca. Liberibacter asiaticus*, cujo desenvolvimento inicial ocorre nas raízes.

ABSTRACT

STUDY OF CHEMICAL DEFENSE OF *Citrus sinensis* TISSUES IN DIFFERENT ONTOGENETIC STAGES TO INFECTION BY *Candidatus Liberibacter asiaticus* – The objective was to develop analytical methods to evaluate the variation in the chemical profile between specimens of juvenile and mature tissues of Pera orange (*C. sinensis*) in cuttings and grafted on Rangpur lime (*C. limonia*) with symptoms of HLB, and without the bacteria, aiming to understand the resistance of the juvenile plants in relation to the mature tissue in the cuttings and in the graft. The seedlings were prepared from seed and these later provided cuttings which were rooted. The mature seedlings were obtained from segments of Pera orange seedlings produced in graft with Rangpur lime, and yielded cuttings, which were rooted. After 30 days in the humid chamber, the rooted cuttings were transplanted to pots where they remained for 6 months. The grafts were obtained by removing buds from the healthy juvenile and mature orange pear plants obtained as above. The grafted plants were 6-month-old Rangpur lemon seedlings, also healthy. Bubbles were removed from symptomatic Pera orange plants (with *Ca. L. asiaticus*) and grafted onto the healthy plants mentioned above. After inoculation of the bacteria by bubbles, the plants were evaluated by PCR at 10, 30, 60 and 120 days. After 120 days, mature plants showed positive PCR for root, lower stem, upper stem and leaves, while juveniles also had the same responses, however, their leaves, PCR indicated absence of the bacteria. The study of the chemical profile was carried out with the plants after 120 days of inoculation with the bacteria. These plants were collected and separated into root, lower stem, upper stem and leaves, dried and crushed. This dry material was stored in a freezer at -80 °C. These dry materials were extracted with MeOH:H₂O (1:1) and analyzed by UPLC-QToF/MS individually. The data obtained were compared by means of multivariate analysis by PCA and OPLS-DA/S-Plot, and these indicated the fractions to be studied, that is, those where there was a variation in the chemical profile in the presence of the bacteria. An analytical method using UPLC-QToF/MS was developed to identify the main compounds and determine their relative amounts in all fractions suggested by the multivariate analysis. Studies have shown that coumarins are always present in greater concentration in mature tissues, and are present in the lower parts of the graft. Only one coumarin was detected in the upper stem and leaves, 7-demethylisotamarin, and also with the highest concentration in mature tissues. Only two flavonoids were detected at the base of the graft (lower stem), nobiletin and tangeretin. In the other upper parts, several other flavonoids were detected, and all in greater concentration in the juvenile tissues. An analytical method using HPLC-UV was developed to quantify the coumarins xanthylethine, seseline and 5-methoxyseseline, and the flavonoid hesperidin. This study confirmed seselin with a high increase in the presence of the bacteria, while the flavonoid hesperidin had its concentration drastically reduced in the presence of the bacteria. The data suggest energy savings, and this being channeled into the biosynthesis of more coumarins. Coumarins are present in the lower parts of the graft and must have bactericidal potential against *Ca. Liberibacter asiaticus*, whose initial development occurs in the roots.

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Citricultura e doenças citrícolas.....	1
1.2 Citros Huanglongbing.....	2
1.3 Estudos químicos comparativos de citro com e sem sintomas de Huanglongbing	10
1.4 Estaquia	16
1.5 Enxertia.....	18
1.5.1 Lacunas na relação estaquia e enxerto de <i>Citrus</i> em fases ontogenéticas distintas frente a <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	23
1.6 Metabolômica.....	27
1.7 Quimiometria.....	30
2. Objetivos	31
2.2. Objetivo geral	31
2.2.1. Objetivos específicos	31
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Materiais	33
3.2. Equipamentos	34
3.3. Obtenção das plantas para estudo.....	35
3.3.1. Preparação de estacas de laranja Pera.....	35
3.3.2. Preparação de enxertos de laranja Pera	36
3.3.3. Inoculação de <i>Ca. L. asiaticus</i> por borbulha de plantas com HLB	38
3.3.4. Preparo dos extratos das plantas de citros e as respectivas amostras.....	39
3.4. Extração de DNA e reação de PCR	40
3.5. Desenvolvimento do Método Analítico para UPLC-MS.....	41
3.5.1. Análise quimiométricas	42
3.6. Quantificação das cumarinas xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina, e do flavonoide hesperidina nas plantas de citros em estudo	42

3.6.1. Preparação das amostras	42
4. Resultados e Discussões	45
4.1. Plantas desenvolvidas para o estudo do perfil químico	45
4.1.1. Laranja Pera juvenil e madura em estacas.....	45
4.1.2. Laranja Pera juvenil e madura em enxertia	46
4.1.3. Inoculação de <i>Ca. L. asiaticus</i> em laranja Pera juvenil e madura em estaca e em enxertia	49
4.1.4. Resultado das análises de PCR para confirmar a presença de <i>Ca. L. asiaticus</i> em laranja Pera juvenil e madura em estaca e em enxertia, após a inoculação.....	51
4.2. Análise exploratória dos dados obtidos por LC-MS-QToF	54
4.2.1. Análise do perfil químico dos tecidos juvenis e maduros de laranja Pera enxertadas em limão cravo e sem a enxertia, com e sem <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>	60
4.3. Validação do método de quantificação das cumarinas xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina, e do flavonoide hesperidina nas plantas de citros discutidas acima	121
4.3.1. Linearidade	121
4.3.2. Precisão e Exatidão	124
4.3.3. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	126
4.3.4. Aplicação do método de quantificação por CLAE-UV nas amostras dos enxertos de <i>C. sinensis</i> maduras e juvenis sobre <i>C. limonia</i> madura e nas estaquias de <i>C. sinensis</i> maduras e juvenis com HLB.....	127
5. Conclusão	133
6. Referências Bibliográficas	135

1. Introdução

1.1 Citricultura e doenças citrícolas

Entre os principais grupos de frutas no mundo os citros se destacam em volume de produção estando em primeiro lugar, seguido das culturas de banana, uva e maçã. Os países que se destacam como maiores produtores mundial de citros são: Brasil representando 15.62 milhões de toneladas métricas, China 7,3, União Europeia 6,10, Estados Unidos 4.66, Egito 3,00, México 2,53. Como toda cultura, a citricultura é alvo de várias doenças e pragas que causam a diminuição da produção e da qualidade dos frutos, e sem medidas de controle pode tornar o pomar improdutivo ou até mesmo levar a sua erradicação (SHAHBANDEH, 2020). As principais doenças citrícolas que causam danos significativos são: Leprose dos Citros, Gomose de *Phytophthora*, Cancro Cítrico, Declínio, Mancha Alternaria, Morte Súbita dos Citros (MSC), Podridão Floral dos Citros, Rubelose, Tristeza – *Citrus Tristeza Virus* (CTV), Mancha Preta do Citros (MPC), Clorose Variegada dos Citros (CVC) e Huanglongbeing (HLB – ex-greening), dando destaque para a última que foi o foco desta tese.

Huanglongbing (HLB) tem sido uma séria ameaça à indústria cítrica em todo o mundo. Após seu primeiro relato no Estado de São Paulo, principal polo cítrico do Brasil, a doença se espalhou para Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul. Tentativas de cura das plantas se mostraram ineficientes e inviáveis. O desenvolvimento de variedades resistentes ou tolerantes à bactéria ou ao seu inseto vetor, o psíldeo cítrico asiático *Diaphorina citri* Kuwayama, ainda é um desafio de longo prazo. O manejo anterior do HLB baseava-se em medidas preventivas, como plantio de mudas saudáveis, eliminação de árvores doentes e controle de vetores. Apoiado em dados de pesquisa e experiências de produtores de citros, o manejo do HLB no cinturão cítrico de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro foi aprimorado com medidas aplicadas individualmente apenas nos pomares para o manejo regional da doença. Isto também incluiu o controle diferenciado de psíldeos nos pomares com base na localização das árvores e lavagem de brotos, controle coordenado de psíldeos em toda a área e remoção de fontes de inoculo em propriedades não comerciais nas proximidades dos pomares comerciais (BASSANEZI et al., 2020).

Além disso, o impacto negativo do HLB na produção e longevidade do pomar foi reduzido com a ampla adoção de melhores práticas culturais, como plantio de alta densidade, irrigação e nutrição adequada. Diferentemente de outros países onde o HLB atingiu níveis epidêmicos, o manejo do HLB no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro tem sido considerado um caso de sucesso e tem garantido a manutenção da citricultura e a competitividade desta enquanto novas e mais duráveis medidas sustentáveis ainda não estão disponíveis (BASSANEZI et al., 2020).

Até o momento, as experiências de manejo do HLB no Brasil demonstram que a doença pode ser controlada se as práticas de manejo preventivo de redução do inoculo e controle de vetores forem aplicadas em escala regional. O sucesso exige um considerável esforço individual e cooperativo de citricultores, instituições de pesquisa, agentes governamentais e sociedade.

1.2 Citros Huanglongbing

Huanglongbing é a doença mais destrutiva dos citros. No Brasil ela está associada às bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca. L. americanus* (COLLETA FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005), as quais colonizam o floema causando queda gradual de folhas e frutos e declínio da planta. *Ca. L. asiaticus* é a mais agressiva e mais difundida em regiões citrícolas. A origem desse agente patogênico é desconhecida, mas o movimento global e plantio de culturas agrícolas em novas regiões, provavelmente acelerou o surgimento desse patógeno. A compreensão da fisiopatologia desta doença permanece limitada devido ao seu recente surgimento, propagação e a impossibilidade de se desenvolver em laboratório culturas do agente causal (ALBRECHT & BOWMAN, 2012).

O HLB é visualizado inicialmente nos pomares como sintomas foliares na extremidade dos galhos com brotos amarelos, e queda das folhas. Estes sintomas visíveis não se desenvolvem em até 6 meses a 3 anos após o início da infecção, dependendo da idade da árvore (FOLIMONOVA & ACOR, 2010; BOVÉ, 2006). Os sintomas na folha começam em um ou em alguns ramos e lentamente se espalham para o resto da árvore, muitas vezes ao longo de vários anos. Este desenvolvimento lento de sintomas visuais não explica a queda rápida no rendimento que ocorre no

início em árvores sintomáticas (BASSANEZI et al., 2011). A discrepância entre a gravidade dos sintomas visuais e do declínio do rendimento em citros afetados pelo HLB sugere que danos não observados estão ocorrendo.

A maioria dos estudos sobre o HLB até recentemente focaram nos sintomas foliares, por serem visualmente aparente e devido ao psíldeo *Diaphorina citri*, transmissor da bactéria, se alimentar do floema das folhas. Este inseto é altamente prolífico e de difícil controle. No entanto, estudos da distribuição de *Ca. L. asiaticus* em árvores de citros fortemente infectadas mostram que a bactéria invade todos os tecidos contidos no floema (LI et al., 2009; TATINENI et al., 2008).

O movimento inicial das *Ca. L. asiaticus* para diferentes tecidos dos citros após a infecção e os primeiros efeitos do HLB sobre os tecidos da raiz são mal entendidos (ETXEERRIA et al., 2009; FOLIMONOVA & ACOR, 2010). Conhecer quais são os tecidos primeiramente colonizados por *Ca. L. asiaticus* após a infecção forneceria informações úteis sobre os efeitos iniciais do HLB.

Os sintomas no geral têm sido relacionados à redução na condutividade vascular, notadamente dos vasos do floema, o qual é um tecido formado por vasos especializados na condução de nutrientes (carboidratos, proteínas, aminoácidos e minerais), alguns hormônios, e substâncias do metabolismo secundário. Ou seja, a infecção impede a planta de transportar essas substâncias devido à obstruções dos vasos do floema. Tem sido sugerido que isso ocorre devido ao acúmulo de calose, um polímero de glicose que obstrui as placas crivosas de ligação das células dos vasos e dos plasmodesmas, que são canais celulares especializados em transporte de substâncias das células companheiras que estão na interface entre a fonte e o floema (KOH et al., 2012).

Essa obstrução do floema tem sido considerada uma das principais causas dos sintomas como a redução do desenvolvimento de folhas e frutos, e até de sua queda. A parte aérea das plantas é responsável pelo fornecimento de carboidratos para o desenvolvimento do sistema radicular, e se esse fornecimento é reduzido devido à obstrução do floema em citros com HLB, e as raízes tendem a se reduzirem e até se definharem ao longo do tempo e, conseqüentemente, diminuem a absorção de água e nutrientes minerais, proporcionando deficiências minerais e hídricas para a parte aérea (MEDINA et al., 2012).

No entanto, Graham e colaboradores na Flórida mostraram que a perda das raízes ocorre mais cedo do que o esperado em árvores adultas com sintomas recentes e até mesmo em árvores de 3 a 4 anos infectadas e com teste positivo para *Ca. L. asiaticus* em folhas por PCR quantitativo (GRAHAM et al., 2013). Sabe-se que a bactéria invade um tecido aproximadamente 3 meses antes de os sintomas visuais se desenvolverem (FOLIMONOVA & ACOR, 2010). Portanto, é provável que acompanhar o movimento da bactéria em um processo de infecção precoce poderia dar uma visão de onde o desenvolvimento da doença ocorre inicialmente e teria um grande impacto sobre a saúde da árvore. A hipótese dos autores era que o primeiro tecido colonizado por *Ca. L. asiaticus* deveria ser o local dos primeiros danos no desenvolvimento de HLB.

JOHNSON e colaboradores (2014) estudaram o movimento da *Ca. L. asiaticus* após a infecção inicial monitorando as folhas e raízes das árvores em casa de vegetação. A análise da densidade de raízes, do teor de amido armazenado e da anatomia do sistema vascular na presença dessa bactéria em plantas sintomáticas e assintomáticas no campo e em casa de vegetação mostrou a importância da infecção na raiz no desenvolvimento da doença.

Eles mostraram que a bactéria coloniza preferencialmente as raízes antes das folhas, onde se multiplicam e rapidamente invadem as folhas quando novas folhagens se tornam um tecido formado por vasos especializados na condução do fluxo do floema. Isto levou à descoberta de que as raízes são danificadas pela infecção ocasionada pela bactéria antes do desenvolvimento dos sintomas foliares visíveis, e não está associada com a obstrução do floema e consequente redução do fornecimento de carboidratos, como era a hipótese anteriormente mostrada acima.

O papel da infecção na raiz por bactérias sistêmicas transmitidas por insetos vetores têm sido subestimado. Estes resultados sugerem um modelo para o movimento de bactéria limitada ao floema desde o local inicial de alimentação do inseto até às raízes onde ela se replica, ocasiona danos no sistema radicular, e depois se espalha para o resto da copa durante lançamentos de novas folhagens (JOHNSON et al., 2014).

O HLB não provoca de fato a morte da planta. Porém, com o passar dos anos ela se torna debilitada e improdutiva. Os frutos de citros infectados por HLB têm o seu desenvolvimento comprometido e apresentam gosto amargo. As plantas

contaminadas produzem cada vez menos frutos, aqueles que se desenvolvem ficam menores, com menor teor de sólidos solúveis, maior acidez, menor índice de maturação (“Ratio”), menor quantidade de suco e menor índice tecnológico. Com isso a planta perde todo seu valor econômico, gerando assim sérios prejuízos aos seus produtores (RIECKMANN, 2008).

O sintoma inicial do HLB aparece, geralmente, em um ramo que se destaca pela presença de folhas de cor amarela em contraste com a coloração verde das folhas dos ramos não afetados (Figura 1). Com a evolução da doença, há intensa desfolha dos ramos afetados e os sintomas começam a aparecer em outros ramos da planta, tomando toda a copa.



Figura 1 - Sintomas de HLB em laranjeiras em dois estádios de infecção (Fonte: Fundecitrus).

As folhas do ramo afetado apresentam manchas de formas irregulares, verdes claras ou amareladas, mescladas com o verde normal sem uma nítida divisão entre elas, ou clorose assimétrica (Figura 2 A). Em plantas novas afetadas pelo HLB, o sintoma se caracteriza pelo amarelecimento generalizado das folhas. Em ramos com sintoma avançado da doença podem surgir novos brotos, com folhas pequenas e de coloração amarelada, sem o mosqueado típico (Figura 2 B). Em alguns casos, observa-se o engrossamento e clareamento das nervuras da folha, que ficam com aspecto corticoso (Figura 2 C). Geralmente os sintomas podem ser confundidos com sintomas de deficiências de nutrientes. Os sintomas mais importantes ocorrem com os frutos, que é o real interesse do produtor.

Nos frutos de plantas doentes com HLB pode ocorrer internamente diferença de maturação nas diferentes partes, ou seja, ter um dos lados maduro e o outro ainda verde, além de ficar deformado, pequeno e assimétrico. É comum também

a ocorrência de sementes abortadas, que ficam pequenas, mal formadas (Figura 2 D). Cortando o fruto no sentido longitudinal, é possível verificar internamente que a parte branca da casca, em alguns casos, apresenta uma espessura maior que a de um fruto sadio (Figura 2 E). Nos frutos afetados podem surgir pequenas manchas circulares amareladas que contrastam com o verde normal do restante do fruto (Figura 2) (Fundecitrus).

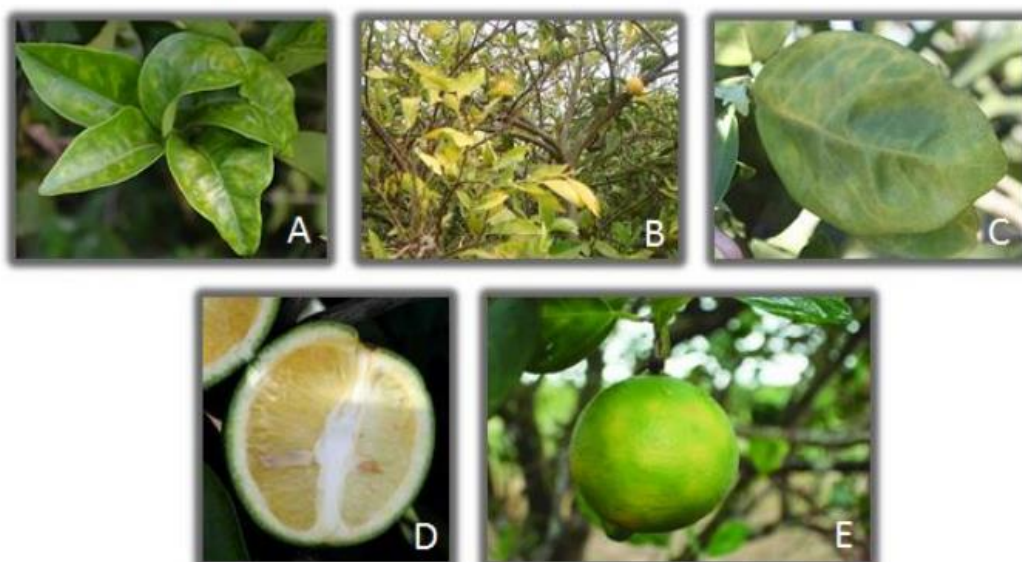


Figura 2 - Principais sintomas nas folhas e nos frutos de citros, provocados pela doença HLB. (A): mosqueamento; (B): amarelecimento nas folhas novas; (C): engrossamento da nervura central; (D): sementes abortadas e engrossamento da casca; (E): manchas amarelas na casca (Fonte: Fundecitrus).

Todas as espécies comerciais de citros e cultivares são sensíveis ao HLB, independentemente de porta-enxertos, não havendo nenhuma espécie resistente ou tolerante (BOVÉ, 2006). Os primeiros relatos científicos sobre o HLB foram registrados em 1919, os quais a denominaram na China a doença do ramo amarelo (“yellow shoot”) dos citros (BOVÉ, 2006). A partir deste país, outros se sucederam ao logo do tempo, nos continentes Asiático e Africano, e na Oceania. Apenas recentemente, no início do século 21, a doença chegou ao continente Americano, justamente nos dois principais centros produtores de citros, Brasil (São Paulo) e Estados Unidos (Flórida), somando-se ao todo próximo a 40 países onde a doença se faz presente (BOVÉ, 2006).

Por muito tempo acreditou-se que a doença era causada por deficiências nutricionais, ou até mesmo por falta de água, ao invés de um agente fitopatogênico. Um importante resultado obtido foi o da transmissão da doença por enxertia, em 1956, provando tratar-se de uma doença infecciosa. A partir do momento em que o HLB foi relatado ser transmitido por enxertia e insetos vetores, houve a necessidade de se compreender mais sobre o assunto. Acreditava-se tratar de um vírus, por ser o único organismo conhecido até o momento que pudesse ser transmitido por esses meios, e essa natureza viral foi dada como verdadeira por muitos anos. Porém, em 1970 estudos mais avançados, equipamentos mais modernos e imagens mais precisas permitiram a confirmação de um agente bacteriano através de análises microscópicas de tecido vegetal, em vasos do floema de plantas doentes (LAFLECHE, 1970).

Esses mesmos agentes não eram visualizados em floemas de plantas saudáveis. Muito embora o postulado de Kock não tenha sido concluído para o HLB, é consenso que este é causado pela bactéria "*Candidatus Liberibacter*", a qual é gram-negativa e restrita ao floema (JAGOUÉIX, 1994). O nome trivial *Liberibacter* (do latim *liber* = casca e *bacter* = bactéria) foi dado para organismos neste novo subgrupo, enquanto "*Candidatus*" é um termo usado para organismos bem caracterizados, porém não cultivados *in vitro* (MURRAY, 1994). Até meados de 2004, existiam apenas duas formas de bactérias causadoras do HLB, *Candidatus Liberibacter africanus*, associado à forma africana da doença, e *Candidatus Liberibacter asiaticus* associada à forma asiática. Através do uso de ferramentas da biologia molecular uma nova espécie de *Liberibacter* foi descoberta, a "*Candidatus Liberibacter americanus*" (TEIXEIRA, 2005). No estado de São Paulo os principais agentes do HLB são "*Ca. L. americanus*" e "*Ca. L. asiaticus*" (BOVÉ, 2006).

A bactéria causadora do HLB não é disseminada pelo vento, pela água, instrumentos agrícolas, material contaminado, por contato, etc. Ela é transmitida apenas através do inseto vetor, por enxertia de mudas contaminadas, borbulhas e por meio da planta parasita *Cuscuta*. Outra forma de transmissão é por mudas contaminadas, que disseminam a doença a longas distâncias. A principal forma de transmissão é através dos insetos vetores *Trioza erytreae* e *Diaphorina citri* (Figura 3). O primeiro está associado à forma africana da doença e o segundo à forma asiática e americana (CAPOOR, 1967). As interações entre os vetores e o patógeno são pouco

estudadas, mas sabe-se que a bactéria é capaz de se multiplicar no interior do vetor (AUBERT, 1987).



Figura 3 - Vetores do HLB, *Tryosa eritreae* (A) e *Diaphorina citri* (B). Fonte: Fundecitrus).

No Brasil o HLB é transmitido pelo psílídeo *D. citri*, um inseto de coloração cinza e com manchas escuras nas asas que mede de 2 a 3 mm de comprimento. Este se hospeda em todas as variedades cítricas e na murta (*Murraya paniculata*, Rutaceae). Ele é encontrado nas folhas e ramos e estando a uma inclinação de 45°, o que ajuda no seu reconhecimento (Figura 4 A). O inseto, devido ao seu metabolismo, só consegue voar a uma distância de 10 metros no máximo por voo. Há ocorrência do inseto o ano inteiro, mas a sua população é maior durante o período de brotações da planta. *D. citri* é um membro da família Psyllidae que apresenta ciclo de vida curto e alta fertilidade (AUBERT, 1987).

Os adultos do psílídeo se alimentam de folhas. Porém deposita seus ovos apenas em brotos novos, onde depois as ninfas se desenvolvem. O inseto não nasce com a bactéria, este se contamina quando suga plantas doentes e uma vez que adquire a bactéria nunca mais a perde. Como o patógeno é restrito ao floema, assume-se que a alimentação no floema seja essencial para a aquisição e inoculação (Figura 4 B). Uma vez infectado, este irá disseminar a doença ao se alimentar novamente, dessa vez de uma planta sadia (AUBERT, 1987).

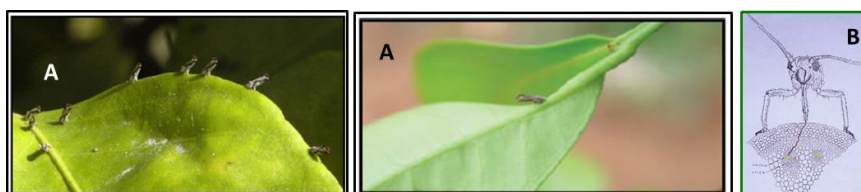


Figura 4 - Pisílídeo *Diaphorina citri* sobre folha de citros A) e se alimentando B) (fonte: www.insectimages.org).

Diaphorina citri é referido no Brasil desde 1942, porém mesmo com a presença constante do psíldeo em pomares de São Paulo e de outros estados brasileiros durante todo esse tempo, o HLB só foi constatado 62 anos após a referência da ocorrência da praga (AUBERT, 1987). Sob condições experimentais, ambas as espécies são capazes de transmitir o HLB asiático e africano. Porém, a sensibilidade e tolerância à temperaturas para essas duas espécies de psíldeo, diferem-se para os diferentes tipos de HLB. *D. citri* é tolerante ao calor, enquanto que *T. erytrae* é sensível às altas temperaturas (assim como a bactéria que este carrega, isto é, *Ca. L. africanus* é sensível a temperaturas superiores a 25 °C (BOVÉ, 2006).

Absolutamente não existe um método curativo para o HLB. Tudo que se pode fazer é prevenir. Se instalado, combate-lo através da eliminação constante de fontes de inóculo (plantas doentes), assim como diminuir ao máximo possível a população do vetor, *D. citri*. O manejo da doença é baseado em cinco medidas fundamentais que devem ser adotadas por todos os citricultores de maneira coletiva (BASSANEZI et al., 2020, Fundecitrus, informação Sílvio A. Lopes).

a) Inspeções frequentes de todas as plantas dos pomares, devendo ser feitas em todas as plantas cítricas. Recomenda-se que sejam realizadas, no mínimo, seis vezes por ano, mas o controle mais adequado exige inspeções mensais, dependendo da região e histórico da doença.

b) Arranque das árvores contaminadas, independentemente da idade e severidade de sintomas. A única forma de transmissão no pomar é por meio do inseto vetor. O inseto só pode se contaminar se alimentando de plantas doentes. Dessa forma, as plantas sintomáticas devem ser eliminadas assim que detectadas. Não manter plantas cítricas com sintomas no pomar, mesmo quando próximo da colheita. As mesmas são fonte constante de inóculo e permitem a infecção de novas plantas e pomares, mesmo quando se faz o controle do inseto vetor.

c) O controle do vetor é baseado no monitoramento de adultos e ninfas. O inseto vetor está presente no pomar o ano todo. O monitoramento deve ser realizado por meio de armadilhas adesivas e pela observação em brotos novos. Para o controle do psíldeo podem ser utilizados inseticidas em pulverização e sistêmicos.

d) Adquirir mudas sadias com origem garantida. Essas mudas são produzidas em viveiros devidamente cadastrados na Coordenadoria de Defesa Agropecuária (www.cda.sp.gov.br).

e) Eliminação das plantas de murta. Por ser hospedeira do psílídeo e da bactéria, as plantas de murta devem ser eliminadas para que não sirvam de fonte de inoculo. A poda é inútil e perigosa. Experimentos conduzidos com diferentes variedades de copa em diferentes idades e com plantas apresentando vários níveis de sintomas comprovaram que a poda não funciona para o HLB. Ela não cura a planta, a maioria delas podadas tanto no tronco como na pernada desenvolveram sintomas da doença entre 4 a 5 meses depois da poda. Além de não curar a planta, as brotações que surgem após a poda servem como fonte para novas infecções (BASSANEZI et al., 2020, Fundecitrus, informação Sílvio A. Lopes).

1.3 Estudos químicos comparativos de citro com e sem sintomas de Huanglongbing

O primeiro relato de HLB no Brasil data de junho de 2004, onde o Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (IAC) e o Fundecitrus relataram simultaneamente a ocorrência da doença em plantas localizadas próxima ao município de Araraquara, em São Paulo. Porém, relatos de produtores levam a crer que esta doença já estava em nossas culturas há pelo menos 10 anos sem ter-se dado atenção a sua existência. Essa foi a primeira detecção da doença no continente americano. Em 2005 ocorreu a primeira detecção da doença em Minas Gerais e em 2007 no Paraná.

Uma das grandes dificuldades ao lidar com esta doença é a sua rápida disseminação. Estudos científicos comprovam que para cada planta apresentando sintoma da doença, esta irá infectar outras três saudáveis num período de até três meses. É possível compreender melhor essa afirmação analisando a Figura 5. Esta figura ilustra a propagação da doença, onde uma única planta doente pode provocar um grande prejuízo para a plantação toda, pois ao final de um ano (12 meses) uma única planta contaminada pode ter transmitido a doença para mais de 250 plantas (COLLETTA FILHO, 2004; TEIXEIRA, 2005).

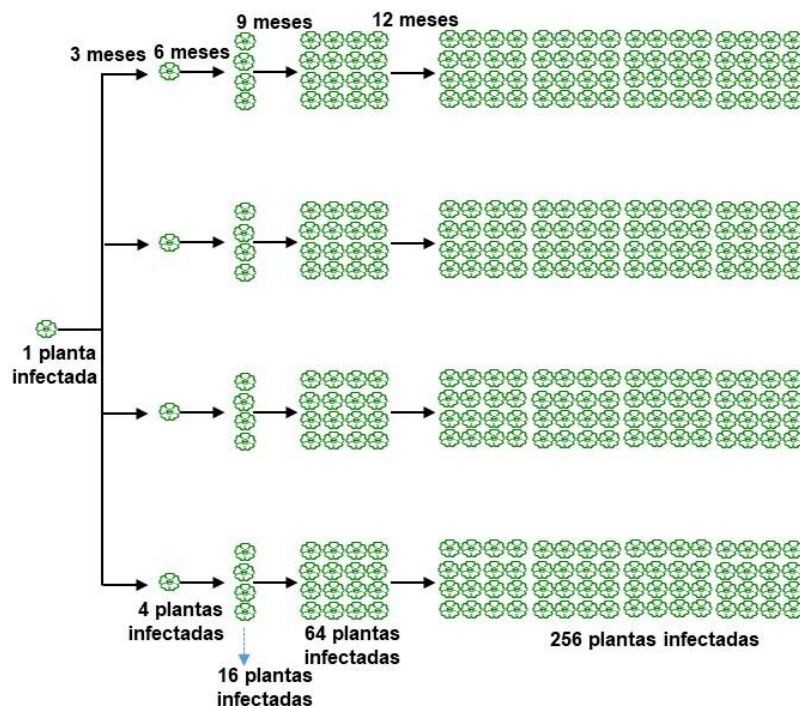


Figura 5 - Representação da rápida disseminação do HLB. Uma planta contaminada, infecta outras 3. A partir de uma única planta doente, ao final de um ano haverá mais de 260 plantas contaminadas.

Para se entender o avanço da doença, o primeiro levantamento amostral realizado em março de 2004 apontou a presença do HLB em dois municípios paulistas. Dois anos depois desse primeiro levantamento, esse número já chegava à 126 municípios. Em julho de 2010, já eram 253 em São Paulo, mais 4 em Minas Gerais e 54 no Paraná (Figura 6).

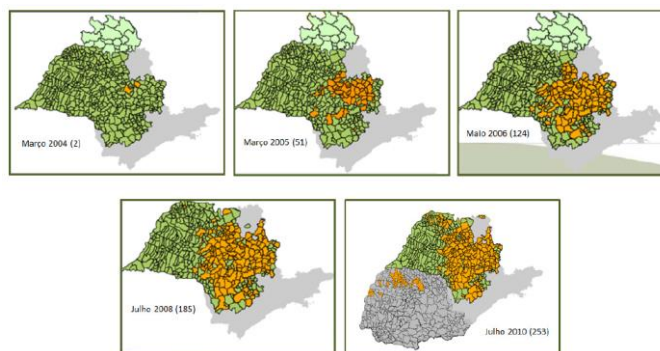


Figura 6 - Evolução de municípios com HLB no estado de São Paulo (Fundecitrus 2008, 2009).

Devido à essa rápida disseminação, quatro anos após a constatação da presença do HLB no Brasil, através da identificação dos sintomas nas plantas e testes

moleculares específicos, foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) uma Instrução Normativa nº53 (IN53), divulgada no Diário Oficial em 17 de outubro de 2008. Anteriormente a Instrução Normativa nº32, determinava a eliminação somente das plantas sintomáticas comprovadamente infectadas, já a IN 53 determina a eliminação das plantas sintomáticas e assintomáticas do mesmo talhão quando a incidência da doença é superior a 28%.

Em outras palavras, se o talhão apresentar ao menos 28% das plantas doentes com sintomas, foi provado cientificamente que todas as plantas já estão infectadas (mesmo que muitas ainda não apresentem sintomas), e, portanto, todo o talhão deve ser eliminado. Além disso, a IN 53 também proíbe a produção de material propagativo de citros, nas áreas de ocorrência do HLB, quando não realizada em ambiente protegido; proíbe a produção, comércio e trânsito de plantas de *Murraya paniculata* nessas mesmas áreas; e determina que citricultores façam, no mínimo, inspeções trimestrais para detecção de plantas com HLB (BELASQUE Jr. et al., 2009).

Estas informações mostra a grande necessidade de um programa para o controle do HLB. O grupo de Produtos Naturais da UFSCar vem respondendo a essas necessidades identificadas e classificadas como estratégicas em documentos de políticas públicas do Governo, como mostrado acima. Para a execução deste programa pesquisadores de diferentes áreas foram agregados em rede (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Control de insetos Pragas; INCT-CBIP), e estes vem usando o conhecimento e experiência científica para melhorar as práticas de controle do HLB.

Os metabólitos secundários que um microrganismo sintetiza estão relacionados com o seu respectivo nicho ecológico. Este não só precisa sintetizar metabólitos para competir com outros patógenos, a fim de colonizar o hospedeiro, mas presumivelmente também para regular o metabolismo do hospedeiro em sua associação equilibrada. Assim, *Ca. L. asiaticus* ou *Ca. L. americanus* estão em contato com seus citros hospedeiros, formando uma intrigante e desafiadora dupla planta-microrganismo para estudos científicos.

Os resultados em pesquisa nesta interação os quais serão mostrados a seguir mostram as competências já estabelecidas pela equipe do INCT-CBIP, indicando que ele tem o potencial para alcançar novos grandes avanços dentro do tema HLB.

Inicialmente foi realizado o estudo da variação do perfil químico de citros após a inoculação da bactéria *Ca. L. asiaticus*. Inoculou-se essa bactéria em mudas de laranja Valência [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas em citumelo Swingle (*Citrus paradisi* X *Poncirus trifoliata*) e avaliou-se a variação dos metabólitos secundários através do desenvolvimento de métodos analíticos como HPLC-UV, LC-MS/MS, LC-UV-SPE-NMR e de ferramentas quimiométricas (Tese de doutorado de B.S. BELLETE, 2013). As ferramentas quimiométricas, aplicadas aos dados obtidos nos estudos de LC-MS/MS, permitiram discriminar as plantas infectadas com a bactéria daquelas sadias, e também a caracterização dos compostos que mais contribuem para essa diferenciação.

Ao analisar o perfil químico da planta infectada com HLB e sadia via HPLC-UV-SPE-NMR e LC-MS foi possível observar que a planta responde produzindo alguns metabólitos em maior ou menor quantidade em resposta à presença da bactéria. Nas análises via HPLC-UV-SPE-NMR foi possível observar que a planta aumenta a produtividade de alguns metabólitos em resposta à presença da bactéria somente nos extratos das raízes (Tabela 1). Nos demais extratos, folhas, caule superior e caule inferior, há uma reação inversa, ocorrendo a redução da produção dos compostos nas plantas infectadas com HLB.

Tabela 1 - Variação do perfil químico obtido via técnica de HPLC-UV-SPENMR, entre citros doente e sadios.

Folhas			
Banda	RT (min)	Variação (doente)	Identificação (Fig. 7,8)
F1	8,3	Redução	Vicenina 2
F2	8,8	Redução	6,8-di-C-glu-Diosmetina
F4	11,3	Redução	Didymina
F5	12,9	Redução	Diosmina
F6	13,2	Redução	Hesperidina
Caule Superior			
Banda	RT	Variação	Identificação
C2	13,2	Redução	Hesperidina
Caule Inferior			
Banda	RT	Variação	Identificação
C1	8,1	Redução	Vicenina 2
C2	12,2	Redução	Hesperidina
C3	21,8	Redução	Xantiletina
C4	22,1	Redução	Xantoxiletina
C5	23,1	Redução	Dentatina
Raiz			
Banda	RT	Variação	Identificação
R1	14,20	Aumento	Limonina
R3	15,74	Aumento	Xantoxiletina
R5	22,77	Aumento	Clauserina

A variação quantitativa dos compostos citados na tabela (redução ou aumento relativos) foi calculada através das áreas dos picos dos cromatogramas.

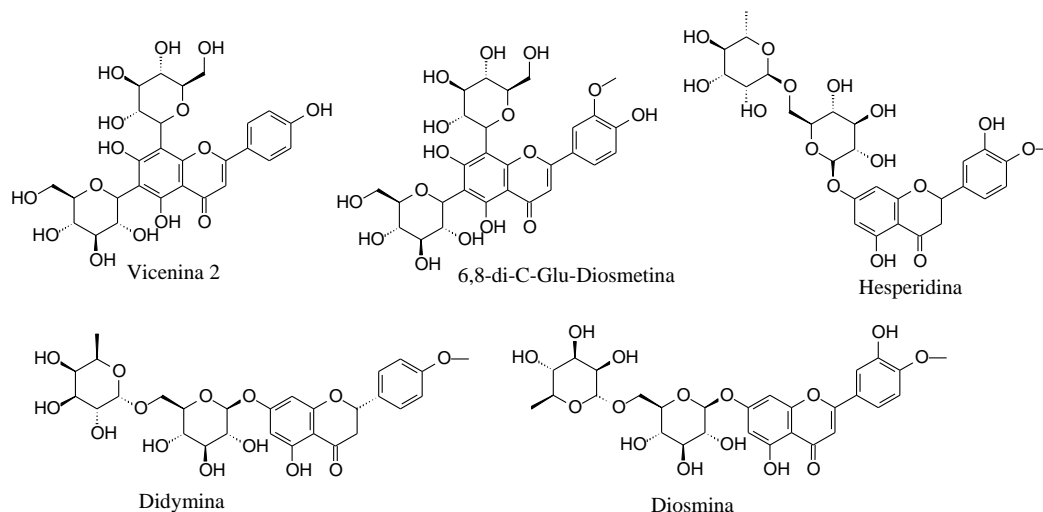


Figura 7 - Flavonoides cujas concentrações variaram nos citros com sintoma de HLB.

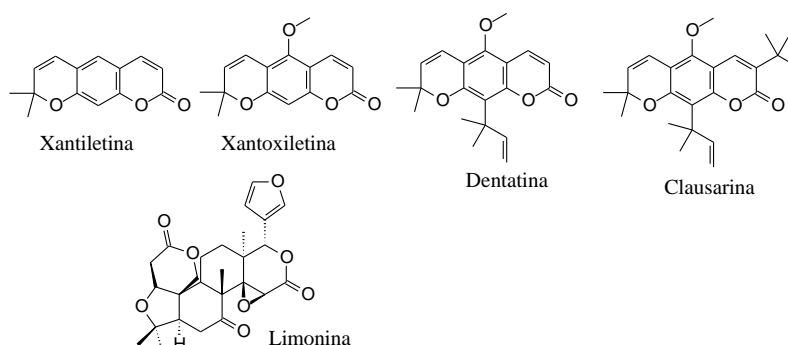


Figura 8 - Cumarinas e Limonoides cujas concentrações variaram nos citros com sintoma de HLB.

O conjunto dos dados obtidos sugere que a defesa da planta frente à bactéria parece estar nas raízes, inibindo o caminho do ácido cinâmico que leva aos flavonoides nos demais órgãos, para ativar aquele que conduz às cumarinas nos tecidos radiculares. A ativação do caminho que leva às cumarinas sugere estas terem a função de sinalização na defesa contra a bactéria. As cumarinas poderiam ser mensageiras, que ativam o mecanismo de defesa para os demais órgãos da planta. Estas informações abrem possibilidades de estudos em engenharia genética sobre a biossíntese destes compostos, com possibilidades de indução de resistência em citros à *Ca. Liberibacter*.

Os dados obtidos também estimularam novos estudos, entre eles entender a interação entre a bactéria e a planta, e a possibilidade de ensaios *in vivo*

das substâncias que se mostraram potencialmente promissoras, uma vez que essa bactéria ainda não é cultivável *in vitro*.

Não há relatos na literatura sobre a avaliação dos efeitos do HLB sobre os metabólitos secundários dos citros, e os dados obtidos pelo INCT-CBIP reforçam os resultados dos estudos de Johnson e colaboradores (2014) mostrados na introdução. Eles mostraram que a bactéria coloniza preferencialmente as raízes antes das folhas, onde se multiplicam e rapidamente invadem as folhas quando novas folhagens se tornam um tecido formado por vasos especializados na condução do fluxo do floema. Isto levou à descoberta de que as raízes são danificadas pela infecção ocasionada pela bactéria antes do desenvolvimento dos sintomas foliares visíveis, o que confirma o aumento na concentração de cumarinas neste órgão estar relacionado a uma resposta de defesa da planta.

Assim, alguns desafios foram vencidos, indicaram outros novos e mostram que a sequência do trabalho é necessária para se alcançar novos grandes avanços dentro desse tema. Uma mudança na prevalência do patógeno foi observada ao longo do tempo, com um aumento desproporcional na ocorrência de *Ca. L. asiaticus*. A impossibilidade de se desenvolver em laboratório culturas de ambas as bactérias, experimentos de transmissão por enxerto foram usados para um estudo comparativo de ambas as espécies. Borbulhas de ramos sintomáticos de árvores afetadas no campo foram usadas como inoculo. As plantas foram inoculadas com *Ca. L. asiaticus* ou *Ca. L. americanus*, sozinhas ou simultaneamente com ambas as espécies. As populações bacterianas mais altas de plantas infectadas com *Ca. L. asiaticus* forneceram uma explicação para o aumento desproporcional na prevalência desta espécie no campo ao longo do tempo, com base na maior probabilidade de transmissão do patógeno pelo inseto vetor (LOPES et al., 2009). Estas informações sugerem a sequência do trabalho usando preferencialmente *Ca. L. asiaticus* e a inoculação por enxertia.

A propagação comercial de porta-enxertos cítricos pode ser realizada por sementes apomíticas, as quais permitem a obtenção de plantas com características genéticas iguais às da planta matriz. Apomixia é um modo de reprodução assexuada por sementes, contudo, esta técnica não garante a obtenção de material clonal, devido à dificuldade de seleção de plântulas apomíticas, com base no vigor e em características morfológicas (ROCHA et al., 1988).

A estaquia é um método alternativo para a propagação de porta-enxertos, pois ela garante a manutenção das características genéticas desejáveis da planta matriz, a redução do período para a obtenção das mudas e uma possível redução no porte das plantas (FERRI, 1997).

A maioria das laranjas é obtida de enxertos sobre limão cravo o qual também é conhecido pelos nomes de Rosa, Bravo, Vermelho, etc. O emprego deste porta-enxerto recebe um grande incentivo pois apresenta algumas vantagens como: antecipação do início de produção, aumento da produtividade, mudas praticamente idênticas à planta-mãe e uniformidades das mudas. O limão cravo o principal porta-enxerto sobre o qual a citricultura brasileira foi constituída, e está presente em quase 40% das plantas cítricas (MATTOS Jr. et al., 2005), sugerindo o uso deste enxerto nos estudos futuros pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar.

1.4 Estaquia

A estaquia é um dos métodos para fornecer o porta-enxerto na enxertia. Nesse tipo de propagação vegetativa designa-se por estaca uma porção do tronco de uma árvore-mãe que é induzida a formar raízes por intervenção de meios químicos, mecânicos e/ou manipulação ambiental. Nesse caso a nova planta independente é um clone, que é idêntico à planta mãe. A estaquia é muito utilizada devido ao baixo custo do material (estacas) e método (CASTLE et al., 1993).

O enraizamento das estacas é feito usualmente estimulando a formação de raízes adventícias na própria estaca. A estaca enraizada torna-se depois da diferenciação do seu sistema radicular numa planta independente, elas também são facilmente transplantadas, e seu comprimento varia consideravelmente oscilando de 10 a 76 cm, sendo que para citros o ideal é de 15 a 20 cm e com múltiplos nós (Figura 9). A base das estacas são pura e simplesmente enfiada no substrato humedecido e com sombreamento adequado (SARDINHA, 2008).

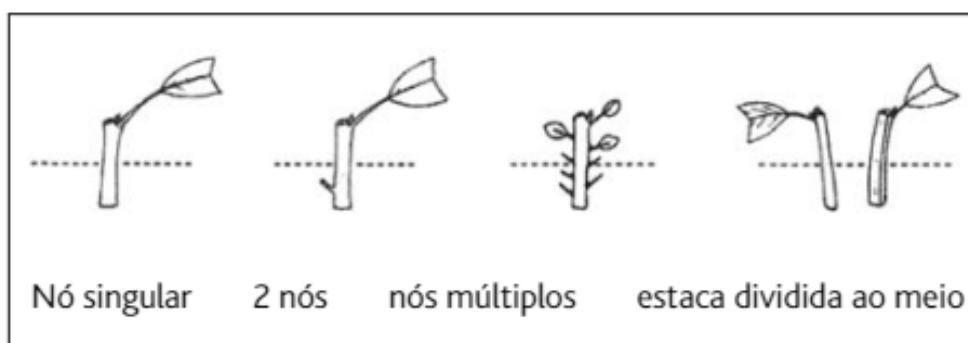


Figura 9 - Diferentes estacas utilizadas para enraizamento (Fonte: SARDINHA, 2008).

Durante o preparo das estacas (Figura 10) deve-se tomar alguns cuidados como: remover partes que tenham sido lascados ou esmagadas pois estas facilmente apodrecem; reduzir a dimensão da estaca se o lançamento é bastante longo; cortar a base perpendicularmente ao eixo pois caso contrário o sistema radicular ficará assimétrico; cortar as estacas onde é mais provável que se desenvolvam as raízes (abaixo do nó); remover o látex ou mucilagens que se desenvolvem na zona de corte porque elas podem impedir a entrada das auxinas (substâncias promotora de raízes); seccionar as folhas largas nas zonas superiores e remover qualquer material morto; remover as folhas da secção inferior mas deixar sempre uma no topo; retirar os pequenos ramos laterais que ficam subterrados e em espécies com duas folhas opostas, remover um ou dois gomos para produzir uma planta que não tenha uma forquilha na base (SARDINHA, 2008).

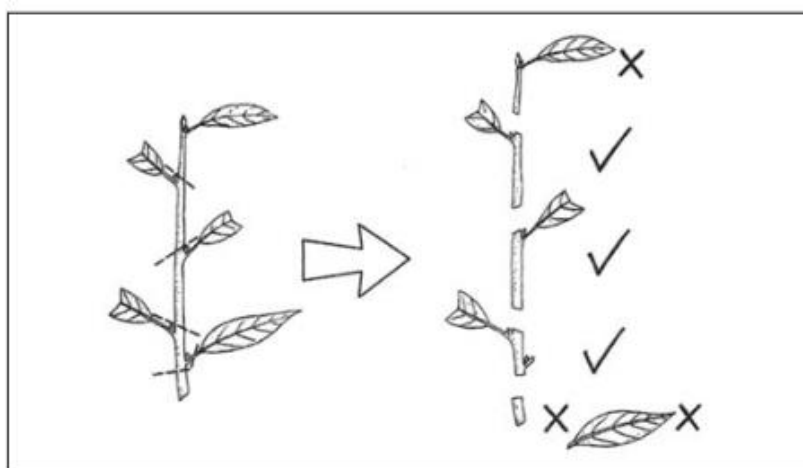


Figura 10 - Preparo de estacas a partir de lançamento retirado da árvore-mãe (Fonte: SARDINHA, 2008).

As estacas não secam tão rapidamente podendo sobreviver em caixas de germinação ou mesmo em solo húmido até formação das raízes. Para as estacas enraizarem é mais fácil retirando-lhes as folhas, pois isto aumenta a taxa de sucesso com a passagem da extremidade que vai para o solo por produtos indutores como, auxinas e co-fatores de formação de raízes, como os ácidos indolacético e giberélico (FERRI, 1997).

