

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

**ESTUDO QUÍMICO EM PATÓGENOS E VETORES DE  
DOENÇAS DE CITROS: *Xylella fastidiosa* e *Diaphorina citri***

**Moacir dos Santos Andrade\***

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

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva**

\* bolsista CNPq

**São Carlos - SP  
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A553eq

Andrade, Moacir dos Santos.

Estudo químico em patógenos e vetores de doenças de citros : *Xylella fastidiosa* e *Diaphorina citri* / Moacir dos Santos Andrade. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
237 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química orgânica. 2. Clorose Variegados Citros. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Cromatografia gasosa. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

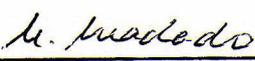
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

---

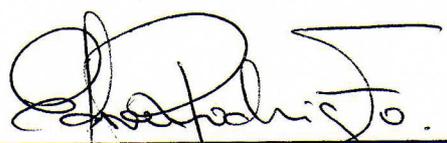
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Moacir dos Santos Andrade**, realizada em 04 de julho de 2011:*

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcos Antonio Machado

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Bloch Junior

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de São Carlos através do Departamento de Química pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela dedicação, confiança e ensinamentos, na orientação deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Dr. João Batista Fernandes, Dr. Paulo Cesar Vieira e Dr. Moacir Rossi Forim que participaram diretamente e/ou indiretamente na execução deste trabalho.

Ao, Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pela cumplicidade na realização dos experimentos via LC-MS e disponibilidade do laboratório.

À Dra. Alessandra Alves de Souza e Carolina Munari Rodrigues pela forte contribuição em todo aspecto envolvidos a bactéria *Xylella fastidiosa*.

À Dr. Marcos Antônio Machado, abriu as portas do Centro de Citricultura *Sylvio Moreira* – IAC, pela prestatividade e disponibilidade do laboratório.

Ao Prof. Dr. Djair Vendramin, Dr. Paulo Cesar Borgoni e Msc. Leandro Ribeiro, pela colaboração dos ensaios com *Diaphorina citri*, paciência e ensinamentos no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas, ESALQ-USP.

Ao, Prof. Dr. Antonio G. Ferreira e Eduardo Sanchez pela colaboração nos experimentos via LC-SPE-NMR do Laboratório de Ressonância magnética nuclear - UFSCAR.

Á todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar.

*Muito Obrigado!*



## ABREVIATURA E SÍMBOLOS

$\delta$  - deslocamento químico

acil-HSLs - homoserinas lactonas aciladas

ACN – acetonitrila

AHLs - *N*-acil-homoserina lactonas

AI - Autoindutor

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

CAR/PDMS - Carboxeno/Polimetilsiloxano

CDCl<sub>3</sub> - Clorofórmio Deuterado

CDCN - Acetonitrila deuterada

CG-EAD (Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector Eletroantenográfico)

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY - *Correlation Spectroscopy*

CVC - Clorose Variegada dos Citros

d - Dubleto

D<sub>2</sub>O - Água deuterada

DAD - *Diode Arrange Detector*

dd - duplo dubleto

ddd - duplo duplo dupleto

DKPs - dicetopiperazinas

DSF- *Diffusional Signal Factor*

EAG - eletroantenografia

EM - Espectrometria de massas

ESI - *Electrospray Ionization*

eV - eletro volts

HCA - *Hierarchical Clusters Analysis*

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Hz – Hertz

IAC - Instituto Agronômico de Campinas

IR - Índice de Retenção de Kovats

*J* - Constante de Acoplamento

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

LC-MS-*Liquid chromatography coupled mass spectrometry*

LC-NMR - *Liquid Chromatography coupled to Nuclear Magnetic Resonance*

LC-SPE-NMR - *Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection coupled to Solid-Phase Extraction coupled to Nuclear Magnetic Resonance*

*m* - multipletto

*m/z* - relação massa sobre carga

MeOH - Metanol

MHz - Megahertz

min - minutos

MRM - *Mutiple Reaction Monitoring*

PA - Poliacrilato

PCA - *Principal Components Analysis*

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

PDMS/DVB – Polimetilsiloxano/Divinilbenzeno

*ppm* - partes por milhão

PW - *Periwinkle Wilt*

QS - *quorum-sensing*

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

*s* - Singleto

SIR - *Selected Ion Recording*

*sl* - Singleto largo

SPE - *Solid-Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida)

SPME - *Solid Phase Micro-Extraction* (Microextração em Fase Sólida)

*t* - Tripleto

t.r. – Tempo de Retenção

TIC - *Total Ion Chromatogram*

UV - *Ultraviolet Detector*

## LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1.1. Ocorrência de moléculas de baixo peso molecular no gênero <i>Pseudomonas</i> .....	16
TABELA 1.2. Estrutura de algumas moléculas de comunicação entre bactérias.....	18
TABELA 3.1. Reagentes e suas concentrações necessárias para preparar um determinado volume do meio PW.....	30
TABELA 3.2. Condições cromatográficas avaliadas para análise do extrato polar da <i>X. fastidiosa</i> .....	35
TABELA 3.3. Condições de condicionamento para as fibras (Supelco).....	38
TABELA 4.1. Compostos identificados por CG-EM no extrato hexânico.....	49
TABELA 4.2. Valores de massas calculados de DKPs no modo positivo de ionização....	78
TABELA 4.3. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) em comparação com os dados da literatura [FURTADO, <i>et al.</i> , 2005, $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz]....	109
TABELA 4.4. Dados de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) da <i>ciclo</i> (Leu-Leu) comparados com dados da literatura [HUANG <i>et al.</i> , 2007, $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz].....	115
TABELA 4.5. Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) do <i>p</i> -hidroxibenzóico.....	119
TABELA 4.6. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) do <i>ciclo</i> (Pro-Tyr) em comparação com os dados da literatura.....	127
TABELA 4.7. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) do <i>ciclo</i> (Tyr-Val) em comparação com os dados da literatura.....	128
TABELA 4.8. Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) do <i>ciclo</i> (Pro-Leu) em comparação com os dados da literatura.....	135
TABELA 4.9. Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) do <i>ciclo</i> (Pro-Ile) em comparação com os dados da literatura.....	141
TABELA 4.10. Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) do <i>ciclo</i> (Pro-Leu) em comparação com os dados da literatura.....	146
TABELA 4.11. Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) do <i>ciclo</i> (Pro-Leu) em comparação com os dados da literatura.....	153
TABELA 4.12. Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) do <i>ciclo</i> (Pro-Phe) em comparação com os dados da literatura.....	160
TABELA 4.13. Percentual relativo das classes de compostos identificados por CG-EM dos óleos essenciais da figura 4.1.....	200

---

## LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 1.1. Esquema Ilustrativo de interações entre espécies.....	6
FIGURA 1.2. Aspectos físicos dos frutos e folhas infectados pela CVC.....	11
FIGURA 1.3. Figura ilustrativa que demonstra o bloqueio dos vasos xilemáticos, causando sérios danos à planta.....	12
FIGURA 1.4. Modelo dos estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano.....	13
FIGURA 1.5. Moléculas identificadas em <i>C. albicans</i> (Tirosol e Farnesol).....	17
FIGURA 1.6. <b>a)</b> Furanosil borato diéster (AI-2), <b>b)</b> diéster não boratada (vAI-2) e <b>c)</b> ácido 3-hidroxi metil éster palmítico.....	17
FIGURA 1.7. (A) Estrutura proposta para molécula DSF produzida pela bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> (ácido 12-metil-tetradecanóico), (B) Molécula DSF produzida pela bactéria <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> (ácido <i>cis</i> -11-metil-2-dodecenóico).....	21
FIGURA 1.8. Moléculas sinalizadoras da família DSF relacionado a uma gama de bactérias.....	22
FIGURA 3.1. Figura ilustrativa mostrando em destaque as células bacterianas aderidas à parede do erlemneyer, após 10 dias de crescimento.....	31
FIGURA 3.2. Imagem ilustrativa do equipamento LC-SPE-NMR.....	37
FIGURA 4.1. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM do extrato hexânico sobrenadante da <i>Xylella fastidiosa</i> e do branco <i>PW</i> .....	42
FIGURA 4.2. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM.....	43
FIGURA 4.3. Espectros de massas da banda tr 14,550.....	43
FIGURA 4.4. Proposta estrutural para alguns fragmentos característicos da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Val) observados por CG-EM ( <i>IE</i> , 70 eV).....	44
FIGURA 4.5. Proposta estrutural para formação do íon de <i>m/z</i> 153, que decompostos pela expulsão de CO formando o pico <i>m/z</i> 125 observados por CG-EM ( <i>IE</i> , 70 eV).....	44
FIGURA 4.6. Espectros de massas das Substâncias em t.r. 33.375 (A) e t.r. 37.918 (B) ( <i>D,L ciclo</i> (Pro-Phe)).....	45
FIGURA 4.7. Espectros de massas das Substâncias em t.r. 16,970 (A) e t.r. 17,778 (B) ( <i>D,L ciclo</i> (Pro-Leu)).....	46
FIGURA 4.8. Íons característicos das Dicetopiperazinas.....	47
FIGURA 4.9. Cromatograma adquirido por monitoramento de íons selecionados <i>m/z</i> 154 (A), <i>m/z</i> 125 (B), <i>m/z</i> 91 (C) e <i>m/z</i> 70 (D).....	47
FIGURA 4.10. Espectros de massas das DKPs <i>ciclo</i> (Val-Ala) e <i>ciclo</i> (Val-Phe).....	48
FIGURA 4.11. Espectros de massas dos picos em t.r. 17.82 min (A) e t.r. 32.17 min (B)....	49

---

FIGURA 4.12. Alguns fragmentos característicos da N-acil-HSLs.....	50
FIGURA 4.13. Cromatograma adquirido do íon selecionado $m/z$ 143, 113, 102, 101 e 100.	51
FIGURA 4.14. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM.....	52
FIGURA 4.15. Espectros de massas e compostos identificados no extrato hexânico do precipitado celular.....	53
FIGURA 4.16. Esquema geral de fragmentação de ésteres.....	55
FIGURA 4.17. Cromatograma adquirido por seleção de íons $m/z$ 69, 74, 83 e 87.....	55
FIGURA 4.18. Cromatograma adquirido dos íons selecionados $m/z$ 143 e 113, 102, 101 e 100.....	56
FIGURA 4.19. Cromatograma adquirido por íons selecionados $m/z$ 74 e 87 no extrato hexânico sobrenadante.....	57
FIGURA 4.20. Cromatograma adquirido por íons selecionados $m/z$ 69 e 83 no extrato hexânico sobrenadante e espectros de massas da banda com t.r. 17.82 (A) e t.r. 32.17 (B)...	58
FIGURA 4.21. Cromatograma adquirido por íons selecionados $m/z$ 154, 128, 125, 91 e 70 no extrato hexânico do precipitado celular.....	59
FIGURA 4.22. Cromatogramas de íons totais: (A) CAR/PDMS, (B) PDMS/DVB e (C) PA.....	62
FIGURA 4.23. Substância 2,4-diisocianato tolueno e seu respectivo espectro de massas.....	63
FIGURA 4.24. Espectros de massas dos compostos com tempo de retenção em 27.66 (A) e 34.79 (B).....	64
FIGURA 4.25. Proposta de fragmentação para o octadecen-2-ol.....	65
FIGURA 4.26. Espectros de massas da banda cromatográfica t.r. 16,37 min.....	65
FIGURA 4.27. Proposta de fragmentação para undecan-2-ona.....	66
FIGURA 4.28. Espectros de massas da banda cromatográfica t.r. 12,67 min.....	66
FIGURA 4.29. Proposta de fragmentação para hept-6-ene-2-ona.....	66
FIGURA 4.30. Espectros de massas da banda cromatográfica t.r. 16,57 min.....	67
FIGURA 4.31. Proposta de fragmentação para 2,7-diidroxi octano.....	67
FIGURA 4.32. Espectros de massas das bandas cromatográficas t.r. 21,63 (A) e 23,35 (B) min.....	68
FIGURA 4.33. Espectros de massas das bandas cromatográficas t.r. 21,74 min.....	68
FIGURA 4.34. Proposta de fragmentação para 9-aril-2-hidroxinonano.....	69
FIGURA 4.35. Espectros de massas das bandas cromatográficas t.r. 23,77 min.....	69
FIGURA 4.36. Proposta estrutural para 12-aril-2-hidroxinonano e 12-aril-3-hidroxinonano	70
FIGURA 4.37. Espectros de massas das bandas cromatográficas t.r. 24,07 e formação do	

ion $m/z$ 105.....	70
FIGURA 4.38. Espectros de massas das bandas cromatográficas t.r. 48,15 (A), t.r. 50,45 (B) e t.r. 54,19 (C).....	71
FIGURA 4.39. Cromatograma DAD-HPLC do extrato acetato de etila do sobrenadante da <i>Xylella fastidiosa</i> .....	73
FIGURA 4.40. (A) Cromatograma no modo <i>full scan</i> da amostra padrão com $m/z$ 211. (C) Espectro no modo <i>full scan</i> do íon selecionado $m/z$ 211 do extrato acetato de etila sobrenadante.....	74
FIGURA 4.41. (A) Cromatograma de íons produtos $m/z$ 211 no modo ESI <sup>+</sup> da amostra padrão. (B) Cromatograma de íons produtos $m/z$ 211 no modo ESI <sup>+</sup> do extrato acetato de etila do sobrenadante.....	74
FIGURA 4.42. Possíveis isômeros da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	75
FIGURA 4.43. Espectros de massas para os íons produtos $m/z$ 211. Amostra padrão (A) e no extrato (B, C, D).....	76
FIGURA 4.44. Proposta de fragmentação para <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	76
FIGURA 4.45. Cromatograma para $m/z$ 245 na amostra padrão (A) e no extrato (B). Espectro de massa <i>full scan</i> das bandas com t.r. 20.7 e 22.5, para amostra padrão (C) e extrato (D).....	80
FIGURA 4.46. Cromatograma para íons produtos $m/z$ 245. Amostra padrão (A) e o extrato (B).....	80
FIGURA 4.47. Espectro de massas do íon produtos $m/z$ 245. Amostra padrão (A) e (B) e o extrato (C) e (D).....	81
FIGURA 4.48. Proposta de fragmentação para <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	82
FIGURA 4.49. (A) Cromatograma para $m/z$ 261 no extrato e (B) espectro de massa <i>full scan</i> com t.r. 9,6 do extrato.....	83
FIGURA 4.50. Cromatograma de íons totais para os íons produtos $m/z$ 261. Amostra padrão <i>ciclo</i> (Pro-Tyr) (A) e no extrato (B).....	83
FIGURA 4.51. Espectro de massas dos íons produtos $m/z$ 261 das bandas com t.r. 9,28 (A) e 9,61(B) para amostra <i>ciclo</i> (Pro-Tyr) e da banda t.r. 9,52 (C) do extrato.....	84
FIGURA 4.52. Proposta de fragmentação para o <i>ciclo</i> (Pro-Tyr).....	85
FIGURA 4.53. Cromatograma no modo <i>full scan</i> para $m/z$ 197 no extrato.....	86
FIGURA 4.54. Espectro de massas íons produtos para $m/z$ 197 no extrato com t.r. 9,98 min.....	86
FIGURA 4.55. Proposta de fragmentação para o <i>ciclo</i> (Pro-Val).....	87

FIGURA 4.56. Cromatograma de íons produtos com $m/z$ 185 do extrato.....	88
FIGURA 4.57. Espectro de massas do íon produto $m/z$ 185 com t.r. 13.48 min do extrato...	88
FIGURA 4.58. Proposta de fragmentação para o <i>ciclo</i> (Ala-Leu).....	89
FIGURA 4.59. Estruturas da <i>ciclo</i> (Val-Ile) e <i>ciclo</i> (Val-Leu).....	90
FIGURA 4.60. Espectro no modo <i>full scan</i> para íon seleccionado $m/z$ 213.....	90
FIGURA 4.61. Espectro de massas do íon produto $m/z$ 213 em t.r. 25.76 min.....	90
FIGURA 4.62. Proposta de fragmentação para <i>ciclo</i> (Val-Leu).....	91
FIGURA 4.63. Cromatograma de íons produtos $m/z$ 268 do extrato.....	91
FIGURA 4.64. Espectro de massas de íons produtos da banda com t.r. em 29.66 e 30.14....	92
FIGURA 4.65. Diketopiperazinas <i>ciclo</i> (Leu-Leu) (A), <i>ciclo</i> (Ile-Leu) (B) e a <i>ciclo</i> (Ile-Ile) (C).....	92
FIGURA 4.66. Diketopiperazinas <i>ciclo</i> (Leu-Leu) (A) e a <i>ciclo</i> (Leu-Ile) (B).....	93
FIGURA 4.67. Cromatograma para íons produtos $m/z$ 247 (A) e espectro de massas do íon produto $m/z$ 247 com t.r. 27.86 min (B).....	93
FIGURA 4.68. Cromatograma para íons produtos $m/z$ 245 (A) e espectros de massas da banda no t.r. 20,72 min (B) e no t.r. 22,59 min (C).....	94
FIGURA 4.69. Cromatograma para SIR $m/z$ 136 dos íons produtos $m/z$ 327 do extrato.....	95
FIGURA 4.70. Espectro de massas do íon produto $m/z$ 327 em t.r. 12,10 min.....	95
FIGURA 4.71. Cromatograma para íons produtos provenientes do $m/z$ 311 do extrato.....	95
FIGURA 4.72. Espectro de massas de íons produtos para $m/z$ 311 em t.r. 13.07, 14.12, 21.95 e 24.58 min.....	96
FIGURA 4.73. Cromatograma de íons totais: volume de injeção a 0,1 $\mu$ l, 1 $\mu$ l, 5 $\mu$ l e 10 $\mu$ l da amostra padrão <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	98
FIGURA 4.74. Cromatograma do extrato das folhas de <i>C. sinensis</i> para <i>ciclo</i> (Pro-Leu) ( $m/z$ 211).....	99
FIGURA 4.75. Cromatograma do extrato do caule superior de <i>C. sinensis</i> para <i>ciclo</i> (Pro-Leu) ( $m/z$ 211).....	99
FIGURA 4.76. Esquema do sistema de LC-DAD-SPE-NMR.....	101
FIGURA 4.77. Cromatograma LC-DAD-SPE-NMR do extrato acetato de etila do sobrenadante da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> ,.....	102
FIGURA 4.78. Substâncias identificadas por LC-SPE-NMR com seus respectivos experimentos Uni e Bidimensional.....	103
FIGURA 4.79. Correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (A) e $J_{\text{H-C}}$ HSQC (B) do grupo isopropil.....	104
FIGURA 4.80. Mapas de contorno COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125	

MHz), respectivamente.....	104
FIGURA 4.81. Correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY e $J_{\text{H-C}}$ HSQC.....	104
FIGURA 4.82. Mapas de contorno HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz) e COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz), respectivamente.....	105
FIGURA 4.83. Correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (A), $J_{\text{H-C}}$ HSQC (A) e $^3J_{\text{H-C}}$ HMBC (B).....	105
FIGURA 4.84. (A) Sistema de anel dicetopiperazínico e (B) Deslocamento químico dos hidrogênios do resíduo de aminoácido leucina.....	106
FIGURA 4.85. Ampliação do espectro de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e mapa de contorno HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz), respectivamente.....	106
FIGURA 4.86. Correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (A) e (B), $J_{\text{H-C}}$ HSQC (C).....	107
FIGURA 4.87. Mapas de contorno HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz) e COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz).....	107
FIGURA 4.88. Mapas de contorno COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz).....	108
FIGURA 4.89. Estruturas parciais com seus respectivos deslocamentos químicos de H e C (A) e (B).....	108
FIGURA 4.90. Estrutura química da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	109
FIGURA 4.91. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) da Substância <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	110
FIGURA 4.92. Mapa de correlação COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e HSQC da substância <i>ciclo</i> (Pro-Leu) ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz).....	111
FIGURA 4.93. Mapa de correlação HMBC da substância <i>ciclo</i> (Pro-Leu) ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz).....	112
FIGURA 4.94. Correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (A) e $^1J_{\text{H-C}}$ HSQC (B) e (C).....	113
FIGURA 4.95. Ampliações do mapa de correlação COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz), e HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz) do sinal cromatográfico t.r. 17,01, respectivamente.....	114
FIGURA 4.96. Mapa de correlação HMBC do sinal cromatográfico t.r. 17,01 ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz).....	115
FIGURA 4.97. Estrutura da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Leu-Leu).....	115
FIGURA 4.98. Ampliações do espectro de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e mapa de correlação HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz), respectivamente.....	117
FIGURA 4.99. Correlações $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (A) e $^1J_{\text{H-C}}$ HSQC (B) e $^2J_{\text{H-C}}$ HMBC (C).....	117
FIGURA 4.100. Ampliações dos mapas COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e HMBC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz), respectivamente.....	118

FIGURA 4.101. Estrutura do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico.....	118
FIGURA 4.102. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> CN, 500 MHz) da Substância <i>ciclo</i> (Leu-Leu) e derivado ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico.....	120
FIGURA 4.103. Mapa de contorno COSY (CD <sub>3</sub> CN, 500 MHz) e HSQC (CD <sub>3</sub> CN, 125 MHz) da Substância <i>ciclo</i> (Leu-Leu) e derivado ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico.....	121
FIGURA 4.104. Mapa de contorno HMBC (CD <sub>3</sub> CN, 125 MHz) da Substância <i>ciclo</i> (Leu-Leu) e derivado ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico.....	122
FIGURA 4.105. Cromatograma DAD-HPLC do extrato acetato de etila do sobrenadante da <i>Xylella fastidiosa</i> .....	123
FIGURA 4.106. Substâncias identificadas no extrato acetato de etila do sobrenadante da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> .....	124
FIGURA 4.107. Estrutura parcial da dicetopiperazina formado com o aminoácido tirosina.	125
FIGURA 4.108. Deslocamentos químicos dos hidrogênios benzílicos (A) e da literatura (B).....	125
FIGURA 4.109. Possíveis estruturas formadas na condensação com resíduos de aminoácidos tirosina, prolina e leucina.....	126
FIGURA 4.110. Estrutura da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Tyr-Pro).....	126
FIGURA 4.111. Estrutura da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Tyr-Val).....	127
FIGURA 4.112. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 21,50.....	129
FIGURA 4.113. Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 21,50.....	130
FIGURA 4.114. Mapa de contorno HSQC (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 150 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 21,50.....	131
FIGURA 4.115. Ampliações do espectro de contorno HSQC (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 150 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 21,50.....	131
FIGURA 4.116. Cromatograma de íons totais (A) e espectros de massas (B) e (C).....	132
FIGURA 4.117. Espectro de massas da amostra padrão <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	133
FIGURA 4.118. Estrutura química da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	134
FIGURA 4.119. Espectros de massas dos ésteres metílicos (A) e (B).....	134
FIGURA 4.120. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 29,48.....	136
FIGURA 4.121. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 600 MHz) com dupla supressão do cartucho de SPE sem presença de amostra “trapeada”.....	137

FIGURA 4.122. Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 29,48. (A) região 3,45 a 4,50 ppm e (B) região 1,00 a 2,40 ppm.....	138
FIGURA 4.123. Hidrogênios destacados $\alpha$ -carboxílico do núcleo dicetopiperazínico.....	139
FIGURA 4.124. Deslocamentos químicos de hidrogênios da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-axx).....	139
FIGURA 4.125. Estrutura do resíduo de aminoácido Isoleucina.....	140
FIGURA 4.126. Espectro de massas obtido por CG-EM da amostra em análise.....	140
FIGURA 4.127. Estrutura da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Ile).....	141
FIGURA 4.128. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 30,28 min.....	142
FIGURA 4.129. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 30,28 min.....	143
FIGURA 4.130. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 30,28 min.....	144
FIGURA 4.131. Estrutura da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	145
FIGURA 4.132. Cromatograma de íons totais. Espectro de massas: (a) hexadecanoato de metila, (b) <i>ciclo</i> (Pro-leu), (c) ácido undecenóico e (d) 16-metil-heptadecanoato de metila..	147
FIGURA 4.133. Espectro de massas do composto <i>p</i> -etoxibenzoato.....	147
FIGURA 4.134. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 31,03 min.....	148
FIGURA 4.135. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 31,03 min.....	149
FIGURA 4.136. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 31,03 min.....	150
FIGURA 4.137. Correlações HSQC do anel dicetopiperazínico.....	151
FIGURA 4.138. Correlações HSQC do resíduo de aminoácido Leucina.....	151
FIGURA 4.139. Estrutura da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	152
FIGURA 4.140. (A) cromatograma de íons totais e (B) espectro de massas.....	152
FIGURA 4.141. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica no t.r. 32,91 min.....	154
FIGURA 4.142. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica no t.r. 32,91 min.....	155
FIGURA 4.143. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da	

banda cromatográfica com t.r. 32,91 min.....	156
FIGURA 4.144. Ampliação do mapa de contorno HSQC (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 150 MHz) da banda cromatográfica no t.r. 32,91.....	157
FIGURA 4.145. Estrutura do resíduo de aminoácido Fenilalanina com N dissustituído.....	158
FIGURA 4.146. Espectro de massas obtido da fração no t.r. 34,17 min para <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	159
FIGURA 4.147. Estrutura química da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	159
FIGURA 4.148. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 600 MHz) da banda cromatográfica no t.r. 34,17.....	161
FIGURA 4.149. Proposta estrutural da <i>ciclo</i> (Phe-Axx).....	162
FIGURA 4.150. Possíveis estruturas: <i>ciclo</i> (Phe-Axx) (A), <i>ciclo</i> (Pro-Axx) (B) e <i>ciclo</i> (Ile-Axx) (C).....	163
FIGURA 4.151. (A) cromatograma de íons totais e os respectivos espectros de massas obtidos por CG-EM dos picos cromatográficos com t.r. 19,10; 23,83; 28,35; 29,31 e 29,51 min.....	163
FIGURA 4.152. Dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Phe) identificadas por CG-EM e RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OH + H <sub>2</sub> O, 600 MHz).....	164
FIGURA 4.153. Proposta estrutural da banda cromatográfica em t.r. 29,51 obtida por CG-EM.....	164
FIGURA 4.154. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O, 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 36,40.....	165
FIGURA 1.1. Diagrama Ilustrativo de vários estágios da <i>Diaphorina Citri</i> .....	180
FIGURA 1.2. Hospedeira preferencial (Murta) do psílídeo <i>diaphorina citri</i> .....	182
FIGURA 1.3. Sintomas característicos em citros causados pelo greening.....	182
FIGURA 3.1. Equipamentos utilizados no sistema de olfatometria.....	190
FIGURA 3.2. Figura ilustrativa do aparato tipo clewenger usado para hidrodestilação.....	191
FIGURA 4.1. A) ( <i>Co</i> ) campos de odor, ( <i>le</i> ) Campo de escolha e ( <i>li</i> ) Campo de resposta.....	195
FIGURA 4.2. Percentual de respostas (n=10) para cada estímulo.....	196
FIGURA 4.3. Porcentagem do número de respostas de <i>Diaphorina citri</i> em Olfatômetro em 'Y' da amostra C1 a C22 observados para os períodos da manhã e tarde (n=5).....	197
FIGURA 4.4. Porcentagem do número de respostas de <i>Diaphorina citri</i> em Olfatômetro em 'Y' da amostra C1 a C22.....	198
FIGURA 4.5. Comparação dos cromatogramas de Íons Totais dos óleos essências das espécies mais atrativas e menos atrativas através do bioensaio por olfatometria.....	200

---

FIGURA 4.6. Gráfico da variância versus os números de PCs.....	202
FIGURA 4.7. Gráfico PCA das amostras C1 a C21 dos dados obtidos por CG-EM.....	203
FIGURA 4.8. Dendograma das amostras C1 a C21 dos dados obtidos por CG-EM.....	204

## LISTA DE ESQUEMAS

---

ESQUEMA 3.1. <u>Etapa 1)</u> As células 9a5c da <i>X. fastidiosa</i> foram cultivadas em meio PW com agitação (130 rpm) e controle de temperatura (28 °C) durante 10 dias, posteriormente o meio é centrifugado com subsequente separação do <i>pellet</i> e sobrenadante. Posteriormente, maceração do <i>pellet</i> em metanol sob agitação, filtrado e extraído com hexano. Com o sobrenadante foi realizada extração líquido-líquido com Acetato de etila. <u>As Etapas 2 e 3</u> são complementares de acordo com a técnica utilizada para identificação.....	32
ESQUEMA 3.2. Preparo do extrato hexânico do sobrenadante da bactéria <i>X. fastidiosa</i> ...	33
ESQUEMA 3.3. Extração dos compostos voláteis utilizando Microextração em fase sólida.....	39



## RESUMO

ESTUDO QUÍMICO EM PATÓGENOS E VETORES DE DOENÇAS DE CITROS: *Xylella fastidiosa* e *Diaphorina citri*. Historicamente, a citricultura nacional sofreu profundas mudanças devido a problemas fitossanitários, e hoje, dentre as principais ameaças à citricultura, destacam-se o “Huanglongbing” (HLB) ou “Greening” e a Clorose Variegada dos Citros (CVC). A bactéria *X. fastidiosa* é o agente etiológico causador da clorose variegada dos citros (CVC). O HLB está associado a bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter* e sua disseminação se dá por enxertia de material infectado ou por psilídeos. Neste sentido a presente tese descreve o estudo químico da bactéria *Xylella fastidiosa* e resposta olfatométrica de *Diaphorina citri* frente a espécies de *Citrus*. A *X. fastidiosa* (9a5c) foi cultivada em meio PW. No estudo químico da bactéria *X. fastidiosa* foram utilizados as técnicas de identificação CG-EM, LC-MS e LC-SPE-NMR. Estas técnicas permitiram a identificação de derivados de ácidos graxos e alcalóides dicetopiperazínicos. Este é o primeiro estudo químico em *X. fastidiosa* o qual foi abordado a produção dos alcalóides, *ciclo* (Pro-Val), *ciclo* (Val-Phe), *ciclo* (Tyr-Tyr), *ciclo* (Phe-Tyr), *ciclo* (Pro-Phe), *ciclo* (Leu-Leu), *ciclo* (Leu-Ile), *ciclo* (Val-Leu), *ciclo* (Ala-Leu), *ciclo* (Ala-Pro) *ciclo* (Pro-Leu), *ciclo* (Pro-Tyr), *ciclo* (Tyr-Pro), *ciclo* (Tyr-Val), *ciclo* (Pro-Ile), *ciclo* (Phe-Ile), *ciclo* (Arg-Val), *ciclo* (Leu-phe), *ciclo* (Gly-Phe). Através de SPME dos voláteis produzidos pela bactéria *X. fastidiosa* foram identificadas metil cetonas e álcoois. O estudo comportamental com o psilídeo *D. citri* frente aos óleos essenciais de espécies de citrus, utilizando ensaios olfatométricos, mostrou os maiores índices de atratividade para as espécies *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus paradisi* Macfad., *Citrus medica* L. e o padrão *Murraya paniculata*. Contudo, foi observada uma menor atratividade de *D. citri* frente aos híbridos *tangor Murcott*, *citrumelo Swingle* e *citrange Trover*, que apresentaram um percentual elevado de compostos sesquiterpênicos em sua composição. Como subsídios complementares à compreensão das interações *D. citri*-hospedeiros também foi realizada análise de componentes principais (PCA) e a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA), os quais demonstraram um agrupamento entre os híbridos *tangor Murcott* e *citrumelo Swingle*, indicando semelhança química.



## ABSTRACT

CHEMICAL STUDY OF PATHOGENS AND VECTORS DISEASE OF CITRUS: *Xylella fastidiosa* & *Diaphorina citri*. Historically the national citriculture suffered great changes because of phytosanitary problems, and nowadays among the main threats to citriculture are the “Huanglongbing” (HLB) or “Greening” and the Citrus Variegated Chlorosis (CVC). The bacteria *Xylella fastidiosa* is the etiologic agent of Citrus Variegated Chlorosis. The HLB is associated to a bacterium that belongs to the *Candidatus Liberibacter* genera and its dissemination is by grafting of infected material or by psyllids. This work describes the chemical study of bacteria *Xylella fastidiosa* and the olfactometric response of *Diaphorina citri* to *Citrus* species. The *X. fastidiosa* (9a5c) were cultivated in PW medium. In the chemical study of *X. fastidiosa* the identification techniques used were CG-EM, LC-MS e LC-SPE-NMR. These techniques allowed the identification of fatty acid derivatives and diketopiperazinic alkaloids. This is the first chemical study of *X. fastidiosa* that boarded the alkaloids production *cyclo* (Pro-Val), *cyclo* (Val-Phe), *cyclo* (Tyr-Tyr), *cyclo* (Phe-Tyr), *cyclo* (Pro-Phe), *cyclo* (Leu-Leu), *cyclo* (Leu-Ile), *cyclo* (Val-Leu), *cyclo* (Ala-Leu), *cyclo* (Ala-Pro), *cyclo* (Pro-Leu), *cyclo* (Pro-Tyr), *cyclo* (Tyr-Pro), *cyclo* (Tyr-Val), *cyclo* (Pro-Ile), *cyclo* (Phe-Ile), *cyclo* (Arg-Val), *cyclo* (Leu-Phe), *cyclo* (Gly-Phe). Volatile compounds produced by *X. fastidiosa* extracted by SPME allowed the identification of methyl ketones and alcohols. The behavior study of *D. citri* to *Citrus* species essential oils, using olfactometric assays showed higher attractiveness to *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus paradisi* Macfad., *Citrus medica* L. and the standard *Murraya paniculata*. However, lower attractiveness of *D. citri* was observed to hybrid species *tangor Murcott*, *citrumelo Swingle* e *citrange Trover*, that showed a high percentual of sesquiterpene compounds in the chemical composition. As complementary subsidy for understanding the interactions between *D. citri*-host the Principal Components Analysis (PCA) and *Hierarchical Clusters Analysis* (HCA) were carried out, these analyses demonstrated a group between *tangor Murcott* e *citrumelo Swingle* that indicate chemical similarity.



## SUMÁRIO

<b>1.Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Ecologia Química.....	1
<b>Capítulo I: Estudo Químico da Bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>5</b>
1.1. Comunicação Bacteriana.....	5
1.2. <i>Xylella fastidiosa</i> .....	8
1.2.1. <i>Xylella fastidiosa</i> : características gerais.....	8
1.2.2. Brasil – Clorose Variegada dos Citros (CVC).....	10
1.3. Formação de Biofilme.....	11
1.3.1. Moléculas de “ <i>Quorum-sensing</i> ” .....	14
1.4. Comunicações Celulares em <i>Xylella fastidiosa</i> .....	20
<b>2. Proposição e Justificativa.....</b>	<b>24</b>
2.1. Objetivos Específicos.....	25
<b>3. Metodologia.....</b>	<b>27</b>
3.1. Materiais e Equipamentos.....	27
3.2. Procedimentos Experimentais.....	30
3.2.1. Obtenção do Material Bacteriano.....	30
3.2.2. Preparo do Meio.....	30
3.2.3. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa.....	33
3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	34
3.2.5. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas.....	36
3.2.6. LC-SPE-NMR.....	37
3.2.6.1. Cromatografia.....	37
3.2.6.2. SPE-NMR.....	37
3.2.6.3. RMN.....	38
3.2.7. Metodologia para Compostos Voláteis.....	38
3.2.7.1. Microextração em Fase Sólida dos Voláteis.....	38
3.2.8. Preparo dos extratos de <i>Citrus sinensis</i> após inoculação da bactéria <i>X. fastidiosa</i> .....	39
<b>4. Resultados e Discussões.....</b>	<b>41</b>
4.1. Estudo Químico da <i>Xylella fastidiosa</i> por Cromatografia Gasosa acoplada Espectrometria de Massas.....	41

4.1.1. Perfil químico do “Extrato Hexânico do Sobrenadante da <i>Xylella fastidiosa</i> ” por CG-EM.....	42
4.1.2. Perfil químico do “Extrato Hexânico do Precipitado Celular da <i>X. fastidiosa</i> ” por CG-EM.....	52
4.1.3. SPME dos Voláteis produzidos pela <i>X. fastidiosa</i> 9a5c.....	60
4.1.3.1. Identificação dos Compostos Voláteis.....	62
4.2. Estudo do Extrato Acetato de Etila do Sobrenadante da <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c.....	72
4.2.1. Estudo do Extrato Acetato de Etila do Sobrenadante da <i>Xylella fastidiosa</i> por LC-MS.....	72
4.3. Análise de <i>Citrus sinensis</i> após inoculação da bactéria <i>X. fastidiosa</i> por LC-MS/MS.....	97
4.4. Estudo do Extrato Acetato de Etila do Sobrenadante da <i>Xylella fastidiosa</i> por LC-SPE-NMR.....	100
4.4.1. Determinação estrutural do sinal cromatográfico com t.r. 12,55 min.....	103
4.4.2. Determinação estrutural do sinal cromatográfico com t.r. 17,01 min.....	113
4.5. <u>Experimento 2</u> : Estudo do Extrato Acetato de Etila do Sobrenadante da <i>Xylella fastidiosa</i> por LC-SPE-NMR.....	123
4.5.1. Determinação estrutural do sinal cromatográfico com t.r. 21,50 min .....	124
4.5.2. Determinação Estrutural do Sinal cromatográfico com t.r. 29,48 min.....	132
4.5.3. Determinação Estrutural do Sinal Cromatográfico com t.r. 30,28 min.....	139
4.5.4. Determinação Estrutural do Sinal Cromatográfico com t.r. 31,03 min.....	145
4.5.5. Determinação Estrutural do Sinal Cromatográfico com t.r. 32,91 min.....	151
4.5.6. Determinação Estrutural do Sinal Cromatográfico com t.r. 34,17 min.....	158
4.5.7. Determinação Estrutural do Sinal Cromatográfico com t.r. 36,40 min.....	162

<b>5. Conclusões.....</b>	<b>167</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>169</b>
<b>Capítulo II: Estudo Comportamental de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae).....</b>	<b>176</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>178</b>
1.1. A Citricultura Brasileira.....	178
1.1.1. “Huanglongbing” (HLB) ou “Greening.....	178
1.2. <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	180
1.3. Voláteis na Seleção Hospedeiras.....	183
<b>2. Proposição e Justificativa.....</b>	<b>186</b>
2.1. Objetivos Específicos.....	187
<b>3. Metodologia.....</b>	<b>189</b>
3.1. Materiais e Métodos.....	189
3.1.1. Obtenção dos insetos e plantas.....	189
3.1.2. Bioensaios de olfatometria.....	189
3.2. Procedimentos Experimentais.....	190
3.2.1. Obtenção e identificação dos Óleos Essências.....	190
3.2.1.1. Extração do óleo essencial.....	190
3.2.1.2. Análise química do óleo essencial.....	191
3.2.1.3. Bioensaios de olfatometria.....	192
3.2.1.4. Análises Quimiométricas.....	192
<b>4. Resultados e Discussões.....</b>	<b>195</b>
4.1. Bioensaios de olfatometria.....	195
4.2. Análise Quimiométrica.....	201
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>207</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>208</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>210</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Ecologia Química

Ao longo de milhares de anos os organismos vivos desenvolveram mecanismos de comunicação utilizando sinais sonoros, visuais e químicos. Entre as varias áreas da química encontra-se a ecologia química, que estuda estas relações, mediadas por sons e moléculas que participam das cores, dos aromas e das secreções. A Ecologia Química é a área da ciência que se ocupa com o estudo do uso de substâncias químicas como carreadoras de informações entre os diferentes organismos. Esta área da ciência teve um grande avanço a partir da metade do século XX, com a primeira caracterização química do feromônio utilizado por mariposas do bicho da seda (*Bombyx mori*) [MILLAR & HAYNES, 1998]. O avanço foi intensificado com o desenvolvimento de metodologias analíticas e instrumentais cada vez mais sensíveis e confiáveis.

A utilização de substâncias químicas como carreadoras de informações entre organismos de uma mesma espécie ou até mesmo entre espécies diferentes é amplamente difundida e podem ser encontradas em vertebrados, invertebrados, plantas e microrganismos [MORI, 1998]. Os processos de comunicação mediados por sinalizadores químicos se dividem em duas grandes classes, sendo aqueles empregados entre indivíduos de uma mesma espécie (feromônios) e os empregados entre indivíduos de espécies distintas (aleloquímicos). O estudo destas substâncias permite revelar ou aprofundar o conhecimento disponível sobre diversas interações ecológicas, muitas vezes essenciais para a sobrevivência das espécies no nicho ecológico [POMINI, 2009].

Sinais químicos produzidos pelos organismos são constituídos por compostos produzidos por vias metabólicas secundárias, que estão estreitamente relacionadas com as vias principais que dão origem aos metabólitos primários (carboidratos, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos). Os metabólitos secundários

formam uma rede invisível que é crucial na dinâmica de indivíduos, populações, comunidades e ecossistemas. Estudar estes fenômenos significa decodificar a linguagem química da vida.

O estudo e a compreensão vêm avançando em paralelo com as novas tecnologias que permitem o isolamento e identificação de pequenas quantidades de metabólitos secundários. Além disso, o interesse de resolver determinados problemas ambientais urgentes, como as relacionadas com as perdas econômicas causadas por pragas na agricultura, deu um grande impulso para a ecologia química [[http://www.pdcb.unam.mx:8080/upload\\_files/3007.pdf](http://www.pdcb.unam.mx:8080/upload_files/3007.pdf)].

A cultura de citros é um alvo constante de inúmeras pragas e doenças, que, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento são capazes de causar danos irreversíveis. A quantidade e a qualidade das frutas cítricas são freqüentemente ameaçadas devido aos danos deixados na planta, que dependendo da intensidade do ataque, pode torná-la improdutiva ou levar à sua morte. As principais doenças e pragas que afetam a citricultura brasileira são: Cancro Cítrico, Clorose Variegada dos Citros (CVC), Declínio, Gomose de *Phytophthora*, Greening, Leprose dos Citros, Mancha *Alternaria*, Morte Súbita dos Citros (MSC), Pinta Preta, Podridão Floral dos Citros, Rubelose, Tristeza – *Citrus Tristeza Virus* (CTV).

Dentre o estudo das relações ecológicas, a presente tese concentrou-se em dois tópicos. Capítulo I: Estudo Químico da Bactéria *Xylella fastidiosa*, analisando os eventos metabólicos subjacentes a comunicação bacteriana. Capítulo II: Estudo Comportamental do psílideo *Diaphorina citri*, uma vez que, o conhecimento das alterações comportamentais, promovidas por voláteis de plantas, representa uma alternativa de novas estratégias para o manejo desta praga.

# CAPÍTULO I

**“Estudo Químico da Bactéria *Xylella fastidiosa*”**

*Parte*

**1**

*Introdução*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Comunicação Bacteriana

Organismos macroscópicos, tais como insectos e mamíferos usam produtos químicos em sua comunicação, assim como, os microrganismos também dependem da comunicação química para sobreviver. A literatura mostra vários exemplos de bactérias que não existem como células independentes, mas como colônias, que exploram sistemas elaborados de comunicação intercelular para facilitar a adaptação às condições ambientais [WHITEHEAD *et al.*, 2001]. Há aproximadamente 30 anos a ciência reconheceu os primeiros indícios relacionados aos mecanismos de percepção e resposta empregados pelas bactérias. Esta linguagem apresenta a forma de sinais químicos secretados a partir das células e que podem induzir diversas alterações na fisiologia bacteriana [WHITEHEAD *et al.*, 2001; POMINI, 2009].

Os microrganismos são constantemente sujeitos a diversos estímulos ambientais, como alterações de temperatura, osmolaridade, pH, disponibilidade de nutrientes, presença de substâncias químicas que interferem em seu desenvolvimento e até mesmo a presença de outros organismos. Desta forma, as bactérias desenvolveram ao longo de milhares de anos de evolução mecanismos adaptativos em resposta à estas flutuações do ambiente, bem como nas interações ecológicas com outras espécies, seja de modo simbiótico ou até mesmo patogênico [WHITEHEAD *et al.*, 2001]. Ao contrário do que se imaginava não se trata de um fenômeno raro: a percepção do quorum (“*quorum sensing*”) é um processo altamente difundido entre os mais diversos gêneros de bactérias, mostrando sua habilidade em perceber e responder à presença de populações microbianas vizinhas [WHITEHEAD *et al.*, 2001].

O processo *quorum-sensing* baseia-se na produção de substâncias sinalizadoras de baixa massa molecular, cuja concentração extracelular está

relacionada à densidade populacional do microrganismo produtor. A substância sinalizadora pode ser detectada pelas células e isto permite à população como um todo iniciar uma ação coordenada, uma vez atingida uma densidade populacional crítica. Isto pode ser de vital importância, por exemplo, em infestações patogênicas, onde a produção de fatores de virulência prematuramente (em baixas densidades celulares) pode alertar os sistemas de defesa do hospedeiro minimizando as chances de colonização bem sucedida. De forma mais prática, o *quorum sensing* dá aos pesquisadores uma nova estratégia: destruindo-se o sistema de comunicação de bactérias, talvez elas não consigam organizar seu ataque com eficiência. Nas palavras de Bassler, "tanto se pode torná-las surdas como mudas".

Historicamente, as interações entre espécies concentraram-se em interações inibidoras de crescimento, mas uma variedade fenotípica é possível, incluindo alterações nos processos de desenvolvimento, como a esporulação, formação de biofilme e produção de metabólitos secundários (FIGURA 1.1). Ao longo dos anos, os estudos de antibiose, sem dúvida, levaram a uma compreensão mais profunda de como os microrganismos se relacionam ao ambiente e a seus companheiros. Assim como, levou à descoberta de compostos clinicamente úteis.

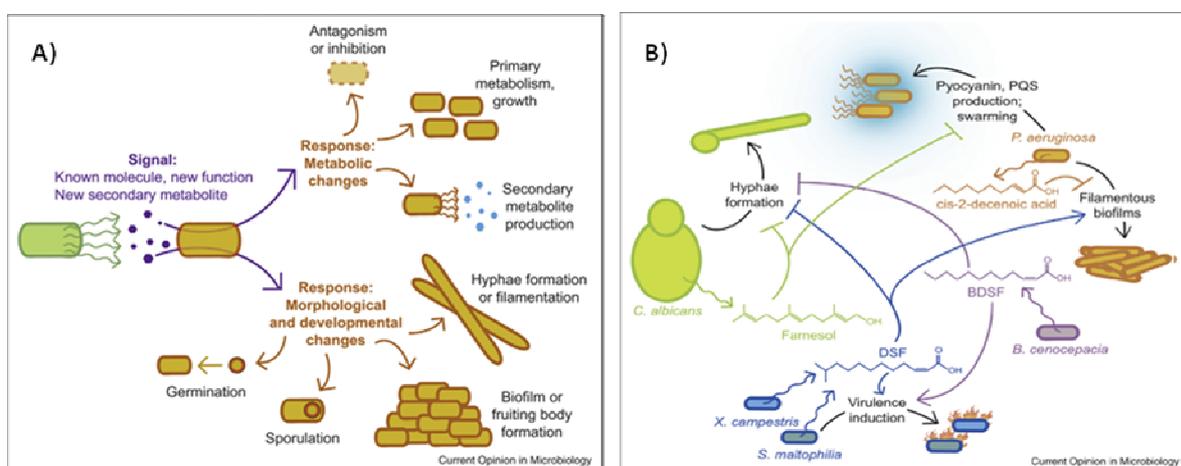


FIGURA 1.1: Esquema Ilustrativo de interações entre espécies. A) Uma interação entre dois microrganismos é ilustrada à esquerda da figura, em verde microrganismo produz um sinal

(hexágonos roxo) que faz com que o microrganismo laranja responda em uma das maneiras ilustradas à direita. **B)** Alguns ácidos graxos e álcoois produzidos por fungos e bactérias têm um papel como sinais interespecíes. As setas indicam a produção de pequenas moléculas e os efeitos desses compostos sobre o comportamento de outros organismos, o que é indicado por linhas suaves em forma de seta [Fonte: SHANK *et al.*, 2009. *Current Opinion in Microbiology*, 12:205–214].

O sistema de sinalização dependente de densidade celular *quorum sensing* já foi identificado em muitos gêneros de bactérias. Nesse processo, a bactéria é capaz de monitorar a presença de outras bactérias ao seu redor pela produção e resposta a moléculas sinalizadoras, que são compostos de baixa massa molecular liberados no ambiente, conhecidos como autoindutores ou molécula AI, [TAGA e BASSLER, 2003]. Quando uma concentração crítica de autoindutores é atingida, o microrganismo detecta que um número suficiente ou um *quorum* de bactérias está presente e responde com a expressão coordenada de certos genes. Os sinais são enviados a uma região promotora particular, que ativa ou reprime genes alvos e permite ao microrganismo organizar uma resposta unificada favorável a sobrevivência da população [DE KIEVIT e IGLEWSKI, 2000; SWIFT *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2004].

São reconhecidos dois tipos de sistemas *quorum sensing*: intraespécie e interespecíes. A comunicação intraespécie em bactérias Gram-negativas é frequentemente mediada por *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs) derivadas de precursores de ácidos graxos e aminoácidos, também conhecidas com AI-1 [FUQUA *et al.*, 2001; MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD *et al.*, 2001; PONCE, 2007]. As AHLs constituem a família mais bem caracterizada de moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* [WHITEHEAD *et al.*, 2001]. Em Gram-positivas, a comunicação intraespécies é facilitada por peptídeos [MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD *et al.*, 2001].

Ainda não está completamente elucidada como a comunicação celular ocorre nas bactérias. Pesquisas sobre a sinalização baseada em *N*-acil-homoserinas lactonas mostram que esse sistema é muito comum. Entretanto, os

tipos de moléculas potenciais que as bactérias produzem e às quais respondem para se adaptarem ao ambiente, incluindo ambientes competitivos, ainda são pouco exploradas, mas é crescente o número de moléculas sinalizadoras identificadas [KELLER e SURETTE, 2006; PONCE, 2007].

## **1.2. *Xylella fastidiosa***

### **1.2.1. *Xylella fastidiosa*: características gerais**

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria Gram-negativa, fastidiosa, membro do filo proteobacteria, sub-divisão Gama, ordem Lysobacterales, família Lysibacteriaceae e grupo Xanthomonas [WELLS *et al.*, 1987]. O gênero *Xylella* possui apenas uma espécie, a *X. fastidiosa*, com formatos de bastonetes, medindo 0,25-0,35  $\mu\text{m}$  vs 0,9-3,5  $\mu\text{m}$ , Gram-negativas, não apresenta mobilidade, aflageladas, oxidase negativa e catálise positiva e não pigmentadas [WELLS *et al.*, 1987]. Os primeiros relatos na literatura sobre *X. fastidiosa* datam de 1973, quando uma bactéria, semelhante às bactérias da família Rickettsiaceae, foi associada a doença de Pierce em videiras [HOPKINS *et al.*, 1973]. Em 1978, estudos com o DNA desta bactéria revelaram uma composição de G + C (guanina + citosina) diferente da composição do grupo das Rickettsiaceas, indicando tratar-se de uma bactéria pertencente a um grupo taxonômico distinto [SOUZA, 2002]. A bactéria associada ao mal de Pierce passou a ser chamada de bactéria fastidiosa, limitada ao xilema (FXLB – “*Fastidious Xylem-Limited Bactéria*”) [HOPKINS, 1989].

A *X. fastidiosa* é limitada ao xilema das plantas hospedeiras e ao lúmen do canal alimentar de insetos vetores da família Cicadellina (cigarrinhas), responsáveis pela transmissão da bactéria entre as plantas [De SOUZA., 2004]. Possuindo uma ampla gama de hospedeiros, incluindo membros de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas [YORINORI *et al.*, 2003], dentre estas, culturas economicamente importantes; como alfafa (*Medicago sativa* L.),

ameixeira (*Prunus salicina* Lindl), citros (*Citrus* spp.), pessegueiro [*Prunus persicae* (L.) Batsch], cafeeiro (*Coffea* spp.) e videira (*Vitis vinifera* L.) [De SOUZA *et al.*, 2004]. As doenças mais expressivas causadas pelo agente etiológico a bactéria *fastidiosa* são a clorose variegada dos citros (CVC) e o mal de Pierce em videiras (“Pierce’s disease”) [DAVIS *et al.*, 1978].

O mecanismo de patogenicidade da bactéria sugere que os sintomas produzidos por estresse hídrico sejam causados devido à oclusão de vasos do xilema ocasionando principalmente o bloqueio do transporte de água e nutrientes, resultado, provavelmente, de uma eficiente capacidade de aderência e multiplicação da *X. fastidiosa* nestes vasos condutores, através de agregados, gomas e tiloses, podendo também estar associada à presença de fitotoxinas e desbalanço hormonal [De SOUZA, 2004; YORINORI *et al.*, 2003]. Os mecanismos pelos quais a *X. fastidiosa* causa a doença nas plantas não estão completamente esclarecidos, apesar dos esforços feitos neste sentido com base no conhecimento das seqüências de todos os genes que compõem o genoma do agente da CVC (programa Genoma Funcional da *X. fastidiosa* - Fapesp).

Um importante fato relacionado à *X. fastidiosa* foi a identificação de genes associados à adesão da bactéria em superfícies, sendo muitos deles similares a genes que possuem esta função em bactéria patogênicas de humanos [SIMPSON *et al.*, 2000]. Nessas bactérias, o principal mecanismo de patogenicidade está relacionado à sua capacidade de formar biofilme na superfície colonizada do hospedeiro. O termo biofilme descreve a habilidade das bactérias em aderir às superfícies e formar uma comunidade microbiana. Trabalhos publicados demonstram que a *X. fastidiosa* possui a habilidade de formar biofilme em diferentes superfícies e que a morfologia parece variar de acordo com a estirpe e as condições ambientais analisadas [MARQUES *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2004]. Considerando o fato dos sintomas característicos da CVC serem decorrentes do bloqueio dos vasos do xilema em consequência da

colonização bacteriana, a formação do biofilme é considerada o principal mecanismo de patogenicidade desse fitopatógeno [NEWMAN *et al.*, 2004; OSIRO *et al.*, 2004; GUILHARBERT AND KIRKPATRICK, 2005].

Acreditava-se que, até 1993, a *X. fastidiosa* fosse um patógeno restrito ao continente americano, entretanto, apresenta-se na Ásia [LEU & SU, 1993] e Europa [BERISHA *et al.*, 1998], demonstrando-se uma problemática mais global.

### **1.2.2. Brasil - Clorose Variegada dos Citros (CVC)**

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, dentre as diversas cadeias produtivas do agronegócio, uma que merece destaque é o segmento citrícola. Segundo os dados do *United States Department of Agriculture* (USDA), o Brasil é responsável por 38% da produção mundial de laranja (19,1 milhões de toneladas) e 61% da produção mundial de suco de laranja (1,33 milhão de toneladas), exportando 98% da sua produção, com participação de 86% do mercado mundial [USDA, 2011; FAVA-NEVES *et al.*, 2010]. A cultura encontra-se disseminada por todo o território nacional, com grande importância econômica e social para diversos estados onde se situa entre as dez principais culturas: São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Bahia. As maiores plantações são de laranja (*Citrus sinensis*, 66%), tangerina (*C. reticulata*, 15,4%), pomelo (*C. paradisi*, 8,5%) e o limão (*C. limon*, 6,8%); as menores plantações (3,3%) são de lima (*C. aurantifolia*), cidra (*C. medica*) e alguns híbridos [ABDELNUR, 2006].

A clorose variegada dos citros foi constatada e descrita pela primeira vez no Brasil em 1987 em pomares de Colina – SP, em seguida no triângulo Mineiro e nas regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo [CHANG *et al.*, 1993; LEU & SU, 1993], entretanto, a bactéria causadora da CVC foi somente isolada em 1991 por Leite Jr. e Leite. No Brasil, a clorose variegada dos citros (CVC) acarreta prejuízos à economia citrícola e as estimativas dos danos econômicos

causados na primeira década do século XXI são da ordem de 286 – 322 milhões de dólares [FERMANDES, JR. 2003].

A cada ano o número de plantas afetadas pela CVC aumenta, pondo em risco o sustento de muitas famílias e prejudicando a economia do Estado e do país. Em 1994, estimava-se que 26% das laranjeiras do Estado de São Paulo apresentavam sintomas; em 1997, este número já havia subido para 34%, e em 2004, estimava-se que 44% estavam infectadas [LARANJEIRA *et al.*, 2005]. Popularmente a CVC é conhecida como “amarelinho” devido ao aspecto amarelado nas folhas e frutos, este precocemente amadurecido [GAI, 2006], tornando-os impróprios para o consumo “*in natura*” ou para a indústria (FIGURA 1.2). A origem desta enfermidade no território brasileiro é indeterminada.

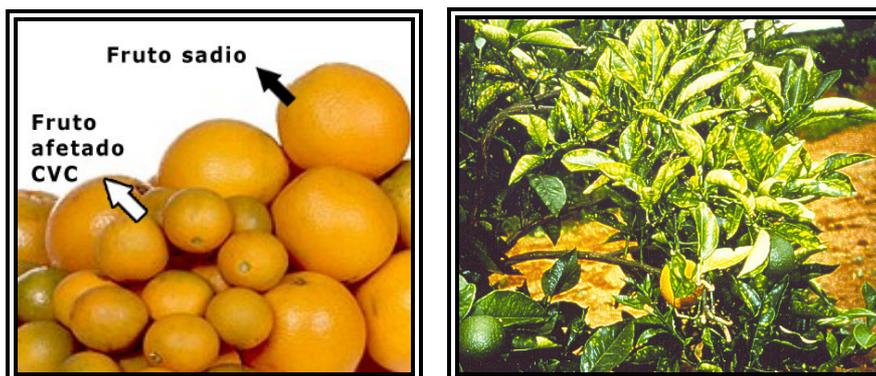


FIGURA 1.2: Aspectos físicos dos frutos e folhas infectados pela CVC. Fontes: <http://www.abc.org.br/publicacoes/ba/NABCII28/laranja> [http://www.ars.usda.gov/images/docs/8361\\_8555/cvc1](http://www.ars.usda.gov/images/docs/8361_8555/cvc1), respectivamente.

### 1.3. Formação de Biofilme

A capacidade de adesão em superfícies sólidas seguida de multiplicação e colonização bacteriana é característica de formação de biofilme. O termo biofilme descreve a habilidade das bactérias e/ou fungos em aderir a superfícies sólidas e estabelecer, em consequência, uma comunidade microbiana; consistindo em uma importante estratégia de sobrevivência para as bactérias na natureza [MARQUES *et al.*, 2002]. O bloqueio dos vasos xilemáticos por este

biofilme de *X. fastidiosa* é o mecanismo de patogênese mais sugerido e pesquisado (FIGURA 1.3, p. 11). Todavia, os processos que mediam a formação e a manutenção desses biofilmes ainda são desconhecidos.

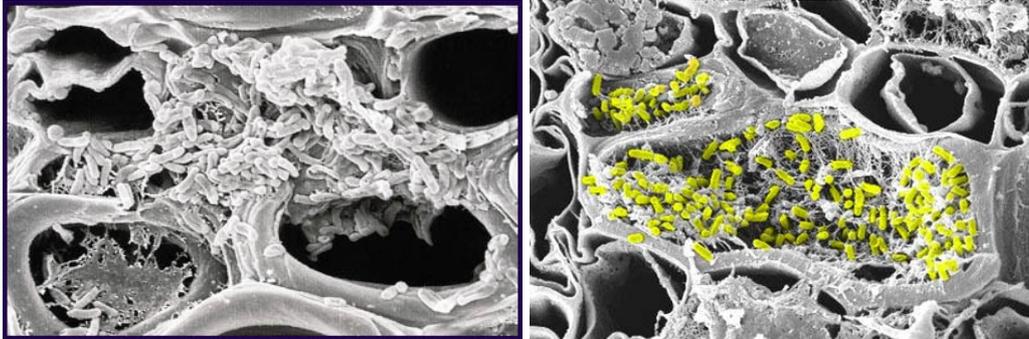


FIGURA 1.3: Figura ilustrativa que demonstra o bloqueio dos vasos xilemáticos, causando sérios danos à planta. Foto: E. W. Kitajima (ESALQ/USP/Brasil).

A formação de biofilme é composta por diferentes estágios iniciando-se pela adesão na superfície, proliferação bacteriana dentro de micro colônias e expansão destas, formando estruturas altamente organizadas. Sauer (2003) dividiu a formação de biofilme em cinco diferentes estágios (FIGURA 1.4, p. 12). O estágio 1, correspondente à adesão reversível das células na superfície; o estágio 2 é referente à adesão irreversível mediada principalmente pela produção de substâncias exopoliméricas; no estágio 3 inicia-se a primeira fase de maturação do biofilme caracterizada pelo início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme; a segunda fase de maturação, estágio 4, corresponde ao biofilme totalmente maduro, com alta densidade celular, e a arquitetura do biofilme apresenta-se de forma complexa; o estágio 5 é referente à fase de dispersão das células do biofilme.

Quando as células atingem o estágio de biofilme maduro é ativado um sistema de comunicação intercelular denominado “*quorum sensing*” [SAUER, 2003; De SOUZA *et al.*, 2005]. Esta sinalização permite que as bactérias regulem a expressão de genes específicos como, por exemplo, associados aos fatores de virulência, resistência a compostos antimicrobianos, respostas de

defesa do hospedeiro, condições de deficiência nutricional, produção de antibióticos e transferência de plasmídeo por conjugação [SMITH *et al.*, 2004].

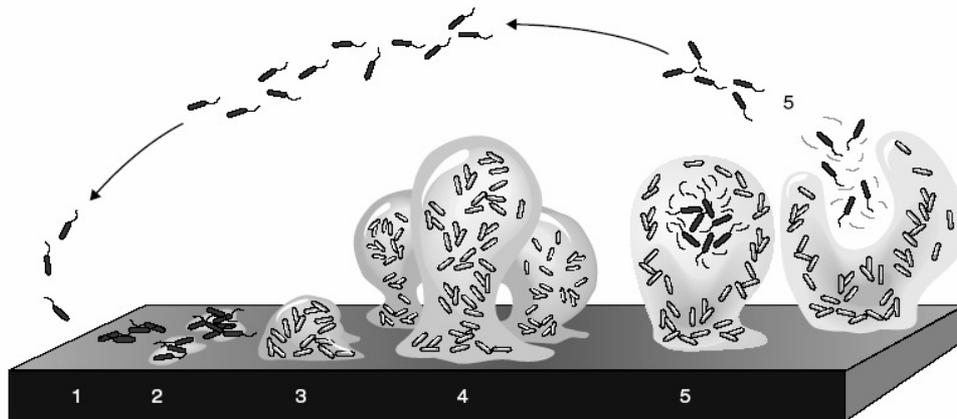


FIGURA 1.4: Modelo dos estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano. **1)** Estágio onde as células bacterianas aderem de forma reversível na superfície. **2)** Estágio que as células perdem sua motilidade e aderem na superfície de forma irreversível, uma etapa mediada principalmente por substâncias exopoliméricas. **3)** Estágio correspondente ao início da maturação do biofilme, indicado pelo desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. **4)** Estágio de total maturação do biofilme, indicado por uma complexa arquitetura do biofilme. **5)** Estágio de dispersão, com o aparecimento de células móveis que deixam as microcolônias [STOODLEY *et al.*, 2002].

Atualmente, o número de estudos da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme tem aumentado principalmente em bactérias que causam doenças em humanos, uma vez que a formação de biofilme está associada a doenças como fibrose cística, periodontia, otite média, endocardite, etc. Contudo, há poucas informações sobre a expressão de genes envolvidos na formação de biofilme em patógeno de planta [DONLAN & COSTERTON, 2002].

A caracterização da formação de biofilme foi feita em *X. fastidiosa* por microscopia de varredura, mostrando que esta pode formar biofilme em diferentes superfícies e que a morfologia deste parece variar de acordo com a estirpe testada e as condições ambientais analisadas [MARQUES *et al.*, 2002]. O biofilme vem fornecer uma proteção contra todo tipo de agente antimicrobiano e permite uma cooperação metabólica facilitando a troca de

substratos, a remoção e a troca de metabólitos, além disso, a proximidade das bactérias dentro do biofilme desempenha papel fundamental na aquisição de novas características genéticas através da transferência de genes.

As vantagens nutricionais e de proteção oferecidas pelos biofilmes dentro do hospedeiro, a estreita comunicação que ocorre entre os indivíduos dessas comunidades permite corrigir o momento do ataque do patógeno ao hospedeiro [DAVEY & O'TOOLE, 2000]. O mecanismo de sensoriamento do tamanho de populações de bactérias no ambiente denomina-se “*quorum sensing*”, também relatado em outros patossistemas como moléculas sinalizadoras, “*quorum-sensing molecules*” que atuam somente após um número de bactérias terem se agregado [PARSEK *et al.*, 2005; LAZDUNSKI *et al.*, 2004].

A principal estratégia de controle de bacterioses em vários patossistemas é a aplicação de compostos antimicrobianos, como antibióticos e compostos cúpricos. Entretanto, os estudos de respostas a estes compostos em duas bactérias que formam biofilme, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* têm mostrado que a dose necessária para controle é geralmente muito maior do que a utilizada quando as células crescem de forma planctônica, sugerindo dificuldades no controle ao se utilizar essa estratégia [BROOUN *et al.*, 2000; RODRIGUES, 2007; TEITZEL e PARSEK, 2003; FUX *et al.*, 2004].

### **1.3.1. Moléculas de “*Quorum-sensing*”**

O mecanismo de sensoriamento “*quorum-sensing*” (QS) foi descoberto há vinte anos na bactéria *Vibrio fischeri* (também conhecido como *Photobacterium fischeri*), que é um exemplo clássico de regulação da expressão gênica por moléculas *quorum-sensing* na presença da bioluminescência através do *N*-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona [EBERHARD *et al.*, 1981], desde então a pesquisa de QS progrediu rapidamente, principalmente em estudos ao nível

molecular e é agora considerado como um sistema geral entre as bactérias Gram-negativas [LAZDUNSKI *et al.*, 2004].

A sinalização se dá em função das flutuações ambientais, tais como diferenças de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e outras. Este fenômeno ocorre porque as bactérias têm desenvolvido múltiplos sistemas que permitem a sua adaptação ao meio ambiente. Uma extensa gama de microrganismos tem a capacidade de perceber e responder à presença de populações vizinhas [De OLIVEIRA, 2005]. Existem duas categorias principais de moléculas que desempenham o papel de sinalizadores:

- Aminoácidos e curtas cadeias peptídicas, que são comuns em bactérias Gram-positivas;
- Derivados de ácidos graxos, usualmente em bactérias Gram-negativas.

As acil homoserina lactonas (AHLs) são moléculas de baixo peso molecular produzidas por diversas bactérias Gram-negativas. Estas moléculas apresentam a capacidade de atuar na comunicação celular bactéria-bactéria [LAZDUNSKI *et al.*, 2004; GRAM *et al.*, 1999] regulando a expressão gênica responsável por diferentes fenótipos, sendo conhecida como moléculas *quorum sensing* [SHAPIRO, 1998], também descritas como controladoras na formação de biofilme [DAVIES *et al.*, 1998; LEITE *et al.*, 2001; PARSEK *et al.*, 2005].

O papel de comunicação intercelular no regulamento do comportamento multicelular bacteriano recebeu atenção difundida e uma variedade de moléculas envolvidos na comunicação bacteriana foi descoberta [BREDENBRUCH *et al.*, 2005]. Além das *N*-acil homoserina lactonas, também foram descobertas as 4-hidroxi-2-alkilquinolinas, e recentemente com a utilização da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas um número maior destas moléculas vem sendo descoberto [DÉZIEL *et al.*, 2004], incluindo principalmente uma série de 2-alkilquinolinas, 2-heptilquinolina e 2-nonilquinolina. A principal

molécula que é amplamente relatada como sinalizadora envolvida na comunicação intracelular é a 4-hidroxi-2-heptilquinolina. Outros estudos relatam que 2-heptilquinolinas funcionam como um mensageiro intercelular, participando na comunicação de célula para célula, coordenando a população das comunidades bacterianas [MICHAEL, 2005].

Com a demonstração que as 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolinas podem funcionar como um sinalizador intercelular torna-se compreensível o papel dos metabólitos secundários em *P. aeruginosa*. Assim, a comunicação “cell-to-cell” não está restringida as acil homoserina lactonas [PESCI *et al.*, 1999]. Este fato fez com que muitos alcalóides do tipo 2-alkilquinolina e 4-alkilquinolina recebessem os nomes triviais de "Pseudans" por causa da ocorrência destas em bactérias do gênero *Pseudomonas* [MICHAEL, 1997]. De maneira geral a ocorrência destas moléculas em *Pseudomonas* está descrita na TABELA 1.1.

TABELA 1.1: Ocorrência de moléculas de baixo peso molecular no gênero *Pseudomonas*.

Compostos	Espécies	REF
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Heptil-4-hidroxiquinolina;</li> <li>• 2-Nonil-4-hidroxiquinolina;</li> <li>• 2-Undecil-4-hidroxiquinolina;</li> <li>• 2-(Undec-1-enil)-4-hidroxiquinolina;</li> <li>• 2-(Hept-1-enil)-4-quinolona ;</li> <li>• 2-(Undec-3-enil)-4-quinolona.</li> </ul>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MACHAN <i>et al.</i> , 1992 BUDZIKIEWICZ <i>et al.</i> , 1979 KOZLOVSKI <i>et al.</i> , 1976
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quinolobactina</li> </ul>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MOSSIALOS <i>et al.</i> , 2000
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-<i>n</i>-Nonil-4-quinolona ;</li> <li>• 2-<i>n</i>-Undecil-4-quinolona;</li> <li>• 2-[(1'E)-Undec-1-enil]-4-quinolona;</li> <li>• 2-nonil-4-ol-quinolina-N-oxido</li> </ul>	<i>Pseudomonas</i> (cepa 1531-E7 – associada a esponja <i>Homophymia</i> sp.)	BULTEL-PONCE <i>et al.</i> , 1999
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Pentil-3-metil-4-quinolona;</li> <li>• 2-Heptil-3-metil-4-quinolona ;</li> <li>• 2-Nonil-3-metil-4-quinolona;</li> <li>• 2-(Hept-2-enil)-3-metil-4-quinolona;</li> <li>• 2-(Non-2-enil)-3-metil-4-quinolona</li> </ul>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	MOON <i>et al.</i> , 1996 HOMMA <i>et al.</i> , 1989 ROITMAN <i>et al.</i> , 1990

As pesquisas com moléculas sinalizadoras são mais concentradas em bactérias devido ao vasto conhecimento sobre as *N*-acil-homoserina lactonas e peptídeos, principais exemplos de sinalizadores em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente [BASSLER, 2002; PUPO *et al*, 2007]. No entanto, o tirosol e o farnesol (FIGURA 1.5) já foram identificados como moléculas sinalizadoras em *Candida albicans* [NICKERSON *et al*, 2002; CHEN *et al*, 2004].

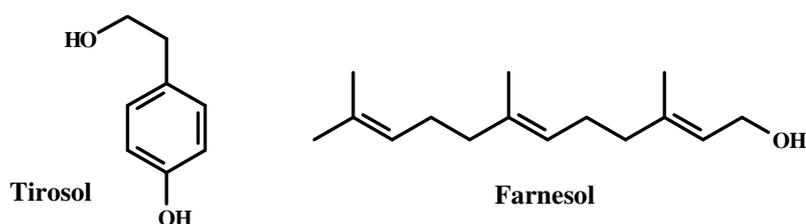


FIGURA 1.5: Moléculas identificadas em *C. albicans* (Tirosol e Farnesol)

A comunicação intra e interespecies utiliza moléculas de diéster do borato de furanosila (AI-2) e 2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxi-tetrahidrofurano (vAI-2) (FIGURA 1.6) [PONCE, 2007]. Além dessas, outras moléculas estão envolvidas na sinalização célula-célula, entre elas, dipeptídeos cíclicos, como dicetopiperazinas (DKPs) [DEGRASSI *et al.*, 2002], o ácido 3-hidroxipalmitato de metila (FIGURA 1.6) [PONCE, 2007]. Na tabela 1.2, alguns exemplos de moléculas sinalizadoras em bactérias.

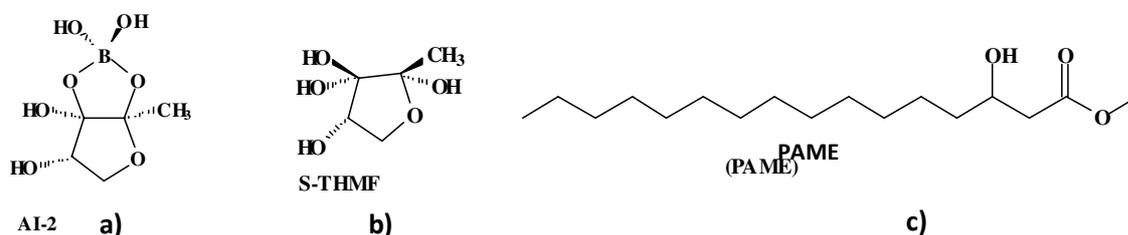
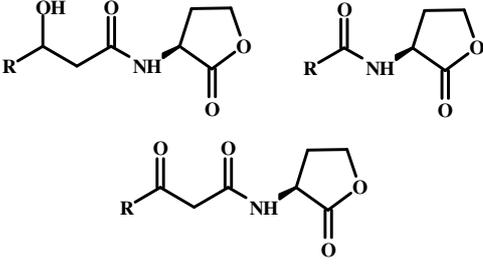
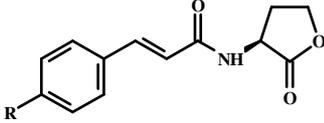
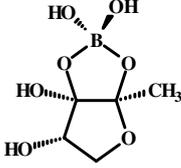
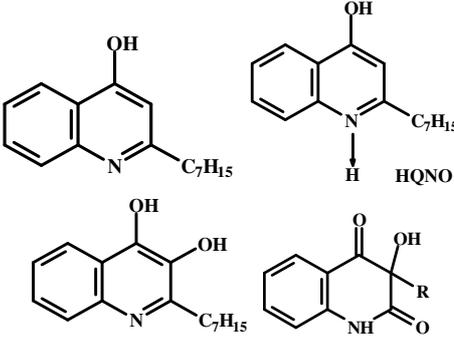
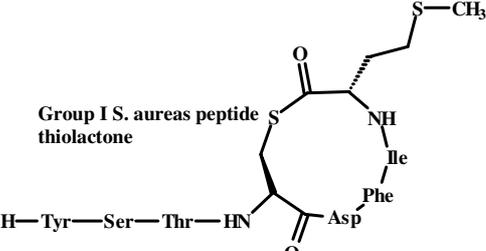
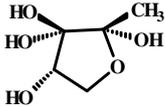
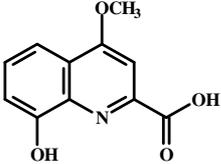
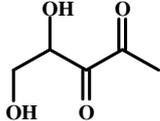
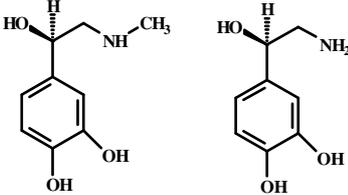
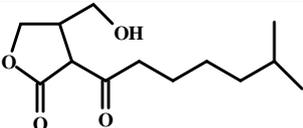
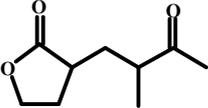
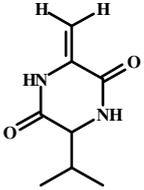
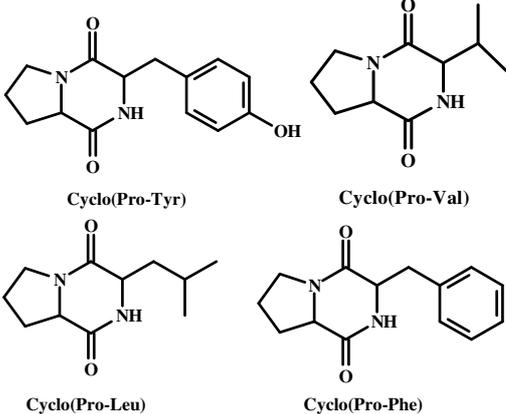
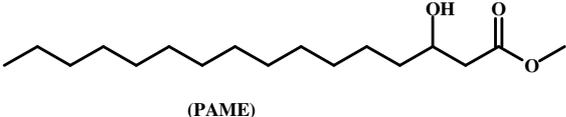


FIGURA 1.6: **a)** diéster do borato de furanosila (AI-2), **b)** 2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxi-tetrahidrofurano (vAI-2) e **c)** ácido 3-hidroxipalmitato de metila.

TABELA 1.2: Estruturas de moléculas sinalizadoras de bactérias.

Estrutura Química	Microrganismos	Referências
	<p><i>Vibrio fischeri</i>  <i>A. tumefaciens</i>*  <i>Erwinia carotovora</i>  <i>P. aeruginosa</i>*  <i>V. harveyi</i></p>	<p>HE &amp; ZHANG, 2008;  DANIELS <i>et al.</i>, 2004</p>
	<p><i>Bradyrhizobium</i>,  <i>Rhodopseudomonas</i>,  <i>Silicibacter</i></p>	<p>ATKINSON &amp; WILLIAMS, 2009</p>
	<p><i>V. harveyi</i></p>	<p>HE &amp; ZHANG, 2008;  DANIELS <i>et al.</i>, 2004</p>
 <p>DSF</p> <p>DSF (<i>Xylella</i>)</p>	<p><i>X. campestris</i>*  <i>S. maltophilia</i>*  <i>X. fastidiosa</i>*</p>	<p>HE &amp; ZHANG, 2008;  SIMIONATO <i>et al.</i>, 2007</p>
 <p>BDSF</p>	<p><i>Burkholderia cenocepacia</i></p>	<p>HE &amp; ZHANG, 2008</p>
	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>HE &amp; ZHANG, 2008;  SCHERTZER <i>et al.</i>, 2009</p>
 <p>Group I <i>S. aureus</i> peptide thiolactone</p> <p>H—Tyr—Ser—Thr—HN—Asp</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>DANIELS <i>et al.</i>, 2004</p>

	<i>Salmonella typhimurium</i>	HE & ZHANG, 2008
	<i>P. aeruginosa</i>	DIGGLE <i>et al.</i> , 2007
	<i>V. harveyi</i> , Precursor AI-2	WANG <i>et al.</i> , 2009
	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	WANG <i>et al.</i> , 2009
	<i>Streptomyces griseus</i>	HE & ZHANG, 2008
	<i>Xanthomonas campestris</i>	DANIELS <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DANIELS <i>et al.</i> , 2004
	<i>P. mirabilis</i> ** <i>B. cepacia</i> *	HOLDEN <i>et al.</i> , 1999; WANG <i>et al.</i> , 2010
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	DANIELS <i>et al.</i> , 2004

\**Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Burkholderia cepacia*, \*\* *Proteus mirabilis*.

Embora o sequenciamento do genoma da *X. fastidiosa* tenha sido concluído ainda não há medidas de controle satisfatórias que possam ser recomendados para esse patossistema. Uma alternativa para inibição de crescimento, que é o modo de ação da maioria dos antibióticos tradicionais, pode ser a atenuação de produção de fator de virulência. Assim uma análise dos eventos metabólicos subjacentes a comunicação bacteriana intercelular e elucidação da biogênese das moléculas sinalizadoras podem contribuir para a compreensão, assim como, podem prover uma oportunidade para interferir no controle de produção de fator de virulência [BREDENBRUCH *et al.*, 2005]. Uma vez que estas moléculas regulam importantes processos nos organismos produtores, a pesquisa nesta área é bastante promissora para o entendimento do ciclo de vida dos microrganismos e para a descoberta de moléculas bioativas, as quais possam inclusive regular a virulência de patógenos.

#### **1.4. Comunicação Celular em *Xylella fastidiosa*.**

Várias moléculas sinalizadoras de “*quorum*” têm sido identificadas e pertencentes a famílias quimicamente distintas como mostrados na tabela 1.2 (p. 18). Embora o mecanismo “*quorum-sensing*” mediado por AHLs seja o mais intensamente investigado, nem todas as bactérias comunicam-se usando este tipo de sinalização. A análise do genoma de *X. fastidiosa* sugere a existência de mecanismos de sinalização de *quorum* independentes das AHLs e similares aos que ocorrem em *Xanthomonas campestris* [LAMBAIS *et al.*, 2000].

No genoma da *X. fastidiosa* existe uma região com alta homologia à região cromossômica de *X. campestris* pv. *campestris* que contém o agrupamento de genes *rpf*. No entanto, no genoma de *X. fastidiosa* não foi encontrado o gene *rpfI*, o qual também não está presente em *X. axonopodis* pv. *citri*. Em *X. campestris* pv. *campestris*, os níveis de expressão de protease e celulase são reduzidos quando o gene *rpfI* é inativado, sugerindo que esse gene

pode agir na degeneração massiva do tecido que é observada em podridões moles causadas por essa bactéria, o que não é observado em plantas infectadas com *X. fastidiosa* ou *X. axonopodis* pv. *citri* [SILVA, 2004].

Os genes *rpfB* e *rpfF* estão envolvidos na síntese de DSF (*diffusible signal factor*), a qual pode ser importante para a percepção de quorum de *X. campestris* pv. *campestris*, na qual, foi identificado o ácido 11-metil *cis*-2-dodecenoico (FIGURA 1.7, B) [RYAN & DOW, 2008]. Desta forma, levando em consideração que os genes *rpfB* e *rpfF* de *X. fastidiosa* também poderiam estar envolvidas na síntese de DSF, Simionato e colaboradores (2007) identificaram a presença do ácido 12-metil-tetradecanóico (FIGURA 1.7, A) em *Xylella fastidiosa*.

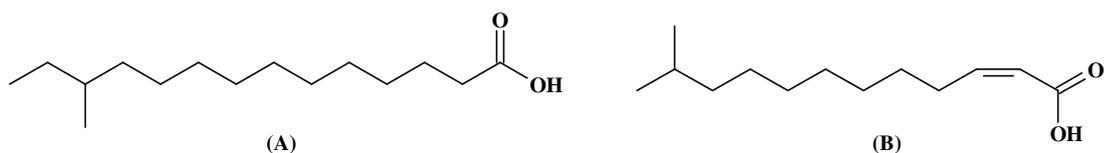


FIGURA 1.7: (A) Estrutura proposta para molécula DSF produzida pela bactéria *Xylella fastidiosa* (ácido 12-metil-tetradecanóico), (B) Molécula DSF produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico).

Muitas bactérias patogênicas utilizam sinalização celular para regular a expressão de fatores de virulência. A primeira molécula sinalizadora conhecida como *Diffusional Signal Factor* (DSF) é um *cis*-ácido graxo insaturado, identificado em *Xanthomonas campestris*. Um estudo recente mostrou que, os ácidos graxos produzidos pela bactéria *Burkholderia cenocepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* estão relacionados a regulação de virulência, formação de biofilme e tolerância aos antibióticos. Além disso, a família sinalizadora DSF têm mostrado o envolvimento na sinalização inter-espécies, modulando o comportamento das bactérias. Uma compreensão destes diversos mecanismos de sinalização poderia sugerir estratégias de intervenção, com consequências para o controle da doença. Embora acreditava-se que a síntese de DSF estava restrito a *Xanthomonas*, novas descobertas indicam uma importância

mais ampla em todo o mundo bacteriano (FIGURA 1.8) [RYAN & MAXWELL DOW, 2011].

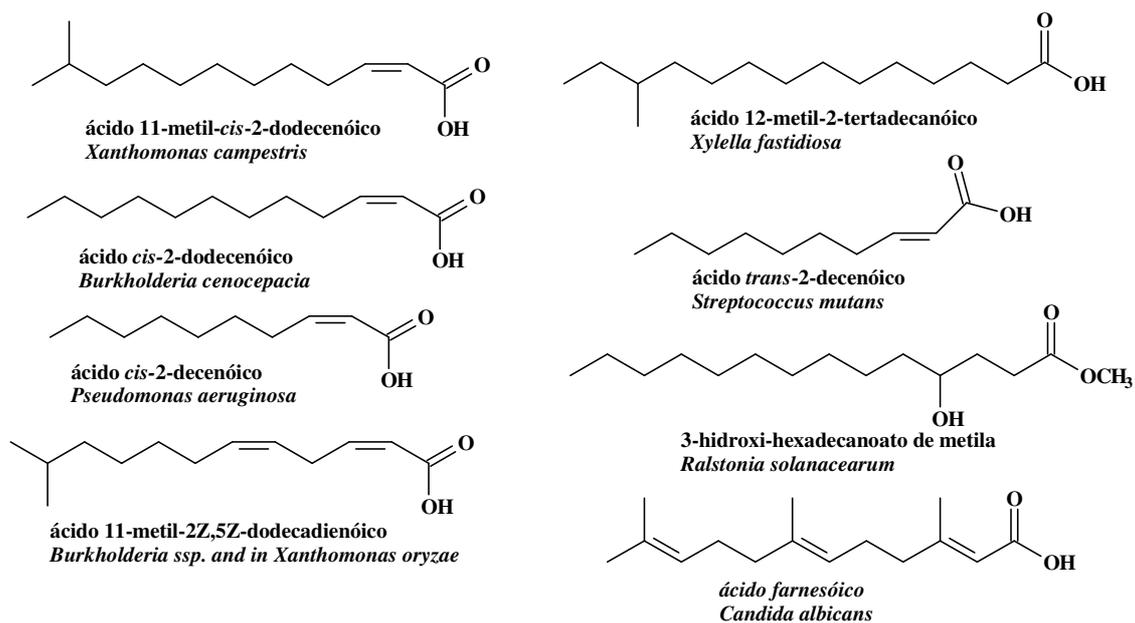


FIGURA 1.8: Moléculas sinalizadoras da família DSF relacionado a uma gama de bactérias.  
Fonte: Ryan, R. P. & Maxwell, D.J. *Trends in Microbiology*. v. 19, n 3, p 145-152. 2011.

*Parte*

**2**

*Objetivos*

## 2. PROPOSIÇÃO E JUSTIFICATIVA

A citricultura é uma das mais importantes atividades econômicas do Estado de São Paulo, gerando mais de 400 mil empregos e é responsável pela circulação de milhões de dólares, no entanto a cada ano o número de plantas afetadas por pragas vem aumentando, pondo em risco empregos e prejudicando a economia do país [SOUZA, 2002]. Entre as doenças fitossanitárias mais sérias encontra-se a clorose variegada do citros (CVC) ou amarelinho. Segundo a Fundecitrus em seu último levantamento a incidência de plantas contaminadas no Estado de São Paulo é de 39,19%. [FUNDECITRUS, 2009].

A bactéria *Xylella fastidiosa* é a causadora da CVC, atacando o xilema das plantas, causando o entupimento dos vasos responsáveis por levar água e nutrientes das raízes para as folhas. Embora o sequenciamento do genoma da *X. fastidiosa* tenha sido concluído ainda não há medidas de controle satisfatórias que possam ser recomendados para esse patossistema. Uma alternativa para inibição de crescimento, que é o modo de ação da maioria dos antibióticos tradicionais, pode ser a atenuação de produção de fator de virulência. Assim uma análise dos eventos metabólicos subjacentes à comunicação bacteriana intercelular e elucidação da biogênese das moléculas sinalizadoras podem contribuir à compreensão, assim como, podem prover uma oportunidade para interferir no controle de produção de fator de virulência [BREDENBRUCH, *et al.* 2005].

A *Xylella fastidiosa* desenvolve-se na forma de biofilme, cuja formação, acredita ser sinalizada por moléculas de baixo peso molecular. Assim, isolar e identificar estas moléculas permitirá obter informações sobre a formação do biofilme e conseqüentemente o desenvolvimento da bactéria. Portanto, a presente tese teve como objetivo buscar estas moléculas e entender os aspectos químicos que envolvem o desenvolvimento da bactéria *Xylella fastidiosa*. Sendo

assim, em trabalhos futuros, algumas aplicações poderão passar pelo estudo de compostos antagonistas aos compostos de comunicação produzidos pela *X. fastidiosa*, ou por métodos que impeçam a produção de eventual metabólitos.

## 2.1. Objetivos Específicos

- a. Desenvolver um protocolo de extração adequado para identificação *on-line* das moléculas produzidas pela *X. fastidiosa*;
- b. Estudar a química dos compostos voláteis produzidos pela bactéria *Xylella fastidiosa* via microextração em fase sólida (SPME) e análise por CG-EM;
- c. Desenvolver uma metodologia de análise dos extratos apolares por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM);
- d. Desenvolver um método de separação dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- e. Estudar a química da bactéria *Xylella fastidiosa* via Cromatografia líquida hifenada a Ressonância Magnética Nuclear (LC-NMR), utilizando unidade de extração em fase sólida (SPE);
- f. Estudar a química da bactéria *Xylella fastidiosa* via Cromatografia líquida hifenada a Espectrometria de Massas (LC-MS);
- g. Buscar por possíveis moléculas sinalizadoras produzidas pela *Xylella fastidiosa* via LC-MS/MS in planta com sintomas da CVC.

*Parte*

**3**

*Metodologia*

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Materiais e Equipamentos Utilizados

##### ➤ Equipamentos em Geral

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu modelo LC-10AD (condições analíticas); Detector Espectrofotômetro UV-VIS. Modelo SPD-GAV, Shimadzu para HPLC-R;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e detector de Ultravioleta G1314B. O equipamento está acoplado a uma interface G1369A e os cromatogramas foram registrados através do *software* EZCrom Ellite;
- Cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP5000, equipado com coluna AT-5ms, L = 30 m, DI = 0,25 mm e filme = 0,25 µm;
- Cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP2010, equipado com coluna RTx-5ms, L = 30 m, DI = 0,25 mm e filme = 0,25 µm;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker), DRX 400 Bruker (9,4 Tesla);
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker), modelo AVANCE III, 500 MHz (11,7 tesla) acoplado ao sistema de HPLC-UV-SPE foi composto por um cromatógrafo Agilent Technologies modelo 1100, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A,

amostrador automático G1329A e detector de Ultravioleta G1314B. A sonda HPLC-RMN de 4 mm com volume de detecção de 30 µl foi utilizada em conjunto com uma unidade de Extração em Fase Sólida (SPE) Bruker/Spark Prospekt II para a concentração dos analitos de interesse. A fase estacionária dos cartuchos empregada foi a HySphereResin GP-10-12 µm;

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker), modelo AVANCE III, 600 MHz (14,1 tesla) equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda de 5 mm com ATMA<sup>®</sup> (Automatic Tuning MAtching) e gradiente de campo em z, sonda de 5 mm TXI ( Broadband Inverse Detection com ATMA<sup>®</sup>) com gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade cryo-fit<sup>®</sup> e unidade LC-SPE acoplado;
- Espectrômetro de Massas: Modulo de separação WATERS Allience 2695, detector PDA WATERS 2996 e espectrômetro de massas QuattroLC – MICROMASS, Triplo-quadrupolo, ESI/APCI;
- Evaporador de solvente a vácuo (SPEEDVAC) da 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;
- Centrífuga com sistema de refrigeração, Eppendorf modelo 5810R;
- Mesa agitadora tecnal TE-1401.
- Evaporador rotatório BUCHI, rotavapor R-114 e R-200, equipado com banho BUCHI B-480 e 490, respectivamente. Recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

➤ **Solventes:**

- Solventes comerciais destilados no DQ – UFSCar;
- Solventes grau HPLC;
- Solventes deuterados.

➤ **Reagentes para preparar meio de cultura PW (*Periwinkle Wilt*)**

- Peptona Fitona;
- Peptona Trypticase;
- Cloreto de Hemina;
- Vermelho fenol;
- Glutamina;
- $K_2HPO_4$ ;
- $KH_2PO_4$ ;
- $MgSO_4 \cdot H_2O$ ;
- NaOH.

➤ **Materias em Geral**

- Membrana Teflon 0,45 e 0,20  $\mu m$  (Millipore<sup>®</sup>);
- Tubos Falcon 15 e 50 mL;
- Micropipetas Eppendorf de 20-200  $\mu L$  e 200- 1000  $\mu L$ ;
- Vórtex PHOENIX AP56

## 3.2. Procedimentos Experimentais

### 3.2.1. Obtenção do Material Bacteriano

O crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa* foi realizado juntamente com o Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros *Sylvio Moreira* do Instituto Agrônomo (IAC), situado na cidade de Cordeirópolis-SP, sob os cuidados e colaboração da Dra. Alessandra Alves de Souza. Inicialmente, preparou-se o meio de cultura PW (líquido) para as células 9a5c de *X. fastidiosa*, segundo o protocolo de Davis *et al.*, 1981 (TABELA 3.1). Adicionou-se a quantidade específica de cada reagente de acordo com a quantidade total de meio necessário.

TABELA 3.1: Reagentes e suas concentrações necessárias no preparo do meio PW.

	P/ 1000 mL	P/ 200 mL	P/150 mL	P/100 mL
Peptona Fitona	4,00 g	0,80 g	0,60 g	0,40 g
Peptona Trypticase	1,00 g	0,20 g	0,15 g	0,10 g
Cloreto de Hemina (0,1%)	10,00 mL	2,00 mL	1,50 mL	1,00 mL
V. de Fenol (0,2%)	10,00 mL	2,00 mL	1,50 mL	1,00 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,20 g	0,24 g	0,18 g	0,12 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00 g	0,20 g	0,15 g	0,10 g
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,40 g	0,08 g	0,06 g	0,04 g
H <sub>2</sub> O	800 mL	164 mL	125 mL	92 mL

### 3.2.2. Preparo do Meio

Preparou-se vermelho de fenol 0,2% a partir da adição de 0,2 g de vermelho de fenol e 10 gotas de NaOH 20% em 100 mL de H<sub>2</sub>O; e cloreto de hemina 0,1% a partir da adição de 0,1 g cloreto de hemina (Sigma H-1652) e 0,2 g NaOH em 100 mL H<sub>2</sub>O. Os outros reagentes foram obtidos comercialmente. Autoclavou-se a mistura por 20 minutos a 120°C e adicionou-se glutamina 4%. Foi necessária uma grande quantidade de meio líquido para a realização dos

experimentos, portanto, preparou 4000 mL de meio para cada preparo dos extratos.

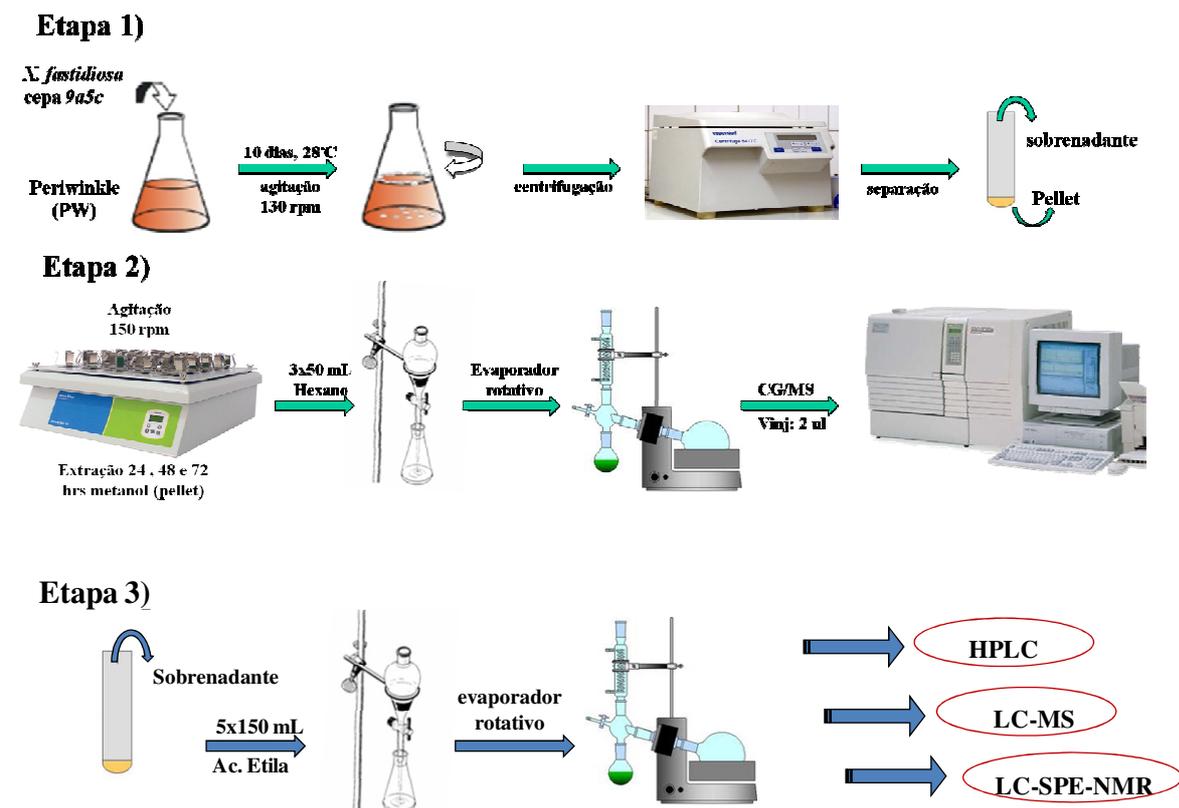
Os meios são preparados com o máximo de cautela, toda vidraria usada é autoclavada, o meio é autoclavado e toda preparação do meio é executada dentro de um fluxo laminar, uma vez que este meio é facilmente contaminável, devido ser este rico e não conter nenhum antibiótico. O meio líquido é facilmente contaminado que o meio sólido, pois há um maior manuseio e transferência de vidrarias. Após este procedimento os meios ficaram sob “quarentena” (aproximadamente 14 dias) para verificar se não houve contaminação. Preparados os meios de cultivo, colocou-se a bactéria para crescer no meio líquido. A bactéria após 10 dias de crescimento (FIGURA 3.1), onde se encontra em maior nível populacional, o meio foi centrifugado e posteriormente os extratos bacterianos foram obtidos pelo processo de extração segundo o esquema 3.1 da página 32. Todos os extratos foram preparados na quinta repicagem.



FIGURA 3.1: Figura ilustrativa mostrando em destaque as células bacterianas aderidas à parede do Erlenmeyer, após 10 dias de crescimento.

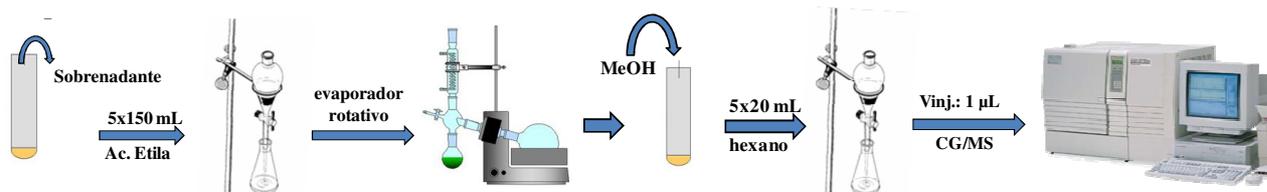
Nesta fase o meio foi centrifugado e posteriormente os extratos bacterianos foram obtidos pelo processo de extração utilizando solventes orgânicos grau HPLC. Após centrifugação a 15.000 rpm por 20 minutos (ESQUEMA 3.1, Etapa 1, p. 32), o sobrenadante é retirado para extração líquido-líquido com acetato de etila (ESQUEMA 3.1, Etapa 3, p. 32) e o

precipitado celular (*pellet*) foi colocado em metanol para extração durante 3x24 horas sob agitação, posteriormente, submetido a extração líquido-líquido com hexano (ESQUEMA 3.1, Etapa 2). Nesta fase foram obtidos dois extratos da bactéria *X. fastidiosa*; o extrato acetato de etila sobrenadante e extrato hexânico do precipitado celular (*pellet*).



ESQUEMA 3.1: Etapa 1) As células 9a5c da *X. fastidiosa* foram cultivadas em meio PW com agitação (130 rpm) e controle de temperatura (28 °C) durante 10 dias, posteriormente o meio é centrifugado com subsequente separação do precipitado celular (*pellet*) e sobrenadante. Posteriormente, maceração do precipitado celular em metanol sob agitação (3x24 hrs), posteriormente filtrado e extraído com hexano. Com o sobrenadante foi realizada extração líquido-líquido com acetato de etila. As Etapas 2 e 3 exemplifica as etapas de acordo com a técnica utilizada para identificação.

Outra etapa realizada foi à extração líquido-líquido do sobrenadante com acetato de etila, que posteriormente foi seco em rotaevaporador. Este foi ressuspendido em metanol com subsequente extração líquido-líquido com hexano (ESQUEMA 3.2, p. 33).



ESQUEMA 3.2: Preparo do extrato hexânico do sobrenadante da bactéria *X. fastidiosa*.

O preparo dos extratos bacterianos e controle foram realizados seguindo o protocolo descrito para cada 4000 mL de meio bacteriano. Em geral, a proporção de extratos bacterianos obtidos foi de 10 mg a partir do precipitado celular (extrato bruto em metanol) e 30 mg a partir do sobrenadante (extrato bruto em acetato de etila).

### 3.2.3. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu CG-EM QP5000 e QP2010, massas operando por impacto de elétrons a 70 eV. Os cromatógrafos operaram com colunas capilares AT-5ms, 30m x 0,25 mm e 0,25 µm e RTx-5ms, 30 m x 0,25 mm e 0,25 µm, respectivamente. O gás de arraste foi hélio. A temperatura do injetor e detector, mantidos a 250°C e 280°C, respectivamente. Os volumes de amostra injetados foram de 2 µL em *splitless*. A detecção por massas foi realizada num intervalo de 50 -500 Da.

Os extratos apolares obtidos da bactéria *X. fastidiosa* foram analisados no cromatógrafo QP5000 (coluna AT-5ms ), na qual consistiu em uma programação de temperaturas utilizado o forno inicialmente a 150°C, com incremento de temperatura de 3°C/min até 200°C, com 10 minutos isotermicamente, posteriormente um incremento de 5°C/min até 280°C, com 5 min isotermicamente.

As frações aprisionadas na unidade SPE do sistema LC-SPE-NMR foram analisadas no cromatógrafo QP2010 (coluna TRx-5ms ), na qual consistiu em

uma programação de temperaturas utilizado o forno inicialmente com uma programação de temperatura utilizando forno inicialmente a 140°C com isoterma de 5 min, com incremento de temperatura de 4°C/min até 290°C, posteriormente um incremento de 2°C/min até 315°C, com 5 min isotermicamente.

#### **3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

O desenvolvimento de um método cromatográfico utilizando HPLC no modo reverso foi iniciado com o emprego de uma eluição gradiente exploratória, a qual pode ser usada para determinar se uma condição gradiente ou isocrática é a mais apropriada para a análise da amostra em estudo.

Este experimento permite determinar os tempos de retenção ( $T_r$ ) da primeira e da última banda observadas na eluição empregada e os valores podem ser utilizados para determinar o valor de  $K_m$  (fator de retenção médio) para os compostos presentes na amostra. Se as substâncias presentes nesta amostra apresentarem valores de tempos de retenção baixos e também uma adequada separação dos mesmos, o modo isocrático de análise pode ser escolhido como condição de eluição a ser utilizado. Entretanto, se os compostos existentes na amostra analisada tiverem valor de  $T_r$  elevado e apresentarem uma grande distribuição de banda cromatográfica, então a condição gradiente deverá ser escolhida como modo de eluição a ser utilizada [SNYDER & DOLAN, 1996].

Foi empregado um detector de arranjo de fotodiodos como seleção da faixa de comprimento de onda entre 200-500 nm na região do UV para determinar as absorvâncias das substâncias presentes. Assim, para tentar melhorar a interação e distribuição cromatográficas dos compostos presentes na amostra analisada, alterações de vazão, fase móvel e fase estacionária foram avaliadas (TABELA 3.2, p. 35).

O uso da mistura H<sub>2</sub>O:ACN como fase móvel geralmente é menos viscosa e permite a utilização de valores baixos de comprimento de onda no UV para detecção dos compostos, com isso, a utilização de ACN como modificador orgânico foi utilizado constantemente nas análises, ao invés de MeOH, uma vez que, o comprimento de onda em que os compostos melhor absorveram foi 217 nm. A primeira eluição gradiente exploratória do extrato indicou que a uma esta séria a mais apropriada, uma vez que, o extrato apresentou uma alta distribuição de bandas, contudo, optou-se por fazer alguns testes no modo isocrático (TABELA 3.2).

TABELA 3.2: Condições cromatográficas avaliadas para análise do extrato polar da *X. fastidiosa*.

COLUNA	CONDIÇÃO		FASE MÓVEL	
Eclipse XDB-C18 (150 x 4,60) x 5 µm	1A	1,0 mL/min	10% de ACN por 5 min., 10-50% em 15 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 10 min..	
	2A	0,8 mL/min	10% de ACN, 10-50% em 20 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 5 min..	
		0,9 mL/min		
		1,0 mL/min		
		1,1 mL/min		
	3A	0,8 mL/min	10% de ACN, 10-50% em 15 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 10 min..	
		1,0 mL/min		
	4A	1,0 mL/min	10% de (ACN:MeOH-8:2) por 5 min, 10-50% em 15 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 10 min..	
	ODS2 (125x4,0) x 5 µm	5A	0,8 mL/min	10% de (ACN:MeOH-1:1), 10-30% em 20 min (ACN:MeOH-1:2), 30-60% em 10 min (ACN:MeOH-1:2)., 100% de MeOH em 10 min, isocrático por 5 min

Eclipse XDB-C18 (250 x 4,60) x 5 µm	<b>1B</b>	0,5 mL/min	10% de (ACN:MeOH-1:1), 10-30% em 20 min (ACN:MeOH-1:2), 30-60% em 10 min (ACN:MeOH- 1:2)., 100% de MeOH em 10 min, isocrático por 5 min
Gemini-C18 (150 x 4,60) x 5 µm	<b>1C</b>	1,0 mL/min	10% de ACN, 10-50% em 15 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 10 min..
	<b>2C</b>	1,0 mL/min	Isocrático (ACN 35%)
Luna phenyl- hexyl (250 x 4,60) x 5 µm	<b>1D</b>	0,8 mL/min	10% de ACN, 10-50% em 15 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 10 min..
	<b>2D</b>	0,8 mL/min	Isocrático (ACN 35%)
Luna C18 (250 x 4,60) x 10 µm	<b>1E</b>	0,8 mL/min	10% de ACN, 10-50% em 20 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 5 min..
	<b>2E</b>	0,8 mL/min	10% de MeOH por 5 min, 10-50% em 15 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 5 min..
	<b>3E</b>	1,0 mL/min	Isocrático (ACN 35%)

De acordo com as condições cromatográficas, a coluna selecionada para trabalho foi a Eclipse XDB-C18 (250 x 4,60) x 5 µm, condição **1B** (vazão 0,5 ml/min) (TABELA 3.2, p. 35) e ODS2 (125 x 4,0) x 5 µm, condição **5A** (TABELA 3.2, p. 35), uma vez que estas apresentaram melhor separação e resolução das bandas cromatográficas.

### **3.2.5. Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS)**

Na análise química do extrato acetato de etila sobrenadante da *Xylella fastidiosa* por LC-MS utilizou-se as condições cromatográficas descritas na tabela 3.2, página 35, condição **5A**. Os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo de ionização. O fluxo de entrada no espectrômetro de massas foi regulado utilizando um splitter numa vazão de 0,3 mL/min. O nitrogênio foi utilizado para nebulização (35 L/h) e dessolvatação (800 L/h). A ponta do

capilar ESI foi fixada em 3,39 kV. Argônio foi utilizado para os experimentos fragmentações e os íons pai foram acelerados usando uma rampa de energia de colisão de 5-35 eV.

### 3.2.6. LC-SPE-NMR

#### 3.2.6.1. Cromatografia

A análise cromatográfica foi executada em uma coluna Eclipse XDB-C18 (250 x 4,60) x 5  $\mu$ m, condição **1B** (vazão 0,5 ml/min) (TABELA 3.2, p. 35). O volume de injeção foi de 5  $\mu$ L em 40 mg/mL do extrato acetato de etila do sobrenadante da *Xylella fastidiosa*, e os cromatogramas foram detectadas em 205 - 500 nm. As bandas foram trapeadas em cartuchos *hysphere*.

#### 3.2.6.2. SPE-NMR

Primeiramente os cartuchos foram condicionados com 3 volumes de acetronitrila e equilibrados com 1 volume de água. As bandas foram trapeadas em cartuchos *hysphere*. Para tanto, o fluxo que saía da coluna foi combinado com um fluxo de água três vezes maior, visando uma diminuição da força da fase movel para que os compostos ficassem retidos no cartucho SPE (FIGURA 3.2). Após a retenção dos compostos os cartuchos foram secos por 30 min com fluxo de nitrogênio. Cada cartucho foi eluido com 200  $\mu$ l de metanol deuterado, e através de um capilar a amostra foi inserida na sonda (volume da sonda 60  $\mu$ l).

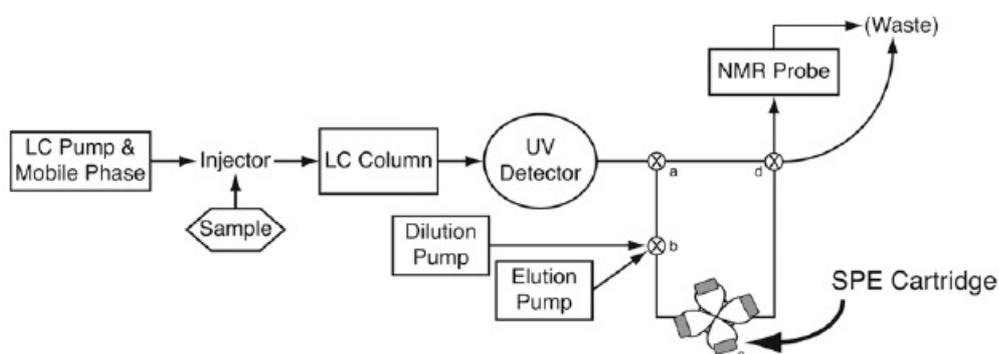


FIGURA 3.2: Imagem ilustrativa do equipamento LC-SPE-NMR (Griffiths,L., Horton,R.; Magn. Reson.Chem., 1998, 36, 104-109).

### 3.2.6.3. RMN

Os espectros de RMN das amostras eluídas dos cartuchos foram obtidas utilizando sequências de pulsos com supressão do solvente e dupla pré-saturação da água residual. Todos os espectros foram registrados em 300 K e referenciados utilizando os picos solvente residuais do solvente: 1,93 ppm para CD<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N e 3,30 ppm para CD<sub>2</sub>HOD. Os espectros foram adquiridos pela acumulação de 128 varreduras.

### 3.2.7. Metodologia para Compostos Voláteis

Para a extração dos voláteis da bactéria *X. fastidiosa* foi utilizada a técnica de Microextração em Fase sólida (SPME) e análise por CG-EM. O material bacteriano foi obtido de acordo com o **item 3.2.1.**, página 30.

#### 3.2.7.1. Microextração em Fase Sólida dos Voláteis

Os experimentos foram realizados com três tipos de fibra: CAR/PDMS – Carboxeno/Polimetilsiloxano 75 µm, PDMS/DVB Polimetilsiloxano/Divinilbenzeno 65 µm, e PA - Poliacrilato 85 µm. Condicionou-as antes de iniciar o experimento em um cromatógrafo a gás utilizando condições específicas catalogadas (TABELA 3.3).

TABELA 3.3: Condições de condicionamento para as fibras (Supelco).

<b>Fibra</b>	<b>T injetor (°C)</b>	<b>T coluna (°C)</b>	<b>T detector (°C)</b>	<b>t condicionamento (min)</b>
<b>CAR/PDMS</b>	250	250	280	100
<b>PDMS/DVB</b>	250	250	280	30
<b>PA</b>	250	250	280	60

Posteriormente, inseriram-se as fibras em um sistema fechado em meio de cultura com a bactéria *X. fastidiosa*, deixando-a expostas por 60 min. Após este período, injetaram-se as fibras diretamente em um Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM) (ESQUEMA 3.3), sob as seguintes condições:

Cromatógrafo Shimadzu CG-EM QP5000, operando por impacto de elétrons a 70 eV. O cromatógrafo operou com coluna capilar AT-5ms 30m x 0,25 mm, ID., 0,25 um. O gás de arraste foi hélio com fluxo de 1,6 mL/min. A temperatura do injetor e detector, foram mantidas a 250°C e 280°C, respectivamente. A injeção foi em *splitless*. O programa de temperaturas utilizado consistiu no forno inicialmente a 40°C, com incremento de temperatura de 7°C/min até 260°C, com 15 minutos isotermicamente. A detecção por EM foi realizada num intervalo de 40 -500 Da.



ESQUEMA 3.3: Extração dos compostos voláteis utilizando Microextração em fase solida.

### 3.2.8. Preparo dos extratos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb) após inoculação da bactéria *X. fastidiosa*.

O extrato foi preparado utilizando folhas e caules superiores de laranja doce sobre limão cravo inoculada e com sintomas foliares de CVC após inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa*. O material seco foi moído em moinho de facas Willey, pulverizado em moinho criogênico e peneiradas utilizando uma peneira molecular de 0,25 µm, a fim de deixar todas as partículas homogêneas evitando assim erros experimentais de extração.

Pesou-se 40 mg do material seco, adicionou-se 2,0 mL de metanol e posteriormente foi realizada extração por 90 s utilizando-se Vortex. Seguidamente o material foi centrifugado a 10000 rpm por 15 min, o sobrenadante retirado e seco em SpeedVac. Repetiu-se o procedimento de extração por mais quatro vezes.

Após o extrato seco, o mesmo foi re-suspenso em 1 mL de Metanol e filtrado em filtros PTFE MILLIPORE<sup>®</sup> 30 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro, posteriormente analisou-se por LC/MS.

*Parte*

# **4**

*Resultados e  
Discussões*

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estudo químico da bactéria *Xylella fastidiosa* (9a5c) cultivado em meio PW foi realizado utilizando as seguintes técnicas de análise: Cromatografia Gasosa, Cromatografia Líquida, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear, as quais juntas tornaram possível a análise de matrizes e misturas complexas. Estas técnicas contribuíram na identificação *on-line* de compostos presentes em pequenas concentrações, uma vez que o desenvolvimento da bactéria levou a extratos brutos em pequenas quantidades. Desta forma, os resultados serão abordados de acordo com cada técnica cromatográfica.

### 4.1. Estudo Químico da *Xylella fastidiosa* por Cromatografia Gasosa acoplada Espectrometria de Massas

Os metabólitos secundários produzidos por bactérias em geral são encontrados em baixas concentrações, sendo assim, uma das estratégias adotadas foram as análises dos extratos apolares (ESQUEMA 3.1, p. 32) por CG-EM. A análise dos extratos hexânicos por CG-EM permitiu a identificação de derivados de ácidos graxos (**EXPH** - extrato hexânico do precipitado celular da *Xylella fastidiosa*) e alcalóides dicetopiperazinas (DKPs) (**EXSH** - extrato hexânico sobrenadante da *Xylella fastidiosa*). A injeção do meio PW (sem a presença da bactéria) foi usada como o branco dos experimentos, onde foram usados os mesmos parâmetros para preparo do extrato e análise por CG-EM (FIGURA 4.1, p. 42).

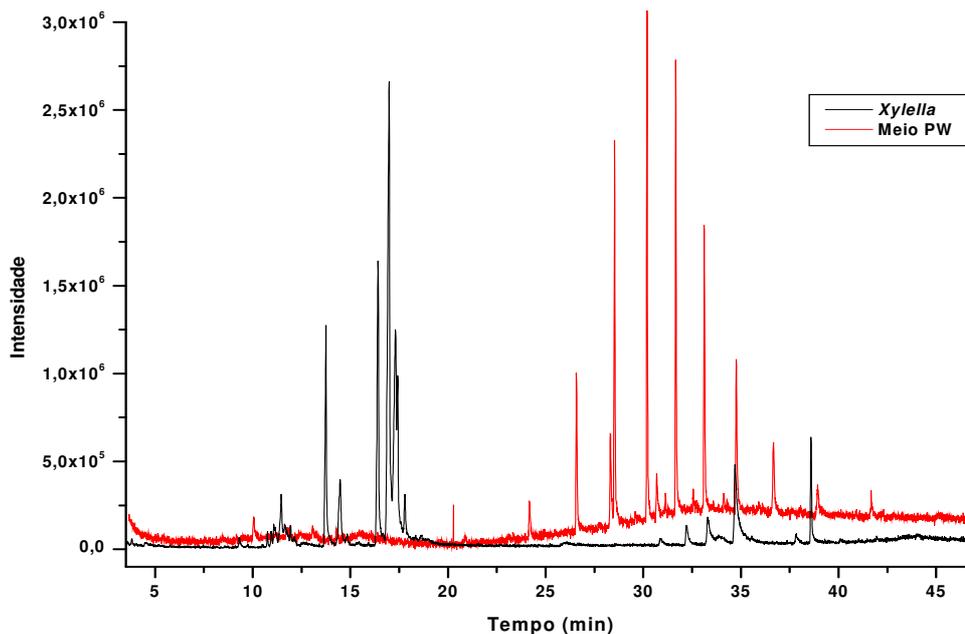


FIGURA 4.1: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM do extrato hexânico sobrenadante da *Xylella fastidiosa* e do branco PW (coluna AT-5ms 30m x 0,25 mm, ID., 0,25 um). Condições : 150° C(3 min.) (3° C/min)-200° C (10 min.) (5° C/min) -280° C (5° C/min). Injetor: 250° C, Detector: 280° C- Gás arraste: He-1,1 mL/min.

Assim, foram filtradas as bandas cromatográficas referentes aos metabólitos produzidos pela *X. fastidiosa*, no qual estes foram discutidas na presente tese.