A auxina é um fitorregulador endógeno, que pode ser aplicado de forma exógena. Esta substância indutora de formação de raízes pode ser abundante, escassa ou mesmo ausente no interior da planta, de acordo com a condição fisiológica e genética da estaca. Por isso, normalmente adota-se o uso de auxinas exógenas, como o ácido indolbutírico (AIB) (PIZZATTO et al., 2011).

O uso de AIB exógeno tem como principal finalidade acelerar o processo de enraizamento da estaca, sendo que em citros foi observado que isto ocorre em uma ampla faixa de concentração de AIB, de 250 a 10000 mg/L (PIZZATTO et al., 2011). Assim as bases das estacas são simplesmente enfiadas no substrato humedecido e com sombreamento adequado, para que ocorra o enraizamento. Em algumas espécies, que apresentam dificuldade de enraizamento, aconselha-se a abrir uma fenda na base da estaca que vai para o solo antes de se passar pela auxina para aumentar a taxa de enraizamento (SARDINHA, 2008).

Um conjunto de fatores onde se incluem as condições de temperatura, insolação e humidade utilizada são muito importantes para garantir um enraizamento satisfatório. Mas independentemente das condições as estacas juvenis apresentam sempre uma taxa de sucesso superior às mais velhas (tecido maduro). No estudo descrito nesta tese este método além de ter sido utilizado para a obtenção dos porta-enxertos de limão cravo, também foi usado para a produção de plantas oriundas de estacas de tecido juvenil e maduro de laranja Pera, para a produção de mudas sem enxertia, isto devido a este método apresentar um menor tempo para a formação da muda quando comparado com semeadura (ANDRADE & MARTINS, 2003).

1.5 Enxertia

A enxertia é uma técnica utilizada para a obtenção de novas plantas através de um processo assexuado de multiplicação vegetativa, criando-se uma

associação simbiótica entre dois indivíduos que são geneticamente distintos, mas que devem viver num relacionamento, mutuamente benéfico, para que a nova planta desenvolvida através da enxertia seja produtiva e tenha longevidade. Este método consiste em transplantar uma muda chamada copa, cavaleiro ou enxerto, em outra planta denominada cavalo ou porta-enxerto, sendo esta munida de raízes (Figura 11).

Sendo o porta-enxerto responsável pela formação do sistema radicular cujas funções são retirar os nutrientes do solo e servir de suporte mecânico a planta, e o enxerto é responsável por assegurar as funções de fotossíntese, transpiração, respiração e produção da planta. A copa é a planta que se deseja difundir devido ao seu valor comercial e econômico. O porta-enxerto é uma planta derivada de sementes ou estaquia, sendo está rústica e resistente. O porta-enxerto gera algumas alterações à copa como: resistência climática (exemplo: à seca e ao frio), capacidade de absorção de nutrientes, tolerância à salinidade, transpiração das folhas, fertilidade do pólen, alteração na época de maturação dos frutos, estabilidade dos frutos na planta, peso dos frutos, conservação da fruta após colheita e cor da casca e do suco (CESAR, 1996).

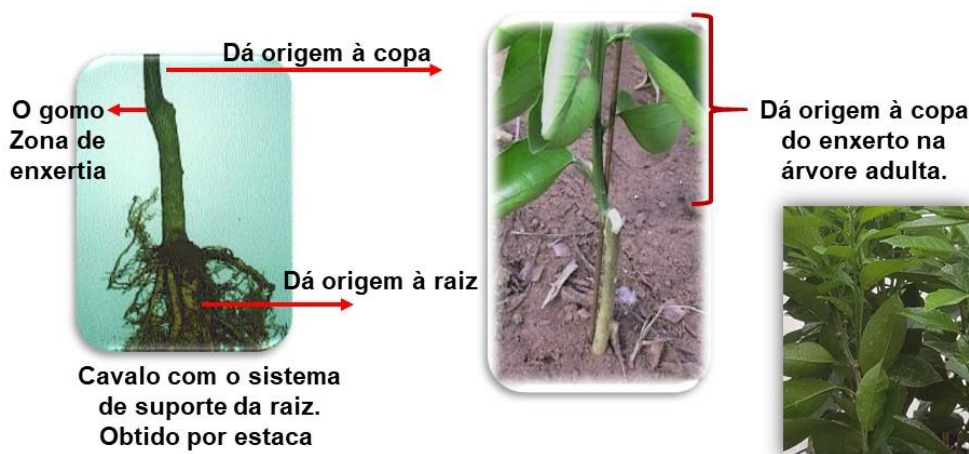


Figura 11 - Desenvolvimento de uma planta enxertada.

Há vários tipos de enxertia, mas será resumido a seguir as mais comuns em plantas frutíferas.

Enxerto por Garfagem

Consiste no implante de um galho da planta a ser desenvolvida sobre um porta-enxerto que seja compatível, e o qual está enraizado (Figura 12). Neste

método o porta-enxerto tem a sua parte superior decapitada e o enxerto de garfagem é feito 20 cm, aproximadamente, acima do nível do solo, sendo que ambas as partes devem apresentar diâmetros equivalentes (CÉSAR, 1996).



Figura 12 - Enxertia por garfagem (Fonte: CÉSAR, 1996).

Neste tipo de enxertia o método mais usado, a garfagem de topo, por oferecer maiores facilidades na prática, apresenta o inconveniente de se ter que sacrificar o porta-enxerto na decapitação que se faz para a abertura da fenda que recebe o ponteiro acunhado na extremidade basal. Portanto, caso o enxerto não pegue, perde-se a muda. A enxertia por garfagem de topo é bem praticada, situação em que dependendo da espécie em questão, resulta em índices superiores a 90% de pegamento dos enxertos (CÉSAR, 1996).

Enxerto por Borbulhia

Este método consiste em se destacar uma gema vegetativa ou borbulhia da planta de interesse comercial, que é fixada ao porta-enxerto, após um corte superficial na casca do mesmo. Para que esse enxerto tenha êxito, é essencial que se ajuste delicadamente as partes interligadas, com enfaixe com fita plástica na união para que se acelere a fusão da gema com o porta-enxerto (Figura 13). Também para adiantar o desenvolvimento do enxerto faz-se uma torção da haste um pouco acima do local da enxertia e curva-se o ramo para o solo, assim a seiva, devido a curvatura, tende a reduzir sua velocidade e acumular-se na região do enxerto, gerando grande vigor e adiantando o desenvolvimento deste (RODRIGUEZ et al., 1991).

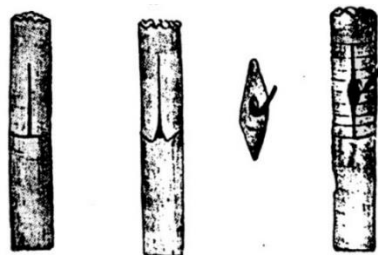


Figura 13 - Enxertia por borbulhia (Fonte: CÉSAR, 1996).

O processo de enxertia apresenta várias características, das quais pode-se destacar: propagação de uma planta com todas as suas qualidades inerentes à variedade que ela pertence; redução do porte médio das plantas, o que facilita a colheita dos frutos, manejo e combate as doenças, etc.; aumento da produtividade, uma vez que a planta torna-se mais precoce quanto ao período de produção; transformação de plantas estéreis em plantas produtivas, através da inoculação de gemas ou ramos frutíferos; perpetuação de plantas em solos impróprios, isso devido à resistência do porta-enxerto e produção de plantas doentes para estudos científicos (CÉSAR, 1996; CASTEL et al., 1992).

Para que haja êxito na enxertia algumas observações devem ser levadas em consideração, como a compatibilidade entre o enxerto e o porta-enxerto, sendo que apenas plantas que possuam entre si um certo grau de parentesco e analogia entre suas estruturas anatômicas podem ser enxertadas (mesma família botânica), como também inspeções frequentes após a enxertia para que brotos que nascem do porta-enxerto, abaixo do ponto de enxertia, sejam podados, para impedir que o porta-enxerto cresça, rejeitando assim a copa que lhe foi implantada (Rodriguez et al., 1991).

No processo de cicatrização na enxertia por borbulhia, em 24 horas surgem as primeiras divisões celulares; os primeiros calos aparecem em 5 dias; o início de diferenciação nos calos da casca do porta-enxerto em ocorrem em 10 dias e nos calos da casca do enxerto em 15 dias; a primeira ocorrência de meristema entre a casca do porta-enxerto e o enxerto surge em 15 dias; os primeiros vasos xilemáticos nos calos da casca do porta-enxerto aparecem em 15 dias e nos calos da casca do enxerto em 20 dias; e a lignificação completa na casca do porta enxerto completa em 25 a 35 dias e sob o enxerto em 30 a 40 dias (HARTMANN, 1997).

A enxertia por borbulhia é a técnica utilizada para a produção de citros devido a execução rápida, resultados geralmente muito bons, ou seja, porcentagem de falha menor quando comparada com os outros métodos e a ferida de enxertia é reduzida, causando menos dano a planta e conseqüentemente uma recuperação mais rápida (SARDINHA, 2008), sendo assim este foi o método escolhido para aplicar nos estudos desenvolvidos na presente tese.

Enxerto por Microenxertia

A cultura de citros é constantemente ameaçada por diversas doenças sistêmicas. A técnica da microenxertia foi desenvolvida, tornando possível a produção *in vitro* de mudas com alta qualidade fitossanitária. A microenxertia vem sendo utilizada com sucesso na eliminação de doenças sistêmicas de outras espécies arbóreas também. A microenxertia consiste em enxertar um meristema, oriundo de uma planta-matriz, sobre um porta-enxerto multiplicado *in vitro*. Esta técnica possibilita a detecção precoce de incompatibilidade de espécies (ABREU et al., 2003).

O processo de soldadura dos microenxertos é condicionado fundamentalmente pela congenialidade dos indivíduos. O primeiro estágio da união ocorre em poucos dias. Este estágio é caracterizado pela morte de camadas celulares da interface do enxerto e pela formação de células parenquimáticas. Estas células preenchem a fenda no ponto de enxertia, constituindo o calo em associação com a região vascular da copa e do porta-enxerto. A diferenciação de algumas células do calo, a partir de novas células cambiais, forma uma união entre os tecidos afins da copa e do porta-enxerto, resultando no estabelecimento de uma conexão cambial contínua. Estes autores ressaltam que o posterior desenvolvimento da copa pelo alongamento e formação de novas camadas celulares assegura o estabelecimento da continuidade da vascularização entre o porta-enxerto e a copa (ABREU et al., 2003).

Considerando que a microenxertia não é a mais comum para plantações de citros no geral, decidiu-se na presente tese usar a enxertia por borbulhia de amplo uso na citricultura. Uma vez preparado os enxertos de citros, o estudo químico para entender a interação dele com a bactéria *Ca. L. asiaticus* não deve ser guiado pela fitoquímica clássica, pois os perfis químicos de vários citros são bem conhecidos. Os dados já obtidos em estudos similares pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar,

apresentados anteriormente, sugerem que o estudo da interação planta bactéria seja desenvolvido usando os conhecimentos da Metabolômica e Quimiometria.

1.5.1 Lacunas na relação estaquia e enxerto de *Citrus* em fases ontogenéticas distintas frente a *Candidatus Liberibacter asiaticus*

S. A. LOPES e colaborador (2008) realizaram experimentos de inoculação de *Candidatus Liberibacter* americanos via a enxertia de borbulhas individuais e usando pedaços de casca de vários tamanhos ou casca mais madeira (haste portando borbulhas de citros), os quais foram removidos de ramos sintomáticos como fontes de inóculo. O sucesso da transmissão foi avaliado através da análise por PCR do DNA total extraído de amostras de folhas. As plantas inoculadas foram laranjas doces Valência, Hamlin, Natal e Pera (*Citrus sinensis*), tangerinas Murcott tangor (*C. reticulata* × *C. sinensis*) e Ponkan mandarim (*C. reticulata*), com 6 meses de idade e todas enxertadas em limão Cravo (*C. limonia*). Um grupo de plantas cítricas usadas como porta-enxertos também sofreram a inoculação, Rangpur (*C. limonia*), Tahiti limes (*C. latifolia*), Sunki (*C. sunki*), Cleopatra mandarins (*C. reshni*) e Swingle citrumelo (*Poncirus trifoliata* × *C. paradisi*).

De quatro a cinco meses após a inoculação, as plantas infectadas manifestaram manchas nas folhas similares às deficiências de ferro, manganês e zinco. Folhas mosqueadas apareceram apenas em laranjas doces e Murcott tangor. A transmissão do patógeno foi maior para essas cultivares (31,2 a 65,2%) do que para limões, tangerinas ou Swingle citrumelo (2,0 a 25,0%). Uma baixa eficiência de propagação do patógeno foi observada nos experimentos onde foi utilizado o processo de produção de mudas jovens. Em um segundo experimento similar com *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*, S. A. LOPES e colaboradores (2009) observaram que as porcentagens de transmissão variaram de 54,7 a 88,0% para *Ca. L. asiaticus* e 10,0 a 45,2% para *Ca. L. americanus* em dois experimentos. Em plantas co-inoculadas, 12,9% continham apenas *Ca. L. americanus*, 40,3% continha apenas *Ca. L. asiaticus* e 19,3% continham ambas as espécies.

As maiores populações bacterianas de *Ca. L. asiaticus* em plantas infectadas forneceram uma explicação para o aumento desproporcional na predominância no campo desta espécie ao longo do tempo, com base na maior probabilidade de transmissão do patógeno pelo inseto vetor.

Um pouco mais recente, DAVID G. HALL e colaboradores (2016) concluíram uma pesquisa na Flórida, onde eles mostraram que as taxas de transmissão de *Ca. L. asiaticus* aumentam quando o lançamento de brotos vegetativos (Flush) nas plantas cítricas está presente. Os brotos vegetativos ficam nas inserções das folhas com o ramo ou no final deste, e originam-se de duas ou três gemas e crescem emitindo folhas novas até seu completo amadurecimento.

Em um experimento com mudas de um porta-enxerto denominado cultivar US-942 (*C. reticulata* L. Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.), uma infestação de 20 psílídeos cítricos asiáticos (*Diaphorina citri* Kuwayama) de uma colônia contaminada por *Ca. L. asiaticus*, resultou em 53-60% das mudas infectadas quando o lançamento de folhas novas estava presente em comparação com apenas 7% quando não havia nenhum lançamento. Um experimento semelhante com a laranja doce Valência (*C. sinensis* L. Osbeck) resultou em 23, 80 e 3% das mudas infectadas quando jovens, mais velhas ou sem lançamento de folhas novas (flush), respectivamente. As plantas jovens são, portanto, mais propensas a contrair HLB se o lançamento de folhas novas (Flush) estiver presente, contudo, quando o lançamento de folhas está mais velho estas promovem taxas de infecção mais altas nas condições deste estudo.

Citrus com lançamento de folhas podem ser mais suscetíveis à inoculação de *Ca. L. asiaticus* por psílídeos cítricos asiáticos do que mudas sem lançamentos, isto como resultado de diferenças morfológicas ou químicas entre folhas maduras e imaturas. Especulou-se que o anel fibroso de parede espessa (esclerênquima) ao redor do floema pode atuar como uma barreira à penetração do estilete do psílídeo cítrico asiático no floema, e este anel é mais proeminente nas folhas maduras.

LUO et al. (2015) usando ensaios de gráfico de penetração elétrica (EPG), mostraram que alguns aspectos da atividade alimentar de psílídeos cítricos asiáticos foram significativamente influenciados pela idade da folha. SERIKAWA et al. (2012) com base em EPG relataram que estes psílídeos se alimentam de folhas jovens com mais frequência e por mais tempo do que de folhas maduras. Além das diferenças morfológicas, pode haver diferenças na composição química entre folhas maduras e imaturas que afetam as taxas de transmissão de *Ca. L. asiaticus*.

Por exemplo, alguns flavonoides de folhas em certas concentrações demonstraram agir como fagoestimulantes de insetos, enquanto em diferentes concentrações podem inibir a alimentação (SIMMONDS, 2001), talvez haja diferenças de flavonoides entre folhas de citros maduras e imaturas. Também pode haver voláteis nas folhas que afetam as atividades de alimentação de psilídeos cítricos asiáticos.

O nosso grupo quase simultâneo ao trabalho de DAVID G. HALL (2016), mostrou que *D. citri* quando estimulado com fontes de odor de 22 genótipos de *Citrus* em um olfatômetro de tubo em Y, preferencialmente entrou no braço contendo os óleos voláteis de *Murraya paniculata*, confirmando o jasmim laranja como seu melhor hospedeiro (ANDRADE et al., 2016).

O derivado monoterpreno pregeijerene B (C-12), e os sequiterpenos α -cubebene (C-15), β -cubebene (C-15), α -zingiberene (C-15), *trans*-cadina-1,4-diene (C-15) and spathulenol (C-15) foram encontrados somente em *M. paniculata*, podendo ser estes os principais atraentes de *D. citri* à *M. paniculata*. A escolha um pouco mais reduzida também foi encontrada em nove óleos voláteis, os quais são citados a seguir em ordem decrescente de preferência, *C. grandis* (26,8%), *C. sunki* × *Poncirus trifoliata* (25,9%), *C. limettioides* (25,3%), *C. aurantium* (22,8%), *C. sinensis* cultivar Hamlin (22,4%), *Fortunella margarita* (21,6%), *C. sinensis* cultivar Pera (20,8%), *C. paradisi* × *P. trifoliata* (19,1%) e *P. trifoliata* × *C. sinensis* (18,1%).

J. C. Cifuentes-Arenas, seu orientador de doutorado S. A. Lopes e outros colaboradores em 2018, considerando que o desenvolvimento de *D. citri* em relação à ontogenia no lançamento de brotos vegetativos (“flush”) nos citros não foi claramente definido ou ilustrado na literatura, eles decidem estudar como a ontogenia do lançamento de brotos vegetativos influencia o potencial biótico de *D. citri*.

O desenvolvimento dos brotos vegetativos (“flush”) nos citros foi avaliado em 35 dias e divididos em seis estágios e quatro fases de desenvolvimento: emergência (V1), desenvolvimento (V2 e V3), maturação (V4 e V5) e dormência (V6). Para descrever os estágios e suas durações, plantas de dois anos saudáveis de ‘Valência’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck.) em porta-enxertos de ‘Swingle citrumelo’ (*C. paradisi* MacFaden × *Poncirus trifoliata* (L.) foram podadas 20 cm acima da união das gemas e totalmente desfolhadas.

Na emergência a qual compreende um único estágio (V1) ocorre o inchamento da gema e a abertura de escamas protetoras. Nesta fase, as taxas de

alongamento atingiram um máximo de 2,5 mm por dia e ocorreu em um intervalo de 3 dias. No início da fase de desenvolvimento denominada estágio V2, a qual durou cerca de 5 dias, as taxas de alongamento do eixo do broto foram de 1,5 a 3 mm por dia. Houve uma expansão inicial da lâmina das folhas basais, mas as margens permaneceram dobradas para dentro, de modo que as superfícies adaxiais das folhas não eram ainda visíveis. Mais tarde no estágio V3, que durou cerca de 9 dias, o alongamento do eixo do broto foi de 10 mm por dia, atingindo um máximo de 14 mm por dia no meio do estágio, seguido por um declínio de 5 mm por dia.

Durante esta fase as margens das folhas se abriram e as superfícies adaxial destas tornaram-se visíveis. Na maturação os alongamentos do eixo dos brotos continuaram, mas diminuindo rapidamente a 5 mm por dia no início do estágio V4, o qual durou cerca de 7 dias. No estágio V5, o qual durou cerca de 11 dias, os alongamentos do eixo dos brotos diminuíram para menos de 0,25 mm por dia. O estágio V4 começou quando a emissão de novas folhas parou e foi o período em que estas endureceram gradualmente do topo à base com a cor mudando de verde brilhante para verde-amarelo opaco claro. O estágio V5 começou quando uma clorose da ponta do caule e abscisão posterior eram evidentes, as folhas tornaram-se quase totalmente expandidas e endurecidas, mudando de verde-amarelo claro para verde escuro. A dormência composta por um estágio (V6) é caracterizada por folhas maduras verde-escuras e totalmente expandidas.

Os autores avaliaram a oviposição e o desenvolvimento de ninfas de *D. citri* em todos os estágios do desenvolvimento dos brotos vegetativos, em uma casa de vegetação com temperatura controlada e em um galpão com variação de temperatura ambiente. As fêmeas colocaram ovos apenas nos estágios V1 a V5, com o tempo necessário para iniciar a oviposição aumentando com o aumento da idade da brotação. Os estágios V1, V2 e V3 foram os mais adequados para oviposição, sobrevivência e desenvolvimento de ninfas e emergência de adultos, as quais apresentaram evidências de protandria, ou seja, emergência de machos em maior proporção do que as fêmeas no início do período de emergência. A ontogênese da brotação também influenciou o tempo necessário para as fêmeas começarem a oviposição, o que demorou mais nos tecidos mais duros do estágio V5 (3 dias) do que nos tecidos mais jovens de V1 a V4 (cerca de 1 dia). Isso sugere que as mudanças

na dureza da folha e sua composição química sinalizam para as fêmeas que os tecidos da folha maduras não são adequados para o desenvolvimento de ninfas.

Considerando o exposto acima, verifica-se a ausência de estudo que possam explicar como o perfil químico de tecidos maduros e imaturas de *Citrus* afetam as taxas de transmissão do patógeno *Ca. L. asiaticus*, o mais comum nas culturas brasileiras. Assim, pretende-se desenvolver metodologias analíticas similares a trabalhos anteriores do grupo, visando entender se tecidos juvenis e maduros de *Citrus* respondem produzindo alguns metabólitos em maior ou menor quantidade em resposta à presença da bactéria, e comparar o seu perfil químico com aqueles do enxerto desses tecidos sobre o porta-enxerto limão cravo (*C. limonia* Osbeck). Essa observação levou aos objetivos do trabalho.

1.6 Metabolômica

Metabolômica é o termo usado para definir o conjunto de dados qualitativos e quantitativos sobre todos os metabólitos secundários de uma determinada matriz de origem biológica, e é considerada uma das mais avançadas abordagens sobre o mapeamento químico de um organismo da biodiversidade (WOLFENDER et al., 2009; KIM et al., 2011).

Portanto, uma estratégia bastante útil também para a investigação metabólica de variedades vegetais de interesse agrícola e para o controle de qualidade de produtos naturais para consumo humano, cujas legislações tendem a ficar cada vez mais restritivas mundialmente, tais como fitoterápicos, suplementos alimentares e cosméticos. Devido a esta ampla gama de aplicações, a metabolômica vem crescendo exponencialmente nas pesquisas que envolvem a química de produtos naturais, a julgar pelo incremento no número de publicações observado nessa área (LAST et al., 2007).

Os estudos metabolômicos são realizados fundamentalmente a partir de análises comparativas sobre os perfis metabólicos individuais obtidos para as diferentes amostras. Um perfil metabólico pode ser definido como um conjunto de sinais cromatográficos e/ou espectroscópicos adquiridos para uma amostra complexa de extratos vegetais, animais e microrganismos, obtidos a partir de métodos analíticos que revelem todas as características químicas inerentes a determinados padrões

funcionais e estruturais das classes de produtos naturais analisadas. Esse conjunto de informações analíticas é interpretado e deve refletir todos os metabólitos secundários detectáveis e presentes na amostra em estudo (WOLFENDER et al., 2009; JIANG et al., 2010; CIEŚLA, 2012).

Havendo diferenças de atividades biológicas entre amostras, as análises metabólicas são mais detalhadas. Por exemplo em análises de amostras de plantas saudáveis em comparação com amostras de plantas sintomáticas a uma bactéria, exige-se, necessariamente, o uso de instrumentos e de técnicas analíticas avançadas de alto desempenho, pois o número de compostos micromoleculares em um extrato à base de plantas ou de outros materiais de origem biológica pode chegar a milhares. O acoplamento de uma técnica que leve à separação dos constituintes de uma amostra com uma ou mais técnicas espectroscópicas que deem informações sobre a estrutura destes constituintes é frequentemente utilizado para o estabelecimento dos perfis metabólicos destes tipos de amostras (TISTAERT et al., 2011).

Dentre as várias técnicas de separação destacam-se a cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) e a cromatografia líquida (LC) de alta e de ultra-alta eficiência (HPLC e UPLC, respectivamente), sendo as duas últimas as mais aplicadas em estudos metabolômicos por serem adequadamente compatíveis com qualquer tipo de analito. A cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) mesmo possuindo algumas vantagens, como colunas com elevada capacidade de picos e não utilizar solventes, esta exige compostos volatilizáveis e termoestáveis a aproximadamente 350°C. Além disso, HPLC e UHPLC são instrumentos de fácil manuseio, podem ser totalmente automatizados e exibem boa resolução, reprodutibilidade e seletividade (WOLFENDER et al., 2009; TISTAERT et al., 2011; Zhong et al., 2009).

A espectrofotometria no ultravioleta visível com arranjo de diodos (DAD-UV/Vis), a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e a ressonância magnética nuclear (NMR 1D e 2D) destacam-se para a obtenção de perfis metabólicos de amostras complexas (WOLFENDER et al., 2009; VERPOORTE et al., 2007).

Detectores DAD UV/Vis são os mais comumente acoplados a HPLC e UHPLC, pois apresentam alta sensibilidade e boa linearidade e são técnicas relativamente insensíveis a mudanças no fluxo e na temperatura da fase móvel. O uso da NMR vem crescendo exponencialmente nos últimos anos devido a sua robustez e alta sensibilidade na quantificação dos núcleos orgânicos ativos mais populosos: ^1H ,

^{13}C , ^{15}N , ^{31}P . Seu uso pode ser feito a partir de hifenação com LC em fluxo contínuo (on-flow) para determinação dos constituintes majoritários, ou por coleta de frações em micro colunas de extração de fase sólida (SPE) permitindo a realização de espectros bidimensionais (off-line) e a detecção dos compostos minoritários. No entanto, além dos problemas inerentes da técnica, em especial aqueles dos isótopos menos abundantes como o ^{13}C , a sobreposição dos sinais em espectros de alta complexidade continua sendo um desafio. A incorporação de experimentos bidimensionais ou n-dimensionais é uma alternativa interessante para vencer esse obstáculo, assim como o uso de ferramentas estatísticas (VERPOORTE et al., 2007).

De acordo com publicação recente, a combinação de UHPLC acoplada à HRMS (espectrometria de massas de alta resolução) com ionização por eletrospray e analisador por tempo de voo (ISE-ToF) é a abordagem que fornece, atualmente, a melhor relação custo-benefício, e é o tipo de equipamento utilizado no presente trabalho (Figura 14). A HRMS é uma técnica extremamente sensível, demandando quantidades mínimas de amostra, menor tempo de análise e menor custo instrumental, proporcionando um arsenal de informações valiosas quanto à estrutura dos metabólitos de interesse (WOLFENDER et al., 2009).

Contudo, é importante ressaltar que os resultados adquiridos em um espectrômetro de massas específico dificilmente são reproduzidos em sua integridade em outro instrumento com as mesmas características (tipos de fonte de ionização e analisador, por exemplo). Por vezes, essa dificuldade em reprodutibilidade é observada até mesmo entre instrumentos do mesmo modelo e do mesmo fabricante. Esta informação levou a autora da tese considera-la e todo o trabalho aqui apresentado foi desenvolvido no equipamento da Figura 14, o qual possui software para análises de quimiometria.



Figura 14 - UHPLC AcquityUPLC H-class acoplado a espectrômetro de massas Xevo G2-XS QTof, ambos da Waters (Fonte: Waters).

1.7 Quimiometria

A geração de muitos dados que podem ser coletados a partir do uso das técnicas analíticas modernas, em estudos metabolômicos exige, necessariamente, a associação de técnicas e de abordagens estatísticas. Muitas vezes é necessário tratar os dados cromatográficos previamente, pois perfis metabólicos estão sujeitos a erros experimentais inerentes do método analítico que devem ser corrigidos antes da análise de dados. Quando, por exemplo, análises de perfis cromatográficos de metabólitos são replicadas observam-se variações nos tempos de retenção para um determinado pico. Essas variações podem ser causadas por erros experimentais, mas também pelo contínuo processo de envelhecimento da coluna cromatográfica (VERPOORTE et al., 2007; HEYDEN, 2008).

Como técnicas quimiométricas costumam incluir cálculos matriciais, elas só funcionarão adequadamente quando o tempo de retenção de uma determinada substância for o mesmo nos diferentes cromatogramas. Assim, uma correção deve ser realizada para alinhar os picos correspondentes, por meio das chamadas técnicas de deformação. A partir do pré-tratamento dos dados, sejam aqueles obtidos por técnicas de separação e/ou espectroscópicas, as técnicas quimiométricas são capazes de selecionar informações relevantes, as quais poderão ser usadas para diferentes propósitos (HEYDEN, 2008).

Para estudos taxonômicos e de quimiosistemática, ou para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica, a aplicação de técnicas quimiométricas de análise multivariada é a mais recomendada (FUNARI et al., 2012). Elas permitem a classificação ou a formação de conglomerados de dados ou clusters, por meio da análise de componentes principais (PCA) ou de análise hierárquica de agrupamentos (HCA), mínimos quadrados parciais (PLS), análises discriminantes, análises de correlações, etc (VERPOORTE et al., 2007; HEYDEN, 2008).

Como comentado no item anterior as análises comparativas entre amostras oriundas de plantas contaminadas por bactéria com aquelas sadias foram feitas utilizando os próprios softwares do equipamento citado acima, os quais permitiram análises discriminantes e de correlações que atenderam os objetivos do projeto desta tese.

2. Objetivos

2.2. Objetivo geral

O projeto desenvolvido e que levou à presente tese teve como objetivo geral desenvolver ferramentas analíticas que possibilitassem avaliar a variação do perfil químico entre exemplares de tecidos juvenis e maduros de laranja Pera [*C. sinensis* (L.) Osbeck] em estaquia e enxertadas em limão cravo (*C. limonia*) com sintomas de HLB, e sem a bactéria, planta controle, visando obter possíveis marcadores bioquímicos que possibilitassem entender a resistência das plantas juvenis em relação ao tecido maduro na estaquia e no enxerto.

2.2.1. Objetivos específicos

Para alcançar os objetivos gerais mencionados, os objetivos específicos foram:

- Desenvolver métodos analíticos usando HPLC-UV, HPLC-DAD e UHPLC-MS;
- Utilizar ferramentas de quimiometria para as análises comparativas entre amostras oriundas de plantas com a bactéria e aquelas saudáveis;
- Identificar as substâncias do metabolismo secundário das plantas que estiverem envolvidas no mecanismo de defesa das espécies de *Citrus* frente à bactéria *Ca. L. asiaticus*.

Conhecer as substâncias que estariam variando quantitativa ou qualitativamente nos diferentes tratamentos poderá mostrar qual ou quais constituintes estão envolvidos no mecanismo de defesa da planta.

3. Materiais e Métodos

O preparo e fracionamento dos extratos vegetais e desenvolvimento dos métodos para avaliação do perfil químico por HPLC-UV e HPLC-DAD foram realizados no laboratório de pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (PN-UFSCar), o desenvolvimento do método para a avaliação do perfil químico por UHPLC-MS foi realizado no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP).

O preparo de todas as plantas (porta-enxertos, pé-francos e mudas enxertadas), utilizadas neste projeto foram desenvolvidas no Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), localizado no município de Araraquara-SP.

3.1. Materiais

Solventes

No preparo de extratos das plantas estudadas foi usado solventes grau HPLC (Merck, Tedia, HoneyWell, J. T. Baker, Panreac). Nas análises em UPLC-MS foram usados solventes e água grau LC-MS (Panreac e Chromasolv). Água ultra pura foi obtida no Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka).

Colunas

Nas análises em UHPLC-MS foi utilizado Coluna Acquity UPLC BEH C18 Waters (100 x 2.1 mm, partícula de 1,7 µm).

Filtros

No estudo das amostras analisadas na tese foram utilizados filtro de seringa (PVDF e PTFE), não estéril, 25 mm x 0,45 µm (Millipore®).

Micropipetas

No preparo de amostras no presente estudo foi usado micropipetas marca Eppendorf de 100 µL e 1000 µL.

3.2. Equipamentos

Evaporadores

As amostras estudadas quando precisaram evaporar o solvente foi utilizado o evaporador de solvente a vácuo (SPEEDVAC), Savant Speedvac Plus SC 10 A, acoplado com um refrigerador Vapor Trap RVT-400 Savant, bomba a vácuo Savant VLP-200 e registrador Digital Vacuum Gauge DVG 50 Savant. Em algumas análises foi usado o evaporador rotativo BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25.

Balanças Analíticas

No preparo das amostras deste estudo foi utilizado a balança Shimadzu Corporation modelo AUW220D.

Purificador de Água

Na purificação de água foi usado o ultrapurificador de água Master System MS2000 (Gehaka).

Centrífuga

No desenvolvimento do trabalho foi usado a centrífuga marca Eppendorf, Modelo 5810R com sistema de refrigeração.

Dispersadores/Homogeneizadores

No preparo de várias amostras foi utilizado T 10 standard ULTRA-TURRAX® (IKA).

Moinho

Parte de plantas estudadas foram trituradas usando o moinho analítico básico A 11 (IKA).

Cromatógrafos

O principal cromatógrafo utilizado foi o Acquity UPLC H-Class (Waters).

Espectrômetro de Massa

No desenvolvimento do trabalho foi utilizado Xevo G2-XS (Waters), Fonte de ionização ESI, e Analisador híbrido QToF.

3.3. Obtenção das plantas para estudo

Todas as plantas estudadas foram desenvolvidas e obtidas na Fundecitrus, como comentado anteriormente. Para o desenvolvimento completo das mudas, em um tamanho ideal para coleta do material vegetal, foi necessário um período de 8 a 10 meses. Primeiramente será abordado como foram desenvolvidas as mudas para este estudo, desde a obtenção do porta-enxerto até o estágio da coleta, e posteriormente como foi preparado o material vegetal para o desenvolvimento dos métodos analíticos.

3.3.1. Preparação de estacas de laranja Pera

Tecidos juvenis

Foram produzidas plântulas de laranja Pera a partir de sementes certificadas obtidas junto ao banco de sementes da Fundecitrus. Quando as plantas atingirem caules de diâmetro de aproximadamente 5 mm à uma altura de mais ou menos 20 cm acima do nível do solo, partes do caule, estacas herbáceas com 12 a 15 cm de comprimento contendo de 3 a 4 folhas foram coletadas para prosseguir com o processo de enraizamento produzindo novas plantas ou clones. As folhas das estacas foram cortadas ao meio para reduzir a área foliar e diminuir a evapotranspiração das plantas (LOPES & FRARE, 2008).

Posteriormente realizou-se a imersão da parte basal das estacas em solução contendo o fito regulador promotor de enraizamento o ácido indolbutírico (IBA) na concentração de 1,5 g L⁻¹ por 5 minutos. Em seguida, as estacas foram acondicionadas em vasos de 12 L contendo o substrato de fibra de coco, para facilitar o enraizamento e crescimento das raízes, sendo esses vasos cobertos com saco plástico de 50 L, para formar uma câmara úmida, e estas irrigadas diariamente para manter a umidade do substrato sem encharca-lo. Após 30 dias as plantas enraizadas foram transferidas para vasos de 1,7 L contendo substrato "Plantimax citros" e mantidas em casa de vegetação no Fundecitrus (LOPES & FRARE, 2008).

As mudas formadas e as plantas obtidas por enraizamento de estacas foram irrigadas 4 vezes por semana e, uma vez por semana, foi feito o manejo nutricional através de fertirrigação contendo os seguintes fertilizantes em g 1000 L⁻¹ de água: nitrato de cálcio - 900, nitrato de potássio - 300, MAP - 70, sulfato de magnésio - 260, cobre-ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (14,5% Cu) - 10, Zinco-EDTA (14% Zn) - 7, Manganês-EDTA (13% Mn) - 5, ácido bórico - 3,5, molibdato de amônio - 0,3, ferro-ácido dietileno diamino hidróxidofenilacético (EDDHA) (6% Fe) - 50. Este manejo foi mantido durante 6 meses, isto até o desenvolvimento das plantas em um tamanho ideal para a continuação dos experimentos, ou seja, inoculação da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Tecidos maduros

Tecido maduros foram produzidos e cultivados posteriormente da mesma maneira que os tecidos juvenis com a diferença de que as estacas utilizadas para a produção destas foram removidas de segmentos de copas de mudas comerciais de laranja Pera produzidas em limão Cravo. O total de plantas que foram produzidas por estaquia pode ser conferido no planejamento experimental disponível na Tabela 2, onde poder ser observado foi estaqueado um número de plantas maior que o necessário devido a perdas que ocorrem no transcorrer do processo.

3.3.2. Preparação de enxertos de laranja Pera

Produção das mudas enxertadas com tecidos maduros e juvenis

Mudas de limoeiro Cravo com 6 meses de idade foram adquiridas de viveiro certificado e transferidos para casa de vegetação no Fundecitrus. Para a enxertia, borbulhas foram retiradas de plantas de laranja Pera sadias com idade ontogenéticas distintas (plantas com tecido fisiológico maduro e juvenil, porém identificados, ver tabela 2) e enxertadas a uma altura de 10 a 20 cm a partir do colo da planta. As plantas que sofreram o enxerto (porta-enxerto) e as plantas matrizes onde foram retiradas as borbulhas foram irrigadas nos dias que antecederam a enxertia para melhorar o desprendimento da casca e facilitar o pegamento da mesma (LOPES & FRARE, 2008).

O porta-enxerto foi preparado retirando-se as folhas e os espinhos da região onde recebeu a borbulha e realizado um corte em formato de 'T' invertido onde

foi encaixada a borbulha e está fixada com fita plástica (fitilho) para evitar a entrada de água durante a irrigação evitando assim o apodrecimento da gema e, conseqüentemente, a perda da enxertia. Em seguida realizou o encurvamento do porta-enxerto, segurando com uma das mãos a 10 cm acima do enxerto e curvando com a outra a parte superior da planta até prender na base da muda (Figura 15) (LOPES & FRARE, 2008).



Figura 15 - Etapas da enxertia por borbulha.

Após 20 dias da realização da enxertia o fitilho foi removido, para a verificação do pegamento da enxertia e realização do corte da parte aérea do porta-enxerto acima da enxertia, favorecendo assim a brotação da planta de interesse. A região do corte foi tratada com pasta cúprica (fungicida cúprico “Gafe” da Bayer) na forma de oxiclreto de cobre na proporção de 1Kg de produto para um litro de água, isto para evitar a entrada de fitopatógenos na planta (LOPES & FRARE, 2008). As mudas enxertadas foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas e fertilizadas da mesma forma que as mudas obtidas por estaquia, sendo este processo mantido por 6 meses até o porte ideal para a realização da inoculação. O planejamento experimental pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Planejamento experimental para obtenção das mudas de citros.

Plantas/Total	Total de plantas necessárias para o estudo	Total de plantas em estacas ou em enxertos
Estaca de tecido juvenil de laranja Pera	44	60
Estaca de tecido maduro de laranja Pera	44	60
Limão Cravo	44	60
Muda de tecido juvenil de laranja Pera enxertada em limão Cravo	44	60
Muda de tecido maduro de laranja Pera enxertada em limão Cravo	44	60
Total de plantas	220	300

Foi preparado um número maior de plantas que o necessário devido a perdas que ocorrem no transcorrer do processo.

3.3.3. Inoculação de *Ca. L. asiaticus* por borbulha de plantas com HLB

Para a inoculação, borbulhas foram retiradas de plantas de laranjeira 'Pera' sintomáticas e enxertadas nas plantas saudáveis em estudo, sendo realizadas duas enxertias por planta para garantir a transmissão da bactéria *Ca. L. asiaticus*. As plantas a serem enxertadas foram irrigadas nos dias que antecederam a enxertia para melhorar o desprendimento da casca e facilitar o pegamento da mesma (LOPES & FRARE, 2008). As plantas foram preparadas retirando-se as folhas e os espinhos da região onde recebeu as borbulhas e realizado um corte em formato de 'T' invertido onde foi encaixada a borbulha, e esta foi fixada com fita plástica (fitalho) para evitar a entrada de água durante a irrigação evitando assim o apodrecimento da gema e consequentemente a perda da inoculação (LOPES & FRARE, 2008). As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas e fertilizadas da mesma forma que anteriormente, sendo este processo mantido durante as coletas do material vegetal para estudos. O planejamento experimental pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Planejamento experimental para obtenção das plantas de citros com HLB.

Plantas/Total	Total de plantas infectadas necessárias para o estudo	Total de plantas inoculadas
Estaca de tecido juvenil de laranja Pera	20	30
Estaca de tecido maduro de laranja Pera	20	30
Limão Cravo	20	30
Muda de tecido juvenil de laranja Pera enxertada em limão Cravo	20	30
Muda de tecido maduro de laranja Pera enxertada em Limão Cravo	20	30
Total de plantas	100	150

Foi preparado um número maior de plantas que o necessário devido a perdas que ocorrem no transcorrer do processo.

Na tabela abaixo estão as datas em que foram realizadas as inoculações e coletas do material vegetal para o desenvolvimento do projeto.

Tabela 4 - Cronograma do experimento: Inoculação e coleta do material vegetal.

	Inoculação	1º Coleta	2º Coleta	3º Coleta	4º Coleta
Data	03/06/2016	13/06/2016	04/07/2016	02/08/2016	05/10/2016

3.3.4. Preparo dos extratos das plantas de citros e as respectivas amostras

A metodologia para o preparo dos extratos para todos os materiais vegetais desenvolvidos acima foi a mesma empregada por BELLETE (2013), a qual otimizou as condições de extração para esse tipo de matriz vegetal. Essa metodologia foi resumida a seguir.

As plantas foram coletadas e separadas em raiz, caule inferior, caule superior e folhas, sendo separado neste momento uma alíquota de cada parte da planta para a realização da análise de PCR. As partes destinadas para o estudo cromatográfico foram posteriormente secas em estufa de circulação a 37 °C durante aproximadamente 5 dias, e trituradas em moinho analítico (Fluxograma Figura 16). Esse material seco foi estocado em freezer à -80 °C, até o momento de sua utilização.



Figura 16 - Fluxograma do preparo do material vegetal.

No preparo dos extratos foram pesados 50 mg do material já moído, e a este adicionado 2 mL de uma mistura de solvente contendo MeOH:H₂O (1:1). Sendo em seguida submetido a extrações com o auxílio de um homogeneizador/dispersor (Turax) à 6000 rpm/min, durante 90 segundos. Após a extração o material foi

centrifugado (25 °C; 10 minutos; 10000 rpm), e o sobrenadante filtrado, utilizando um filtro de seringa (PTFE MILLIPORE; 0,45µm poro; Ø = 13 mm), e ao precipitado foi adicionado mais 2 mL da mesma proporção de solvente, repetindo-se por mais uma vez o processo mencionado. O sobrenadante final foi seco em evaporador de solvente à vácuo (SpeedVac) e armazenado em freezer à -80 °C para posteriores análises cromatográficas (Fluxograma Figura 17).

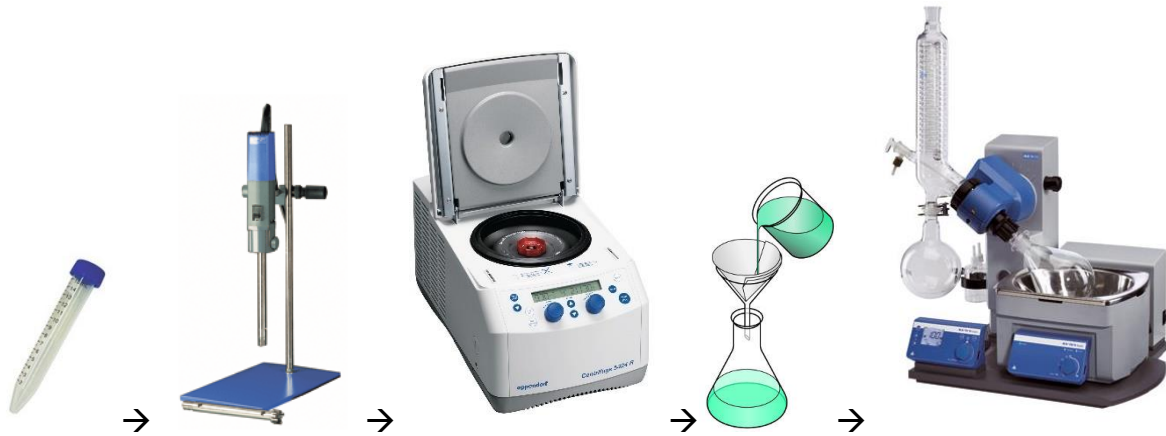


Figura 17 - Fluxograma para o preparo dos extratos do material vegetal.

3.4. Extração de DNA e reação de PCR

Na extração de DNA total das partes das plantas, 0,3 g de material vegetal de cada amostra foram picadas sobre papel toalha e colocadas em tubo eppendorf de 2 mL, e foi adicionado 1,5 mL de solução de extração. O material vegetal foi incubado em banho maria a 65°C por duas horas e homogeneizado por inversão dos tubos a cada 30 min. A extração do DNA foi conduzida como descrito por TEIXEIRA et al. (2005). O DNA extraído foi quantificado, ajustado à concentração de 100 ng µL⁻¹ e analisado por PCR (polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase) em tempo real ou quantitativo (qPCR) em volume final de 12 µL contendo 6 µL de mastermix (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para análise do DNA o volume final continha 3 µL de DNA e 150 nM dos primers e sonda HLBaspr (LI et al., 2006). A PCR foi realizada no equipamento StepOne Plus thermocycler (AppliedBiosystems) no Fundecitrus sob a orientação do Prof. Silvio A Lopes.

3.5. Desenvolvimento do Método Analítico para UPLC-MS

No desenvolvimento do método analítico utilizou-se o cromatógrafo Acquity UPLC H-Class (Waters), acoplado a um espectrômetro de massas Xevo G2-XS (Waters), e o analisador usado foi o híbrido Quadrupolo – Tempo de Vôo (Q-Tof).

Na primeira parte das análises o espectrômetro de massas operou no modo "MS", assim o quadrupolo não foi utilizado como um analisador e se serviu meramente como uma lente para focar o feixe de íons para o segundo analisador, pois após a realização das análises estatísticas e escolha das substâncias de interesse é que foi realizada a fragmentação MS/MS, otimizando assim os experimentos e focando nas diferenças do perfil químico das plantas em idades organolépticas distintas.

A coluna que foi utilizada para este estudo foi uma Waters Acquity UPLC BEH C-18 (2,1x100 mm), com tamanho de partículas de 1.7 µm. A corrida cromatográfica foi realizada no modo reverso com gradiente de eluição, usando-se como fase orgânica acetonitrila. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL min⁻¹, e o volume de injeção foi de 1,0 µL. As condições cromatográficas podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas para UPLC-MS (linha A: H₂O e linha B: ACN).

Tempo (min)	Linha A (%)	Linha B (%)
0	97	3
4,3	83	17
13,4	35	65
15,5	15	85
18,3	15	85
18,9	97	3
20	97	3

Trabalhou-se no modo negativo e positivo, assim, a voltagem do capilar utilizada foi de +0.5 e -0.5 kV (para o modo positivo e posteriormente negativo, respectivamente). A voltagem do Cone foi de 30 V, a temperatura de dessolvatação

mantida em 450 ° C, o fluxo do gás de dessolvatação em 750 L h⁻¹ e, energia de colisão variando de 20-30V. A faixa de massa que se desenvolveu o trabalhado foi de 185 à 1000 Da e o modo de aquisição é do tipo MS^E.

No tratamento e aquisição dos dados espectrométricos foi utilizado o software *MassLynx* versão 4.1 da Waters Technologies®. Este software fornece uma plataforma fundamental para adquirir, analisar, gerenciar e compartilhar informações sobre espectrometria de massa.

3.5.1. Análise quimiométricas

Um fingerprint metabólico foi criado usando o tempo de retenção, razão massa carga (m/z). O método utilizado para gerar o PCA foi centrado na média, indicado para dados espectroscópicos, pois desconsidera ruídos nos espectros. Os resultados dos pares tr-m/z, tempo de retenção das mostras e intensidade dos íons foram analisados por PCA e OPLS-DA. Nestas análises multivariadas foi utilizado o software *UNIFI® Scientific Information System* da Waters Technologies®, o qual mescla dados de cromatografia líquida e espectrometria de massas em uma única solução que abrange os dados de aquisição, processamento, visualização e geração de relatórios.

3.6. Quantificação das cumarinas xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina, e do flavonoide hesperidina nas plantas de citros em estudo

O objetivo desse estudo foi avaliar comparativamente a concentração dessas cumarinas nas plantas em estudo de citros sadias e infectadas com HLB. O Método de quantificação seguiu as normas estabelecidas pelo guia da ANVISA 2003.