#### 4.1.1. Perfil químico do Extrato hexânico do sobrenadante da *X. fastidiosa* por CG-EM

O extrato hexânico do sobrenadante da *X. fastidiosa* foi obtido conforme o item 3.2.2 (ESQUEMA 3.1, p. 32), na qual via CG-EM permitiu a identificação principalmente de alcalóides dicetopiperazinas (DKPs) (FIGURA 4.2, p. 43). Os espectros de massas adquiridos para este extrato foram comparados com aqueles similares armazenados no banco de dados do sistema CG-EM (NIST107, NIST21, 08 e 08s) e com dados de EM da literatura [SMITH *et al.*, 1988; GINZ *et al.*, 2001; De ROSA *et al.*, 2003; HOFMANN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010].

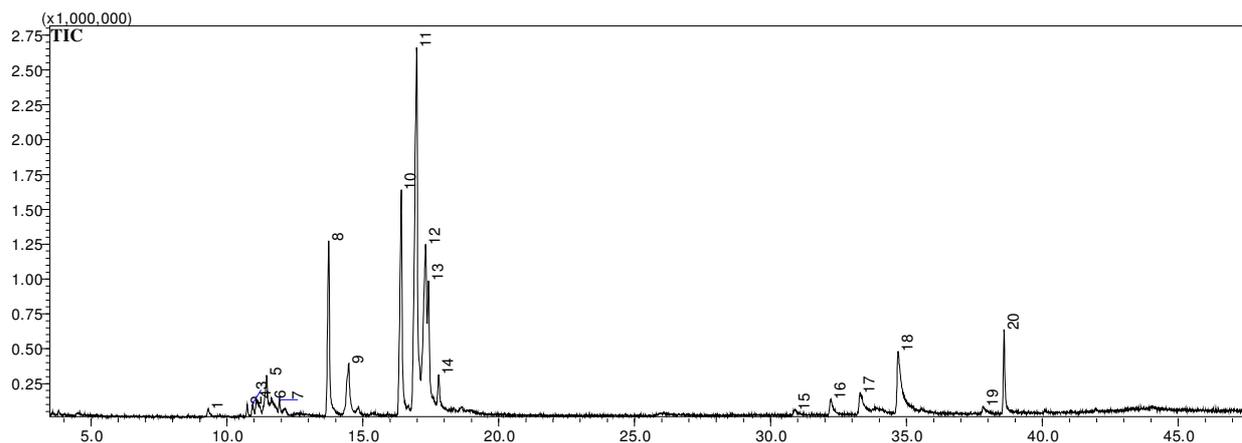


FIGURA 4.2: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM (coluna AT-5ms 30m x 0,25 mm, ID., 0,25 um). Condições : 150° C (3 min.) (3° C/min)-200° C (10 min.) (5° C/min) - 280° C (5° C/min). Injetor: 250° C, Detector: 280° C- Gás arraste: He-1,1 mL/min.

Nos espectros de massas adquiridos para este extrato observou-se a presença de íons característicos de dicetopiperazinas. O espectro de massas (FIGURA 4.3) da banda cromatografica t.r. 14.48 mostrou um íon molecular em  $m/z$  196 e outros íons fragmentos. O íon molecular pode ter sofrido rearranjo de hidrogênio (McLafferty) com perda da molécula neutra  $C_3H_6$  dando um fragmento intenso em  $m/z$  154 (FIGURA 4.4, p. 44). Também é comum em espectros de massas de dicetopiperazinas encontrar a perda de um radical isopropila para produzir um íon de  $m/z$  153, o qual posteriormente pode perder CO formando o fragmento  $m/z$  125 (FIGURA 4.5, p. 44).

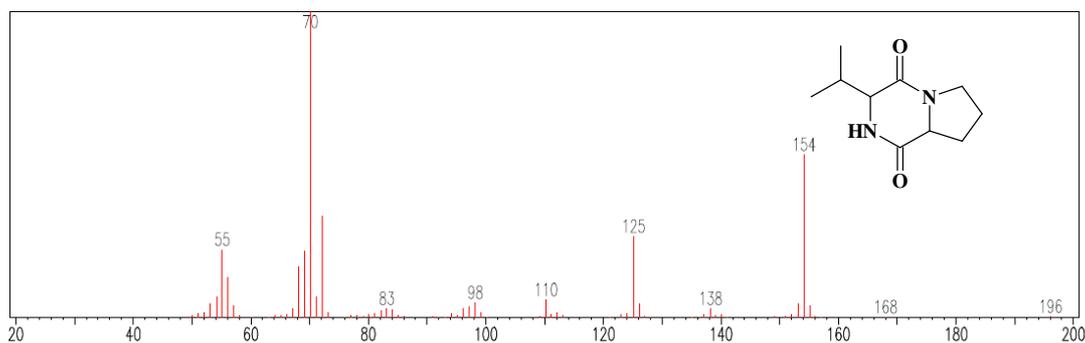


FIGURA 4.3: Espectro de massas da dicetopiperazina ciclo (Pro-Val) que produz a banda com t.r. 14.48 min.

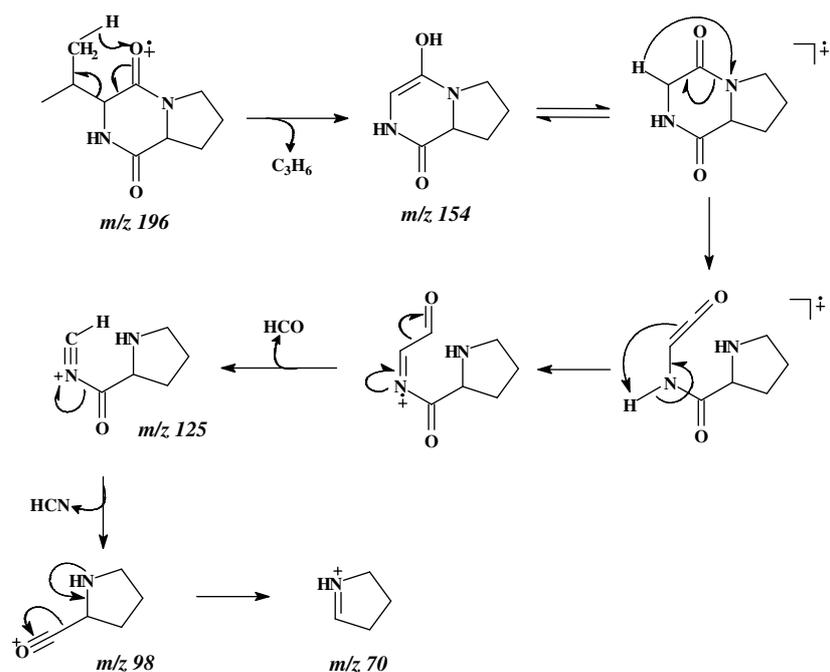


FIGURA 4.4: Proposta estrutural para alguns fragmentos característicos da dicetopiperazina Ciclo (Pro-Val) observados por CG-EM ( $IE, 70 eV$ ).

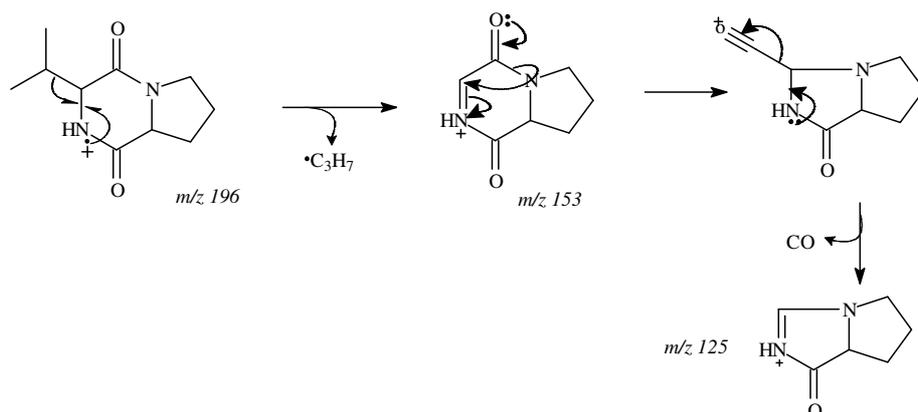


FIGURA 4.5: Proposta estrutural para formação do íon de  $m/z 153$ , que decompostos pela expulsão de CO formando o pico  $m/z 125$  observados por CG-EM ( $IE, 70 eV$ ).

As bandas cromatográficas em t.r. 33.30 e t.r. 34.70 (FIGURA 4.2, p. 43) levaram a espectros de massas similares (FIGURA 4.6, p. 45), sugerindo a presença de isômeros com tempo de retenção diferente na coluna cromatográfica. Em comparação com o EI-MS da literatura [WANG *et al.*, 2010] estes dados sugerem a presença de dois isômeros da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Phe).

Estas moléculas possuem hidrogênio ácido  $\alpha$ -carbonílico, o qual no meio de isolamento poderia ser epimerizado, levando a dois isômeros com tempo de retenção diferentes. Outra possibilidade seria estes dois derivarem de aminoácidos distintos, ou seja, um ser originar dos aminoácidos da série D e o outro da série L, ou a interação entre D e L. Esta última possibilidade têm sido estudada e há dados na literatura que a confirmam a presença de aminoácidos D em alguns microorganismos [LAM *et al.*, 2009; BULL *et al.*, 1998]. Da mesma forma como outras bactérias Gram-negativas relatadas, foram identificadas também em *X. fastidiosa* isômeros de dicetopiperazinas. Sendo assim, neste estudo não se sabe qual banda cromatográfica é pertencente ao respectivo isômero *cis* ou *trans*.

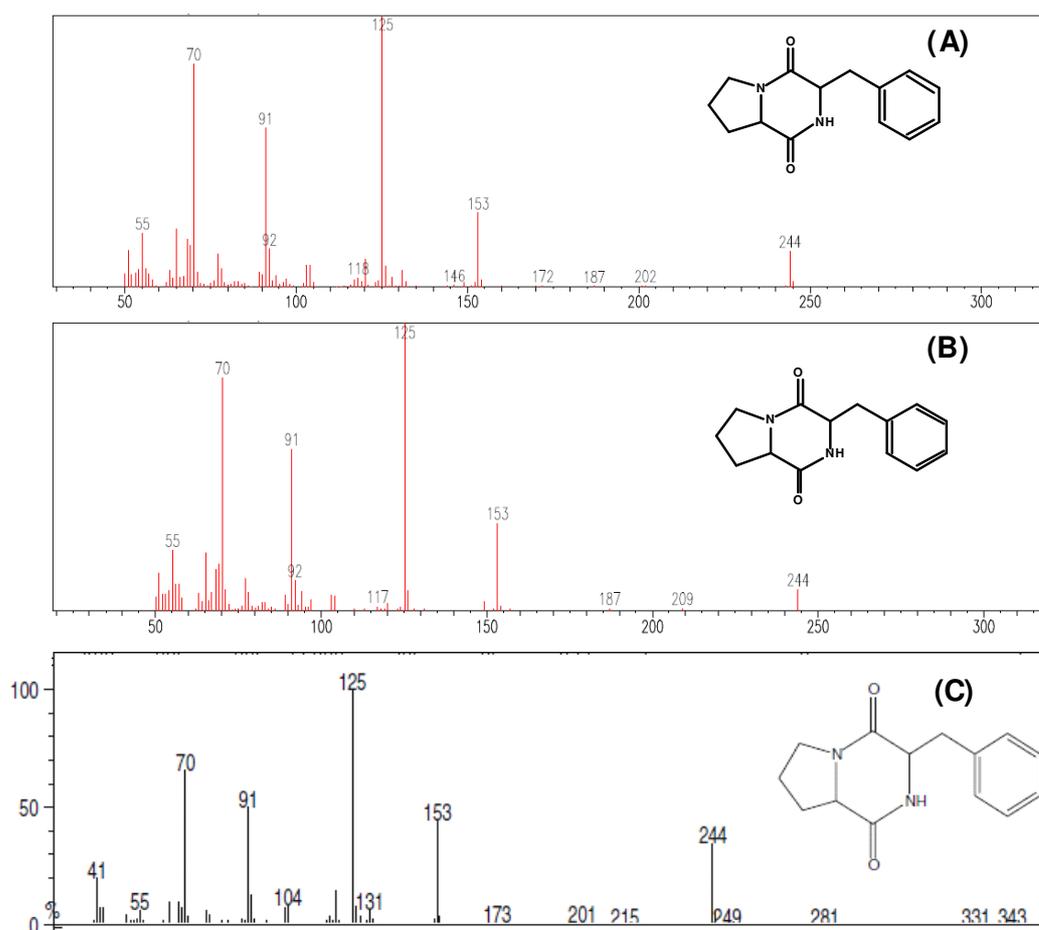


FIGURA 4.6: Espectros de massas das substâncias *ciclo* (Pro-Phe) em t.r. 33.30 (A), t.r. 34.70 (B) e da literatura (C) [WANG *et al.*, 2010].

As bandas cromatográficas em t.r. 16.41, 16.99, 17.30 e 17.42 min (FIGURA 4.2, p. 43) geraram espectro de massas similares (FIGURA 4.7), na qual indicam que os espectros de massas destes picos referem-se a dois pares de epímeros, mas com tempo de retenções diferentes. Em comparação com o padrão da biblioteca do sistema CG-EM (NIST 05 e NIST 107), sugeriu com 91% de similaridade a DKPs *ciclo* (Pro-Leu) e em comparação com o EI-MS da literatura indica a presença do *cis* e *trans* isômeros para *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 4.7, E). Desta forma os dados espectrais revelam a presença do *cis*, *trans ciclo* (Pro-Leu) e por sua vez as outras duas bandas cromatográficas referem-se a *cis*, *trans ciclo* (Pro-Ile). No entanto, neste estudo não podemos afirmar qual pico cromatográfico é pertencente a cada isômero.

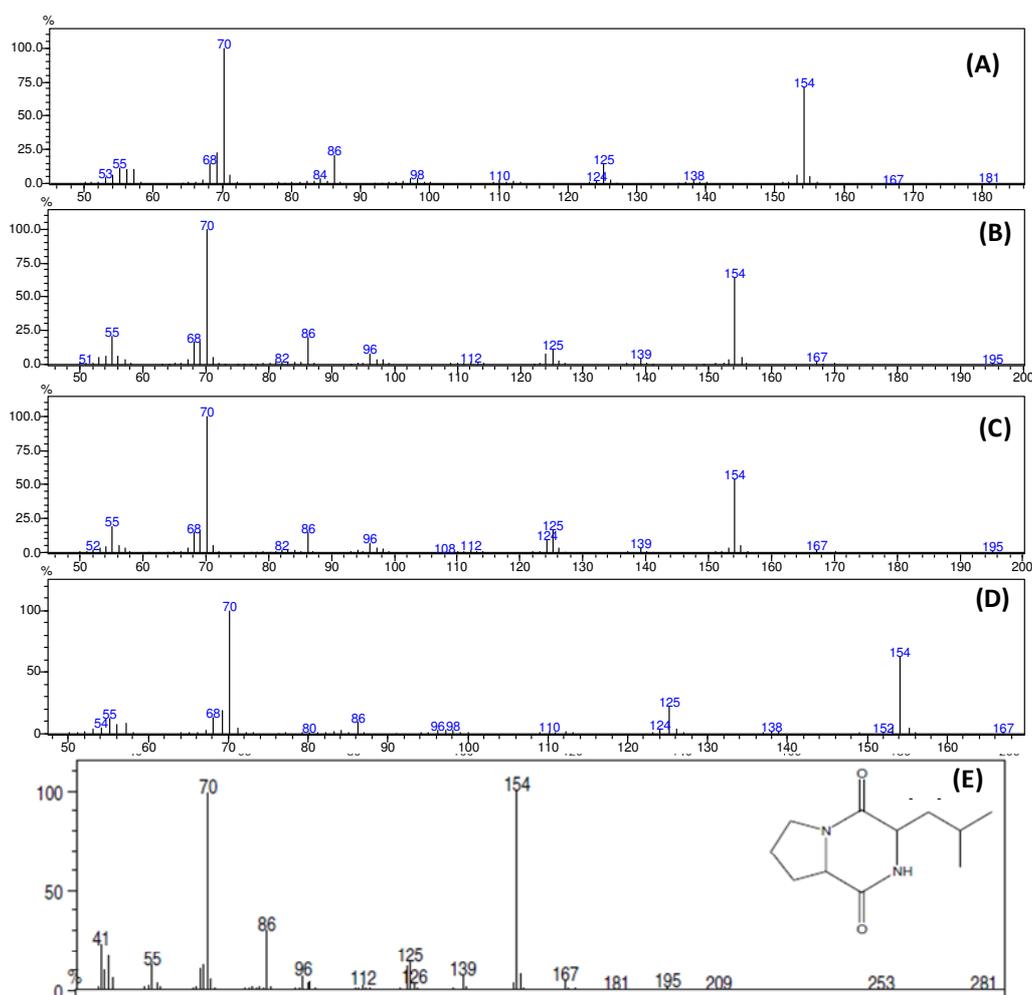


FIGURA 4.7: Espectros de massas das substâncias *ciclo* (Pro-Leu/Ile) em t.r. 16.41 (A), 16.99 (B), 17.30 (C) e 17.42 (D) e da literatura (E) [WANG *et al.*, 2010].

De acordo com os espectros de massas obtidos por ionização com impacto eletrônico foram comumente encontrados fragmentos iônicos característicos tais como:  $m/z$  154, 153, 128, 125, 91 e 70 (FIGURA 4.8, TABELA 4.1, p. 49). Assim, através dos íons selecionados  $m/z$  154, 125, 91 e 70, o extrato hexânico do sobrenadante da bactéria foi analisado adquirindo estes íons (FIGURA 4.9) no intuito de corroborar com aqueles já identificados e na identificação de outras dicetopiperazinas. É importante salientar a presença do íon de  $m/z$  70 como pico base na maioria dos espectros de massas, o qual, funcionou como digital de dicetopiperazinas com presença do resíduo de aminoácido prolina. Semelhantermente, a presença do íon propílio  $m/z$  91 caracteriza o resíduo de aminoácido fenilalanina (FIGURA 4.8).

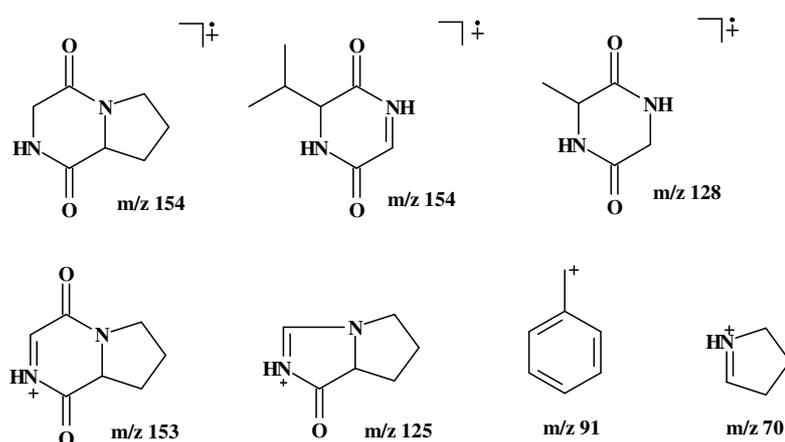


FIGURA 4.8: Íons característicos das Dicetopiperazinas

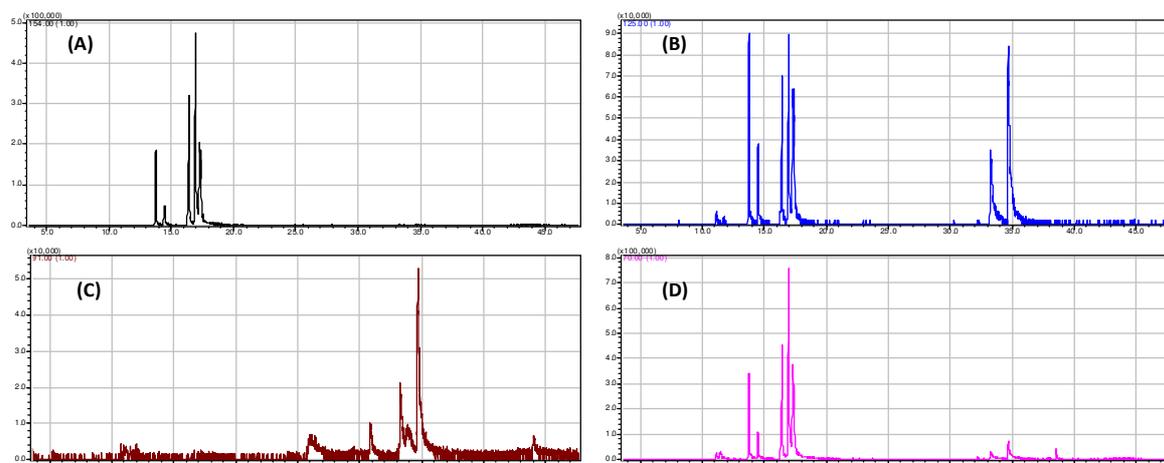


FIGURA 4.9: Cromatograma adquirido por monitoramento seletivo de íons  $m/z$  154 (A),  $m/z$  125 (B),  $m/z$  91 (C) e  $m/z$  70 (D).

Na análise dos espectros de massas do extrato com os íons selecionados  $m/z$  154, 125, 91 e 70 mostrado na figura 4.9 (p. 47), revelou a presença principalmente de dicetopiperazinas formado do resíduo de aminoácido prolina [FIGURA 4.9, cromatograma (B)]. Corroborando com dados discutidos anteriores, a análise do extrato também resultou na identificação das demais dicetopiperazinas (DKPs): *ciclo* (Val-Ala) (t.r. 11.45 e 11.63 min) e *ciclo* (Val-Phe) (t.r. 30.89 min), além disso, foi verificada a presença do ácido hexadecanóico (t.r. 17.82 min) e 1-hexadecenol (t.r. 32.17 min) (FIGURA 4.11, p. 49). Os principais íons observados foram resumidos na tabela 1.

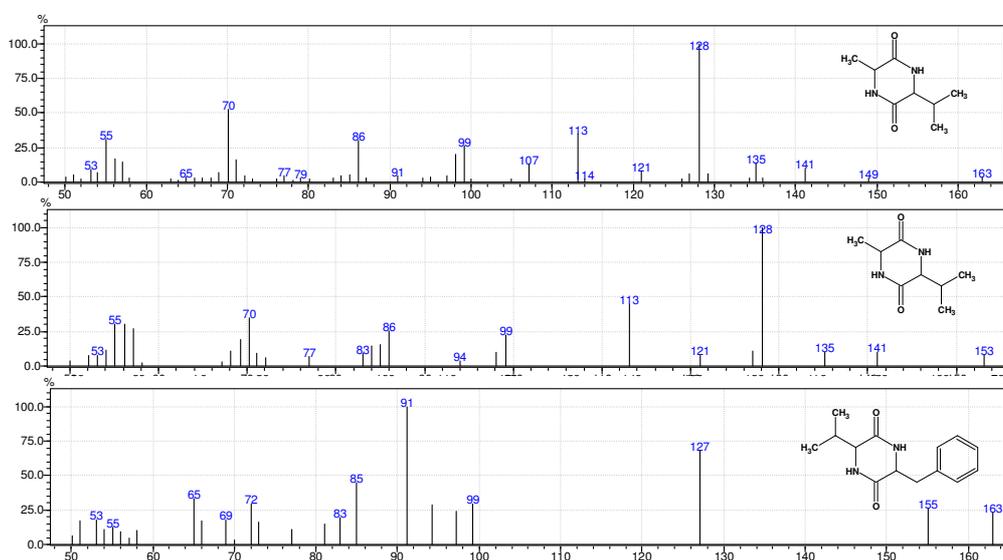


FIGURA 4.10: Espectros de massas das DKPs *ciclo* (Val-Ala) (t.r. 11.45 e 11.63 min) e *ciclo* (Val-Phe) (t.r. 30.89 min).

O espectro de massa da banda em t.r. 17.82 min (FIGURA 4.11, A, p. 49) mostrou similaridade com 87% com o ácido hexadecanóico de acordo com a biblioteca NIST 05. Desta forma, levou a sugerir que o composto que gera o sinal cromatográfico t.r. 17.82 min, possui o íon molecular  $m/z$  256 [ $C_{16}H_{32}O_2$ ], é o ácido hexadecanóico. O espectro de massas da banda t.r. 32.17 min (FIGURA 4.10, B, p. 49) foi caracterizado como 1-heptadecenol [ $C_{17}H_{32}O$ ], na qual mostrou íons fragmentos em  $m/z$  55, 69, 83, 97, 111, que sugerem a presença do álcool primário.

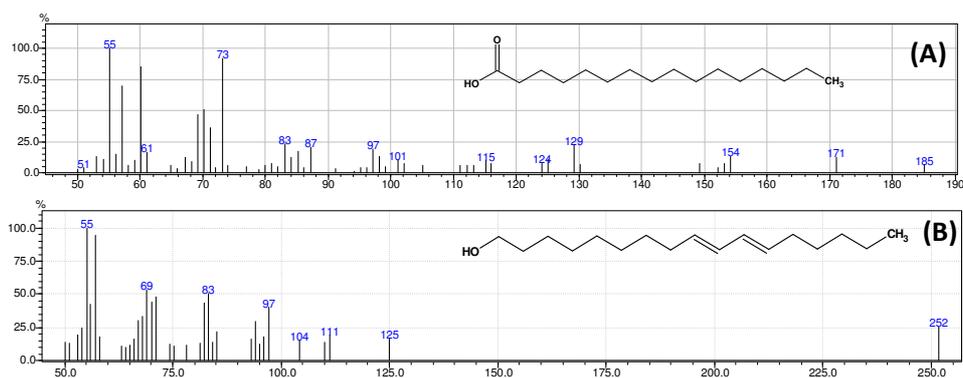


FIGURA 4.11: Espectros de massas obtidos dos picos cromatográficos em t.r. 17.82 min (A) e t.r. 32.17 min (B).

TABELA 4.1 : Compostos identificados por CG-EM no extrato hexânico do sobrenadante da *X. fastidiosa*.

Compostos	pico	M.M.*	t.r.** (min)	m/z (%) íons
<i>ciclo</i> (Val-Ala)	5	168	11.45	128 (100), 70 (60), 55 (38), 86 (32), 113 (32)
<i>ciclo</i> (Val-Ala)	6	168	11.63	128 (100), 113 (38), 99 (25), 57 (22), 149 (20)
<i>ciclo</i> (Pro-Val)	8	196	13.74	70 (100), 154 (58), 125 (28), 72 (30), 55 (25)
<i>ciclo</i> (Pro-Val)	9	196	14.48	70 (100), 154 (50), 125 (42), 68 (18), 55 (15)
<i>ciclo</i> (Pro-Leu/Ile)	10	211	16.41	70 (100), 154 (75), 86 (26), 125 (22), 68 (20)
<i>ciclo</i> (Pro-Leu/Ile)	11	211	16.99	70 (100), 154 (70), 86 (28), 55 (12), 125 (20)
<i>ciclo</i> (Pro-Ile/Leu)	12	211	17.30	70 (100), 154 (55), 125 (23), 55 (23), 86 (18)
<i>ciclo</i> (Pro-Ile/Leu)	13	211	17.42	70 (100), 154 (68), 86 (28), 125 (20), 68 (17)
ácido Hexadecanoico	14	256	17.82	55 (100), 73 (85), 60 (82), 129 (25), 87 (23)
<i>ciclo</i> (Val-Phe)	15	246	30.89	91 (100), 55 (58), 127 (42), 85 (37), 99 (30)
1-Heptadecenol	16	252	32.17	55 (100), 69 (60), 83 (53), 97 (45), 111 (27)
<i>ciclo</i> (Pro-Phe)	17	244	33.30	125 (100), 70 (80), 91 (45), 153 (32), 244 (12)
<i>ciclo</i> (Pro-Phe)	18	244	34.70	125 (100), 70 (77), 91 (55), 153 (30), 244 (15)

\*M.M. Massa Molecular; \*\* t.r. tempo de retenção

Os dados mostrados até o momento evidenciou a presença de alcalóides dicetopiperazinas produzidos pela bactéria *X. fastidiosa* identificadas no extrato hexânico do sobrenadante. Os alcalóides dicetopiperazínicos (DKPs) constituem uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos em fungos, com diversas e interessantes atividades biológicas incluindo atividades antibiótica, imunossupressora e antitumoral [AMEUR *et al.*, 2004].

É importante ressaltar que este é o primeiro relato da presença das dicetopiperazinas em *Xylella fastidiosa*. O papel destas moléculas ainda permanece largamente desconhecido em microrganismos, desta forma o papel destas pode revelar grandes avanços no mecanismo biológico das bactérias e, sobretudo da *X. fastidiosa*. Degrassi et al, (2002), em estudos similares, observaram combinações de dipeptídeos cíclicos (DKPs) no sobrenadante em culturas da bactéria *Pseudomonas putida* (WCS358), o que foi um relato completamente novo em bactérias Gram-negativas. Além disso, foi sugerido que vários DKPs possam fazer um papel importante como mediadores químicos e sinalizadores dos sistemas bacterianos [BRELLES-MARINO & BEDMAR, 2001; FURTADO *et al.*, 2007].

Em geral, bactérias Gram negativas usam as homoserinas lactonas aciladas (acil-HSLs) como autoindutores e as Gram positivas usam oligopeptídeos. As acil homoserinas em análise via CG-EM fornecem em geral os íons  $m/z$  143, 128, 113, 102, 101 e 100 (FIGURA 4.12). Os espectros de massas das Acil-HSLs apresentam em sua maioria como pico base o íon  $m/z$  143, obtido pelo *rearranjo de McLafferty* envolvendo a carbonila da cadeia acila. Na tentativa de verificar se as acil-HSLs estavam presentes no extrato do sobrenadante da *X. fastidiosa*, estes foram analisados via CG-EM monitorando os íons  $m/z$  143, 113, 102, 101 e 100.

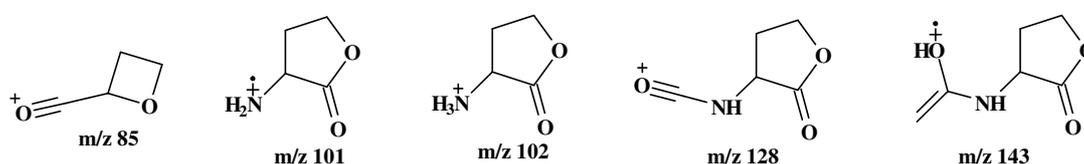


FIGURA 4.12: Alguns fragmentos característicos da N-acil-HSLs [POMINI, 2009].

O cromatograma obtido nesta análise (FIGURA 4.13, p. 51) mostra que nenhum destes íons foi detectado caracterizando as acil-HSLs, no qual sugeriu a ausência de homoserinas lactonas aciladas no extrato analisado via CG-EM.

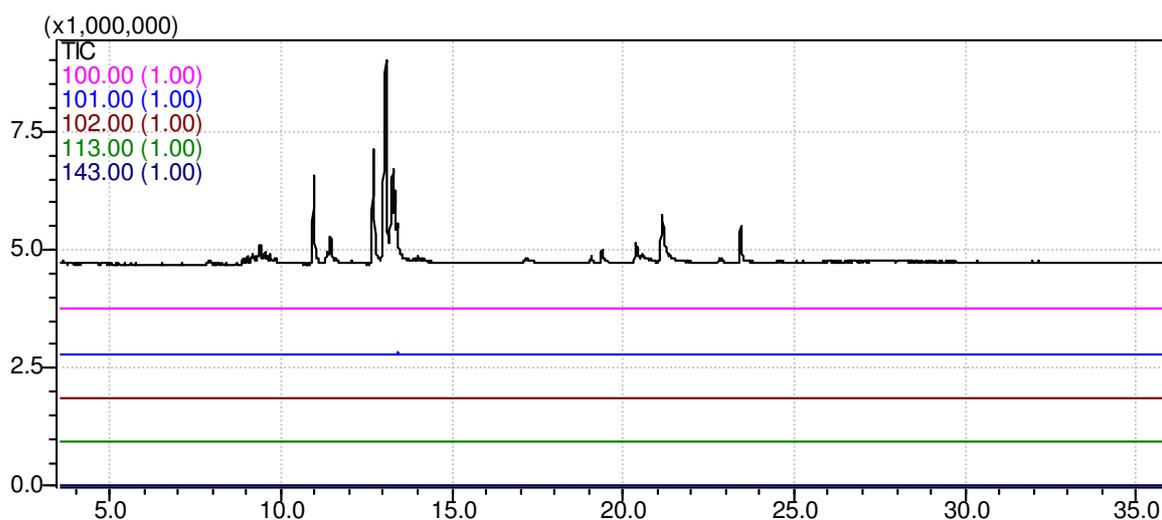


FIGURA 4.13: Cromatograma adquirido do íon selecionado  $m/z$  143, 113, 102, 101 e 100.

Este resultado confirma a análise do genoma de *X. fastidiosa*, que sugere a existência de mecanismos de sinalização independentes da acil-HSLs e semelhantes aquelas que ocorrem em *Xanthomonas campestris* [LAMBAIS *et al.*, 2000]. Estes também evidenciam a grande relevância deste trabalho, uma vez que é o primeiro relato de dicetopiperazinas na bactéria *X. fastidiosa*.

A fim de determinar o papel das DKPs encontrados em bactérias Gram-negativas, Degrassi *et al.* [2002] encontrou quatro DKPs, a *ciclo* (L-Tyr-L-Pro), *ciclo* (L-Leu-L-Pro), *ciclo* (L-Phe-L-Pro) e *ciclo* (L-Val-L-Leu) em *Pseudomonas putida* (WCS358), e usando DKPs sintéticos, descobriram que dois destes; o *ciclo* (L-Tyr-L-Pro) e *ciclo* (L-Leu-L-Pro) ativaram biossensores em *Agrobacterium* A. NT1 (pDCI41E33), enquanto os outros ativaram o biossensor em *E. coli* JM109 (PSB401). Também há relatos que algumas DKPs ativaram biossensores das homoserinas lactonas aciladas, o que sugeriu um provável complexo mecanismo de sinalização de bactérias Gram-negativas. Barnard e Salmão em 2005 classificaram as DKPs como moléculas sinalizadoras, no entanto, o papel destas na transdução de sinal ainda permanece desconhecido [WANG *et al.*, 2010].

#### 4.1.2. Perfil químico do Extrato hexânico do precipitado celular da *X. fastidiosa* por CG-EM

O extrato hexânico do precipitado celular da *X. fastidiosa* foi obtido conforme o **item 3.2.2** (ESQUEMA 3.1, p. 32) e a análise da composição química por CG-EM possibilitou a identificação de derivados de ácidos graxos (FIGURA 4.14). Os espectros de massas adquiridos para este extrato foram comparados com os espectros de massas armazenados no banco de dados do sistema CG-EM (NIST107, NIST21, WILEY8) e com dados da literatura [CHRISTIE, 2011; SIMIONATO *et al.*, 2007].

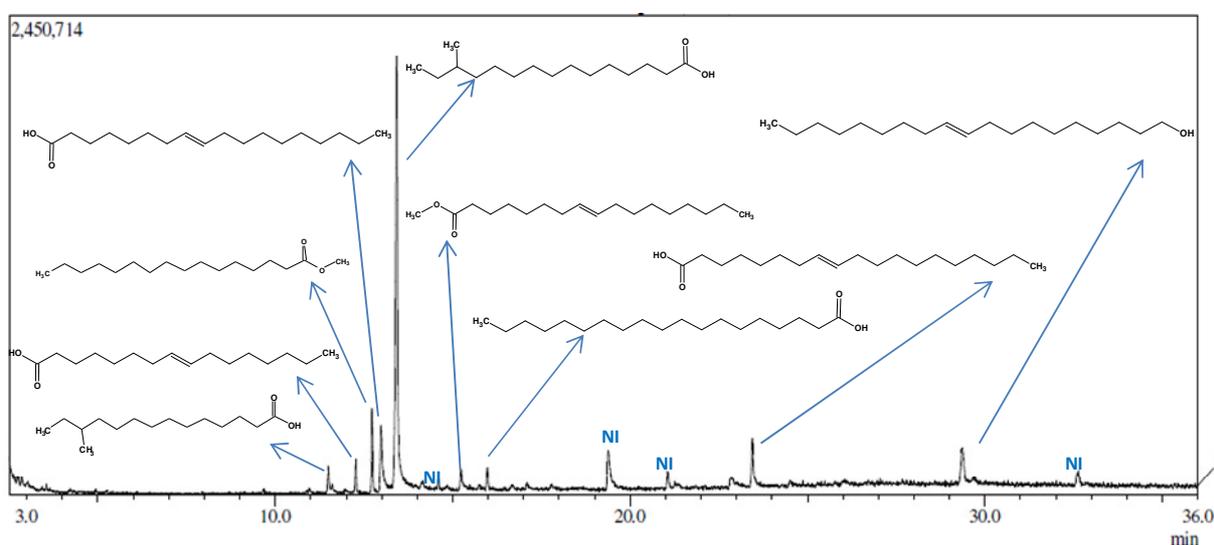


FIGURA 4.14: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM (coluna AT-5ms 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25  $\mu$ m) do extrato do precipitado celular. Condições : 150° C(3 min.) (5° C/min)-280° C (10 min) Injetor: 250° C, Detector: 280° C- Gás: He-1,1 mL/min.

Os espectros de massas obtidos das bandas cromatográficas foram apresentados na figura 4.15, página 53. Os resultados do extrato hexânico do precipitado celular mostraram que *X. fastidiosa* produz derivados de ácidos graxos de cadeia não muito longa e dados da literatura sugere que os ácidos graxos podem fazer um papel importante como mediadores químicos nos sistemas de sinalização em bactérias. Esse fato sugere que *X. fastidiosa* sintetiza moléculas DSF (difusíveis fator de sinal) semelhantes mas não iguais as produzidas pela bactéria *Xanthomonas campestris* [RYAN & MAXWELL DOW, 2011; SIMIONATO *et al.*, 2007].

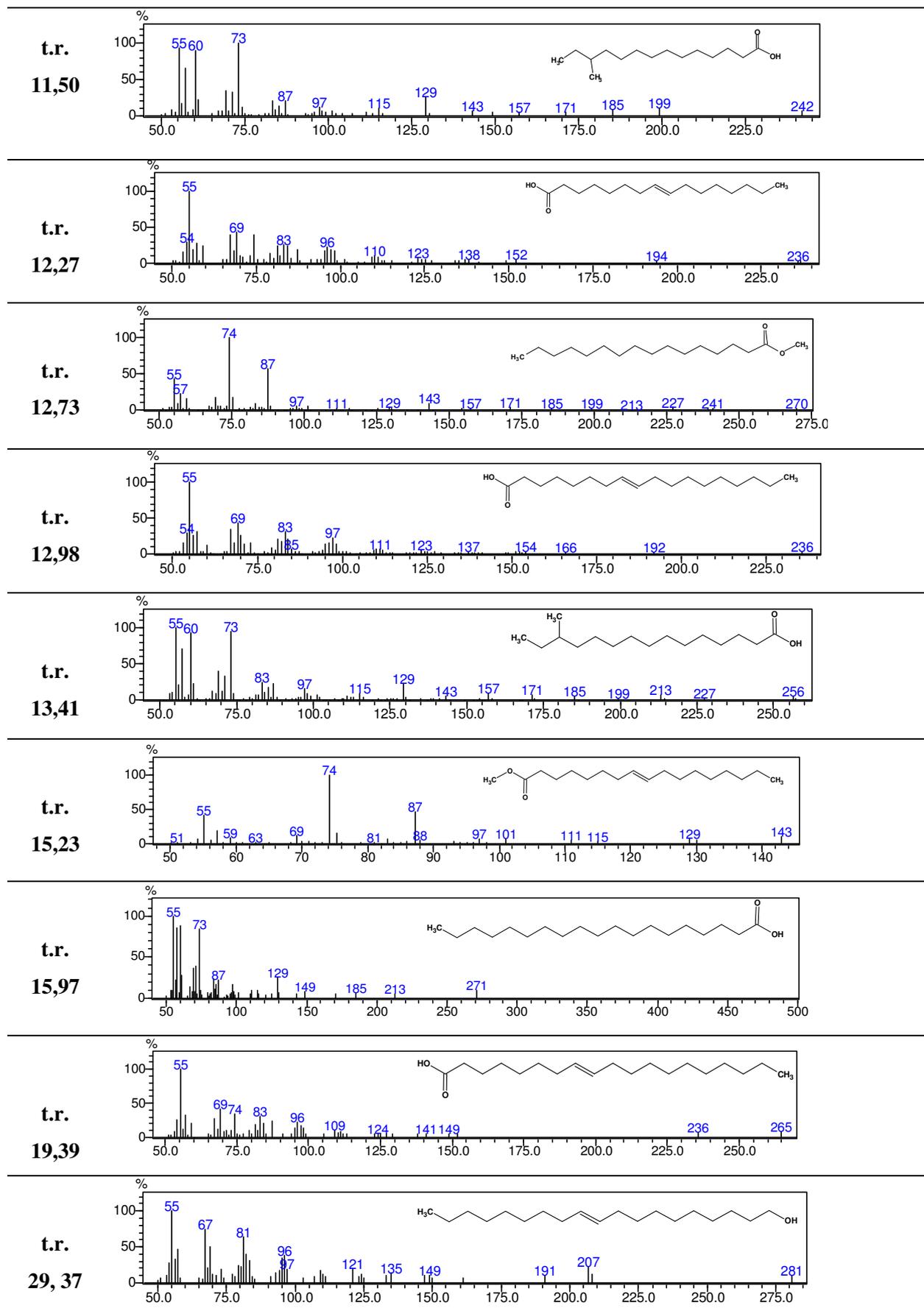


FIGURA 4.15: Espectros de massas e compostos identificados no extrato hexânico do precipitado celular da *X. fastidiosa*.

A banda cromatográfica t.r. 12.27 min revelou em seu espectro de massas fragmentos de baixa intensidade de uma cadeia alquílica saturada. Um íon característico observado  $m/z$  138 [M-116] que surge por uma perda de fragmento, contendo o grupo carbonila e clivagem entre C5-C6. O espectro de massa do pico investigado mostrou similaridade de 89 % com ácido hexadecenoico [C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>] de acordo com a biblioteca NIST 05 e NIST 107. Os mesmos íons foram observados para o espectro de massas da banda em t.r. 12.98 min, na qual se sugere uma série homóloga deste ácido. O espectro de massas da banda t.r. 29.37 min foi caracterizado como álcool nonadecadien-1-ol [C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O], na qual mostrou íons fragmentos em  $m/z$  55, 67, 81, 96, 121, 135, 149 sugerindo a presença de álcool primário e o fragmento  $m/z$  281 formado com perda de um hidrogênio radicalar do íon molecular  $m/z$  282. O espectro de massas da banda t.r. 19.39 min revelou os íons  $m/z$  265, 236, 141, 124, 109, 96, 83, 74, 69 e 55 que se referem ao alceno de série homóloga dos ácidos carboxílicos. O espectro de massa desta banda investigada mostra similaridade com 85% com o ácido undecenóico de acordo com a biblioteca NIST 05. As observações nós levar a sugerir que o composto que gera o sinal cromatográfico t.r. 19.39 min, com o íon molecular  $m/z$  296 [C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>], é o ácido undecenóico.

Através dos espectros de massas do extrato hexânico do precipitado celular da *X. fastidiosa* identificou-se a presença de compostos caracterizados por fragmentos  $m/z$  74 e 87, característicos da ocorrência de ésteres metílicos. O íon  $m/z$  87 surge através da migração do hidrogênio da posição  $\delta$  para o oxigênio da carbonila, via um mecanismo concertado que leva a clivagem da ligação C $\beta$ -C $\gamma$  (FIGURA 4.16, p. 55). O fragmento  $m/z$  74, o qual é o íon característico para a detecção seletiva da maioria dos derivados de ácidos graxos, é produzido pelo rearranjo McLafferty em que o H $\gamma$  migra para o grupo carbonila por meio de um estado de transição de seis membros e clivagem da ligação C $\alpha$ -C $\beta$  (FIGURA 4.16, p. 55). Considerando os íons  $m/z$  74 e 87 e aqueles que caracterizam os

ácidos graxos correspondentes, o extrato hexânico do precipitado celular da bactéria foi re-analisado monitorando estes íons (FIGURA 4.17, p. 55).

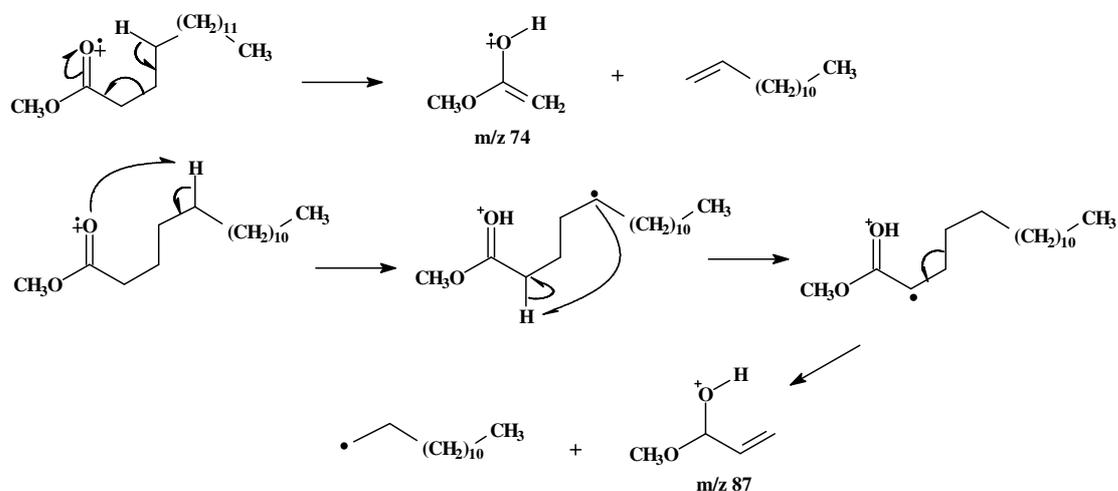


FIGURA 4.16: Esquema geral de fragmentação de ésteres. (Fonte: Simionato *et al.*2007. *J. Mass Spectrom.* **42**: 1375–1381.

O cromatograma obtido na análise por seleção de íons (FIGURA 4.17), usando íons característicos dos ácidos graxos e derivados, mostrou bandas cromatográficas que caracterizam a produção destes compostos pela bactéria *X. fastidiosa*.

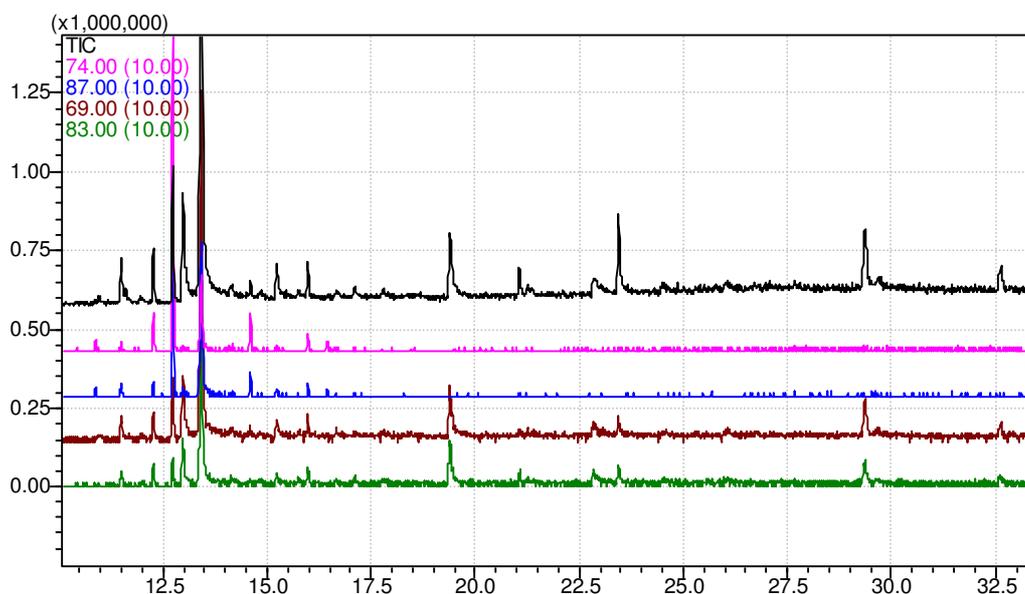


FIGURA 4.17: Cromatograma adquirido por seleção de íons  $m/z$  69, 74, 83 e 87.

Na análise por seleção de íons realizadas por CG-EM do extrato hexânico do sobrenadante da *X. fastidiosa* as acil homoserinas não foram detectadas.

Assim, na tentativa de verificar se estes compostos estavam presentes na fase do precipitado celular, o extrato hexânico desta foi re-analisado via CG-EM monitorando os íons que caracterizam as acil homoserinas ( $m/z$  143, 113, 102, 101 e 100). O cromatograma obtido nesta análise (FIGURA 4.18) mostra que nenhuns dos íons monitorados foram detectados que caracterizem a presença das acil homoserinas. Desta forma os dados mais uma vez mostram que as acil homoserinas parecem estar ausentes em *X. fastidiosa*, corroborando com dados da literatura que sugerem um mecanismo de sinalização independentes as acil homoserinas.

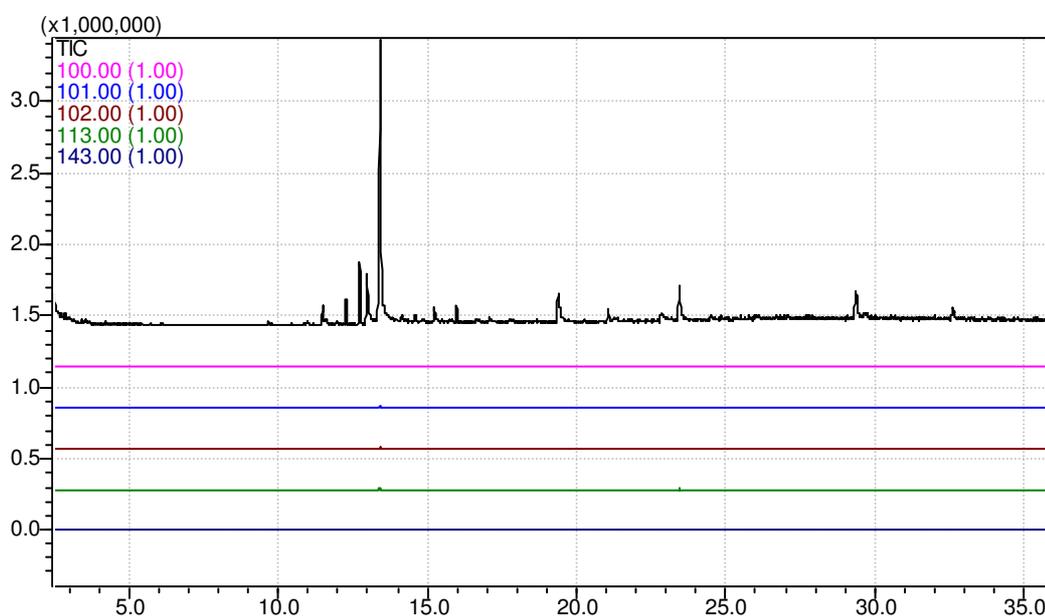


FIGURA 4.18: Cromatograma adquirido por seleção de íons  $m/z$  143 e 113, 102, 101 e 100.

A confirmação da existência de um mecanismo de sinalização independentes das AHLs e semelhantes aquelas denominadas *diffusible signal factors* (DSF), mediados por derivados de ácidos graxos, que ocorrem em *Xanthomonas campestris*, *Burkholderia cenocepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* [RYAN & MAXWELL DOW, 2011], fica evidente em *X. fastidiosa*. Além disso, estes resultados mostram que a *X. fastidiosa* possui similaridade química à *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O grupo de Carrilho (2007) também fez o estudo da *X. fastidiosa* desenvolvida em meio PW, o qual estudou apenas o sobrenadante e neste encontrou o ácido 12-metil-tetradecanóico. No presente estudo os ácidos graxos foram detectados na fase sólida (*pellet*) como foi discutido anteriormente. Contudo, estes poderiam corresponder a picos de baixa intensidade e não analisados no cromatograma do extrato hexânico do sobrenadante. Com isto, este foi re-analisado via CG-EM monitorando os íons  $m/z$  69, 83, 74 e 87, característicos de ésteres metílicos e ácidos graxos.

O cromatograma obtido (FIGURA 4.19) mostra que os íons  $m/z$  74 e 87 não foram detectados, confirmando a ausência de ésteres metílicos de ácidos graxos no sobrenadante da *X. fastidiosa* analisado no presente estudo.

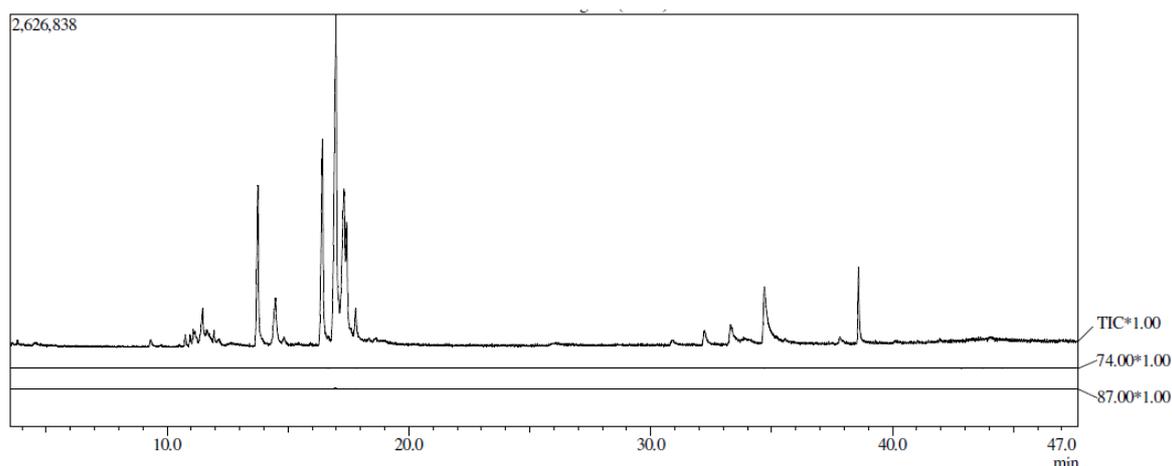


FIGURA 4.19: Cromatograma adquirido por seleção de íons de  $m/z$  74 e 87 do extrato hexânico sobrenadante.

O segundo cromatograma obtido (FIGURA 4.20) mostra que os íons  $m/z$  69 e 83 foram detectados no extrato do sobrenadante. Contudo, analisando os espectros de massas foi confirmada a presença do ácido graxo hexadecanóico (FIGURA 4.20, A, p. 58) presentes no extrato hexânico do sobrenadante da *X. fastidiosa*. Porém não foi observado o pico do íon molecular. Assim como, também se observou a presença do álcool 1-heptadecenol (FIGURA 4.20, A, p. 58), discutidos anteriormente.

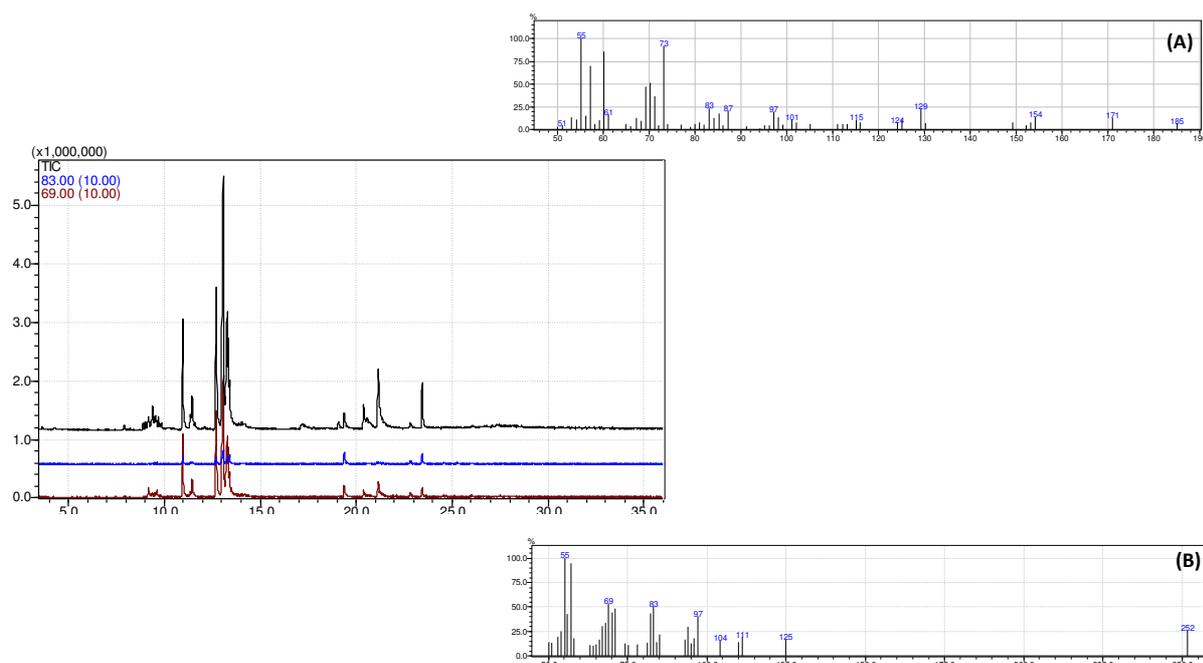


FIGURA 4.20: Cromatograma adquirido selecionando íons de  $m/z$  69 e 83 do extrato hexânico do sobrenadante e espectros de massas da banda t.r. 17.82 (A) e t.r. 32.17 min (B).

As dicetopiperazinas poderiam corresponder às bandas cromatográficas de baixa intensidade e não analisadas no extrato hexânico do precipitado celular da *X. fastidiosa*. Com isto este extrato foi re-analisado via CG-EM monitorando alguns íons característicos as dicetopiperazinas ( $m/z$  154, 128, 125, 91 e 70). Desta forma, o cromatograma (FIGURA 4.21, p. 59) obtido mostrou picos, na qual seus respectivos espectros de massas não caracterizam os alcalóides dicetopiperazinas. Desta forma, através da CG-EM estes não foram detectados, sugerindo a ausência de DKPs no extrato do precipitado celular.