3.6.1. Preparação das amostras

As cumarinas xantiletina, seselina e 5-metoxiseselina, e o flavonoide hesperidina foram fornecidas pelo grupo. Esses compostos foram usados como padrões nas análises de quantificação, após confirmação do grau de pureza dos

mesmos. As amostras de citros em estudo sadias e infectadas com HLB, e utilizadas na quantificação foram preparadas de acordo com os itens cima.

3.6.1.1. Construção das Curvas de Calibrações

Para este trabalho foi escolhida a curva de calibração por padronização externa. A padronização externa é utilizada em amostras que não precisam de extenso tratamento (CASS, 2001). Neste caso, a construção da curva de calibração foi feita através de padrões de calibração, que são soluções de concentrações conhecidas do analito. Para a preparação das soluções estoques pesou-se exatamente uma massa de 10 mg de cada composto e transferiu para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida este padrão foi solubilizado em MeOH grau HPLC e armazenado a -20°C. Sua concentração nominal foi de 1000 µg/mL. Em seguida preparou-se as soluções de trabalho, para cada composto também em MeOH grau HPLC. As concentrações escolhidas foram de 1,00; 2,50; 5,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100 µg mL⁻¹ para a construção da curva, que foram preparados a partir da diluição da solução estoque. Todos os pontos da curva foram preparados e analisados em triplicata, utilizando as mesmas condições cromatográficas para as cumarinas e uma segunda para o flavonoide, mencionadas a seguir.

Para este trabalho de quantificação utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Agilent Technologies 1260. A separação foi realizada no modo reverso de eluição, com um sistema gradiente de solvente consistindo em H₂O, ACN (60:40; v/v), com um fluxo de 1,0 mL/min e alça de amostragem de 15 µL. A coluna utilizada foi a ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, com partículas de 5µm, da marca Agilent Technologies, acoplado com uma coluna de segurança C18 (4x3 mm), também da Agilent Technologies. Os cromatogramas foram registrados com detector de ultravioleta em 260 nm. O tempo total da eluição foi de 35 min, para as cumarinas. Para o flavonoide hesperidina, a coluna foi a mesma e a seletividade foi obtida com H₂O, ACN (90:10), vazão 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e o comprimento de onda de 260 nm. As bandas cromatográficas referentes aos compostos foram determinadas através da comparação do tempo de retenção obtido analisando as soluções dos padrões.

4. Resultados e Discussões

4.1. Plantas desenvolvidas para o estudo do perfil químico

4.1.1. Laranja Pera juvenil e madura em estacas

A produção inicial de mudas de laranja Pera a partir de semente foi um sucesso, e estas posteriormente forneceram estacas (Figura 18) as quais foram enraizadas com excelente rendimento, levando ao número de mudas juvenis necessárias para o estudo (Figura 19). As mudas de laranja Pera maduras foram obtidas de segmentos de copas de mudas comerciais de laranja Pera produzidas em limão Cravo, e renderam estacas (Figura 18), as quais enraizaram muito bem, levando ao número de mudas maduras necessárias para o estudo (Figura 19).



Figura 18 - Estacas de laranja Pera juvenil (nas laterais) e madura (central).

Após 30 dias na câmara úmida (Figura 19 **C**) para que ocorresse o enraizamento, as estacas enraizadas foram transplantadas para seus vasos definitivos onde permanecerem por 6 meses até seu desenvolvimento e tamanho ideal para coleta e estudo (Figura 20).



Figura 19 - Estacas de laranja Pera juvenis (A) e maduras (B) e adaptação em câmara úmida, (foto da autora da tese).



Figura 20 - Mudas obtidas por estaquia de laranja Pera juvenis e maduras, as placas em cada vaso identificam cada uma, (foto da autora da tese).

4.1.2. Laranja Pera juvenil e madura em enxertia

Na enxertia borbulhas foram retiradas de plantas de laranjeira pera sadias juvenis e maduras obtidas como visto no item anterior. As plantas que sofreram o enxerto (porta-enxerto) eram mudas de limoeiro Cravo com 6 meses de idade também sadias. A Figura 21 mostra as plantas logo após a enxertia, onde as hastes do porta-enxerto foram curvadas para favorecer a região do enxerto. Estas plantas ficaram em observação por 20 dias até a próxima etapa, onde se corta o ramo referente ao porta enxerto.



Figura 21 - Mudas obtidas por enxertia de laranja Pera juvenis e maduras em limão cravo de 6 meses de idade (**A**, **B**). **A**: detalhe da hastes do porta-enxerto curvadas, (foto da autora da tese).

Após 20 dias da preparação dos enxertos, retira-se o fitilho que protegia o enxerto e corta-se a copa do porta-enxerto logo acima da região da enxertia para favorecer a brotação da planta de interesse (Figura 22). No corte da copa faz-se o tratamento com pasta cúprica para evitar a contaminação das mudas com outros tipos de fitopatógenos.



Figura 22 - Mudas obtidas por enxertia de laranja Pera juvenis e maduras em limão cravo, após o corte copa do porta-enxerto (**A**, **B**). **B**: detalhe do corte do porta-enxerto permanecendo somente a brotação da laranja Pera, (foto da autora da tese).

A mudas obtidas pelo método de enxertia foram monitoradas durante todo o seu desenvolvimento, deflorando sempre que necessário o porta-enxerto de limão cravo para se sobressair o crescimento de laranja Pera (Figura 23).



Figura 23 - Mudas obtidas por enxertia de laranja Pera com 2, 4 e 6 semanas, respectivamente, deflorando sempre que necessário o porta-enxerto de limão cravo, sobressaindo somente o crescimento da laranja, (foto da autora da tese).

A figura 24 mostra as mudas de laranja Pera madura e juvenil com 3 meses após a poda do limão cravo, já se observa a diferença entre tecido maduro e juvenil, ou seja, as mudas enxertadas com tecido maduro apresentam um crescimento mais uniforme quando comparadas com o tecido juvenil que cresce para as laterais. Outra diferença são os espinhos que aparecem somente no tecido juvenil (Figura 24 B).



Figura 24 - Mudas obtidas por enxertia de laranja Pera madura (A) e juvenil (B), na juvenil espinhos indicado pela seta.

As mudas enxertadas foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas e fertilizadas da mesma forma que as mudas obtidas por estaquia, sendo este processo mantido por 6 meses até o porte ideal para a realização da inoculação (Figura 25).



Figura 25 - Mudas obtidas por enxertia de laranja Pera maduras (A) e juvenis (B), prontas para a inoculação de *Ca. Liberibacter asiaticus*, (foto da autora da tese).

4.1.3. Inoculação de *Ca. L. asiaticus* em laranja Pera juvenil e madura em estaca e em enxertia

Borbulhas foram retiradas de plantas de laranja Pera sintomáticas (com *Ca. L. asiaticus*) e enxertadas nas plantas saudáveis em estudo. Na figura 26 encontra-se um fluxograma de fotos mostrando as etapas da inoculação por borbulha retiradas de laranja Pera sintomáticas. A primeira imagem ilustra os galhos coletados de plantas sintomáticas de onde foram retiradas as gemas para a inoculação (imagens 2 e 3), a foto 4 mostra o corte em T invertido na planta onde foi inoculada a gema, e posteriormente na imagem 5 observa-se o encaixe da gema, a seguir a foto 6 mostra o envolvimento da região com o fitilho para evitar a entrada de água durante a irrigação.

Durante a etapa de inoculação sempre há perdas devido a morte da gema que foi enxertada. Considerou-se inviável para a continuação do estudo quando as duas borbulhas enxertadas morreram. A Tabela 6 mostra o total de plantas viáveis obtidas para a continuação do trabalho, sendo que mesmo com as perdas conseguiu-se obter todas as plantas necessárias para o estudo como proposto no planejamento experimental inicial. A tabela 6 mostra que as borbulhas usadas como inoculo

sobreviveram em 96% das plantas inoculadas, sendo descartadas as plantas nas quais as borbulhas não sobreviveram.

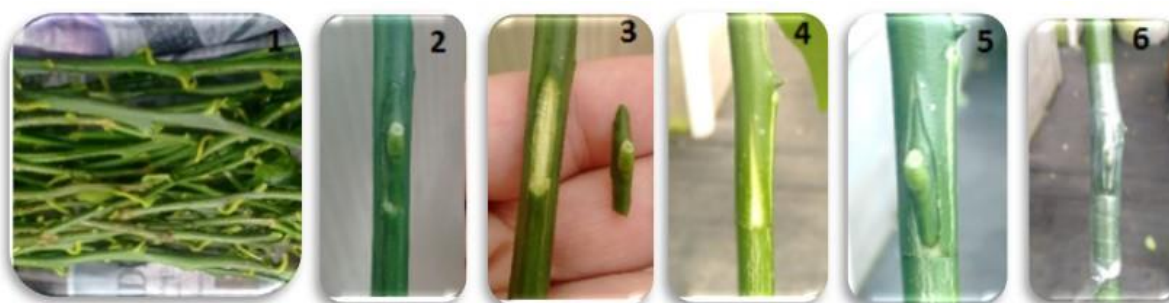


Figura 26 - Sequência de fotos demonstrando a inoculação de *Ca. L. asiaticus* em laranja Pera, pelo método de borbulha, (foto da autora da tese).

Tabela 6 - Resumo das plantas preparadas para o estudo do perfil químico.

Plantas/Total	Total de plantas infectadas necessárias para o estudo	Total de plantas inoculadas	Plantas viáveis para continuação do estudo
Estaca de tecido juvenil de laranja Pêra	20	0	30
Estaca de tecido maduro de laranja Pêra	20	0	24
Limão Cravo	20	0	30
Muda de tecido juvenil de laranja Pêra enxertada em Limão Cravo	20	0	30
Muda de tecido maduro de laranja Pêra enxertada em Limão Cravo	20	0	30
Total de plantas	100	50	144

As plantas citadas na tabela 6 foram coletadas para análise de PCR e confirmação da presença da bactéria após a inoculação (03/06/2016) em 13/06 depois em 04/07, 02/08, e finalmente em 05/10/ de 2016. As plantas foram separadas nas seguintes partes, folhas, caule superior, caule inferior e raízes. A figura 27 ilustra como as plantas foram separadas para o estudo do perfil químico e para a análise por PCR.

As plantas para o estudo químico foram mantidas em frizer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para parar o metabolismo e não influenciar o estudo químico posteriormente á análise por PCR.



Figura 27 - Separação das folhas, caule superior, caule inferior e raízes das plantas de laranja Pera citadas na tabela 6. **A**: amostras para estudo químico; **B**: amostra para análise por PCR, (foto da autora da tese).

4.1.4. Resultado das análises de PCR para confirmar a presença de *Ca. L. asiaticus* em laranja Pera juvenil e madura em estaca e em enxertia, após a inoculação

A figura 28 ilustra como foi feita a análise por PCR, usando como modelo a análise para as folhas. A análise de todas as partes da planta seguiu metodologia discutida em Materiais e Métodos e estas foram realizadas pelo Fundecitrus sob a coordenação do Dr. Sílvio A. Lopes. Os ensaios de PCR convencionais incluíram os pares de primers A2/J5, usados rotineiramente no Fundecitrus para detecção de '*Ca. L. asiaticus*' (Lopes et al., 2009).

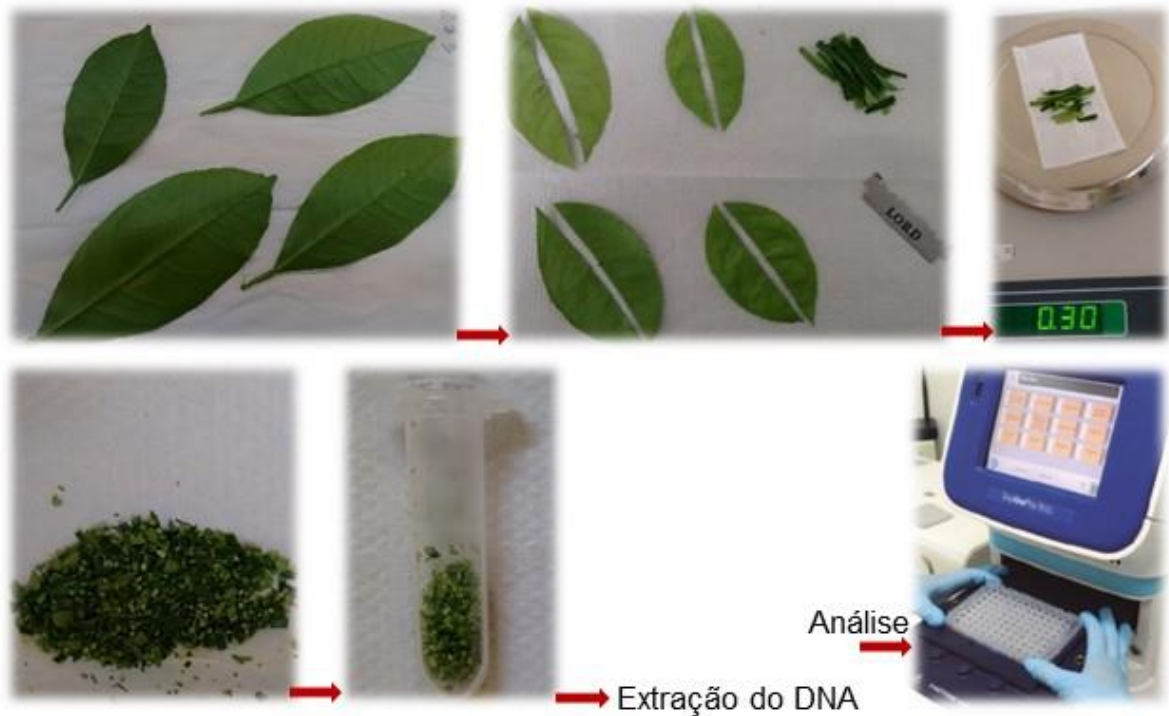


Figura 28 - Ilustração da análise de PCR nas plantas de laranja Pera estudadas.

As plantas da tabela 6 foram analisadas visando acompanhar a movimentação da bactéria nas plantas (Tabela 7). No tempo 1 (10 dias), nenhuma das plantas manifestaram sintomas típicos de HLB ou resultado positivo por PCR, exceto onde foi inoculada a bactéria, caule superior, indicando que, a bactéria não havia ainda se movimentado.

No segundo tempo, 30 dias, o caule inferior de todos os tecidos maduros, apresentaram PCR positivo, indicando o início da movimentação da *Ca. L. asiaticus* nestas, porém sem sintomas visíveis de HLB.

Na coleta de 60 dias ambas as plantas, laranja Pera madura e juvenil enxertada em limão cravo, apresentaram PCR positivo no caule inferior e negativo nas folhas, indicando que a bactéria *Ca. L. asiaticus* se movimenta primeiramente no sentido das raízes, corroborando com os estudos apresentados por Johnson e colaboradores (2014). Neste mesmo período (60 dias), as raízes das plantas maduras já apresentaram PCR positivo, e das plantas juvenis ainda apresentavam PCR negativos, isto já indica uma certa resistência dos tecidos juvenis em relação ao maduro, apoiando os estudos que têm sido realizados pelo Fundecitrus e tornando

indispensável a identificação das substâncias que diferem entre os perfis químicos dessas duas plantas em idades organolépticas distintas.

Somente após 120 dias as plantas juvenis inoculadas apresentaram PCR positivo para as raízes, além dos caules superiores e inferiores, porém as folhas permaneceram sem a bactéria (PCR negativo). Neste período (120 dias) as plantas maduras mostraram PCR positivo até para as folhas. Contudo, nenhuma das plantas doentes apresentaram sintomas visíveis de HLB.

As plantas controle (enxertada com borbulha sadia), não manifestaram sintomas de HLB ou a presença da bactéria em nenhuma das datas avaliadas.

Tabela 7 - Resultados das análises por PCR das plantas de laranja Pera estudadas.

Plantas	Data 13/06/2016 (10 dias)				Data 04/07/2016 (30 dias)			
	Raiz	Caule	Caule superior	Folha	Raiz	Caule inferior	Caule superior	Folha
Pera madura/cravo Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Pera madura/cravo Inoculada	-	-	+	-	-	+	+	-
Pera juvenil/cravo Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Pera juvenil/cravo Inoculada	-	-	+	-	-	-	+	-
Pera madura Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Pera madura Inoculada	-	-	+	-	-	+	+	-
Pera juvenil Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Pera juvenil Inoculada	-	-	+	-	-	-	+	-
Cravo Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Cravo Inoculado	-	-	+	-	-	+	+	-

Tabela 7. Continuação

Plantas	Data 02/08/2016 (60 dias)				Data 05/10/2016 (120 dias)			
	Raiz	Caule inferior	Caule superior	Folha	Raiz	Caule inferior	Caule superior	Folha
Pera madura/cravo Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Pera madura/cravo Inoculada	+	+	+	-	+	+	+	+
Pera juvenil/cravo Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Pera juvenil/cravo Inoculada	-	+	+	-	+	+	+	-
Pera madura Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Pera madura Inoculada	+	+	+	-	+	+	+	+
Pera juvenil Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Pera juvenil Inoculada	-	+	+	-	+	+	+	-
Cravo Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Cravo Inoculado	+	+	+	-	+	+	+	+

O estudo do perfil químico foi realizado com as plantas após 120 dias de inoculação da bactéria.

4.2. Análise exploratória dos dados obtidos por LC-MS-QToF

As plantas preparadas acima foram analisadas por UPLC-QToF/MS individualmente e avaliando amostras das raízes, caule inferior, caule superior e folhas, para os enxertos, aquelas obtidas em estaquias não possuem o caule inferior oriundo do porta enxerto. Foram analisadas essas respectivas partes da laranja Pera

madura enxertada em limão Cravo controle e com a bactéria inoculada, laranja Pera juvenil/limão Cravo controle e inoculado, assim como as em estaquia, laranja Pera madura controle e inoculada, laranja Pera juvenil controle e inoculada e limão Cravo controle e inoculado. Foram realizadas corridas no modo positivo e negativo com as quatro réplicas, para um melhor perfil estatístico. Os dados obtidos foram comparados por meio de análise multivariada por PCA e OPLS-DA/S-Plot. Os cromatogramas de íons totais de cada espécie/órgão foram utilizados nestas análises.

A análise de Componentes Principais (PCA) como apresentado na introdução é um método não supervisionado de análise no qual não é necessário nenhum conhecimento prévio em relação à classificação das amostras. Elas são agrupadas naturalmente de acordo com os dados experimentais obtidos, ou seja, amostras semelhantes se agrupam e amostras diferentes se distanciam. Adicionalmente, esta ferramenta tem a capacidade de projetar os dados multivariados em uma dimensão menor com perda controlada de informações, simplificando a interpretação, visualização e compreensão dos dados. No gráfico de *scores*, cada ponto representa uma observação e o gráfico de *loadings* representa a influência de cada variável na separação, neste caso, essas variáveis são os íons obtidos por EM nas análises das amostras por LC-MS.

Esses resultados serão exemplificados com as análises das raízes. Através do gráfico de *scores* contendo as análises das amostras de laranja Pera madura/limão Cravo controle e inoculado, laranja Pera juvenil/limão Cravo controle e inoculado, em estaquia laranja Pera madura controle e inoculado, foi possível observar uma separação das amostras inoculadas com a bactéria e as não inoculadas (controle) (Figura 29 **A, B**).

O interessante foi que ao comparar as mesmas plantas não enxertadas, laranja Pera madura controle e inoculado, laranja Pera juvenil controle e inoculado e limão Cravo controle e inoculado, os gráficos de *scores* mostram os dados das inoculadas a esquerda, enquanto naquelas enxertadas esses dados aparecem a direita do gráfico (Figura 30). Isto já indica haver diferenças em tipos de metabólitos secundários, ou quantidade deles.

Ao comparar as idades ontogenéticas distintas de laranja Pera madura/limão Cravo inoculado com laranja Pera juvenil/limão Cravo inoculado, assim como as amostras não enxertadas, laranja Pera madura inoculada com laranja Pera juvenil inoculado, os gráficos de *scores* mostram que elas se diferenciam (Figura 31).

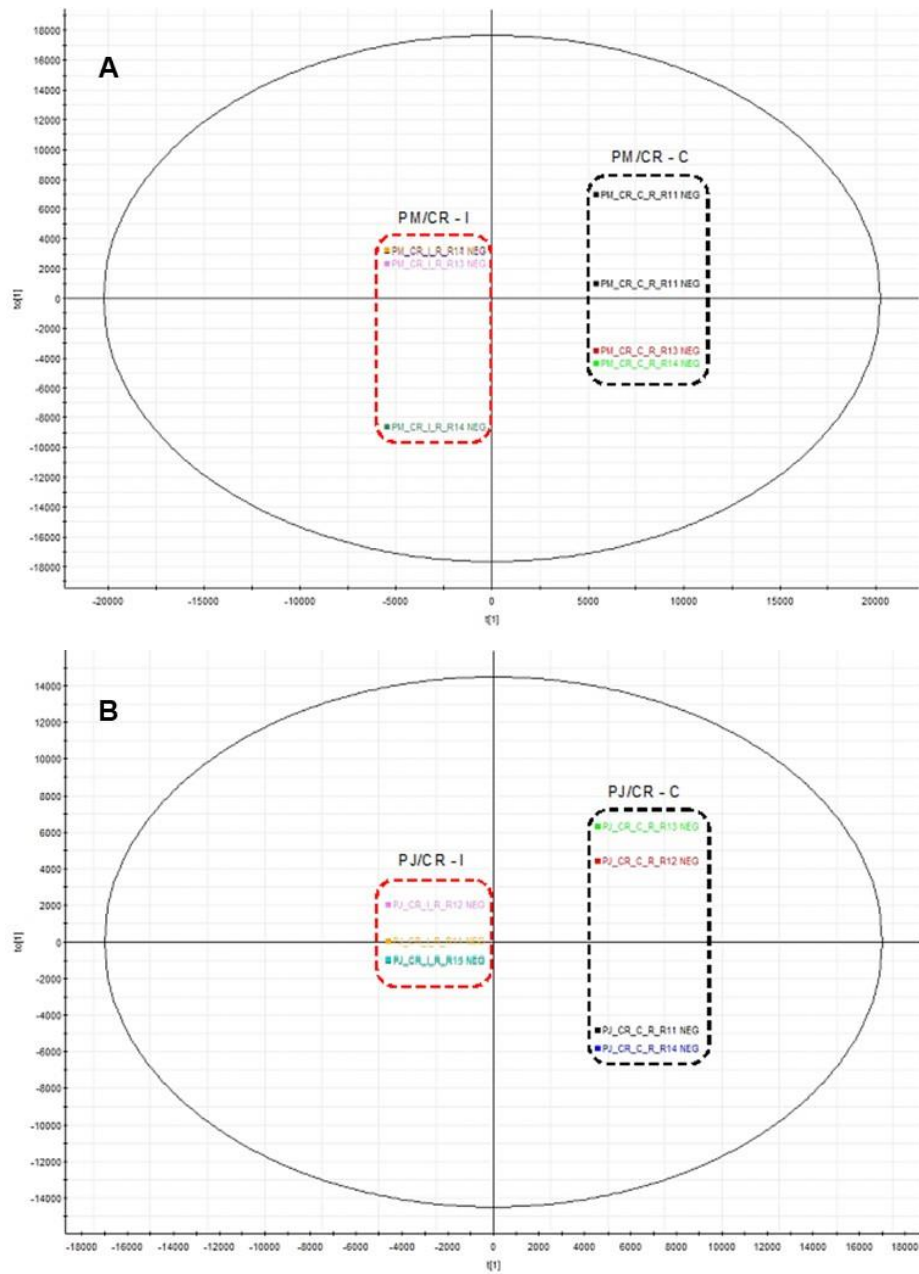


Figura 29 - Gráfico de score em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: Análises das raízes; **A:** laranja Pera madura/limão Cravo controle (---) e inoculado (---); **B:** laranja Pera juvenil/limão Cravo controle (---) e inoculado (---).

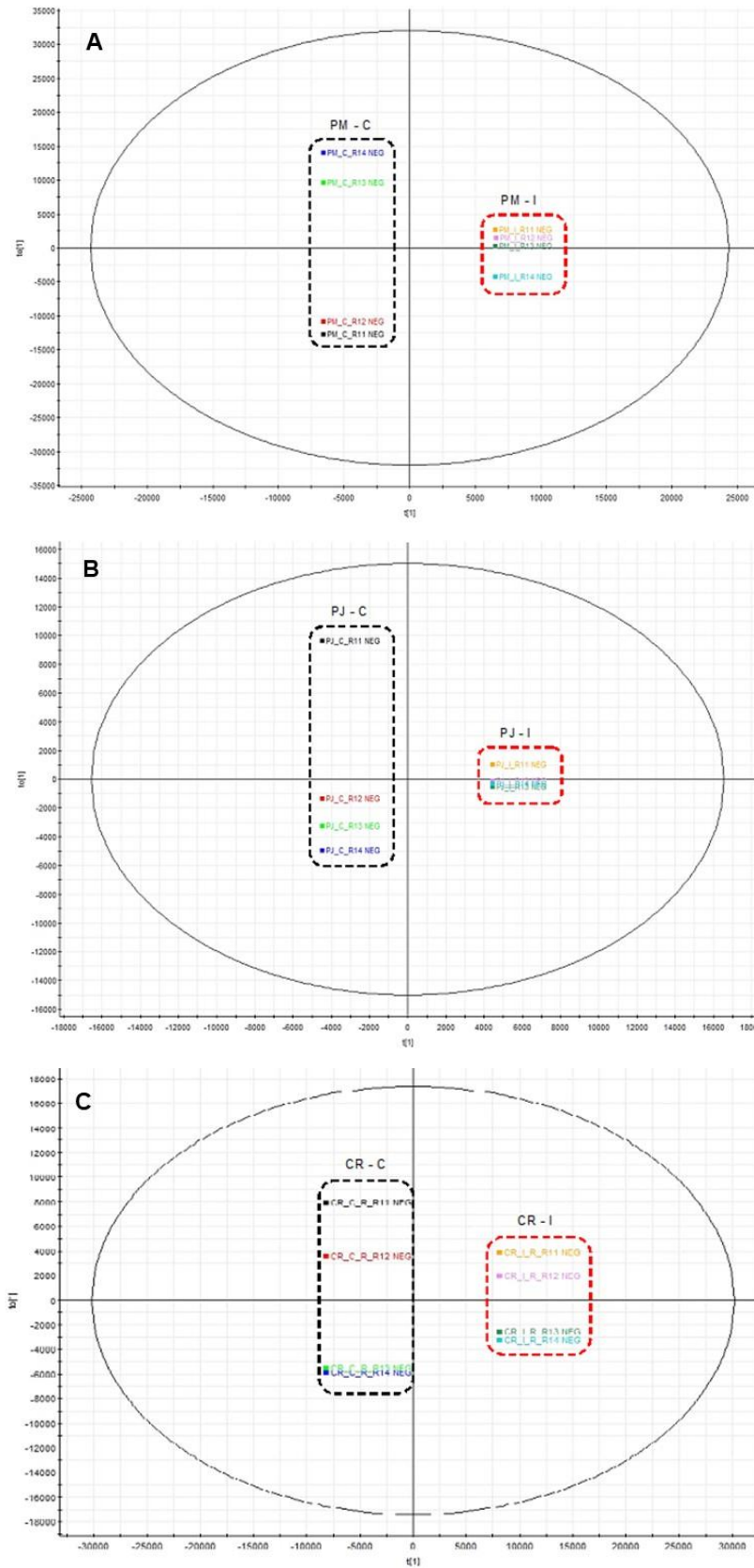


Figura 30 - Gráfico de score em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: Análises das raízes; **A:** estaquias laranja Pera madura controle (---) e inoculado (---), **B:** laranja Pera juvenil controle (---) e inoculado (---), **C:** limão Cravo controle (---) e inoculado (---).

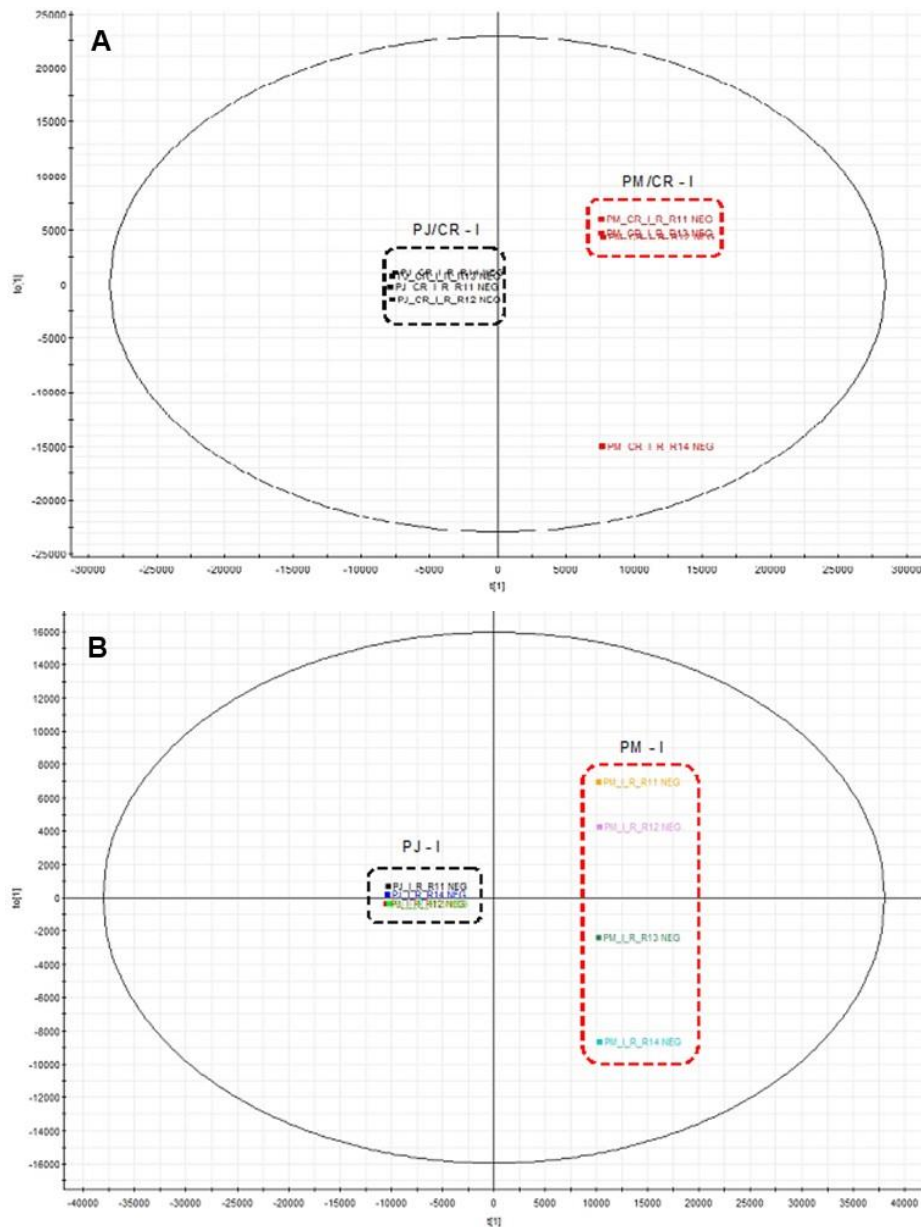


Figura 31 - Gráfico de score em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA, comparando idades ontogenéticas distintas. Análises das raízes; **A**: laranja Pera juvenil/limão Cravo (---) inoculado e Pera madura/limão Cravo (---) inoculado, **B**: laranja Pera juvenil (---) inoculado e laranja Pera madura (---) inoculada.

O modelo de OPLS-DA foi aplicado aos dados de UPLC-QToF-MS a fim de se comparar os grupos de amostras usando também gráfico de dispersão (*S-plot*), para visualização desses grupos. Os valores de *tr-m/z* serviram de base para a identificação, ou tentativamente de identificação dos potenciais biomarcadores responsáveis pela classificação e separação das amostras. O gráfico de *S-plot* utiliza os valores de tempo de retenção e carga/massa (*tr-m/z*) para identificar os

responsáveis pela separação das amostras. O gráfico projeta a variância em função dos metabólitos, os íons com alto valor de Y e X, covariância, são localizados distante da origem e, conseqüentemente, contribuem significativamente para separação das classes. A grande vantagem do uso dessa técnica é poder identificar os íons que são mais representativos, ou seja, as diferenças químicas significativas entre as amostras analisadas. Para exemplificar esse tipo de análise a seguir o gráfico de dispersão (S-Plot) foi construído usando amostras de raízes dos enxertos de laranja Pera madura/limão Cravo e laranja Pera juvenil/limão Cravo inoculados, visando comparar as idades ontogenéticas distintas (Figura 32). Esta análise permitiu separar 10 íons mais significativos, cujas identificações de estruturas serão discutidas no próximo item.

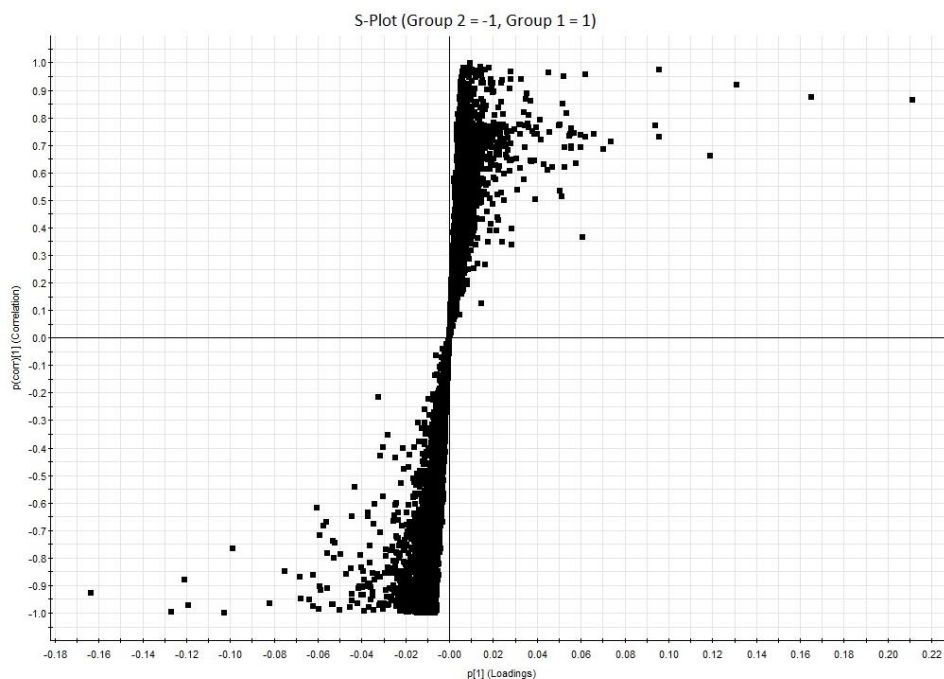


Figura 32 - Gráficos de dispersão (S-plot) em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: Análise das raízes de enxertos de laranja Pera madura/limão Cravo e laranja Pera juvenil/limão Cravo inoculados.

Os cromatogramas de íons totais destas amostras são mostrados a seguir (Figura 33).

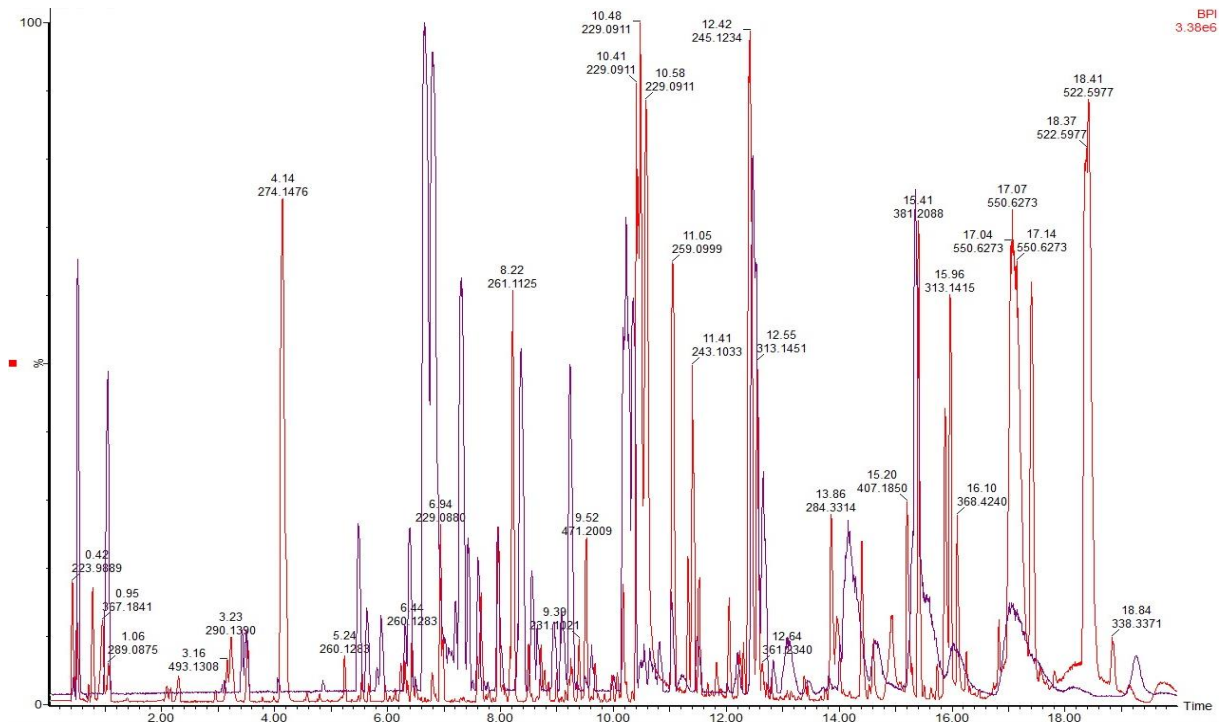


Figura 33 - Comparação dos cromatogramas de íons totais de amostras das raízes dos enxertos de laranja Pera madura/limão Cravo e laranja Pera juvenil/limão Cravo inoculados (vermelho tecido juvenil e em azul tecido maduro).

4.2.1. Análise do perfil químico dos tecidos juvenis e maduros de laranja Pera enxertadas em limão cravo e sem a enxertia, com e sem *Ca. Liberibacter asiaticus*

O objetivo principal do projeto que originou esta tese foi avaliar a variação do perfil químico entre exemplares de tecidos juvenis e maduros de laranja Pera enxertadas em limão cravo e sem a enxertia, com sintomas de HLB, visando obter possíveis marcadores bioquímicos que possibilitassem entender a resistência das plantas obtidas de sementes (juvenis) em relação ao tecido maduro em enxertia e na ausência do enxerto. Assim, as análises dos dados de UPLC-QTOF-MS usando o gráfico de dispersão (*S-plot*) foram desenvolvidos para estas plantas e avaliando os diferentes órgãos raízes, caule inferior, caule superior e folhas. Os resultados são discutidos a seguir.

A figura 34 exemplifica como as diferentes partes dos enxertos foram estudadas. As fotos mostram que nos enxertos sempre temos quatro partes da planta para estudo, raízes, caule inferior, ambos oriundos do porta enxerto (*C. limonia*), caule superior e as folhas, ambos oriundos da laranja pera (*C. sinensis*) madura (A) ou

juvenil (**B**). Devemos lembrar que o caule superior e as raízes do enxerto são tecidos maduros, pois são oriundos de *C. limonia* adquiridos em viveiros certificados.

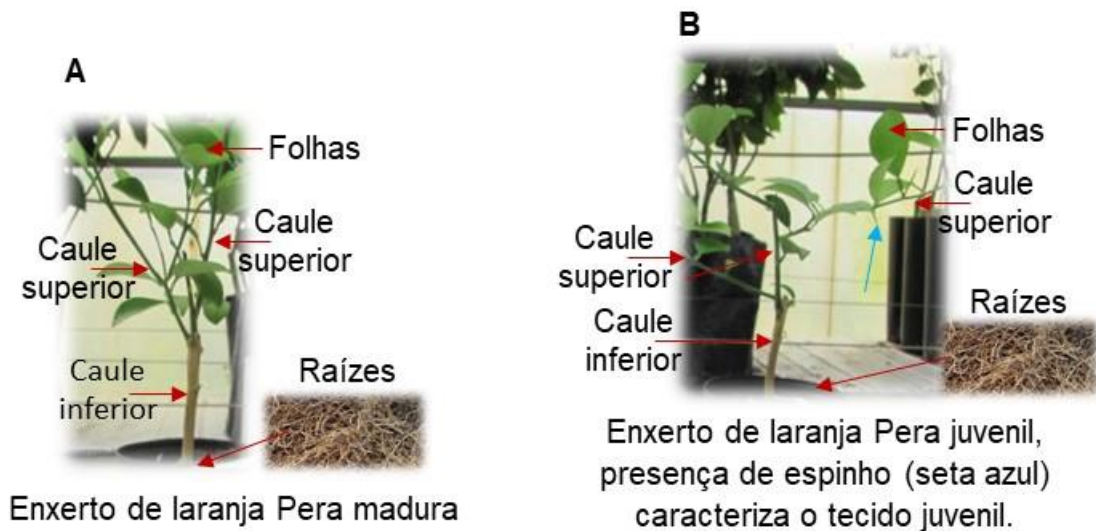


Figura 34 - As fotos exemplificam como estas plantas foram separadas para o estudo químico usando UPLC-QTOF-MS.

A figura 35 exemplifica como as diferentes partes das estaquias foram estudadas. A foto mostra que nas estaquias não há o porta enxerto, logo neste estudo temos somente três partes da planta para estudo, raízes, caule superior, e folhas, todos oriundos de laranja pera madura ou juvenil.



Mudas obtidas por estaquia de laranja Pera juvenis e maduras.

Elas são diferenciadas pelas placas, mas a juvenis possuem espinhos.

Elas não são enxertadas, não há o caule inferior oriundo de *C. limonia*.

Figura 35 - A foto exemplifica como estas plantas foram separadas para o estudo químico usando UPLC-QTOF-MS.

4.2.1.1. Análise das raízes dos enxertos de tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera em limão cravo com HLB

Através do tratamento quimiométrico destas amostras foi possível identificar os 10 íons que apresentaram maior diferença estatística significativa no modo positivo de ionização, quando comparado as raízes infectadas de tecidos maduros com as juvenis de laranja Pera enxertadas em limão cravo (Tabela 8).

As quantidades de todos os extratos analisados foram iguais, ou seja, 50 mg de folhas moídas, caules, caules do porta-enxertos e raízes. Além disso, alíquotas de 1.0 µL foram injetadas na coluna analítica em todas as análises, sugerindo que a quantidade dos compostos nesses extratos pode ser inferida a partir da área da banda obtida nos cromatogramas. No geral, todas as cumarinas mostradas na Tabela 8, avaliando as bandas cromatográficas correspondente a elas em tecido maduro e juvenil e diminuindo o valor da última da primeira, os valores foram positivos, indicando que todas estavam em maior quantidade nos tecidos maduros com HLB.

Tabela 8 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras das raízes dos enxertos no gráfico S-plot, íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.

Banda	[M+H] ⁺	Substância	Varição*
1	163,1351	Umbeliferona	1,58
2	229,0164	Xantiletina	2,11
3	229,0380	Seselina	2,57
4	245,0894	Suberenona	1,75
5	245,1234	Ostol	7,21
6	259,0916	5-Metoxiseselina	1,76
7	259,1245	Xantoxiletina	3,93
8	261,1125	Tamarina	3,93
9	279,1279	Ulopterol	1,64
10	313,1451	Nordentatina	2,36

*Média da área do pico cromatográfico das réplicas do tecido maduro menos o juvenil.

Identificação da banda 1, íon m/z 163,1351

Analisando os espectros de massas do íon selecionado no modo positivo de ionização obtém-se o espectro em *full scan* indicando o íon m/z 163, e no espectro de íons produtos deste verifica-se o pico base em m/z 107 (Figura 36). A perda neutra de monóxido de carbono (CO) do íon $[M+H]^+$ com m/z 163 leva ao íon produto m/z 135. Um rearranjo neste íon seguido pela perda de mais uma unidade de CO leva a um segundo fragmento de estabilidade maior, m/z 107 (Esquema 1). Esses fragmentos sugerem a presença da cumarina umbelliferona. Devido à ausência de um padrão autêntico da umbelliferona ($C_9H_6O_3$) em nosso laboratório, comparamos os dados de MS com aqueles publicado recente pelo grupo em trabalho similar, porém avaliando a interação com uma segunda bactéria fitopatogênica de citros, *Xylella fastidiosa* (SOARES et al., 2020). Para deixar claro, todas as sequências de fragmentações em um íon, discutidas nesse item e em toda a tese, ocorreram em parte das moléculas do íon ainda não detectado.

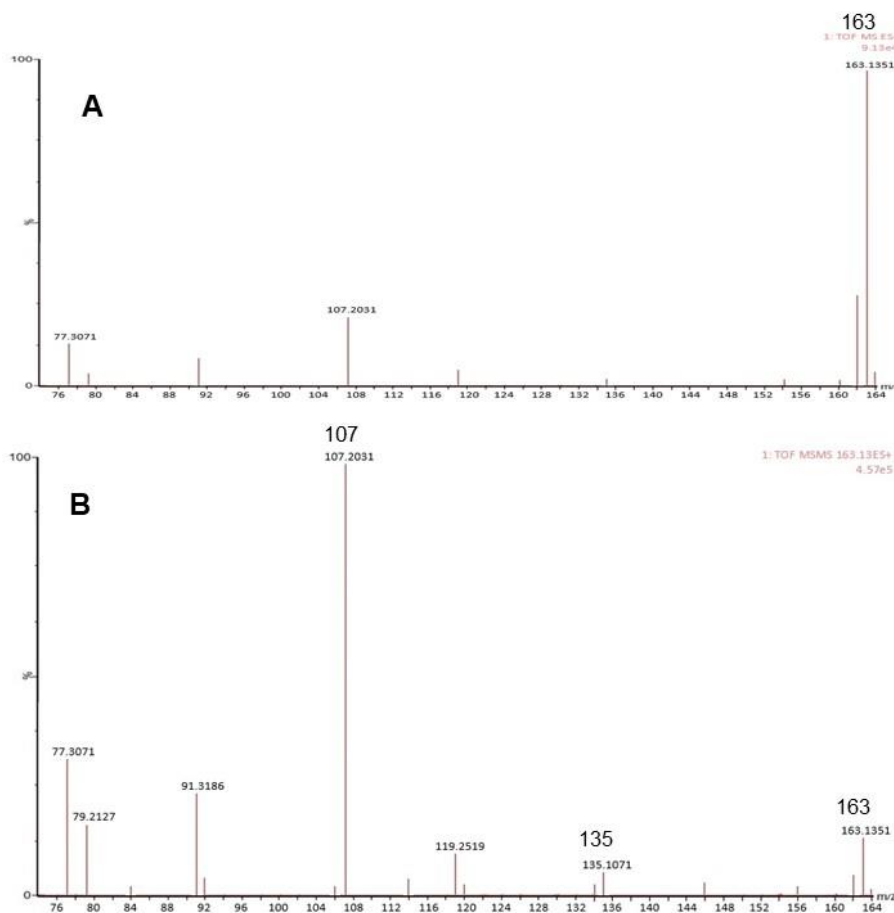
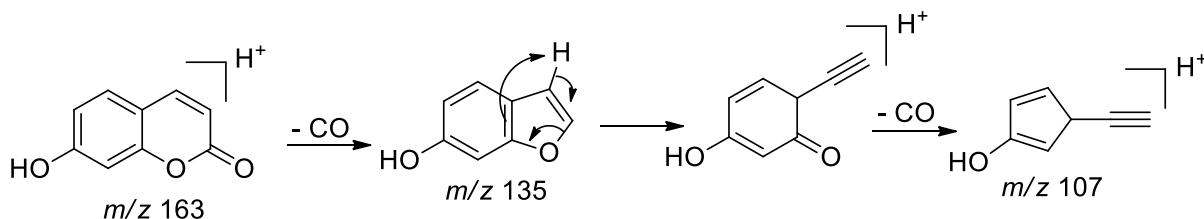


Figura 36 - Espectro de massas para o íon m/z 163,1351 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 163.



Identificação das bandas 2 e 3, íons m/z 229,0164 e 229,0380, respectivamente

Ambos os íons com m/z 229 $[M+H]^+$ sofreram fragmentações diferentes, o primeiro levou ao íon produto com intensidade proeminente em m/z 213 $[M+H - CH_4]^+$ no espectro MS², o qual foi formado pela perda de CH₄, seguido por um segundo pico menos intenso a m/z 185, pela perda neutra de CO no anel lactônico (Figura 37, Esquema 2).

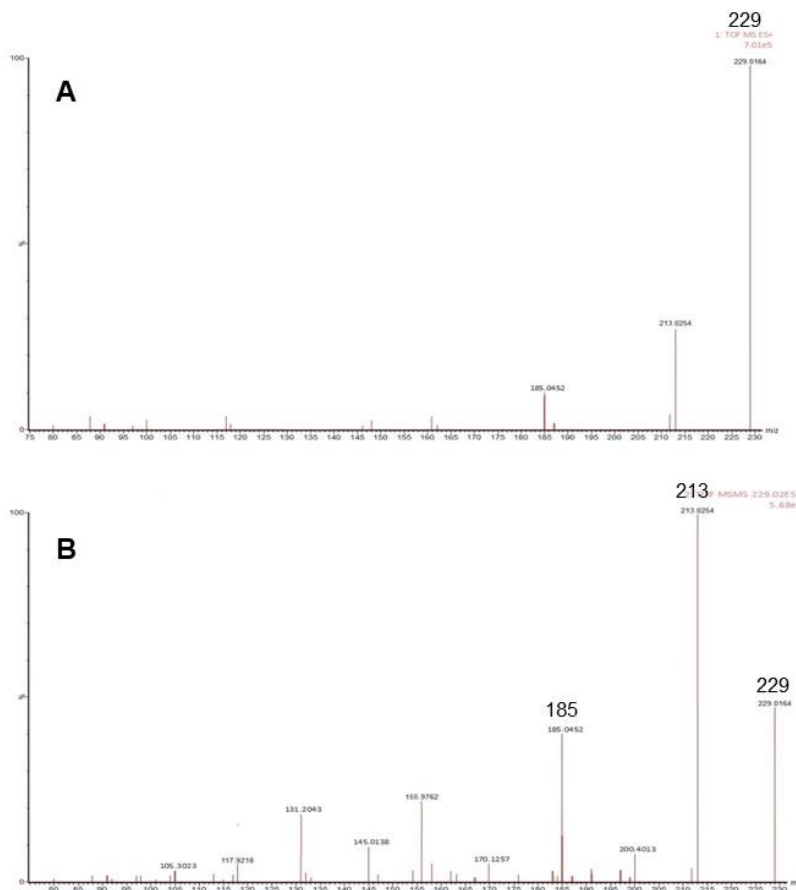
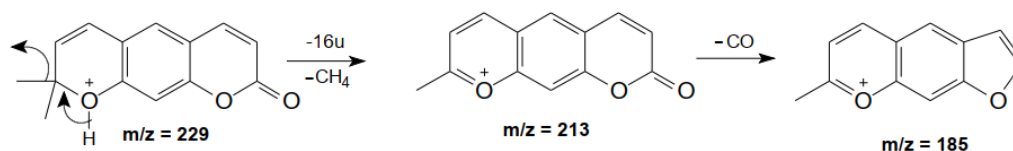


Figura 37 - Espectro de massas para o íon m/z 229,0164 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 229.



Esquema 2. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS², característicos da xantiletina protonada.

O segundo íon mostrou no espectro MS/MS um pico base em *m/z* 175 formado pela perda dos carbonos que constituem o anel lactônico [M+H - (HC≡CH + CO)]⁺ (Figura 38, Esquema 3). Estes fragmentos sugerem a presença das cumarinas xantiletina e seselina, as quais foram confirmadas por comparação direta com padrões autênticos obtidos no estudo citado acima (SOARES et al., 2020).

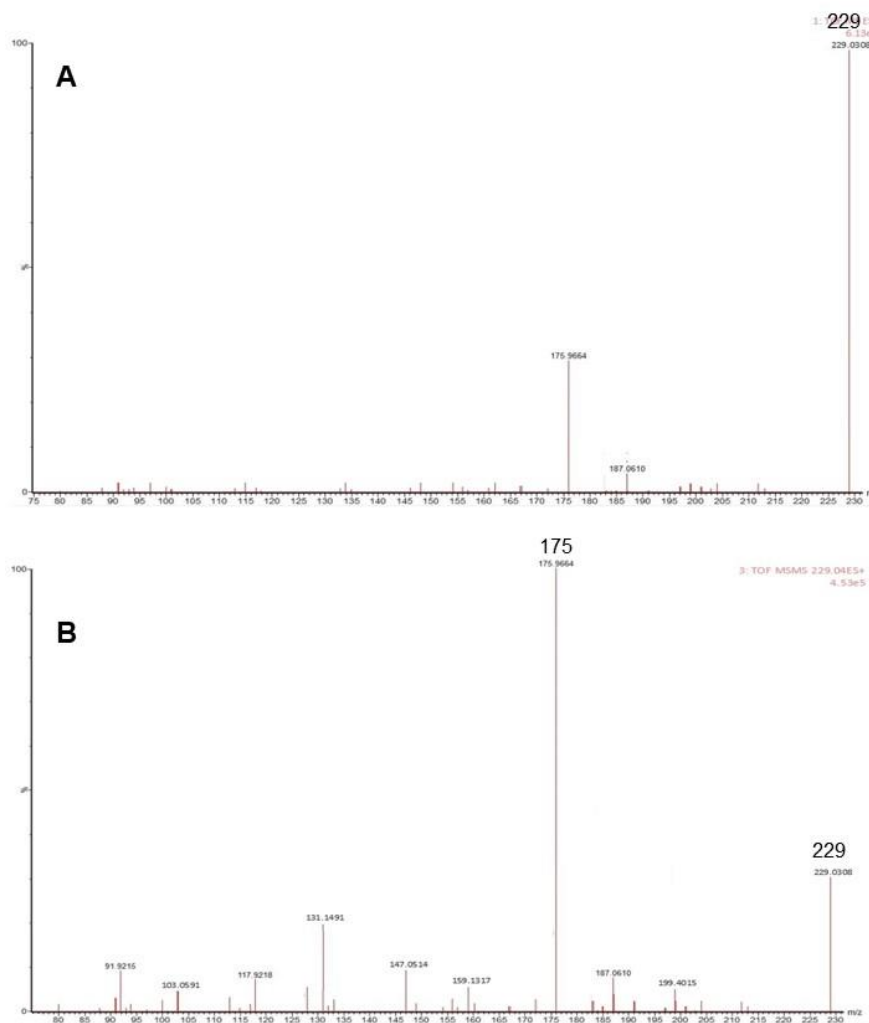
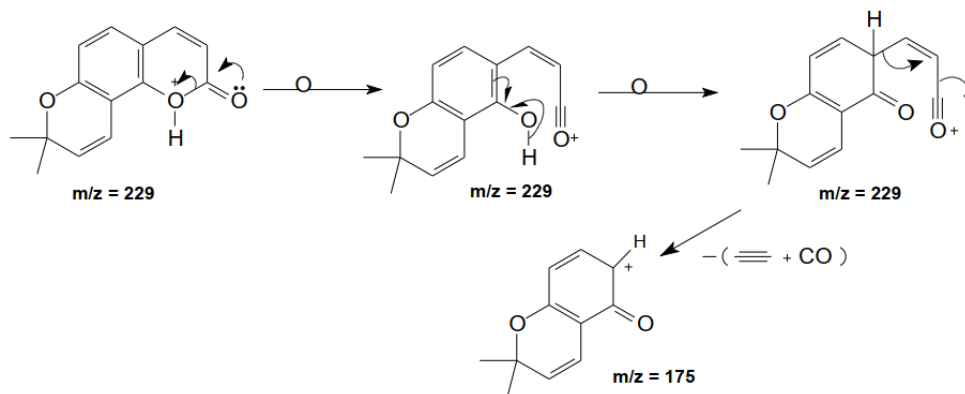


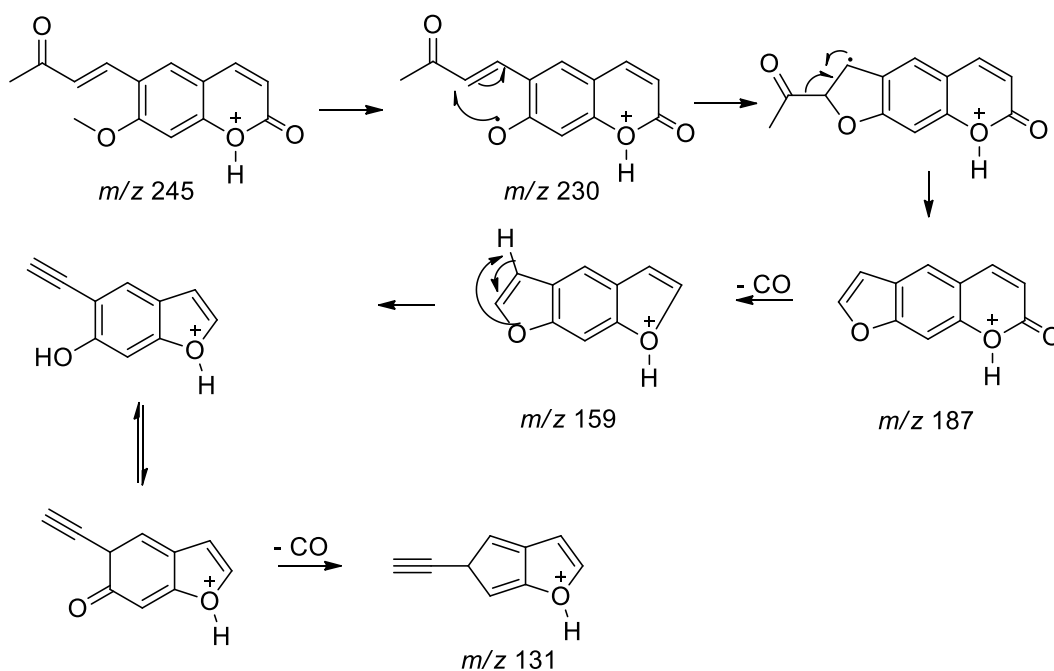
Figura 38 - Espectro de massas para o íon *m/z* 229,0380 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de *m/z* 229.



Esquema 3. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos da seselina protonada.

Identificação das bandas 4 e 5, íons m/z 245,0894 e 245,1234, respectivamente

As metoxicumarinas fornecem íons produtos por clivagem homolítica com a perda de $\cdot\text{CH}_3$ do grupo metoxila levando a um valor par de m/z 230 (Figura 39). Este íon radical sofre ciclização com perda de $\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{O}\cdot$ radicalar levando ao íon produto com intensidade proeminente em m/z 187. A perda comum de CO do anel da lactona ocorre nesse último íon levando ao fragmento m/z 159, e em seguida a perda de mais uma unidade de CO no anel fenila como mostrado no esquema 4.



Esquema 4. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos da suberenona protonada.

Estas fragmentações sugerem a presença da cumarina suberenona, identificada pelo grupo também de *Citrus sinensis* (CERQUEIRA, 2016). Infelizmente o grupo não possuía essa cumarina como padrão, mas os dados de fragmentação foram similares aos observados anteriormente, permitindo, no momento, propor para a banda 4 a cumarina suberenona.

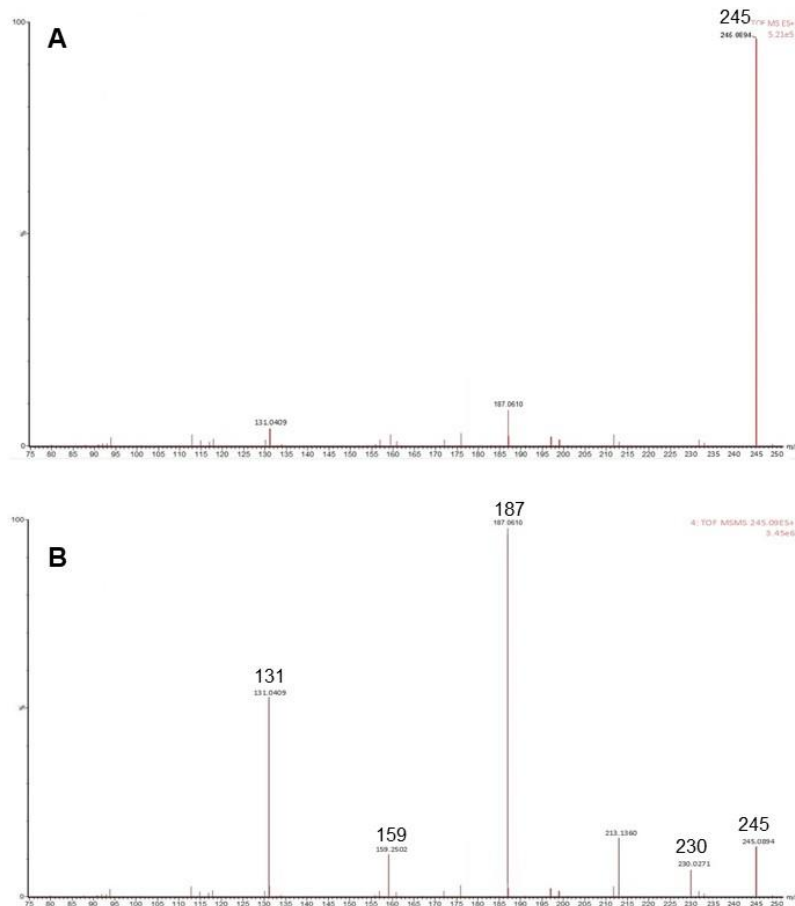


Figura 39 - Espectro de massas para o íon m/z 245,0894 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 245.

A banda 5 também sugere a presença de uma metoxicumarina, seu espectro de MS^2 (Figura 40) fornece íons produtos por perda neutra de CH_2O do grupo metoxila a m/z 215, por clivagem homolítica com a perda de $\cdot CH_3$ levando a um valor par de m/z 230, assim como perda neutra de CH_2O do grupo metoxila e de CO do anel da lactona levando ao m/z 187, conforme mostra o esquema 5. Outras fragmentações no esqueleto da cumarina e na unidade prenila em C-8 são mostradas no esquema 5.

Estas fragmentações sugerem a presença da cumarina ostol, identificada pelo grupo em estudo citado acima (SOARES et al., 2020). Infelizmente o

grupo não possuía essa cumarina como padrão, mas os dados discutidos permitem, no momento, propor para a banda 5 a cumarina ostol.

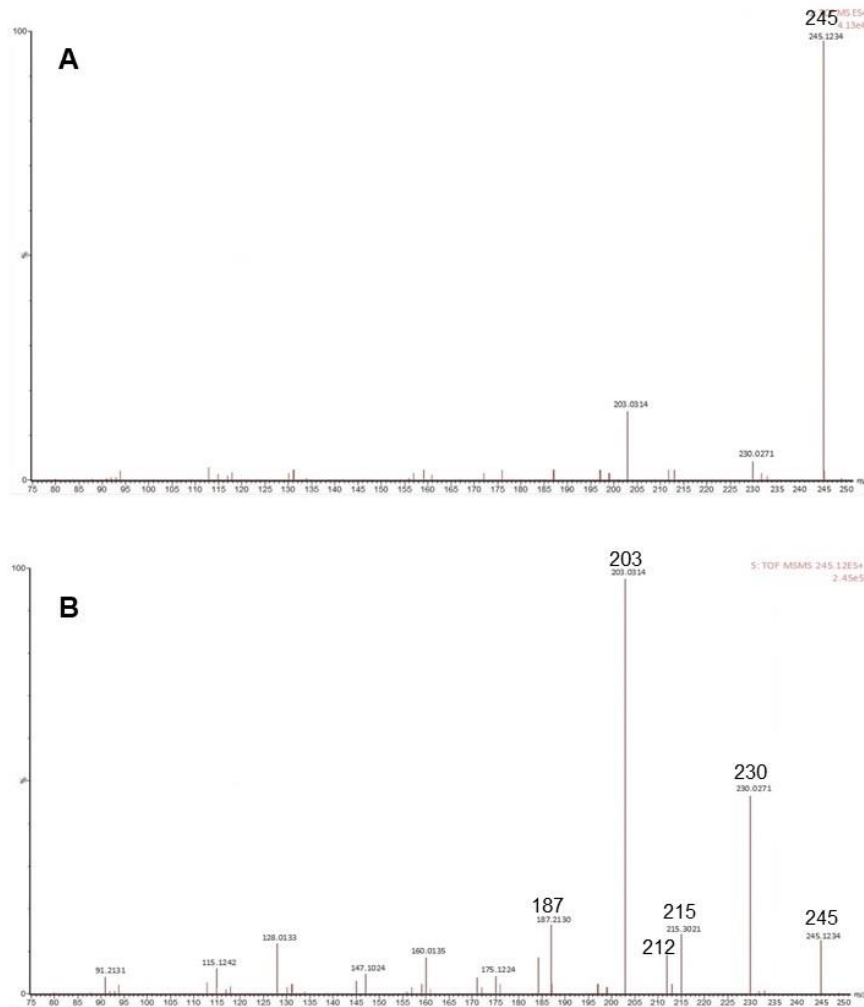
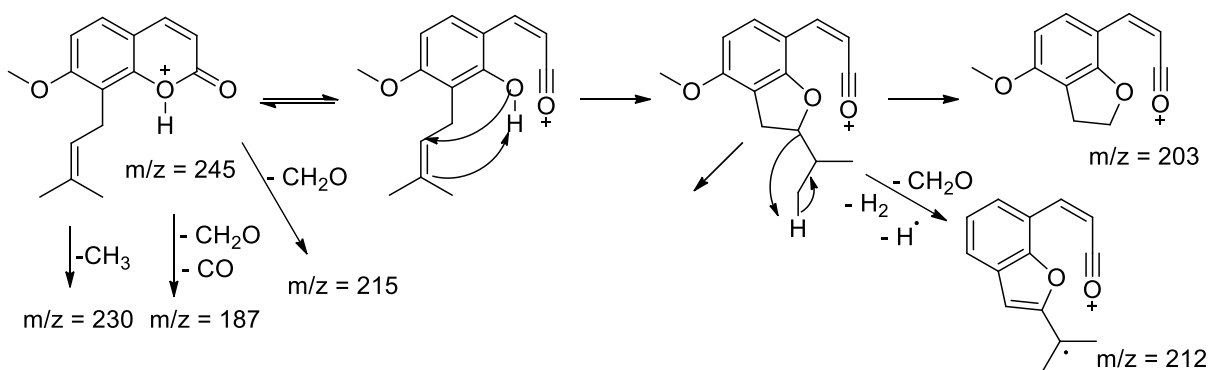


Figura 40 - Espectro de massas para o íon m/z 245,1234 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 245.



Esquema 5. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de ostol protonado.

Identificação das bandas 6 e 7, íons m/z 259,0916 e 259,1245, respectivamente

A banda 6 e 7 também sugerem a presença de metoxicumarinas (Figuras 41 e 42), seus espectros de MS^2 fornecem íons produtos por perda neutra de CH_2O do grupo metoxila a m/z 229. O restante dos íons encontrado no espectro MS^2 para a banda 6 correspondem a fragmentações no anel cromeno, o qual sofre abertura e posterior perda de propene ($CH_2=CHCH_3$) levando ao íon m/z 217, a partir deste último não detectado a perda neutra de CO do anel da lactona fornece o pico base a m/z 189, como mostra o esquema 6. Estes sugerem a presença da 5-metoxiseselina, identificada pelo grupo também de *Citrus sinensis* (CERQUEIRA, 2016). Infelizmente o grupo não possuía essa cumarina como padrão, mas os dados permitem, no momento, propô-la a banda 6.

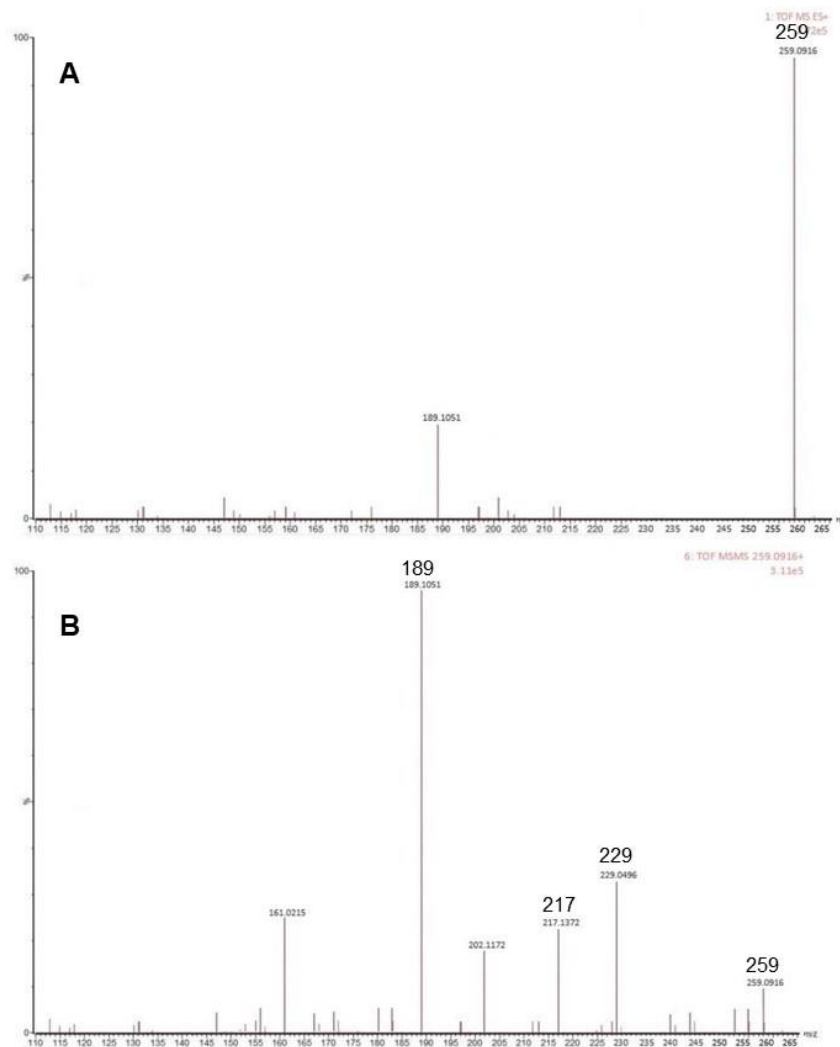
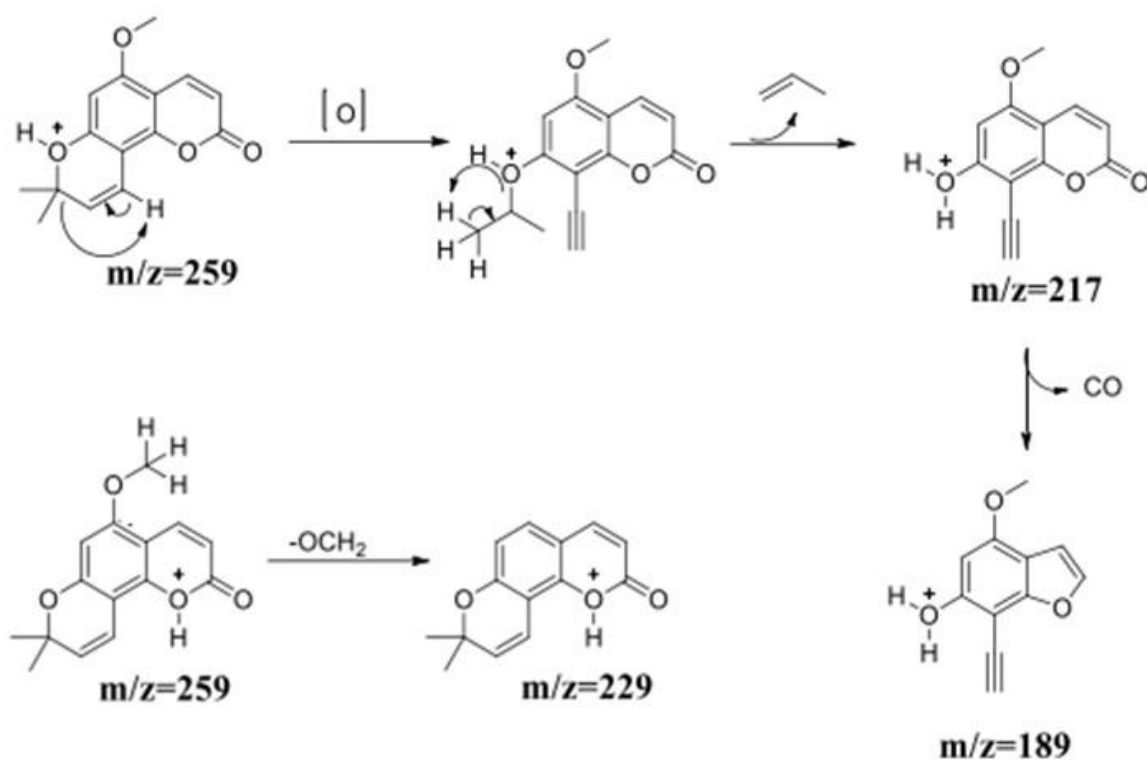
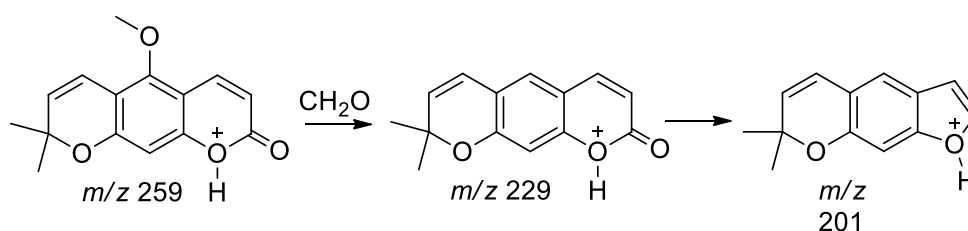


Figura 41 - Espectro de massas para o íon m/z 259,0916 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 259.



Esquema 6. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de 5-metoxiseselina protonada.

O interessante é que a banda 7 em seu espectro de MS^2 mostra somente mais um íon fragmento proeminente a m/z 201 formado pela perda neutra de CO do anel da lactona (Esquema 7), sugerindo a xantoxiletina para a banda 7, e indicando a piranocumarina linear mais estável que a angular nesta análise de MS/MS. A xantoxiletina foi identificada pelo grupo em estudo citado acima (SOARES et al., 2020).



Esquema 7. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de xantoxiletina protonada.

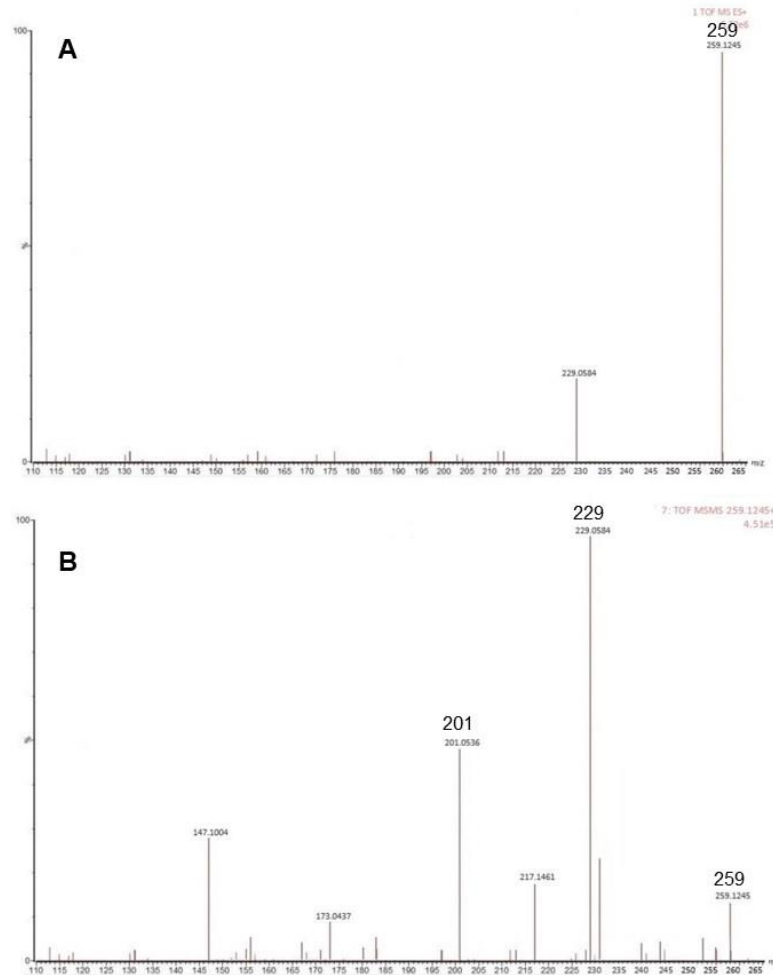


Figura 42 - Espectro de massas para o íon m/z 259,1245 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 259.

Identificação da banda 8, íon m/z 261,1125

A banda 8 em seu espectro de MS^2 (Figura 43) fornece íons produtos formados inicialmente por clivagem homolítica com a perda de parte da cadeia lateral (C_4H_7O) levando a um íon radical com valor par de m/z 190. O radical formado cicliza com o carbono da metoxila, perdendo hidrogênio radicalar e formando um anel diidrofurano, correspondente ao m/z 189, a seguir a perda neutra de CO no anel lactona leva ao segundo pico proeminente a m/z 161 no espectro MS^2 , como mostra o esquema 8. Estes sugerem a presença da cumarina tamarina na banda 8, identificada pelo grupo também de *Citrus sinensis* (SOARES 2011).

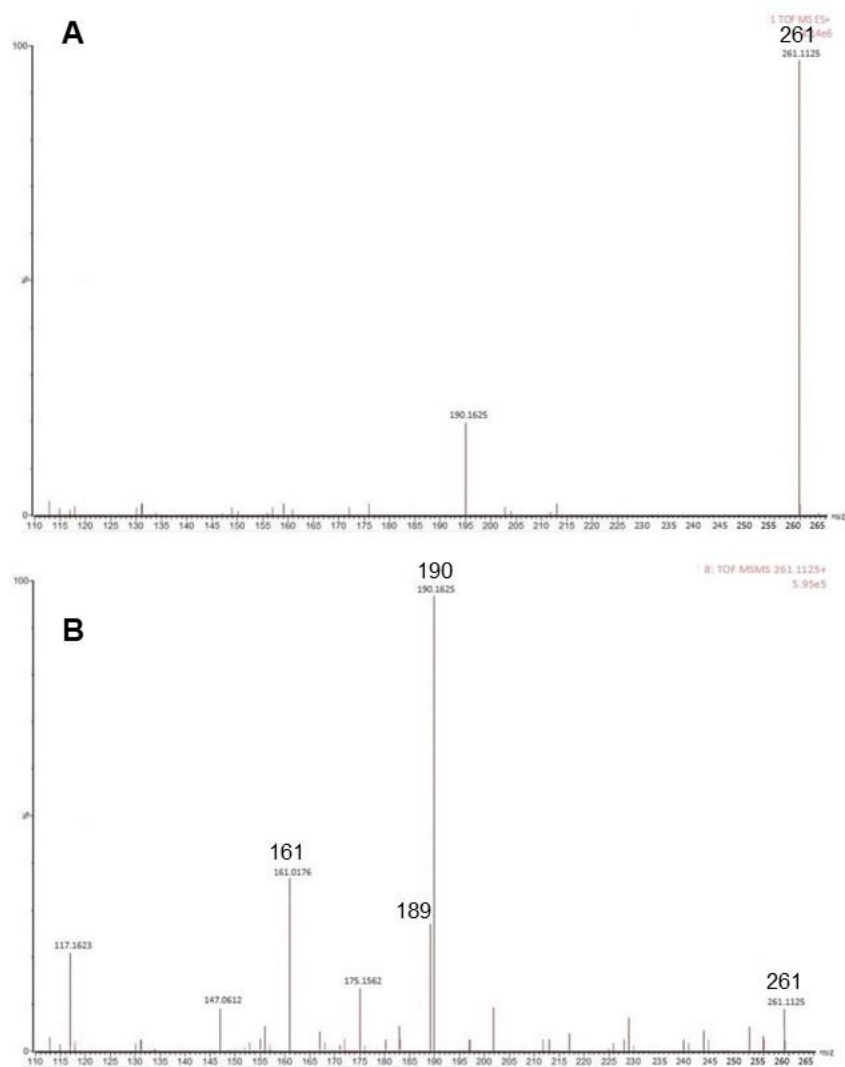
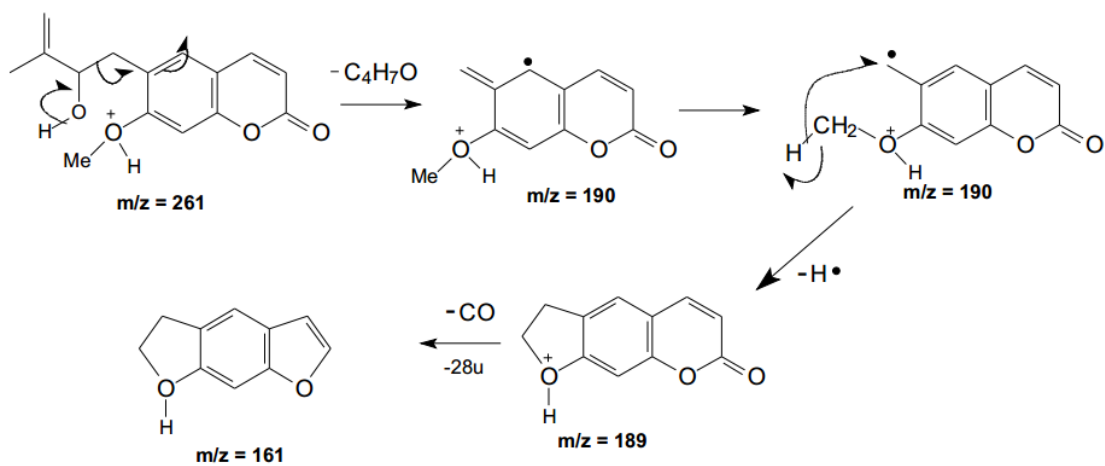


Figura 43 - Espectro de massas para o íon m/z 261,1125 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 261.



Identificação da banda 9, íon m/z 279,1279

A banda 9 em seu espectro de MS^2 (Figura 44) também fornece íons produtos formados inicialmente por clivagem homolítica com a perda de parte da cadeia lateral ($C_4H_9O_2$) levando a um íon radical com valor par de m/z 190. Outras fragmentações comuns nas cumarinas preniladas são mostradas no esquema 9, e estas indicam para a banda 9 a cumarina ulopteroil, identificada pelo grupo em estudo citado acima (SOARES et al., 2020).

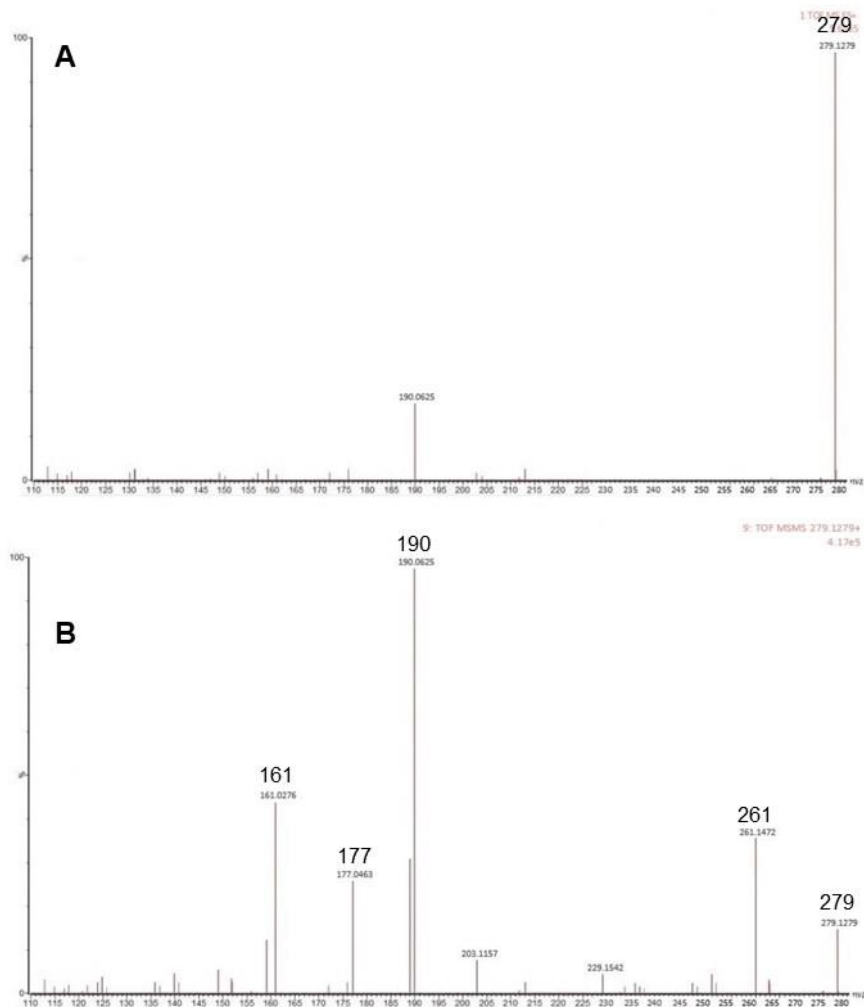
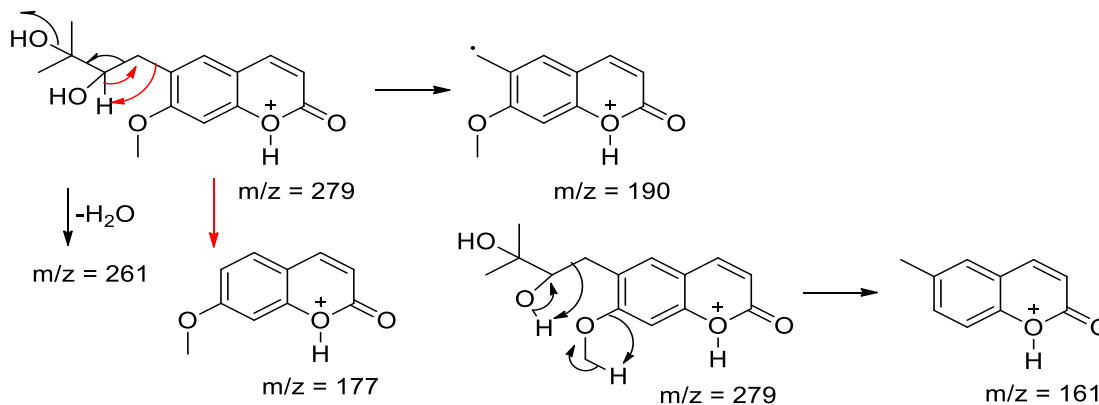


Figura 44 - Espectro de massas para o íon m/z 279,1279 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 279.



Esquema 9. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS², característicos de ulopterol protonado.

Identificação da banda 10, íon m/z 313,1451

A banda 10 em seu espectro de MS² (Figura 45) fornece íons produtos de fragmentações típicos de cumarinas preniladas, e podem ser vistas no esquema 10.

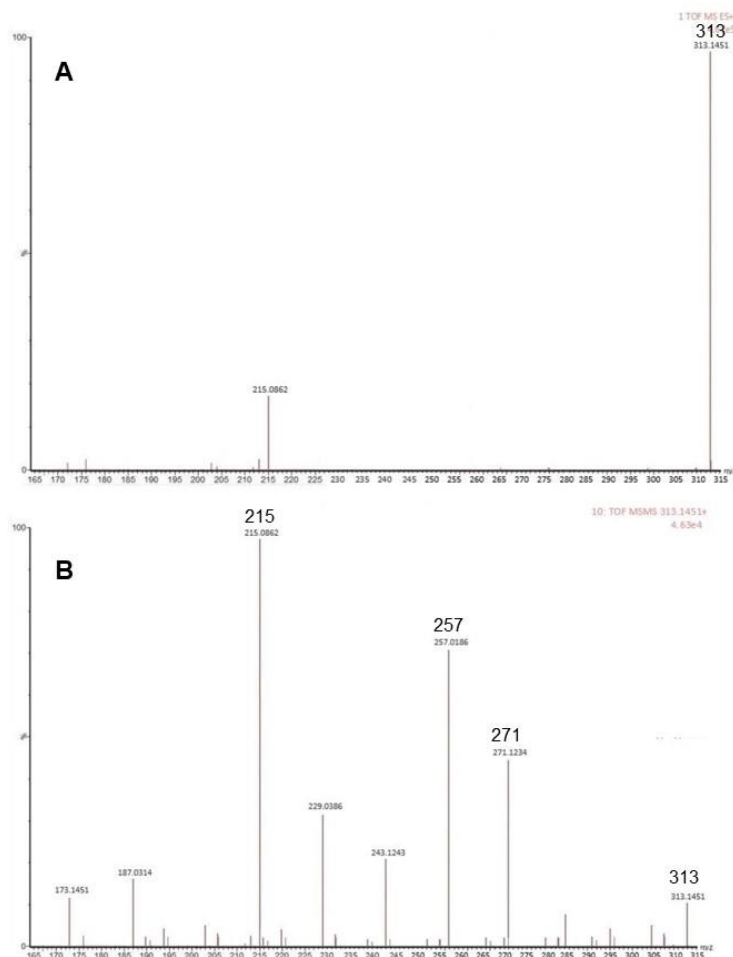
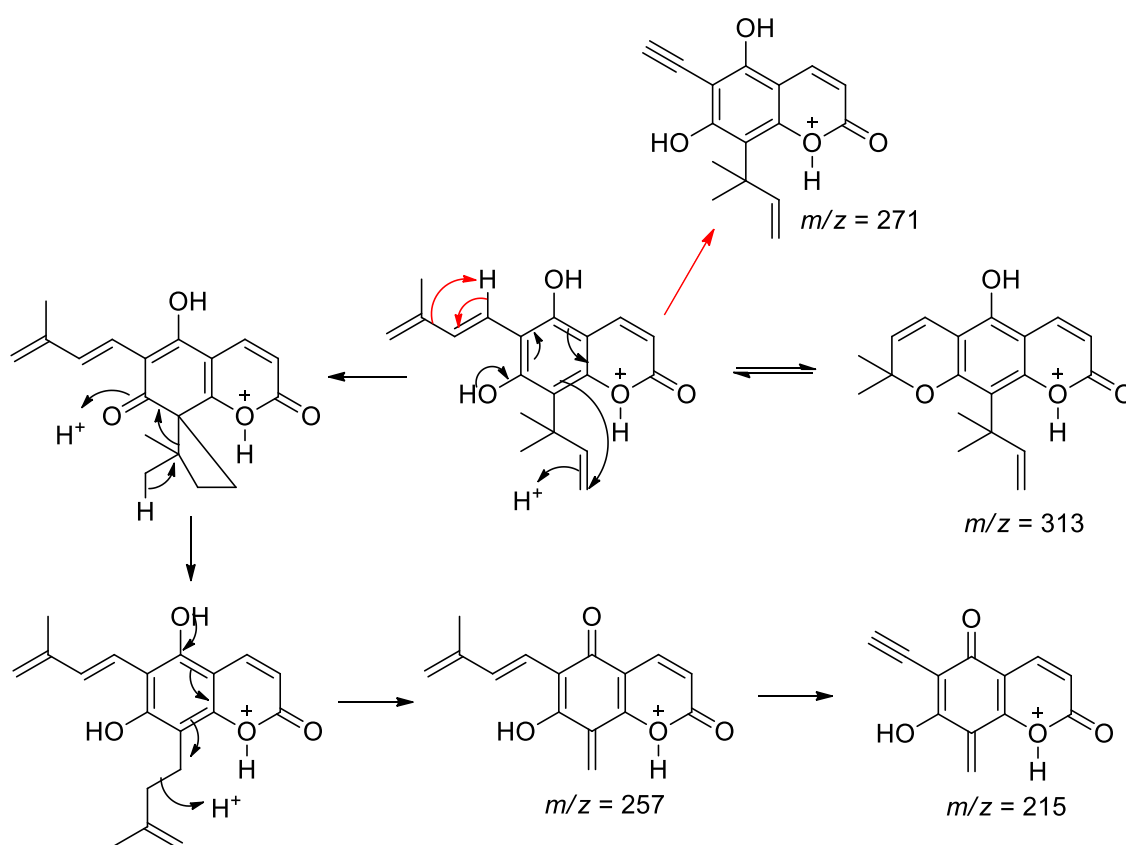


Figura 45 - Espectro de massas para o íon m/z 313,1451 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 313.

As cumarinas preniladas freqüentemente têm esta cadeia oxidada ou modificadas por ciclizações e rearranjos, e o principal produto de fragmentação resulta da clivagem de uma das ligações C – C adjacentes ao átomo de oxigênio ou à ligação alílica. A perda de C₄H₈O de [M+H]⁺ levando ao íon *m/z* 257 e 215, sugere um rearranjo da unidade 1,1-dimetilalil em C-8 para posteriormente permitir a saída da unidade C₄H₈O, como mostrado no esquema 10. A massa molecular e as fragmentações sugerem a presença da cumarina nordentatina identificada pelo grupo em estudo citado acima (SOARES et al., 2020). Infelizmente o grupo não possuía essa cumarina como padrão, mas os dados permitem, no momento, propô-la a banda 10.



Esquema 10. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS², característicos de nordentatina protonada.

Na análise da raiz, as bandas cromatográficas 2 e 3 com *m/z* 229 foram atribuídas à xantiletina e seselina, respectivamente, e como o grupo as possuía para serem usadas como padrão, ambas foram quantificadas e serão discutidas posteriormente. Infelizmente o grupo não possuía nenhuma das demais cumarinas desta análise para usar como como padrão, mas os dados obtidos permitiram, no momento, sugerir estruturas de cumarinas para as bandas de 1 a 10. Avaliando a

tabela 8 verifica-se que foram identificadas somente cumarinas (10) na análise das raízes dos enxertos de tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera em limão cravo com HLB. Entre estas, avaliando as bandas cromatográficas correspondente a elas em tecido madura e juvenil e diminuindo o valor da última da primeira, os valores foram positivos, indicando que todas estavam em maior quantidade nas raízes cuja parte superior possui tecidos maduros com HLB.

Assim, estamos comparando o efeito de tecidos maduros e juvenis sobre as raízes, as quais originaram-se de *C. limonia* madura. Ostol é a cumarina que se encontra em maior concentração nestas raízes, variação de 7,21. Ostol estar em maior quantidade nestas raízes mostra um efeito maior de tecidos maduros sobre a síntese ou acúmulo desta cumarina nas raízes, o que poderia ser devido a um mecanismo de defesa frente à bactéria do HLB, cujo desenvolvimento inicial ocorre neste órgão. Ou a diferença é devido a idades ontogenéticas diferentes, ou seja, a genética dos tecidos juvenis acima do enxerto ainda não permite ativar a biossíntese de cumarinas nas raízes do enxerto maduro, com isso elas são detectadas em menores quantidade. As cumarinas detectadas foram as mesmas em todas as raízes, logo, estes dados não permitem ainda entender porque a taxa de transmissão do patógeno (*Ca. Liberibacter asiaticus*) para plantas juvenis (seedlings, plantas originadas de sementes) foi significativamente menor do que a taxa de transmissão do patógeno para mudas de laranjas maduras. A resposta pode estar nas folhas onde ocorre a inoculação inicial.

4.2.1.2. Análise das raízes dos tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera com HLB em estaquia (sem enxerto)

Através do tratamento quimiométrico destas amostras foi possível identificar também 10 íons que apresentaram maior diferença estatística significativa no modo positivo de ionização, quando comparado as raízes infectadas de tecidos maduros com as juvenis de laranja Pera não enxertadas (Tabela 9). Nesta análise, também se verifica que todas as cumarinas mostradas na Tabela 9, avaliando as bandas cromatográficas correspondente a elas em tecido madura e juvenil e diminuindo o valor da última da primeira, os valores foram positivos, indicando que todas estavam em maior quantidade nos tecidos maduros com HLB.

Tabela 9 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras das raízes de estaquias no gráfico S-plot, íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.

Banda	[M+H] ⁺	Substância	Variação*
1	229,0155	Xantiletina	7,52
2	229,0371	Seselina	6,95
3	243,2635	Citrubutina	2,25
4	245,1225	Ostol	8,67
5	245,1643	Suberosina	2,72
6	259,0907	5-Metoxiseselina	5,59
7	259,1236	Xantoxiletina	4,12
8	263,2931	Decursinol	3,41
9	263,1584	Xantoarnol	3,15
10	263,2817	Diidrosuberenol	2,49

*Média da área do pico cromatográfico das réplicas do tecido maduro menos o juvenil.

Identificação das bandas 1, 2, 4, 6, 7, íons m/z 229,0155, 229,0371, 245,1225, 259,0907, 259,1236, respectivamente.