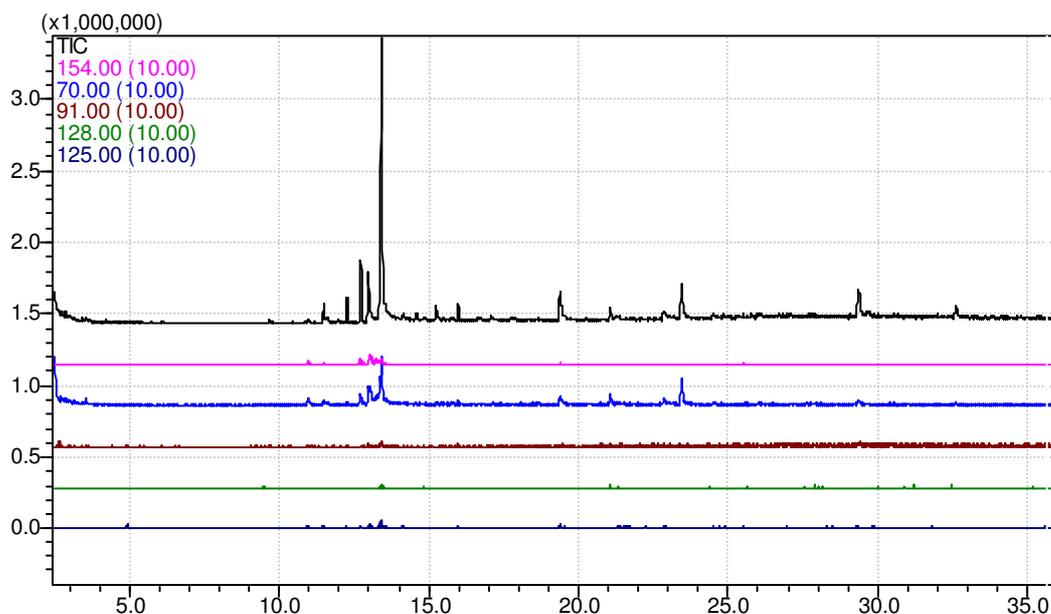


FIGURA 4.21: Cromatograma adquirido por seleção de íons  $m/z$  154, 128, 125, 91 e 70 no extrato hexânico do precipitado celular.

Finalmente os dados evidenciam que as dicetopiperazinas são encontradas no extrato do sobrenadante e os derivados de ácidos graxos no extrato do pélete. Uma hipótese sugerida é uma possível característica do meio PW (rica em aminoácidos), servindo como substrato na produção das dicetopiperazinas. Na planta, *in vivo*, possivelmente o fluido xilemático pode funcionar como substrato para produção das DKPs, contudo, ainda não se sabe o papel destes compostos em bactérias.

Andersen et al. (2007) estudaram a influência do xilema e constituintes no desenvolvimento e agregação da *X. fastidiosa*. Os autores verificaram que no aumento de aminoácidos, ácido cítrico, cálcio e magnésio resultaram em um aumento planctônico e agregação, demonstrando características dependentes à química do fluido xilemático. A dependência da agregação e formação de biofilme sobre o conteúdo de nutrientes do xilema sugere que a química deste é importante na resistência e suscetibilidade. Os resultados do presente estudo indicam que os ácidos graxos e dicetopirazinas podem estar envolvidos no crescimento planctônico, agregação e formação de biofilme da *X. fastidiosa*. Se a análise de citros com a bactéria em seu interior, indicar a presença

principalmente de dicetopiperazinas nas plantas, será um forte indicativo desta classe ser sinalizadora.

Em *Xanthomonas campestris*, exoenzimas e a produção do exopolissacarídeo são reguladas pela densidade celular e pela presença de ácidos graxos  $\alpha$ ,  $\beta$  *cis-11-metil-2-dodecenoico* e em *Ralstonia solanacearum* o ácido 3-hidroxi-palmitato de metila serve como autoindutor controlando a produção do exopolissacarídeo e de maior virulência [MASSENA, 2005].

O estudo químico da bactéria *X. fastidiosa* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas mostrou-se bastante viável e constitui uma importante técnica na busca de possíveis moléculas sinalizadoras em microrganismos. A ecologia química da *X. fastidiosa* pode constituir um grande avanço na compreensão do desenvolvimento da doença clorose variegada dos citros. Acreditando que moléculas de baixo peso molecular podem ser responsáveis pela ativação e expressão genômica, é crucialmente importante a descoberta das mesmas.

#### **4.1.3. SPME dos Voláteis produzidos pela *Xylella fastidiosa* 9a5c**

Os compostos voláteis são geralmente analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), com uma etapa prévia envolvendo a extração e pré-concentração das frações. A técnica de microextração em fase sólida (SPME-*solid phase micro-extraction*) exige apenas uma pequena quantidade de amostra e permite o isolamento dos voláteis em diferentes matrizes, tanto no estado sólido e líquido em um curto tempo, de uma forma simples. Por esta razão, a técnica por SPME é comumente utilizado para a extração de compostos voláteis [DELGADO *et al*, 2010].

A técnica de SPME tem sido usada na extração de componentes voláteis em culturas de bactérias, uma vez que, em um espaço relativamente curto de tempo, normalmente <30 min em um ambiente sem fluxo de oxigênio, é

suficiente para extração. Apesar dessas vantagens da SPME, os revestimentos da fibra podem limitar a sensibilidade, preferencialmente absorvendo ou excluindo analitos especiais com base na polaridade ou tamanho. Por exemplo, a fibra de PDMS (polidimetilsiloxano) adsorve preferencialmente metabólitos não-polares, enquanto CAR/DVB (Carboxeno/divinilbenzeno) favorece compostos polares de cadeia curta, assim como, a área da superfície da fibra também pode limitar a capacidade de absorção do analito [FARAG *et al.*, 2006].

Scholler *et al.* (1997) realizaram uma pesquisa de compostos orgânicos voláteis (VOCs) excretado a partir de várias bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.* e *Enterobacter spp.*) e identificou principalmente dimetil sulfeto, dimetil trissulfeto e isopreno. Anteriormente a este relato, Labows *et al.* (1980) realizaram análise dos voláteis em culturas de 11 linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* e uma linhagem das *P. cepacia*, *P. putida*, *P. putrefaciens*, *P. fluorescens* e *P. maltophilia*. As linhagens de *P. aeruginosa* produziram uma série distinta de metil cetonas, com número ímpar de carbono, particularmente 2-nonanona, 2-undecanona e 2-aminoacetofenona. Dois compostos de enxofre, dimetil dissulfeto e dimetil trissulfeto, estavam presentes em todas as cepas de *P. aeruginosa* e em quantidades variáveis nas outras espécies. Assim como, foram detectados butanol, 2-butanona, 1-undeceno e isopentanol em culturas de *P. aeruginosa*.

Alguns trabalhos utilizam a SPME em análise de compostos gerados em meios de cultura. Exemplo são as pirazinas produzidas por diversos microrganismos isoladas por *purge and trapping* e quantificadas ao nível de traços por Baudron *et al.* (1991). Vergnais *et al.* (1998), estudando os efeitos de força iônica do meio e do tipo de fibra extratora, determinaram metabólitos de *Staphylococcus carnosus* e *S. xylosus*, tanto após extração direta por SPME do meio de cultura quanto do seu *headspace*. Contudo, ainda são escassos os trabalhos com voláteis produzidos por bactérias.

Desta forma, neste trabalho, relata-se a identificação de componentes voláteis produzidos pela bactéria *Xylella fastidiosa* utilizando microextração em fase sólida (SPME), conforme o **item 3.2.7**.

#### 4.1.3.1. Identificação dos compostos voláteis de *X. fastidiosa*

A identificação foi baseada na comparação computadorizada dos espectros de massas do sistema CG-EM (WILEY8, NIST08 e NIST08s) e com dados da literatura [SCHOLLER *et al.*, 1997; CHRISTIE, 2011; ADAMS, 2007]. Observando-se os cromatogramas de íons totais (FIGURA 4.22), verifica-se que a fibra CAR/PDMS foi a que apresentou uma pior adsorção dos compostos, enquanto que as fibras PDMS/DVB e PA apresentaram resultados similares. No entanto, a absorção e melhores resultados foram com a fibra PDMS/DVB. A extração em “SPME” e posterior análise por CG-EM foi feita com a bactéria em meio de cultura (*Xylella* + PW) e somente meio de cultura (PW). Desta forma, foram filtrados os picos referentes aos voláteis produzidos pela *X. fastidiosa*, no qual serão discutidas neste trabalho.

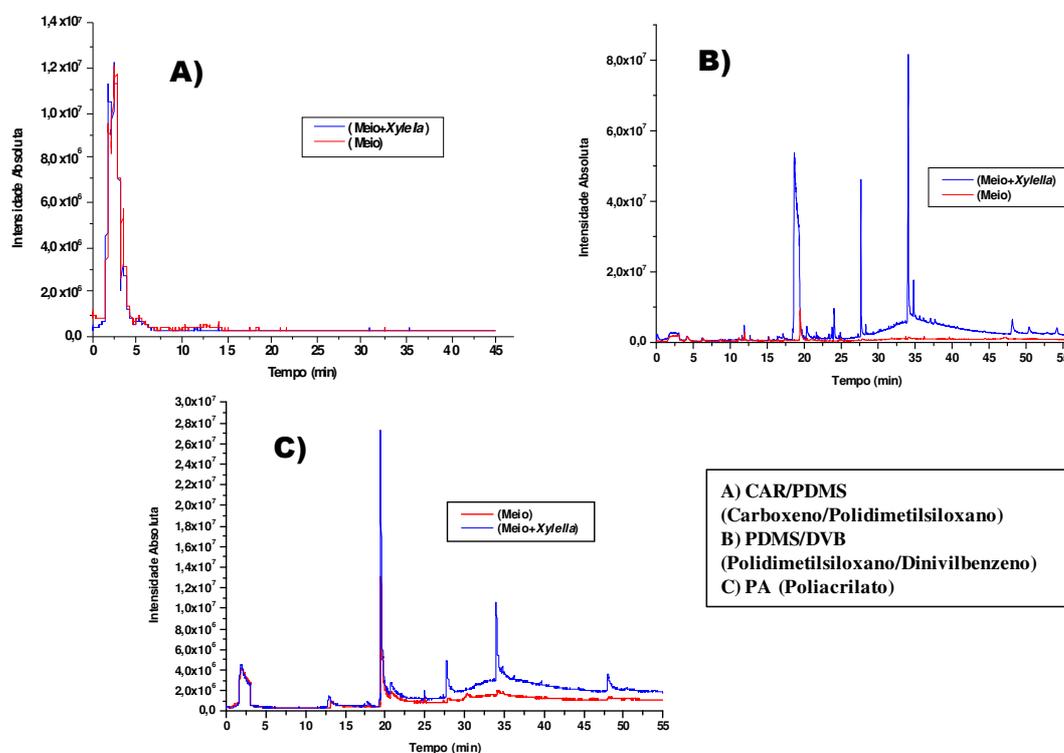


FIGURA 4.22: Cromatogramas de íons totais das frações voláteis de *X. fastidiosa* avaliadas por SPME: (A) CAR/PDMS, (B) PDMS/DVB e (C) PA

A análise foi feita em triplicata e não foram observadas mudanças significativas nos cromatogramas, apenas uma pequena variação na abundância relativa. Desta forma, primeiramente foram avaliadas as bandas cromatográficas mais intensas nas análises com a fibra PDMS/DVB e PA. A banda com t.r. 18,70 obtida em ambas às análises apresentou o mesmo espectro de massas (FIGURA 4.23). O espectro de massas indicou uma boa correlação com os espectros de massas para o 2,4-diisocianato tolueno da biblioteca do sistema CG-EM. Infelizmente não se conseguiu amostra padrão de 2,4-diisocianato-tolueno para análise de co-injeção, e assim, confirmar a presença deste composto. A literatura relata a presença de 2,4-diisocianato-tolueno em voláteis produzidos na deterioração de verduras embaladas, como alface e repolho [LONCHAMP, 2004]. Também foi identificada em voláteis de sucos de abacaxi industrializado.

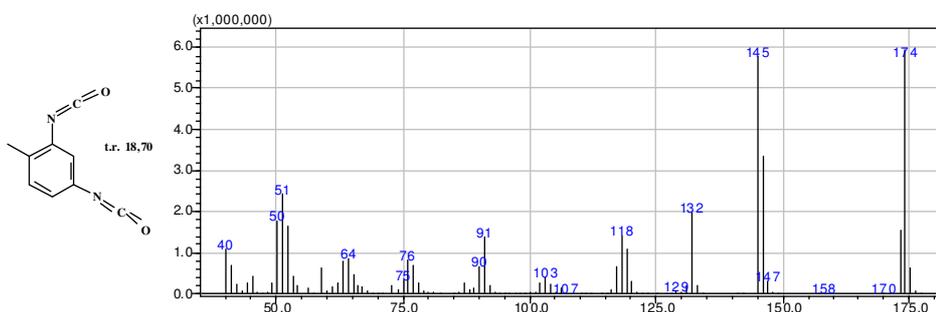


FIGURA 4.23: Substância 2,4-diisocianato de tolueno e seu respectivo espectro de massas.

O 2,4-diisocianato-tolueno é uma substância altamente tóxica utilizada na fabricação de poliuretano, adesivos e outros elastômeros. O poliuretano é muito utilizado em selantes, fibras, vedações, etc. Portanto, é mais provável que o 2,4-diisocianato-tolueno seja produto de degradação de materiais utilizados nas análises, como as próprias fibras.

As bandas cromatográficas com t.r. 27,66 e 34,79, presentes nos cromatogramas B e C da figura 4.22 (p. 62), forneceram espectros de massas similares. A presença do íon  $m/z$  43 sugere a presença de uma metil cetona

( $\text{CH}_3\text{CO}^+$   $m/z$  43). Contudo, considerando uma metil cetona de cadeia longa a massa molecular seria 268, e a perda de um hidrogênio radicalar levaria ao íon  $m/z$  267. Entretanto, ao considerar um álcool e uma insaturação na cadeia explicar melhor a formação dos íons formados em maiores intensidades, como mostrado na figura 4.24 (A). Desta forma, a proposta de fragmentação pode ser vista na figura 4.25, p. 65, no qual baseado neste, pode-se propor para esta banda cromatográfica com t.r. 27,66 o álcool 2-hidroxi-octadeceno (octadecen-2-ol). Contudo, somente com estes dados não foi possível atribuir à posição da ligação dupla na cadeia.

A banda cromatográfica com t.r. 34,79 levou ao espectro de massas com os mesmos fragmentos, contudo, foi observada uma unidade de  $\text{CH}_2$  a mais levando ao íon  $m/z$  281 (FIGURA 4.24, B). Portanto, pode-se propor para esta banda um álcool homólogo 2-hidroxi-nonadeceno (nonadecen-2-ol).

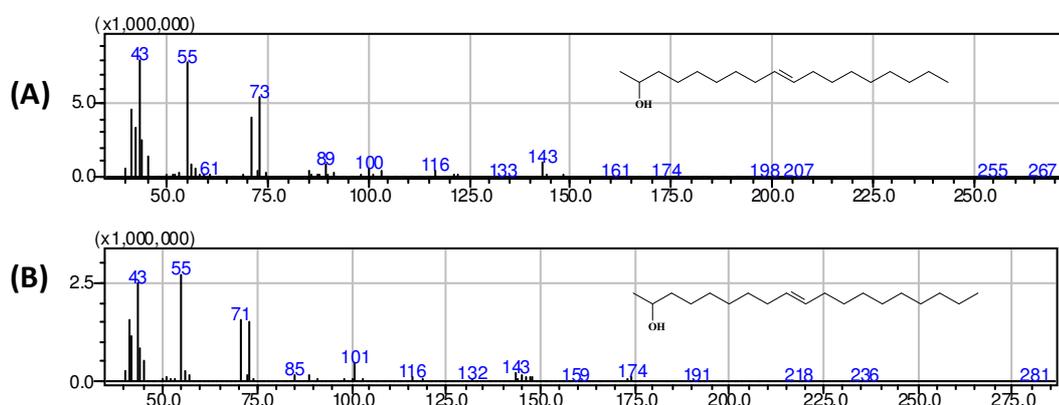


FIGURA 4.24: Espectros de massas dos compostos com tempo de retenção em 27,66 (A) e 34,79 (B) (Ver Figura 30).

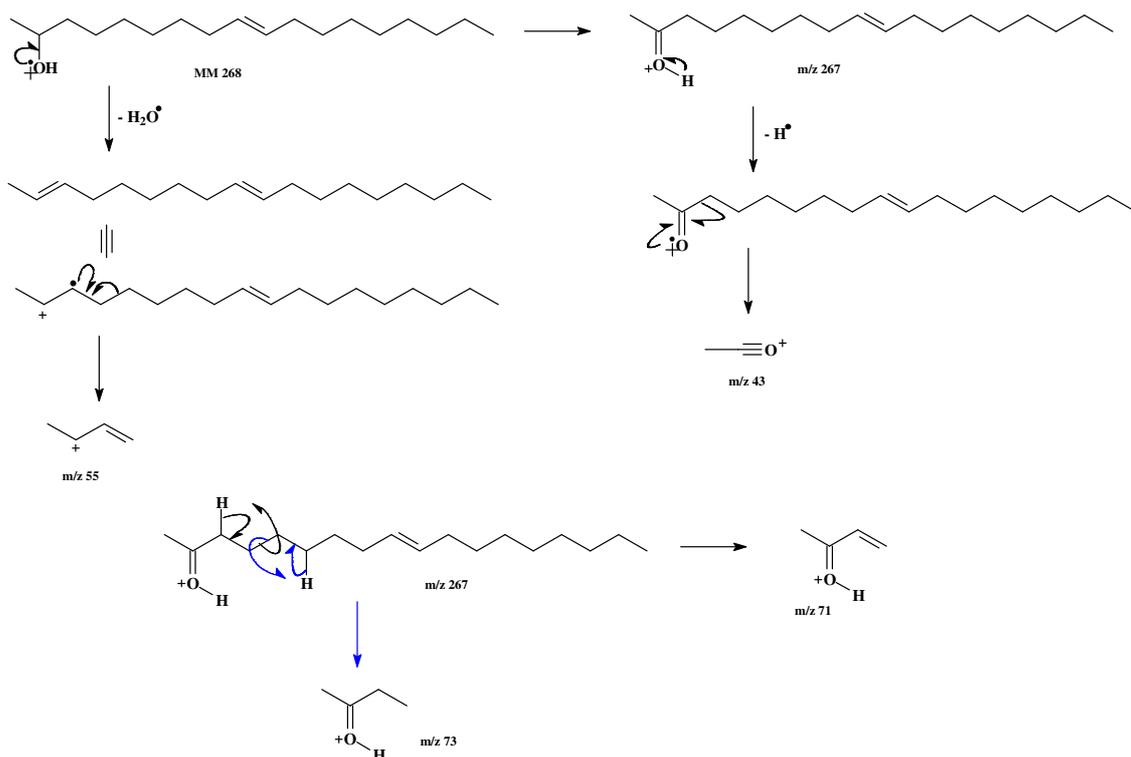


FIGURA 4.25: Proposta de fragmentação para o octadecen-2-ol.

Como mencionado anteriormente, a absorção dos componentes voláteis foi melhor com a fibra PDMS/DVB. Desta forma, ao analisar os componentes voláteis adsorvidos nesta fibra permitiu a obtenção de mais 11 espectros de massas. A banda cromatográfica t.r. 16,37 correspondeu a um espectro de massas (FIGURA 4.26) cuja comparação computadorizada dos espectros de massas do sistema CG-EM indicou em percentual elevado ser a undecan-2-ona. A proposta de fragmentação pode ser observada na figura 4.27, p. 66.

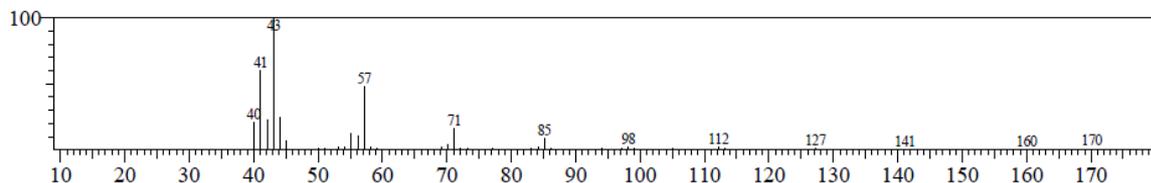


FIGURA 4.26: Espectros de massas da banda cromatográfica t.r. 16,37 min.

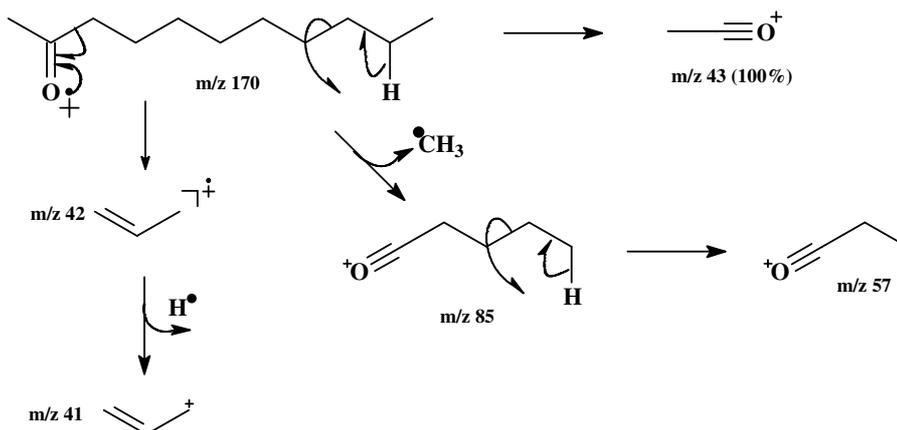


FIGURA 4.27: Proposta de fragmentação para undecan-2-ona.

O espectro de massas para a banda t.r. 12,67 (FIGURA 4.28) levou a um espectro de massas similar ao espectro de massas para a banda t.r. 16,37. O pico do íon molecular com  $m/z$  112 sugere uma cadeia mais curta e uma insaturação na molécula. Desta forma, pode-se sugerir para a esta banda a heptene-2-ona, no entanto, a presença do íon  $m/z$  41 (100%) para este composto sugeriu a ligação dupla terminal (hept-6-ene-2-ona) (FIGURA 4.29).

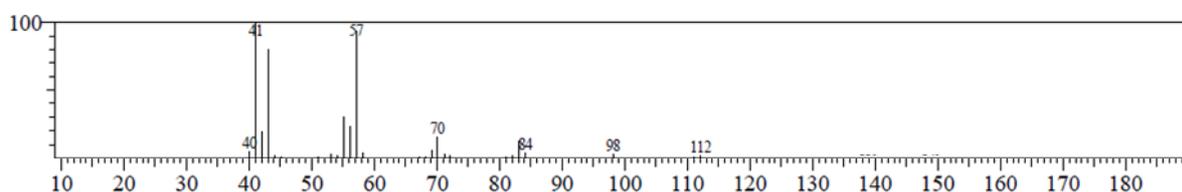


FIGURA 4.28: Espectro de massas da banda cromatográfica t.r. 12,67 min.

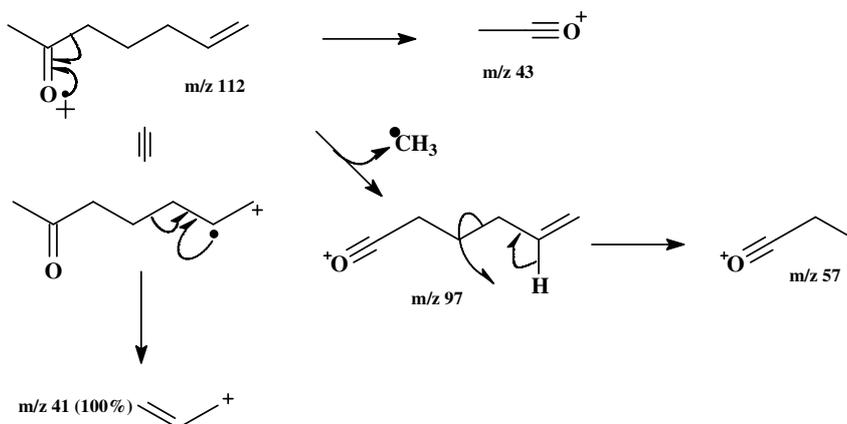


FIGURA 4.29: Proposta de fragmentação para hept-6-ene-2-ona.

O espectro de massas para a banda t.r. 16,57 (FIGURA 4.30) sugeriu a presença de um diol ( $C_8H_{18}O_2$ ) com massa molecular 146, o qual com a perda de hidrogênio radicalar forma o íon  $m/z$  145. A proposta de fragmentação para este diol, a qual explicaria vários dos íons fragmentos obtidos, sugeriu uma das hidroxilas no carbono 2 da cadeia carbônica (FIGURA 4.31). No entanto, a presença do íon  $m/z$  99 sugeriu a segunda hidroxila no último ou penúltimo carbono da cadeia, no qual indicou ser o diol 2,7-diidroxi octano ou 2,6-diidroxi octano. Finalmente, a presença do íon  $m/z$  41 sugere o 2,7-diidroxi octano, como pode ser visualizado na figura 4.31.

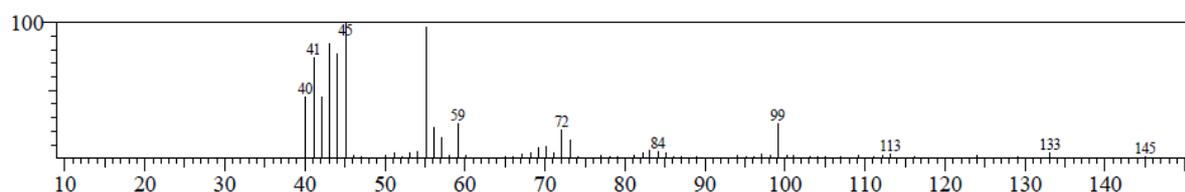


FIGURA 4.30: Espectro de massas da banda cromatográfica t.r. 16,57 min

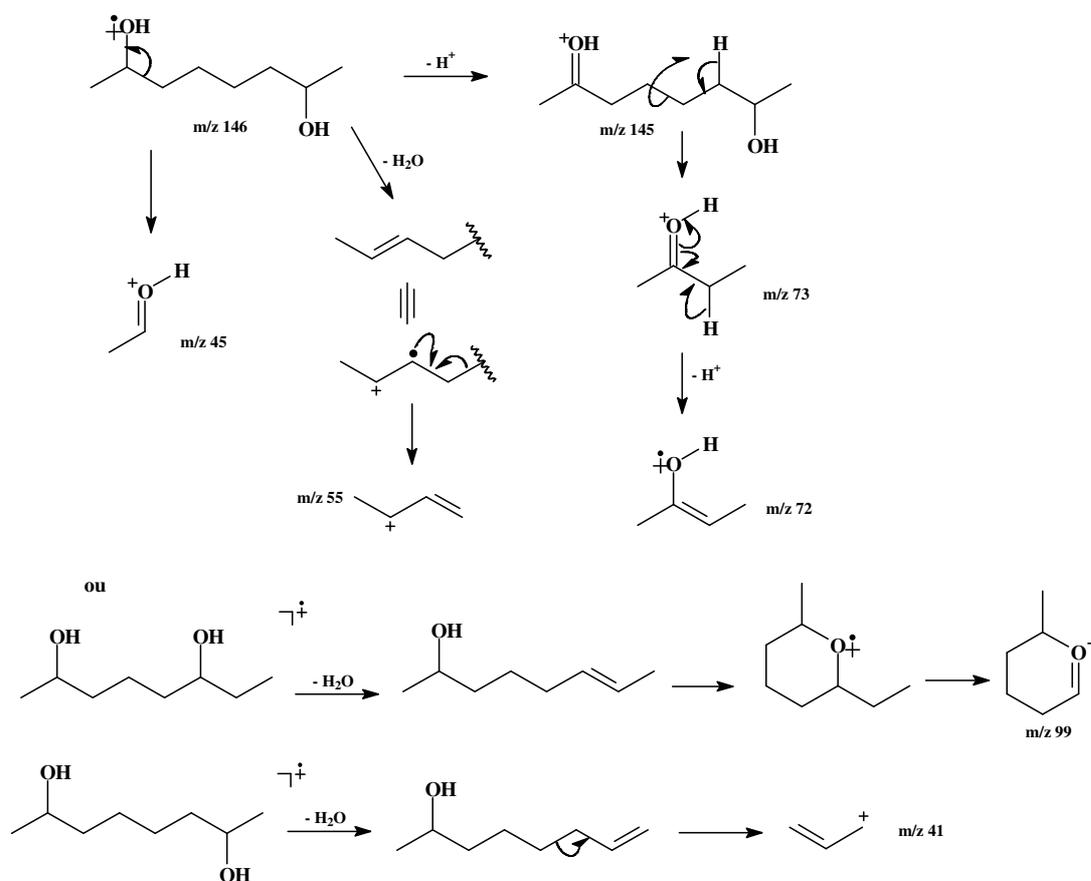


FIGURA 4.31: Proposta de fragmentação para 2,7-diidroxi octano.

As bandas cromatográficas t.r. 21,63 e 23,35 forneceram espectros de massas (A) e (B) (FIGURA 4.32), respectivamente. Os quais a biblioteca do sistema CG-EM sugeriu com elevado percentual de confiança serem tetradecan-2-ona ( $C_{14}H_{28}O$ ) e pentadecan-2-ona ( $C_{15}H_{30}O$ ), respectivamente.

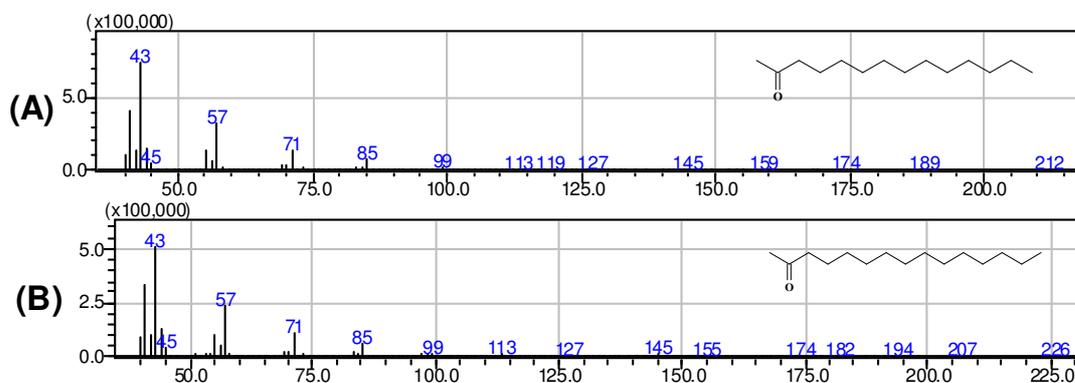


FIGURA 4.32: Espectros de massas das bandas cromatográficas t.r. 21,63 (A) e 23,35 (B) min.

A banda cromatografica t.r. 21,74 levou a um espectro de massas com íons já discutidos como  $m/z$  41, 43 e 57 (FIGURA 4.33). A presença do íon  $m/z$  91 em baixa intensidade, pode indicar a presença de um anel benzênico com uma cadeia lateral similar aos álcoois e cetonas discutidas. Assim, considerando o pico do íon molecular  $m/z$  220 para  $C_{15}H_{24}O$ , permite a presença do anel benzênico. De acordo com a proposta de fragmentação (FIGURA 4.34, p. 69), permitiu sugerir para a banda t.r. 21,74 o 9-aryl-2-hidroxinonano.

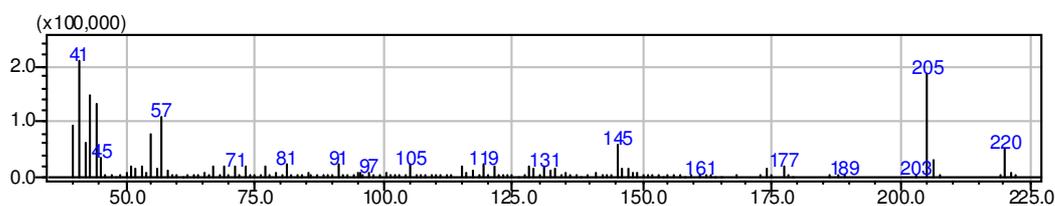


FIGURA 4.33: Espectro de massas da banda cromatográfica t.r. 21,74 min.



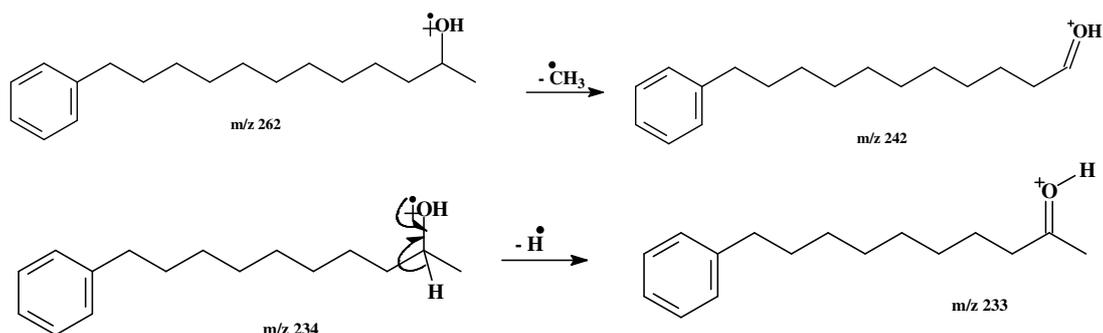


FIGURA 4.36: Proposta estrutural para 12-aryl-2-hidroxinonano e 12-aryl-3-hidroxinonano.

A banda cromatográfica t.r. 24,07 deve ser um isômero da estrutura proposta para a banda t.r. 21,74. Neste isômero a hidroxila deve estar na posição C-3, o que permite formar o íon  $m/z$  105 (FIGURA 4.37).

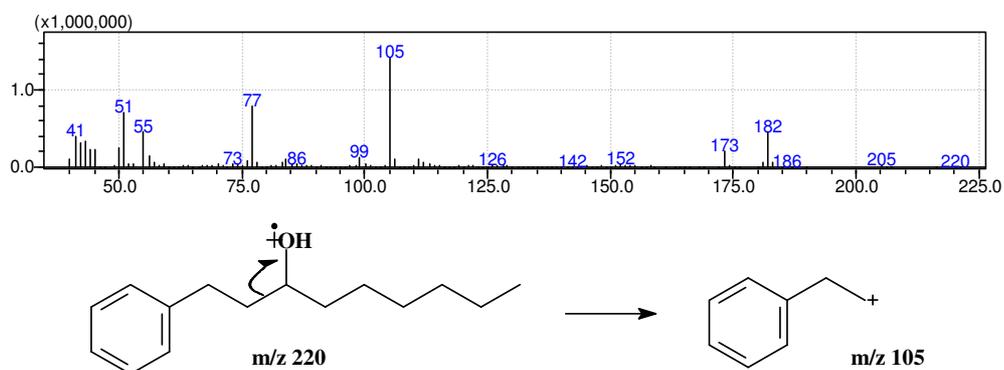


FIGURA 4.37: Espectro de massas da banda cromatográfica t.r. 24,07 e formação do íon  $m/z$  105.

As demais bandas cromatográficas t.r. 48,15 (FIGURA 4.38, A, p. 71), 50,45 (FIGURA 4.38, B, p. 71) e 54,19 (FIGURA 4.38, C, p. 71) mostram ions fragmentos similares aos discutidos anteriormente, sugerindo novamente uma série homóloga. Os quais correspondem a, 2-uneicosanol (t.r. 48,15), 2-doeicosanol (t.r. 50,45) e trieicosan-2-ona (t.r. 54,19), respectivamente.

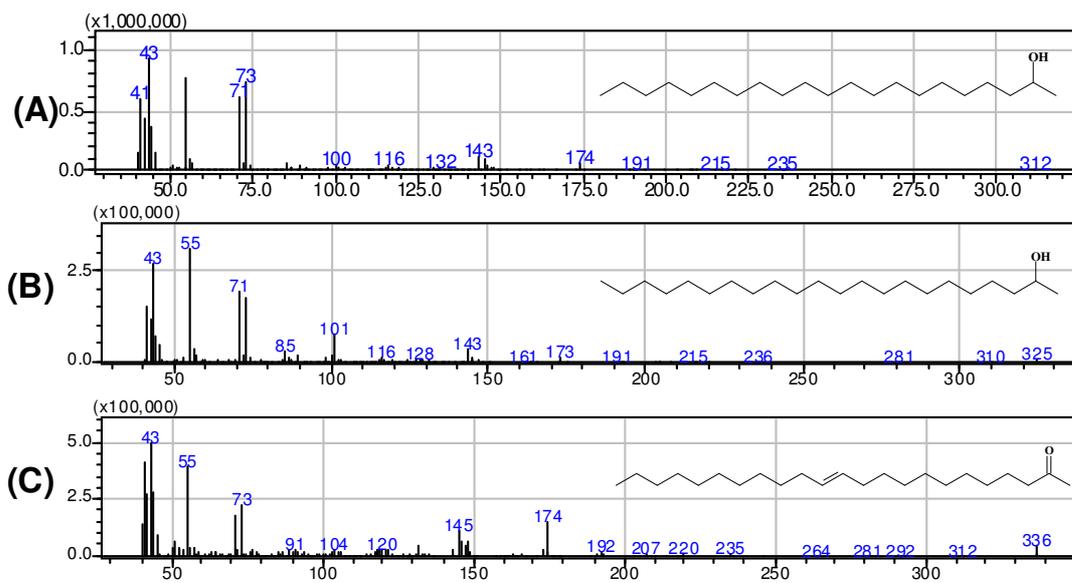


FIGURA 4.38: Espectros de massas das bandas cromatográficas t.r. 48,15 (A), t.r. 50,45 (B) e t.r. 54,19 (C).

## **4.2. Estudo do extrato acetato de etila do sobrenadante da *Xylella fastidiosa* 9a5c**

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS-*Liquid chromatography–mass spectrometry*) é uma técnica que tem se destacado bastante na identificação *on-line* de substâncias presentes em misturas complexas. Desta forma, esta técnica foi utilizada para análise do extrato acetato de etila do sobrenadante da *X. fastidiosa*. Inicialmente foi desenvolvido o protocolo de partição da fase líquida com acetato de etila do desenvolvimento da bactéria (sobrenadante) (ESQUEMA 3.1, p. 32) e este foi submetido à análise via LC-MS. Contudo, anteriormente foi desenvolvido um método por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Item 3.2.4., p. 34). Assim, com as condições cromatográficas idéias, em seguida iniciou-se as análises por LC-MS.

### **4.2.1. Estudo do extrato acetato de etila do sobrenadante da *Xylella fastidiosa* por LC-MS**

Uma análise rápida por LC-MS deste extrato mostrou ser ele constituído principalmente por dicetopiperazinas (DKPs). Assim como, os resultados obtidos por CG-EM mostrados anteriormente orientou na busca das DKPs no extrato acetato de etila do sobrenadante da bactéria. Com isto decidiu-se por utilizar a técnica de monitoramento de íons selecionados (SIM), ou *Selected Ion Recording* (SIR). A dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu) foi utilizada como padrão para se obter as melhores condições do aparelho na técnica SIM para análise desta classe de compostos.

A literatura mostra que as dicetopiperazinas fornecem melhores resultados em análises por ESI (*electrospray ionization*) no modo positivo de ionização, com isto esta foi a técnica utilizada no presente trabalho. O cromatograma DAD-HPLC do extrato acetato de etila do sobrenadante pode ser visto na figura 4.39.

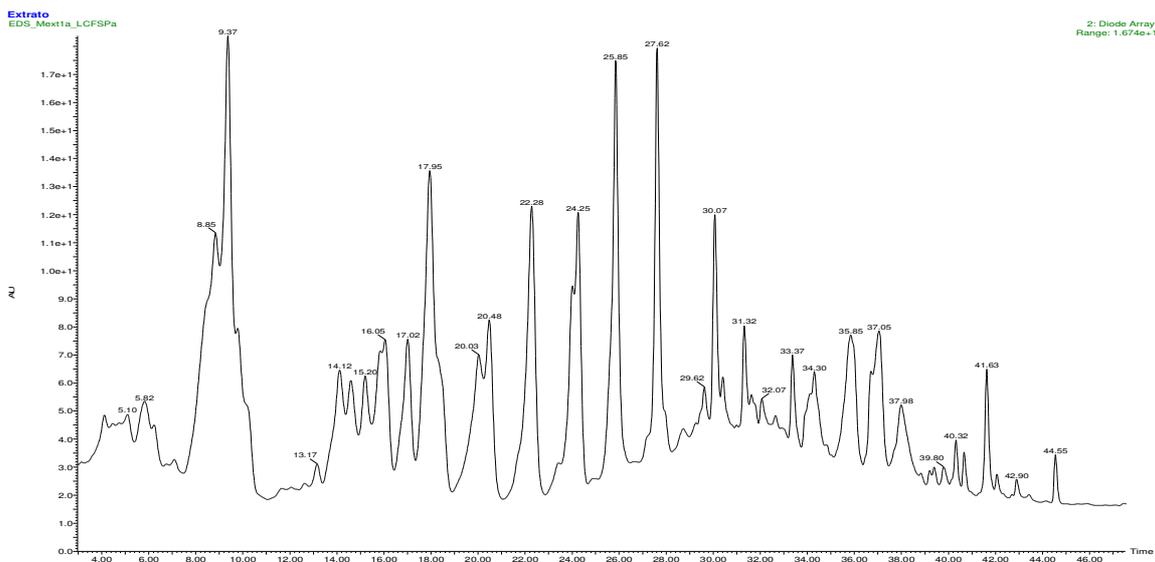


FIGURA 4.39: Cromatograma DAD-HPLC do extrato acetato de etila do sobrenadante da *Xylella fastidiosa*. Condições cromatográficas: 10% de (ACN:MeOH-1:1), 10-30% em 20 min (ACN:MeOH-1:2), 30-60% em 10 min (ACN:MeOH-1:2), 100% de MeOH em 10 min, isocrático por 5 min, vazão 0,8 mL/min.  $\lambda = 210-500$  nm,  $V_{inj} = 20\mu\text{L}$ ,  $[ ] = 1$  mg/mL.

A dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu) foi isolada pelo grupo de PN da UFSCAR em quantidade suficiente para ser caracterizado por RMN e EM de baixa e alta resolução. Portanto, esta é um representante da classe com as condições ideais para ser utilizada como padrão. O cromatograma do padrão nas mesmas condições encontra-se na figura 4.40 (A), p. 74. O monitoramento do íon  $m/z$  211  $[M+H]^+$  correspondente a *ciclo* (Pro-Leu), na amostra padrão e no extrato acetato de etila do sobrenadante levou aos cromatogramas da figura 4.40 e 4.41, p. 74.

O monitoramento do íon  $m/z$  211  $[M+H]^+$  correspondente a *ciclo* (Pro-Leu) e/ou *ciclo* (Pro-Ile) levou a detecção de três bandas com Rt. 16.15 min, 17.23 min e 18.19 min (FIGURA 4.40 (C), p. 74). Os espectros de massas observados para estas bandas são similares, diferenciando somente com a presença abundante do íon  $m/z$  86 e o desaparecimento do íon  $m/z$  72 no espectro de massas obtido para banda Rt. 18.19 min. Os respectivos espectros de massas para estas bandas (B, C e D) obtidas por ESI no modo positivo de ionização foram comparados com o espectro de massas da amostra padrão (A)

(FIGURA 4.43, p. 76). Os espectros de massas B, C e D em comparação com aquele do padrão (A) indicam fortemente a presença do *ciclo* (Pro-Leu) no extrato em estudo.

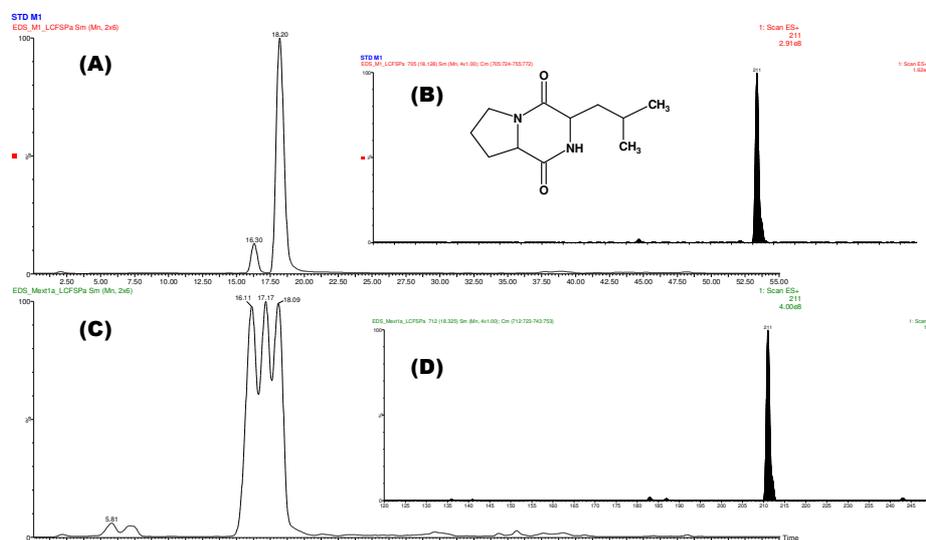


FIGURA 4.40: (A) Cromatograma no modo *full scan* da amostra padrão com  $m/z$  211. (C) Espectro no modo *full scan* do íon selecionado  $m/z$  211 do extrato acetato de etila do sobrenadante.

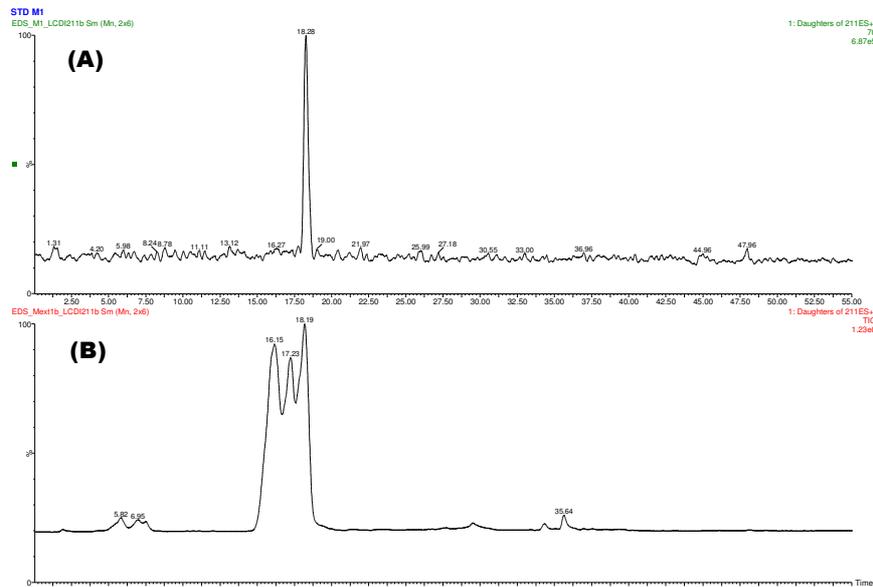


FIGURA 4.41: (A) Cromatograma de íons produtos  $m/z$  211 no modo  $ESI^+$  da amostra padrão. (B) Cromatograma de íons produtos  $m/z$  211 no modo  $ESI^+$  do extrato acetato de etila do sobrenadante.

O núcleo dicetopiperazínico possui dois centros estereogênicos epimerizáveis, consequentemente podendo levar a quatro possíveis isômeros (FIGURA 4.42). Contudo, no estudo por RP-HPLC dois isômeros são possíveis ser observados, o *cis* e *trans*. Desta forma somente poderia ser detectável duas

bandas cromatográficas, uma para o *cis* e outra para o *trans ciclo* (Pro-Leu), uma vez que no presente estudo não foi utilizado cromatografia com fase quiral. Assim, dos quatro possíveis isômeros dos íons produtos  $m/z$  211 (*ciclo* (Pro-Leu)) os enantiômeros coeluem utilizando cromatografia de fase reversa e assim não se sabe necessariamente qual dos isômeros *cis* e *trans* foram detectados. Considerando o íon molecular protonado  $m/z$  211 poderia levar a detecção de quatro bandas cromatográficas, a *cis*, *trans-ciclo* (Pro-Leu) e *cis*, *trans-ciclo* (Pro-Ile).

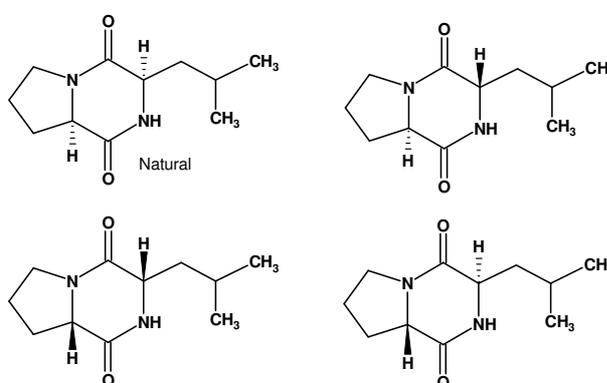


FIGURA 4.42: Possíveis isômeros da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu)

É de suma importância mencionar que estes isômeros podem ser artefatos formados no meio de isolamento, resultantes de epimerização não enzimática daquele natural *ciclo* (L-Pro-L-Leu). Os epímeros B, C e o padrão A possuem estruturas que facilitam a formação do íon  $m/z$  72, na qual, o lado do núcleo dicetopiperazínico contendo o aminoácido prolina deve ocasionar tensão estérica e facilitando a clivagem do núcleo, levando a íons mais abundantes  $m/z$  70 e 72 (FIGURA 4.43, p. 76). Analisando os quatro possíveis epímeros é difícil avaliar qual deles facilitaria a clivagem da dicetopiperazina do lado contendo o aminoácido Leucina levando ao íon  $m/z$  86 e inibindo a formação do  $m/z$  72. Na qual, dois isômeros o *syn* e *anti* foram detectados no extrato em análise e aquele correspondente a banda D (FIGURA 4.43, p. 76) deve possuir a estereoquímica destes centros a qual facilita a formação do íon  $m/z$  86. No entanto, neste estudo

não podemos afirmar para qual banda cromatográfica pertencente as DKPs *cyclo* (Pro-Leu) e/ou *cyclo* (Pro-Ile).

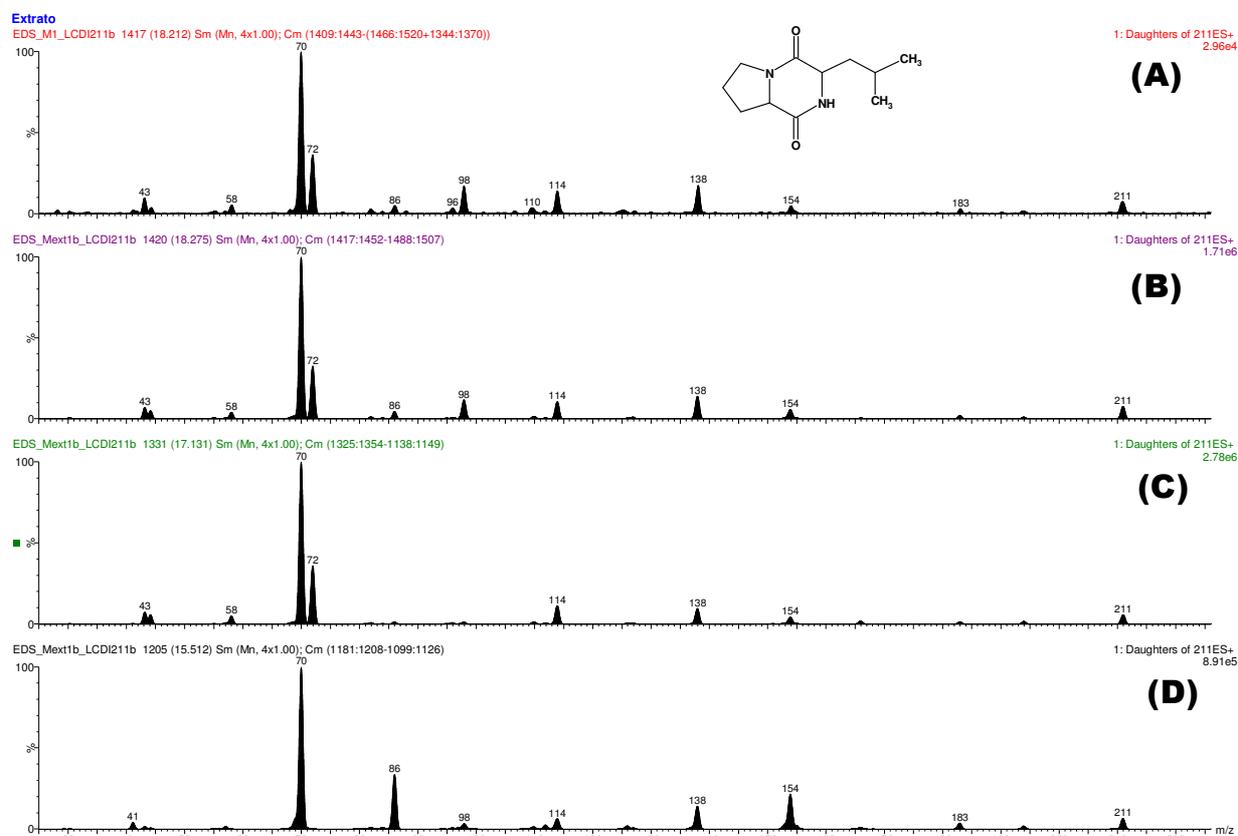


FIGURA 4.43: Espectros de massas para os íons produtos  $m/z$  211. Amostra padrão (A) e no extrato (B, C, D).

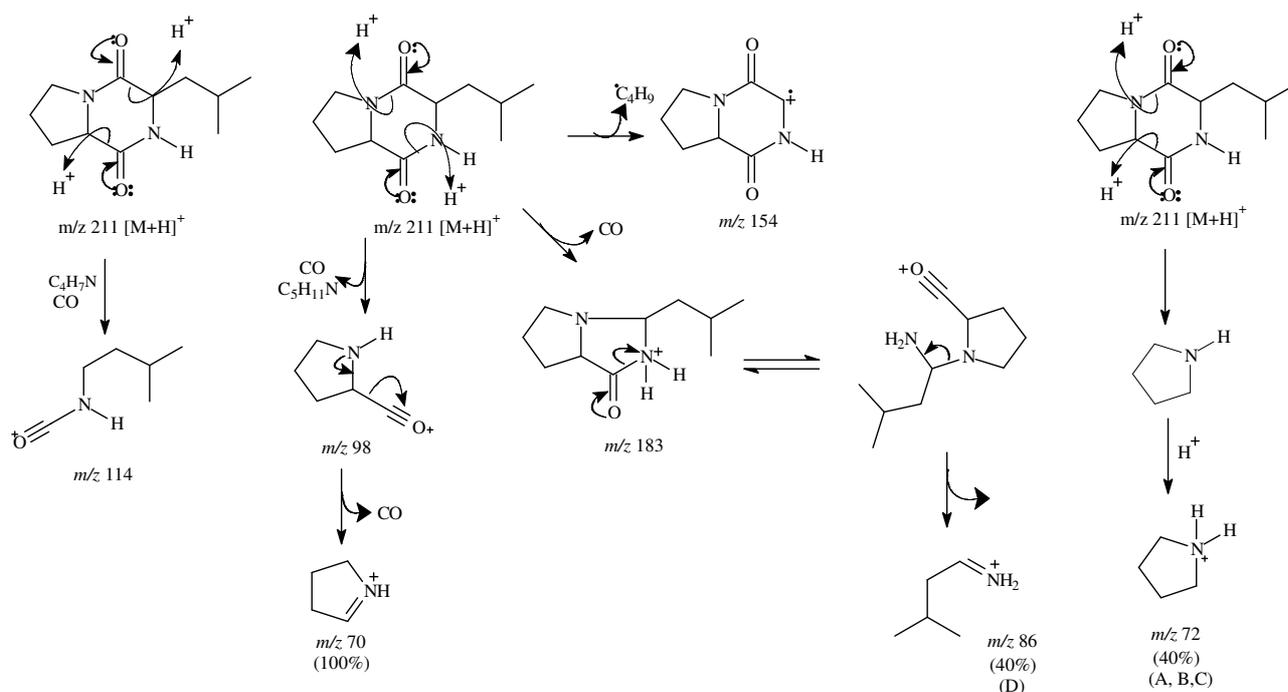


FIGURA 4.44: Proposta de fragmentação para *cyclo* (Pro-Leu).

Contudo, os dados sugerem a presença da dicetopiperazina natural *ciclo* (L-Pro-L-Leu) em uma das bandas cromatográficas. Outros estudos realizados em microrganismos produtores de dicetopiperazinas também indicaram a presença de epímeros [CHEN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2004].

Em todos os organismos conhecidos, os aminoácidos são essencialmente sintetizadas e utilizadas como L-isômeros. No entanto, Lam *et al.*, (2009) descobriram que algumas bactérias produzem diversos D-aminoácidos, que se acumulam nas concentrações milimolar em sobrenadantes de culturas na fase estacionária. Eles apresentaram evidências que diversas linhagens de bactérias fazem uso de D-aminoácidos para controlar a produção de suas respectivas peptidogliconas. Observaram que a linhagem *Vibrio cholerae mrcA* muda de forma entre a fase de crescimento e a fase estacionária. O fracionamento biomonitorado do meio de cultura levou ao isolamento de D-metionina, D-leucina, D-valina e D-isoleucina, enquanto que, *Bacillus subtilis* produziu D-tirosina e D-fenilalanina.

Em *Escherichia coli*, os autores observaram a incorporação de D-metionina na sua respectiva peptidoglicona. Linhagens de algumas bactérias também mostraram produzir D-aminoácidos na sua fase estacionária de desenvolvimento, atuando como controle na população bacteriana [LAM *et al.*, 2009]. Assim, a síntese de D-aminoácidos pode ser uma estratégia comum para algumas bactérias se adaptem às mudanças das condições ambientais.

Com o seqüenciamento do genoma da *X. fastidiosa* estirpe 9a5c, Simpson *et al.* (2000), mostraram que ela possui vias metabólicas completas para aminoácidos, vias relacionados à síntese de muitas purinas, pirimidinas, ácido fólico, tiamina, glutamina e muitas outras. Contudo, ainda é desconhecido rotas de formação de D-aminoácidos em *X. fastidiosa*. Alguns relatos são abordados na presença de aminoácidos D-Prolina de ocorrência natural em DKPs,

entretanto, restrito a organismos conhecidos por produzirem o correspondente *D*-aminoácidos. Por exemplo, *ciclo-D-Val-L*-triptofano foi isolado do fungos *Aspergillus chevalieri*, um organismo que é conhecido por biosintetizar *D*-valina para incorporação em ciclosporinas. Da mesma forma, *ciclo-D-Ala-N-metil-L*-Leu estava presente como um metabólito final da derivação de uma cepa mutante da *Beauveria nivea* [BULL *et al.*, 1998].

Considerando a possibilidade da ocorrência de aminoácidos *D* e *L* em bactérias, e com isto a presença da *D,L*-prolina e *D,L*-Leucina, a união destes só poderiam levar a *ciclo (D-Pro-D-Leu)*, *ciclo (L-Pro-L-Leu)*, *ciclo (D-Pro-L-Leu)* e *ciclo (D-Pro-L-Leu)*. Portanto, quatro epímeros poderiam ser encontrados. Porém, o *ciclo (L-Pro-L-Leu)* e o *ciclo (D-Pro-D-Leu)* constituem um par de enantiômeros e em coluna cromatográfica não quiral coeluem juntos levando à mesma banda. Contudo, vários estudos futuros seriam necessários para confirmar se os dois epímeros detectados em *X. fastidiosa* seriam naturais.