As bandas 1, 2, 4, 6 e 7 em seus espectros de MS² forneceram íons produtos com fragmentações que permitiram sugerir a presença das cumarians osthol, xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina e xantoxiletina, respectivamente, as quais também foram detectadas nas raízes dos tecidos juvenis e maduros de laranja Pera com HLB enxertadas (Tabela 9). Os dados aqui referem às raízes da laranja pera (*Citrus sinensis*), no item anterior as raízes eram oriundas do limão cravo (*C. limonia*), o porta enxerto.

Agora a comparação é entre tecidos maduros e juvenis de laranja Pera. Nas raízes da laranja Pera o ostol também é a cumarina que se encontra em maior concentração no tecido maduro comparado ao juvenil, variação de 8,67, porém aqui seguido pela xantiletina (7,52), seselina (6,95), 5-metoxiseselina (5,59) com variações próximas. Enquanto na análise no item anterior somente ostol mostrou variação relevante. Estas variações para quatro cumarinas poderiam ser devido a um mecanismo de defesa, contudo, o mais provável é seja devido às idades ontogenéticas diferentes, e novamente não explica a resistência do tecido juvenil ao fitopatógeno.

Identificação da banda 3, íon m/z 243,2635

A banda 3 sugere a presença de uma metoxicumarina (Figura 46), seu espectro de MS^2 fornece íons produtos por perda neutra de CH_2O do grupo metoxila a m/z 213, assim como perda neutra de CH_2O do grupo metoxila e de CO do anel da lactona levando ao m/z 185, conforme mostra o esquema 11. A perda neutra de CH_4 levando ao m/z 227 sugere a presença de uma prelina não oxigenada como substituinte.

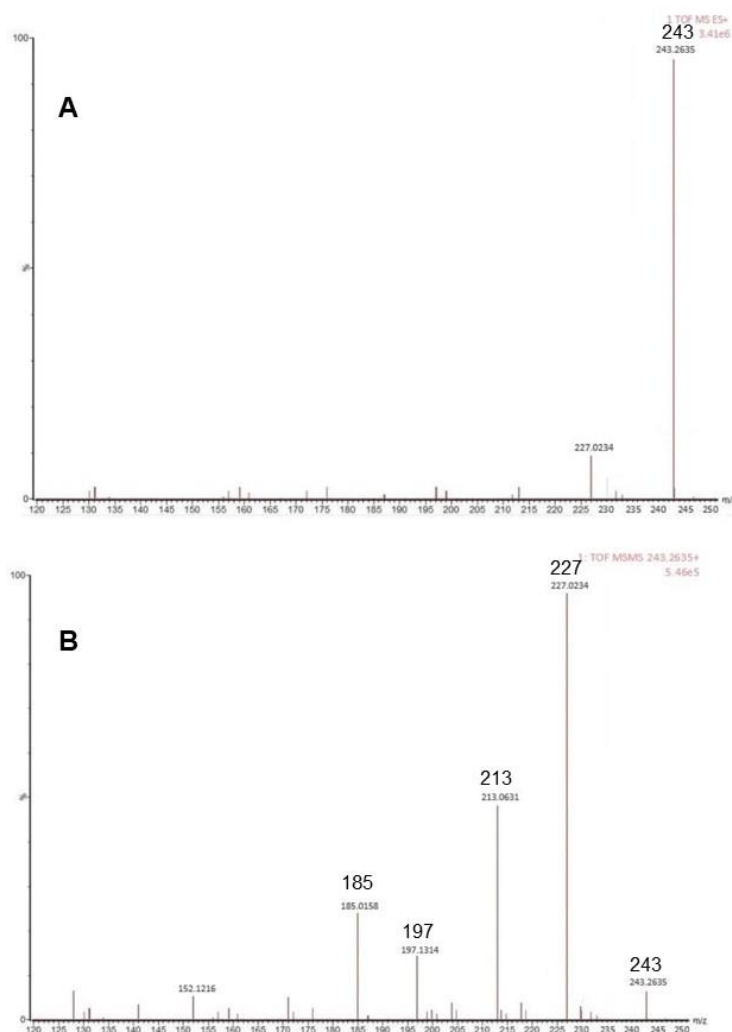
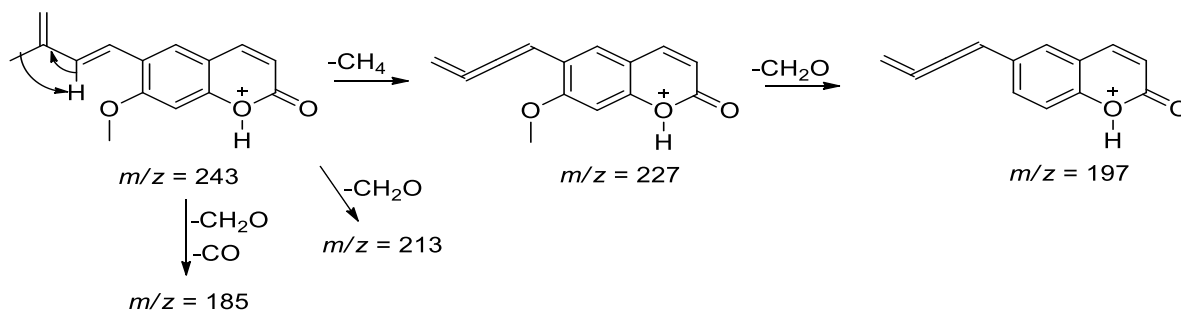


Figura 46 - Espectro de massas para o íon m/z 243,2635 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 243.

Estes dados permitiram sugerir a cumarina citrubuntina para a banda 3. Esta já foi citada anteriormente nas raízes de *C sinensis* pelo grupo (SOARES et al., 2020).



Esquema 11. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de citrubuntina protonada.

Identificação da banda 5, íon m/z 245,1643

A banda 5 sugere a presença de uma metoxicumarina no espectro de MS^2 (Figura 47).

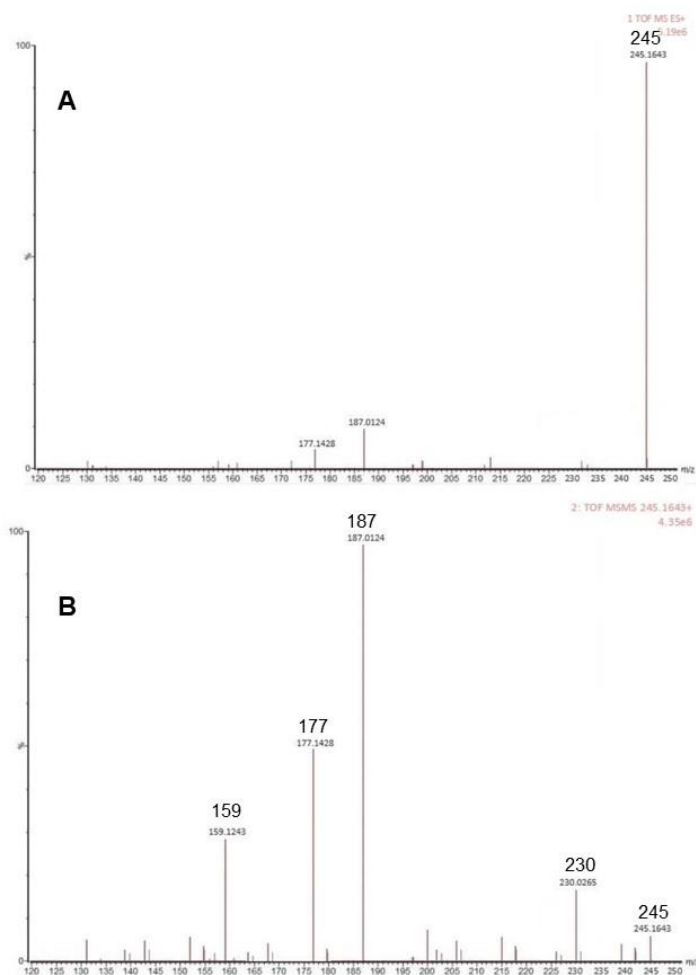
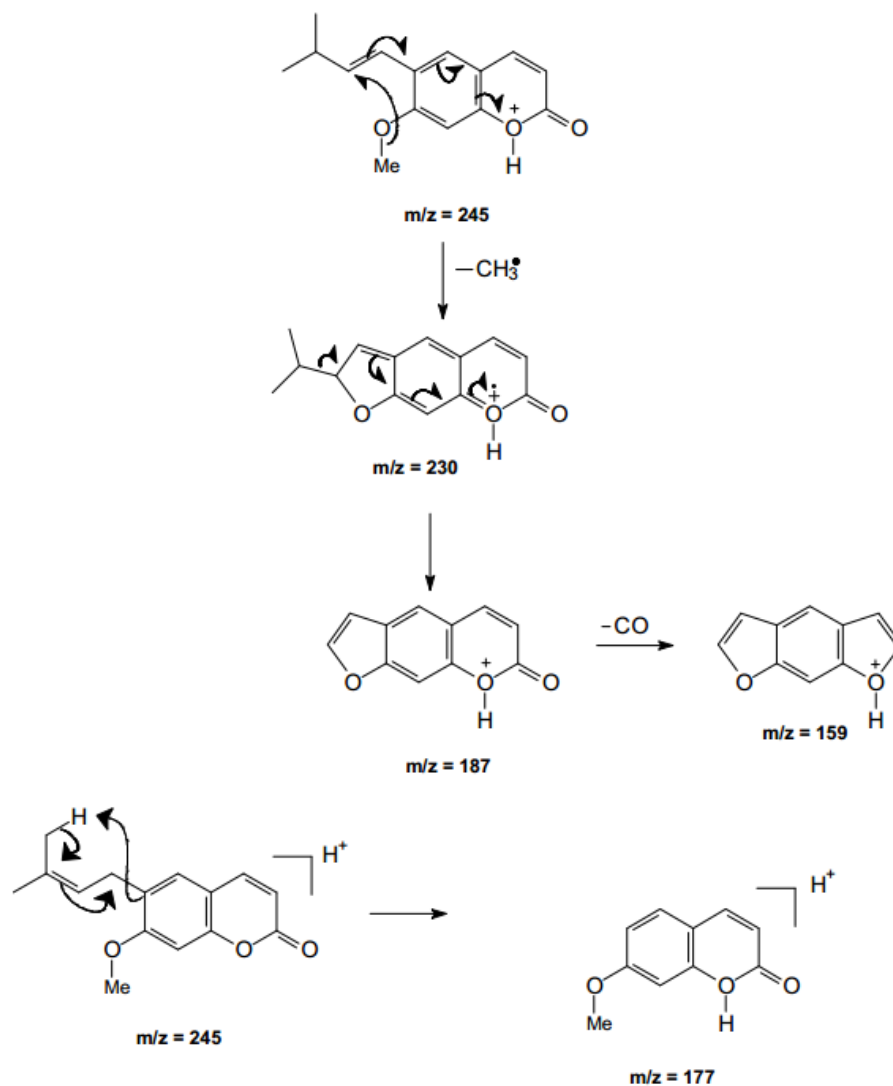


Figura 47 - Espectro de massas para o íon m/z 245,1643 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 245.

Este forneceu íon produto por clivagem homolítica com a perda de $\cdot\text{CH}_3$ levando à formação de anel diidrofurano com um valor par de m/z 230, parte deste ainda não detectado perde isopropila radicalar levando a estável furanocumarina linear como pico base a m/z 187, e parte deste ainda não detectado pela perda de CO leva ao m/z 159. O espectro de MS^2 ainda mostra um fragmento onde ocorreu a perda total da unidade prenila com m/z 177 (Esquema 12). Estes dados permitiram atribuir a cumarina suberosina para a banda 5, a qual foi detectada anteriormente em *C. sinensis* pelo grupo (SOARES et al., 2020).

A banda correspondente à suberosina mostra uma variação pequena (2,72), indicando a presença desta nas raízes maduras e nos tecidos juvenis em concentrações baixas, porém maior na primeira.



Esquema 12. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de suberosina protonada.

Identificação das bandas 8-10, íons m/z 263,2931, 263,1584, 263,2817, respectivamente.

As bandas de 8-10 em seus espectros de MS^2 (Figuras 48-50) forneceram íons produtos que sugerem cumarinas com grupos prenils oxidadas. O espectro MS^2 da banda 8 mostrou um íon a m/z 245 indicando perda de H_2O , parte deste ainda não detectado sofre perda de CO no anel lactona levando ao m/z 217. Perda neutra de C_4H_8O do íon molecular $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{15}O_5$) leva ao íon m/z 191 ($C_{10}H_7O_4$), pico base, e sugere a presença de um anel diidropirano diidroxilado. As fragmentações mostradas no esquema 13 indicam a cumarina decursinol para a banda 8, a qual foi detectada anteriormente em *C. sinensis* pelo grupo (SOARES et al., 2020).

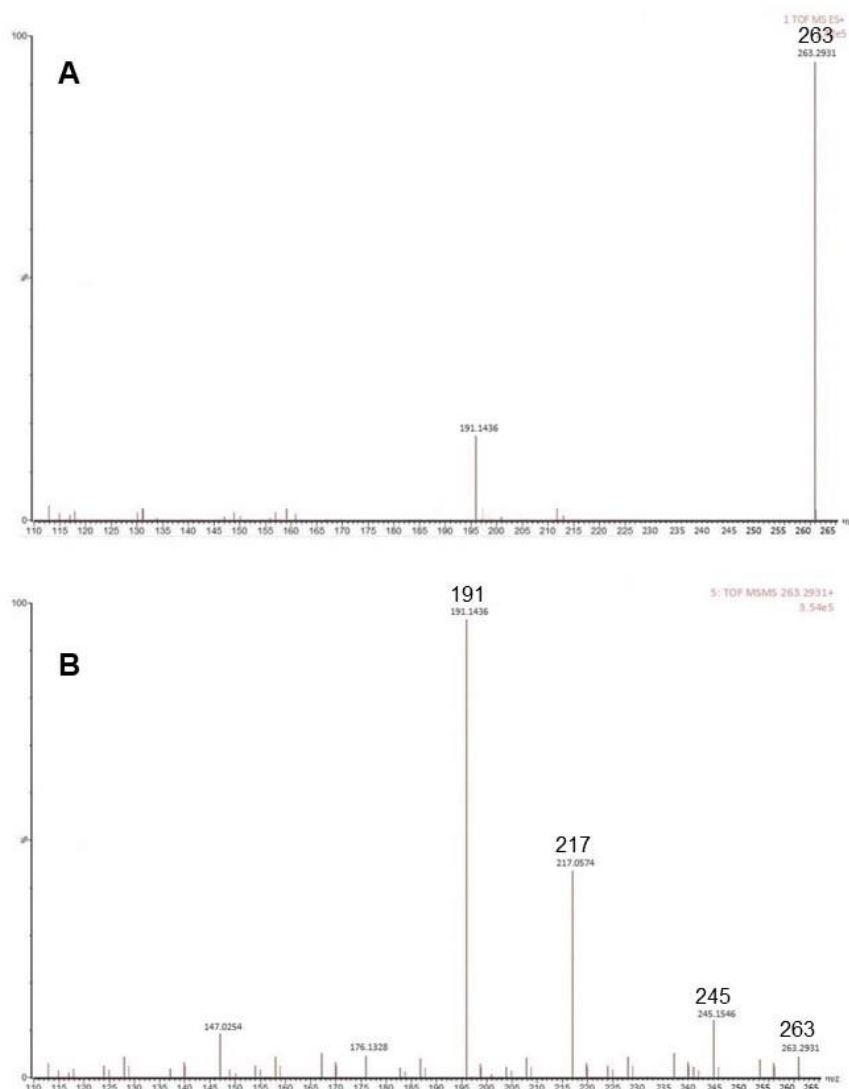
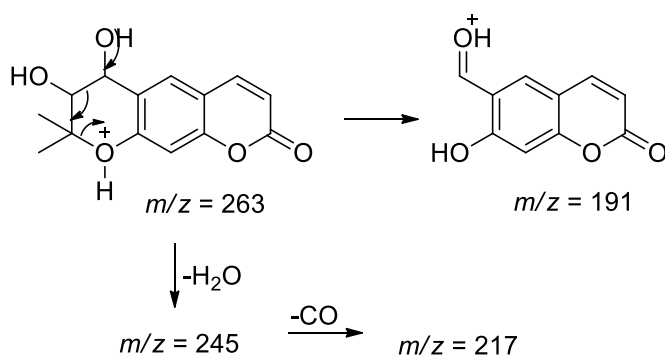
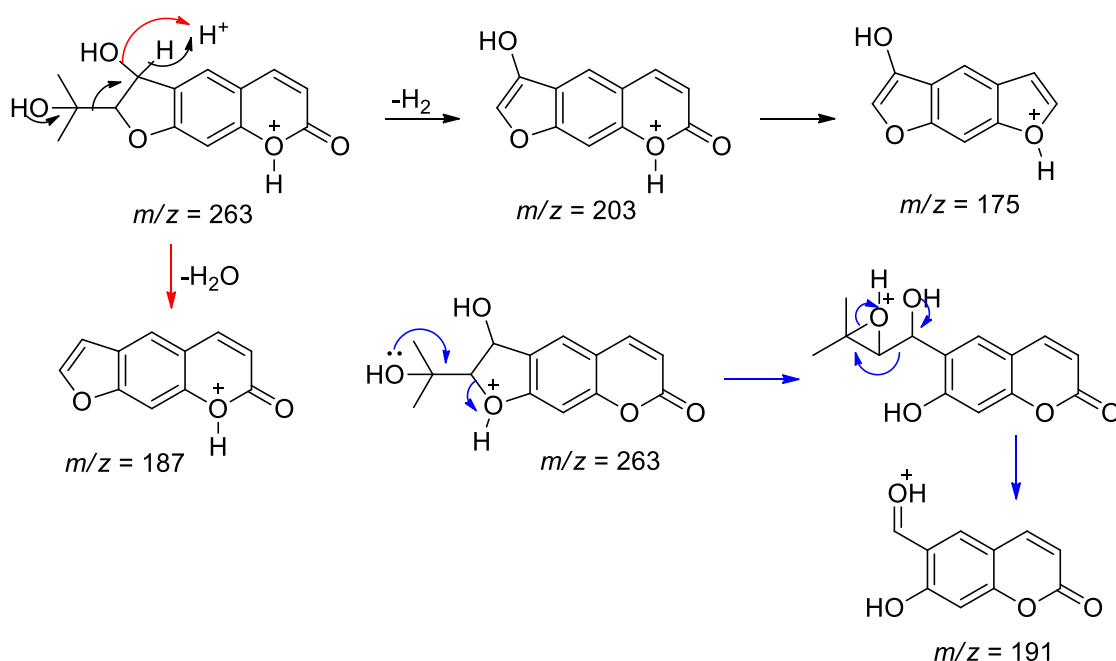


Figura 48 - Espectro de massas para o íon m/z 263,2931 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 263.



Esquema 13. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS², característicos de decursinol protonado.

O espectro MS² da banda 9 (Figura 49) também mostra perda neutra de C₄H₈O do íon molecular [M+H]⁺ (C₁₄H₁₅O₅), levando ao íon m/z 191 (C₁₀H₇O₄), pico base. O espectro MS² também mostra a perda de H₂O e C₃H₆O do íon molecular [M+H]⁺ (C₁₄H₁₅O₅) levando ao íon m/z 187, sugerindo para este íon uma furanocumarina linear protonada. As perdas acima sugerem um anel diidrofuranoidroxilado com um substituinte 2-hidroxiisopropila na molécula. A perda de C₃H₆O+H₂, leva ao íon m/z 203, correspondendo a um esqueleto de 3'-hidroxifuranocumarina linear protonada (Esquema 14). Estas fragmentações permitem indicar a cumarina xantoarnol para a banda 9. Esta cumarina foi detectada anteriormente nas raízes de *C. sinensis* pelo grupo (SOARES et al., 2020).



Esquema 14. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS², característicos de xantoarnol protonado.

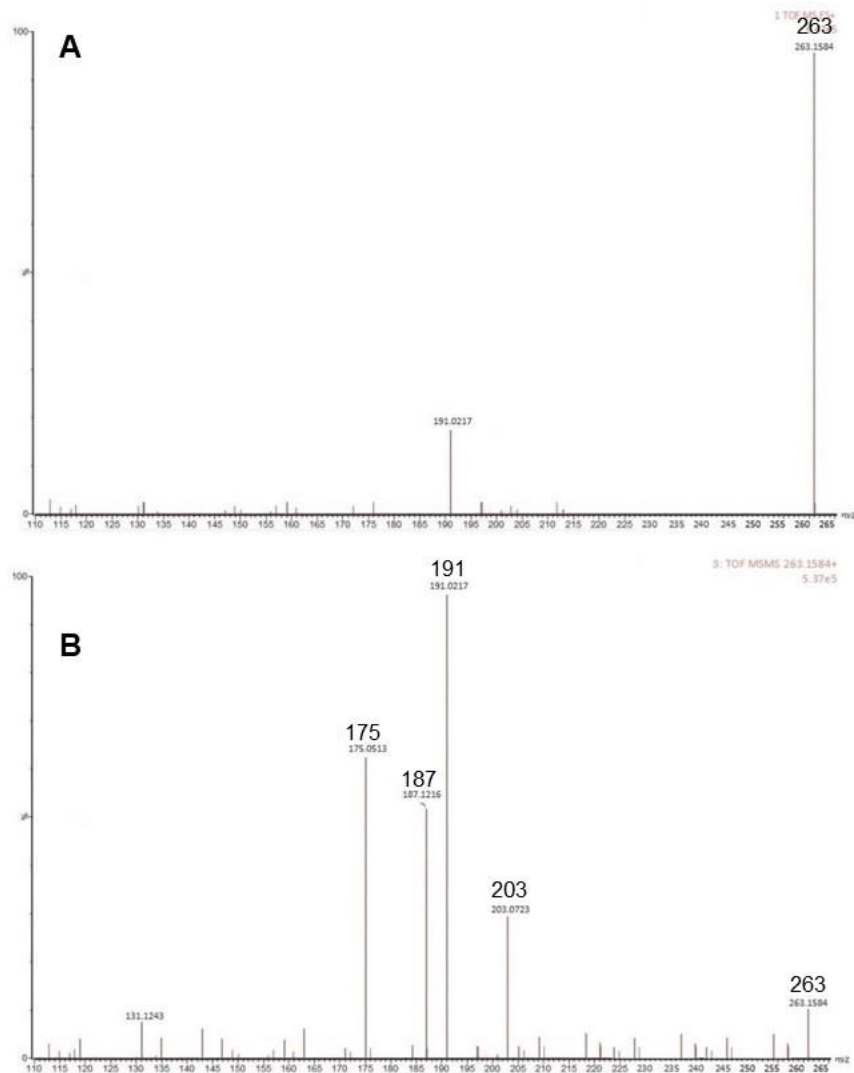


Figura 49 - Espectro de massas para o íon m/z 263,1584 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 263.

O espectro MS^2 da banda 10 (Figura 50) também mostra perda de $C_3H_6O+H_2$ do íon molecular $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{15}O_5$), levando ao íon m/z 203 ($C_{11}H_7O_4$), pico base; a perda de H_2O do íon $[M+H]^+$, e a perda de C_4H_8O também de $[M+H]^+$ ($C_{14}H_{15}O_5$), sugerem todos a presença de uma hidroxiprenila na molécula. Estas fragmentações (Esquema 15) permitem indicar a cumarina diidrosuberenol para a banda 10. Diidrosuberenol entre as demais cumarinas acima é a única que não foi detectada no estudo anterior, onde também foi usado laranja Pera obtidas de semente (juvenil), limão cravo tecidos maduros e o enxerto de pera juvenil em cravo maduro, porém, neste a bactéria avaliada foi *X. fastidiosa*. A banda referente a esta cumarina

possuía área pequena quando comparado às demais, a variação entre juvenil e madura foi 2,49; não sendo negativo significa que a área desta banda nas raízes juvenis era um pouco menor, justificando o grupo não a ter detectado. Ela também não seria um marcador de resistência, já que aparece em tecido juvenil e maduro.

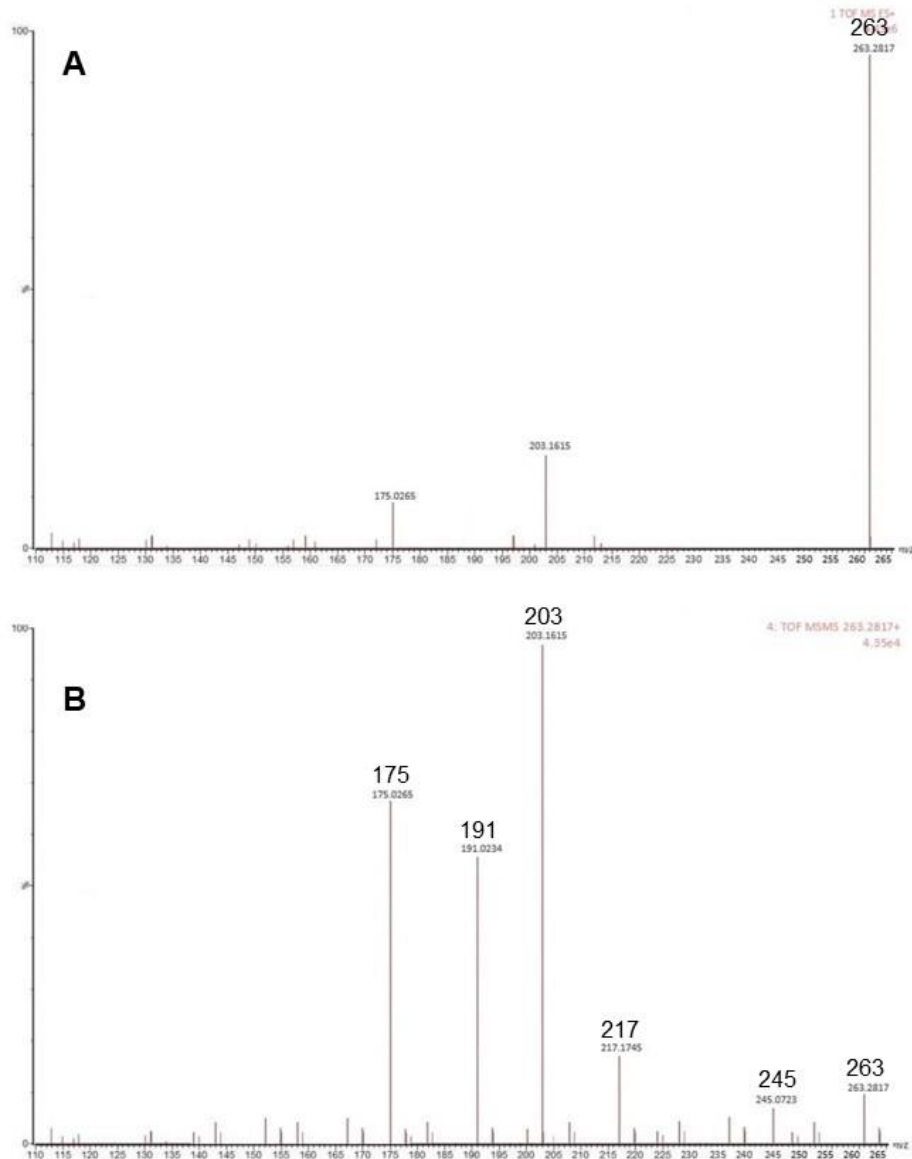
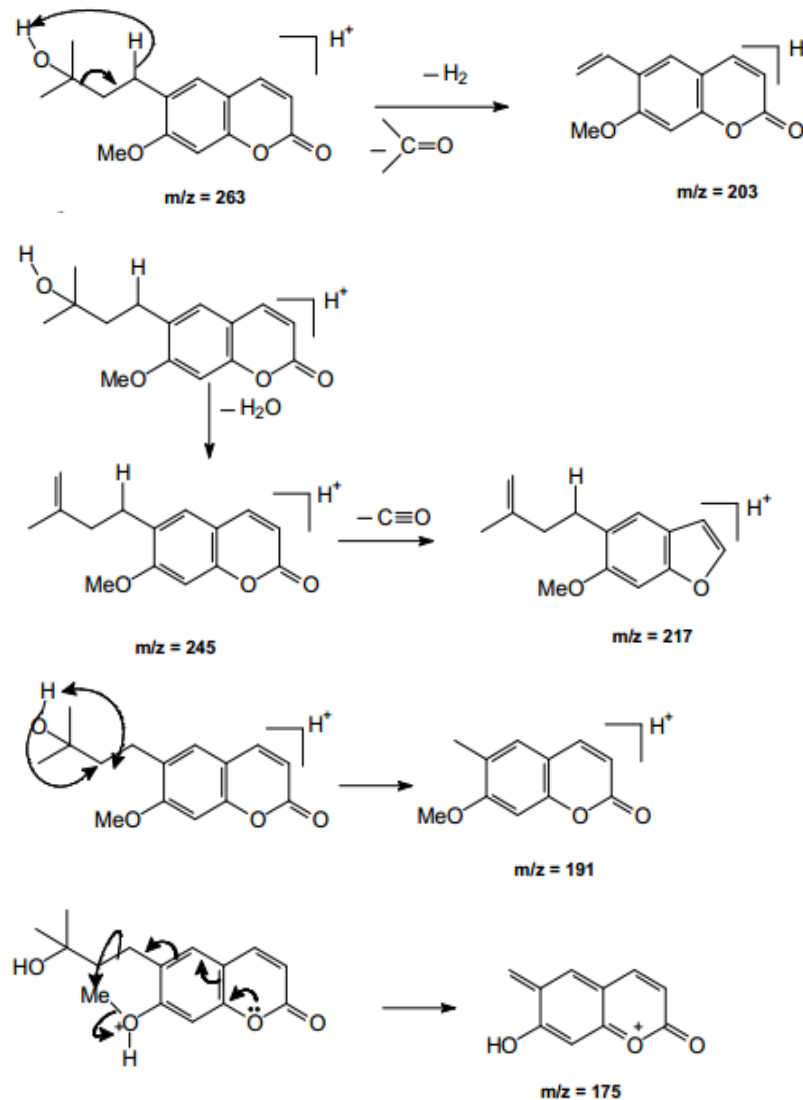


Figura 50 - Espectro de massas para o íon m/z 263,2817 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 263.



Esquema 15. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS², característicos de diidrosuberenol protonado.

4.2.1.3. Análise do caule inferior dos enxertos de tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera em limão cravo com HLB

As análises quimiométrico destas amostras permitiram identificar também 10 íons que apresentaram maior diferença estatística significativa no modo positivo de ionização, quando comparado os dados dos extratos oriundos dos caules inferiores de tecidos maduros com aqueles juvenis de laranja Pera enxertada e ambos infectados (Tabela 10). É importante lembrar que nestas análises estamos comparando o efeito de tecidos maduros e juvenis sobre os caules inferiores, os quais originaram-se de *C. limonia*, portanto são tecidos maduros.

Tabela 10 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras do cule inferior dos tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera enxertadas em limão cravo com HLB, no gráfico S-plot; íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.

Banda	[M+H] ⁺	Substância	Varição*
1	217,1721	Bergapteno	1,27
2	229,0164	Xantiletina	5,61
3	229,0380	Seselina	4,84
4	259,0916	5-Metoxiseselina	6,13
5	259,1245	Xantoxiletina	3,75
6	261,1125	Tamarina	2,21
7	381,0393	Clausarina	1,78
8	403,1281	Nobiletina	-1,93
9	373,0164	Tangeretina	-2,47
10	471,1636	Limonina	-0,71

*Média da área do pico cromatográfico das réplicas do tecido maduro menos o juvenil.

Identificação das bandas 2-6, íons m/z 229,0164, 229,0380, 259,0916, 259,1245, 261,1125, respectivamente.

As bandas 2-6 em seus espectros de MS² forneceram íons produtos com fragmentações que permitiram sugerir a presença das cumarinas xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina e xantoxiletina, respectivamente, as quais também foram detectadas nas raízes dos enxertos de tecidos juvenis e maduros de laranja Pera com HLB, ou seja, nas raízes oriundas de *C. limonia*. Estas também foram detectadas em tecidos juvenis e maduros de laranja Pera com HLB não enxertadas, ou seja, raízes de *C. sinensis* (Tabela 8 e 9). A banda 6 mostrou em seu espectro de MS² íons produtos indicando a presença da cumarina tamarina, também detectada nas raízes dos enxertos de tecidos juvenis e maduros de laranja Pera com HLB (Tabela 8).

Estas cumarinas apresentaram variação positiva; 5-metoxiseselina encontra-se em maior concentração no caule inferior com tecido maduro acima

comparado ao juvenil, variação de 6,13, seguida por xantiletina (5,61), seselin (4,84), xantoxiletina (3,75) e tamarina (2,21). Contudo, é importante lembrar que os dados aqui referem ao caule inferior do enxerto oriundo do limão cravo (*C. limonia*), o porta enxerto, material maduro. Ou seja, novamente avaliamos o efeito de tecidos juvenis e maduros de laranja Pera no perfil químico do porta enxerto. Nenhuma destas cumarinas foi detectada pelo grupo anteriormente nesta parte deste mesmo tipo de enxerto.

A única cumarina detectada anteriormente foi suberosina (SOARES et al., 2020), a qual foi detectada nas raízes das plantas obtidas em estaquia e em estudo na presente tese (Tabela 9). O trabalho anterior foi similar ao desenvolvido aqui, porém foi inoculado outra bactéria, *X. fastidiosa*. Em um trabalho realizado pelo grupo com este mesmo tipo de enxerto, onde foi feito o estudo fitoquímico isolando os compostos em cada parte do enxerto, xantiletina, seselin e tamarina foram isoladas do caule inferior do enxerto (Ribeiro et al., 2008).

Na literatura não há trabalhos sobre estudos de citros analisando as diferentes partes do enxerto, exceto os dois citados acima do próprio grupo. Logo, a presença de 5-metoxiseselina e xantoxiletina poderiam ser consideradas um mecanismo de defesa das plantas frente a *Ca. Liberibacter asiaticus*, já que não foram detectadas antes nestes órgãos. Como a bactéria inicia seu desenvolvimento nas partes inferiores da planta, poderíamos sugerir a influência dos tecidos juvenis e maduros na biossíntese destas cumarinas, ou acúmulo no caule inferior como uma defesa ao fitopatógeno. Mas não explicariam uma influência maior do tecido juvenil ao caule inferior, pois elas estão presente em ambos os caules inferiores, com laranjas Pera maduras e juvenis acima. Para se confirmar este comentário acima seria necessário ensaios *in vivo* com estas cumarinas, pois ainda não se consegue *Ca. Liberibacter asiaticus in vitro*.

Identificação da banda 1, íon m/z 217,1721.

A banda 1 em seu espectro de MS² (Figura 51) fornece íons produtos por clivagem homolítica com a perda de $\cdot\text{CH}_3$ levando a um valor par de m/z 202, seguido de perda neutra de CO levando aos íons com valor par de m/z 174, 146 e 118 (Esquema 16). O íon molecular m/z 217,1721 indica $[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4+\text{H}]^+$, correspondendo a quatro possíveis furanocumarinas, bergapteno, xantotoxina, isobergapteno e

esfondina. As duas últimas são furanocumarinas angulares não comuns em citrus. Xantotoxina é citada na literatura na casca dos frutos de *C. reticulata* (SALEEM et al., 2005). Comparação do espectro de MS² desta banda com aquele de bergapteno mostrou total equivalência.

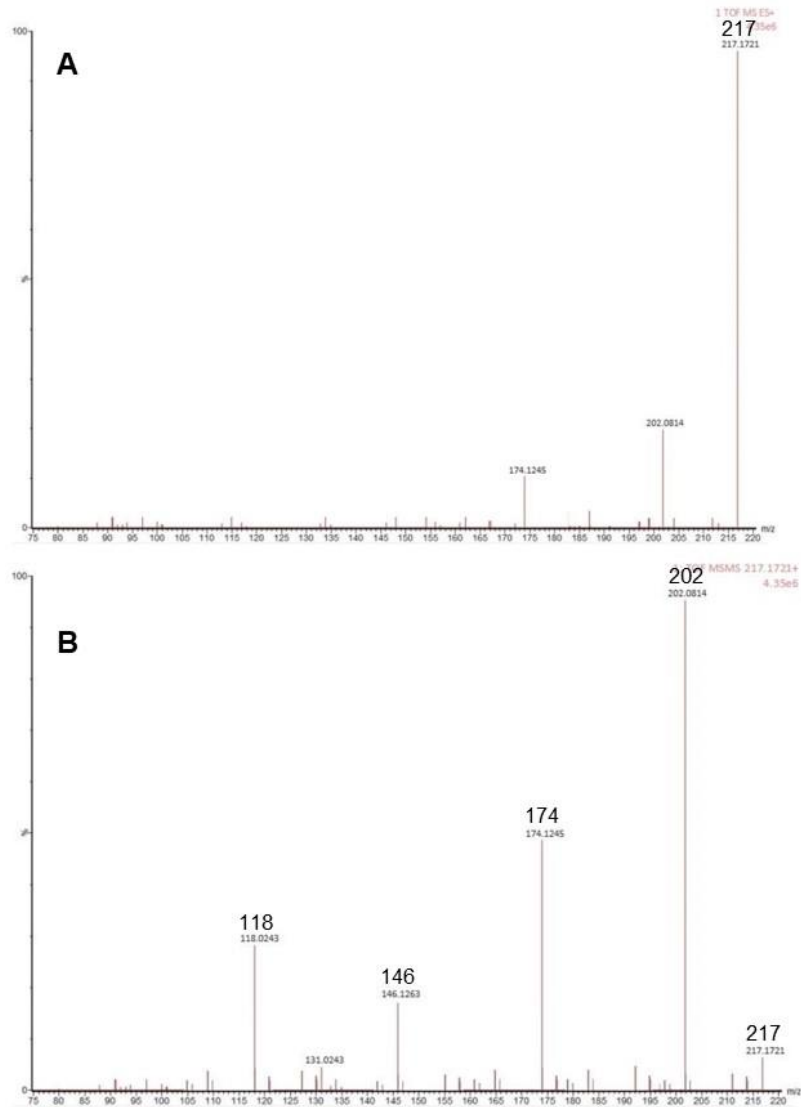
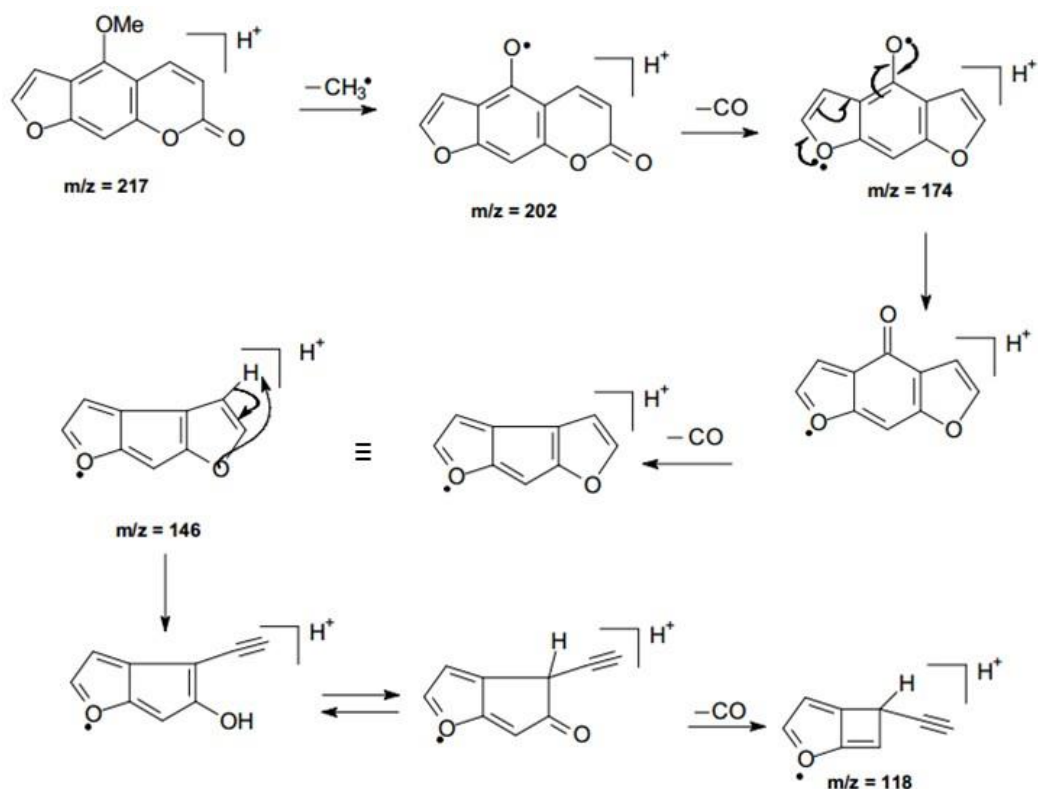


Figura 51 - Espectro de massas para o íon m/z 217,1721 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 217.



Esquema 16. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de bergapteno protonado.

O nosso grupo trabalhando com um enxerto similar detectou e posteriormente isolou das folhas bergapteno; o isolamento foi usando cromatografia acoplada à ressonância magnética nuclear. Bergapteno foi detectada apenas nas folhas do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintomas de Clorose Variegada dos Citros (CVC), sugerindo que ela poderia ser uma fitoalexina, pois ela estava ausente em tecidos saudáveis do enxerto. Bergapteno também foi detectada nas folhas de *C. limonia* de mudas maduras. Assim, não é de se estranhar que bergapteno pudesse ser uma fitoalexina, sintetizada em resposta a *X. fastidiosa* (SOARES et al., 2020).

No presente estudo o bergapteno foi detectado nos extratos oriundos dos caules inferiores, os quais acima tinham tecidos maduros ou juvenis de laranja Pera enxertada, e ambos infectados. Este estava em uma concentração próxima em ambos, mas um pouco maior naquele com tecidos maduros acima, cuja variação na área da banda cromatográfica foi de 1,27 (Tabela 10). Esta cumarina não foi detectada nos controles, plantas saudáveis, sugerindo bergapteno ser também uma fitoalexina sintetizada em resposta à bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus*. O caule inferior (*C.*

limonia) possui os genes necessários para biossintetizar bergapteno, pois esta ocorre nas folhas de *C. limonia*.

Identificação da banda 7, íon m/z 381,0393.

O espectro MS^2 da banda 7 (Figura 52) mostra íons produtos de fragmentação resultantes da clivagem de uma das ligações C – C adjacentes à ligação benzílica, sugerindo cumarinas preniladas. O íon m/z 381,0393 $[M+H]^+$ ($C_{24}H_{28}O_4 + H^+$) sugere uma cumarina (C_9+3O) e mais três unidades prenilas ($3 \times C_5$) e mais uma hidroxila. Considerando uma piranocumarina linear com uma hidroxila em C-5, sobriariam C-8, C-3 ou C-4 para serem prenilados. A literatura indica três cumarinas com a massa molecular 380, contudo o espectro MS^2 da banda mostrou fragmentos coerentes com a clausarina, isolada anteriormente pelo nosso grupo nas raízes desse mesmo enxerto (SOARES et al., 2020).

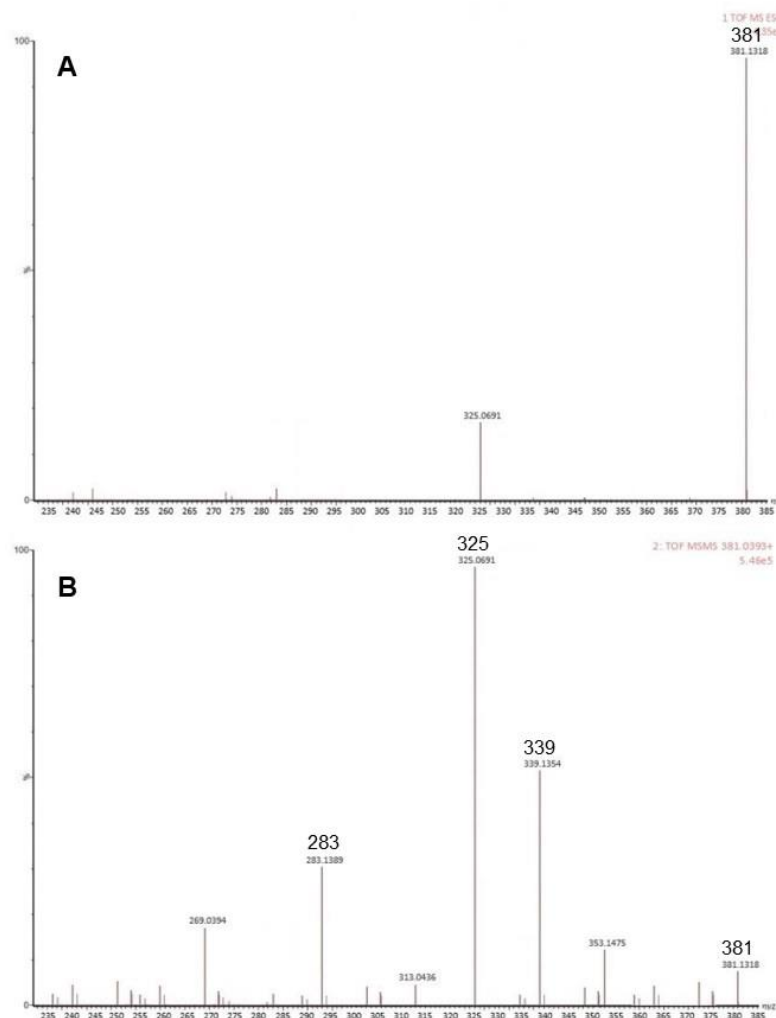
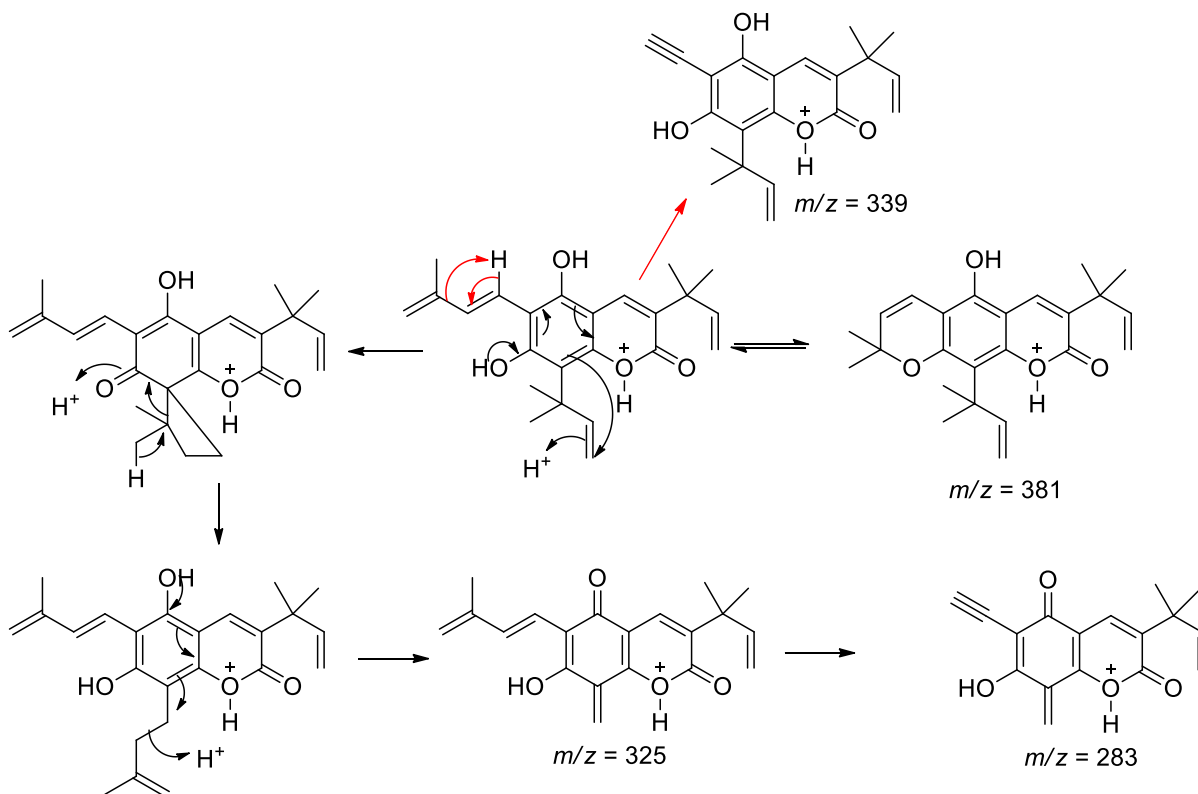


Figura 52 - Espectro de massas para o íon m/z 381,0393 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 381.

A perda de C_4H_8O de $[M+H]^+$ (Esquema 17) sugere um rearranjo da unidade 1,1-dimetilalil em C-8 para posteriormente permitir a saída da unidade C_4H_8O , como mostrado anteriormente para nordentatina (Esquema 10). A perda de C_3H_6 levando ao íon m/z 339, sugere ocorrer via a abertura do anel pirano e posterior perda desta unidade.