Embora existiam 400 combinações possíveis de quaisquer dois resíduos de aminoácidos para formação das dicetopiperazinas, apenas alguns são naturais. Assim, baseando-se em trabalhos reportados sobre dicetopiperazinas em bactérias, uma tabela de valores de  $[M+H]^+$  calculados no modo positivo de ionização, foi estabelecida (TABELA 4.2) no estudo do extrato acetato de etila do sobrenadante da *X. fastidiosa*.

TABELA 4.2: Valores de massas calculados de DKPs no modo positivo de ionização.

	Gly	Ala	Ser	Pro	Val	Thr	Cys	Ile	Leu	Asn	Asp	Gln	Phe	Tyr
Gly	115	129	145	155	157	159	161	171	171	172	173	187	205	221
Ala	129	143	159	169	171	173	175	185	185	186	187	201	219	235
Ser	145	159	175	185	187	189	191	201	201	202	203	217	235	251
Pro	155	169	185	195	197	199	201	211	211	212	213	227	245	261
Val	157	171	187	197	199	201	203	213	213	214	215	229	247	263
Thr	159	173	189	199	201	203	205	215	215	216	217	231	249	265

<b>Cys</b>	161	175	191	201	203	205	207	217	217	218	219	233	251	267
<b>Ile</b>	171	185	201	211	213	215	217	227	227	228	229	243	261	277
<b>Leu</b>	171	185	201	211	213	215	217	227	227	228	229	243	261	277
<b>Asn</b>	172	186	202	212	214	216	218	228	228	229	230	244	262	278
<b>Asp</b>	173	187	203	213	215	217	219	229	229	230	231	245	263	279
<b>Gln</b>	187	201	217	227	229	231	233	243	243	244	245	259	277	293
<b>Phe</b>	205	219	235	245	247	249	251	261	261	262	263	277	295	311
<b>Tyr</b>	221	235	251	261	263	265	267	277	277	278	279	293	311	327

Baseando-se nesta tabela o extrato acetato de etila do sobrenadante da *X. fastidiosa* foi analisado monitorando alguns destes íons junto às bandas no cromatograma DAD-HPLC do extrato total (FIGURA 4.39, p. 73). Duas dicetopiperazinas foram fornecidas pelo Grupo da Profa. Dra. Angela Regina Araújo (UNESP-Araraquara), *ciclo* (Pro-Phe) e *ciclo* (Pro-Tyr), as quais foram utilizadas como padrão. Assim, iniciou-se a análise monitorando o íon  $m/z$  245 referente à *ciclo* (Pro-Phe). Os cromatogramas de íons selecionados ( $m/z$  245) ESI no modo positivo de ionização da amostra padrão e do extrato mostraram a presença do íon  $m/z$  245 em quatro bandas, t.r. 20,67; 22,50; 20,84 e 22,64; respectivamente.

O espectro de massas correspondentes à essas bandas referem-se à dois epímeros (FIGURA 4.45, p. 80) da *ciclo* (Pro-Phe). Os espectros de íons produtos destes epímeros (FIGURA 4.46, p. 80) mostraram que a principal diferença entre eles correspondem aos íons produtos  $m/z$  154 e 120, os quais aparecem com menor e maior intensidade, respectivamente, em um epímero, e o inverso no segundo.

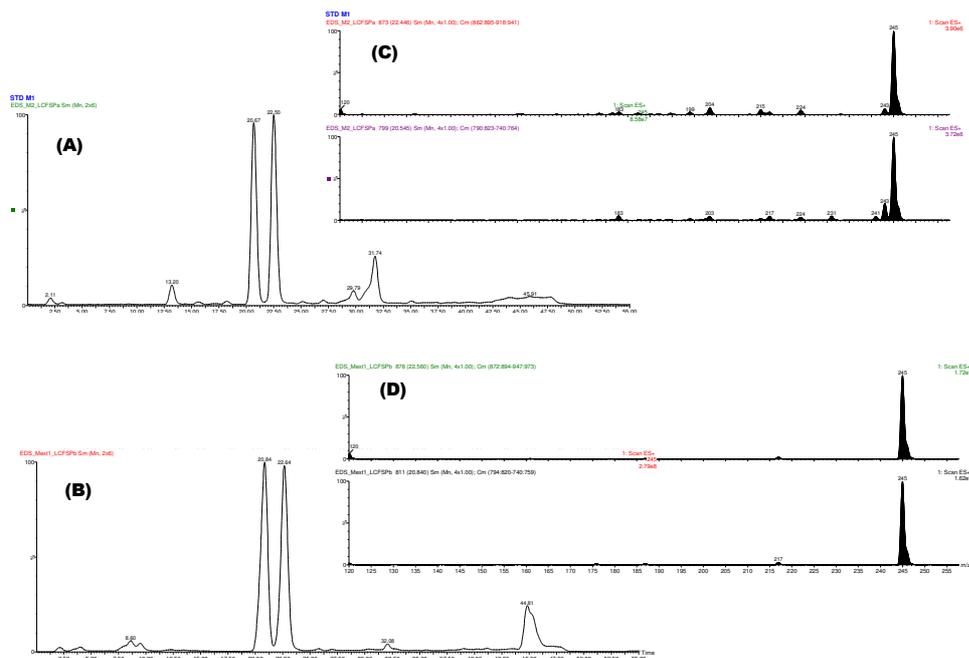


FIGURA 4.45: Cromatogramas para  $m/z$  245 na amostra padrão (A) e no extrato (B). Espectro de massa *full scan* das bandas com t.r. 20.7 e 22.5, para amostra padrão (C) e extrato (D).

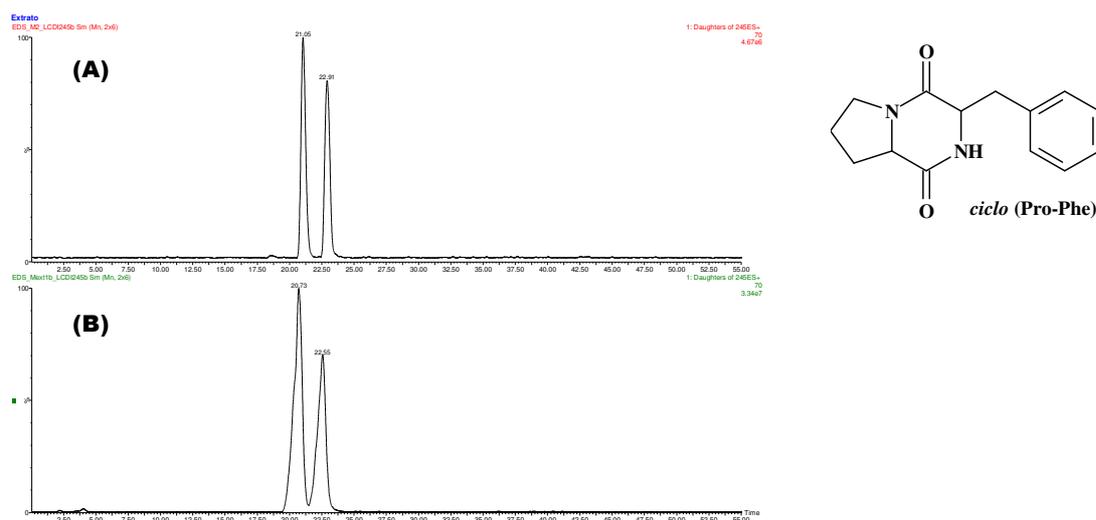


FIGURA 4.46: Cromatogramas para os íons produtos  $m/z$  245  $[M+H]^+$ . Amostra padrão (A) e o extrato (B).

O lado do núcleo dicetopiperazina contendo o aminoácido fenilalanina deve ocasionar tensão estérica, facilitando a clivagem do núcleo levando ao íon  $m/z$  120 em intensidade maior nos espectros para as bandas denominadas A e C (FIGURA 4.47, p. 81). Estes dois espectros são muito similares, sugerindo corresponderem ao mesmo epímero. Contudo, no espectro da banda A (FIGURA 4.47, p. 81) aparece o íon  $m/z$  215, o qual está presente em um percentual irrelevante na banda C (FIGURA 4.47, p. 81). A banda A refere-se à

uma amostra padrão, enquanto a C é oriunda do extrato, uma matriz mais complexa, e o efeito da matriz poderia está interferindo no experimento.

Nas bandas cromatográficas B e D (FIGURA 4.47) o íon  $m/z$  154 aparece em maior intensidade que o  $m/z$  120. Estes dois espectros são muito similares, sugerindo o mesmo epímero para o padrão (B) e aquele do extrato da *X. fastidiosa* (C). Neste epímero o centro estereogênico do aminoácido fenilalanina facilita a saída do radical benzílico levando ao íon  $m/z$  154 em uma intensidade um pouco maior em relação ao  $m/z$  120.

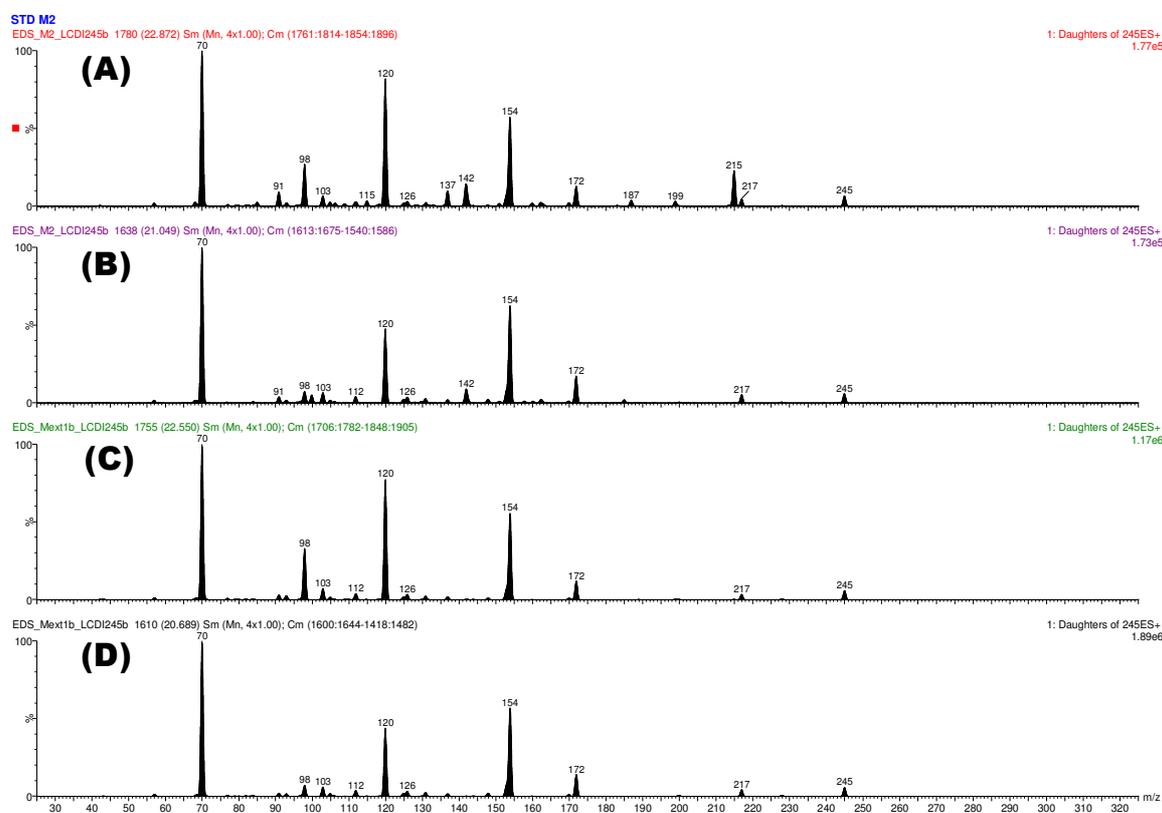


FIGURA 4.47: Espectros de massas do íon produtos  $m/z$  245. Amostra padrão (A) e (B) e o extrato (C) e (D).

A estereoquímica do aminoácido prolina deve ser diferente nos epímeros da amostra padrão, pois a diferença de intensidade do íon  $m/z$  98 oriundo da clivagem do núcleo dicetopiperazina (FIGURA 4.48, p. 82) é bem menor para a banda (B). O mesmo ocorre nas bandas (C) e (D) do extrato da bactéria (FIGURA 4.48, p. 82).

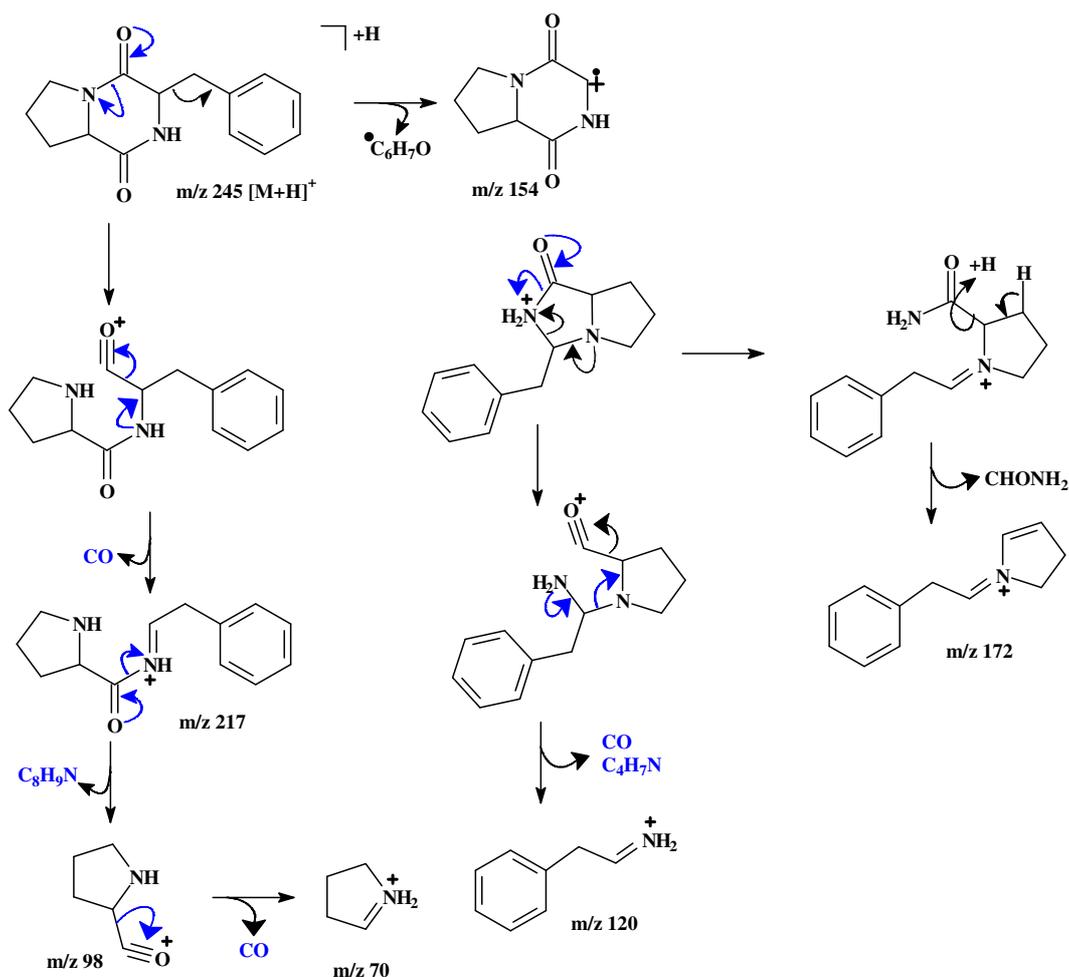


FIGURA 4.48: Proposta de fragmentação para *ciclo* (Pro-Phe). Íons  $m/z$  98 e 70 ver figura 4.44, p. 76.

Finalmente, os dados indicam a presença de dois epímeros ou um par de enantiômeros. Ou seja, considerando a ocorrência natural de D-aminoácidos, a *X. fastidiosa* parece sintetizar *ciclo* (L-Pro-D-Phe) ou *ciclo* (D-Pro-L-Phe), e mais um dos enantiômeros *ciclo* (L-Pro-L-Phe)/*ciclo* (D-Pro-D-Phe), ou a presença dos dois que geram uma mesma banda cromatográfica.

Na amostra padrão *ciclo* (Pro-Tyr) foi analisado (FIGURA 4.49, p. 83) e esta também não estava totalmente pura, mas seu espectro de massas de íons produtos  $m/z$  261 mostrou fragmentos que caracterizam a presença de Prolina e Tirosina (FIGURA 4.50 e 4.51, p. 83 e 84, respectivamente). Para o extrato da bactéria duas bandas (B e C) mostraram a presença do íon  $m/z$  261 (FIGURA 4.51, p. 84). Os espectros de massas do padrão (banda A) e aquele da banda (C) do extrato são muito similares, sugerindo o mesmo epímero para elas. A banda

(B) do extrato deve referir à um segundo epímero, pois o espectro de massas deste (FIGURA 4.51, p. 84) mostra os íons produtos  $m/z$  98 e 91 com intensidades menores quando comparados com aqueles do padrão (A) e da banda (C).

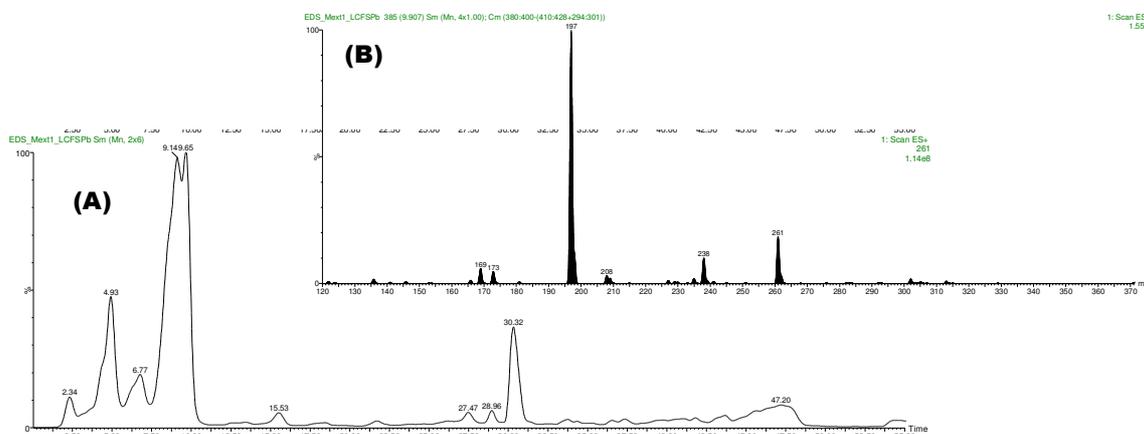


FIGURA 4.49: (A) Cromatograma para  $m/z$  261 no extrato e (B) espectro de massa *full scan* com t.r. 9,6 do extrato.

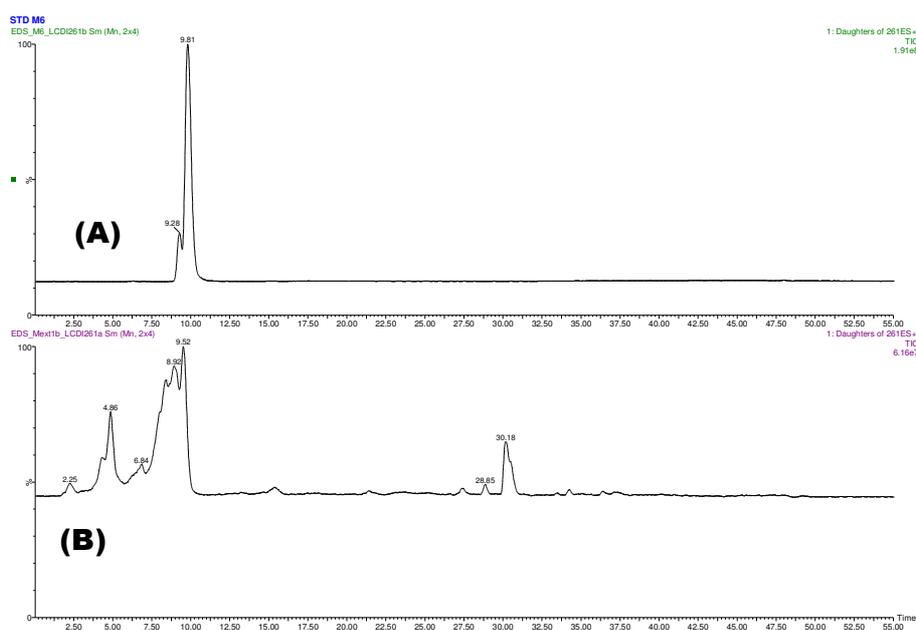


FIGURA 4.50: Cromatograma DAD-HPLC para os íons produtos  $m/z$  261. Amostra padrão *ciclo* (Pro-Tyr) (A) e no extrato (B).

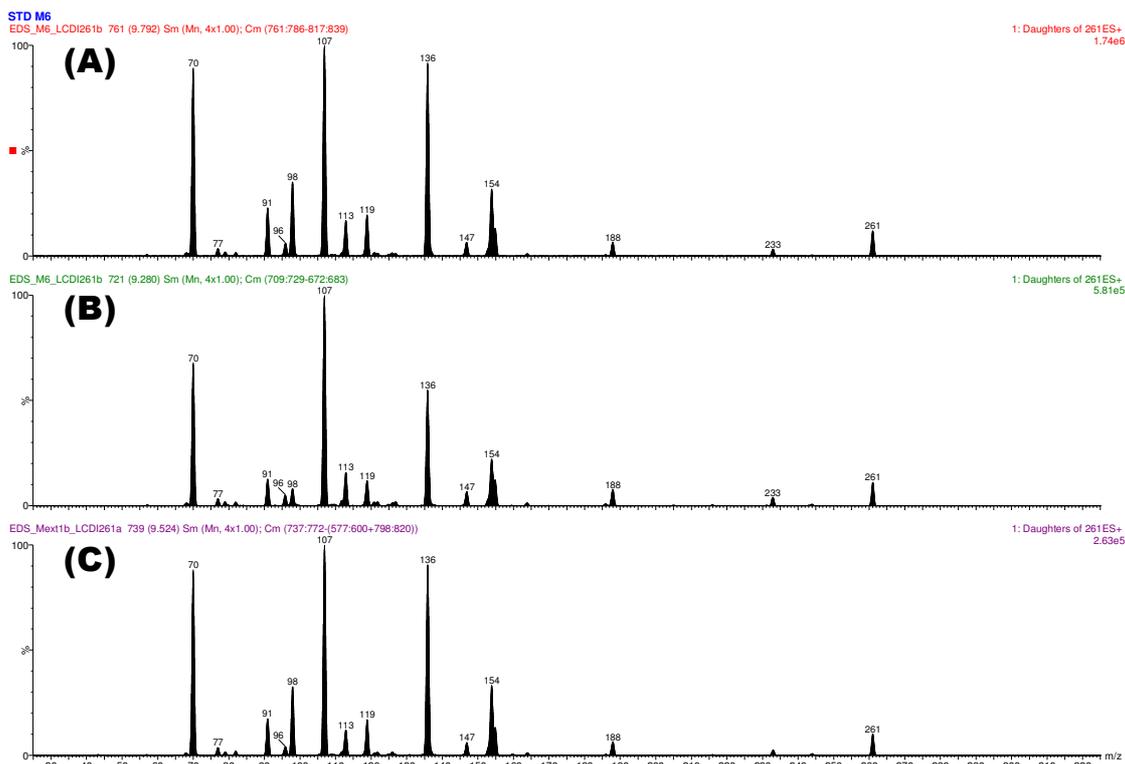


FIGURA 4.51: Espectros de massas dos íons produtos  $m/z$  261  $[M+H]^+$  das bandas com t.r. 9,28 (A) e 9,61(B) para amostra *ciclo* (Pro-Tyr) e da banda t.r. 9,52 (C) do extrato.

Finalmente, os dados sugerem a presença de *ciclo* (L-Pro-D-Tyr) ou *ciclo* (D-Pro-L-Tyr), e mais um dos enantiômeros *ciclo* (L-Pro-L-Tyr)/*ciclo* (D-Pro-D-Tyr), ou a mistura destes dois para uma mesma banda cromatográfica.

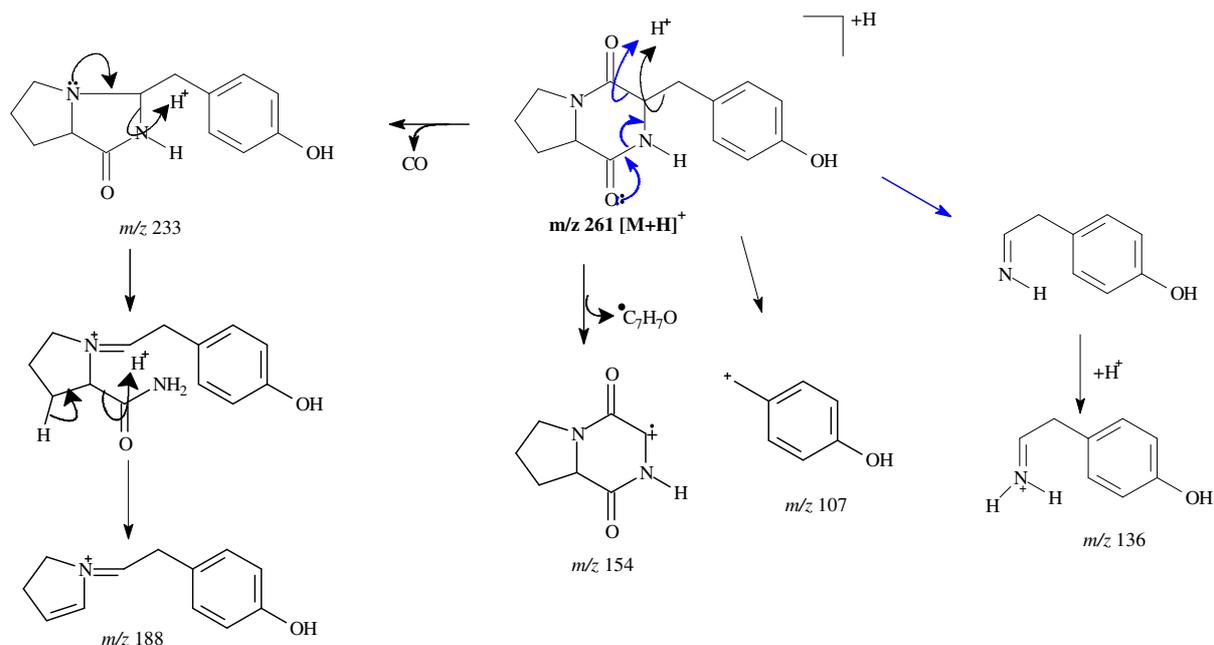


FIGURA 4.52: Proposta de fragmentação para o *ciclo* (Pro-Tyr). Íons  $m/z$  98 e 70 ver figura 4.44, p. 76.

Além dos padrões utilizados outras quatro dicetopiperazinas foram detectadas utilizando a TABELA 4.2 (p. 78) como modelo. Analisando o extrato da bactéria monitorando o íon  $m/z$  197 referente à *ciclo* (Pro-Val), este foi detectado na banda cromatográfica t.r. 9,92 (FIGURA 4.53). O espectro de massas para o íon produto  $m/z$  197 (FIGURA 4.54, p. 86) mostrou os íons  $m/z$  98 e 70 já discutidos anteriormente, os quais caracterizam a presença do aminoácido Prolina. O íon  $m/z$  72 pode se formar por uma fragmentação do núcleo dicetopiperazina levando ao tetraído pirrol, o qual é em seguida protonado (FIGURA 5.55, p. 87). Porém este íon  $m/z$  72 também pode se formar por fragmentação do núcleo dicetopiperazina, mas liberando o resíduo de aminoácido valina (FIGURA 4.55, p. 87). Contudo, a perda da unidade  $C_3H_7$  levando ao íon  $m/z$  154 confirma a presença do aminoácido valina.

Os dados sugerem a presença somente de um isômero, sendo este constituído pelos aminoácidos considerados naturais, L-prolina e L-valina. Portanto, a bactéria *X. fastidiosa* parece sintetizar a *ciclo* (L-Pro-L-Val). Contudo a presença do par de enantiômeros não pode ser descartada [*ciclo* (D-Pro-D-Val)].

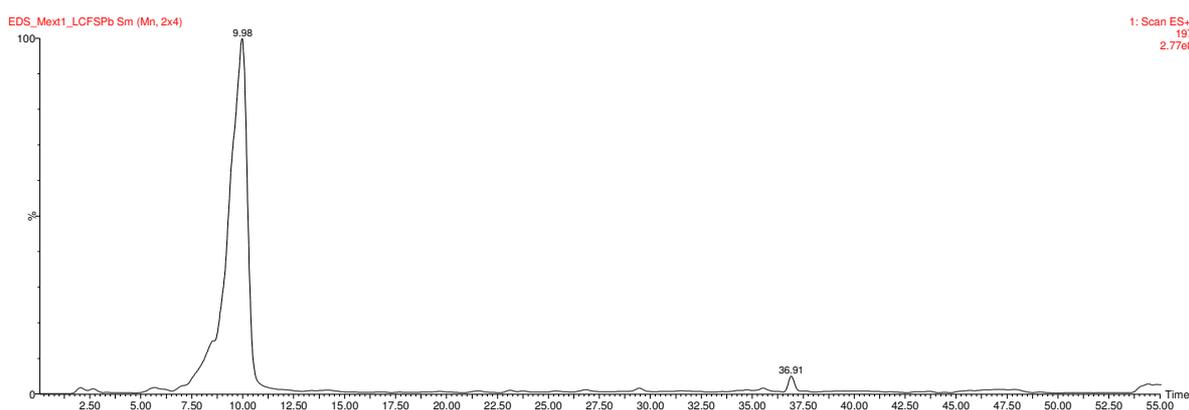


FIGURA 4.53: Cromatograma no modo *full scan* para  $m/z$  197  $[M+H]^+$  no extrato.

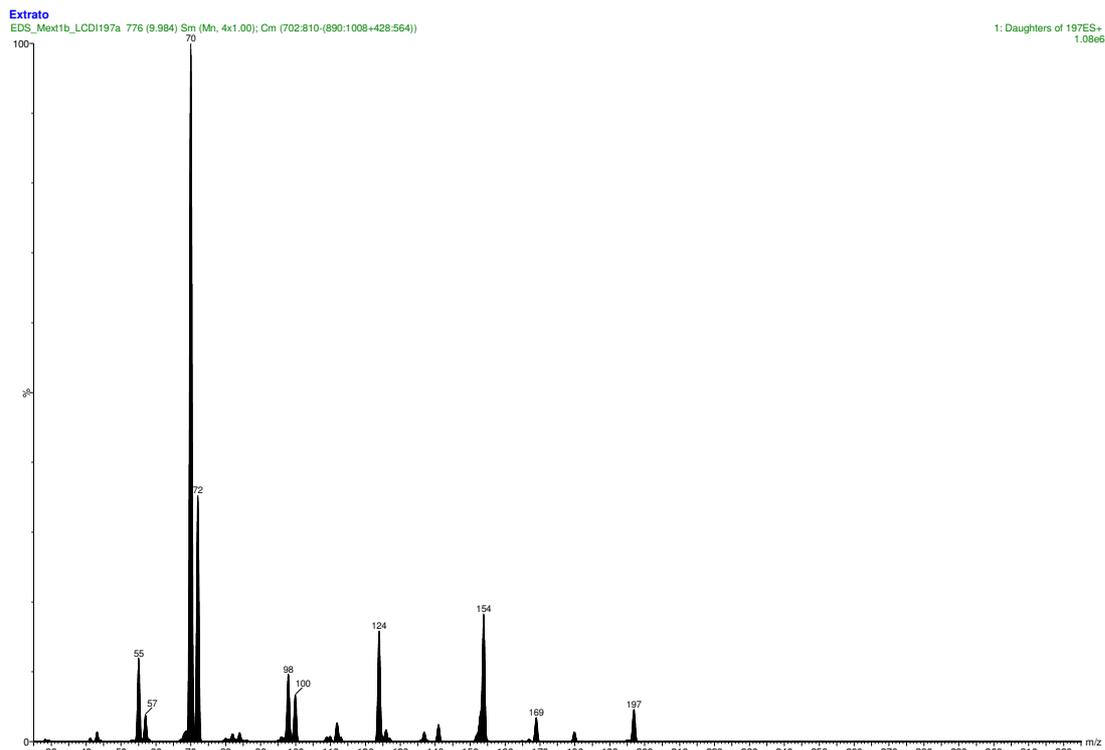


FIGURA 4.54: Espectro de massas íons produtos para  $m/z$  197  $[M+H]^+$  no extrato com t.r. 9,98.

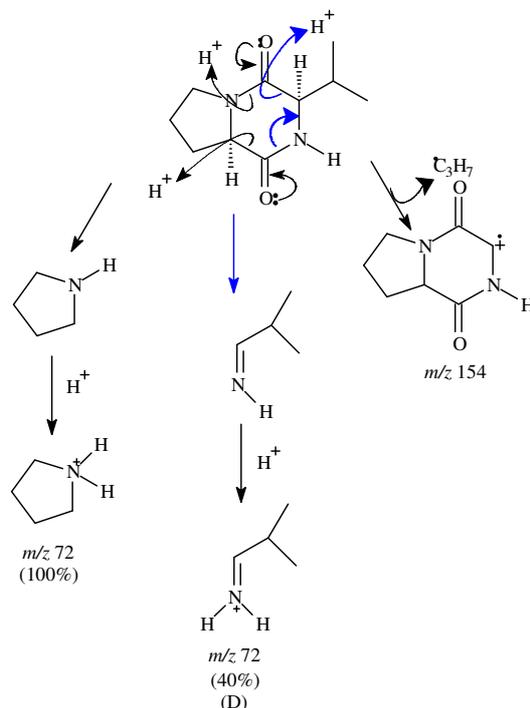


FIGURA 4.55: Proposta de fragmentação para o *ciclo* (Pro-Val).

A análise do extrato da bactéria monitorando o íon  $m/z$  185 permitiu verificar a presença deste na banda cromatográfica t.r. 13,48 (FIGURA 4.56, p. 87). A TABELA 4.2 (p. 78) mostra o íon  $m/z$  185 podendo ser a *ciclo* (Ala-Ile)

ou *ciclo* (Ala-Leu). Diferenciar a presença do aminoácido leucina e isoleucina não é trivial como mostra a literatura [STARK & HOFMANN, 2005, XING *et al.*, 2008]. Os íons  $m/z$  140 e 44 formados pela fragmentação do núcleo ciclopiperazínico (FIGURA 4.57 e 4.58) confirmam a presença de um destes isômeros. O íon  $m/z$  72 indica a presença de resíduo do aminoácido alanina, enquanto os íons  $m/z$  86 e 114 sugerem o aminoácido leucina ou isoleucina. O íon  $m/z$  43 em baixa intensidade reforçaria a ocorrência do isômero *ciclo* (Ala-Leu), o qual se formaria pela unidade isopropila final do aminoácido leucina (FIGURA 4.58, p. 88). Contudo, somente a análise do extrato por LC-RMN poderá garantir se a *X. fastidiosa* sintetiza *ciclo* (Ala-Leu) e não *ciclo* (Ala-Ile).

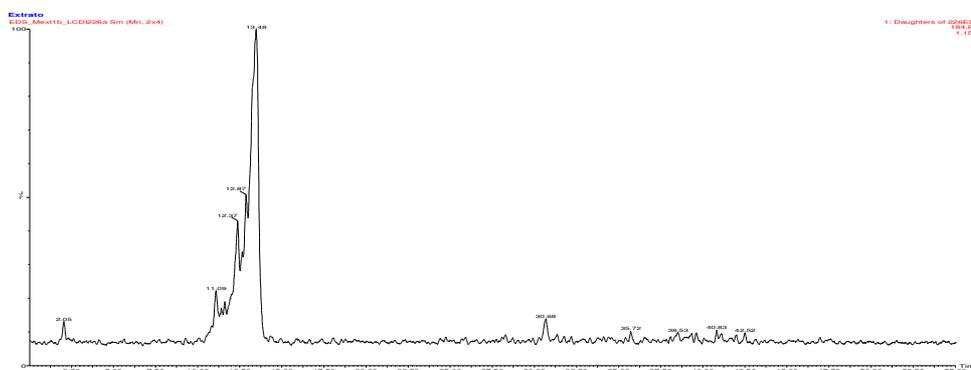


FIGURA 4.56: Cromatograma de íons produtos com  $m/z$  185 do extrato.

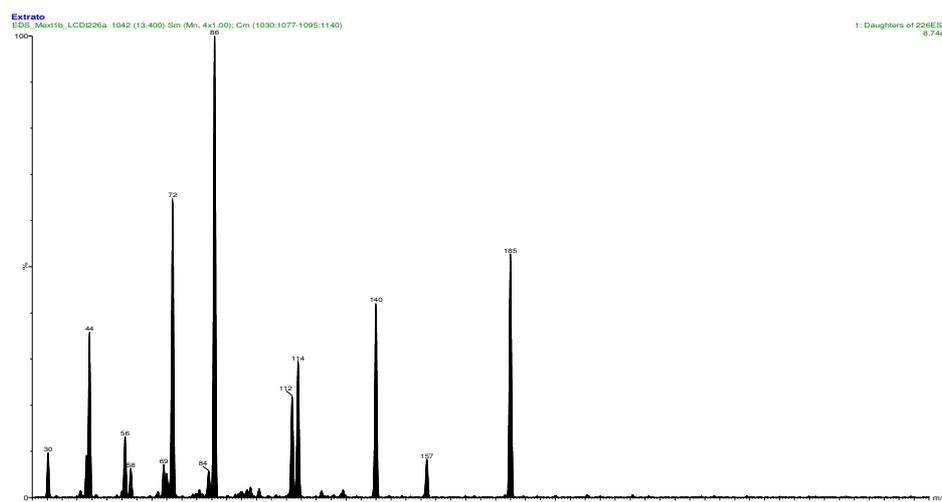


FIGURA 4.57: Espectro de massas do íon produto  $m/z$  185 com t.r. 13.48 min do extrato.

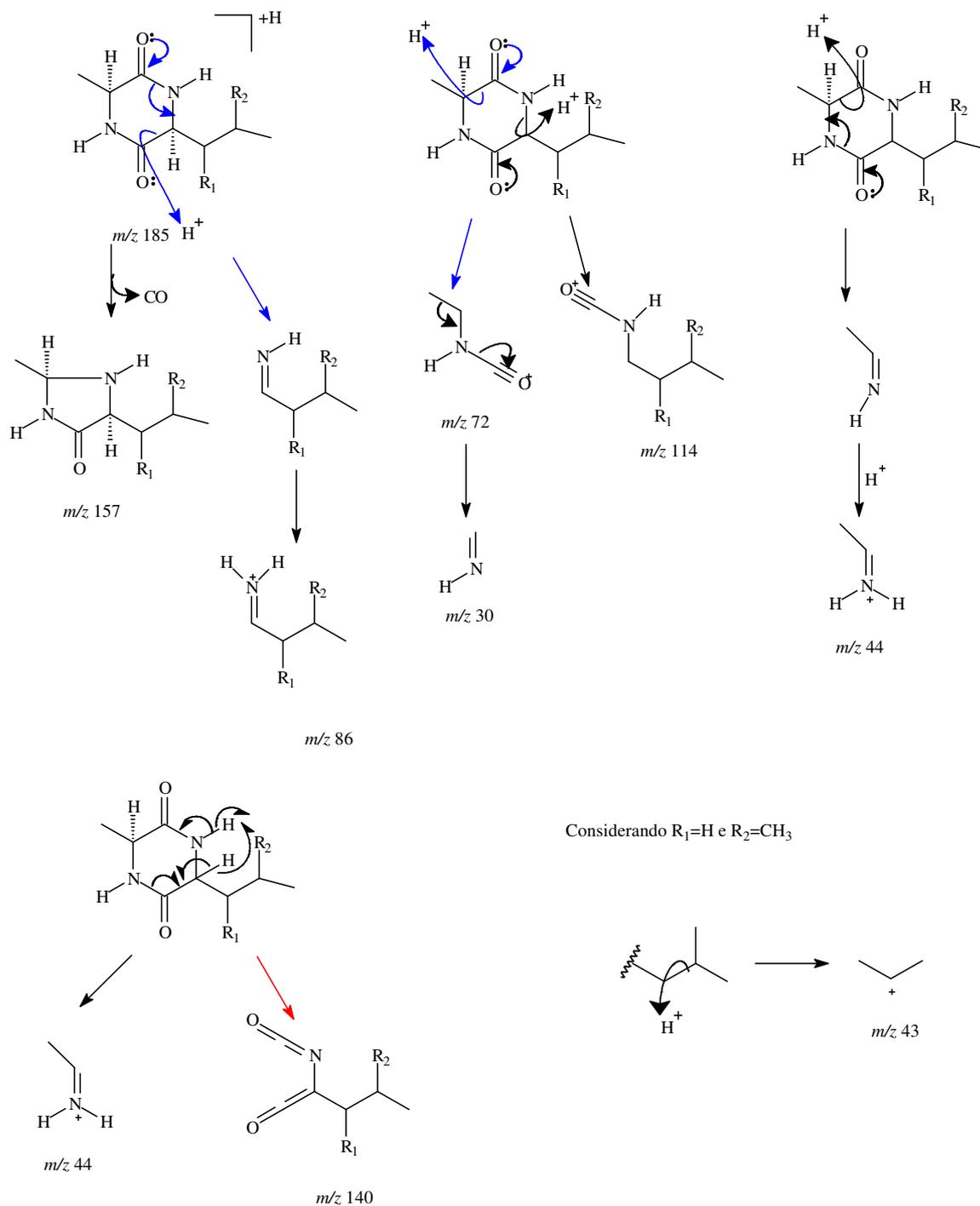


FIGURA 4.58: Proposta de fragmentação para o ciclo (Ala-Leu).

A análise do extrato da bactéria monitorando o íon  $m/z$  213, permitiu verificar a presença desta na banda cromatográfica com t.r. 25,76 (FIGURA 4.60, p. 89). A TABELA 4.2 (p. 78) mostra o íon  $m/z$  213 podendo ser a *ciclo* (Val-Ile) ou *ciclo* (Val-Leu) (FIGURA 4.59, p. 89).

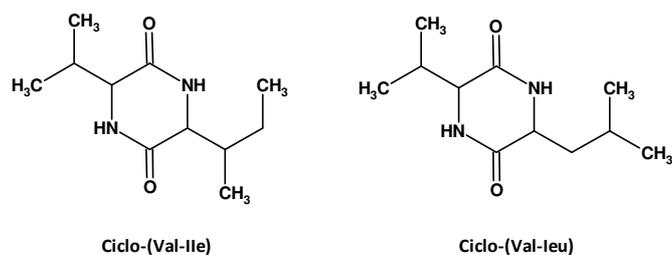


FIGURA 4.59: Estruturas das dicetopiperazinas *ciclo* (Val-Ile) e *ciclo* (Val-Leu).

Os íons  $m/z$  86 e 114 sugerem o aminoácido leucina ou isoleucina. Os íons  $m/z$  140 e 43 formados pela fragmentação do núcleo ciclopiperazínico (FIGURA 4.61 e 4.62, p. 90) sugerem a presença de um destes isômeros, no entanto, a presença do íon  $m/z$  43 formado pela unidade isopropila final do aminoácido leucina, reforçaria a ocorrência do isômero *ciclo* (Val-Leu). A identificação deste na análise do extrato por LC-RMN poderá garantir se a *X. fastidiosa* sintetiza *ciclo* (Val-leu) ou *ciclo* (Val-Ile).

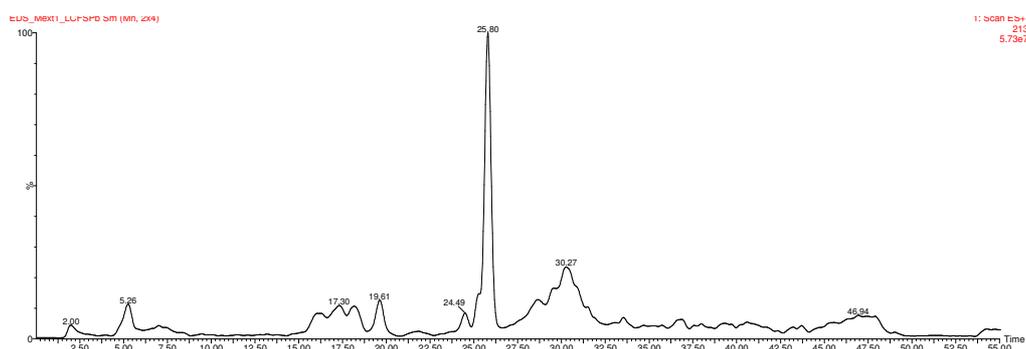


FIGURA 4.60: Cromatograma obtido no modo *full scan* para íon selecionado  $m/z$  213.

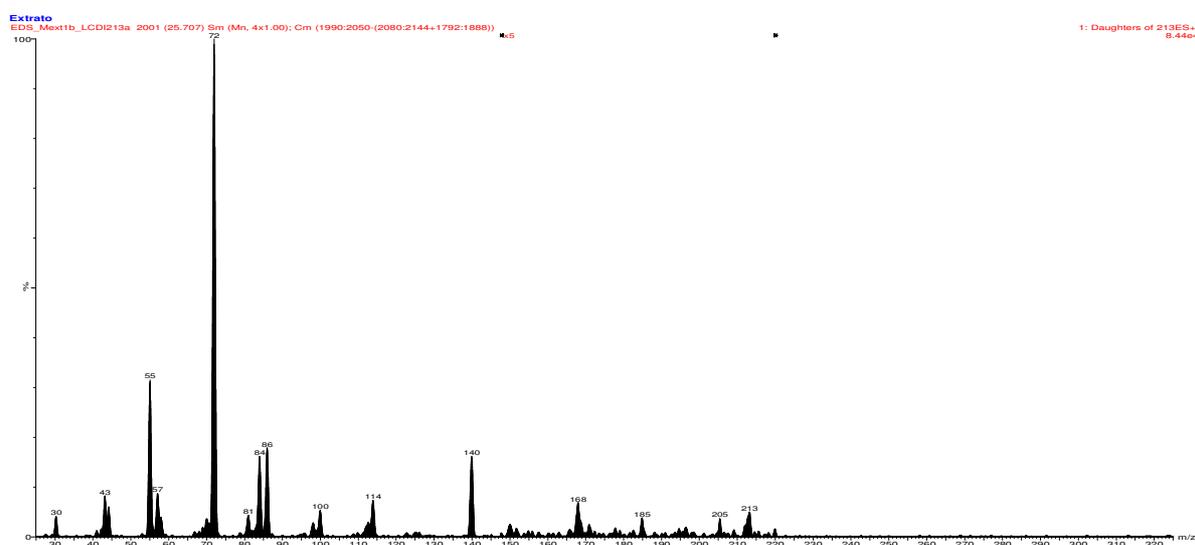


FIGURA 4.61: Espectro de massas do íon produto  $m/z$  213 em t.r. 25.76 min.

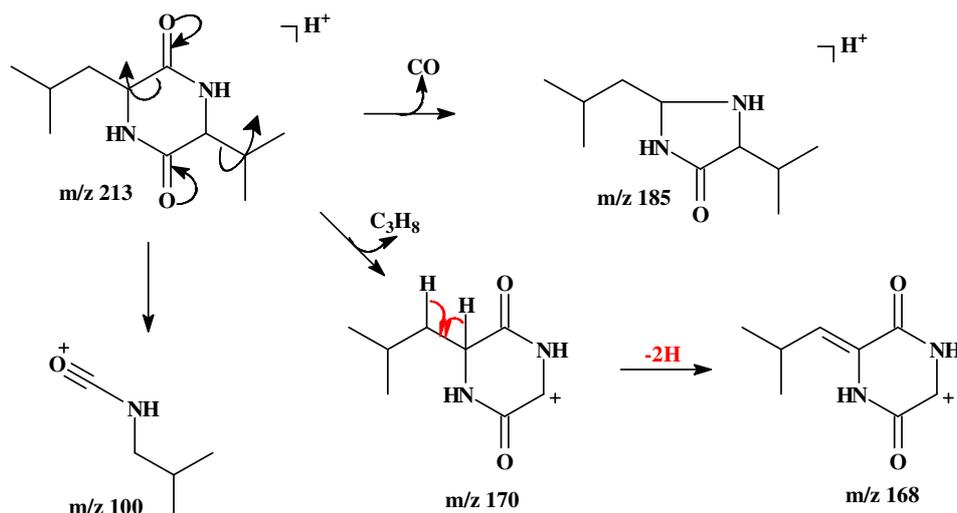


FIGURA 4.62: Proposta de fragmentação para *ciclo* (Val-Leu). Íons  $m/z$  140, 114, 86, 72 ver figura 4.58, p. 88.

Ao utilizar o experimento SIR (*Selected Ion Recording*) para íon precursor  $m/z$  86, revelou espectros de íons produtos  $m/z$  268 com tempo de retenção em 29,66 e 30,14 (FIGURA 4.63). Os respectivos espectros de massas mostraram  $m/z$  268 e  $m/z$  227, respectivamente (FIGURA 4.64, p. 91). Estes correspondem ao íon pseudo molecular  $m/z$  268 ( $[M+H]+ACN$ ) e o íon molecular protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  227 (FIGURA 4.64, p. 91), os quais de acordo com a TABELA 4.2 (p. 78) podem ser a *ciclo* (Leu-Ile), *ciclo* (Leu-Leu) e *ciclo* (Ile-Ile) (FIGURA 4.65, p. 91), os quais possuem  $m/z$  227.

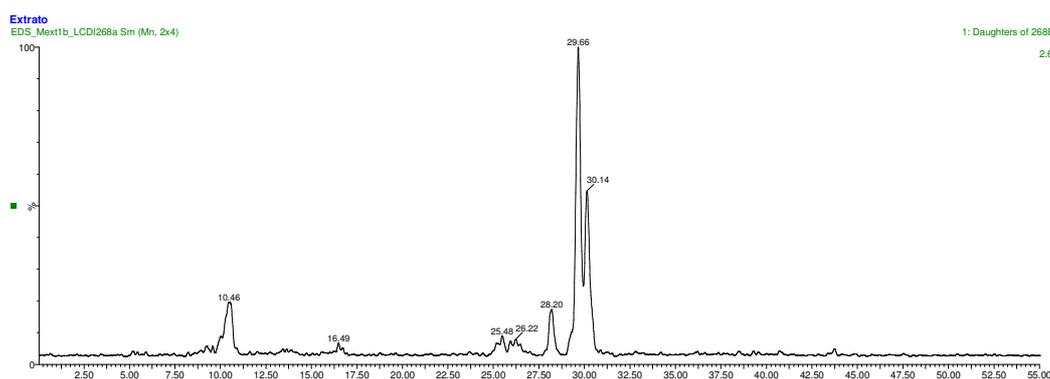


FIGURA 4.63: Cromatograma de íons produtos  $m/z$  268 do extrato.

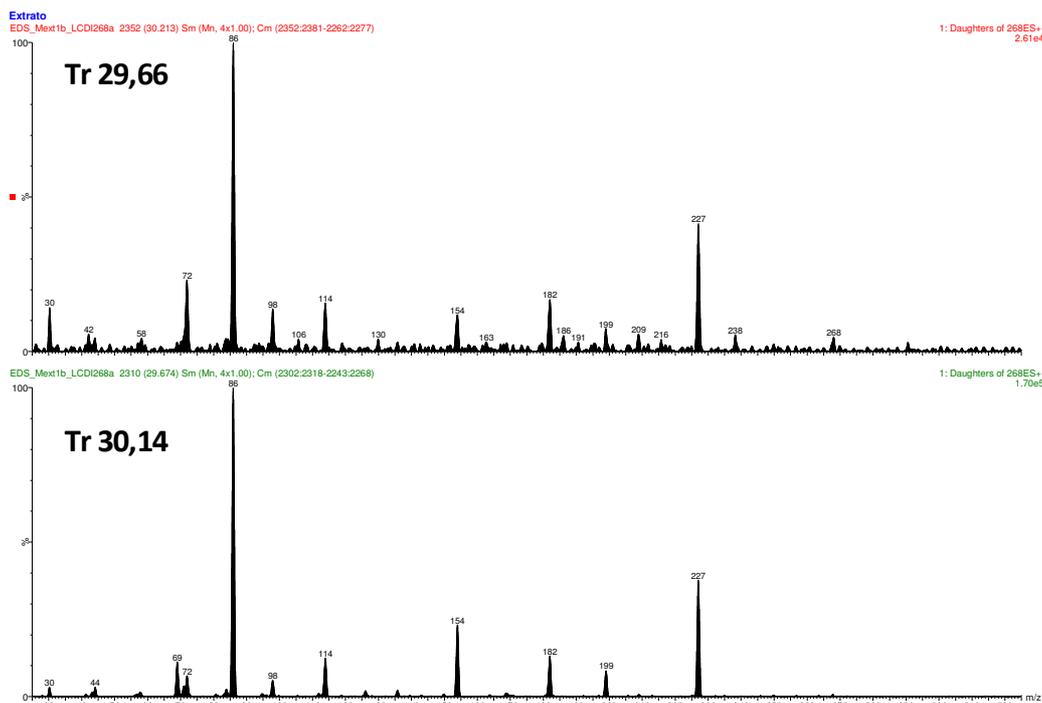


FIGURA 4.64: Espectro de massas de íons produzidos da banda com t.r.em 29.66 e 30.14.

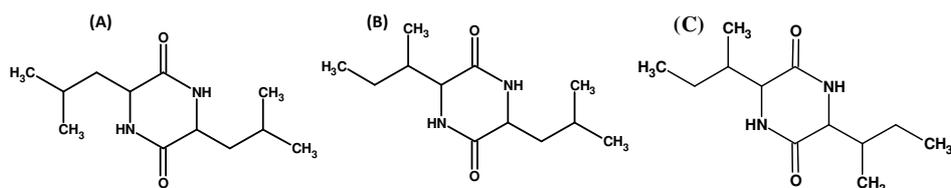


FIGURA 4.65: Diketopiperazinas *ciclo* (Leu-Leu) (A), *ciclo* (Ile-Leu) (B) e a *ciclo* (Ile-Ile) (C).

A única diferença geralmente visualizada quando se obtêm espectros de massas com isoleucina e leucina é a formação do íon  $m/z$  69 ( $C_5H_9$ -Isoleucina) e 72 ( $C_3H_6NO$ -Leucina) [XING *et al.*, 2008]. O espectro de massas do pico com t.r. 29,66 (FIGURA 4.64) mostrou o íon fragmento  $m/z$  72, com isso, sugeriu a formação da DKPs com resíduo de aminoácido Leucina. No entanto, o espectro de massas do pico com t.r. 30,14 apresentou os íons fragmentos  $m/z$  69 e 72 (FIGURA 4.64), os quais sugeriram a condensação do resíduo de aminoácido isoleucina e leucina. Estas análises levaram a identificação das diketopiperazinas *ciclo* (Leu-Leu) (FIGURA 4.66, A, p. 92) e a *ciclo* (Leu-Ile) (FIGURA 4.66, B, p. 92) em 29,66 e 30,14 min, respectivamente. A identificação também foi baseada em dados da literatura [XING *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2004].

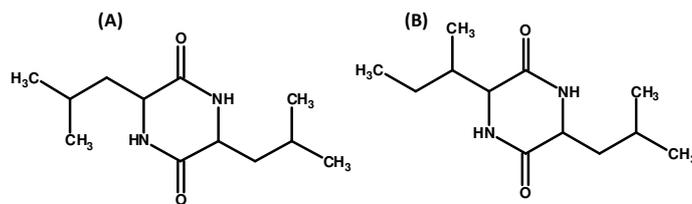


FIGURA 4.66: Diketopiperazinas *ciclo* (Leu-Leu) (A) e a *ciclo* (Leu-Ile) (B).

A análise do extrato acetato de etila do sobrenadante da bactéria revelaram a produção das diketopiperazinas *ciclo* (Pro-Phe) e *ciclo* (Pro-Tyr), discutidas anteriormente. Estes foram caracterizados pela presença dos íons  $m/z$  120 e 136, respectivamente. Desta forma, usando *Selected Ion Recording* (SIR), buscou-se identificar no extrato diketopiperazinas formadas destes aminoácidos precursores. Com isso, ao se analisar o extrato usando o íon  $m/z$  120 revelou na banda cromatográfica t.r. 27,86 min (FIGURA 4.67), espectros de íons produtos  $m/z$  247. Este, usando a TABELA 4.2 (p. 78) como modelo, sugere a presença da *ciclo* (Val-Phe).

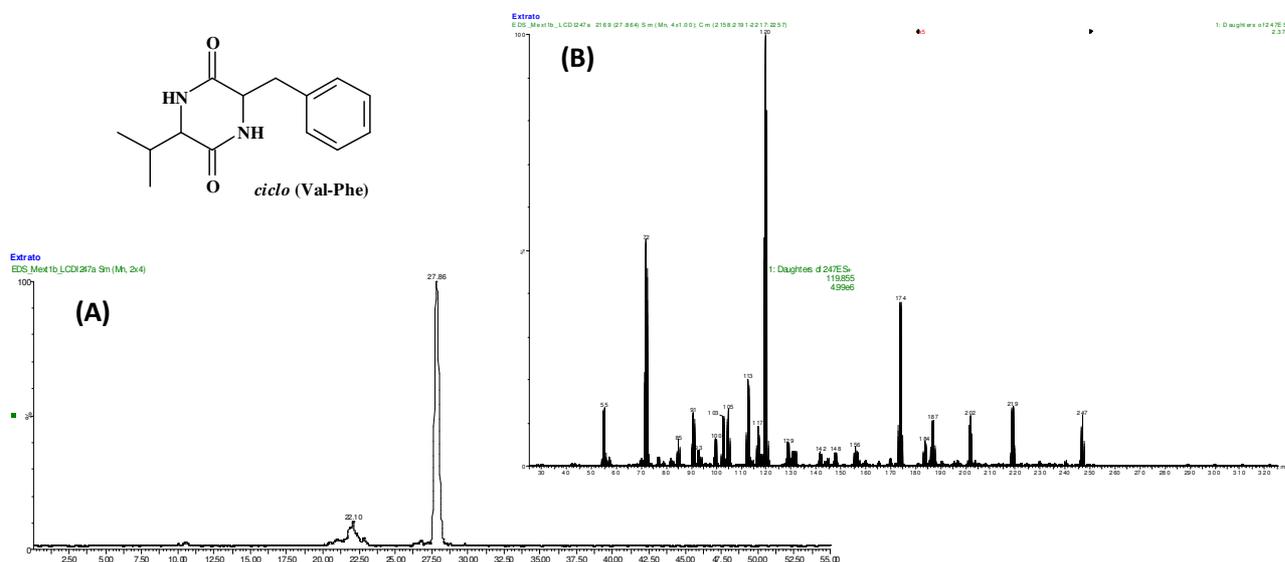


FIGURA 4.67: Cromatograma para íons produtos  $m/z$  247 (A) e espectro de massas do íon produto  $m/z$  247 com t.r. 27.86 min (B).