Clausarina estava em uma concentração próxima em ambos, mas um pouco maior nos caules inferiores com tecidos juvenis acima, cuja variação na área da banda cromatográfica foi de - 1,93 (Tabela 10). Isto sugere uma influência da planta juvenil ao porta enxerto, levando a uma maior biossíntese desta cumarina ou o seu acúmulo mais nos enxertos com plantas juvenis.



Esquema 17. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de clausarina protonado.

Identificação da banda 8, íon m/z 403,1281

O espectro MS^2 da banda 8 (Figura 53) mostra íons produtos característicos de flavonoides polimetoxilado. O íon m/z 403,1281 $[M+H]^+$ ($C_{21}H_{22}O_8 + H^+$) sugere um flavonoide com seis metoxilas ($C_{15}O_2 + 6 OCH_3$), a perda neutra de CH_2O levando ao íon m/z 373 (Esquema 18) reforça a proposta. Em geral o íon

produto mais comum em flavonoides refere-se à clivagem retro-Diels-Alder (RDA) do anel C, os quais dão uma boa indicação sobre os padrões de substituição dos anéis A e B. Considerando que os dois íons fragmentos a m/z 211 ($C_{10}H_{10}O_5 + H^+$) e 163 ($C_{10}H_{10}O_2 + H^+$) tenha se originado de moléculas do íon m/z 373 ($C_{20}H_{20}O_7 + H^+$) ainda não detectado, pode-se concluir que o anel A do flavonoide contém quatro metoxilas e o B duas.

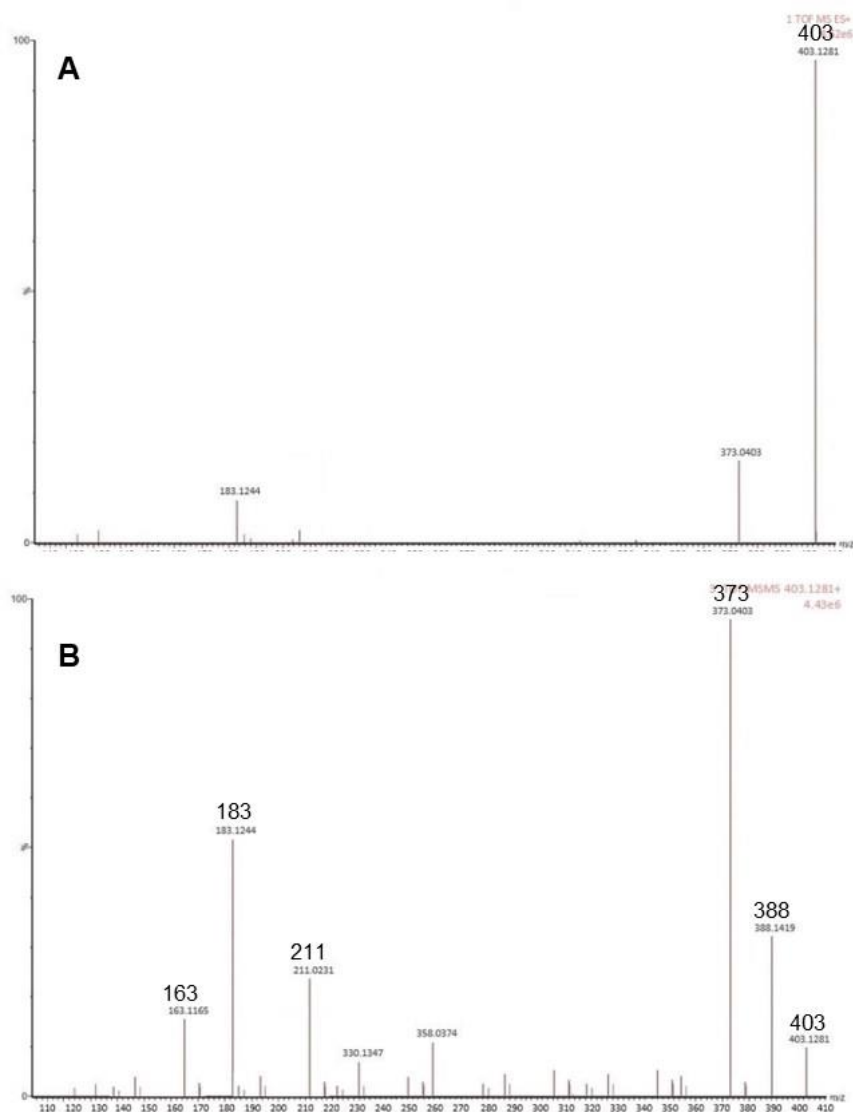
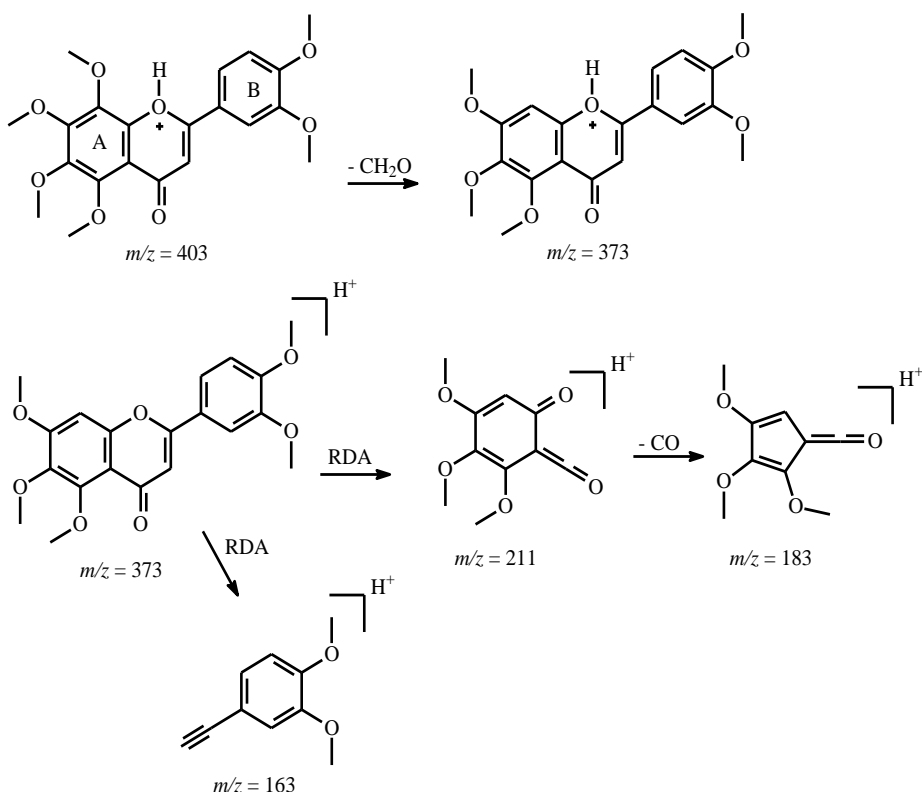


Figura 53 - Espectro de massas para o íon m/z 403,1281 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 403.

Estes dados sugerem para a banda 8 o flavonoide nobiletina, e seu espectro MS^2 mostrou fragmentos coerentes com este flavonoide, o qual foi detectado pelo grupo anteriormente no caule inferior, superior e folhas deste tipo de enxerto

(SOARES et al., 2020). Nobiletina estava em uma concentração próxima em ambos, mas um pouco maior nos caules inferiores com tecidos juvenis acima, cuja variação na área da banda cromatográfica foi de - 1,93 (Tabela 10). Isto sugere uma influência da planta juvenil ao porta enxerto, levando a uma maior biossíntese deste flavonoide ou o seu acúmulo mais nos enxertos com plantas juvenis.



Esquema 18. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de nobiletina protonado.

Identificação da banda 9, íon m/z 373,0164

O íon m/z 373,0164 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7 + \text{H}^+$) da banda 9 no espectro MS^2 (Figura 54) mostra íons produtos similares aos da banda 8, perda neutra de CH_2O levando ao íon m/z 343 (Esquema 19). O fragmento da RDA referente ao anel C não foi detectado, contudo o fragmento formado por uma RDA no anel B, levando ao íon m/z 291 confirma o anel A totalmente metoxilado, sobrando uma metoxila, a qual só pode estar em C-4' do anel B. Estes íons indicam o flavonoide tangeretina para a banda 9, a qual foi detectada pelo grupo anteriormente nas folhas deste tipo de

enxerto, e nas folhas da laranja pera juvenil e do limão cravo maduro (SOARES et al., 2020).

Tangeretina estava em uma concentração um pouco maior nos caules inferiores com tecidos juvenis acima, cuja variação na área da banda cromatográfica foi de - 2,47 (Tabela 10). Isto sugere uma influência da planta juvenil ao porta enxerto, levando a uma maior biossíntese deste flavonoide ou o seu acúmulo mais nos enxertos com plantas juvenis.

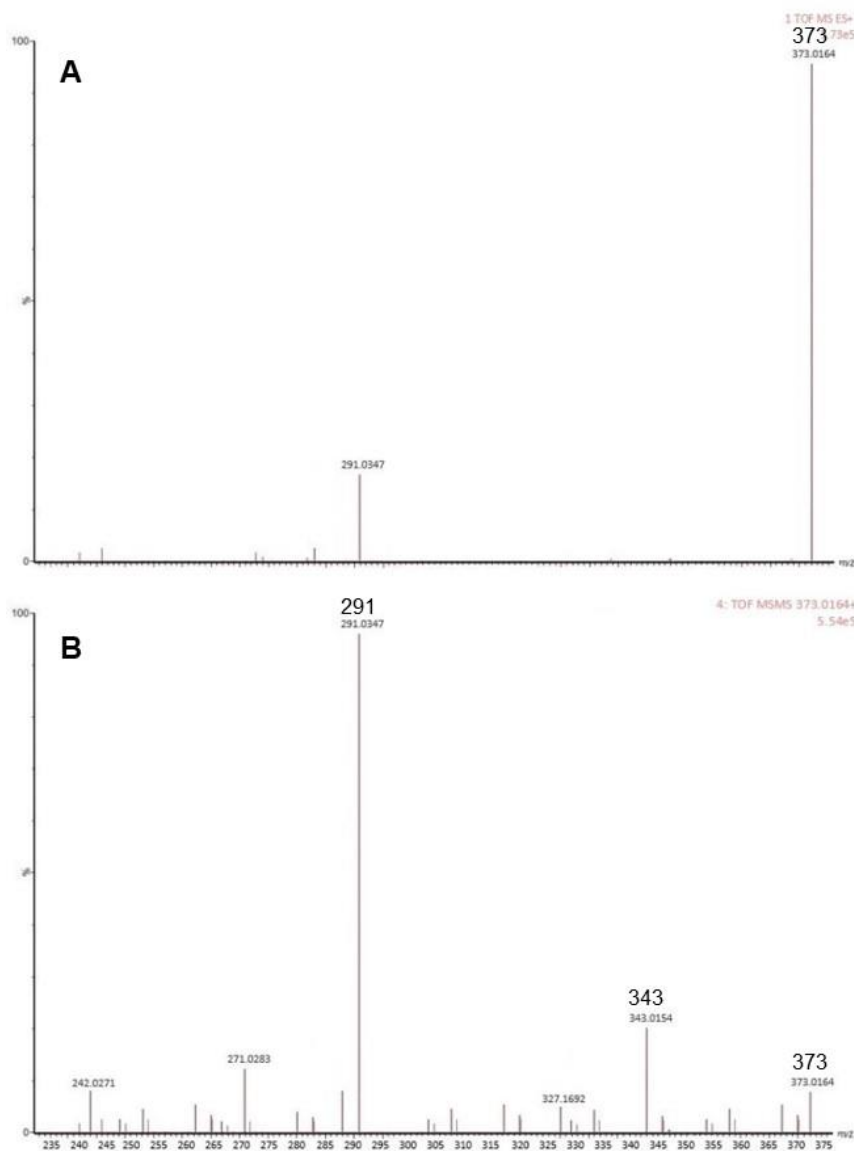
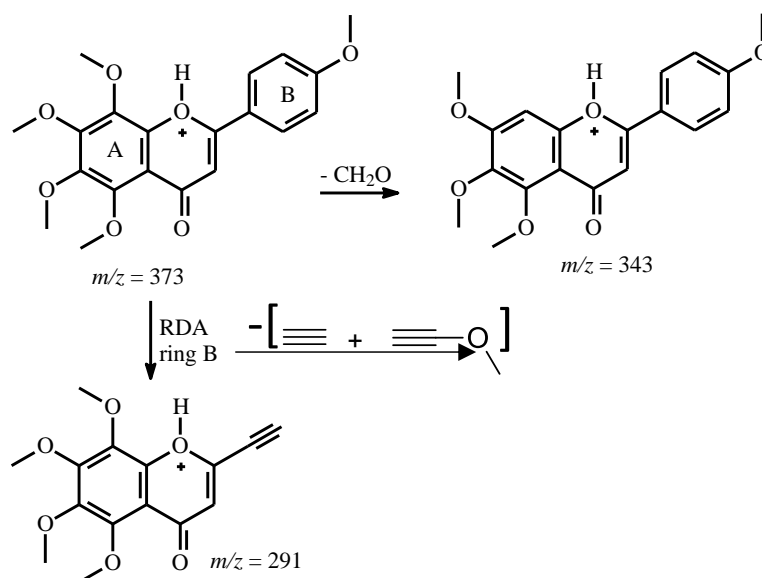


Figura 54 - Espectro de massas para o íon m/z 373,0164 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 373.



Esquema 19. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de tangeretina protonado.

Identificação da banda 10, íon m/z 471,1636

O íon m/z 471,1636 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_8 + \text{H}^+$) da banda 10 no espectro MS^2 (Figura 55) mostra íons típicos de limonoides. Estes em geral mostraram um pico característico em m/z 189 derivado da clivagem comum do anel C, seguido por rearranjos e a perda subsequente de H_2O , o qual confirma a presença de um sistema epoxilactona e um anel de furano intacto (Esquema 20).

Outra clivagem comum nos limonoides ocorre no anel C tipo RDA, restando nos íons fragmentos os substituintes do anel A e B, como o íon a m/z 203, e deste não detectado a perda de CO leva ao m/z 175. A presença da epoxilactona, anel furano e a estrutura do íon m/z 175 sugere a presença da limonina, a qual foi detectada pelo grupo em estudos anteriores somente nas raízes de *C. sinensis* (SOARES et al., 2020). Limonina estava em uma concentração próxima em ambos, mas um pouco maior nos caules inferiores com tecidos juvenis acima, cuja variação na área da banda cromatográfica foi de $-0,71$ (Tabela 10).

A biossíntese de limonina e de flavonoides parece ser mais efetiva nos caules inferiores com tecidos juvenis acima, pois entre todos os metabólitos detectados e discutidos anteriormente, somente estes apareceram em maior quantidade nos caules inferiores com tecidos juvenis. Poderia ser um efeito maior dos tecidos juvenis sobre o porta enxerto.

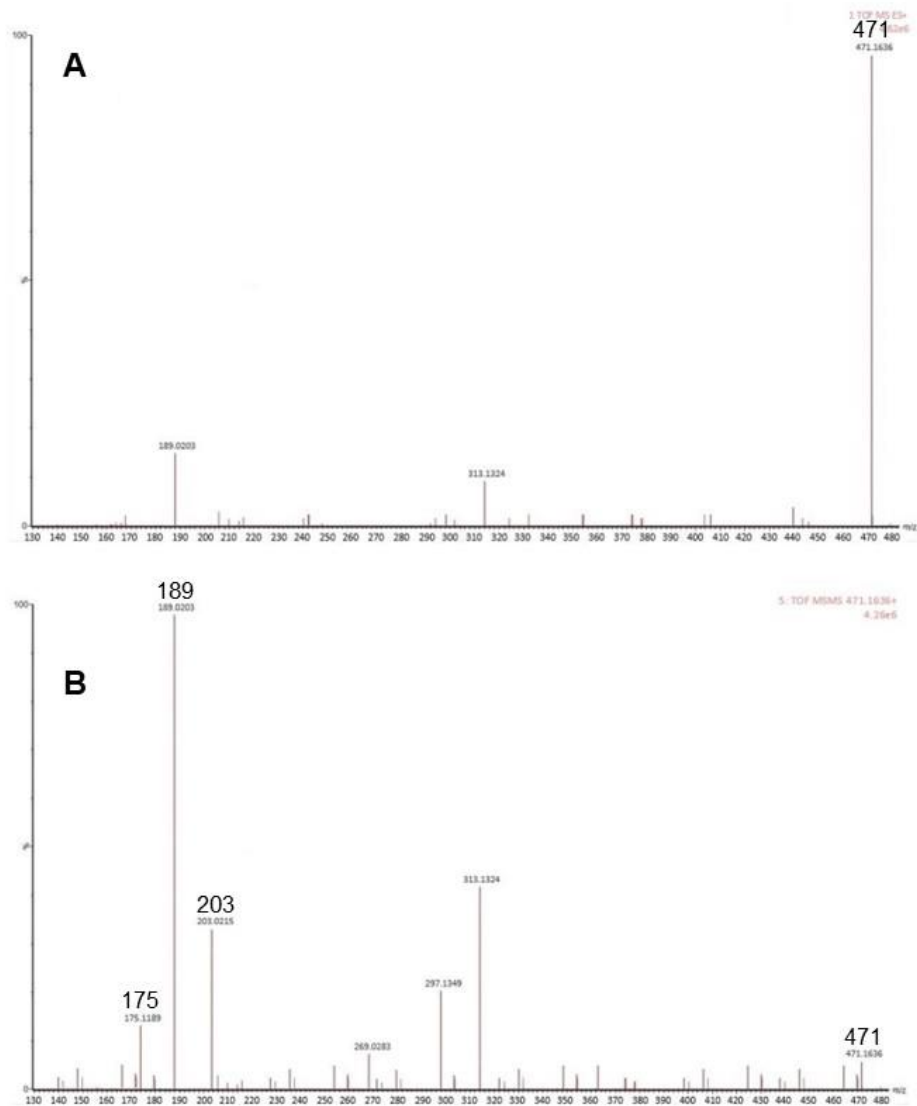
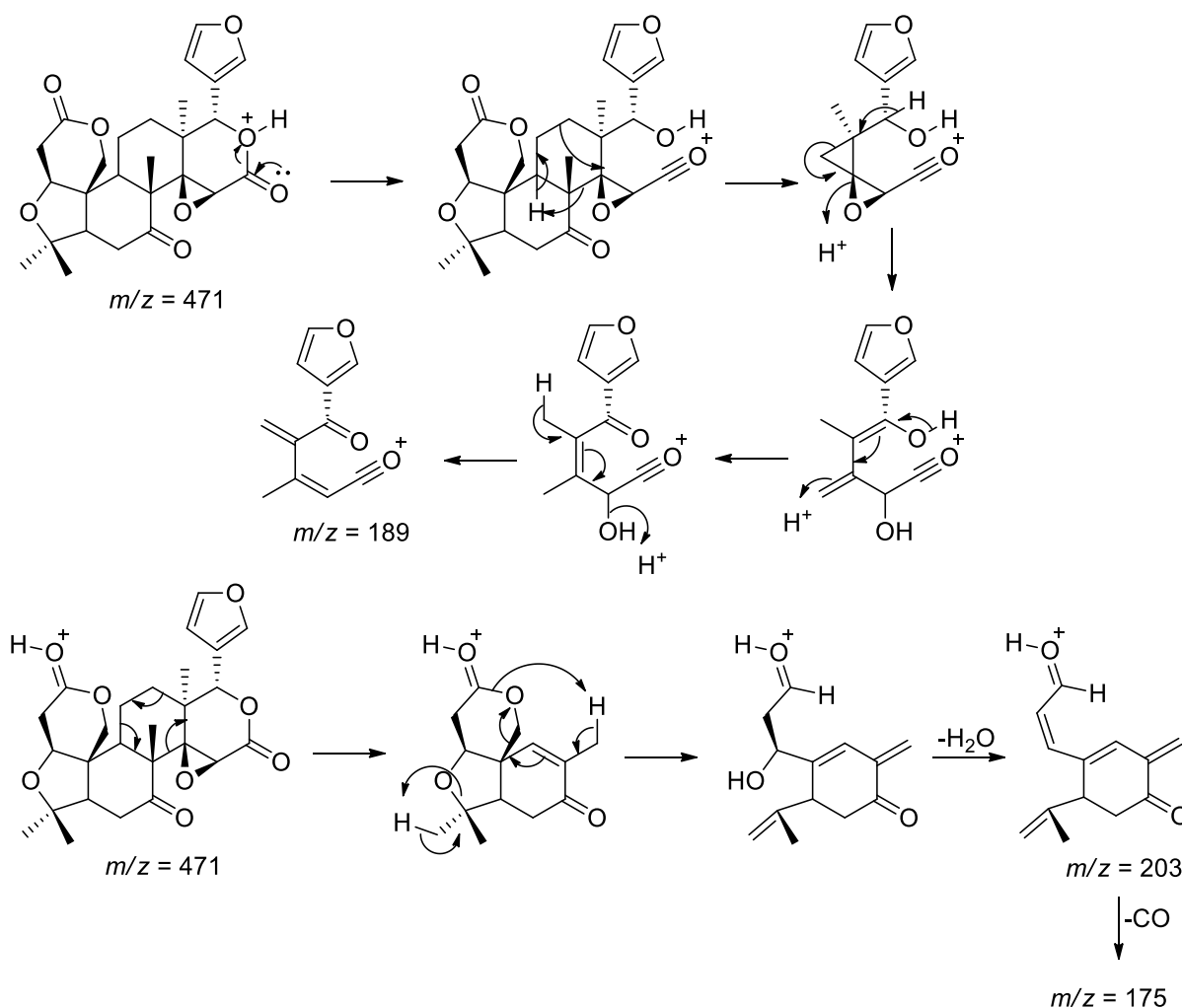


Figura 55 - Espectro de massas para o íon m/z 471,1636 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 471.

Concluindo este tópico, é importante lembrar que o caule inferior se refere ao porta enxerto, logo só nos estudos dos enxertos definimos os ramos acima do enxerto como caules superiores. Nos estudos das plantas por estaquias temos somente o caule principal e ramos (ver figura 35). Assim, a seguir iremos discutir os resultados dos estudos dos caules superiores do enxerto, caules e folhas das plantas de estaquia.



Esquema 20. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS^2 , característicos de limonina protonado.

4.2.1.4. Análise dos caules superiores dos enxertos de tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera em limão cravo, caules e folhas de laranja Pera juvenis e maduras em estaquia, e todos com HLB

A análise destas amostras foram melhores no modo negativo de ionização, o que era esperado, pois estes órgãos são caracterizados por flavonoides glicosilados. Assim, através do tratamento quimiométrico destas amostras foi possível identificar os 6 íons que apresentaram maior diferença estatística significativa no modo negativo de ionização, quando comparado os enxertos infectados com tecidos acima maduros versus os juvenis de laranja Pera em limão cravo, e entre as plantas em estaquia maduras versus as juvenis (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras do caule superior e folhas dos tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera enxertadas em limão cravo com HLB, no gráfico S-plot; íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.

Banda	[M+H] ⁻	Substância	Variação*	
			Caule Superior	Folhas
1	245,0309	7-Demetilisotamarina	2,55	4,41
2	593,1206	Vicenina-2	-3,09	-7,62
3	593,1181	Didimina	-4,13	-6,05
4	632,0178	6,8-di-c-glu-Diosmetina	-6,26	-4,70
5	607,1055	Diosmina	-5,18	-5,21
6	609,0109	Hesperidina	-2,71	-3,97

*Média da área do pico cromatográfico das réplicas do tecido maduro menos o juvenil.

Tabela 12 - Bandas cromatográficas responsáveis pela separação das amostras do caule e folhas dos tecidos juvenis versus maduros de laranja Pera em estaquia com HLB, no gráfico S-plot; íons selecionados, suas identificações, e a variação na área dos picos.

Banda	[M+H] ⁻	Substância	Variação*	
			Caule	Folhas
1	245,0309	7-Demetilisotamarina	3,15	5,42
2	593,1206	Vicenina-2	-6,71	-5,86
3	593,1181	Didimina	-3,26	-6,02
4	632,0178	6,8-di-c-glu-Diosmetina	-5,30	-8,19
5	607,1055	Diosmina	-4,69	-7,23
6	609,0109	Hesperidina	-2,57	-4,71

*Média da área do pico cromatográfico das réplicas do tecido maduro menos o juvenil.

Identificação da banda 1, íon m/z 245,0309

O íon m/z 245,0309 [M-H]⁻ (C₁₄H₁₄O₄ - H⁺) da banda 1 no espectro MS² (Figura 56) mostra íons típicos de cumarinas preniladas. Esta fórmula molecular sugere as cumarinas 7-hidróxi-5-prenilóxicumarina, 7-hidroxi-8-(3-oxobutil)cumarina

(hassanona) ou 7-demetilisotamarinae. A perda de H₂O do íon molecular levando ao *m/z* 227 indicou a presença de uma hidroxila na unidade prenila. A perda neutra de CH₂=C=CH₂ deste último levando ao íon *m/z* 187, assim como a perda de CH₄ também deste último confirma a unidade prenila hidroxilada. Outros fragmentos podem ser visto no esquema 21, sugerindo a 7-demetilisotamarina para a banda 1, a qual foi detectada nos caules de *C. sinensis* pelo grupo (CERQUEIRA, 2016).

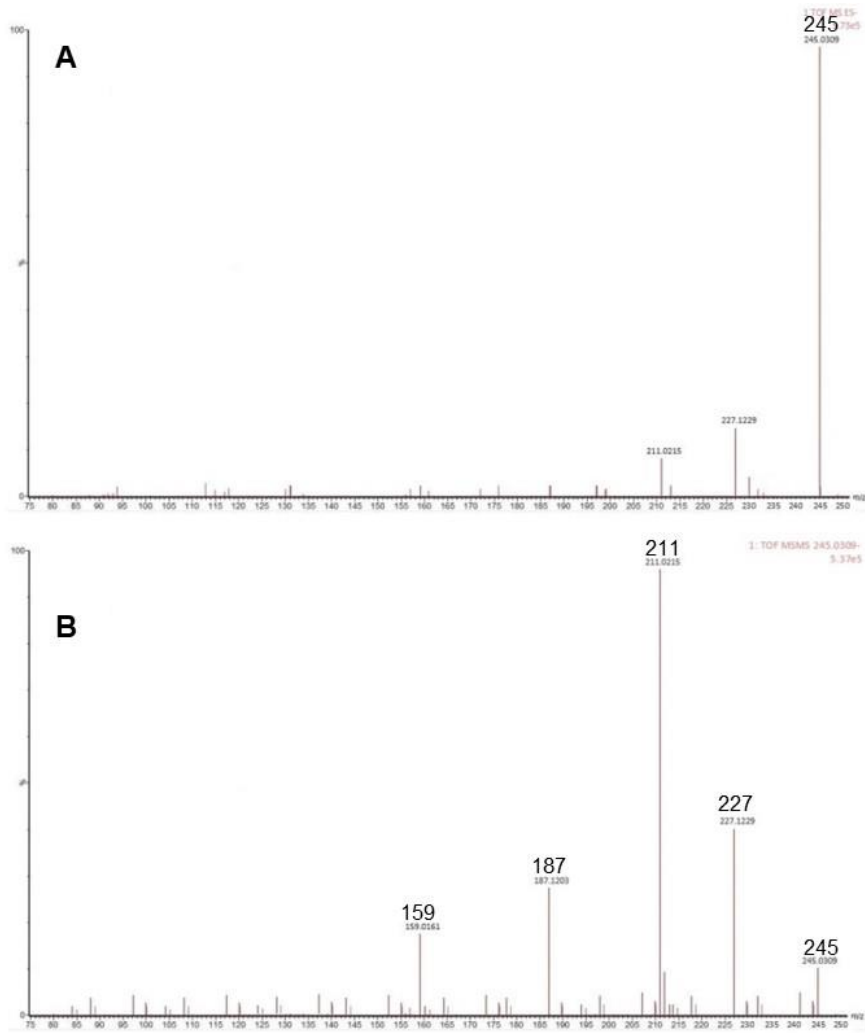
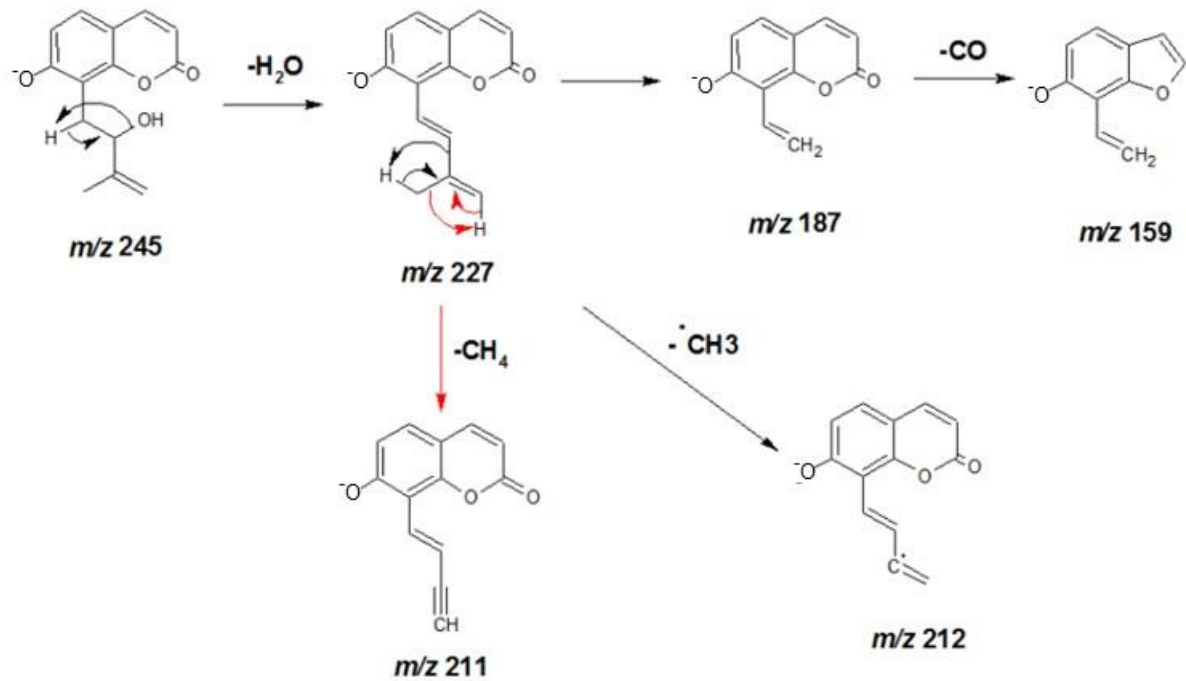


Figura 56 - Espectro de massas para o íon *m/z* 245,0309 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de *m/z* 245.



Esquema 21. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS², característicos de 7-demetilisotamarina desprotonado.

Esta cumarina foi detectada no caule superior e folhas do enxerto e com maior concentração naqueles com *C. sinensis* madura acima, quando comparado a juvenil acima, pois esta mostra variação positiva em ambos os órgãos, 2,55 e 4,41, respectivamente. Como a parte superior do enxerto é *C. sinensis* era de se esperar 7-demetilisotamarina também presente nos caules e folhas das estaquias. Esta está presente em maior quantidade em laranja Pera madura, com variações 3,15 para o caule e 5,42 para as folhas. Estas variações positivas sugerem que 7-demetilisotamarina não seria um marcador de resitencia dos tecidos juvenis.

Identificação das bandas 2 e 3, íons m/z 593,1206 e 593,1181

Os nossos estudos com este tipo de enxerto mostram que os caules superiores e folhas possuem vários flavonoides C- e O-glicosilados, os quais apresentam diferentes mecanismos de fragmentação, característico para cada um deles. Os flavonoides O-glicosilados, nas análises de espectrometria de massas, geram íons característicos que são formados por reações de rearranjo nas ligações interglicosídicas. Nos espectros de MS/MS é comum observar a perda das unidades de açúcar, junto à ligação C-O lábil.

Muitas vezes, dependendo da energia utilizada na fonte de ionização, é possível encontrar essas perdas de açúcar mesmo nos experimentos de primeira ordem. As posições glicosiladas em flavonoides mais comuns são em C-3 e C-7. Um estudo sistemático sobre a dissociação induzida por colisão (CID) de flavonoides mono-*O*-glicosilados revelou que estes sofrem, no modo negativo de ionização, não só a clivagem heterolítica convencional, mas também a homolítica, obtendo-se o fragmento do íon aglicona $[M-H]^-$ e o íon radical aglicona $[M-H]^\cdot$, respectivamente (LU et al., 2010). Comparado com flavonoides 7-*O*-glicosilados, os 3-*O*-glicosilados foram relatados a produzirem fragmentos de clivagem homolítica em maiores quantidades (Figura 57). A abundância relativa de íons derivados de clivagem homolítica e íons provenientes das heterolíticas têm sido utilizados como critério para determinar a posição da unidade de açúcar em flavonoides glicosilados (ABLAJAN et al., 2006; CUYCKENS & CLAEYS, 2005).

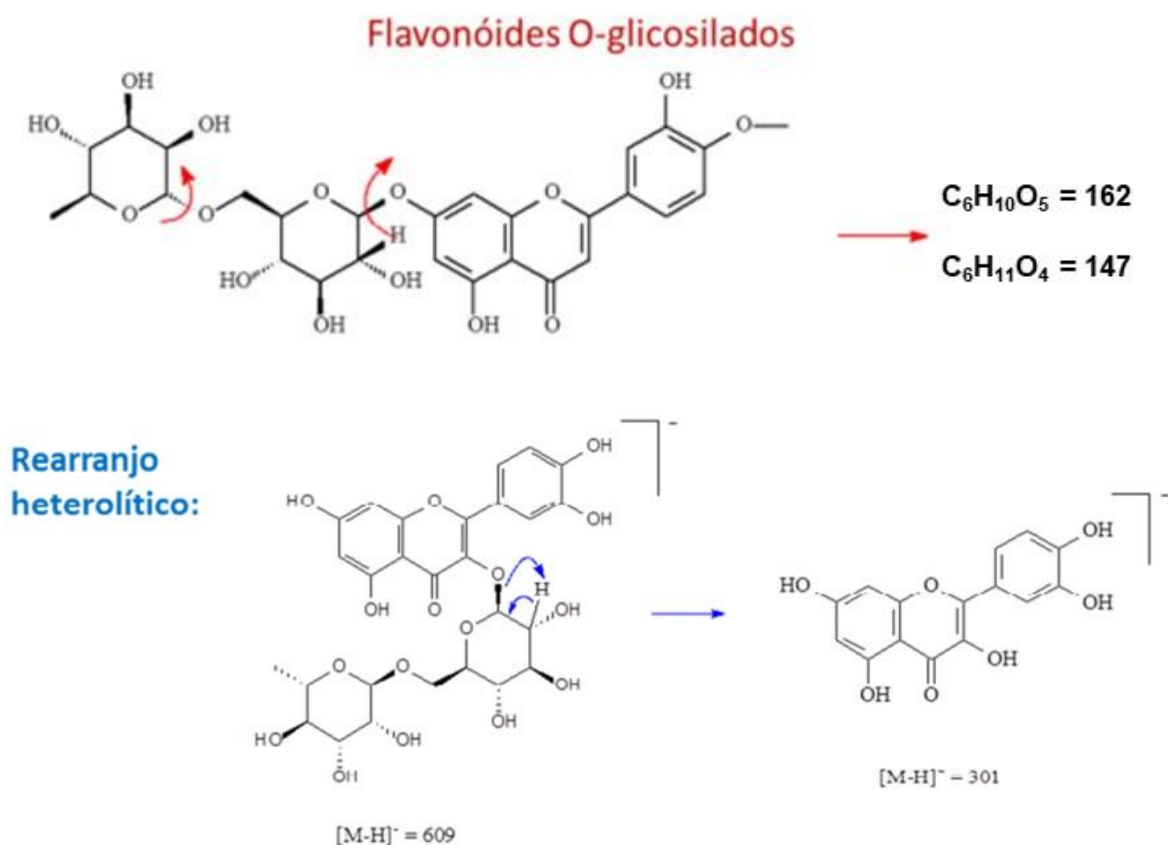


Figura 57 - Fragmentações características de flavonoides *O*-glicosilados (ABLAJAN et al., 2006; CUYCKENS & CLAEYS, 2005).

Clivagem Homolítica:

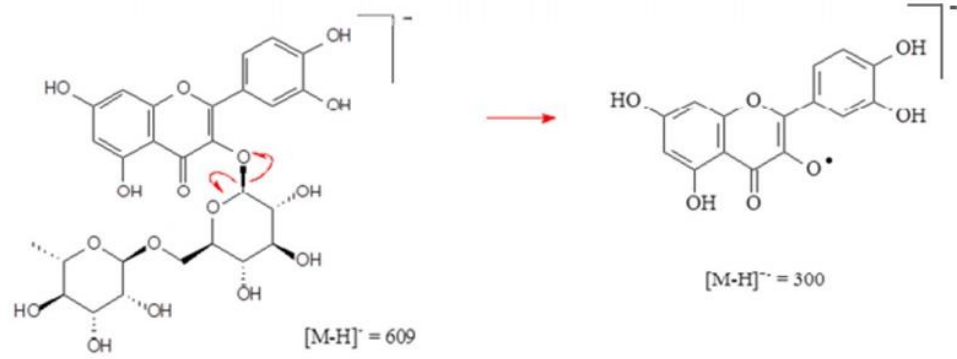


Figura 57. Continuação.

O principal caminho de fragmentação para os flavonoides C-glicosilados são clivagens através da própria unidade de açúcar, uma vez que estes não apresentam a ligação lábil C-O-flavonoide. Existem diversas possibilidades de clivagens para o resíduo de açúcar, sendo característico e mais comum para estes flavonoides perdas de 90, 120 e 150 Da (no caso de hexoses) (Figura 58). Flavonoides C-glicosilados também sofrem perda de água, em ambos os modos de ionização. Essa perda de água é mais pronunciada para flavonoides 6-C do que 8-C-glicosilados, com altas energias de colisão (LI et al., 1992).

A glicosilação em C-6 permite a ligação de hidrogênio entre as hidroxilas em C-5 e C-7 com o oxigênio do sistema heterocíclico do açúcar, inibindo a sua rotação. Considerando por exemplo a ligação de hidrogênio entre a hidroxila em C-7 e o oxigênio do heterocíclico, isso facilitaria a perda de água em C-2". O sistema heterocíclico sem a rotação livre sofreria o ataque da hidroxila em C-5 ao C-2", levando a perda de H₂O.

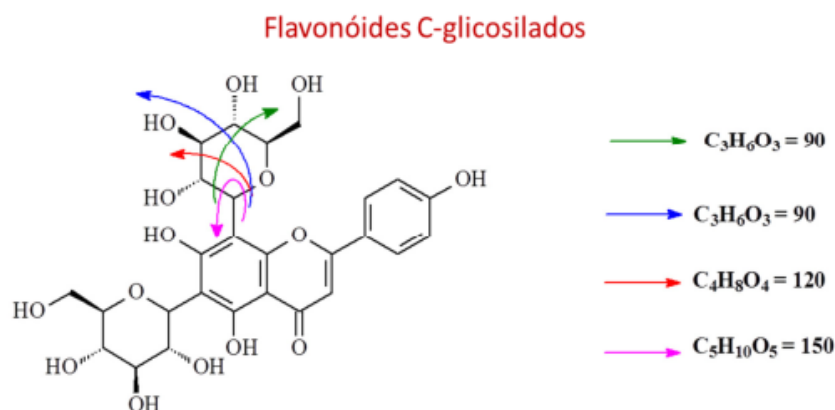


Figura 58 - Fragmentações características de flavonoides C-glicosilados (LI et al., 1992; CUYCKENS & CLAEYS, 2005).

As bandas 2 e 3, íons m/z 593,1206 e 593,1181, nos seus espectros MS^2 (Figuras 59 e 60) mostraram íons típicos de flavonoides C-glicosilado e O-glicosilado, respectivamente. A banda 2, íon m/z 593,1206 ($C_{27}H_{30}O_{15}$), mostrou no espectro de MS^2 (Figura 59) dois íons fragmentos com perda mostradas acima para flavonoides C-glicosilado, um com perda de 120 Da ($C_4H_8O_4$), m/z 473, e o outro com perda de 90 Da ($C_3H_6O_3$), m/z 503. O íon m/z 593 sugere os flavonoides já identificado em *Citrus* (HAGGAG et al., 1999; ABAD-GARCÍA et al., 2012) vicenina-2, apigenina-3,6-di-C-glucosídeo, apigenina-3,8-di-C-glucosídeo, luteolina-7-O-rutinosídeo, luteolina-7-O-neohesperidosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo, kaempferol-7-O-rutinosídeo, poncirina e didimina, os sete primeiros $C_{27}H_{30}O_{15}$ e os dois último $C_{28}H_{34}O_{14}$. Os seis últimos são flavonoides O-glicosilados, podendo ser descartados.

Acima comentamos que uma indicação do flavonoide ser 6-C-glicosilado é a perda de H_2O da unidade de açúcar via o ataque da hidroxila em C-5 ao C-2". Esta informação nos permite descartar apigenina-3,8-di-C-glucosídeo, pois esta perda de água foi observada. Contudo, o mecanismo para ocorrer a perda de água exige antes a perda de dois hidrogênios, e isto só pode ocorrer após fragmentação da unidade de açúcar em C-8 com a perda de 90 Da ($C_3H_6O_3$) levando ao m/z 503. Moléculas deste íon ainda não detectadas podem perder dois hidrogênios levando a um intermediário como uma quinona altamente conjugada, grande estabilidade termodinâmica, e assim, permitindo posterior ataque da hidroxila em C-2" da unidade de açúcar à carbonila em C-5 do intermediário quinona.

A seguir um mecanismo de retorno do enol ao aldeído via um mecanismo de extensa conjugação (o que indica grande estabilidade termodinâmica) leva a recuperação do sistema aromático e a perda de H_2O , levando ao íon m/z 483 de intensidade relevante (Esquema 22). Estes dados permitem descartar apigenina-3,6-di-C-glucosídeo, sugerindo vicenina-2 para a banda 2, a qual não foi detectada pelo grupo neste mesmo tipo de enxerto, mas ela foi detectada nos caules de *C. sinensis* (tecidos maduros). Na presente tese vicenina-2 foi detectada no caule superior e folhas do enxerto, porém em maior quantidade naqueles em que continham laranja Pera juvenil, com variações -3,09 e -7,62. Estas variações indicam porque vicenina-2 não foi detectada no enxerto com laranja Pera madura pelo grupo (CERQUEIRA, 2016), ou seja, a quantidade desta é muito pequena em tecidos maduros, principalmente em folhas.

A tese de CERQUEIRA possui uma revisão sobre as espécies de *Citrus* já estudadas, o que vem facilitando o trabalho com este gênero. O grupo também trabalhou com o enxerto de laranja Valência madura (*C. sinensis*) enxertadas em “Swingle” (*C. paradisi* X *Poncirus trifoliata*), e vicenina-2 foi detectada no caule inferior do enxerto (BELLETE, 2013). Na presente tese vicenina-2 também foi detectada no caule e folhas de laranja Pera madura e juvenil em estaquia, porém mais nas juvenis, variações -6,71 e -5,86, respectivamente.

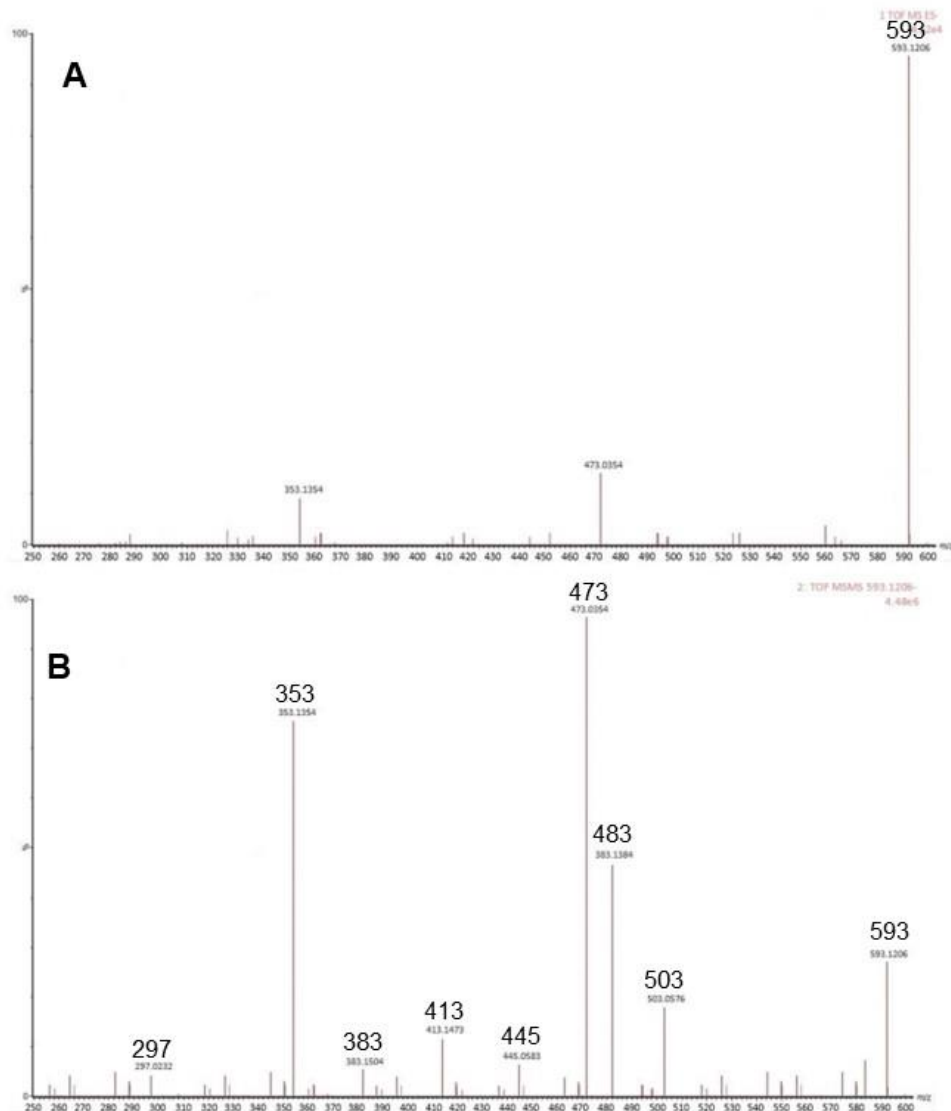
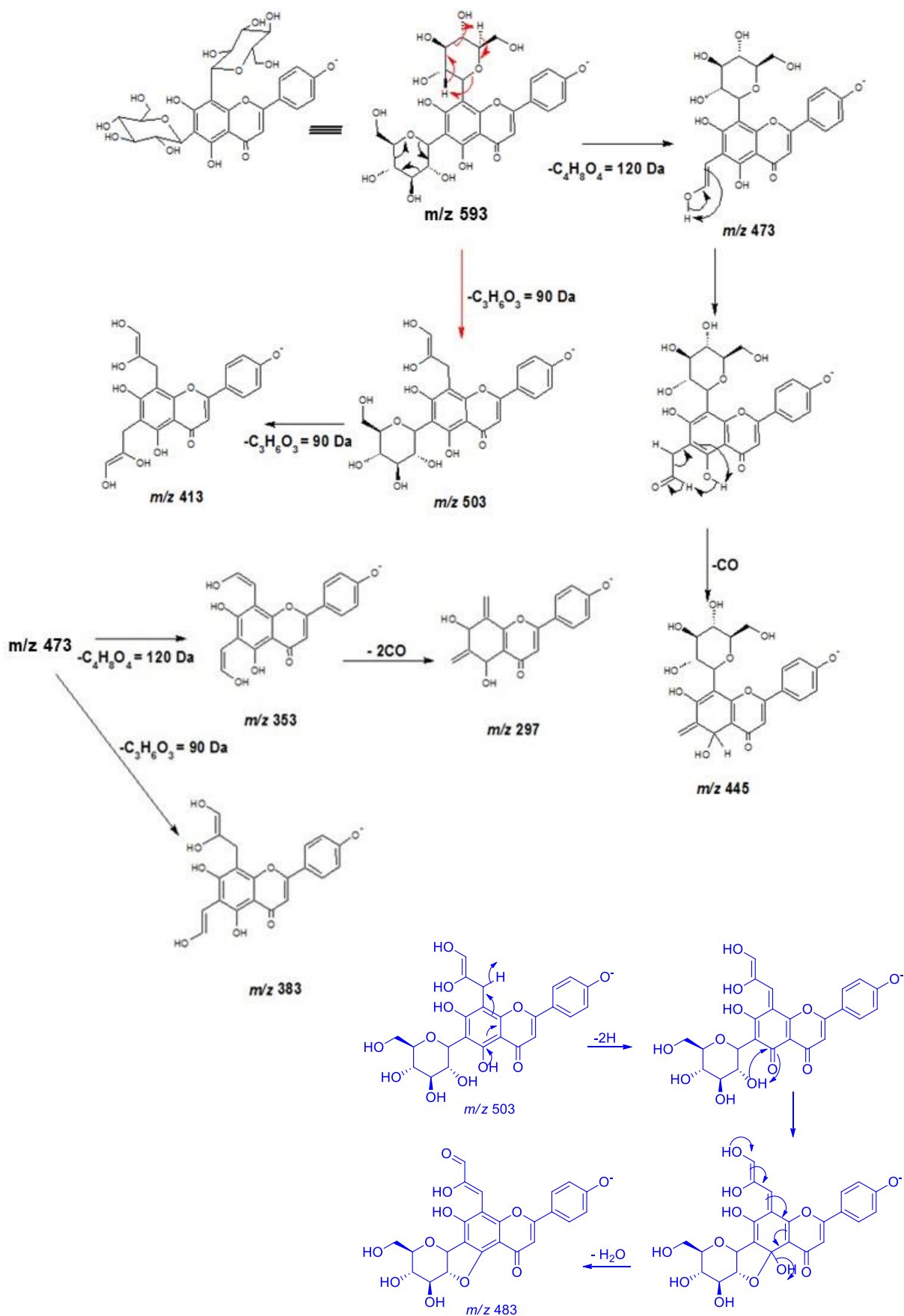


Figura 59 - Espectro de massas para o íon m/z 593,1206 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 593.



Esquema 22. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) nos espectros MS², característicos de vicenina-2 desprotonada.

A banda 3, íon m/z 593,1181 mostrou no espectro de MS^2 (Figura 60) um único íon m/z 285 como pico base e todos os demais com intensidades desprezíveis. Isto sugere um flavonoide O-glicosilado e este açúcar ser um dissacarídeo, e ocorrer clivagem heterolítica convencional. Os Flavonoides citados acima luteolina-7-O-rutinosídeo, luteolina-7-O-neohesperidosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo, kaempferol-7-O-rutinosídeo, poncirina e didimina, os quatro primeiros $C_{27}H_{30}O_{15}$ e os dois último $C_{28}H_{34}O_{14}$, são todos O-glicosilados. Os quatro primeiros ao perderem a unidade do dissacarídeo levam uma flavona com quatro hidroxilas ($C_{15}H_{12}O_6$), e dariam íon m/z 287 ($C_{15}H_{11}O_6$)⁻. Os dois último, os quais possuem uma hidroxila, um O-glicosilado e uma metoxila, daria uma flavanona m/z 285 ($C_{16}H_{13}O_5$)⁻, sendo o pico base encontrado no espectro de MS^2 da banda 3, permitindo atribuir estes dois flavonoides a ela (Esquemas 23 e 24).

Poncirina (Isosakuranetin-7-O-neohesperidosídeo) possui uma unidade neohesperidose (α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosose), enquanto didimina (Isosakuranetin-7-O-rutinosídeo) possui uma unidade 6-deoxy- α -L-mannopiranosil)-beta-D-glicopiranosil. Didimina possui uma das unidades de açúcar ligada ao grupo 6-CH₂OH, e a perda desta unidade levando o grupo 6-CH₂O-Gl levaria ao íon m/z 415, o qual está presente no espectro de MS^2 , mas em intensidade muito pequena. Para confirmar este pico será necessário experimentos localizando este íon. No momento, atribuímos à banda 3 o flavonoide didimina, o qual foi isolado anteriormente das folhas de *C. sinensis* (HAGGAG et al., 1999) e nas folhas do enxerto de laranja Valência madura enxertadas em “Swingle” (BELLETE, 2013). Um levantamento na literatura mostrou que poncirina não foi isolada ou detectada em *C. sinensis*, reforçando a atribuição acima.

Na presente tese didimina foi detectada no caule superior e folhas do enxerto, porém em maior quantidade naqueles em que continham laranja Pera juvenil, com variações -4,13 e -6,05, respectivamente.

Didimina também foi detectada no caule e folhas de laranja Pera madura e juvenil em estaquia, porém mais nos juvenis, variações -3,26 e -6,02, respectivamente.

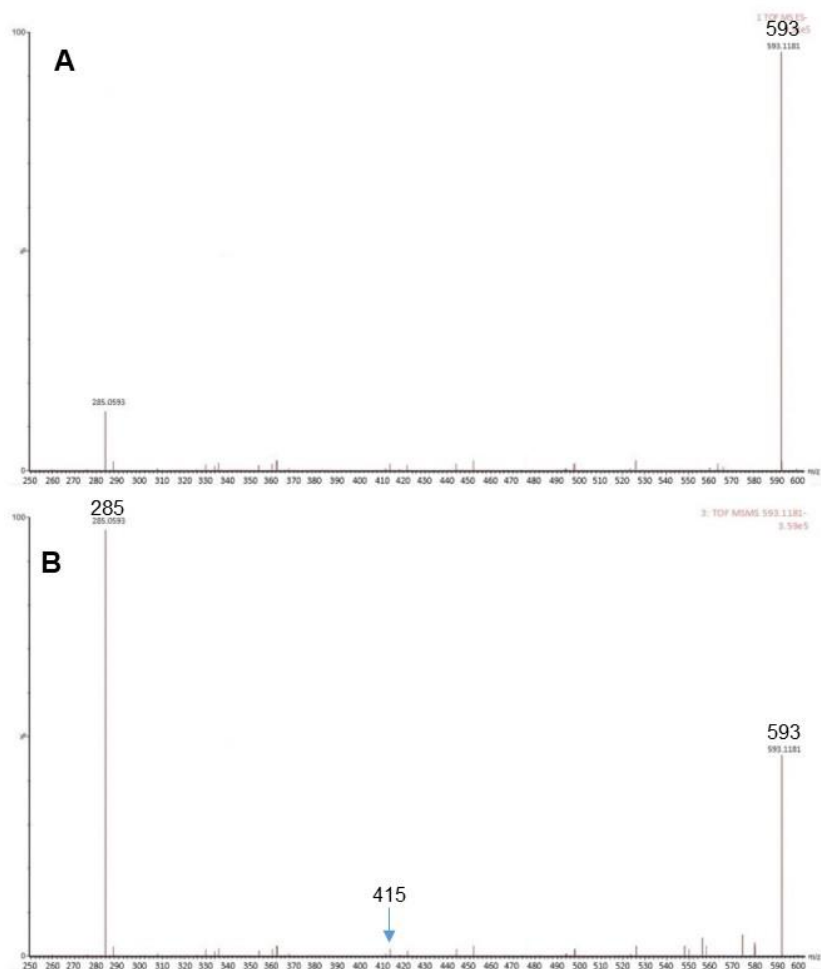
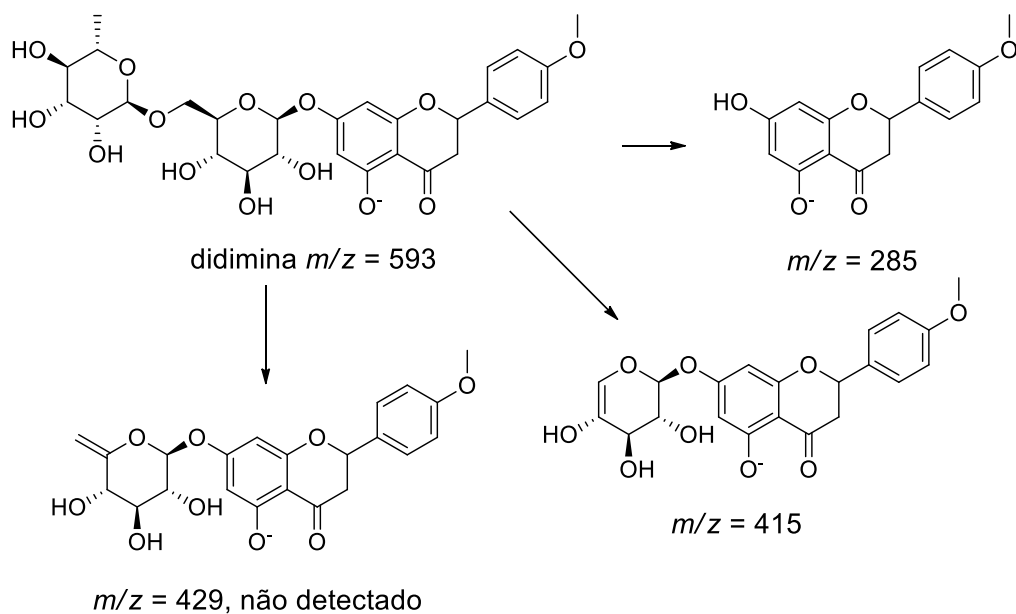
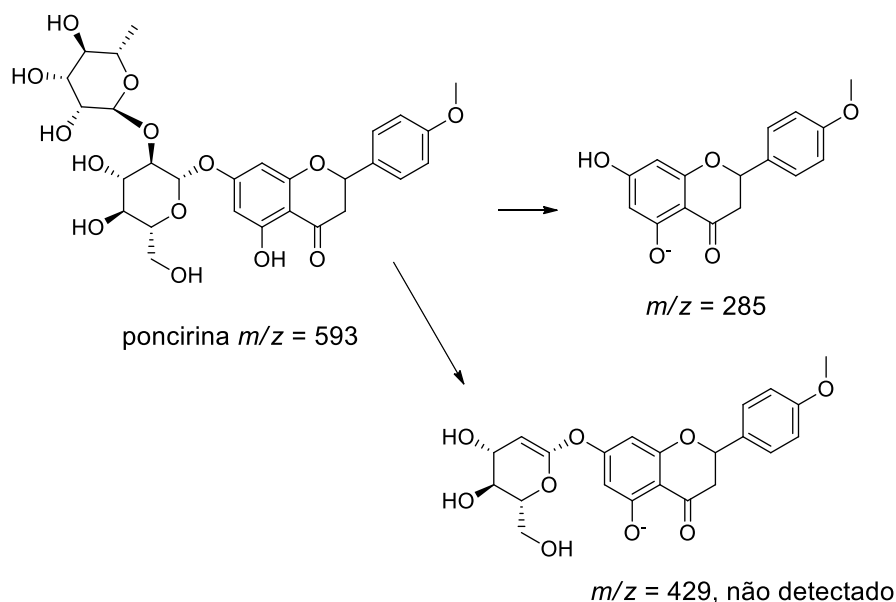


Figura 60 - Espectro de massas para o íon m/z 593,1181 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 593.



Esquema 23. Fragmentos encontrados como íons produtos (MS/MS) no espectro MS^2 , característicos de didimina desprotonada.



Esquema 24. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS², característicos de poncirina desprotonada.

Identificação da banda 4, íon m/z 632,0178

No levantamento bibliográfico realizado pelo grupo e comentado anteriormente (CERQUEIRA, 2016), não há nenhum composto com massa molecular que pudesse corresponder ao íon m/z 632,0178. Contudo, a banda 4 mostrou no espectro de MS² (Figura 61) um íon fragmento a m/z 623, e vários outros característicos de flavonoide C-glicosilado discutido acima.

No levantamento de CERQUEIRA (2016) encontramos os flavonoides O-glicosilados que poderiam dar origem ao íon 623, isorhamnetin-7-O-rutinosídeo, isorhamnetin-3-O-rutinosídeo (narcissina), tamarixetin-7-O-rutinosídeo, os quais foram descartados por não apresentarem as fragmentações encontradas no espectro MS². Consta no levantamento três flavonoides C-glicosilado, stellarina-2 (chrysoeriol-6,8-di-C-glucosídeo; 3'-OMe, 4'-OH); diosmetin-6,8-di-C-glucosídeo (lucenin-2 4'-metil éter); diosmetin-3,8-di-C-glucosídeo. Os íons encontrados no espectro MS² permitem propor para a banda 4 os dois primeiros, como mostra o esquema 25 usando diosmetin-6,8-di-C-glucosídeo como modelo.

O diosmetin-3,8-di-C-glucosídeo poderia ser descartado com mais segurança se o íon fragmento m/z 513 estivesse em uma intensidade mais relevante, pois a formação deste exige a unidade de açúcar em C-8 e a hidroxila em C-5, como mostrado no exemplo anterior (esquema 22) e aqui no esquema 25. O diosmetin-3,8-

di-C-glucosídeo já foi isolado da casca do fruto de *C. sinensis* (SAWABE et al., 1998), e diosmetin-6,8-di-C-glucosídeo das folhas (Haggag et al., 1999), enquanto stellarina-2 do suco de *C. limonia* (Abad-García et al., 2012). Os íons fragmentos no espectro de MS² não permitem diferenciar os dois últimos flavonoides, contudo, considerando que o segundo já foi isolado das folhas de *C. sinensis*, no momento atribuímos este à banda 4.

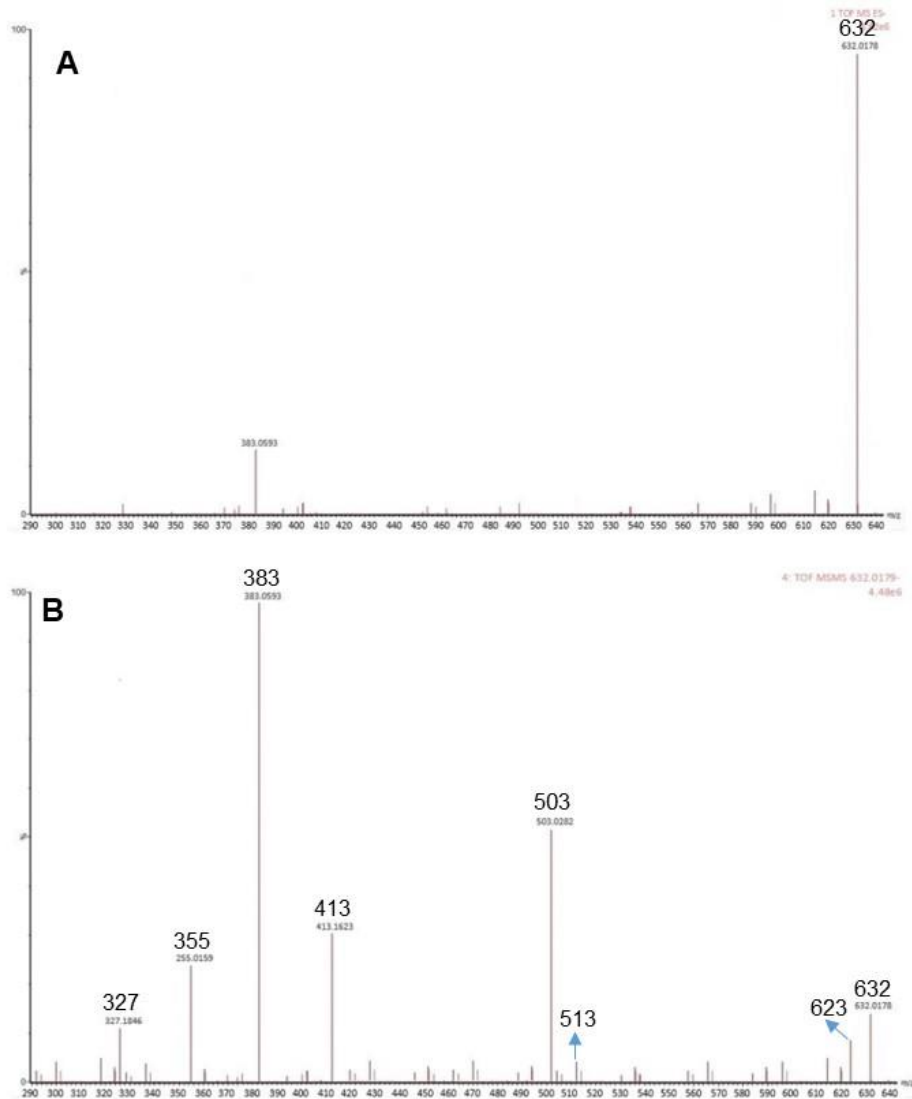
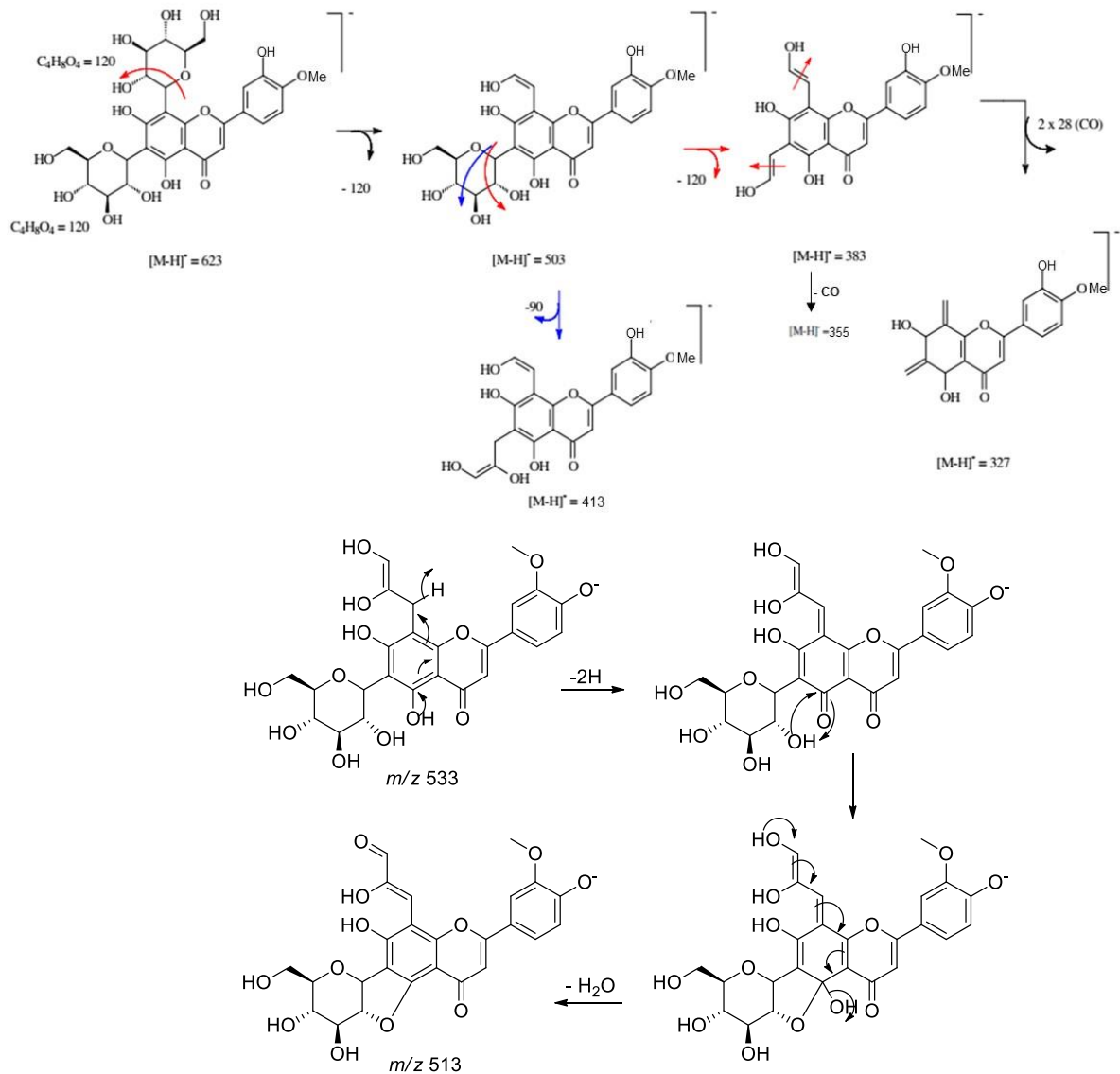
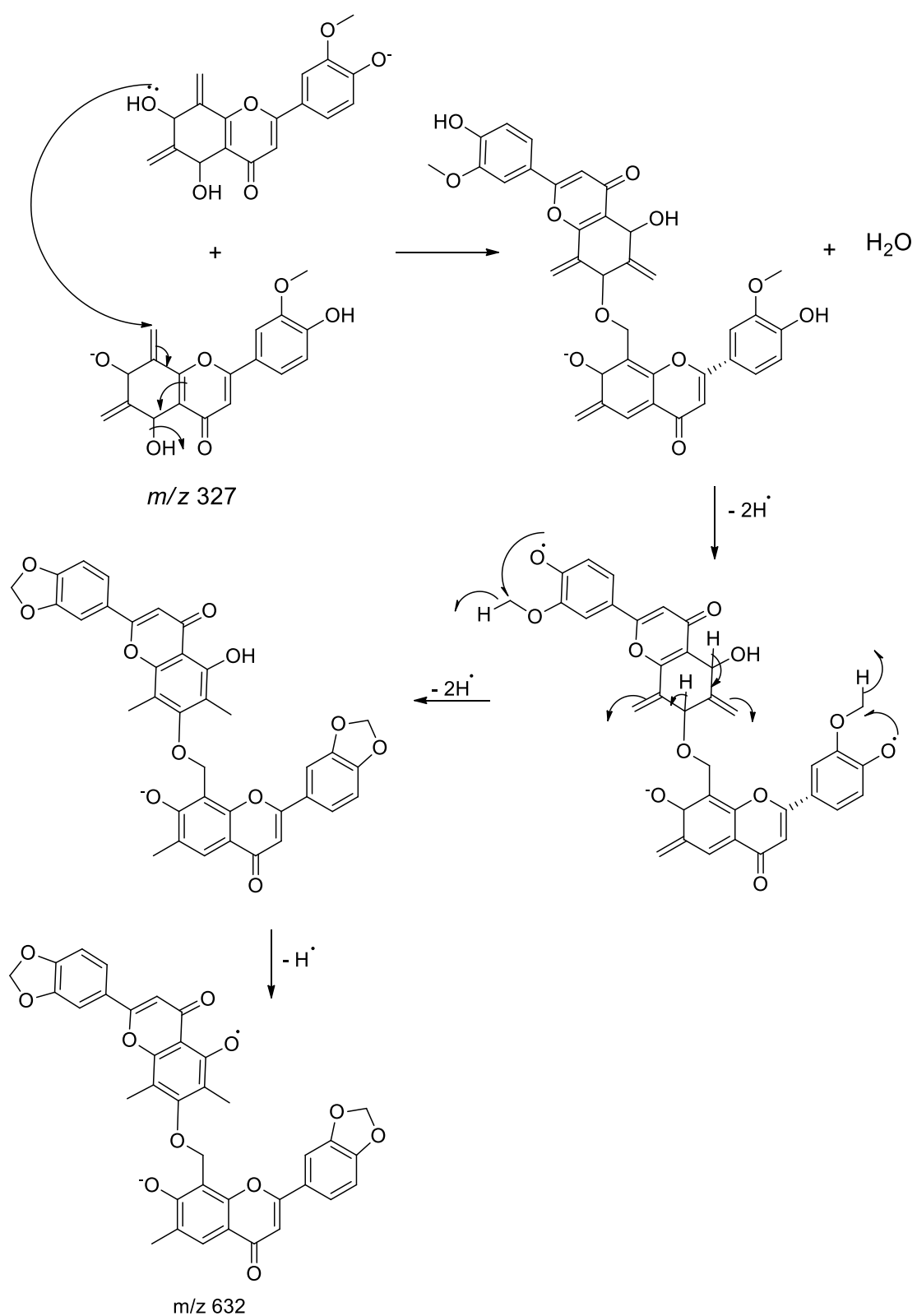


Figura 61 - Espectro de massas para o íon m/ 632,0178 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 623.



Esquema 25. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS², característicos de diosmetin-6,8-di-C-glucosídeo desprotonado.

Contudo, o espectro *full scan* mostram um íon a *m/z* 632, o qual deve ser um produto de reação de duas unidades do fragmento *m/z* 327 antes de ser detectado, levando a um íon radical, como proposto no esquema 26 abaixo. Diosmetin-6,8-di-C-glucosídeo foi detectada anteriormente das folhas do enxerto de laranja Valência madura enxertadas em “Swingle” (BELLETE, 2013). Na presente tese diosmetin-6,8-di-C-glucosídeo foi detectada no caule superior e folhas do enxerto, porém em maior quantidade naqueles em que continham laranja Pera juvenil, com variações -6,26 e -4,70, respectivamente. Este também foi detectada no caule e folhas de laranja Pera madura e juvenil em estaquia, porém mais nos juvenis, variações -5,30 e -8,19, respectivamente.



Esquema 26. Proposta para a formação do íon 632 pela reação de duas unidades do íon m/z 327.

Identificação da banda 5, íon m/z 607,1055

A banda 5, íon m/z 607,1055 mostrou no espectro de MS^2 (Figura 62) um único íon m/z 299 como pico base e todos os demais com intensidades desprezíveis. Isto sugere um flavonoide O-glicosilado e este açúcar ser um dissacarídeo, e ocorrer clivagem heterolítica convencional, levando ao íon correspondente ao flavonoide aglicona. No levantamento bibliográfico realizado pelo grupo (CERQUEIRA, 2016), há quatro flavonoides com massa molecular que pode corresponder ao íon m/z 607, D-glucosil-2S-homoeriodictio-6''-O-3-hidroxi-3-metilglutarato, neodiosmina (3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona-7-O-neohesperidosideo), diosmina (3',5,7-trihidroxy-4'-metoxiflavona-7-rutinoside) e chrysoeriol-7-O-rutinosideo (4',5,7-trihidroxi-3'-metoxiflavona-7-rutinoside).

O primeiro é uma flavanona, cuja aglicona não corresponderia ao íon m/z 299, enquanto os outros três poderiam levar a este íon. Os dois últimos podem sofrer uma RDA no sistema heterocíclico da unidade de açúcar ligada diretamente à hidroxila do flavonoide, com posterior perda de $HC\equiv CH$, levando ao m/z 315, permitindo selecionar diosmina ou chrysoeriol-7-O-rutinoside para a banda 5 (Esquema 27).

Neodiosmina possui um dissacarídeo diferente, e sua estrutura encontra-se no esquema 28, onde pode se verificar que se este perder a unidade D-glucopiranosose em C-2'', deixando uma hidroxila neste carbono C-2'', e este ao sofrer RDA com posterior perda de $HC\equiv CH$ também levaria ao m/z 315, não permitindo descartá-lo para a banda 5. Diosmina e chrysoeriol-7-O-rutinoside foram isolados do suco de *C. limonia* (151), diosmina também das folhas e do suco de *C. sinensis* (137), e neodiosmina só do suco (137). A ocorrência de diosmina nas folhas de *C. sinensis* reforça atribuí-la à banda 5 no momento, exigindo no futuro análises com amostra autêntica.

Diosmina foi detectada anteriormente nas folhas do enxerto de laranja Valência madura enxertadas em "Swingle" (BELLETE, 2013). Na presente tese diosmina foi detectada no caule superior e folhas do enxerto, porém em maior quantidade naqueles em que continham laranja Pera juvenil, com variações -5,18 e -5,21, respectivamente. Esta também foi detectada no caule e folhas de laranja Pera madura e juvenil em estaquia, porém mais nos juvenis, variações -4,69 e -7,23, respectivamente.

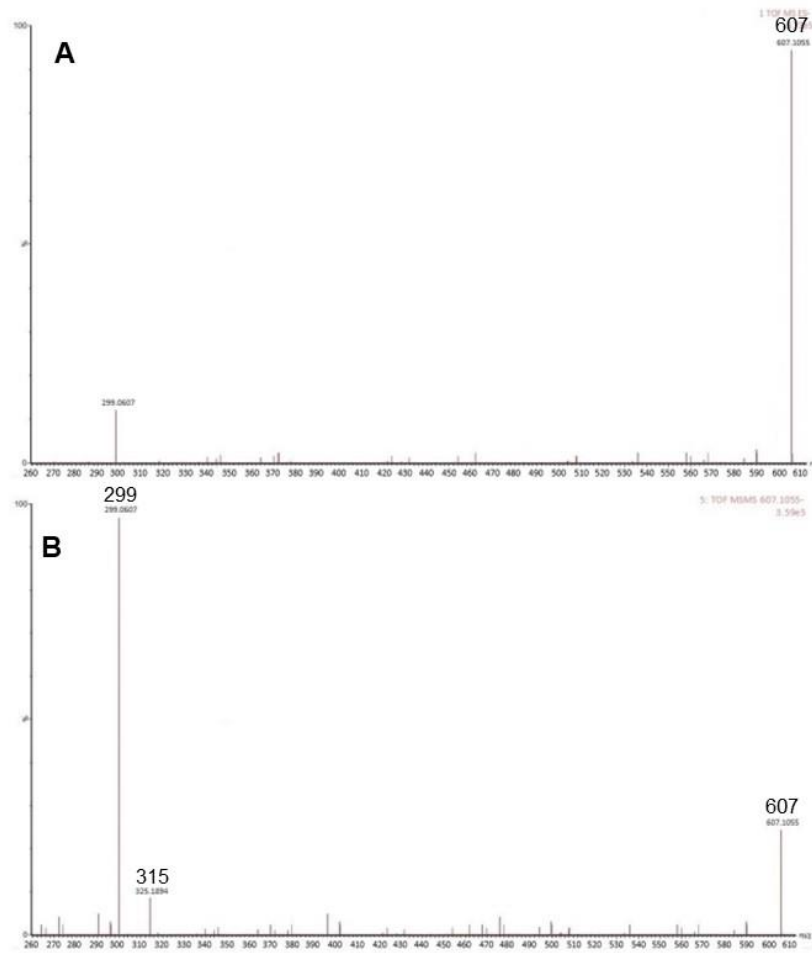
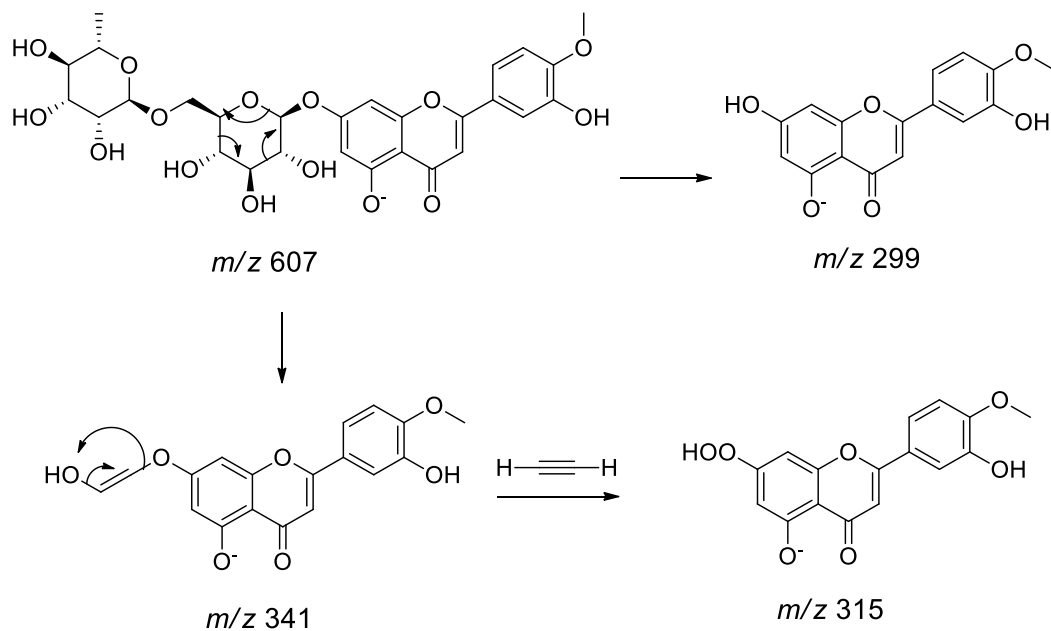
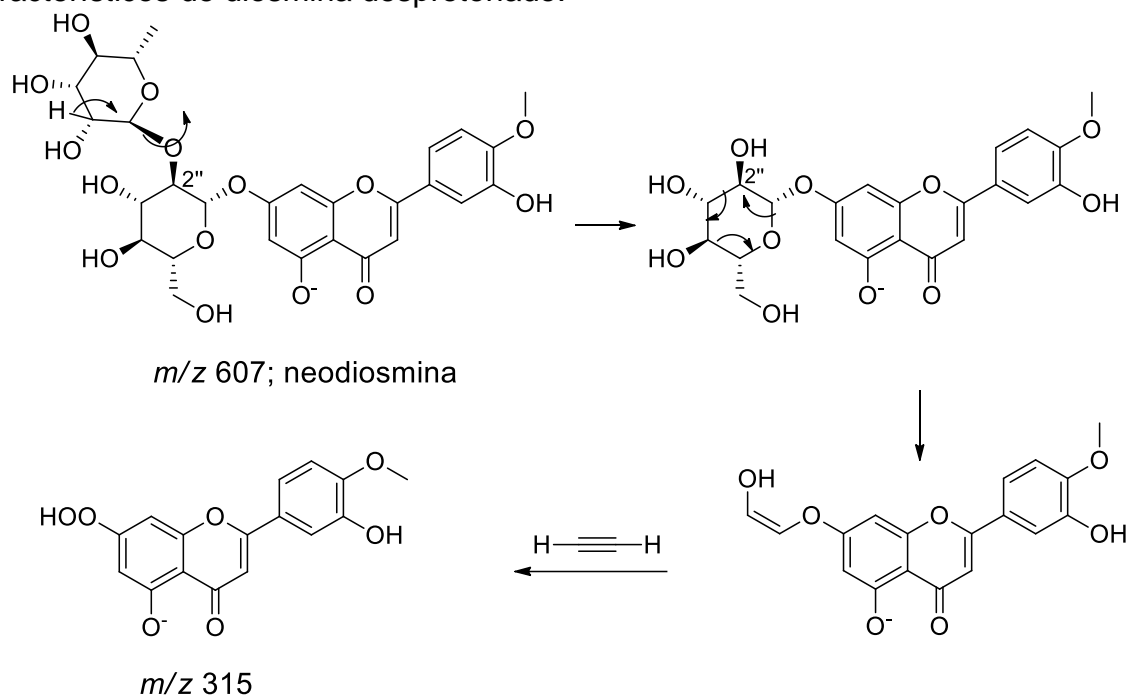


Figura 62 - Espectro de massas para o íon m/z 607,1055 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 607.



Esquema 27. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS², característicos de diosmina desprotonado.



Esquema 28. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS², característicos de neodiosmina desprotonado.

Identificação da banda 6, íon *m/z* 609,0109

A banda 6, íon *m/z* 609,0109 também mostrou no espectro de MS² (Figura 63) um único íon *m/z* 301 como pico base e todos os demais com intensidades desprezíveis. Isto novamente sugere um flavonoide O-glicosilado e este açúcar ser um dissacarídeo, e ocorrer clivagem heterolítica convencional, levando ao íon correspondente ao flavonoide aglicona. No levantamento bibliográfico realizado pelo grupo (CERQUEIRA, 2016), há seis flavonoides com massa molecular que pode corresponder ao íon *m/z* 609, hesperidina (3',5-diidroxi-4'-metoxi-7-O-rutinosídeflavanona), neohesperidina (3',5-diidroxi-4'-metoxi-7-O-neorutinosídeflavanona), homoeriodictiol-7-O-rutinosídeo (3'-metoxi-4',5-diidroxi-7-O-rutinosídeflavanona), rutina (3',4',5,7-tetraidroxi-3-O-rutinosídeflavanona), quercetin-3-O-rutinosídeo-7-O-glucosídeo (3',4',5-triidroxi-3-O-rutinosídeo-7-O-glucosídeflavanona) e luteolin-7-O-soporosídeo (3',4',5-triidroxi-7-O-soporosídeflavanona).

Os dois primeiros levariam ao flavonoide aglicona 3',5,7-triidroxi-4'-metoxiflavanona, o terceiro ao 4',5,7-triidroxi-3'-metoxiflavanona, o quarto e o quinto ao 3',4',5,7-tetraidroxi-flavanona, e o sexto ao 3',4',5,7-tetraidroxi-flavanona, ou seja,

somente este último não levaria ao íon m/z 301 após a perda das unidades de açúcar (Esquema 29). Contudo, a banda 6 foi confirmada corresponder à hesperidina por comparação direta com padrão autêntico obtido no estudo citado anteriormente (SOARES et al., 2020). A quantificação deste flavonoide será discutida mais à frente.

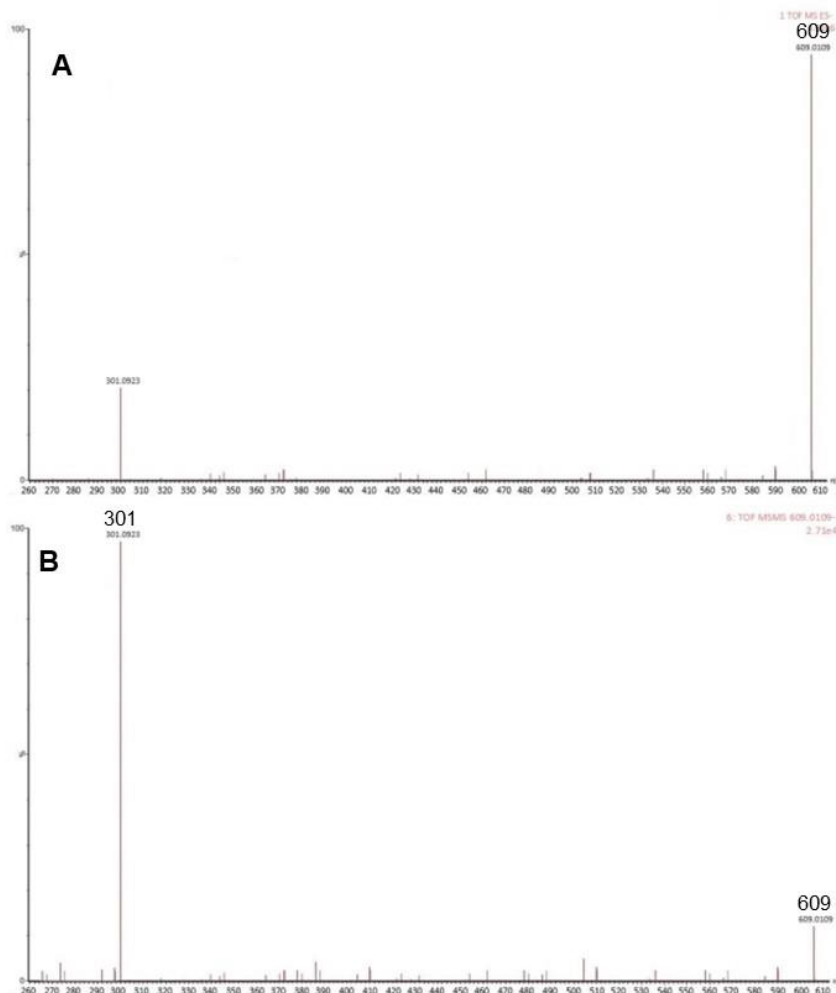
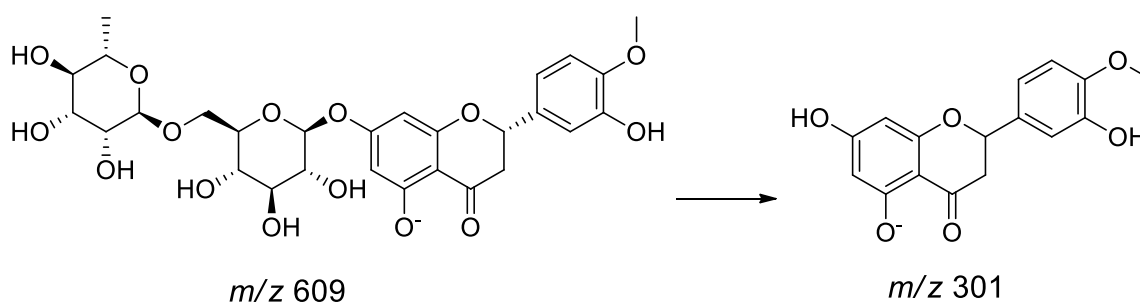


Figura 63 - Espectro de massas para o íon m/z 609,0109 por QTOF-MS. A: Espectro full scan. B: Íons produtos de m/z 609.



Esquema 29. Fragmentos possíveis como íons produtos (MS/MS) no espectro MS^2 , característicos de hesperidina desprotonado.

4.2.1.5. Substâncias responsáveis pela separação das amostras dos enxertos e das estaquias de citros com HLB e como elas variaram nos tecidos maduros e jovens

A análise das amostras das raízes dos enxertos, das estaquias, e caule inferior dos enxertos foram melhores no modo positivo de ionização, o que era esperado por informações de estudo publicado recente pelo grupo em trabalho similar, porém avaliando a interação com uma segunda bactéria fitopatogênica de citros, *Xylella fastidiosa*, o qual mostrou estes órgãos ricos em cumarinas preniladas e flavonoides polimetoxiladas (SOARES et al., 2020). Avaliando a tabela 13 verifica-se que foram identificadas somente cumarinas na análise das raízes dos enxertos e das estaquias (Figura 64).

A variação indicada nas discussões anteriores e resumido na tabela 13 significa a diferença da área da banda cromatográfica da respectiva substância correspondente à amostra de tecido maduro menos a da juvenil. É importante lembrar que as raízes do enxerto se originaram de *C. limonia* madura. A comparação da área das bandas cromatográficas das respectivas substâncias não deveria haver diferenças, e realmente elas não foram grandes (variaram de 1,6 a 3,9), exceto para ostol (7,21).

Contudo, foram analisados dois grupos de enxertos, um em que a parte superior era constituída por *C. sinensis* madura e o outro por juvenil. Assim, ao analisarmos essas variações para as raízes dos enxertos, a diferença deve ser uma influência de *C. sinensis* madura ou juvenil acima. O caule superior e folhas do enxerto e das estaquias, que correspondem a *C. sinensis* são caracterizados por uma cumaria somente, 7-demetilisotamarina, a qual por coincidência também contém prenilação em C-8 como ostol, e com variação positiva, ou seja, presente em maior quantidade em tecido maduro (2,55 para o caule e 4,71 para as folhas).

A taxa de transmissão do patógeno (*Ca. Liberibacter asiaticus*) para plantas juvenis (seedlings, plantas originadas de sementes) foi significativamente menor do que a taxa de transmissão do patógeno para mudas de laranjas maduras. Esta observação indica os tecidos maduros mais suscetíveis à bactéria. Todas as cumarinas estão em maior quantidade nos tecidos maduros das raízes do enxerto, sugerindo um mecanismo de defesa da planta, e indicando o ostol (variações 7,21; 8,67) com maior probabilidade de ser bactericida frente à *Ca. Liberibacter asiaticus*.

Tabela 13 - Substâncias que sofreram aumento na área de seu pico correspondente quando comparado tecidos maduros e jovens em enxertia e em estaquia.

Órgão	Enxerto		Estaquia	
	Substância	Variação	Substância	Variação
Raízes	Cumarinas		Cumarinas	
	Umbeliferona	1,58	Xantiletina*	7,52
	Xantiletina*	2,11	Seselina*	6,95
	Seselina*	2,57	Citrubutina	2,25
	Suberenona	1,75	Ostol*	8,67
	Ostol*	7,21	Suberosina	2,72
	5-Metoxiseselina*	1,76	5-Metoxiseselina*	5,59
	Xantoxiletina*	3,93	Xantoxiletina*	4,12
	Tamarina+	3,93	Decursinol	3,41
	Ulopterol	1,64	Xantoarnol	3,15
	Nordentatina	2,36	Diidrosuberenol	2,49
Caule Inferior	Cumarinas			
	Bergapteno	1,27		
	Xantiletina*	5,61		
	Seselina*	4,84		
	5-Metoxiseselina*	6,13		
	Xantoxiletina*	3,75		
	Tamarina+	2,21		
	Clauserina	1,78		
	Flavonoides Poli-OMe			
	Nobiletina	-1,93		
Tangeretina	-2,47			
Limonoide				
	Limonina	-0,71		
Caule superior	Cumarina		Cumarina	
	7-Demetilisotamarina	2,55	7-Demetilisotamarina	3,15
	Flavonoides C-glu/O-glu		Flavonoides C-glu/O-glu	
	Vicenina-2 (C-glu)	-3,09	Vicenina-2 (C-glu)	-6,71
	Didimina (O-glu)	-4,13	Didimina (O-glu)	-3,26
	6,8-di-c-glu-Diosmetina	-6,26	6,8-di-c-glu-Diosmetina	-5,30
	Diosmina (O-glu)	-5,18	Diosmina (O-glu)	-4,69
Hesperidina (O-glu)	-2,71	Hesperidina (O-glu)	-2,57	
Folhas	Cumarina		Cumarina	
	7-Demetilisotamarina	4,41	7-Demetilisotamarina	5,42
	Flavonoides C-glu/O-glu		Flavonoides C-glu/O-glu	
	Vicenina-2	-7,62	Vicenina-2	-5,86
	Didimina	-6,05	Didimina	-6,02
	6,8-di-c-glu-Diosmetina	-4,70	6,8-di-c-glu-Diosmetina	-8,19
	Diosmina	-5,21	Diosmina	-7,23
Hesperidina	-3,97	Hesperidina	-4,71	

O caule inferior do enxerto também se originou de *C. limonia* madura. Neste foi encontrado cumarinas, das quais somente clausarina e bergapteno não foram destaques nas raízes do enxerto. Clausarina seria uma sequência da biossíntese de nordentatina (Figura 64). Bergapteno é uma furanocumarina linear, a qual só tem sido encontrada na casca dos frutos de *C. limonia* e *C. sinensis* (DUGRAND et al., 2013). Esta cumarina não foi detectada nas plantas saudias (controles), sugerindo bergapteno ser uma fitoalexina sintetizada em resposta à bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus*. Ela deve ser biossintetizada nas raízes e transloucada para o caule do porta enxerto para inibir o desenvolvimento da bactéria e impedindo que esta vá para a parte superior do enxerto, protegendo a planta.

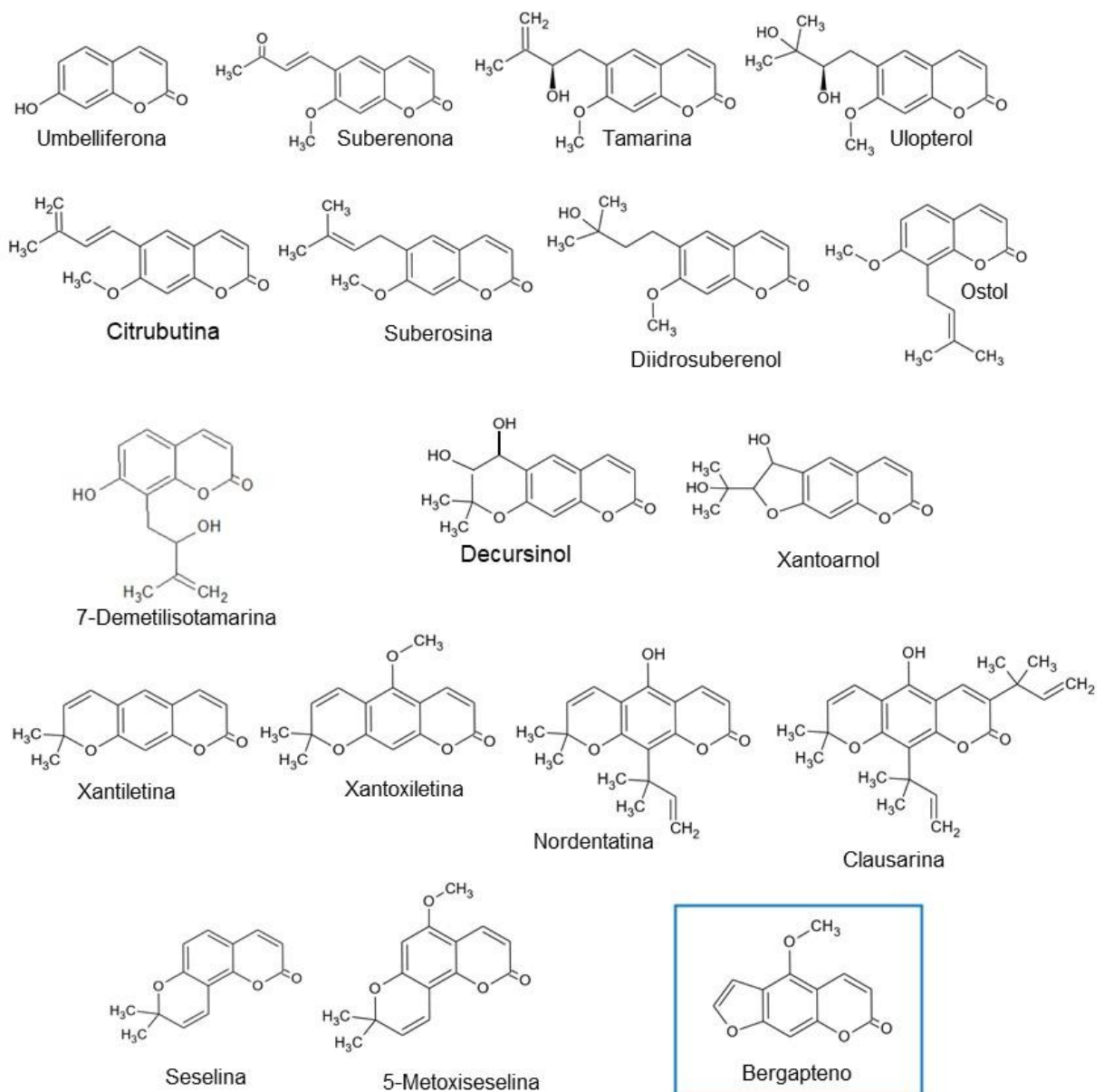


Figura 64 - Cumarinas que sofreram aumento na área de seu pico cromatográfico quando comparado tecidos maduros e jovens em enxertia e em estaquia com HLB.