O espectro de massas desta banda (FIGURA 4.67, B) mostrou o íon fragmento  $m/z$  174 formado pela fragmentação do núcleo diketopiperazina, liberando o resíduo de aminoácido valina. Porém o íon  $m/z$  72 também pode se formar por fragmentação do núcleo diketopiperazina. Finalmente, em

comparação com dados da literatura foi confirmado a DKPs *ciclo* (Val-Phe) [GINZ & ENGELHARDT, 2001]. Ao continuar esta análise também obteve-se espectros de íons produtos  $m/z$  245, presentes nas bandas cromatográfica em t.r. 20,72 e. 22,59 min (FIGURA 4.68). Estes foram discutidos anteriormente e revelado como sendo *ciclo* (Pro-Phe).

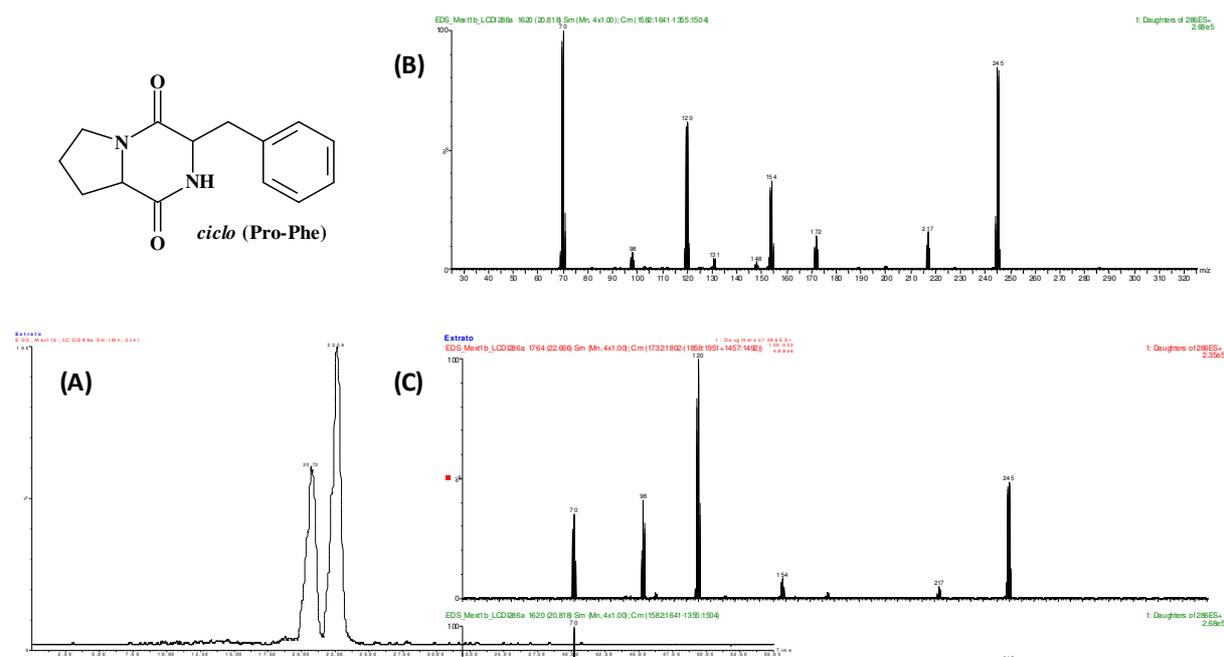


FIGURA 4.68: Cromatograma para íons produtos  $m/z$  245 (A) e espectros de massas da banda no t.r. 20,72 min (B) e no t.r. 22,59 min (C).

Ao analisar o extrato selecionando  $m/z$  136 revelou no espectro *full scan* o íon molecular protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  327, nas bandas em t.r. 10,61 e 12,10 (FIGURA 4.69, p. 94). Desta forma, usando a TABELA 4.2 (p. 78) como modelo e o espectro de massas do íon produto  $m/z$  327 (FIGURA 4.70, p. 94) constatou-se ser a dicetopiperazina *ciclo* (Tyr-Tyr). A identificação foi baseada na fragmentação de massas da literatura [CHEN *et al.* 2004].

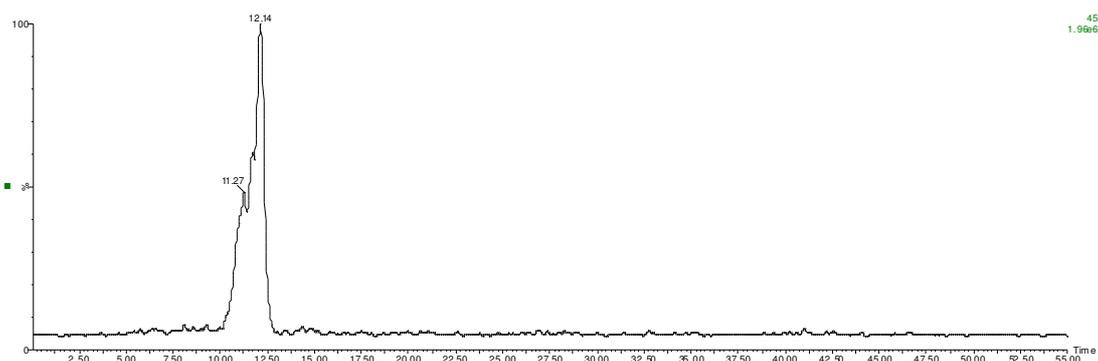


FIGURA 4.69: Cromatograma para SIR  $m/z$  136 dos íons produtos  $m/z$  327 do extrato.

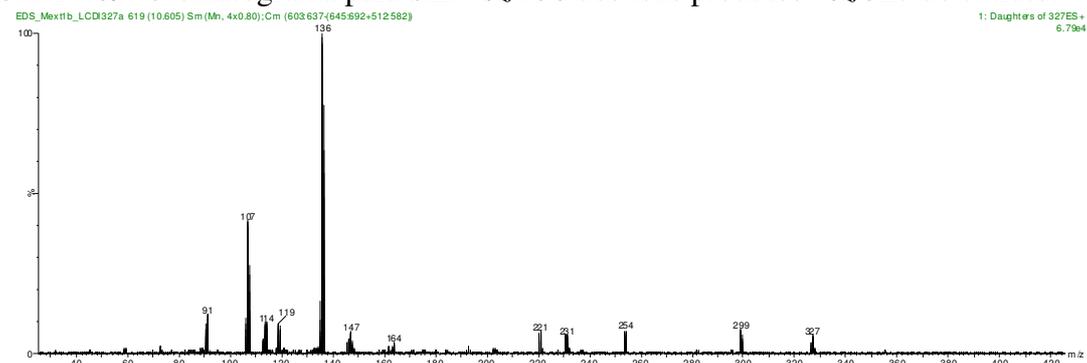


FIGURA 4.70: Espectro de massas do íon produto  $m/z$  327 em t.r. 12,10 min.

Usando a TABELA 4.2 (p. 78) como modelo, buscou-se no extrato a DKPs ciclo (Phe-Tyr) com  $m/z$  311. Para isso, selecionou-se o íon precursor  $m/z$  120 e 136 e estes revelaram as bandas cromatográficas com t.r. 13,07; 14,12; 21,58 e 24,53 min (FIGURA 4.71) do íon molecular protonado  $[M+H]^+$ . De acordo com o espectro de massas dos íons produtos  $m/z$  311 (FIGURA 4.72, p. 95) constatou-se epímeros da dicetopiperazina *ciclo* (Phe-Tyr).

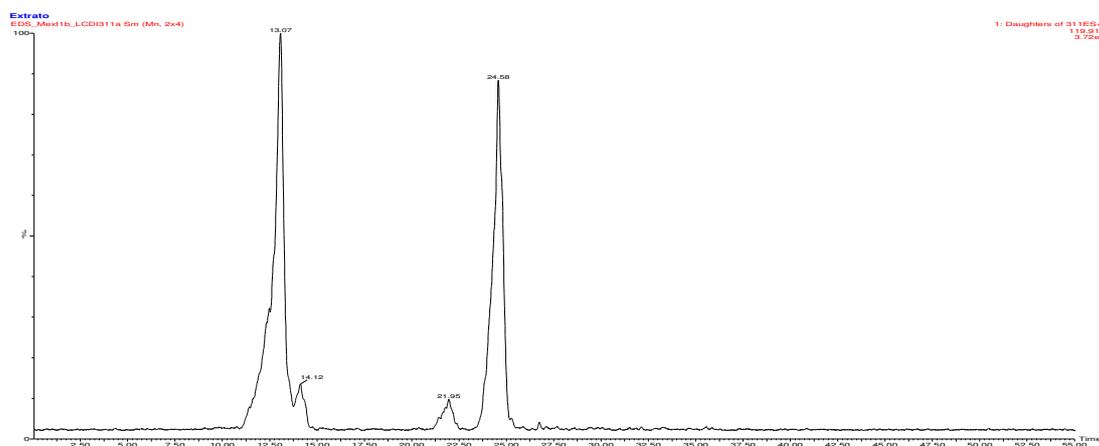


FIGURA 4.71: Cromatograma para íons produtos provenientes do  $m/z$  311 do extrato.

Os espectros de massas para íons produtos  $m/z$  311 (FIGURA 4.72), mostrou pequenas variações nos íons fragmentos, possivelmente característicos para cada isômero, no entanto, somente com informações da literatura não foi possível atribuir a cada isômero o seu respectivo espectro de massas. Desta forma os íons produtos  $m/z$  311 foi identificado como sendo a dicetopiperazina *ciclo* (Phe-Tyr), baseando-se nos dados da literatura [CHEN *et al.* 2004; XING *et al.*, 2008].

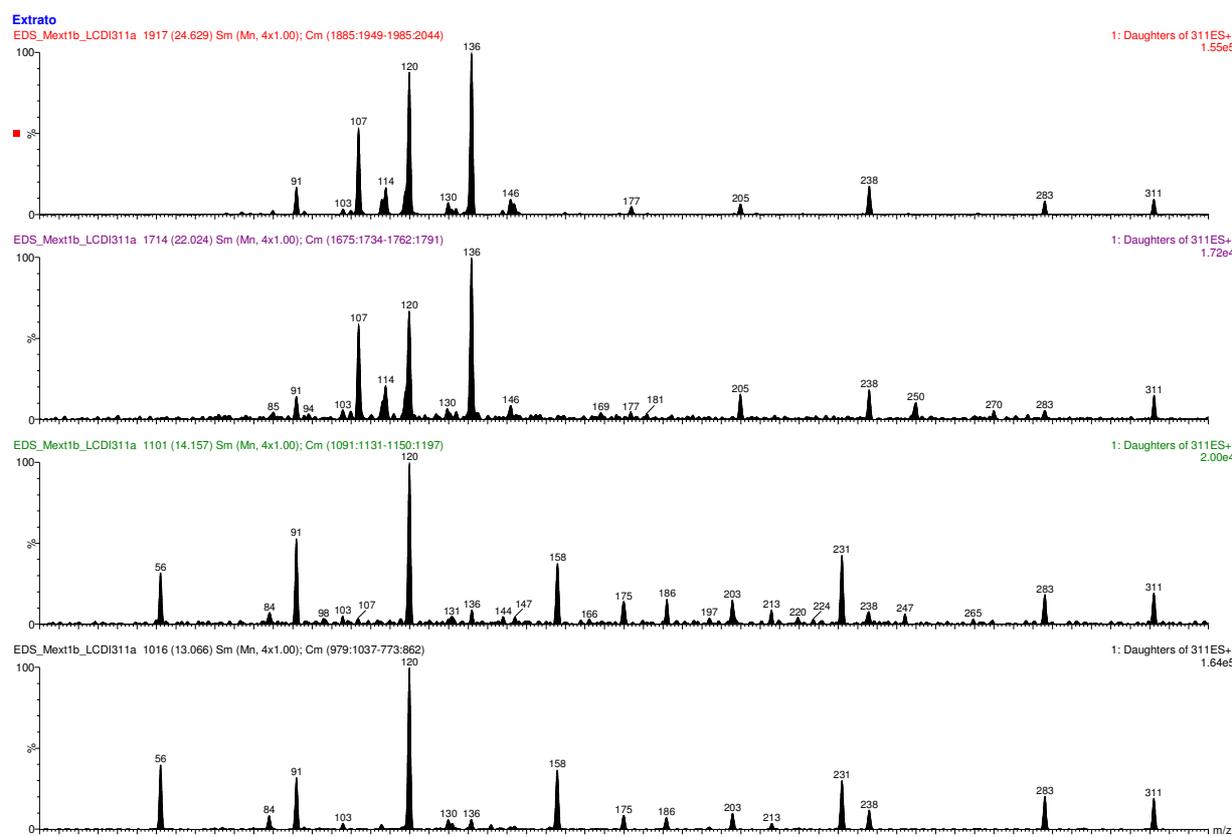


FIGURA 4.72: Espectro de massas de íons produtos para  $m/z$  311 em t.r. 13.07, 14.12, 21.95 e 24.58, de baixo para cima, respectivamente.

A especificidade das dicetopiperazinas em *Xylella fastidiosa* pode ser uma característica no crescimento e patogenicidade, tanto, na sinalização para formação do biofilme, assim como, agregação, micotoxinas e etc. Contudo, ainda é obscuro o papel destes compostos em bactérias e não somente em *X. fastidiosa*. Assim, acredita-se na possibilidade de detectar a produção das DKPs *in planta* com sintomas da CVC, demonstrando que os vasos xilemáticos podem estar envolvidos como substrato e que as DKPs têm um papel importante em *X.*

*fastidiosa*. No futuro próximo, uma das alternativas será buscar bactericidas baseados no controle de genes alvos, como por exemplo: anti *quorum sensing*.

Neste trabalho também foi detectada dicetopiperazinas formadas com aminoácidos não proteínogênicos. Possivelmente produtos formados de uma epimerização não enzimática. Uma vez que as DKPs são geralmente biossintetizadas com aminoácidos proteínogênicos, onde a ciclização de L,L-dipeptídeo confere o esqueleto central da funcionalização L,L-DKPs. Como consequência de sua origem biossintética a partir de dois L-aminoácidos, naturalmente ocorrem DKPs de configuração *cis*, com mais de 400 diferentes relatos de ocorrência natural. Em contraste com a ocorrência generalizada de DKPs a base L-aminoácidos, há apenas um pequeno número de relatos detalhando compostos dicetopiperazinas natural *cis* e *trans*-funcionalizadas [BULL *et al.*, 1998].

O uso da técnica por LC-MS foi importante na identificação *on line* das dicetopiperazinas e a ionização electrospray no modo positivo mostrou-se eficaz na detecção e identificação destas presentes no extrato do sobrenadante obtido da bactéria *Xylella fastidiosa*.

### 4.3. Análise por de LC-MS/MS do extrato de laranja doce (*C. sinensis*) após inoculação da *X. fastidiosa*.

No intuito de detectar a produção das DKPs *in planta* com sintomas da CVC, os extratos das folhas e caule superior de *C. sinensis* após inoculação da bactéria (90 dias) foram analisados via LC-MS/MS. Para a ionização foi usada uma fonte de eletrospray no modo positivo (ESI<sup>+</sup>), utilizando para a detecção o modo monitoramento de reações múltiplas (MRM-Multiple Reaction Monitoring). Nesse modo, ambos os quadrupolos do detector MS/MS permanecem estáticos promovendo um grande ganho em sensibilidade para o analito. Uma vez que se desejava apenas monitorar a presença ou não das dicetopiperazinas nos extratos das folhas e caule superior de *C. sinensis*. Desta forma foi selecionado o íon produto *ciclo* (Pro-Leu) com  $m/z$  211. Os cromatogramas (FIGURA 4.73) foram obtidos por monitoramento de reações múltiplas (MRM), na qual, foi utilizada a amostra padrão *ciclo* (Pro-Leu), na concentração de 1 g/L.

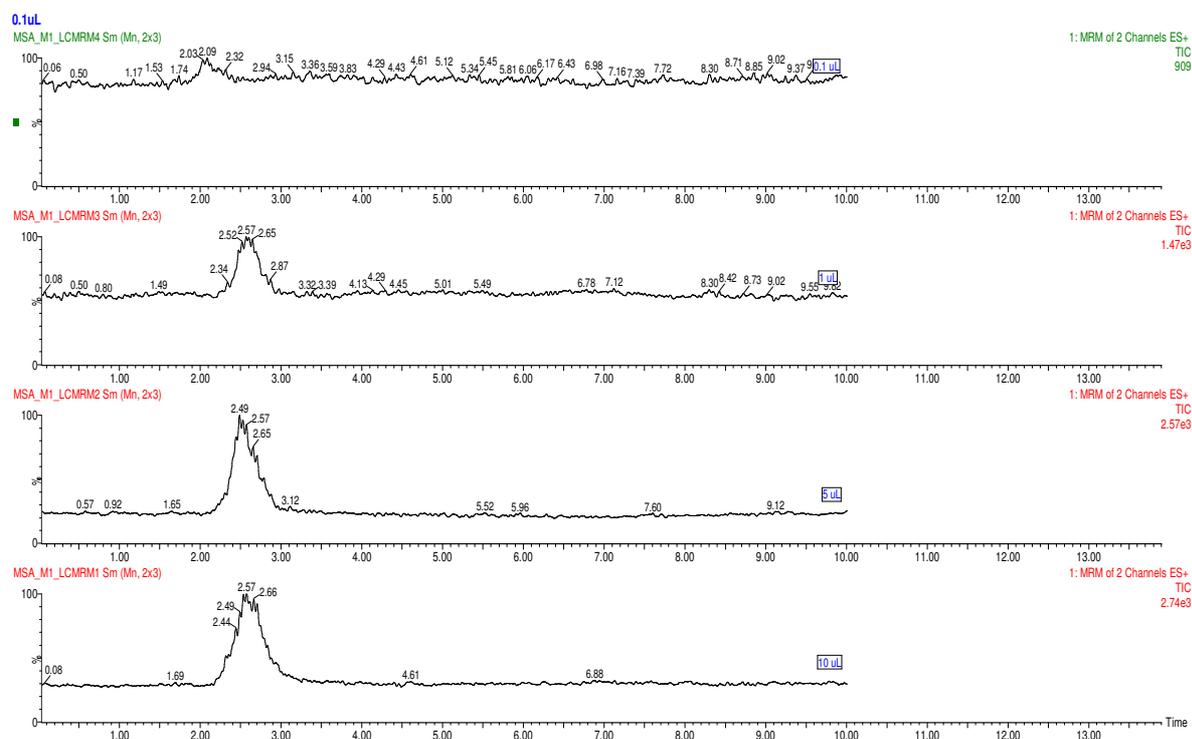


FIGURA 4.73: Cromatograma da amostra *ciclo* (Pro-Leu): volume de injeção a 0,1 µl, 1 µl, 5 µl e 10 µl, respectivamente.

Posteriormente monitorou-se nos extratos das folhas e caule superior de *Citrus sinensis*, preparados seguindo o item 3.2.8., página 39. A análise para cada extrato foi feita em duplicata e em injeções de 30  $\mu$ L. Os cromatogramas obtidos das folhas (FIGURA 4.74) e caule superior (FIGURA 4.75, p. 99) por monitoramento de reações múltiplas (MRM) do íon produto  $m/z$  211, não apresentaram nenhum resultado. Embora nada tenha sido detectado, como mostrado nos cromatogramas abaixo, os dados não são conclusivos. Desta forma, faz-se necessário um estudo mais aprofundado de preparo da amostra e pré-concentração do analíto.

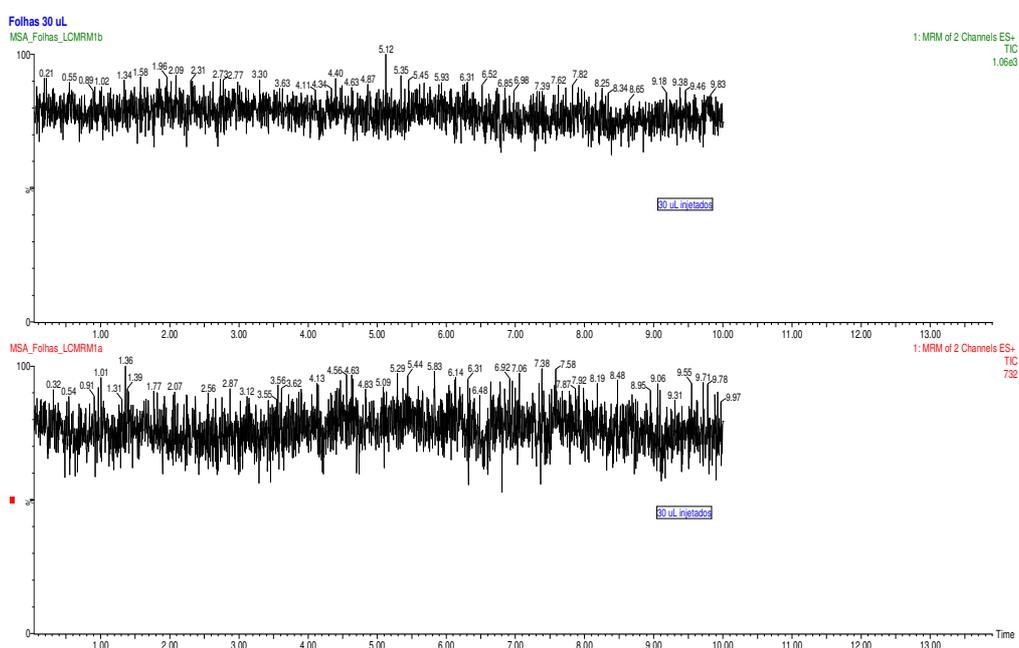


FIGURA 4.74: Cromatograma do extrato das folhas de *C. sinensis* para ciclo (Pro-Leu) ( $m/z$  211).

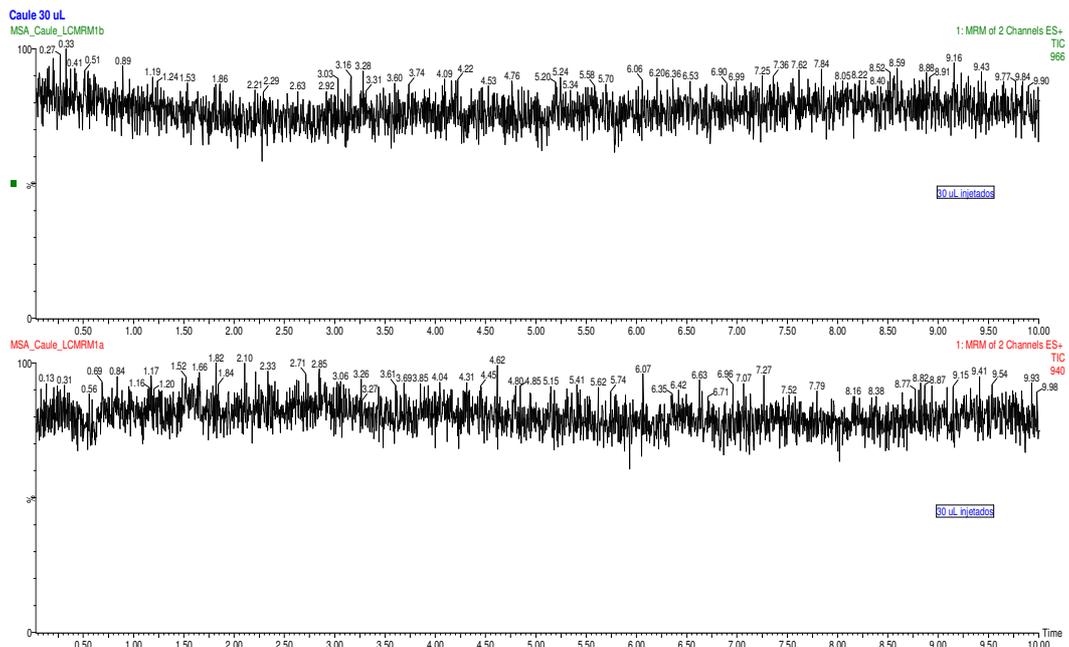


FIGURA 4.75: Cromatograma do extrato do caule superior de *C. sinensis* para ciclo (Pro-Leu) ( $m/z$  211).

#### **4.4. Estudo por LC-SPE-NMR do extrato acetato de etila do sobrenadante da *Xylella fastidiosa*.**

O uso do LC-DAD e LC-MS nem sempre é suficiente para a identificação “on-line” de produtos naturais, uma vez que faltam informações estruturais conferidas pela Ressonância Magnética Nuclear. Assim a Cromatografia Líquida acoplada a Ressonância Magnética Nuclear confere uma alta resolução de informação e permite a identificação de muitos analitos num só espectro. Compostos de ampla faixa de polaridade podem ser analisados, incluindo aqueles não detectados por CG-EM.

A técnica de LC-NMR ainda não foi aceita amplamente pelos cientistas, por causa da falta de sensibilidade, onde a maior dificuldade é a de observar as ressonâncias do analito na presença de uma grande quantidade de fase móvel. Porém, constitui uma poderosa ferramenta na identificação de compostos bioativos quando utilizada em combinação com outras técnicas hífenadas [RIJKE *et al.*, 2006].

A busca por metabólitos secundários de microrganismos, incluindo toxinas fúngicas e outros, pode muitas vezes se transformar em uma tarefa árdua, cara e vagarosa, pois muitas vezes estas substâncias encontram-se presentes em pequenas quantidades nas mais complexas matrizes. Assim, a obtenção de grandes quantidades destas substâncias, com grau de pureza elevado, seja para sua completa determinação estrutural ou para submetê-las frente a diferentes ensaios biológicos, deve necessariamente envolver etapas de cultivo, de extração e de purificação realizadas em larga escala.

Uma excelente alternativa que vem sendo destacada na literatura é a realização dos procedimentos comumente chamados de *screening*, *metabolite profile* ou *dereplication*, que se baseiam em técnicas de alta sensibilidade e que podem prover informações estruturais confiáveis. Por outro lado, dentro deste

mesmo contexto, é notório que a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) provê ao analista informação extremamente útil quanto à estrutura química do composto em questão, embora seja usualmente necessário que a amostra esteja com elevado grau de pureza e em quantidades apreciáveis, geralmente na escala de miligramas.

Entretanto, com o recente avanço no desenvolvimento e *cryoprobes*, na construção de magnetos de alto campo e no desenvolvimento de sequências de pulsos e de interfaces apropriadas, o acoplamento entre a cromatografia líquida (LC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) (FIGURA 4.76) tem se tornado uma técnica viável e extremamente poderosa com relação à elucidação estrutural de compostos orgânicos em misturas complexas [SOUZA, 2009].

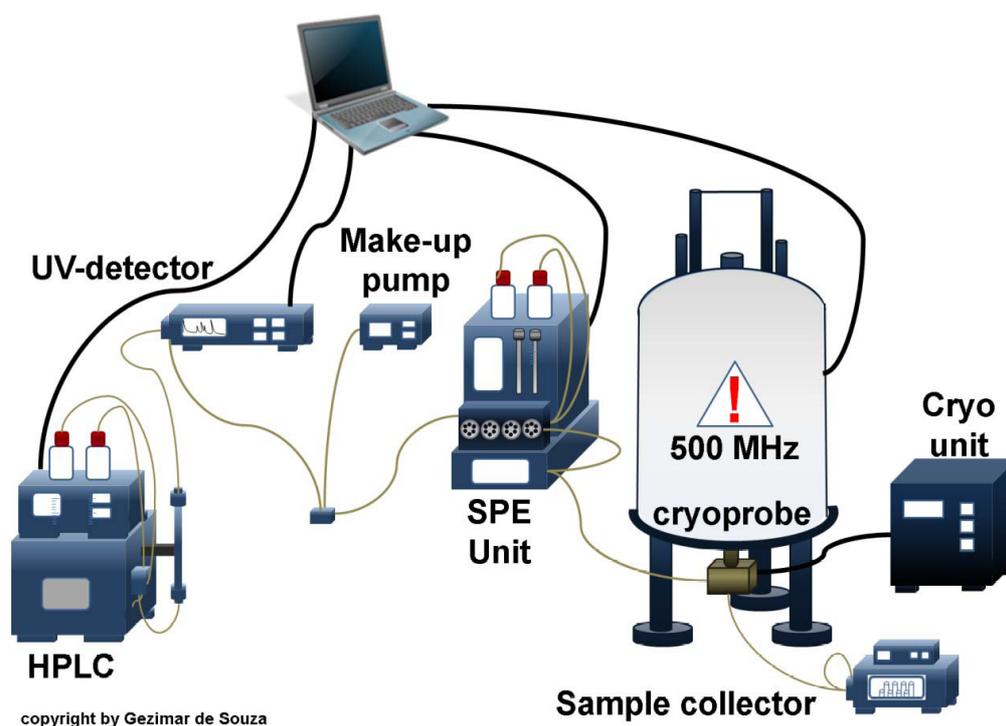


FIGURA 4.76: Esquema do sistema de LC-SPE-NMR. (Fonte: Souza 2009, © Gezimar Donizetti de Souza/UFSCar).

Essa técnica possui algumas peculiaridades, uma delas é a sensibilidade da RMN e a sobrecarga da coluna cromatográfica na separação por LC. Sendo assim, o acoplamento envolvendo a cromatografia líquida (LC), extração em

fase sólida (SPE) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), foi crucial no estudo químico da *X. fastidiosa*. Na qual, neste arranjo as diferentes bandas cromatográficas são “trapeadas” ou “aprisionadas” em cartuchos de SPE, possibilitando o acúmulo destas substâncias aumentando significativamente sua concentração e a sensibilidade da técnica.

O extrato acetato de etila do sobrenadante foi submetida à LC-SPE-NMR em colaboração com a Dra. Cristina Daolio na “Bruker Biospin”, na qual, neste arranjo as bandas cromatográficas destacadas na figura 4.77 foram “trapeadas” ou “aprisionadas” em cartuchos de SPE por três vezes. Posteriormente realizados experimentos na ressonância magnética nuclear possibilitando a identificação principalmente das dicetopiperazinas (FIGURA 4.78, p. 103).

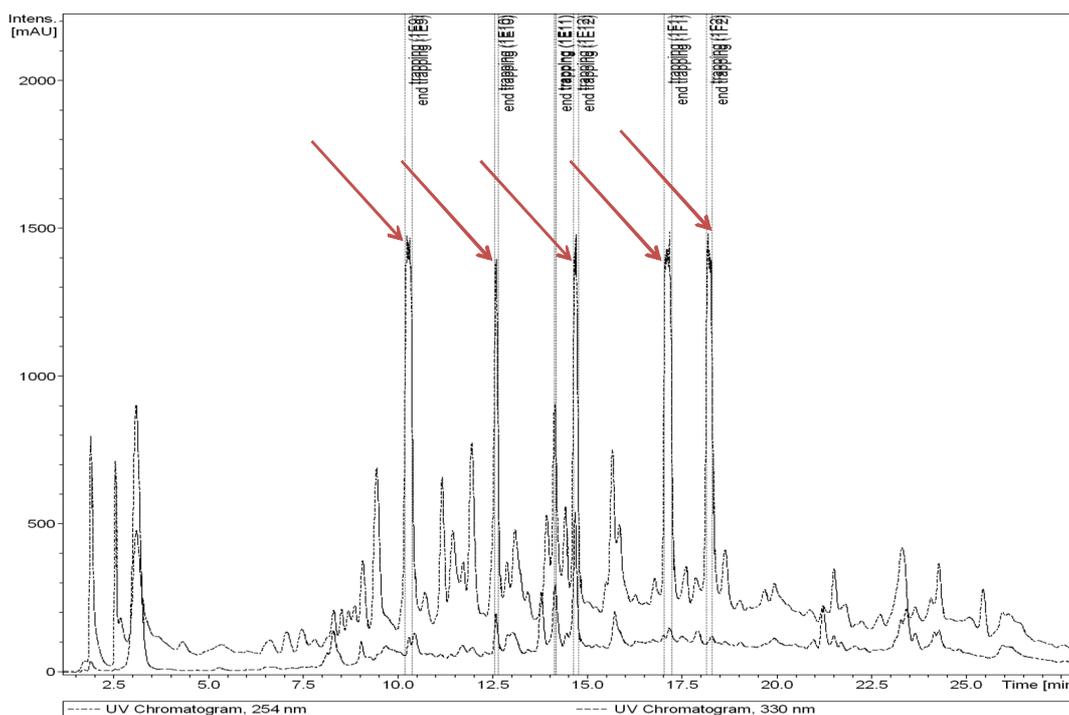


FIGURA 4.77: Cromatograma LC-DAD-SPE-NMR do extrato acetato de etila do sobrenadante da bactéria *Xylella fastidiosa*, destacando as bandas cromatográficas “trapeadas” em cartucho de SPE.

A técnica de LC-SPE-NMR se mostrou eficaz, contudo, uma desvantagem é o uso de múltiplas supressões do solvente e da água acarretando supressão de sinais nos espectros de RMN de hidrogênio. A baixa resolução cromatográfica acarretou em impurezas nas bandas “trapeadas”, conseqüentemente espectros de

RMN em misturas. A baixa concentração dos analítos possibilitou realizar somente experimentos com bandas de maiores intensidades, assim como, experimentos Bidimensionais. Deste modo até o momento foram identificados os constituintes das bandas cromatográficas com tempo de retenção em 12,55 e 17,17 min.

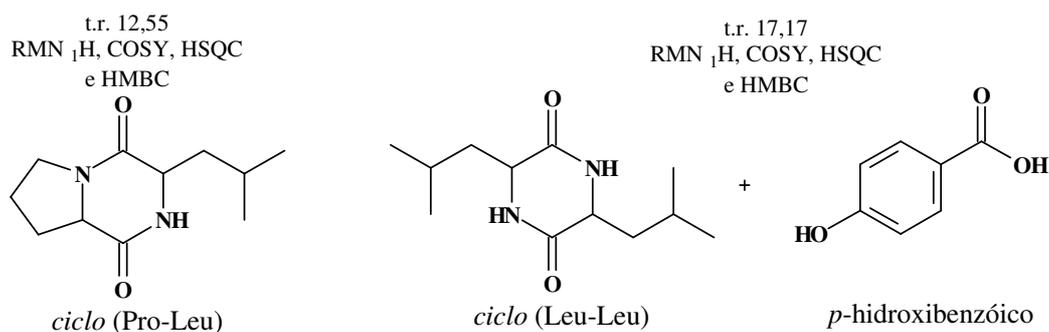


FIGURA 4.78: Substâncias identificadas por LC-SPE-NMR com seus respectivos experimentos Uni e Bidimensional.

#### 4.4.1. Determinação estrutural da substância *ciclo* (Pro-Leu) que produz o sinal cromatográfico com t.r. 12,55 min.

A determinação estrutural da substância *ciclo* (Pro-Leu) foi baseada nos dados espectrais de RMN 1D (<sup>1</sup>H) e 2D (COSY, HMBC e HSQC) e espectrometria de massas.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 4.91, p. 110) apresentou dois dupletos, integrando para 6H, em  $\delta$  0,92 e  $\delta$  0,94, com constante de acoplamento 6,6 Hz, característicos de hidrogênios metílicos. Adicionalmente, um mutipletto em  $\delta$  1,82 indicou a presença de grupo isopropil, confirmada através das correlações entre estes hidrogênios no COSY (FIGURA 4.79, A, p. 104). A análise do mapa de contorno HSQC permitiu atribuir os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono (FIGURA 4.79, B, p. 104).

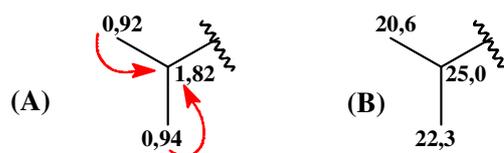


FIGURA 4.79: Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (A) e  $J_{\text{H-C}}$  HSQC (B) do grupo isopropil.

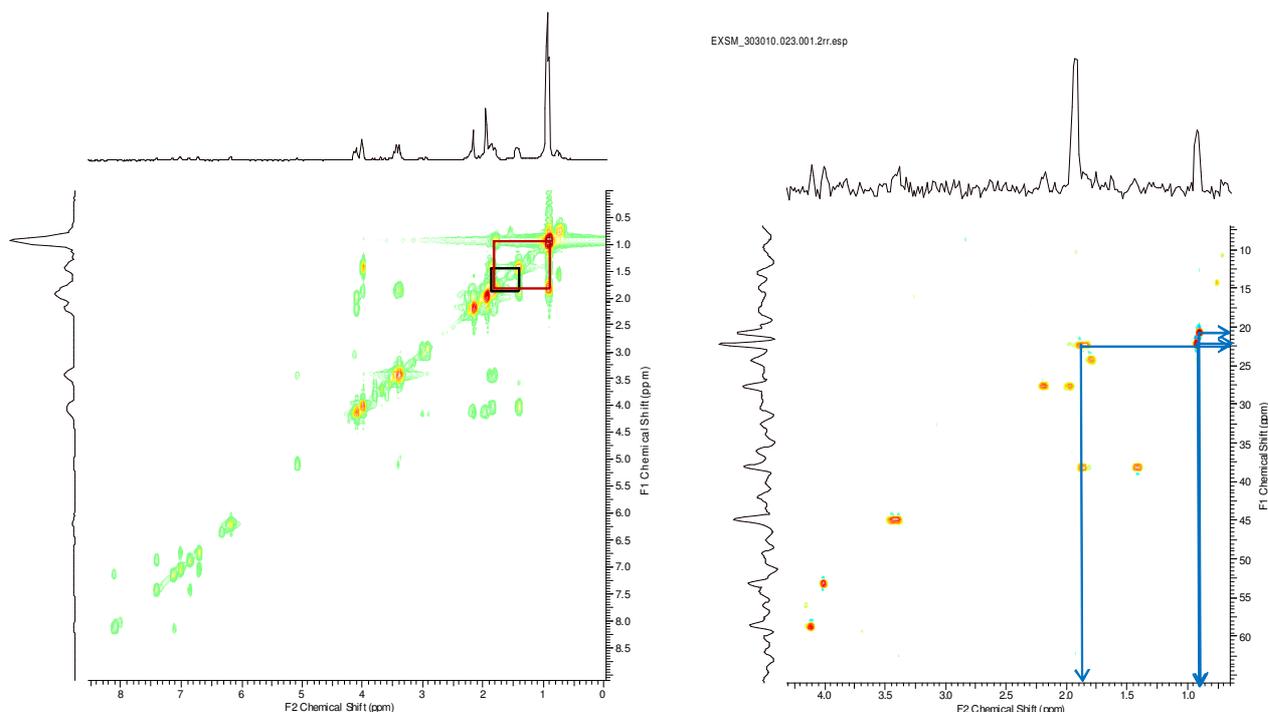


FIGURA 4.80: Mapas de contorno COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz), respectivamente.

No espectro de COSY (FIGURA 4.80) o sinal do hidrogênio em  $\delta$  1,82 correlaciona com um mutipeto em  $\delta$  1,87 (*m*) e com um duplo duplo duplete em  $\delta$  1,42 (*ddd*, 13,8; 8,8; 5,0 Hz), estes no HSQC (FIGURA 4.80) correlacionam com o sinal do carbono em  $\delta$  39,2, indicando a presença de hidrogênios diastereotópicos (FIGURA 4.81 e 4.82, p. 105).

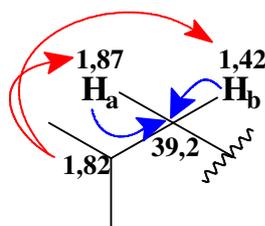


FIGURA 4.81: Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e  $J_{\text{H-C}}$  HSQC.

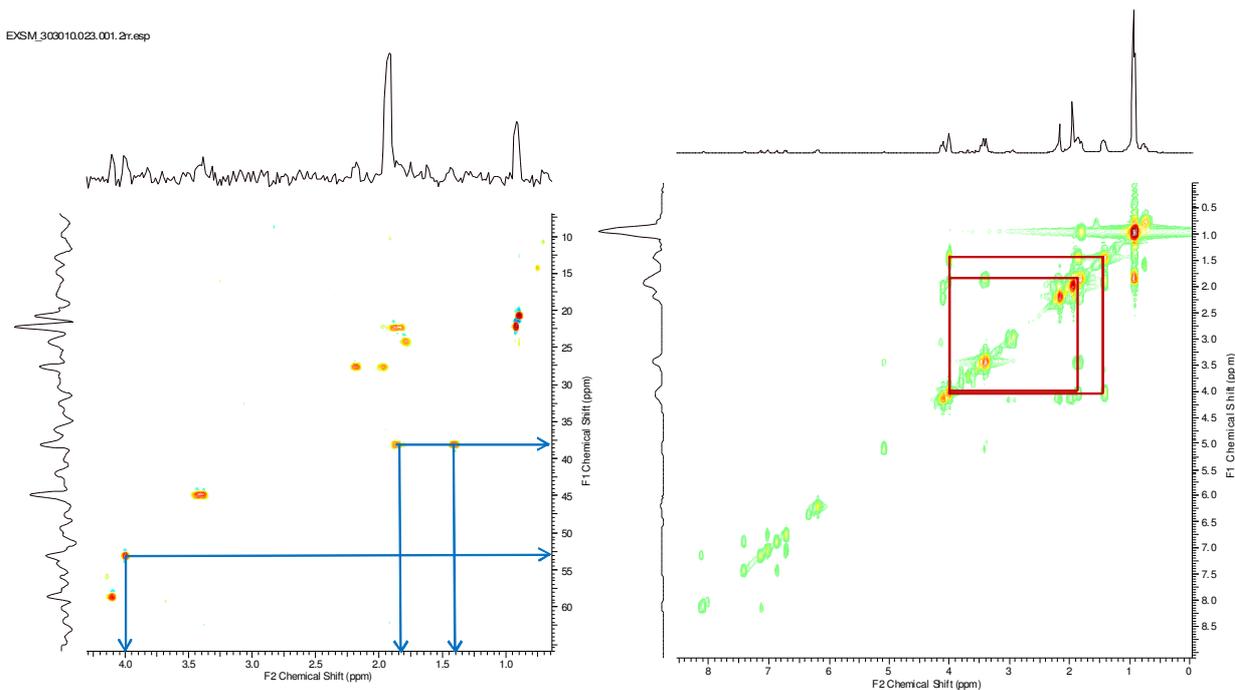


FIGURA 4.82: Mapas de contorno HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz) e COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz), respectivamente.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.91, p. 110) foi observado a presença de um tripleto, integrando para 1H, em  $\delta$  4,00, com constante de acoplamento de 7,8 Hz, sinal característico de hidrogênio  $\alpha$ -carboxílico. Confirmado através do espectro de HMBC (FIGURA 4.83, B, e 4.85, p. 106), na qual, foi observada a correlação entre o sinal do hidrogênio em  $\delta$  4,00 e o sinal do carbono em  $\delta$  166,7. Através da correlação em HSQC (FIGURA 4.83, A) permitiu atribuir ao hidrogênio em  $\delta$  4,00 o respectivo átomo de carbono em  $\delta$  54,0.

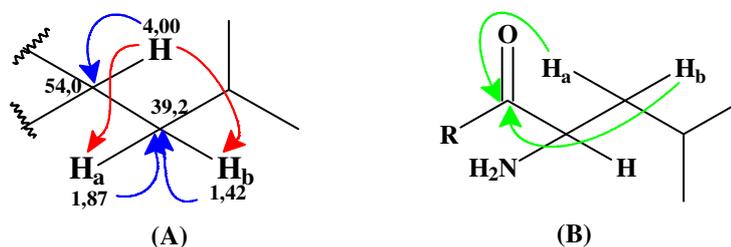


FIGURA 4.83: Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (A),  $J_{\text{H-C}}$  HSQC (A) e  $^3J_{\text{H-C}}$  HMBC (B).

Desta forma, os sinais observados até o momento nos espectros de  $^1\text{H}$ , COSY, HMBC e HSQC indicam a presença do resíduo de aminoácido leucina na estrutura. Entretanto, na análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e HMBC

mostraram a presença de dois hidrogênios, um em  $\delta$  4,00 (*t*,  $J$  7,8 Hz) e outro em  $\delta$  4,11 (*dd*,  $J$  8,8 e 3,5 Hz) e dois sinais carboxílicos em  $\delta$  166,7 e 170,1, caracterizando um sistema de anel dicetopiperazínico (FIGURA 4.84, A).

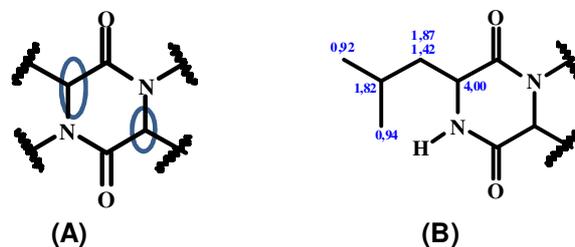


FIGURA 4.84: (A) Sistema de anel dicetopiperazínico e (B) Deslocamento químico dos hidrogênios do resíduo de aminoácido leucina.

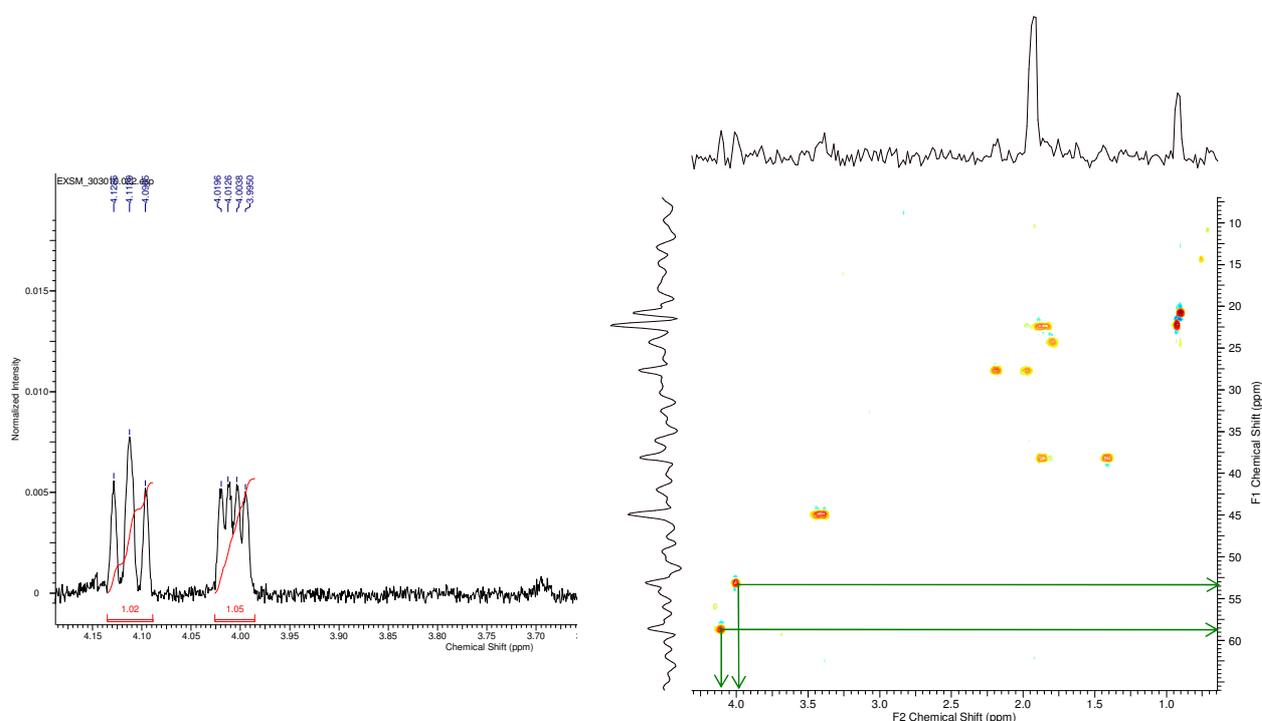


FIGURA 4.85: Ampliação do espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e mapa de contorno HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz), respectivamente.

O experimento COSY mostrou as correlações do sinal do hidrogênio em  $\delta$  4,11 (*dd*,  $J$  8,8 e 3,5 Hz) com os sinais dos hidrogênios diastereotópicos em  $\delta$  2,15 (*m*) e  $\delta$  1,93 (*m*) (FIGURA 4.86, A, p. 107). O espectro HSQC mostrou a correlação do sinal do hidrogênio em  $\delta$  4,11 com o sinal do carbono em  $\delta$  58,4 e os sinais dos hidrogênios diastereotópicos com o sinal do carbono em  $\delta$  28,1 (FIGURA 4.86, A, p. 107). Continuando esta análise, observou-se no espectro

de RMN  $^1\text{H}$  um triplo duplete, integrando para 1H, em  $\delta$  3,42, com constante de acoplamento de 8,5 e 3,6 Hz, e um mutiplete, integrando para 1H, em  $\delta$  3,45; sinais característicos a hidrogênios ligados a carbono contendo heteroátomo. Estes hidrogênios no espectro HSQC correlacionam com o sinal do carbono em  $\delta$  47,5 (FIGURA 4.86, C).

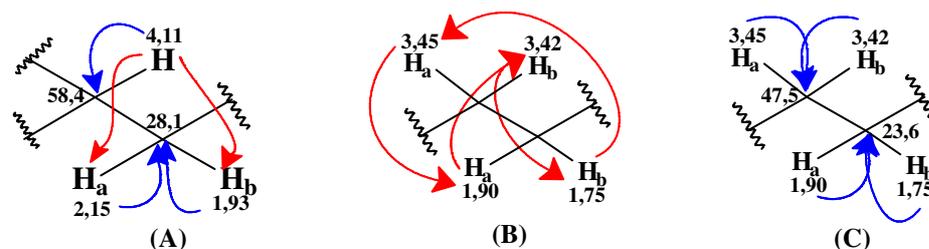


FIGURA 4.86: Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (A) e (B),  $J_{\text{H-C}}$  HSQC (C).

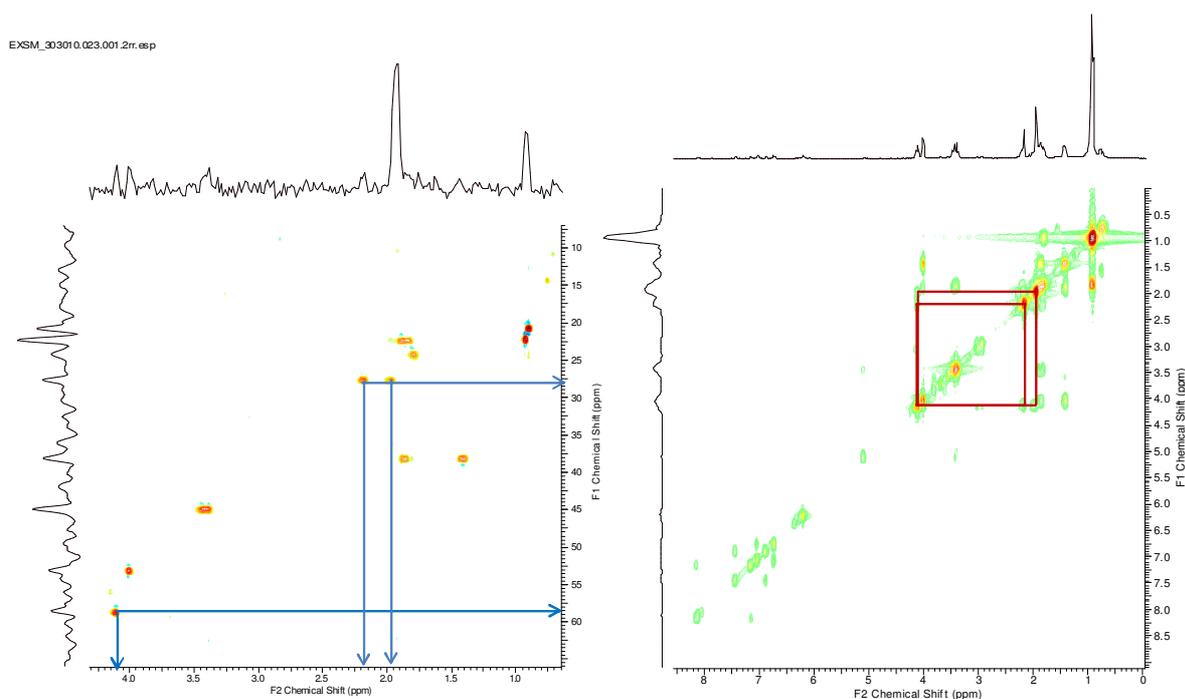


FIGURA 4.87: Mapas de contorno HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz) e COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz).

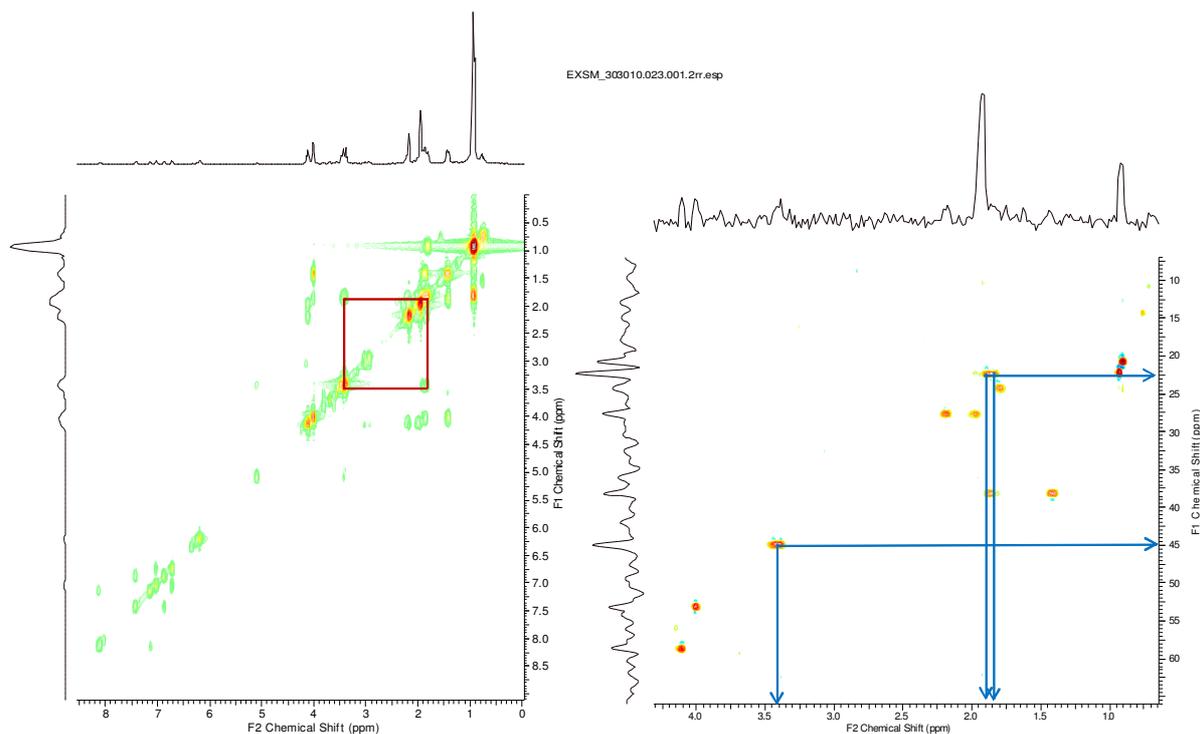


FIGURA 4.88: Mapas de contorno COSY (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz) e HSQC (CD<sub>3</sub>CN, 125 MHz).

Finalmente, com os sinais observados até o momento nos espectros de RMN <sup>1</sup>H, COSY, e HSQC, adicionalmente as correlações observadas no COSY entre os sinais do hidrogênio em δ 3,45 com os sinais dos hidrogênios em 1,75 (*m*) e 1,90 (*m*), indicaram a presença do resíduo de aminoácido prolina na estrutura (FIGURA 4.89).

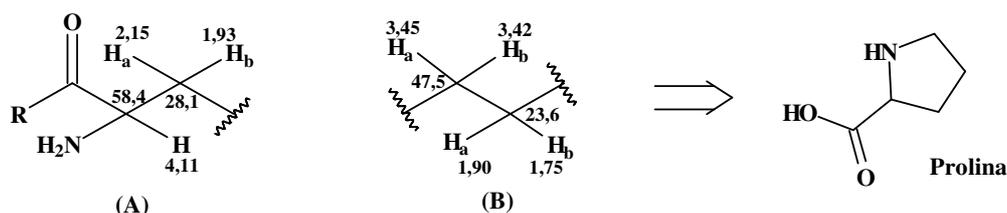


FIGURA 4.89: Estruturas parciais com seus respectivos deslocamentos químicos de H e C (A) e (B).

Desta forma, os dados sugeriram a dicetopiperazina formada com o resíduo de aminoácidos leucina e prolina. O espectro de massas de baixa resolução, obtido através da técnica ESI-MS (+) apresentou o íon molecular  $m/z$  211,  $[M+H]^+$ , sugerindo a fórmula molecular C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os dados espectrais foram comparados com a literatura (TABELA 4.3, p. 109) [FURTADO, *et al.*,

2005; LI, *et al.*, 2009], o qual permitiu a identificação da substância como *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 4.90), relatada como metabolito de diversos fungos e bactérias como por ex., *Arpergillus fumigatus* [FURTADO *et al.*, 2005].

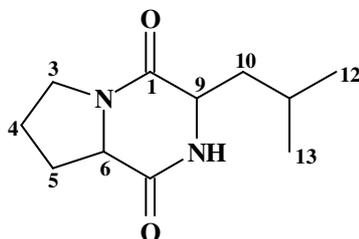


FIGURA 4.90: Estrutura química da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu).

TABELA 4.3: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) da *ciclo* (Pro-Leu) em comparação com os dados da literatura [FURTADO, *et al.*, 2005,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz].