No caule inferior do enxerto também se destacou o limonoide limonina (Figura 65), o que não é surpresa já que a variação mostra sua presença muito próxima quando temos tecidos juvenis ou maduros acima do porte enxerto, e este foi isolado pelo grupo das raízes e folhas do enxerto (RIBEIRO et al., 2008). Limonina poderia ter sido biossintetizada nas raízes e transloucada para o caule do porta enxerto como um mecanismo de defesa à bactéria.

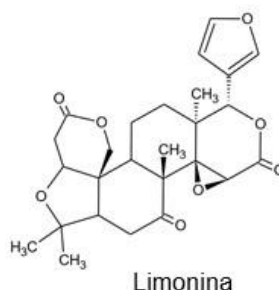


Figura 65 - Limonoide que sofreu aumento na área de seu pico cromatográfico quando comparado tecidos maduros e jovens em enxertia e em estaquia com HLB.

No caule inferior do enxerto também se evidenciaram duas flavonas polimetoxiladas, nobiletina e tangeretina (Tabela 13, figura 66). Como comentado acima o caule inferior do enxerto se originou de *C. limonia* madura, porém parece ter sido influenciado por *C. sinensis* juvenil enxertada acima, pois a variação destes flavonoides é maior quando o enxerto acima é juvenil (-1,93, -2,47 repetível). Nobiletin foi detectada nas folhas de *C. sinensis* juvenil, de *C. limonia* madura, e no caule superior e inferior do enxerto, no estudo publicado recente pelo grupo em trabalho similar, porém avaliando a interação com *X. fastidiosa* (SOARES et al., 2020).

No entanto, tangeretina foi detectada somente nas folhas de *C. sinensis* juvenil, de *C. limonia* madura e do enxerto. Ou seja, a presença desta com variação negativa poderia ser uma influência do enxerto juvenil acima, já que tangeretina não foi detectada em *C. limonia* no trabalho de SOARES et al.

O estudo da parte superior do enxerto é que permite entender melhor a diferença entre os dois grupos de enxertos, aquele em que a parte superior era constituída por *C. sinensis* madura e o outro por juvenil. Os resultados medidos pelas variações na tabela 13 indicam que as folhas e os ramos (caule superior) dos tecidos juvenis biossintetizam mais flavonoides que os correspondentes maduros. O mesmo é observado na comparação de *C. sinensis* juvenil e maduras em estaquia. Nos ramos (caule superior) dos tecidos juvenis do enxerto o flavonoide com maior variação é um

C-glicosilado a 6,8-di-c-glu-diosmetina (-6,26), seguido por um O-glicosilado a diosmina (-5,18), enquanto nos ramos das estaquias são dois C-glicosilados vicenina-2 (-6,71) e 6,8-di-c-glu-diosmetina (-5,30). Nas folhas dos tecidos juvenis do enxerto o flavonoide com maior variação é também um C-glicosilado a vicenina-2 (-7,62) seguido por um O-glicosilado a didimina (-6,05).

Nas folhas das estaquias jovens temos um C-glicosilado 6,8-di-c-glu-diosmetina (-8,19) e um O-glicosilado a diosmina (-7,23) em maiores diferenças. Estes dados sugerem que a taxa de transmissão do patógeno (*Ca. Liberibacter asiaticus*) para plantas juvenis é significativamente menor do que aquela para mudas de laranjas maduras, devido a maior concentração de flavonoides C- e O-glicosilados nos tecidos juvenis, ou seja, esse grupo deve dar resistência aos tecidos jovens frente à bactéria.

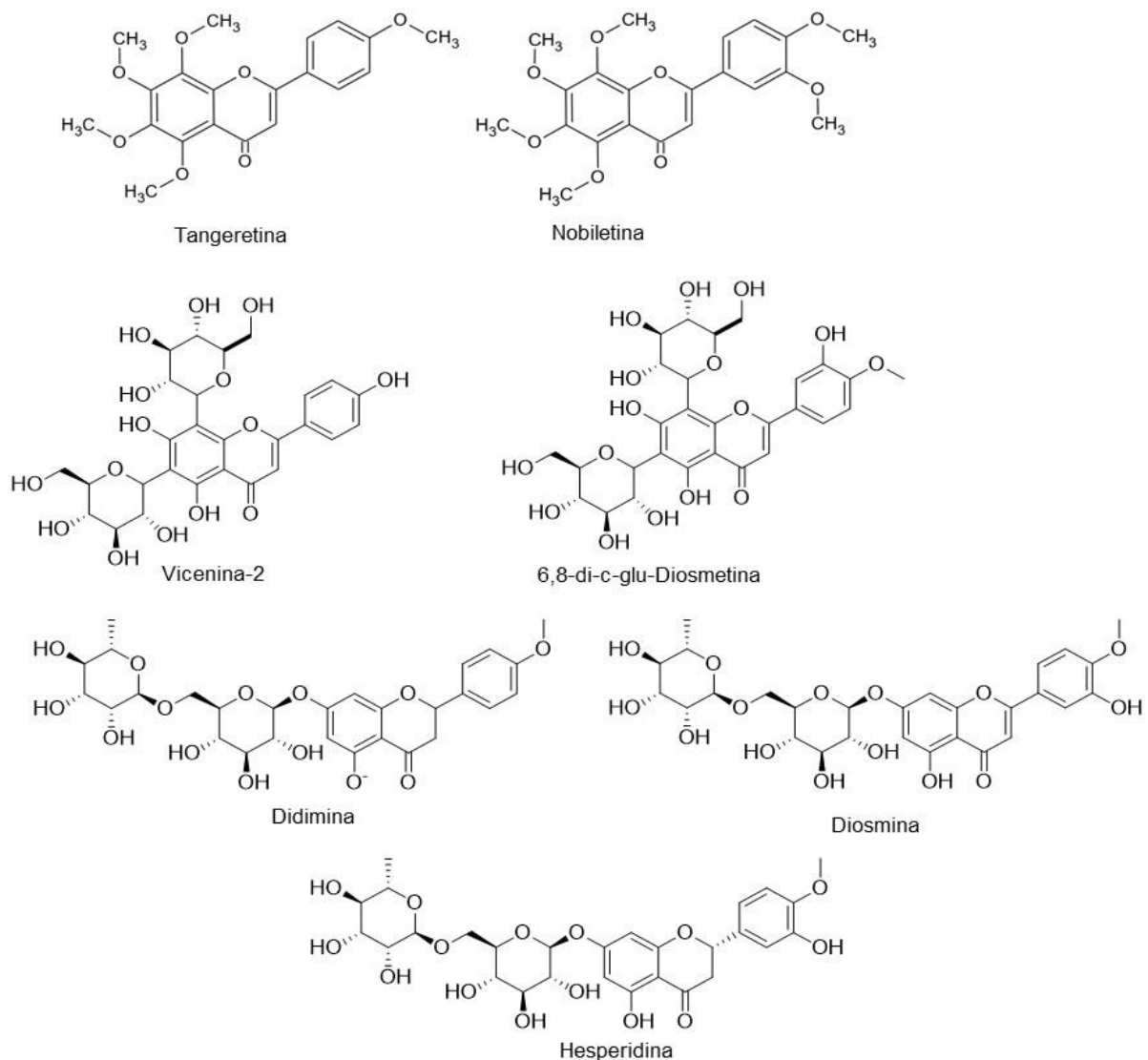


Figura 66 - Flavonoides que sofreram aumento na área de seu pico cromatográfico quando comparado tecidos maduros e jovens em enxertia e em estaquia com HLB.

Os flavonoides vicenina-2 (C-glu), didimina (O-glu), 6,8-di-c-glu-diosmetina e diosmina (O-glu) serão comprados e ensaiados *in vivo*, pois ainda não se consegue *Ca. Liberibacter asiaticus in vitro*. Os ensaios *in vivo* já estão em desenvolvimento pelo grupo usando Hesperidina a qual temos em grande quantidade.

Hesperidina e as cumarinas xantiletina, seselina e 5-metoxiseselina o grupo possui em quantidade suficiente para serem quantificadas e confirmar suas variações entre tecidos juvenis e maduros, na presença ou não da bactéria. Os resultados serão discutidos no tópico a seguir.

4.3. Validação do método de quantificação das cumarinas xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina, e do flavonoide hesperidina nas plantas de citros discutidas acima

4.3.1. Linearidade

Os cromatogramas para os padrões de cumarinas xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina, e do flavonoide hesperidina apresentaram grau de pureza acima de 95%. A curva de calibração de cada composto foi construída plotando a área das bandas contra sua respectiva concentração (média das triplicatas). A linearidade foi determinada através do cálculo de regressão linear obtido a partir do gráfico da área das bandas versus a concentração das soluções padrões.

A determinação da concentração do analito de interesse nas amostras de citros foi feita substituindo a área da banda medida no cromatograma na equação da reta obtida a partir da curva de calibração construída. Essa equação pode ser verificada na curva de calibração de cada composto (Figura 67), e as concentrações usadas para a construção da curva, assim como seus respectivos valores das áreas das bandas medidas, estão nas Tabelas 14-17.

Os coeficientes de correlação (R^2) obtidos para cada curva de padronização externa pode ser visto na figura 67, e todos acima de 0,99. Esses valores encontrados estão de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA, que admite curvas cujo R^2 seja maior que 0,98.

Tabela 14 - Dados da curva de calibração da Xantiletina.

Concentração (µg/mL)	Área do Pico (mAU)			Média	DP	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
1,00	337,38	346,62	331,77	334,58	7,50	2,24
2,50	731,39	721,09	727,61	724,35	5,21	0,72
5,00	1596,0	1672,0	1702,0	1634,0	54,6	3,34
10,0	3133,0	2967,0	2945,0	2956,0	103	3,48
20,0	5889,0	5975,0	5969,0	5929,0	48,0	0,81
40,0	14129	14258	14176	14153	65,3	0,46
60,0	21943	21789	21897	21843	79,1	0,36
80,0	30943	30494	30641	30568	229	0,75
100	39953	40451	40576	40202	330	0,82

DP = desvio padrão e CV = coeficiente de variação.

Tabela 15 - Dados da curva de calibração da Seselina.

Concentração (µg/mL)	Área do Pico (mAU)			Média	DP	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
1,00	1,32	1,29	1,25	1,27	0,04	2,77
2,50	2,59	2,68	2,61	2,60	0,05	1,82
5,00	5,28	5,23	5,32	5,26	0,05	0,86
10,0	10,4	10,3	10,2	10,2	0,09	0,90
20,0	21,7	21,9	22,0	21,8	0,16	0,72
40,0	47,0	47,2	47,4	47,1	0,22	0,46
60,0	73,9	74,3	74,8	74,1	0,49	0,65
80,0	95,4	97,2	96,8	96,1	0,90	0,93
100	121	121	122	121	0,71	0,58

DP = desvio padrão e CV = coeficiente de variação.

Tabela 16 - Dados da curva de calibração da 5-Metoxiseselina.

Concentração (µg/mL)	Área do Pico (mAU)			Média	DP	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
1,00	30,98	31,24	32,41	31,11	0,76	2,45
2,50	77,65	81,13	85,25	79,39	3,80	4,79
5,00	164,0	168,0	171,0	166,0	3,51	2,12
10,0	329,0	337,0	352,0	333,0	11,7	3,51
20,0	698,0	629,0	657,0	643,0	34,7	5,40
40,0	1489	1398	1439	1419	45,6	3,21
60,0	2176	2249	2198	2187	37,4	1,71
80,0	2858	2977	2887	2873	62,1	2,16
100,0	3547	3656	3712	3602	83,9	2,33

DP = desvio padrão e CV = coeficiente de variação.

Tabela 17 - Dados da curva de calibração da Hesperidina.

Concentração (µg/mL)	Área do Pico (mAU)			Média	DP	CV (%)
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
1,00	2,69	2,78	2,85	2,74	0,08	2,93
2,50	6,48	7,12	7,98	6,80	0,75	11,1
5,00	14,0	14,9	15,2	14,4	0,65	4,52
10,0	28,0	28,7	29,1	28,3	0,58	2,06
20,0	58,9	59,2	58,8	58,8	0,24	0,41
40,0	119	121	118	119	1,39	1,17
60,0	180	187	183	182	3,51	1,93
80,0	247	253	251	249	3,06	1,23
100	317	324	339	321	11,2	3,51

DP = desvio padrão e CV = coeficiente de variação.

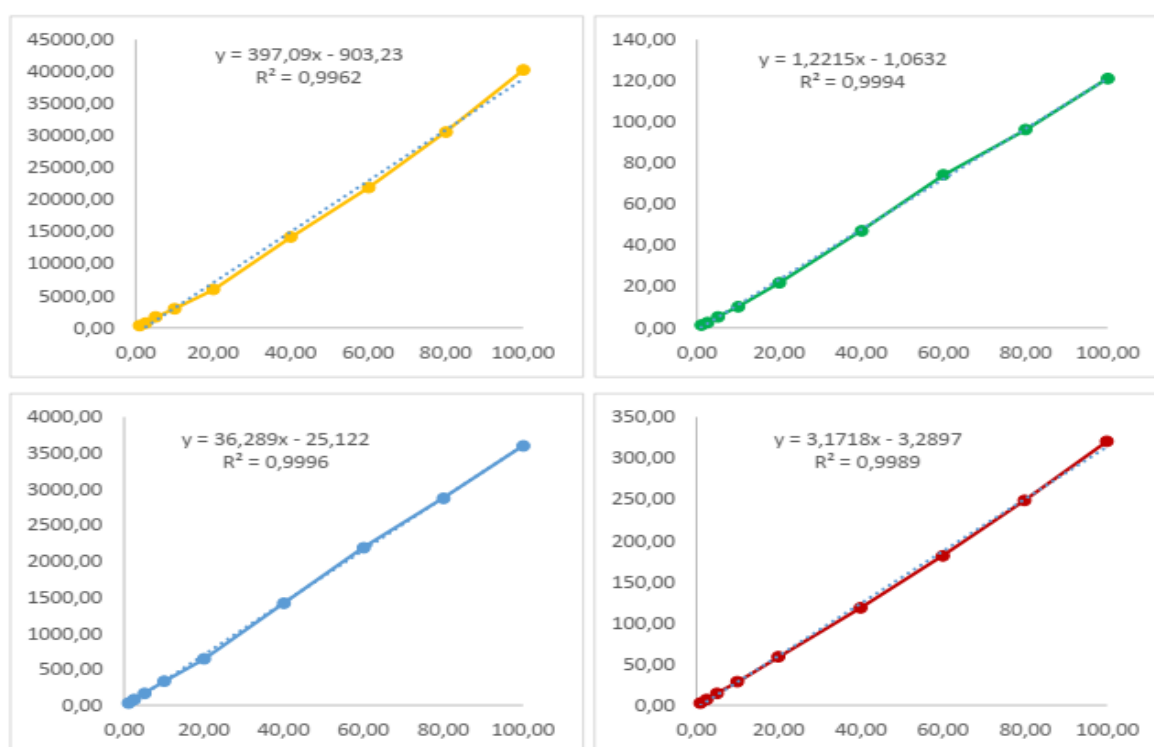


Figura 67 - Curva analítica das soluções padrões (----- Xantiletina, ----- Seselina, ----- 5-Metoxiseselina, ----- Hesperidina).

A avaliação da linearidade do método, das curvas de calibração das cumarinas e do flavonoide apresentaram uma correlação linear estatística coerente entre a faixa de concentração 1,00 e 100 µg mL⁻¹. O valor do coeficiente de correlação (R²) em 0,99 indicando a confiabilidade no método matemático aplicado. As análises de variância, com uma probabilidade ou valor-p de 0,01, onde o valor-p é menor a $p > 0,05$.

4.3.2. Precisão e Exatidão

O estudo da exatidão do método consiste em indicar a correlação que há entre os resultados obtidos com os aceitos como verdadeiros, onde estes são avaliados pelo cálculo da porcentagem média de recuperação para os analitos em três concentrações diferentes, assim como os valores de seu desvio padrão relativo de cada amostra. As concentrações usadas para as cumarinas e o flavonoide como controle de qualidade (baixa, média e alta) foram as seguintes: 1,20; 50,0; 95,0 µg mL⁻¹. Todas as amostragens foram preparadas em quintuplicatas e analisadas em três (n=3) dias diferentes, onde estas foram escolhidas pela faixa de trabalho usada na construção da curva de calibração.

A primeira concentração das soluções padrão das cumarinas e do flavonoide (1,20 µg mL⁻¹) foi selecionada para serem 120% maior que o ponto no intervalo de resposta linear. O segundo (50,0 µg mL⁻¹) e terceiro ponto (95,0 µg mL⁻¹) referem-se a 50 e 95% dos pontos de concentração mais altos na curva de calibração, respectivamente. A recuperação total média e desvio padrão (DP) encontrados foram de 99,3 ± 0,96%, mostrando a relação entre os valores teóricos e experimentais. Os resultados detalhados dos três níveis de concentração testados para as substâncias até agora quantificadas estão apresentados nas Tabelas 18 a 21.

Tabela 18 - Resultados de precisão e exatidão da Xantiletina.

Concentração (µg/mL)	Dia	Média	DP	CV (%)	Exatidão (%)
Intra-dia (n = 5)					
1,20	1	472,00	1,98	0,42	98,5
50,0	1	19635	27,6	0,14	96,1
95,0	1	37382	354	0,95	94,7
1,20	2	459,00	4,02	0,88	98,8
50,0	2	19140	51,3	0,27	96,4
95,0	2	36352	389	1,07	95,9
1,20	3	451,00	2,31	0,51	98,6
50,0	3	18806	42,5	0,23	96,3
95,0	3	35719	369	1,03	95,2
Inter-dia (n = 15)					
1,20	-	468,00	1,29	0,28	97,9
50,0	-	19515	20,7	0,11	96,5
95,0	-	37065	288	0,78	94,8

Tabela 19 - Resultados de precisão e exatidão da Seselina.

Concentração (µg/mL)	Dia	Média	DP	CV (%)	Exatidão (%)
Intra-dia (n = 5)					
1,20	1	1,69	0,07	4,14	97,9
50,0	1	57,6	1,09	1,89	95,4
95,0	1	107	1,61	1,50	98,3
1,20	2	1,71	0,12	7,02	99,8
50,0	2	59,8	1,03	1,72	96,7
95,0	2	122	1,11	0,91	94,6
1,20	3	1,58	0,14	8,86	99,5
50,0	3	59,1	0,78	1,32	96,1
95,0	3	153	2,96	1,93	94,2
Inter-dia (n = 15)					
1,20	-	1,49	0,09	6,04	97,8
50,0	-	57,1	1,01	1,77	96,9
95,0	-	118	3,45	2,92	93,9

Tabela 20 - Resultados de precisão e exatidão da 5-Metoxiseselina.

Concentração (µg/mL)	Dia	Média	DP	CV (%)	Exatidão (%)
Intra-dia (n = 5)					
1,20	1	41,80	0,39	0,93	99,1
50,0	1	1697	40,28	2,37	95,1
95,0	1	3469	50,97	1,47	99,4
1,20	2	39,70	0,66	1,66	99,8
50,0	2	1710	10,85	0,63	97,8
95,0	2	3451	5,76	0,17	94,9
1,20	3	41,20	0,84	2,04	99,8
50,0	3	1729	35,53	2,05	96,9
95,0	3	3508	23,42	0,67	94,6
Inter-dia (n = 15)					
1,20	-	42,01	0,41	0,98	98,9
50,0	-	1672	38,19	2,28	95,8
95,0	-	3519	49,38	1,40	94,1

Tabela 21 - Resultados de precisão e exatidão da Hesperidina.

Concentração (µg/mL)	Dia	Média	DP	CV (%)	Exatidão (%)
Intra-dia (n = 5)					
1,20	1	3,39	0,12	3,54	98,4
50,0	1	118	3,21	2,72	94,7
95,0	1	283	2,59	0,92	99,8
1,20	2	3,28	0,08	2,44	99,7
50,0	2	132	4,33	3,28	96,5
95,0	2	297	2,47	0,83	90,8
1,20	3	3,21	0,06	1,87	99,1
50,0	3	112	6,65	5,94	96,4
95,0	3	293	3,84	1,31	95,3
Inter-dia (n = 15)					
1,20	-	3,34	0,09	2,69	97,6
50,0	-	125	5,48	4,38	96,9
95,0	-	286	3,37	1,18	93,2

As soluções padrões das cumarinas e do flavonoide, usadas para a determinação da precisão foram avaliadas na faixa do intervalo linear de trabalho. A precisão intermediária, inter-dia, foi determinada analisando três níveis diferentes de concentrações de soluções padrões em três dias não consecutivos, para cada amostra analisada.

4.3.3. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção é aquele que representa a concentração padrão das amostras analisadas, nesse caso (os padrões de cumarinas e flavonoide) que teoricamente está sendo produzido em cada análise, enquanto que o limite de quantificação é analisado, através da sensibilidade de calibração da curva analítica. Os limites de quantificação e detecção foram determinados de acordo com a relação sinal/ruído. O limite de quantificação nas matrizes, foi menor do que o ponto da curva de calibração (LQ real); provando assim ser linear, exato e preciso, dentro da faixa de trabalho utilizada na avaliação do método analítico, como mostra a Tabela 22.

Tabela 22 - Parâmetros da curva de calibração do método analítico.

Parâmetros	Compostos (µg/mL)
Faixa de linearidade para todas as amostras	1,00-100,00
Limite de detecção para a Xantiletina	3,5
Limite de detecção para a Seselina	3,4
Limite de detecção para a 5-Metoxiseselina	0,7
Limite de detecção para a Hesperidina	1,6
Limite de quantificação para a Xantiletina	10,1
Limite de quantificação para a Seselina	9,8
Limite de quantificação para a 5-Metoxiseselina	1,2
Limite de quantificação para a Hesperidina	5,3

4.3.4. Aplicação do método de quantificação por CLAE-UV nas amostras dos enxertos de *C. sinensis* maduras e juvenis sobre *C. limonia* madura e nas estaquias de *C. sinensis* maduras e juvenis com HLB

O presente método desenvolvido é simples, reproduzível, sensível e preciso. Assim, ele foi aplicado com sucesso na quantificação das cumarinas xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina, e do flavonoide hesperidina nas plantas de citrus discutidas anteriormente. Os resultados encontram-se nas tabelas 23 a 26. As cumarinas propostas para quantificação foram detectadas somente nas partes inferiores das plantas, raízes e caule inferior do enxerto, e raízes das estaquias, logo somente estes órgãos foram analisados. O flavonoide foi detectado somente nas partes superiores das plantas, com isso somente o caule superior (ramos) e folhas foram avaliadas.

Como comentado acima as raízes e o caule inferior do enxerto se originaram de *C. limonia* madura, ou seja, ao analisarmos as variações para estes órgãos, a diferença deve ser uma influência de *C. sinensis* madura ou juvenil acima. A quantificação neste estudo não é relativa como nas discussões nos itens anteriores, os dados agora referem-se a uma real quantificação, confirmando a influência do enxerto acima sobre a base do enxerto.

Tabela 23 - Quantificação da Xantiletina.

Amostras	Área do Pico (mAU)	Concentração (µg/mL)
Raiz infectada		
Tecido Maduro enxertado	8927	24,76
Tecido Juvenil enxertado	1644	6,41
Tecido Maduro estaquia	9138	25,29
Tecido Juvenil estaquia	1425	5,86
Raiz sadia		
Tecido Maduro enxertado	6521	18,70
Tecido Juvenil enxertado	1186	5,26
Tecido Maduro estaquia	7412	20,94
Tecido Juvenil estaquia	1299	5,55
Caule inferior infectado		
Tecido Maduro enxertado	7838	22,01
Tecido Juvenil enxertado	1397	5,79
Caule inferior sadio		
Tecido Maduro enxertado	5412	15,90
Tecido Juvenil enxertado	1198	5,29

Tabela 24 - Quantificação da Seselina.

Amostras	Área do Pico (mAU)	Concentração (µg/mL)
Raiz infectada		
Tecido Maduro enxertado	932	764,80
Tecido Juvenil enxertado	362	297,59
Tecido Maduro estaquia	843	691,85
Tecido Juvenil estaquia	121	100,05
Raiz sadia		
Tecido Maduro enxertado	713	585,30
Tecido Juvenil enxertado	145	119,72
Tecido Maduro estaquia	621	509,89
Tecido Juvenil estaquia	98,7	81,77
Caule inferior infectado		
Tecido Maduro enxertado	821	673,82
Tecido Juvenil enxertado	169	139,39
Caule inferior sadio		
Tecido Maduro enxertado	512	420,54
Tecido Juvenil enxertado	87,8	72,84

Tabela 25 - Quantificação da 5-Metoxiseselina.

Amostras	Área do Pico (mAU)	Concentração (µg/mL)
Raiz infectada		
Tecido Maduro enxertado	98,9	3,42
Tecido Juvenil enxertado	56,2	2,24
Tecido Maduro estaquia	89,8	3,17
Tecido Juvenil estaquia	16,1	1,14
Raiz sadia		
Tecido Maduro enxertado	76,7	2,81
Tecido Juvenil enxertado	34,5	1,64
Tecido Maduro estaquia	65,6	2,50
Tecido Juvenil estaquia	23,4	1,34
Caule inferior infectado		
Tecido Maduro enxertado	81,2	2,93
Tecido Juvenil enxertado	13,2	1,06
Caule inferior sadio		
Tecido Maduro enxertado	42,3	1,86
Tecido Juvenil enxertado	11,9	1,02

Tabela 26 - Quantificação da Hesperidina.

Amostras	Área do Pico (mAU)	Concentração (µg/mL)
Caule Superior Infectado		
Tecido Maduro enxertado	3379	1066,97
Tecido Juvenil enxertado	6159	1943,94
Tecido Maduro estaquia	2042	645,20
Tecido Juvenil estaquia	5248	1656,56
Caule Superior sadio		
Tecido Maduro enxertado	6157	1943,31
Tecido Juvenil enxertado	7268	2293,78
Tecido Maduro estaquia	6046	1908,29
Tecido Juvenil estaquia	7157	2258,77
Folhas infectadas		
Tecido Maduro enxertado	1755	554,67
Tecido Juvenil enxertado	6968	2199,15
Tecido Maduro estaquia	1692	534,79
Tecido Juvenil estaquia	7968	2514,60
Folhas sadias		
Tecido Maduro enxertado	7379	2328,80
Tecido Juvenil enxertado	8379	2644,26
Tecido Maduro estaquia	7481	2360,97
Tecido Juvenil estaquia	7268	2293,78

É difícil de se explicar e é intrigante, que tanto para xantiletina e seselina a concentração delas diminuem bem mais que o dobro quando temos *C. sinensis* juvenil acima na enxertia (Tabelas 23 e 24). Este efeito não é ocasionado pela bactéria, porque ele ocorre também nas plantas sadias. Nas plantas em estaquia de *C. sinensis* madura ou juvenil esta diferença também é grande, sugerindo que a biossíntese das três cumarinas são função das idades ontogenéticas.

Os dados da enxertia sugerem que a biossíntese do precursor das cumarinas ocorre na parte superior da planta, assim diminui a biossíntese das três cumarinas nos tecidos maduros do porta enxerto. O precursor com a unidade prelina em C-6, 7-demetoxisuberosina e vários derivados são encontrados somente nas raízes de espécies de *Citrus* (levantamento segundo CERQUEIRA, 2016).

O precursor com a unidade prelina em C-8, ostenol e vários derivados também são encontrados nas raízes, porém este também nas cascar dos frutos de espécies de *Citrus* (CERQUEIRA, 2016). A xantiletina no enxerto com HLB e *C. sinensis* juvenil acima a sua concentração é reduzida em 3,8 vezes (madura 24,76 µg/mL/juvenil 6,41). Este valor é muito próximo para os enxertos sadios, 3,6 vezes. Estes valores de redução para a seselina foram 2,6 vezes nas plantas com HLB e 4,9 nas sadias. A diferença aqui é bem maior porque a concentração da seselina foi bem maior nas plantas doentes, o que será discutido mais à frente.

O mesmo se observa ao analisar os dados para o caule inferior, a concentração da xantiletina e seselina decrescem de 3,8 e 4,8 respectivamente nas plantas com HLB e nas sadias 3,0 e 5,8 respectivamente. Como os dados mostram que esta redução na concentração de ambas as cumarinas não é função da presença da bactéria, mas de tecidos juvenis acima do enxerto, conclui-se que 7-demetoxisuberosina e ostenol são sintetizados na parte superior do enxerto e transloucados para as partes inferiores para a biossíntese de ambas as cumarinas, e *C. sinensis* juvenil sintetiza menos, logo transloucando os precursores em quantidades menores. A única cumarina detectada nas partes superiores do enxerto foi um derivado do precursor angular a 7-demetilisotamarina, tanto nos ramos (caule superior) com nas folhas.

A 5-metoxiseselina ocorre em concentração muito menor que as outras duas, assim dispensando maiores discussões sobre ela. A concentração da seselina é elevadíssima quando comparado às outras duas. A concentração das três aumenta na presença da bactéria, contudo, muito mais as da seselina. Mesmo quando *C.*

sinensis juvenil se encontra acima da enxertia, onde a concentração das cumarinas diminui, na comparação entre sadia e com HLB, todas as três aumentam sua concentração.

O aumento da concentração da seselina nas plantas com HLB é muito grande, a diferença das concentrações de xantiletina nas raízes do enxerto com *C. sinensis* madura acima entre doente (24,76 µg/mL) e sadia (18,70 µg/mL) é de 6,06, enquanto esta diferença para seselina é de 179,5 (764,80 µg/mL – 585,30 µg/mL). O mesmo se observa para o caule inferior do enxerto, xantiletina 6,11 (22,01 µg/mL – 15,90 V) e seselina 253,28 (673,82 µg/mL – 420,54 µg/mL).

Estes dados mostram que a presença da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* ativa o caminho de biossíntese das cumarinas angulares. A variação do ostol (7,21), derivado do precursor de seselina, observada nas análises das raízes na tabela 8 reforça este comentário.

A concentração observada para a hesperidina foi elevada, no geral maior que aquelas obtidas para a seselina. A quantificação da hesperidina confirmou as observações nos itens anteriores de que tecidos juvenis ativam a biossíntese de flavonoides. O caule superior e folhas do enxerto se originaram de *C. sinensis* maduras e juvenis, logo as concentrações nas respectivas estaquias são similares às dos enxertos. No caule superior do enxerto com *C. sinensis* juvenil e com HLB a concentração de hesperidina é 1,8 maior que aquela com *C. sinensis* madura. Nestes mesmos caules sadios a relação é de 1,2. Nas folhas do enxerto com *C. sinensis* juvenil e com HLB a concentração de hesperidina é 4,0 maior que aquela com *C. sinensis* madura. Nestas mesmas folhas sadias a relação é de 1,1.

A diminuição da concentração da hesperidina nas plantas com HLB é muito grande; a diferença das concentrações nos ramos (caule superior) do enxerto com *C. sinensis* madura acima entre doente (1.066,97 µg/mL) e sadia (1.943,31 µg/mL) é de -876,34. A diferença das concentrações nos ramos do enxerto com *C. sinensis* juvenil acima entre doente (1.943,94 µg/mL) e sadia (2.293,78 µg/mL) é de -349.83. Nas folhas também há uma diminuição na concentração da hesperidina, porém a diferença das concentrações das folhas do enxerto com *C. sinensis* madura acima entre doente e sadia é mais que o dobro da observada nos ramos, -1774,13 µg/mL. Já a diferença das concentrações das folhas do enxerto com *C. sinensis* juvenil acima entre doente e sadia é próxima ao dos ramos, -445,11 µg/mL.

5. Conclusão

O estudo no geral mostrou a cumarina angular seselina e ostol no tratamento quimiométrico entre outras com maior diferença estatística significativa, quando comparado as raízes e caule inferior de tecidos maduros ou juvenis de laranja Pera enxertadas em limão cravo e com HLB. Estudo de quantificação de algumas cumarinas por CLAE-UV confirmou seselina com um aumento elevado na presença da bactéria.

Ambos os estudos mostraram que a presença da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* ativa o caminho de biossíntese das cumarinas angulares, em especial para a seselina e ostol. As cumarinas estão presentes nas partes inferiores do enxerto e devem ter potencial bactericida a *Ca. Liberibacter asiaticus*, cujo desenvolvimento inicial ocorre nas raízes como observado por JOHNSON e colaboradores (2014). Seselina e ostol devem ser ensaiados *in vivo*, pois ainda não se consegue *Ca. Liberibacter asiaticus in vitro*. Os ensaios *in vivo* já estão em desenvolvimento pelo grupo.

Ao contrário, os estudos sugerem que os flavonoides poderiam não ser bactericidas à *Ca. Liberibacter asiaticus*, usando hesperidina como modelo, pois a concentração deste é reduzida drasticamente na presença desta bactéria. Isto seria esperado, pois os flavonoides ocorrem nas partes superiores do enxerto e o desenvolvimento inicial desta bactéria ocorre nas raízes. Porém, eles permitem entender porque a taxa de transmissão do patógeno (*Ca. Liberibacter asiaticus*) para plantas juvenis (seedlings, plantas originadas de sementes) tem sido significativamente menor do que a taxa de transmissão do patógeno para mudas de laranjas maduras, já que os dados mostraram estes em quantidades maiores em tecidos juvenis.

A quantificação da hesperidina deixou claro a drástica diminuição de sua concentração em tecidos maduros. *Diaphorina citri* (psílideo) não nasce com a bactéria, este se contamina quando suga as folhas das plantas doentes e uma vez que adquiri a bactéria este irá disseminar a doença ao se alimentar novamente, dessa vez de uma planta sadia (AUBERT, 1987).

A transmissão do patógeno tem sido feita com insetos contaminados, e assume-se que a alimentação no floema seja essencial para a aquisição e inoculação, ou seja, o primeiro contato é com as partes superiores dos enxertos, onde há muitos

flavonoides, principalmente nos tecidos juvenis. Estes dados sugerem os flavonoides bactericidas sim, mas em plantas jovens onde eles estão em grande quantidade durante o ataque de *D. citri* contaminado.

Outro fato importante que o estudo mostrou foi que a redução na concentração das cumarinas xantiletina e seselina é função dos tecidos juvenis acima do enxerto. Isto permitiu inferir que 7-demetoxisuberosina e ostenol são sintetizados na parte superior do enxerto e transloucados para as partes inferiores para a biossíntese de ambas as cumarinas, e quando temos *C. sinensis* juvenil acima do enxerto ela sintetiza os precursores em menor quantidade, logo transloucando estes em quantidades menores. Esta hipótese está em desenvolvimento pelo grupo via estudos de biossíntese de cumarinas neste mesmo enxerto (AMARAL et al., 2020).

6. Referências Bibliográficas

ABAD-GARCÍA, B., GARMÓN-LOBATO, S., BERRUETA, L., GALLO, B., VICENTE, F. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta* 99, 213-224, 2012.

ABLAJAN, K., ABLIZ, Z., SHANG, X., HE., J.M., ZHANG, R.P., SHI, J.G. Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 41:(3), 352-360, 2006.

ABREU, M.F., NUNES, J.C.O., SANTOS, M., PEDROTTI, E.L. Estudos istológicos preliminares da microenxertia de plantas micropropagadas de macieira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 195-196, 2003.

ALBRECHT, U., BOWMAN, K.D. Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae* 147, 71-80, 2012.

AMARAL, J.C., SILVA, M.M., SILVA, M.F.G.F., ALVES, T.C., FERREIRA, A.G., FORIM, M.R., FERNANDES, J.B., PINA, E.S., LOPES, A.A., PEREIRA, A.M.S., NOVELLI, V.M. Advances in the Biosynthesis of Pyranocoumarins: Isolation and ¹³C-Incorporation Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet-Solid-Phase Extraction-Nuclear Magnetic Resonance Data. *Journal of Natural Products*, v. 83, p. 1409-1415, 2020.

ANDRADE, R.A. & MARTINS, A.B.G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (1), 134-136, 2003.

ANDRADE, M.D.S., RIBEIRO, L.P., BORGONI, P.C., SILVA, M.F.G.F., FORIM, M.R., FERNANDES, J.B., VIEIRA, P.C., VENDRAMIN, J.D., MACHADO, M.A. Essential Oil Variation from Twenty Two Genotypes of *Citrus* in Brazil-Chemometric Approach and

Repellency Against *Diaphorina citri* Kuwayama. *Molecules*. Jun 22; 21(6), 814, 2016. doi: 10.3390/molecules21060814.

AUBERT, B. *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the biological aspects on citrus greening disease: strategies. *Fruits* 42, 149-162, 1987.

BASSANEZI, R.B., MONTESINO, L.H., GASPAROTO, M.C.G., BERGAMIN, A., AMORIM, L., Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in Sao Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130, 577-86, 2011.

BASSANEZI, R.B., LOPES, S.A., MIRANDA, M.P., WULFF, N.A., VOLPE, H.X.L., AYRES, A.J. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathology* v. 45, pg. 251–264, 2020.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88, 7-37, 2006.

BELASQUE JUNIOR, J., BERGAMIN FILHO, A., BASSANEZI, R.B., BARBOSA, J.C., FERNANDES, N.G., YAMAMOTO, P.T., LOPES, S.A., MACHADO, M.A., LEITE JUNIOR, R.P., AYRES, A.J., MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology* 34, 137-145, 2009.

BELLETE, B.S. Estudo da variação do perfil químico de citrus com greening e sadios, visando obter informações sobre mecanismo de defesa. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, Tese de Doutorado, 2013.

CAPOOR, S.P., RAO, D.G., VISWANATH, S.M. *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science* 37, 572-576, 1967.

CASTLE, W.S., TUCKER, D.P.H., KREZDORN, A.H., YOUTSEY, C.O. Rootstocks for Florida citrus: rootstock selection, the first step to success. 2nded. Gainesville: University of Florida, 1993. 92p.

CERQUEIRA, C.N. Busca de biomarcadores como indicadores do mecanismo de defesa da laranja Pera à infecção de CVC através de análise Metabonômica. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, Tese de Doutorado, 2013.

CÉSAR, H.P. Manual Prático do Enxertador, 215ª ed. São Paulo: Editora Nobel, 1996.
CIESLA, Ł. Biological Fingerprinting of Herbal Samples by Means of Liquid Chromatography. *Chromatography Research International* 2012, V. 2012, Article ID 532418, 9 pages doi:10.1155/2012/532418, Review Article.

CIFUENTES-ARENAS, J.C., GOES, A., MIRANDA, M.P., BEATTIE, G.A.C., LOPES, S.A. *Citrus* flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. *PLoS ONE* 13(1), e0190563, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190563>.

COLETTA-FILHO, H.D., TARGON, M.L.P.N., TAKITA, M.A., DE NEGRI J.D., POMPEU JR.J., MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease* 88,1382, 2004.

CUYCKENS, F, CLAEYS M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospraygenerated deprotonated and sodiated molecules. *J. Mass Spectrom.*, 40:(3), 364-372, 2005.

DUGRAND, A., OLRYS, A., DUVAL, T., HEHN, A., FROELICHER, Y., BOURGAUD, F. Coumarin and Furanocoumarin Quantitation in Citrus Peel via Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (UPLC-MS). *J. Agric. Food Chem.* 61, 10677-10684, 2013.

ETXEBERRIA, E., GONZALEZ, P., ACHOR, D., ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74, 76-83, 2009.

FERRI, C.P. Enraizamento de estacas de citrus. *Revista Brasileira de Fruticultura* 19 (1): 113-121, 1997.

FOLIMONOVA, S.Y., ACHOR, D.S. Early events of citrus greening (huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100, 949-58, 2010.

FUNARI, C.S., EUGSTER, P.J., MARTEL, S., CARRUPT, P.A., WOLFENDER, J.L., SILVA, D.H.S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. *J. Chromatogr. A*, 1259, 167-178, 2012.

GRAHAM, J.H., JOHNSON, E.G., GOTTWALD, T.R., IREY, M.S. Pre-symptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by Huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Disease* 97, 1195-1199, 2013.

HAGGAG, E.G., MAHMOUD, I.I., ABOU-MOUSTAFA, E.A., MABRY, T.J. Flavonoids from the Leaves of *Citrus aurantium* (Sour Orange) and *Citrus sinensis* (Sweet Orange), *Asian J. Chem.* 11, 707-714, 1999.

HALL, D.G., ALBRECHT, U., BOWMAN, K.D. Transmission Rates of *Ca. Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid Are Enhanced by the Presence and Developmental Stage of Citrus Flush. *Journal of Economic Entomology*, 109(2), 558–563, 2016.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES-Jr., F.T., GENEVE, R.L. *Plant Propagation: principles and practices*; Simon & Schuster, 1997, 770 p.

HEYDEN, Y.V. Extracting Information from Chromatographic Herbal Fingerprints. *LCGC Europe* V. 21, Issue 9 Pag. 438–443, 09-01-2008.

JAGOUEIX, S., BOVÉ, J.M., GARNIER, M. The Phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 379-386, 1994.

JIANG, Y., DAVID, B., TU, P., BARBIN, Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines--a review. *Analytical Chimica Acta* 657, 9-18, 2010.

JOHNSON, E.G., WU, J., BRIGHT, D.B., GRAHAM, J.H. Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology* 63, 290-298, 2014.

KIM, H.K., CHOI, Y.H., VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol.* 29, 267-275, 2011.

KOH, E-J., ZHOU, L., WILIAMS, D.S., PARK, J., DING, N., DUAN, Y-P., KANG, B-H. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". *Protoplasma* 249, 687-697, 2012.

LAFLECHE, D., BOVE, J.M. Mycoplasmas in the argumes attentis the greening, stubborn, or the diseases similaries. *Fruits* 25, 455-465, 1970.

LAST, R.L., JONES, A.D., SHACHAR-HILL, Y. Towards the plant metabolome and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 8, pages167–174, 2007.

LI W.B., LEVY L., HARTUNG J.S. Quantitative distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology* 99, 139-44, 2009.

LOPES, S.A., BERTOLINI, E., FRARE, G.F., MARTINS, E.C., WULFF, N.A., TEIXEIRA, D.C., FERNANDES, N.G., CAMBRA, M. Graft Transmission Efficiencies and Multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in Citrus Plants. *Phytopathology* vol. 99, No. 3, 301-306, 2009.

LOPES, S.A., FRARE, G.F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Plant Disease 92, 21-24, 2008.

LU, L., SONG, F.R., TSAO, R., JIN, Y.R., LIU, Z.Q., LIU, S.Y. Studies on the homolytic and heterolytic cleavage of kaempferol and kaempferide glycosides using electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 24:169–172, 2010.

LUO, X., YEN, A.L., POWELL, K.S., WU, F., WANG, Y., ZENG, L., YANG, Y., CEN, Y. Feeding behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its acquisition of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', on huanglongbing-infected *Citrus reticulata* leaves of several maturity stages. Fla. Entomol. 98, 186-192, 2015.

MATTOS JUNIOR, D., De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Jr., J. Citros. 1 ed. Campinas: Instituto Agronômico e Fapesp, v. 1, p. 929, 2005.

MURRAY, R.G.E., SCHLEIFER, K.H. Taxonomic notes: a proposa I for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 174-176, 1994.

PIZZATTO, M., WAGNER JÚNIOR, A., LUCKMANN, D., PIROLA, K., CASSOL, D.A., MAZARO, S.M. Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. Revista Ceres 58 (4): 487-492, 2011.

RIECKMANN, R.C., SCARAMUZZA, L.T., URNHANI, C.O., MARZOLA, D.A., CAMPOS, A.J. Greening. Revista científica eletrônica de Agronomia, ISSN: 1677-0293, ano VII, Número 13, 2008.

ROCHA, A.C., TAVARES, E.D., SANDRINI, M., CARVALHO, S.A., SILVA, L.F.C. Propagação de três espécies de citrus através do enraizamento de estacas verdes. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal v.10, n.2, p.31-33, 1988.

SALEEM, M., FAROOQ, A., AHMAD, S., SHAFIQ, N., RIAZ, N., JABBAR, A., ARSHAD, M., MALIK, A. Chemical constituents of *Citrus sinensis* var. Shukri from Pakistan. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 12 702-706, 2010.

SARDINHA, R.M.A. Manual do viveiro Frutícolas, Instituto Marques de Valle Flor, Projeto de Desenvolvimento dos Recursos Naturais, Município da Cunha, Província do Huambo, (Angola), 2008; <https://docplayer.com.br/11433691-Manual-do-viveiro-fruticolas-raul-manuel-de-albuquerque-sardinha.html>

SAWABE, A., KUMAMO, H., MATSUBA, Y. Bioactive Glycosides in Citrus Fruit Peels. *Bull. Inst. Compr. Agric. Sci. Kinki Univ.* 67, 57-67, 1998.

SERIKAWA, R. H., E. A. BACKUS, AND M. E. ROGERS. Effects of soil-applied imidacloprid on Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) feeding behavior. *J. Econ. Entomol.* 105, 1492–1502, 2012.

SHAHBANDEH, M. Global leading orange producers 2019/2020. Aug 12, 2020. <https://www.statista.com/statistics/1044840/major-orange-producers-worldwide>.

SIMMONDS, M. S. J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: Feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56, 245–252, 2001.

SAWABE, A., KUMAMO, H., MATSUBA, Y. Bioactive Glycosides in Citrus Fruit Peels. *Bull. Inst. Compr. Agric. Sci. Kinki Univ.* 67, 57-67, 1998.

SALEEM, M., FAROOQ, A., AHMAD, S., SHAFIQ, N., RIAZ, N., JABBAR, A., ARSHAD, M., MALIK, A. Chemical constituents of *Citrus sinensis* var. Shukri from Pakistan. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 12 702-706, 2010.

SERIKAWA, R. H., E. A. BACKUS, AND M. E. ROGERS. Effects of soil-applied imidacloprid on Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) feeding behavior. *J. Econ. Entomol.* 105, 1492–1502, 2012.

SIMMONDS, M. S. J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: Feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56, 245–252, 2001.

SOARES, M.S., SILVA, D.F., AMARAL, J.C., SILVA, M.M.D., FORIM, M.R., RODRIGUES-FILHO, E., SILVA, M.F.G.F., FERNANDES, J.B., MACHADO, M.A., SOUZA, A.A., MARTINS, C.H.G. Rapid differentiation of graft *Citrus sinensis* with and without *Xylella fastidiosa* infection by mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 1–14, 2020.

SOARES, M. S. Estudo da variação do perfil químico de *Citrus sinensis* sobre *C. limonia* após a inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, Tese de Doutorado, 2011.

TATINENI, S., SAGARAM, U.S., GOWDA, S., *et al.* In planta distribution of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98, 592-9, 2008.

TEIXEIRA, D.C., DANET, J.L., EVEILLARD, S., MARTINS, E.C., JESUS JR., W.C, YAMAMOTO, P.T., LOPES, S.A. BASSANEZI R.B., AYRES A.J., SAILLARD C., BOVÉ J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo state, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes* 19, 173-179, 2005.

TISTAERT, C., DEJAEGHER, B., HEYDEN, Y.V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Analytical Chimica Acta* 690, 148-161, 2011.

VERPOORTE, R., CHOI, Y.H., KIM, H.K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews* volume 6, pages 3–14, 2007.

WOLFENDER, J.L., GLAUSER, G., BOCCARD, J., RUDAZ, S. MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1417-30, 2009.

ZHONG, X.K.; LI, D.C.; JIANG, J.G. Identification and quality control of Chinese medicine based on the fingerprint techniques. *Curr. Med. Chem.* 2009, 16, 3064-3075.