No.	$\delta_{\text{H}}$ (multip. $J$ = Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (lit)	$\delta_{\text{C}}$ (HSQC e HMBC)	$\delta_{\text{C}}$ (lit)
1	-	-	166,7*	168,5
2	-	-	-	-
3	3,45 ( <i>m</i> ) 3,42 ( <i>td</i> , 8,5 e 3,6 Hz)	3,47-3,51 ( <i>m</i> )	47,5	46,0
4	1,90 ( <i>m</i> ) 1,75 ( <i>m</i> )	1,96-2,05 ( <i>m</i> ) 1,81-1,94 ( <i>m</i> )	23,6	23,2
5	2,15 ( <i>m</i> ) 1,93 ( <i>m</i> )	2,24-2,34 ( <i>m</i> ) 1,96-2,05 ( <i>m</i> )	28,1	28,8
6	4,11 ( <i>dd</i> , $J$ 8,8 e 3,5 Hz)	4,25 ( <i>ddd</i> , 11,1; 6,3; 1,7)	58,4	60,1
7	-	-	170,1*	172,6
8	6,19 <i>sl</i>	4,56 <i>sl</i>		-
9	4,00 ( <i>t</i> , $J$ 7,8 Hz)	4,09-4,15 ( <i>m</i> )	54,0	54,0
10	1,42 ( <i>ddd</i> , 13,8; 8,8; 5,0 Hz) 1,87 ( <i>m</i> )	1,81-1,94 ( <i>m</i> ) 1,47-1,56 ( <i>m</i> )	39,2	38,2
11	1,82 ( <i>m</i> )	1,81-1,94 ( <i>m</i> )	25,0	25,0
12	0,92 ( <i>d</i> , 6,6 Hz)	0,94 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)	20,6	21,4
13	0,94 ( <i>d</i> , 6,6 Hz)	0,95 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)	22,3	22,8

\*Valores de carbono foram obtidos através da projeção do HMBC

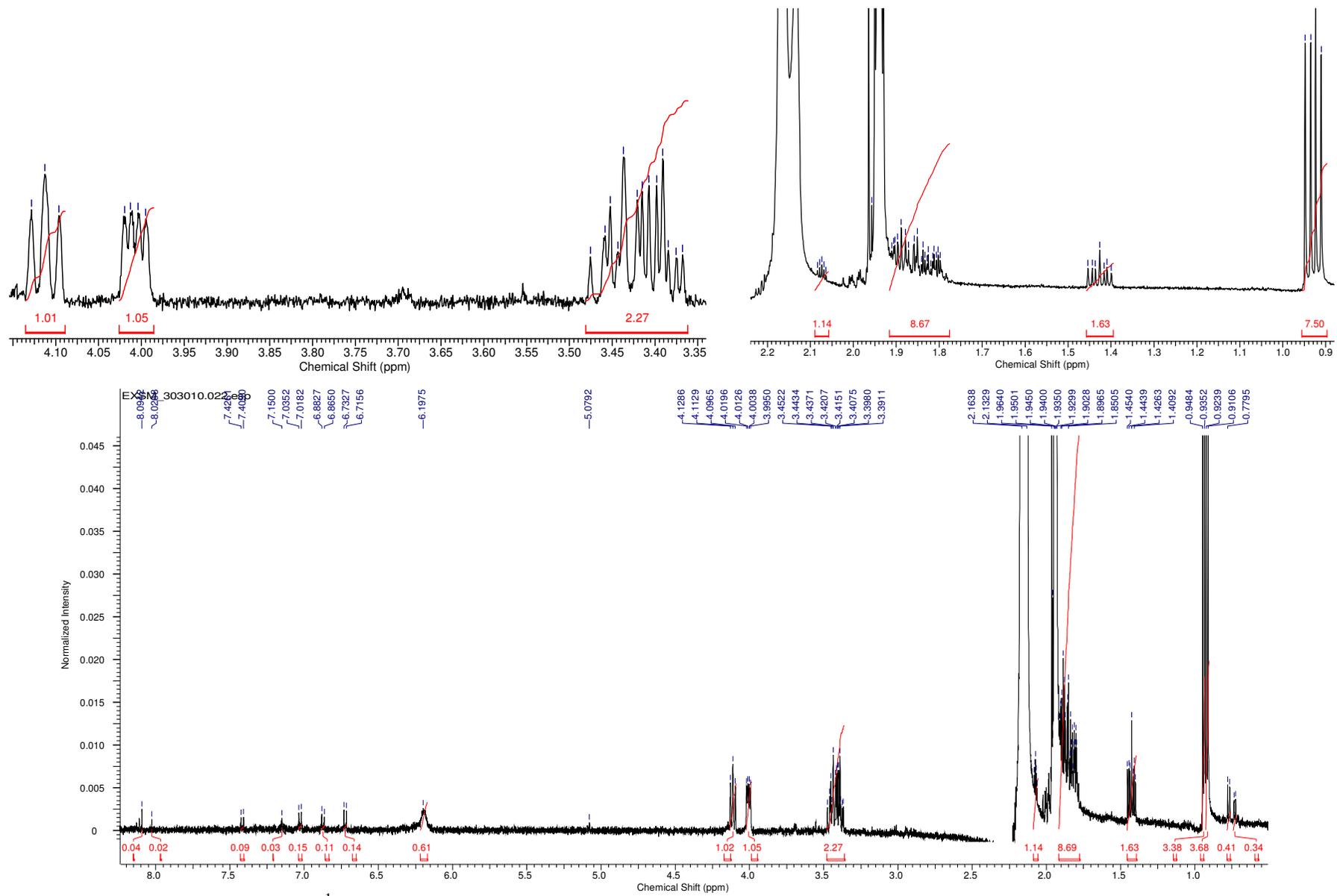


FIGURA 4.91: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz) da Substância *ciclo (Pro-Leu)*.

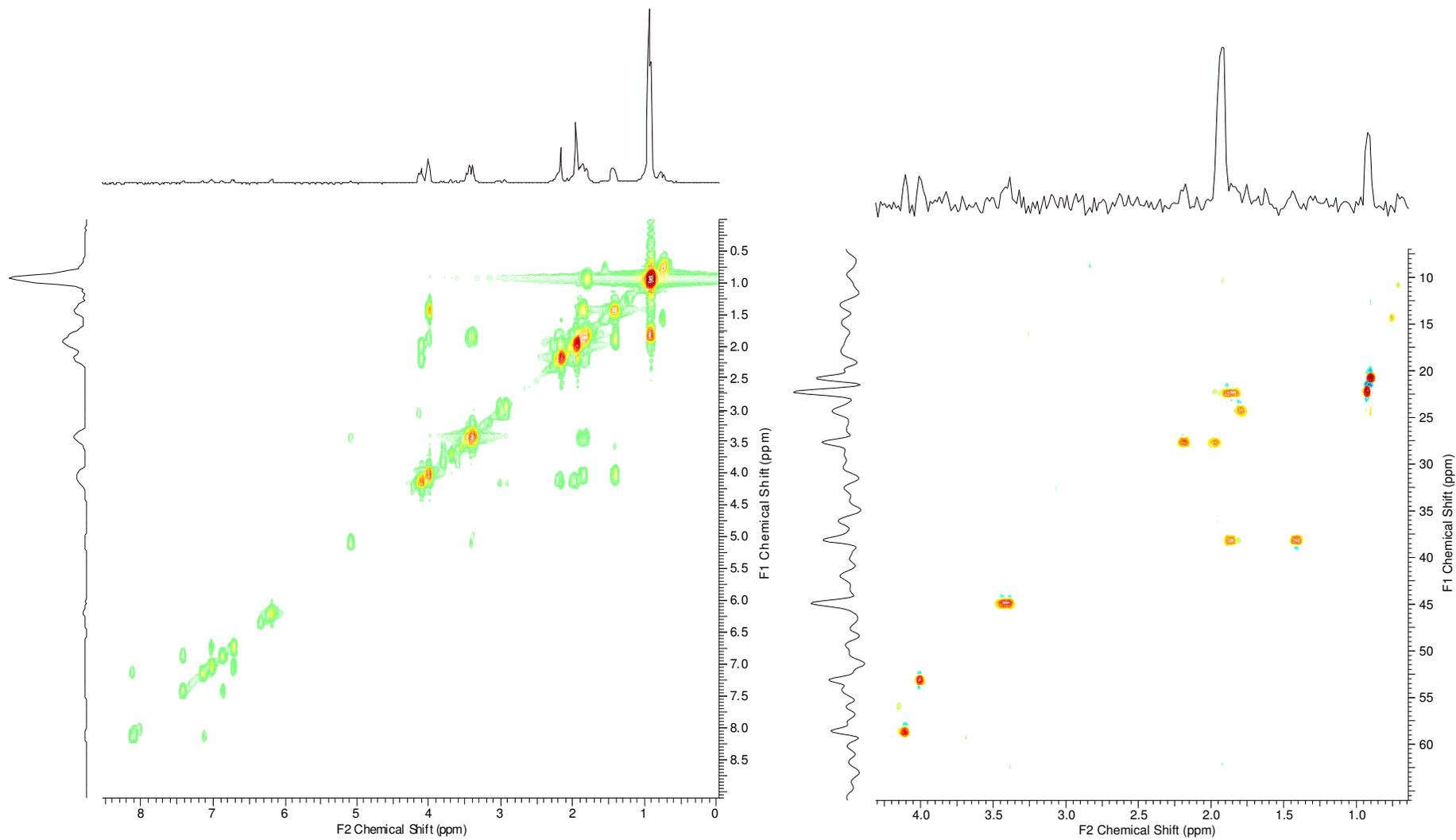


FIGURA 4.92: Mapa de correlação COSY (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz) e HSQC da substância *ciclo* (Pro-Leu) (CD<sub>3</sub>CN, 125 MHz).

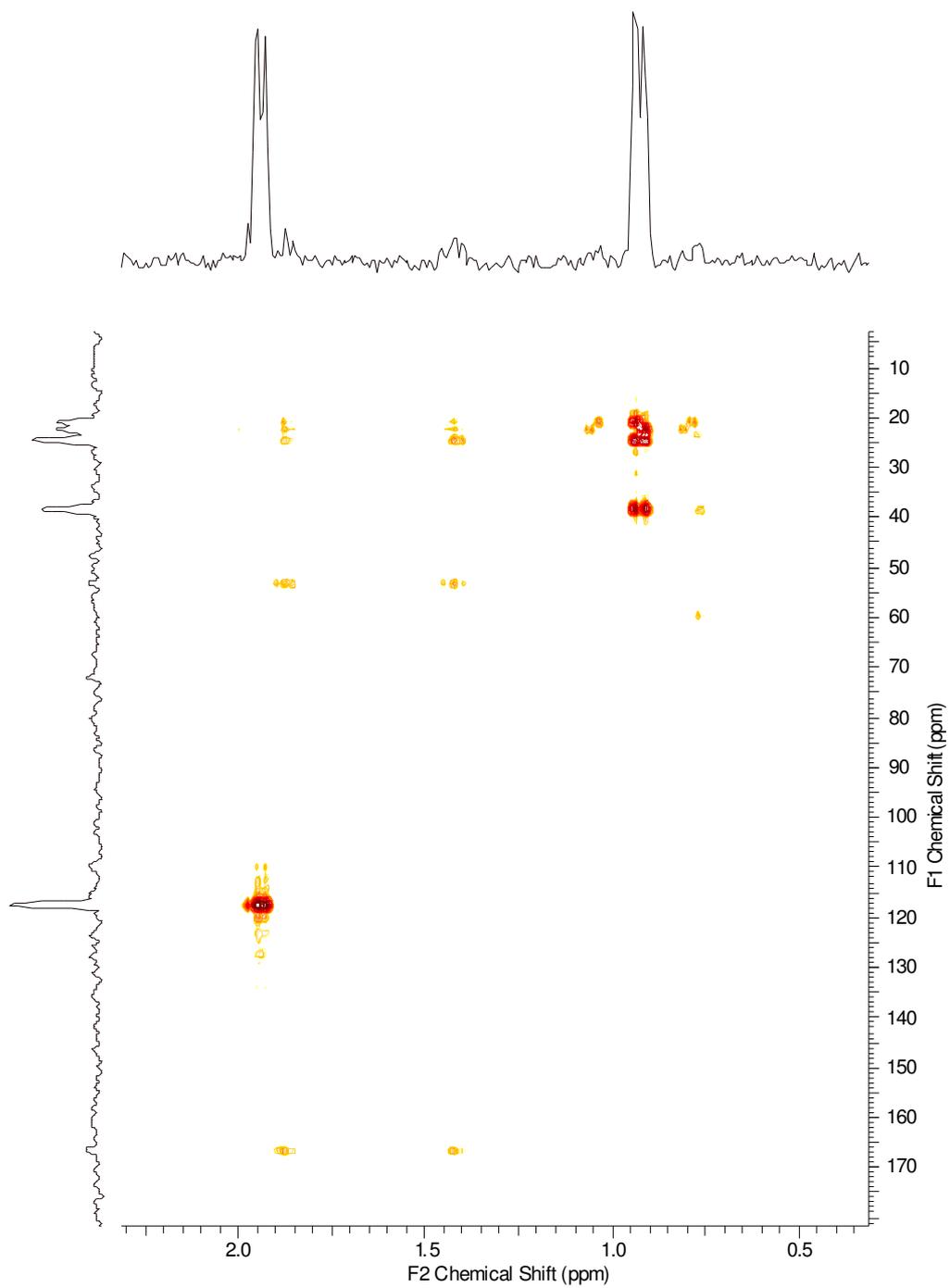


FIGURA 4.93: Mapa de correlação HMBC da substância *ciclo* (Pro-Leu) ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz).

#### 4.4.2. Determinação estrutural das substâncias *ciclo* (Leu-Leu) e o ácido *p*-hidroxi benzóico que produz o sinal cromatográfico t.r. 17,01 min.

A determinação estrutural do sinal cromatográfico em t.r. 17,01 foi baseada nos dados espectrais de RMN 1D ( $^1\text{H}$ ) e 2D (COSY, HMBC e HSQC).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.102, p. 120) foi observado à presença de dois dupletos, com constante de acoplamento 6,6 Hz, integrando para 12H, em  $\delta$  0,91 e  $\delta$  0,95, característicos de hidrogênios metílicos e um multipletto em  $\delta$  1,79, integrando para 2H, indicaram a presença de dois grupos isopropílicos. Este foi confirmado através das correlações entre os hidrogênios no espectro de COSY (FIGURA 4.94, A).

O mapa de contorno COSY (FIGURA 4.95, p. 114), mostrou o sinal do hidrogênio em  $\delta$  1,79 (*m*) se correlacionando com os sinais de duplo duplo dupletto em  $\delta$  1,56 (*ddd*, 14,2; 8,8 e 5,0 Hz) e  $\delta$  1,67 (*ddd*, 13,8; 8,8; 5,0) (FIGURA 4.94, A), e estes no mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.95, p. 114) correlacionam com o sinais do carbono em  $\delta$  43,7 e  $\delta$  43,9 (FIGURA 4.94, B). Assim, de acordo com a integral no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , juntamente com HSQC, sugeririam duas unidades isobutílica, caracterizado também pela presença dos sinais de carbono em  $\delta$  43,7 e 43,9. A análise do mapa de contorno HSQC permitiu atribuir os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono (FIGURA 4.94, C).

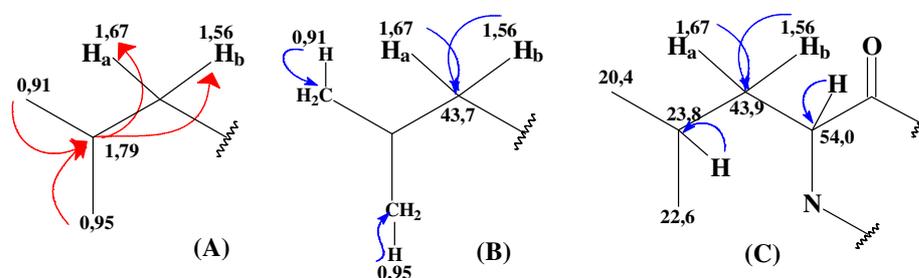


FIGURA 4.94: Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (A) e  $^1\text{J}_{\text{H-C}}$  HSQC (B) e (C).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  foi observado um multipeto  $\delta$  3,83, integrando para 2H, característico de hidrogênio  $\alpha$ -carboxílico e através da correlação em HSQC (FIGURA 4.95) permitiu atribuir o respectivo átomo de carbono em  $\delta$  54,0. Ao analisar o espectro HMBC (FIGURA 4.96, p. 115) foram observados as correlações ( $^3J_{\text{C-H}}$ ) dos sinais dos hidrogênios  $\delta$  1,56 (*ddd*, 14,2; 8,8 e 5,0 Hz) e  $\delta$  1,67 (*ddd*, 13,8; 8,8; 5,0) com o sinal do carbono em 168,2.

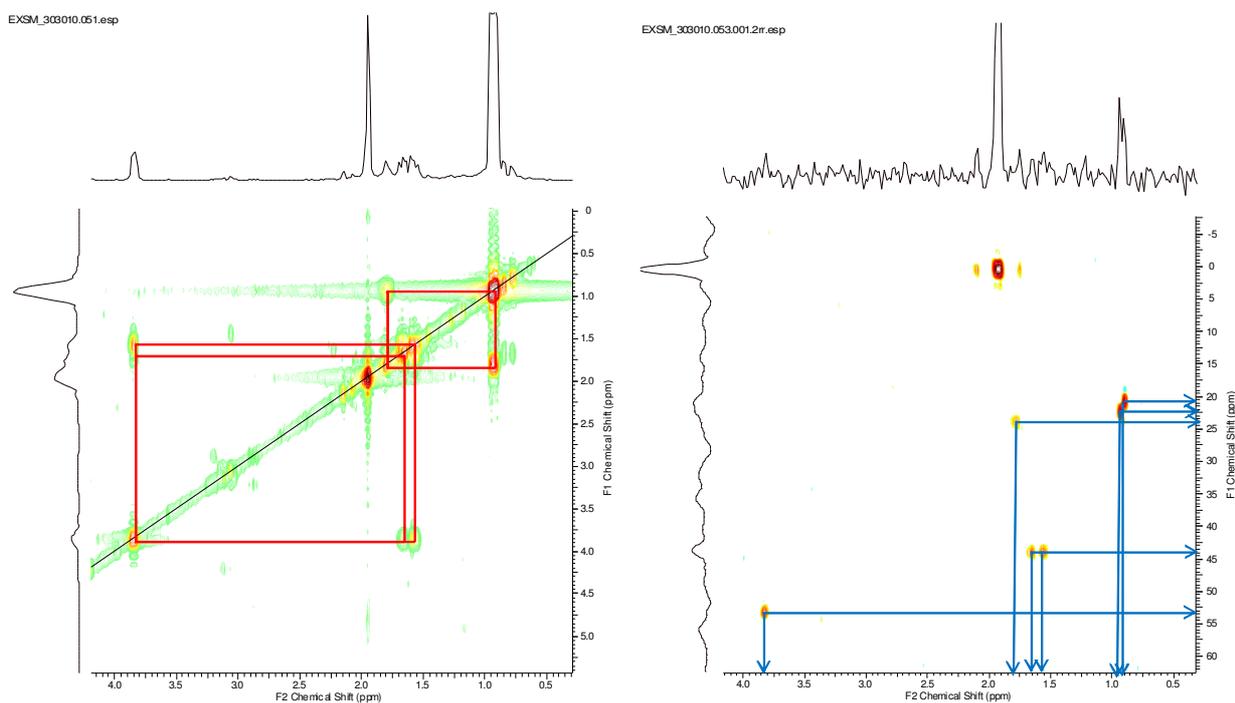


FIGURA 4.95: Ampliações do mapa de correlação COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz), e HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz) do sinal cromatográfico t.r. 17,01, respectivamente.

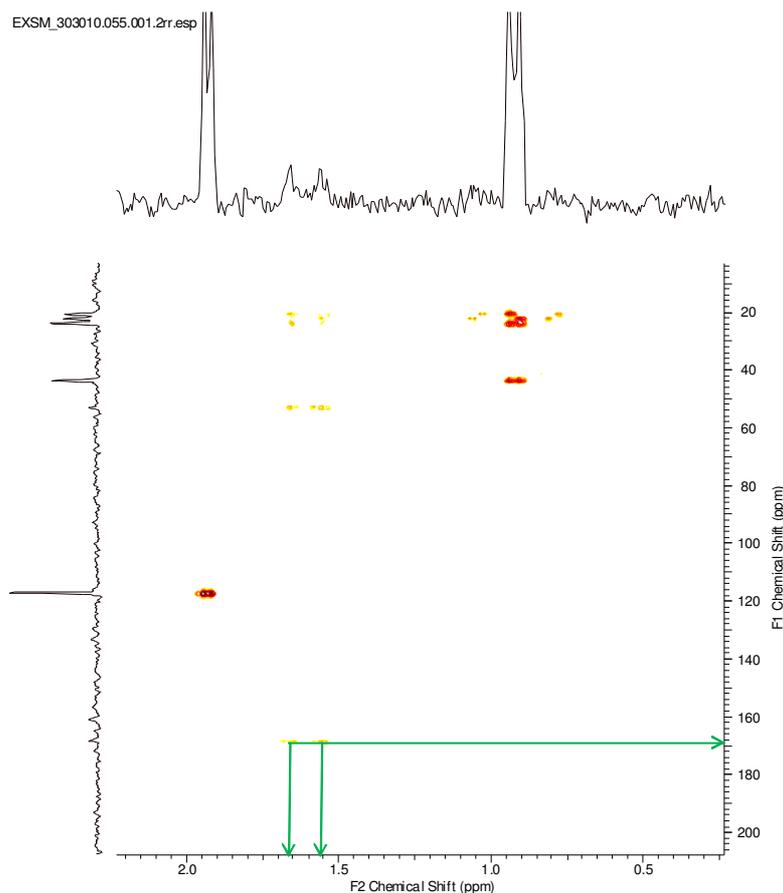


FIGURA 4.96: Mapa de correlação HMBC do sinal cromatográfico t.r. 17,01 (CD<sub>3</sub>CN, 125 MHz).

Desta forma, com os sinais observados até o momento, os espectros de RMN <sup>1</sup>H, COSY, HMBC e HSQC indicaram a formação de um sistema dicetopiperazínico com duas unidades de resíduo do aminoácido leucina. Comparadamente aos dados espectrais da literatura (TABELA 4.4, p. 116) [HUANG *et al.*, 2007] permitiu a identificação da substância *ciclo* (Leu-Leu) (FIGURA 4.97).

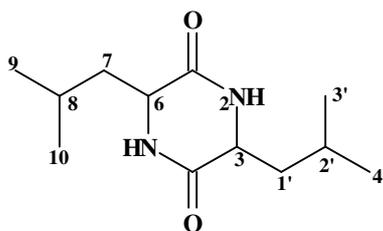


FIGURA 4.97: Estrutura da dicetopiperazina *ciclo* (Leu-Leu).

TABELA 4.4: Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) da *ciclo* (Leu-Leu) comparados com dados da literatura [HUANG *et al.*, 2007,  $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz].

N	$\delta_{\text{H}}$ (multip. $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (lit)	$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY	HSQC	$\delta_{\text{C}}$ (lit)
1	-	-	-	168,2*	167,3
2	6,46 <i>sl</i>	6,14 <i>sl</i>	-		
3	3,83 ( <i>m</i> )	3,96 ( <i>dd</i> , 9,5 e 4,5 Hz)	1'	54,0	53,2
4	-	-	-	168,2*	167,3
5	6,46 <i>sl</i>	6,14 <i>sl</i>	-	-	-
6	3,83 ( <i>m</i> )	3,96 ( <i>dd</i> , 9,5 e 4,5 Hz)	7	54,0	53,2
7	1,56 ( <i>ddd</i> , 14,2; 8,8 e 5,0 Hz) 1,67 ( <i>ddd</i> , 13,8; 8,8; 5,0 Hz)	1,80 ( <i>m</i> ) 1,59 ( <i>m</i> )	6, 8	43,7	43,7
8	1,79 ( <i>m</i> )	1,97 ( <i>m</i> )	7, 9, 10	23,8	24,3
9	0,91 ( <i>d</i> , 6,6 Hz)	0,97 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)	8	20,4	21,0
10	0,95 ( <i>d</i> , 6,6 Hz)	1,00 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)	8	22,6	23,3
1'	1,56 ( <i>ddd</i> , 14,2; 8,8 e 5,0 Hz) 1,67 ( <i>ddd</i> , 13,8; 8,8; 5,0 Hz)	1,80 ( <i>m</i> ) 1,59 ( <i>m</i> )	2', 3	43,9	43,7
2'	1,79 ( <i>m</i> )	1,97 ( <i>m</i> )	1', 3', 4'	23,8	24,3
3'	0,91 ( <i>d</i> , 6,6 Hz)	0,97 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)	2'	20,4	21,0
4'	0,95 ( <i>d</i> , 6,6 Hz)	1,00 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)	2'	22,6	23,3

\*Valores de carbono foram obtidos através da projeção do HMBC

Também no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.98, p. 117) observou-se a presença de dois dubletos, com constante de acoplamento 8,8 Hz e 9,1 Hz, um centrado em  $\delta$  7,73 (2H) e o outro em  $\delta$  6,91 (2H), indicando um sistema de anel aromático *para*-dissubstituído. No espectro de HSQC (FIGURA 4.98, p. 117) foram observadas as correlações dos hidrogênios em 7,73 (*d*, 8,8 Hz, 2H) e 6,91 (*d*, 9,1 Hz, 2H) com os carbonos em  $\delta$  129,3 e  $\delta$  115,5, respectivamente (FIGURA 4.99, B, p. 117). Corroborando a indicação de um anel *p*-dissubstituído foram observados no COSY (FIGURA 4.100, p. 118) as correlações entre os hidrogênios  $\delta$  7,73 (*d*, 8,8 Hz) e  $\delta$  6,91 (*d*, 9,1 Hz) (FIGURA 4.99, A, p. 117).

O mapa de contorno HMBC (FIGURA 4.100, p. 118), mostrou o sinal do hidrogênio  $\delta$  6,91 se correlacionando com os sinais do carbono em  $\delta$  161,0 e  $\delta$  133,2; e o sinal do hidrogênio  $\delta$  7,73 com os sinais do carbono em  $\delta$  161,0 e  $\delta$

129,3 (FIGURA 4.99, C), estes, característicos de compostos fenólicos ou carboxílicos.

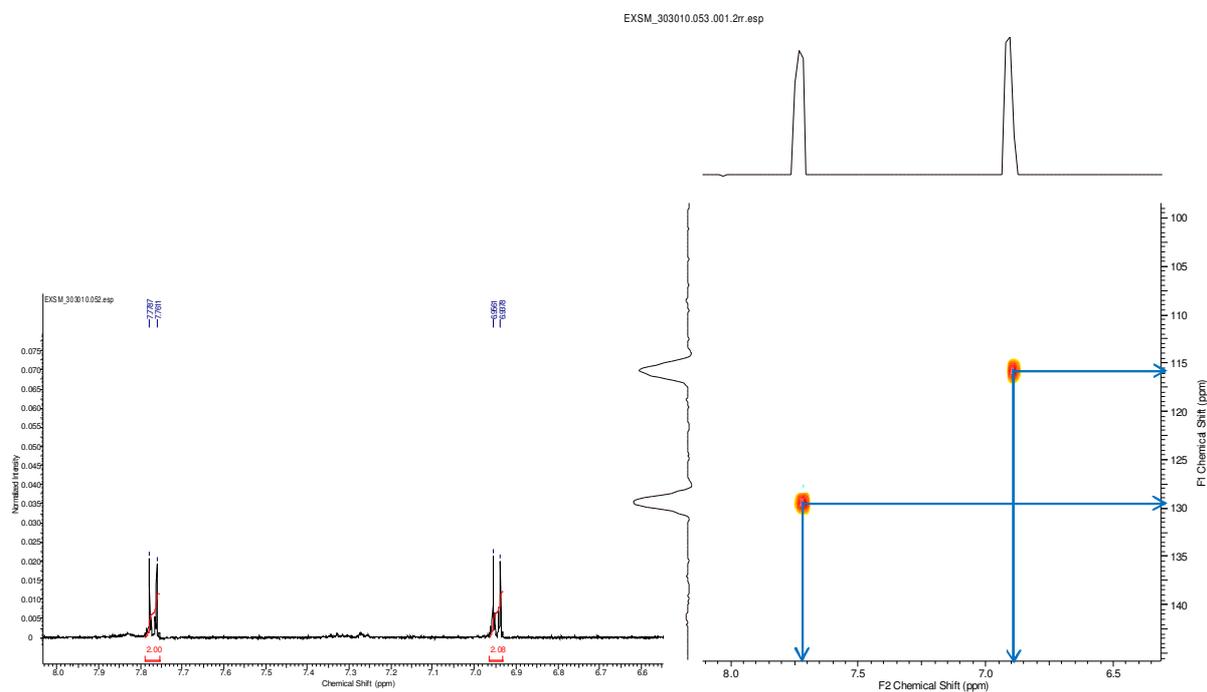


FIGURA 4.98: Ampliações do espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e mapa de correlação HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz), respectivamente

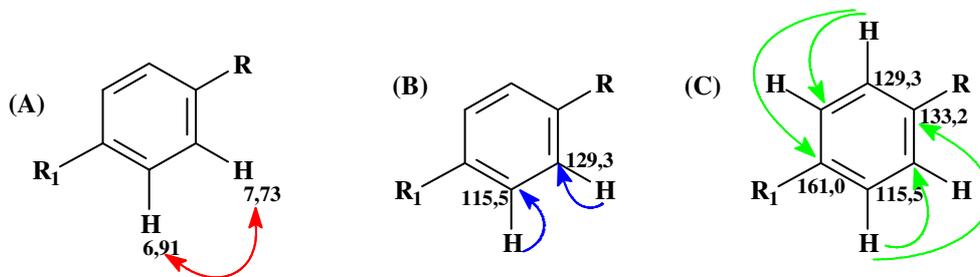


FIGURA 4.99: Correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (A) e  $^1\text{J}_{\text{H-C}}$  HSQC (B) e  $^2\text{J}_{\text{H-C}}$  HMBC (C)

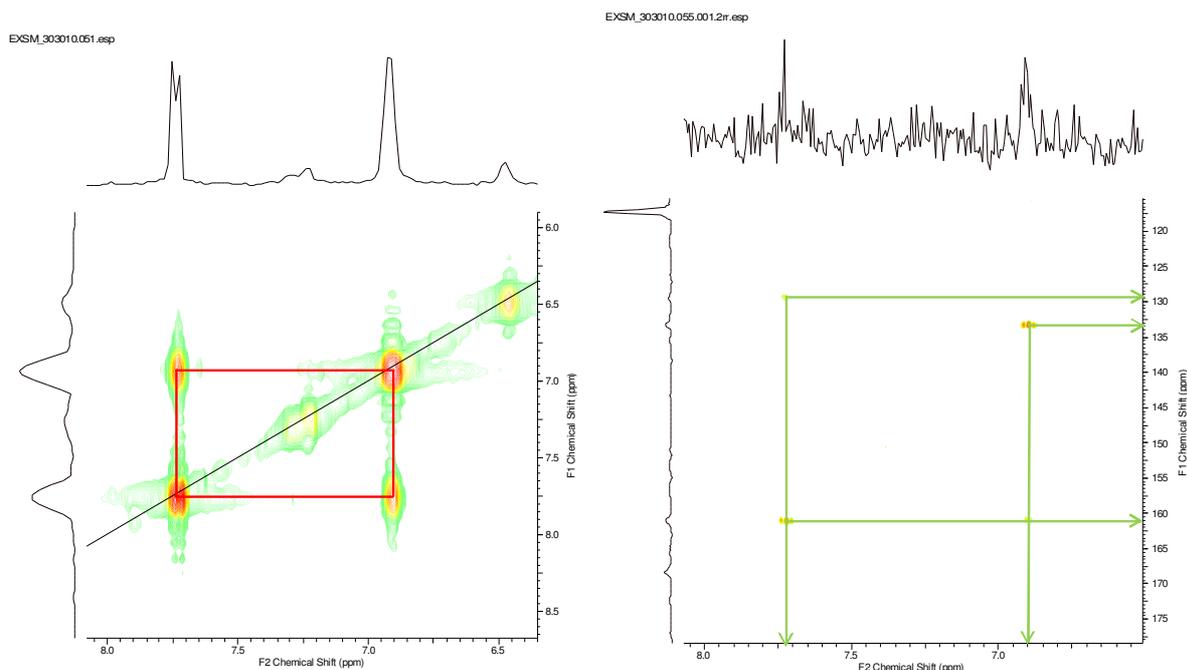


FIGURA 4.100: Ampliações dos mapas COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) e HMBC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz), respectivamente

Finalmente, através dos dados espectrais RMN  $^1\text{H}$ , COSY, HMBC e HSQC, e comparadamente aos dados espectrais da literatura (TABELA 4.5, p. 119) [SCOTT, 1972] sugere a presença do ácido *p*-hidroxibenzóico (FIGURA 4.101).

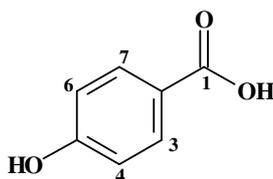


FIGURA 4.101: Estrutura do ácido *p*-hidroxi benzóico

Contudo, os valores de carbono obtidos nas projeções de HSQC e HMBC mostraram alguns desvios quando comparados com a literatura (TABELA 4.5, p. 119). Contudo, na análise por CG-EM dos voláteis produzidos pela *X. fastidiosa* sugeriu a presença de compostos arilas e alcoóis com cadeias laterais longas. Com isso, estes poderiam estar esterificando o ácido *p*-hidroxibenzóico. Contudo, devido à baixa concentração deste composto, o espectro de HSQC não forneceu correlações que permitissem concluir a determinação estrutural do derivado do ácido *p*-hidroxibenzóico.

TABELA 4.5: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) do *p*-hidroxibenzóico em comparação com os dados da literatura [SCOTT, 1972].

Número	$^1\text{H}$ (multip. $J=$ Hz)	$\delta_{\text{C}}$ HSQC e HMBC	$\delta_{\text{H}}$ (lit)	$\delta_{\text{C}}$ (lit)
1	-	n.o.	-	169,0
2	-	133,2*	-	121,9
3 e 7	6,91 ( <i>d</i> , 9,1 Hz, 2H)	129,3	6,70 ( <i>d</i> , 9,0 Hz)	132,7
4 e 6	7,73 ( <i>d</i> , 8,8 Hz, 2H)	115,5	7,80 ( <i>d</i> , 9,0 Hz)	115,8
5	-	161,0*	-	162,5

n.o.: não foi observado

\* Valores de carbono foram obtidos através da projeção do HMBC

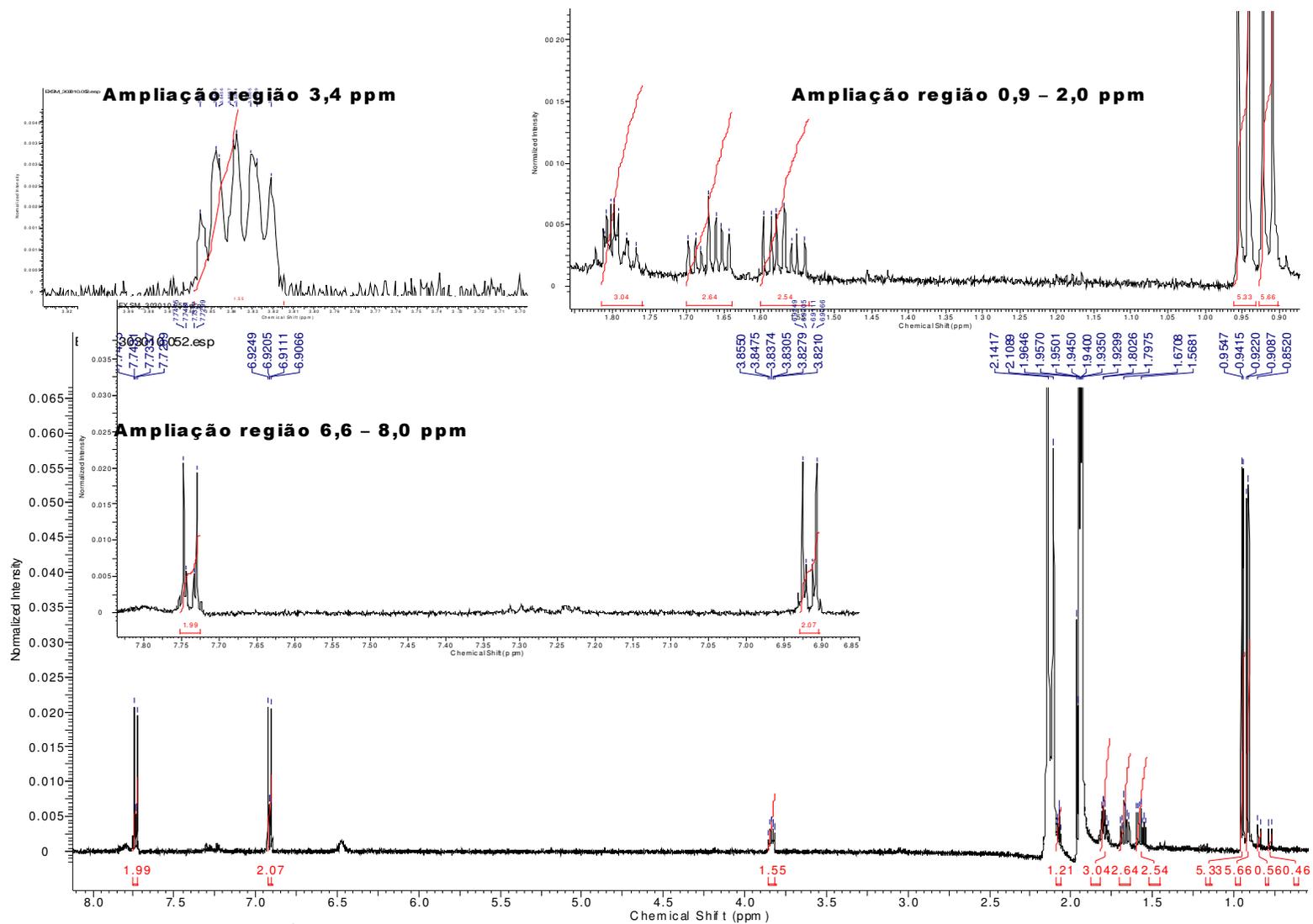


FIGURA 4.102: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz) da substância *ciclo* (Leu-Leu) e o derivado ácido *p*-hidroxibenzóico.

EXSM\_303010.051.esp

EXSM\_303010.053.001.2rr.esp

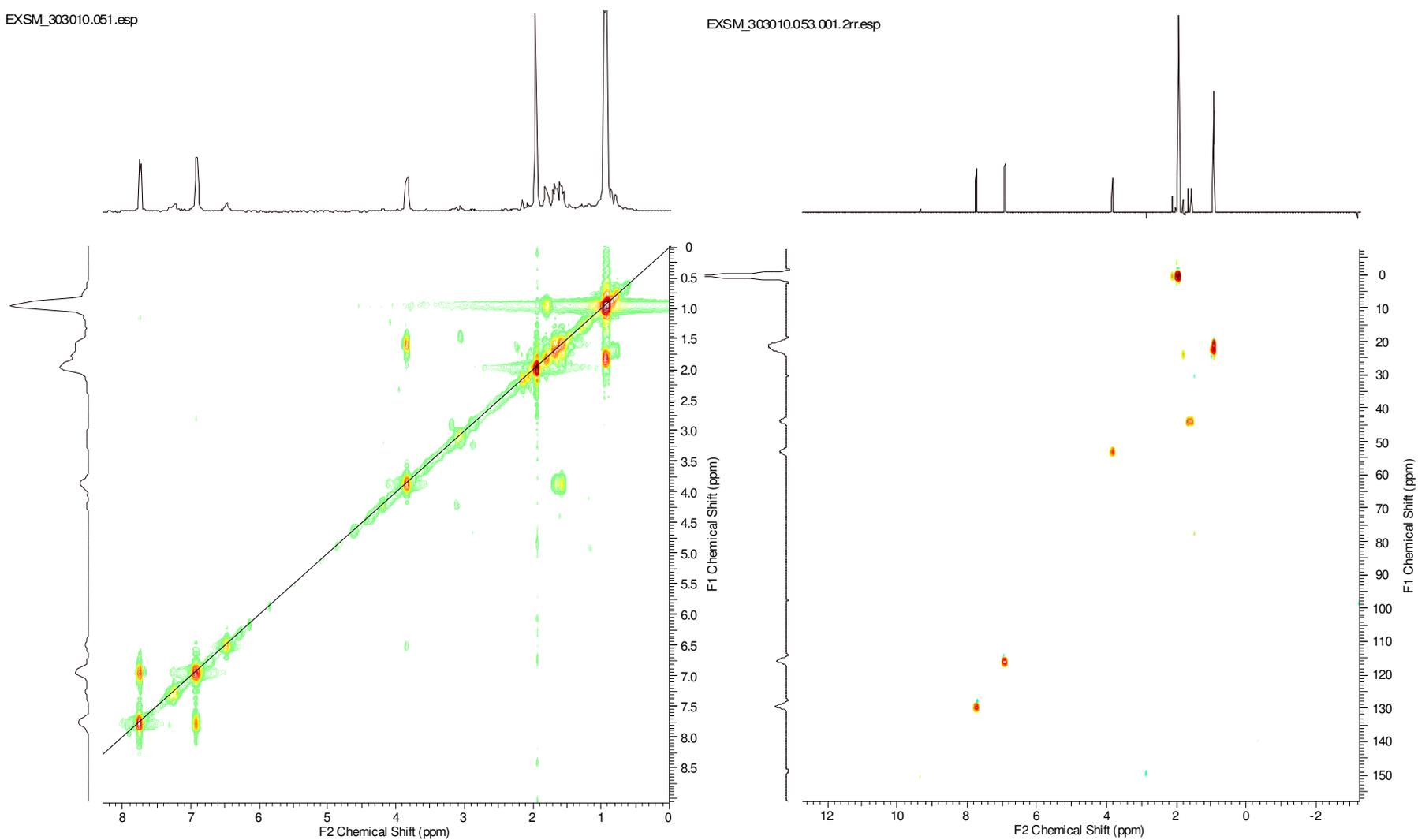


FIGURA 4.103: Mapa de contorno COSY (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz) e HSQC (CD<sub>3</sub>CN, 125 MHz) da Substância *ciclo* (Leu-Leu) e derivado ácido *p*-hidroxibenzóico

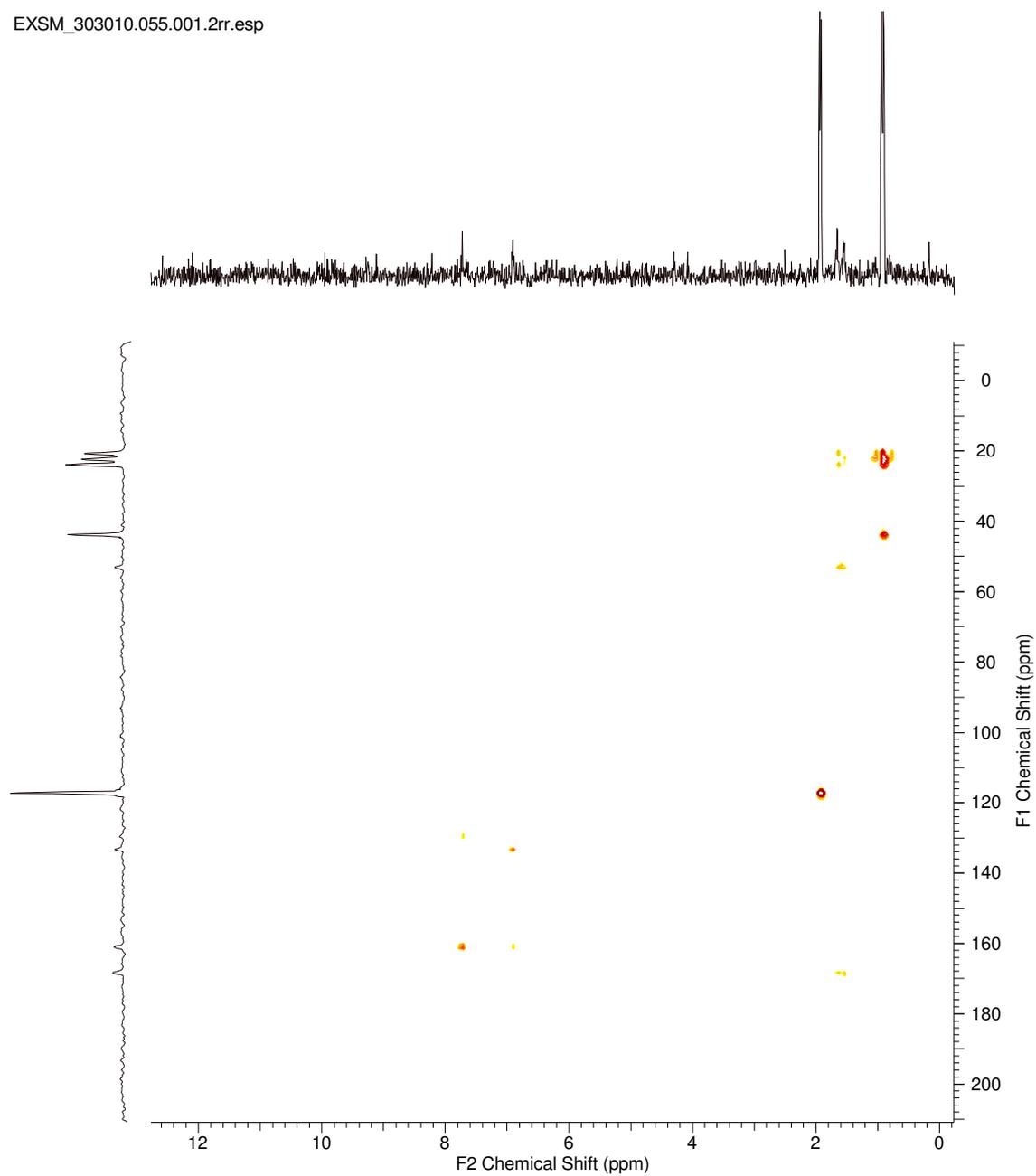


FIGURA 4.104: Mapa de contorno HMBC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 125 MHz) da Substância *ciclo* (Leu-Leu) e derivado ácido *p*-hidroxibenzoico

A baixa resolução cromatográfica levou a espectros de RMN de misturas em baixa concentração dos analítos, o que impossibilitou, em alguns casos, experimentos bidimensionais. Contudo, com a aquisição do LC-SPE-NMR do Grupo de Produtos Naturais da UFSCar através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Controle Biorracional de Insetos Pragas possibilitou um novo estudo do extrato acetato de etila sobrenadante da bactéria *Xylella fastidiosa*.

#### 4.5. Experimento 2: Estudo do Extrato Acetato de Etila do Sobrenadante da *Xylella fastidiosa* por LC-SPE-NMR.

O extrato acetato de etila do sobrenadante foi submetida à LC-SPE-NMR, na qual, neste arranjo as bandas cromatográficas destacadas na figura 4.105 foram “trapeadas” ou “aprisionadas” em cartuchos de SPE por cinco vezes e posteriormente realizados experimentos de ressonância magnética nuclear, possibilitando a identificação principalmente das dicetopiperazinas (FIGURA 4.106, p. 124).

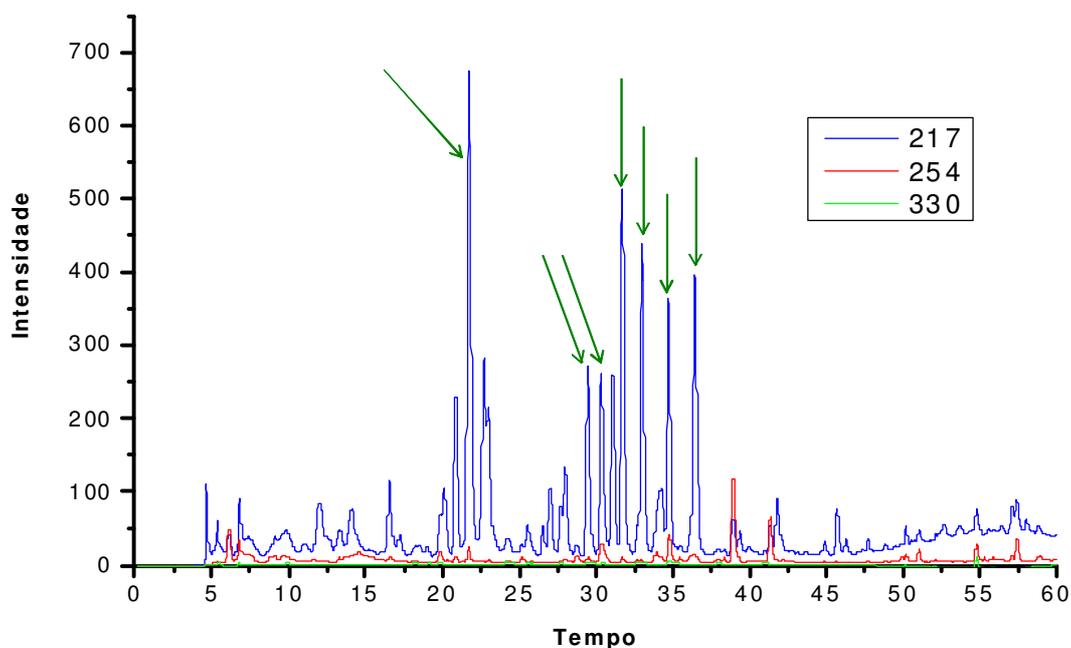


FIGURA 4.105: Cromatograma DAD-HPLC do extrato acetato de etila do sobrenadante da *Xylella fastidiosa*. Condições descritas **item 3.2.6**, página 37.

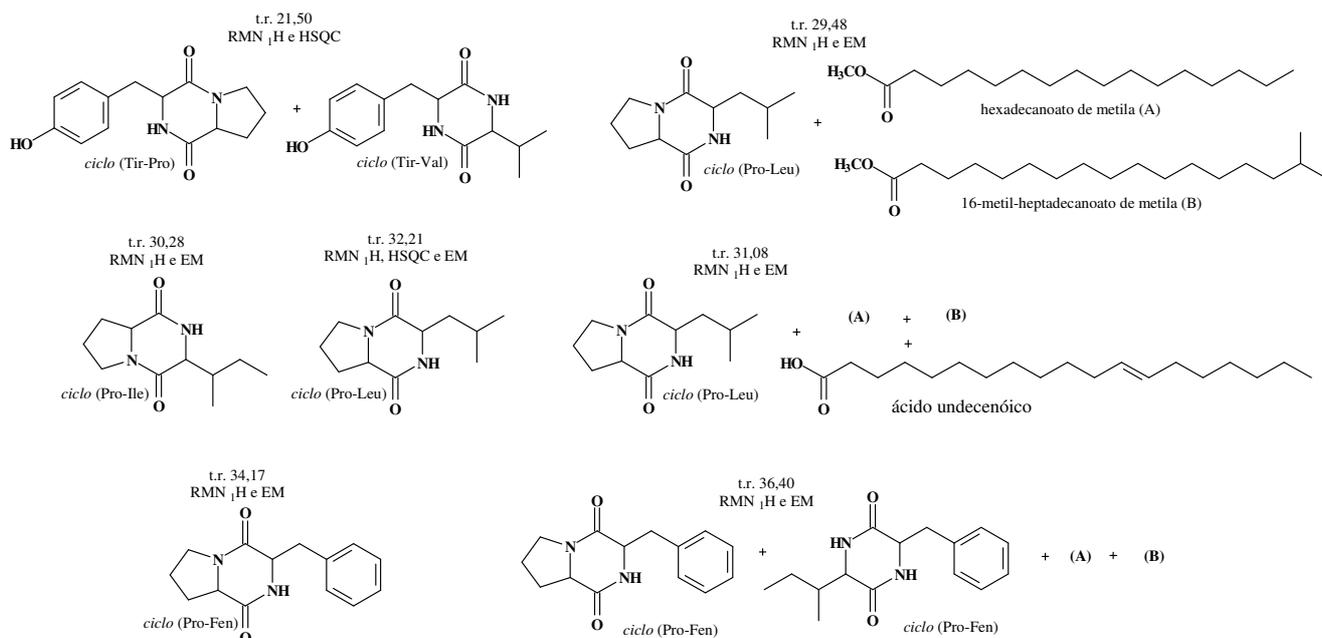


FIGURA 4.106: Substâncias identificadas no extrato acetato de etila do sobrenadante da bactéria *Xylella fastidiosa*.

#### 4.5.1. Determinação estrutural das substâncias *ciclo* (Tyr-Pro) e *ciclo* (Tyr-Val) que produz o sinal cromatográfico t.r. 21,50 min

A determinação estrutural do sinal cromatográfico t.r. 21,50 foi baseada nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.112, p. 129) e HSQC (FIGURA 4.114, p. 131). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou dois dupletos em  $\delta$  7,04 e  $\delta$  6,70, integrando para 4H, com constante de acoplamento 8,4 Hz e 8,6 Hz, respectivamente, estes sinais sugeriu um sistema de spins AA'XX'. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.112, p. 129) também foi observado dois hidrogênios, em  $\delta$  4,36 (*dt*,  $J$  5,0 e 2,1 Hz) e  $\delta$  4,05 (*ddd*,  $J$  10,9; 6,2 e 1,8 Hz), característicos de hidrogênios  $\alpha$ -carboxílicos. Estes no mapa de contorno HSQC se correlacionam aos carbonos em  $\delta$  57,2 e  $\delta$  60,1, o qual indicou um sistema de anel dicetopiperazínico. Desta forma, juntamente aos hidrogênios observados do sistema de anel aromático *para*-dissubstituído, os dados sugerem a presença de uma dicetopiperazina formada com o resíduo de aminoácido tirosina (FIGURA 4.107).

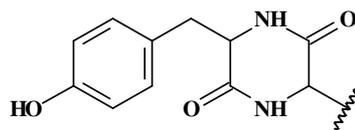


FIGURA 4.107: Estrutura parcial da dicetopiperazina formado com o aminoácido tirosina.

Considerando esta hipótese, os hidrogênios benzílicos mostrados na figura 4.108, A, são diastereotópicos, com multiplicidade esperada de dois duplos dubletos, o que de fato pode ser visualizado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  3,08 (*dd*,  $J= 5,5; 14,3$  Hz, 1H) e  $\delta$  3,02 (*dd*,  $J= 4,4; 14,3$  Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios benzílicos da unidade tirosina (FIGURA 4.108, B). Contudo, os sinais em  $\delta$  4,36 (*dt*,  $J 5,0$  e  $2,1$  Hz) e  $\delta$  4,05 (*ddd*,  $J 10,9; 6,2$  e  $1,8$  Hz) (FIGURA 4.108), característicos das dicetopiperazinas, foram atribuídas aos hidrogênios comparando com dados da literatura [STARK & HOHMANN, 2005].

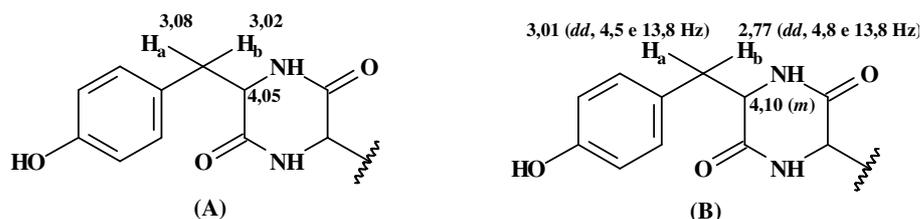


FIGURA 4.108: Deslocamentos químicos dos hidrogênios benzílicos (A) e da literatura (B).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.112, p. 129) também foi observado um sinal em  $\delta$  3,55, o qual sugeriu uma segunda molécula na banda cromatográfica com t.r. 21,50. O mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.114, p. 131) mostrou dois sinais de hidrogênios, em  $\delta$  3,55 e  $\delta$  3,42 se correlacionando com o carbono em  $\delta$  47,0. No entanto, é importante salientar, que o sinal em  $\delta$  3,42 no espectro de RMN  $^1\text{H}$  não foi observado, uma vez que, as múltiplas supressões de solventes realizadas nos experimentos de RMN devem ter suprimido o sinal do hidrogênio em  $\delta$  3,42. Neste estudo foi discutido que estes hidrogênios, em  $\delta$  3,55 (*m*) e 3,42 (*m*), são comuns a dicetopiperazinas formadas com resíduo de aminoácido Prolina. Desta forma, estes dados sugeriram a dicetopiperazina *ciclo* (Tyr-Pro).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.112, p. 129) mostrou também a presença de dois dupletos com constante de acoplamento 7,0 e 6,9 Hz, em  $\delta$  0,98 e 1,02, respectivamente, e um multiplete em  $\delta$  1,89, caracterizando grupo isopropílico. Deste modo, os aminoácidos que se apresenta com grupo isopropilico são os resíduos de aminoácidos valina e leucina. De acordo com a intensidade dos sinais dos hidrogênios característicos do resíduo tirosina, sugere-se a formação de outra dicetopiperazina podendo ser a *ciclo* (Tyr-Leu) ou *ciclo* (Tyr-Val). Sendo assim, os dados indicam a formação de dicetopiperazinas com resíduos de aminoácidos tirosina-leucina (A), tirosina-prolina (B) e tirosina-valina (C) (FIGURA 4.109).

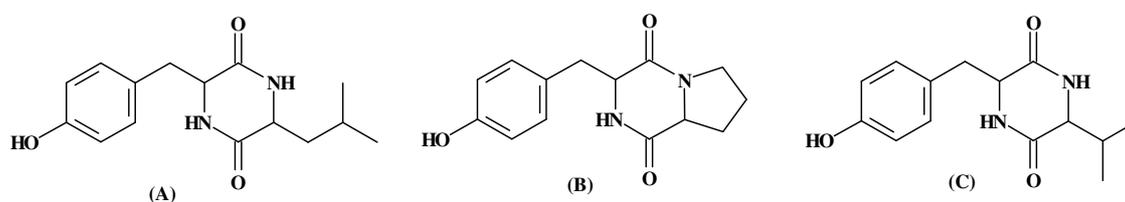


FIGURA 4.109: Possíveis estruturas formadas na condensação com resíduos de aminoácidos tirosina, prolina e leucina.

Com isso, baseando-se nos dados discutidos e em comparação com dados da literatura [DEGRASSI *et al.*, 2002] foi proposta a estrutura da dicetopiperazina *ciclo* (Tyr-Pro) (FIGURA 4.110).

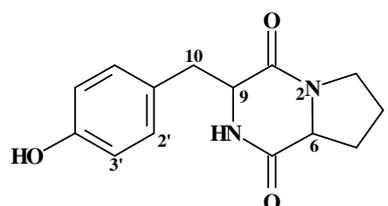


FIGURA 4.110: Estrutura da dicetopiperazina *ciclo* (Tyr-Pro)

O mapa de contorno HSQC mostrou as correlações dos hidrogênios do grupo isopropilico com seus respectivos carbonos, como mostrados na figura 4.111, A. No espectro de hidrogênio não foi observado os hidrogênios metilênicos diastereotopicos do resíduo de aminoácido leucina, com isso, os

dados mostrados sugerem a estrutura da dicetopiperazina *ciclo* (Tyr-Val) (FIGURA 4.111, B).

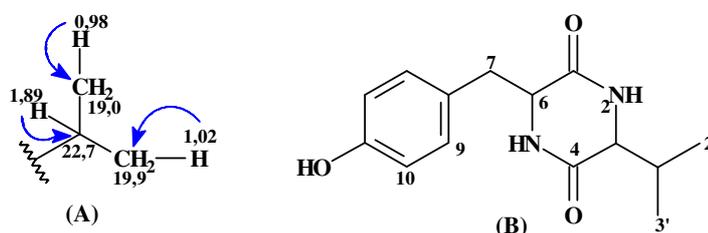


FIGURA 4.111: Estrutura da dicetopiperazina *ciclo* (Tyr-Val).

TABELA 4.6: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) em comparação com os dados da literatura [DEGRASSI *et al.*, 2002] ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

No.	$\delta_{\text{H}}$ (multip. $J = \text{Hz}$ ) <i>ciclo</i> (Pro-Tyr)	$\delta_{\text{H}}$ [ $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz] <i>ciclo</i> (Pro-Tyr)	$\delta_{\text{C}}$ HSQC	$\delta_{\text{C}}$ (Lit)**
1	-	-	-	165,0
2	-	-	-	-
3	3,55-3,42 ( <i>m</i> )	3,50-3,75 ( <i>m</i> )	47,0	44,5
4	1,80 ( <i>m</i> )	1,8-2,15 ( <i>m</i> )	*	21,8
5	2,09 ( <i>m</i> ) 2,14 ( <i>t</i> , 6,2 Hz)	2,16 ( <i>m</i> ) 2,35 ( <i>m</i> )	*	27,8
6	4,36 ( <i>dt</i> , 5,0; 2,1 Hz)	4,09 ( <i>dt</i> , 1,0 e 8,5 Hz)	57,1	58,3
7	-	-	-	168,8
8	4,57 ( <i>sl</i> )	5,62 ( <i>sl</i> )	-	-
9	4,05 ( <i>ddd</i> , 10,9; 6,2 e 1,8 Hz)	4,22 ( <i>m</i> , 10,6; 3,7 e 1,0 Hz)	60,1	56,0
10	3,08 ( <i>dd</i> , 5,5 e 14,3 Hz, 1H) 3,02 ( <i>dd</i> , 4,4 e 14,3 Hz, 1H)	2,75 ( <i>dd</i> , 10,6 e 14,8 Hz); 3,60 ( <i>dd</i> , 14,6 e 3,7 Hz)	49,3	34,7
1'	-	-	-	127,0
2' e 6'	7,04 ( <i>d</i> , 8,4 Hz)	7,10 ( <i>d</i> , 8,5 Hz)	131,9	130,7
3' e 5'	6,70 ( <i>d</i> , 8,6 Hz)	6,82 ( <i>d</i> , 8,5 Hz)	116,0	114,7
4'-OH	4,57 ( <i>sl</i> )	5,15 ( <i>sl</i> )	-	155,8

\*não observado na projeção HSQC, \*\*[LEPTOKARYDIS, 2008]

TABELA 4.7: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) em comparação com os dados da literatura [STARK & HOFMANN, 2005] (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ).

No.	$\delta_{\text{H}}$ (multip. $J=$ Hz) ciclo (Tyr-Val)	$\delta_{\text{H}}$ [ $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz] ciclo (Tyr-Val)	$\delta_{\text{C}}$ HSQC	$\delta_{\text{C}}$ (Lit)
1	-	-	-	166,6
2	4,57 ( <i>sl</i> )	7,95 ( <i>sl</i> )	-	
3	3,50 ( <i>m</i> )	3,51 ( <i>m</i> )	*	55,5
4	-	-	-	166,6
5	4,57 ( <i>sl</i> )	7,85 ( <i>sl</i> )	-	
6	4,05 ( <i>ddd</i> , 10,9; 6,2 e 1,8 Hz)	4,10 ( <i>m</i> )	60,1	59,4
7	3,08 ( <i>dd</i> , 5,5 e 14,3 Hz) 3,02 ( <i>dd</i> , 4,4 e 14,3 Hz)	2,77 ( <i>dd</i> , 4,8 e 13,8 Hz) 3,01 ( <i>dd</i> , 4,5 e 13,8 Hz)	49,3	45,5
8	-	-		126,5
9 e 13	7,04 ( <i>d</i> , 8,4 Hz)	6,96 ( <i>d</i> , 8,4 Hz)	131,9	131,3
10 e 12	6,70 ( <i>d</i> , 8,6 Hz)	6,62 ( <i>d</i> , 8,4 Hz)	116,0	114,9
11-OH	4,57 ( <i>sl</i> )	9,10 ( <i>s</i> )	-	156,3
1'	1,89 ( <i>m</i> )	1,74 ( <i>m</i> )	22,7	21,3
2'	1,02 ( <i>d</i> , 6,9 Hz)	0,69 ( <i>d</i> , 7,0 Hz)	19,9	18,5
3'	0,98 ( <i>d</i> , 7,0 Hz)	0,37 ( <i>d</i> , 7,0 Hz)	19,0	16,5

\*não observado no HSQC

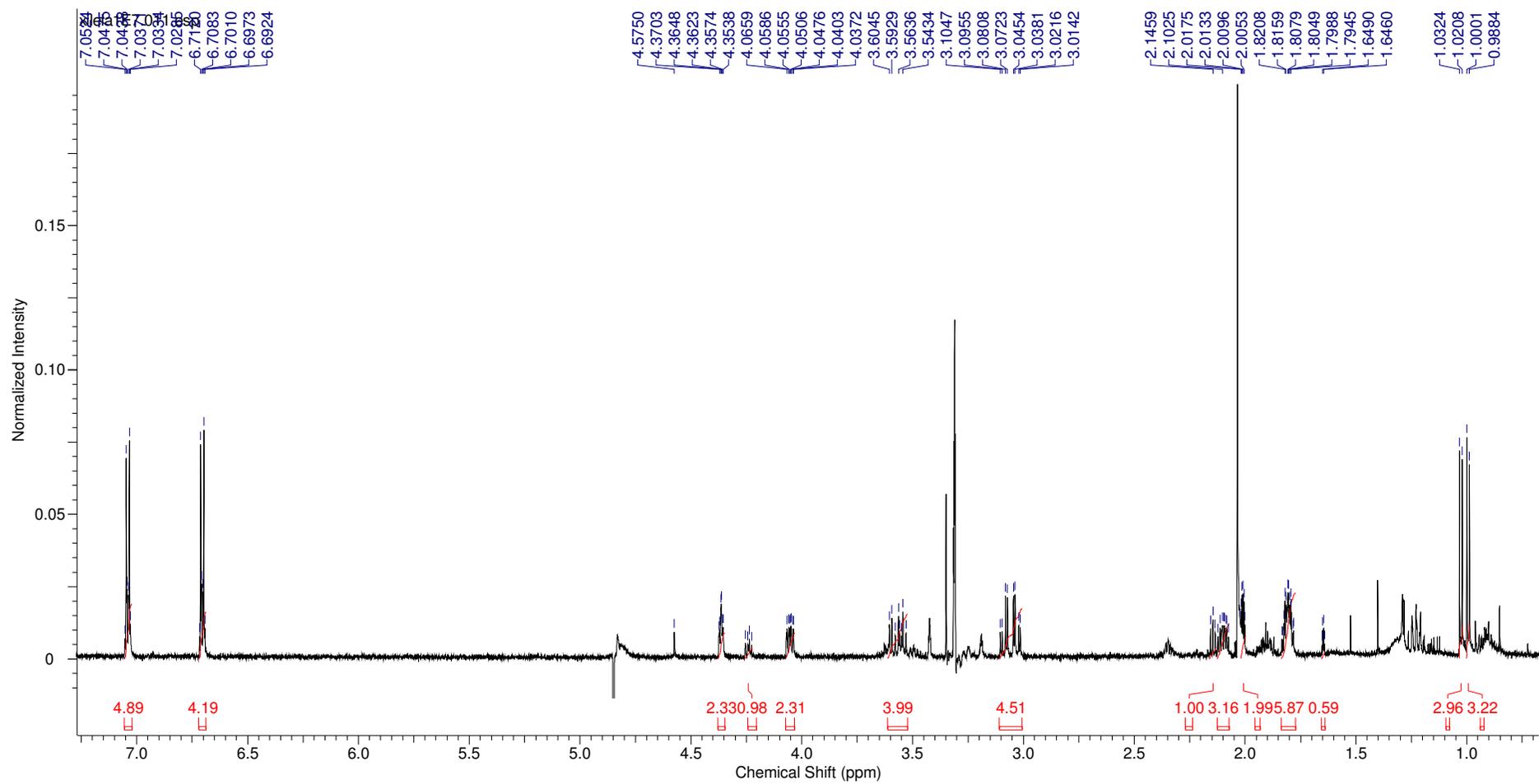


FIGURA 4.112: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 21,50.

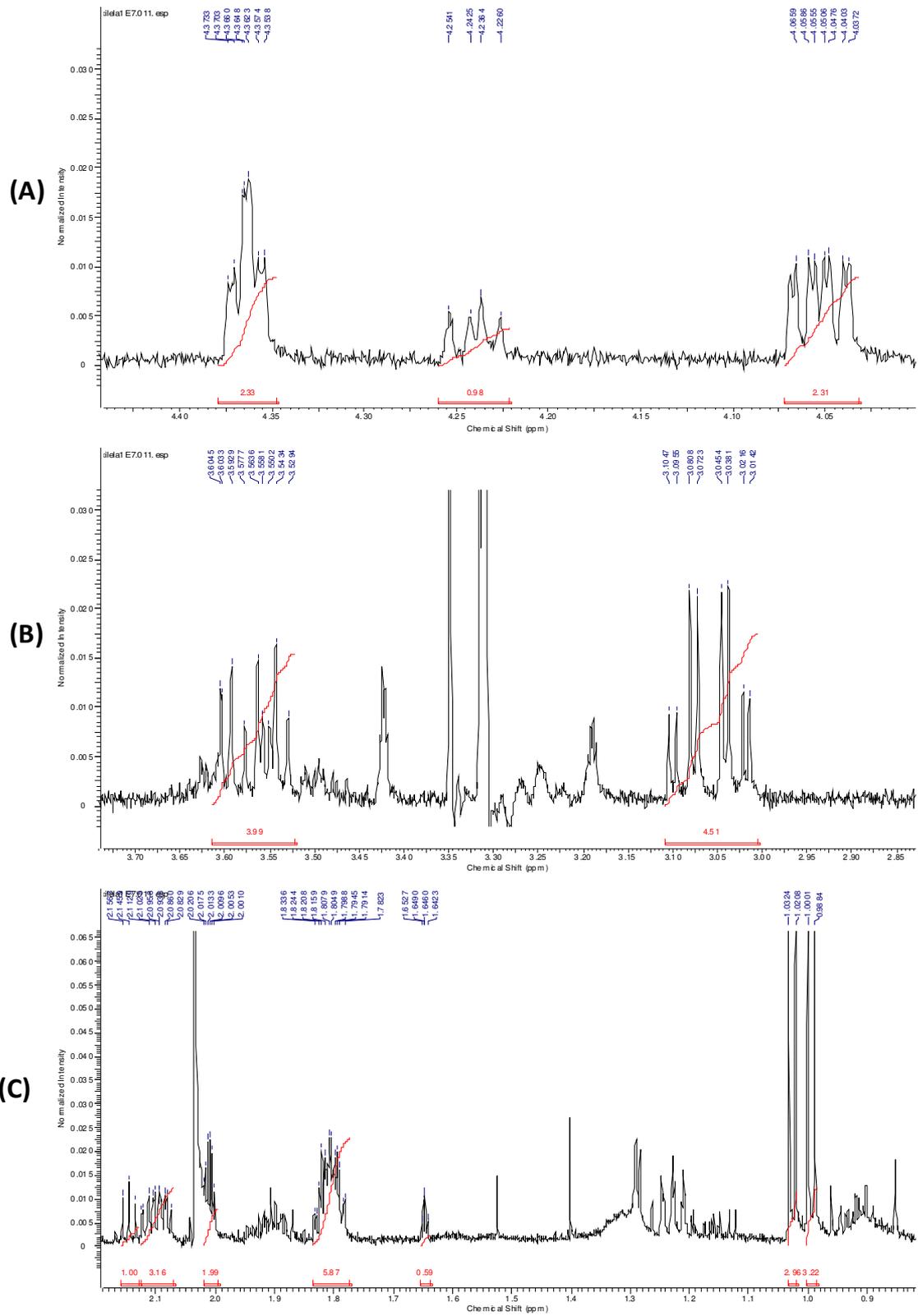


FIGURA 4.113: Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 21,50.

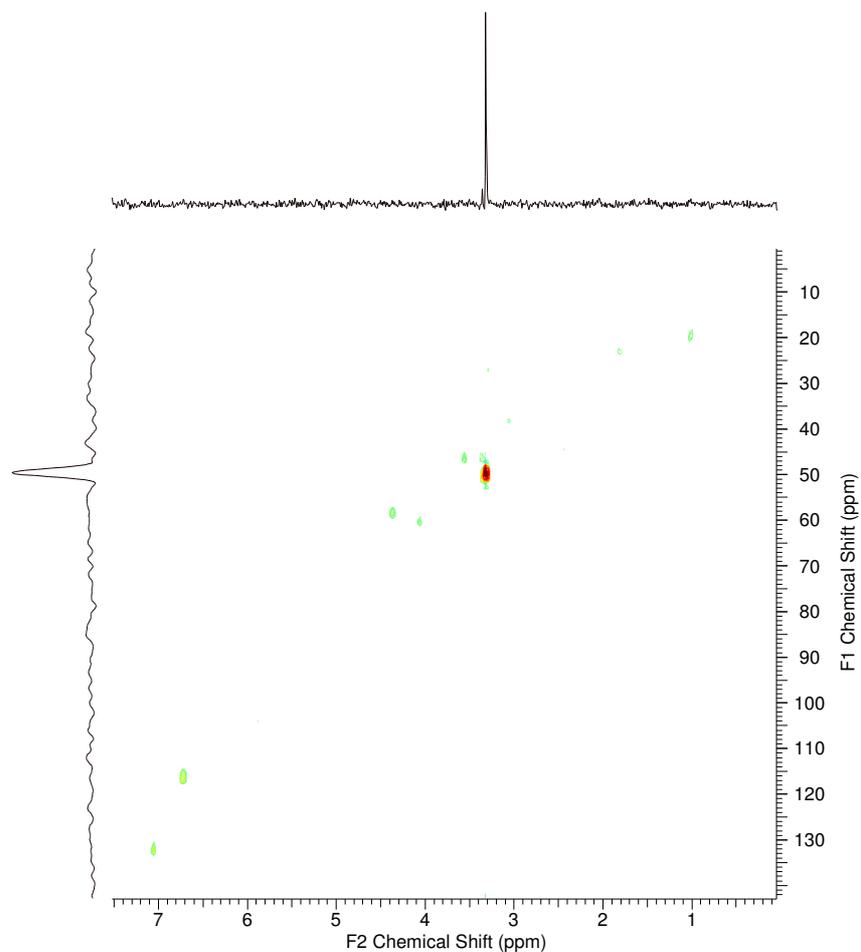


FIGURA 4.114: Mapa de contorno HSQC ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 150 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 21,50.

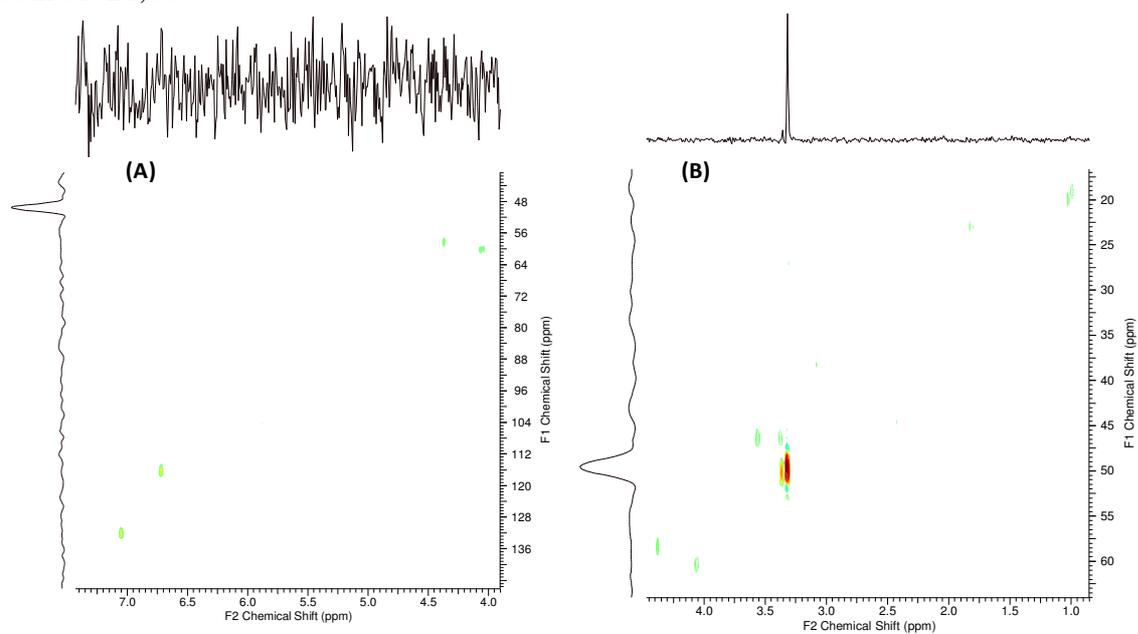


FIGURA 4.115: Ampliações do espectro de contorno HSQC ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 150 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 21,50.

#### 4.5.2. Determinação estrutural da substância *ciclo* (Pro-Leu) que produz o sinal cromatográfico t.r. 29,48 min

A determinação estrutural do sinal cromatográfico com t.r. 29,40 foi baseada nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e espectrometria de massas. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  desta banda mostrou sinais característicos de dicetopiperazinas, entretanto, observando as intensidades e integrais dos sinais de hidrogênios, sugeriu a existência de mais de um componente na banda cromatográfica.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.120, p. 136) mostrou dois sinais típicos a DKPs, um multipletto em  $\delta$  4,19, e um triplete largo em  $\delta$  4,07. Também foi observado sinais em  $\delta$  3,50 (*m*) e 3,54 (*m*), característicos a hidrogênios ligados a carbono contendo heteroátomo. Continuando a análise, através de RMN  $^1\text{H}$  foram observados vários multipletos na região do espectro de  $\delta$  0,90 a  $\delta$  2,50, os quais dificultaram a interpretação, pois esta região apresentou bastantes sinais interferentes provindos do cartucho SPE (FIGURA 4.121, p. 137). Desta forma, para auxiliar a interpretação realizou-se espectrometria de massas com impacto eletrônico (FIGURA 4.116).

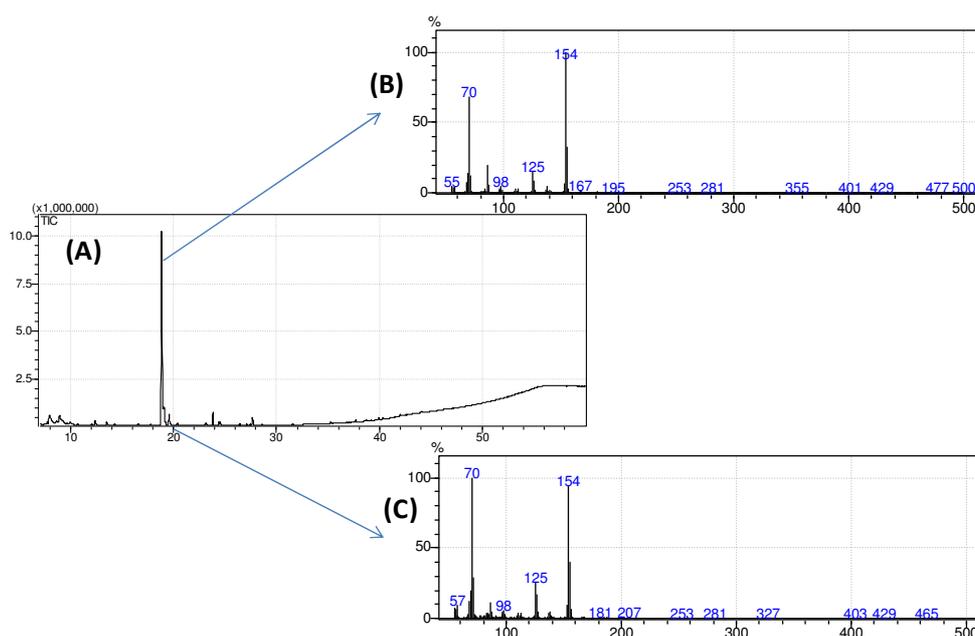


FIGURA 4.116: Cromatograma de íons totais (A) e espectros de massas (B) e (C).

Os espectros de massas (B) e (C) (FIGURA 4.116, p. 132) mostraram íons fragmentos característicos de dicetopiperazinas (**discutidos na seção 4.1.1**), na qual, destacou-se o composto majoritário com t.r. 18,85 e uma minoritária em t.r. 19,55 (FIGURA 4.116, A, p. 132). Ambos os espectros de massas apresentaram-se similares, indicando uma possível epimerização ou se originar do aminoácido da série D e o outro da série L. De acordo, com os fragmentos observados, sugeriu-se a *ciclo* (Pro-Leu), no entanto, notou-se que a banda em t.r. 18,85, mostrou os íons  $m/z$  167 e 195, enquanto que, em t.r. 19,55, mostrou os íons  $m/z$  181 e 207. Desta forma, a confirmação da DKPs *ciclo* (Pro-Leu) deu-se em comparação com o espectro de massas da amostra padrão *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 4.117).

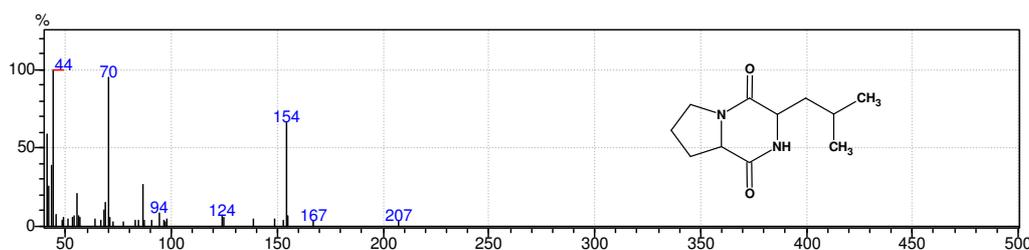


FIGURA 4.117: Espectro de massas da amostra padrão *ciclo* (Pro-Leu).

Com isso, retornou-se a determinação estrutural via RMN  $^1\text{H}$ , na qual, este apresentou multipletos ( $\delta$  3,50-3,54;  $\delta$  2,16 e 2,32;  $\delta$  1,93 e 2,02) (FIGURA 4.120, p. 136) referentes aos hidrogênios metilênicos, característicos do resíduo de aminoácido Prolina [FDHILA et al., 2003]. Também, foram observados dois dupletos, em 1,16 e 1,17, com constante de acoplamento 6,9 Hz, característicos a hidrogênios metílicos e um mutipletto em  $\delta$  1,93, indicaram a presença do grupo isopropila. Além disso, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou um duplo duplo dupletto em  $\delta$  1,44 (*ddd*, 12,1; 7,6 e 4,3 Hz) e um mutipletto em  $\delta$  1,32, característicos de hidrogênios metilênicos do resíduo de aminoácido leucina.

Finalmente, baseando-se nos dados discutidos e em comparação com dados da literatura (TABELA 4.8, p. 135) [FURTADO et al., 2005; LI et al., 2009] foi identificada a dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 4.118).

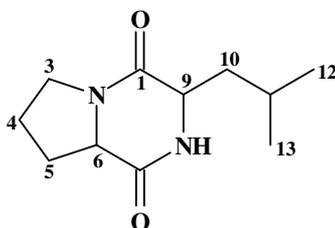


FIGURA 4.118: Estrutura química da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu).

Além disso, através da CG-EM (FIGURA 4.116, p. 132), também foram identificados os ésteres metílicos (A) (hexadecanoato de metila) e (B) (16-metilheptadecanoato de metila), com  $m/z$  270 e  $m/z$  298 (FIGURA 4.119), respectivamente.

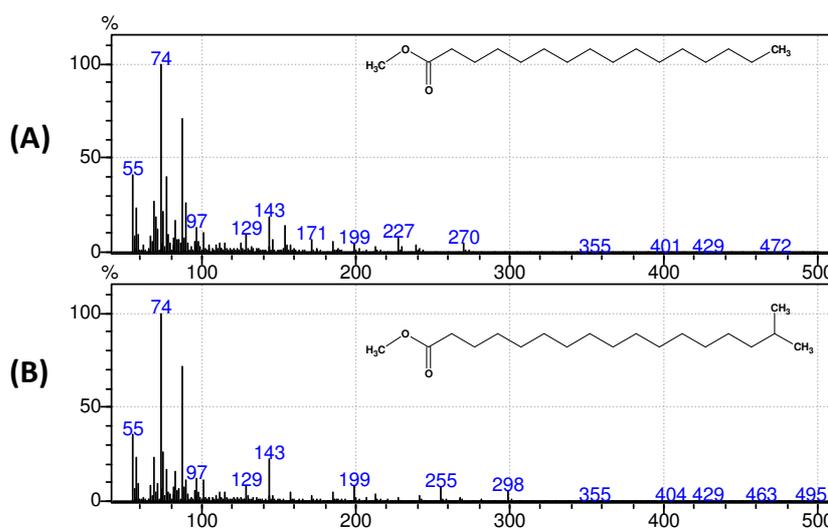


FIGURA 4.119: Espectros de massas dos ésteres metílicos (A) e (B).

TABELA 4.8: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) em comparação com os dados da literatura.

	$^1\text{H}$ (multip. $J=$ Hz) ciclo (Pro-Leu)	FURTADO, <i>et al.</i> , 2005 $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz	LI, <i>et al.</i> , 2009 $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz
3	3,50-3,54 ( <i>m</i> )	3,47-3,51 ( <i>m</i> )	3,56 ( <i>td</i> , 9,0 e 3,6 Hz) 3,61 ( <i>m</i> )
4	1,93-2,02 ( <i>m</i> )	1,96-2,05 ( <i>m</i> ) 1,81-1,94 ( <i>m</i> )	2,02 ( <i>m</i> ) 1,91 ( <i>m</i> )
5	2,32 ( <i>m</i> ) 2,16 ( <i>m</i> )	2,24-2,34 ( <i>m</i> ) 1,96-2,05 ( <i>m</i> )	2,13 ( <i>m</i> ) 2,35 ( <i>m</i> )
6	4,19 ( <i>m</i> )	4,25 ( <i>ddd</i> , 11,1; 6,3; 1,7)	4,12 ( <i>dd</i> , 9,0 e 7,8 Hz)
7	-	-	-
8	5,49 <i>sl</i>	4,56 <i>sl</i>	6,07 ( <i>sl</i> )
9	4,07 ( <i>tl</i> )	4,09-4,15 ( <i>m</i> )	4,02 ( <i>dd</i> , 9,3 e 3,6 Hz)
10	1,44 ( <i>ddd</i> , 12,1, 7,6 e 4,3 Hz) 1,32 ( <i>m</i> )	1,81-1,94 ( <i>m</i> ) 1,47-1,56 ( <i>m</i> )	1,53 ( <i>ddd</i> , 14,4, 9,3 e 5,1 Hz) 2,06 ( <i>m</i> )
11	1,93 ( <i>m</i> )	1,81-1,94 ( <i>m</i> )	1,76 ( <i>m</i> )
12	1,16 ( <i>d</i> , 6,9 Hz)	0,94 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)	0,96 ( <i>d</i> , 6,0 Hz)
13	1,17 ( <i>d</i> , 6,9 Hz)	0,95 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)	1,00 ( <i>d</i> , 6,0 Hz)

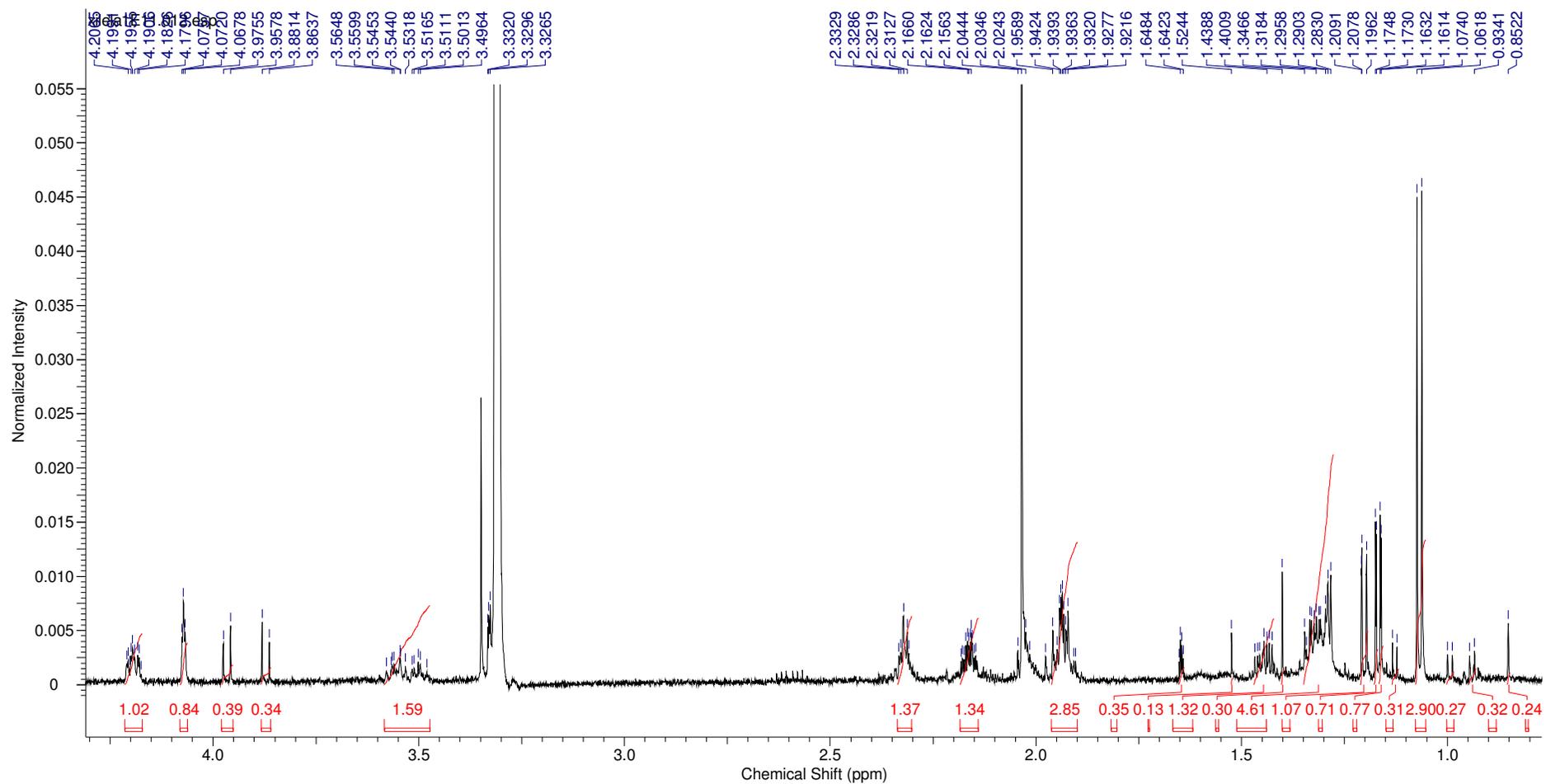


FIGURA 4.120: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OH+H<sub>2</sub>O, 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 29,48.

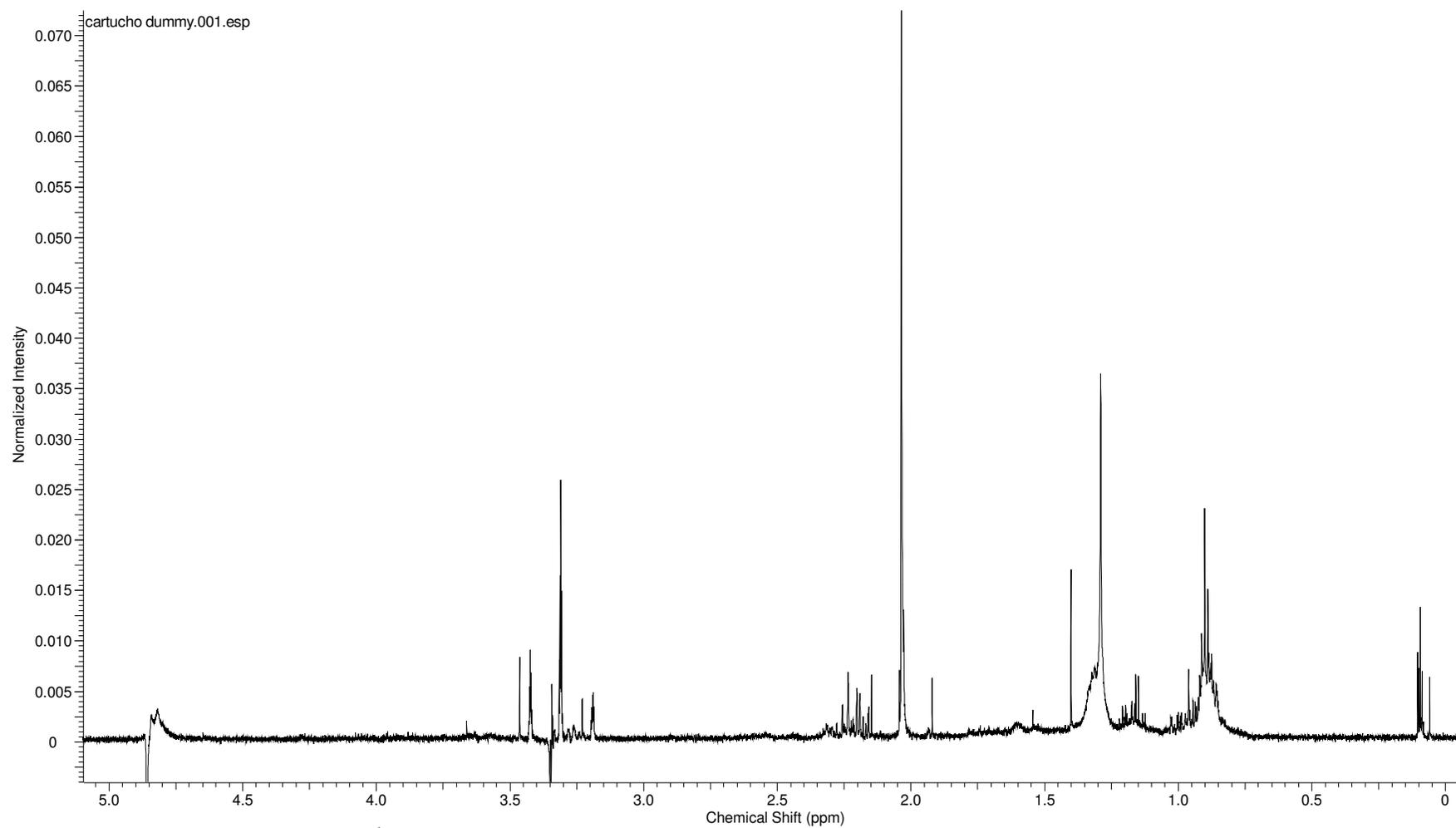


FIGURA 4.121: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) com dupla supressão do cartucho de SPE sem presença de amostra “trapeada”.

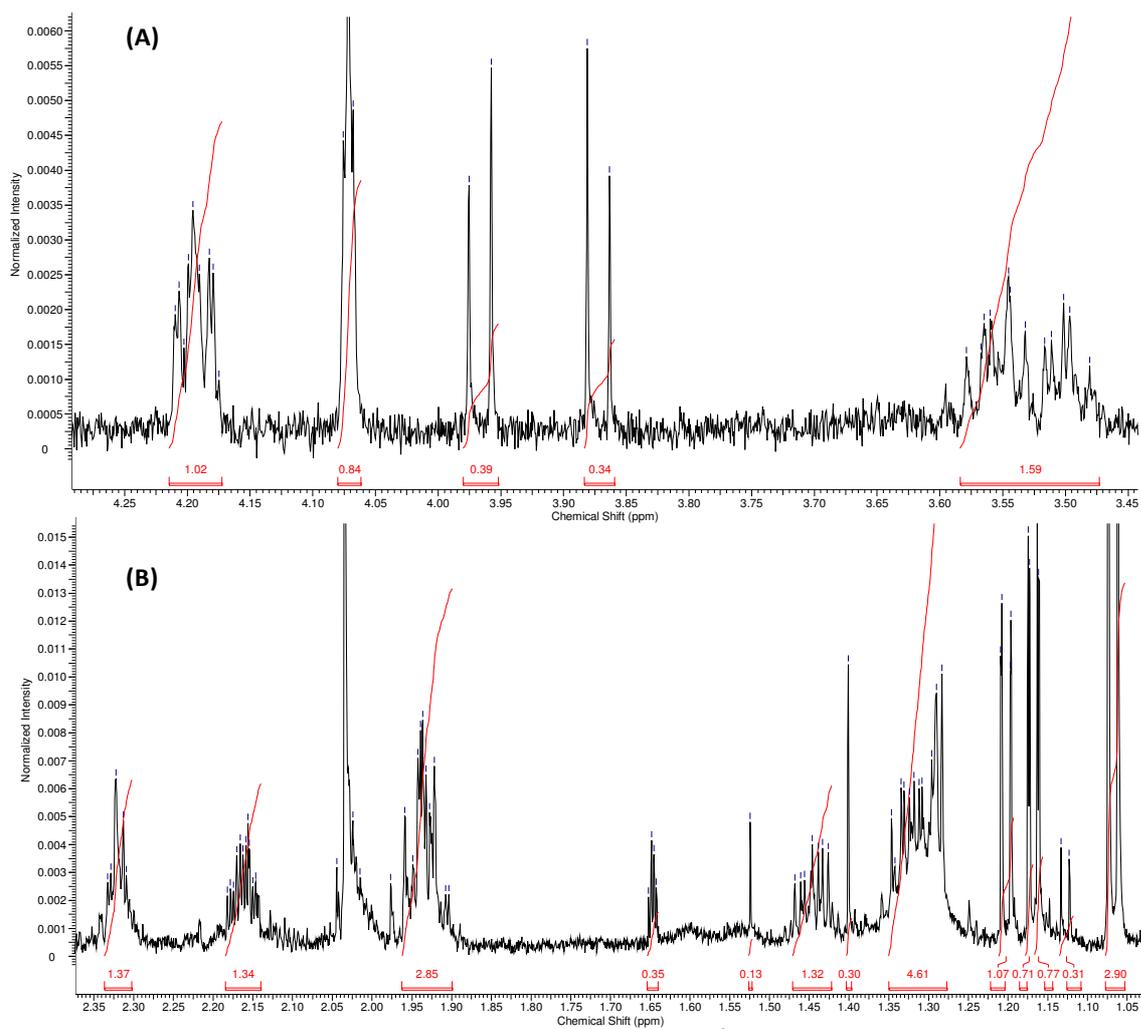


FIGURA 4.122: Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 29,48. (A) região 3,45 a 4,50 ppm e (B) região 1,00 a 2,40 ppm.

### 4.5.3. Determinação estrutural da substância *ciclo* (Pro-Ile) que produz o sinal cromatográfico t.r. 30,28 min

A determinação estrutural do sinal cromatográfico com tempo de retenção em 30,28 min foi baseada nos dados espectrais de RMN 1D ( $^1\text{H}$ ) e a espectrometria de massas.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.129, p. 143) mostrou um duplo duplete em  $\delta$  4,24, com constante de acoplamento de 6,9 Hz e 10,6 Hz, e um duplete em  $\delta$  3,66, com constante de acoplamento de 6,2 Hz, sinais característicos a hidrogênios  $\alpha$ -carboxílico, os quais, sugerem um sistema de anel dicetopiperazínico (FIGURA 4.123).

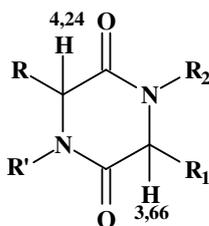


FIGURA 4.123: Hidrogênios destacados  $\alpha$ -carboxílico do núcleo dicetopiperazínico.

Continuando a análise, observou-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.128, p. 142) dois multipletos, integrando para 2H, em  $\delta$  3,49 e 3,60, característicos de hidrogênio ligado a carbono contendo heteroátomo. Estes hidrogênios indicaram uma possível presença do resíduo de aminoácido prolina na estrutura. Corroborando esta hipótese, também foi observados multipletos em  $\delta$  1,13, 1,60, 1,89 e 2,34 ppm; característicos dos hidrogênios metilênicos do resíduo de aminoácido prolina (FIGURA 4.124).

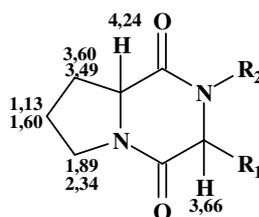


FIGURA 4.124: Deslocamentos químicos de hidrogênios da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-axx).

O espectro de  $^1\text{H}$  mostrou um duplete com constante de acoplamento 6,9 Hz, em  $\delta$  0,99 e um triplete com constante de acoplamento 7,3 Hz, em  $\delta$  0,95. Adicionalmente, ao sinal observado em  $\delta$  3,66 (*d*,  $J=6,2$  Hz), estes dados sugeriram o resíduo de aminoácido isoleucina na estrutura (FIGURA 4.125).

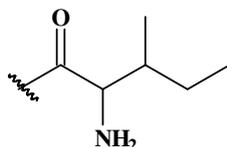


FIGURA 4.125: Estrutura do resíduo de aminoácido Isoleucina.

Desta forma, unindo as duas partes estruturais mostradas neste estudo, os sinais de hidrogênios do espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugeriram a presença da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Ile). Contudo, os vários multipletos observados nas regiões do espectro de  $\delta$  0,95 a  $\delta$  2,00, poderiam levar a uma interpretação errônea. Com isso, foi utilizada a espectrometria de massas com impacto eletrônico para esta amostra (FIGURA 4.126).

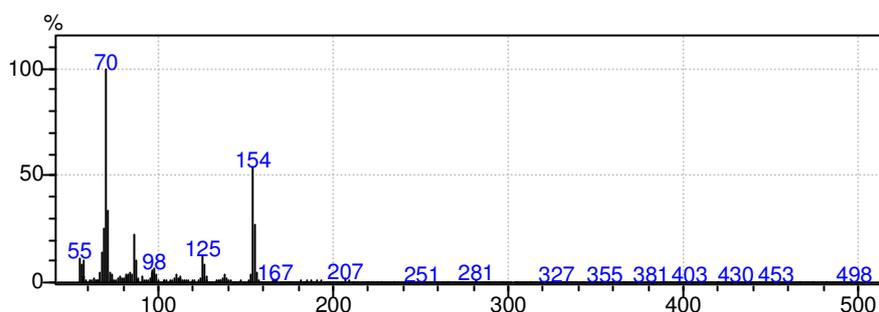


FIGURA 4.126: Espectro de massas obtido por CG-EM da amostra em análise.

No espectro de massas destacaram-se os íons  $m/z$  154 e 70. De acordo com os espectros de massas observados nesta tese, foram comumente encontrados íons fragmentos característicos tais como:  $m/z$  154, 153, 128, 125, 91 e 70. O íon  $m/z$  70 como pico base na maioria dos espectros de massas, indicou peculiarmente a dicetopiperazinas com resíduo de aminoácido prolina. Assim, através dos íons fragmentos observados no espectro da figura 4.126,

pode-se sugerir a presença da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Ile) ou *ciclo* (Pro-Leu).

Contudo, o duplete em  $\delta$  0,99 ( $J$  6,9 Hz) e um tripleto em  $\delta$  0,95 ( $J$  7,3 Hz), além do duplete em  $\delta$  3,66 ( $d$ ,  $J=6,2$  Hz), confirmaram a estrutura da *ciclo* (Pro-Ile) (FIGURA 4.127). Os dados espectrais foram comparados com a literatura [STARK & HOFMANN, 2005; CHEN *et al.*, 2009] e os sinais dos hidrogênios foram atribuídos como mostrado na tabela 4.9.

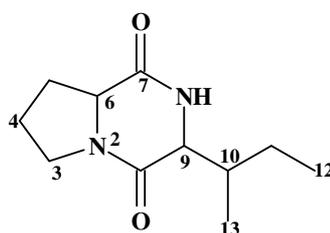


FIGURA 4.127: Estrutura da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Ile).

TABELA 4.9: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) em comparação com os dados da literatura.

	$\delta_{\text{H}}$ (multip. $J=$ Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (DMSO, 400 MHz) Stark & Hofmann, 2005	$\delta_{\text{H}}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) Chen <i>et al.</i> , 2009
1	-	-	-
2	-	-	-
3	3,49 ( <i>m</i> ) 3,60 ( <i>m</i> )	3,36 ( <i>m</i> )	3,51-3,57 ( <i>m</i> ) 3,60-3,67 ( <i>m</i> )
4	1,90 ( <i>m</i> )	1,81 ( <i>m</i> )	1,97-2,11 ( <i>m</i> )
5	2,34 ( <i>m</i> ) 1,89 ( <i>m</i> )	1,81 ( <i>m</i> ) 2,14 ( <i>m</i> )	2,27-2,41 ( <i>m</i> )
6	4,24 ( <i>dd</i> , $J= 6,9$ e $10,6$ )	4,11 ( <i>t</i> , $J= 7,7$ )	4,05-4,09 ( <i>m</i> )
7	-	-	-
8	5,49 <i>sl</i>	7,91 <i>s</i>	6,48 <i>s</i>
9	3,66 ( <i>d</i> , $J= 6,2$ )	3,95 <i>s</i>	3,97 <i>s</i>
10	1,89 ( <i>m</i> )	2,03 ( <i>m</i> )	1,83-1,96 ( <i>m</i> )
11	1,13 ( <i>m</i> ) 1,60 ( <i>m</i> )	1,31 ( <i>m</i> )	1,12-1,26 ( <i>m</i> ) 1,36-1,49 ( <i>m</i> )
12	0,95 ( <i>t</i> , $J= 7,3$ )	0,82 ( <i>t</i> , $J= 7,6$ )	0,93 ( <i>t</i> , $J= 7,4$ )
13	0,99 ( <i>d</i> , $J= 6,9$ )	0,98 ( <i>d</i> , $J= 7,1$ )	1,07 ( <i>d</i> , $J= 7,2$ )

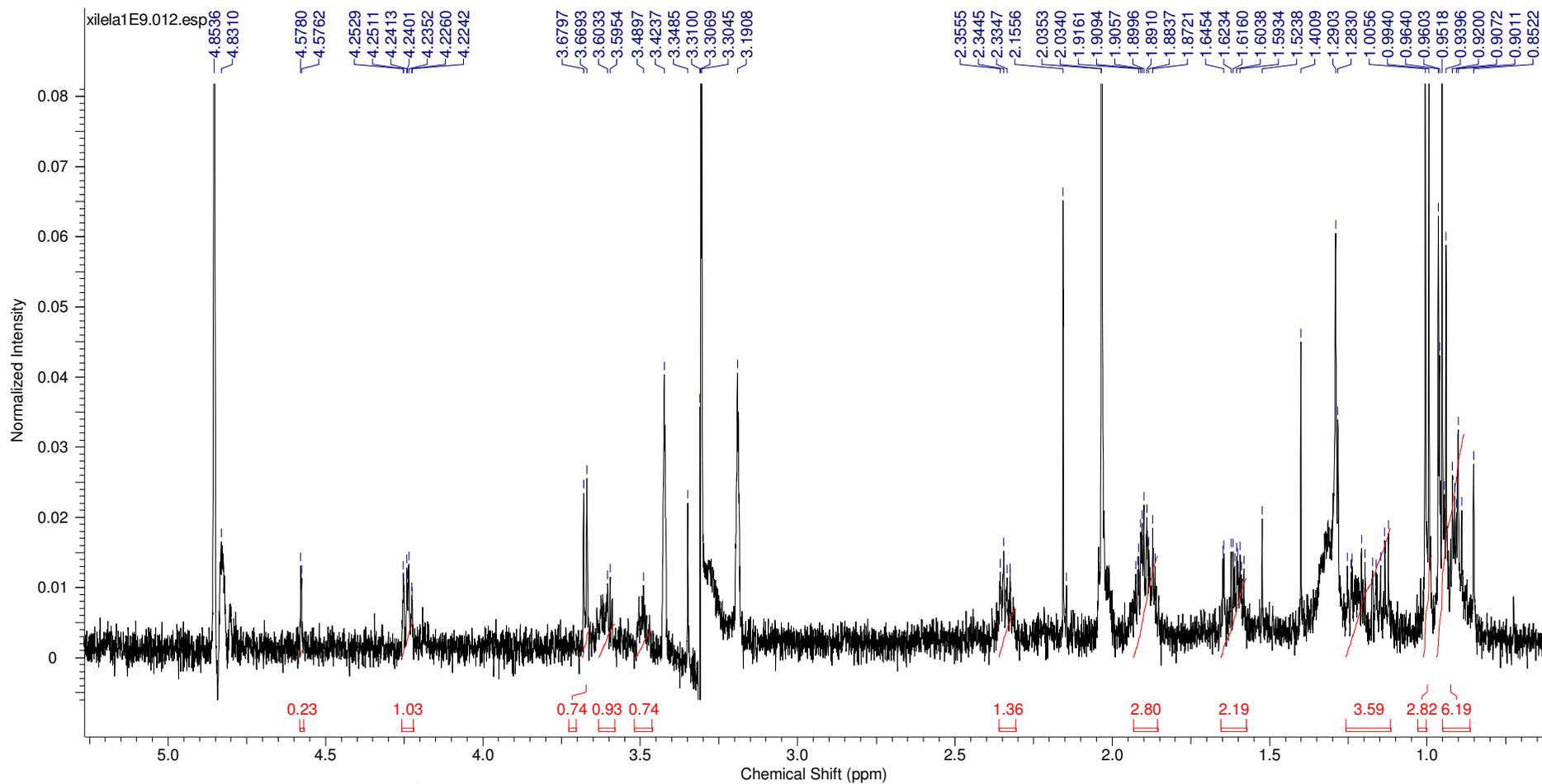


FIGURA 4.128: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 30,28.

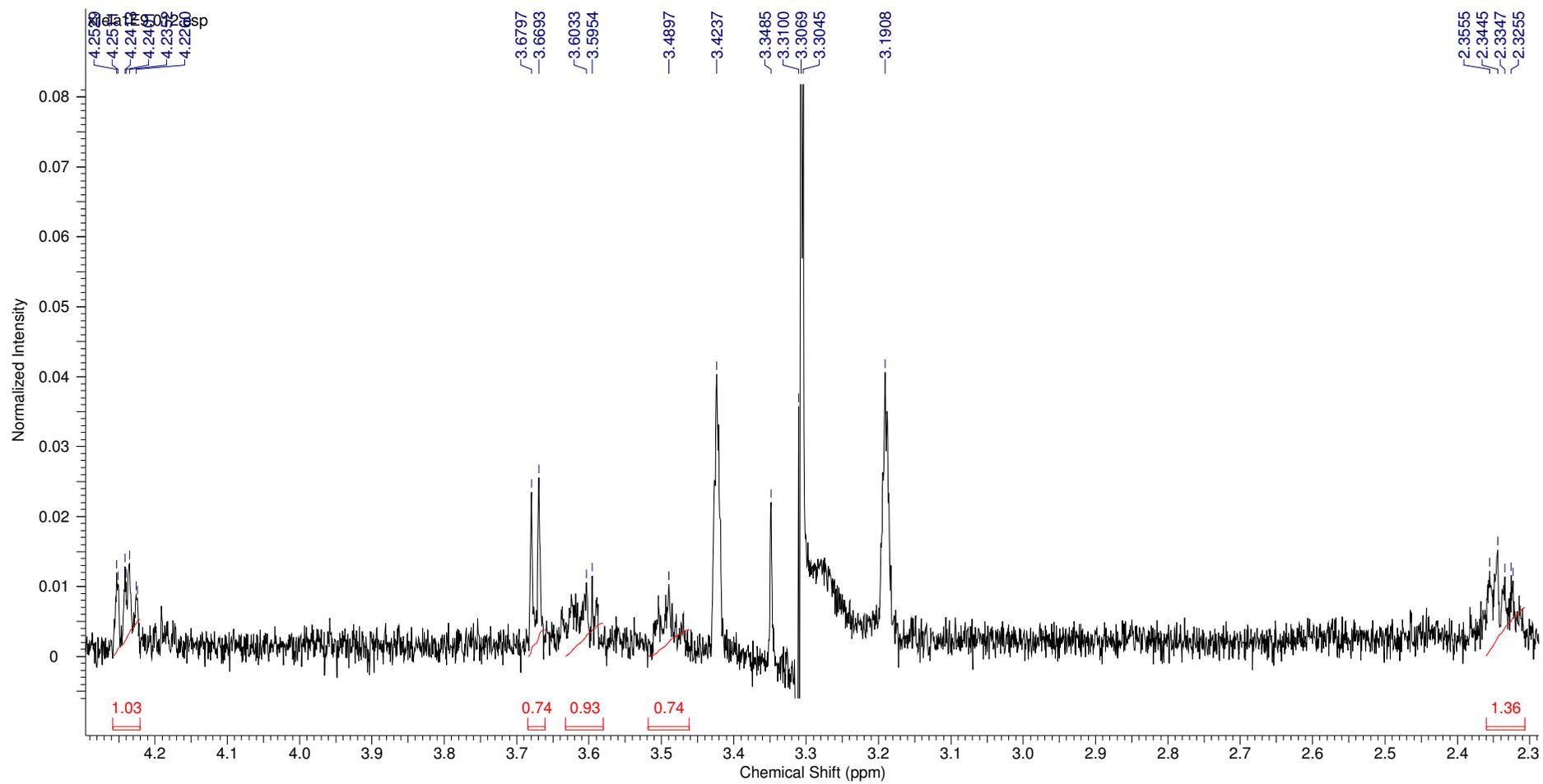


FIGURA 4.129: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 30,28.

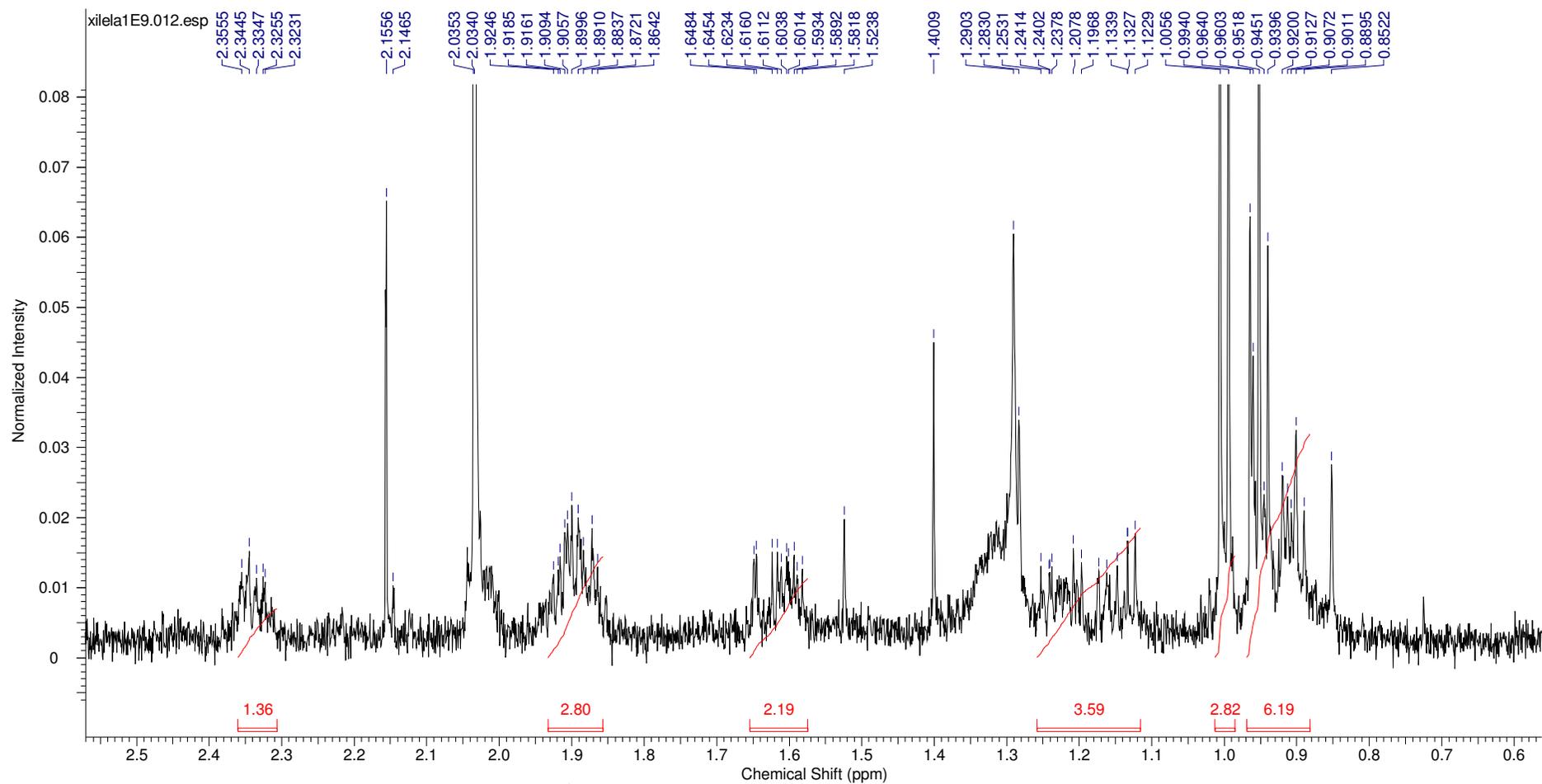


FIGURA 4.130: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 30,28.

#### 4.5.4. Determinação estrutural da substância *ciclo* (Pro-Leu) e *p*-etoxibenzoato que produz o sinal cromatográfico t.r. 31,03 min

A determinação estrutural do constituinte correspondente ao sinal cromatográfico com tempo de retenção em 31,03 min foi baseada nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e espectrometria de massas. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.136, p. 150) apresentou um mutipletto em  $\delta$  4,25 e duplo dupletto com constante de acoplamento de 5,3 e 9,3 Hz, em  $\delta$  3,84, característicos de hidrogênios  $\alpha$ -carboxílico da condensação para o sistema de anel dicetopiperazínicos.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.134, p. 148) apresentou dois multipletos, centrado em  $\delta$  3,49 e 3,59, característicos de hidrogênio ligado a carbono contendo heteroátomo. Também foram observados no espectro sinais de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  1,56 (*m*) e 1,68 (*m*);  $\delta$  1,95 (*m*) e 2,35 (*m*), sugerindo resíduo do aminoácido prolina na estrutura. Além disso, foi observado dois dupletos, um centrado em  $\delta$  0,96 ( $J= 6,7$  Hz) e o outro em  $\delta$  0,99 ( $J= 6,7$  Hz), característicos de hidrogênios metílicos e um mutipletto em  $\delta$  1,94, os quais indicaram a presença de grupo isopropila. Juntamente com o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,56, um duplo duplo dupletto, com constante de acoplamento 5,2; 8,5 e 13,5 Hz, e a presença do duplo duplo dupletto em  $\delta$  1,68, com constante de acoplamento 5,2; 9,4 e 13,7 Hz, pode-se sugerir o resíduo de aminoácido leucina. Desta forma, através do espectro de RMN  $^1\text{H}$  sugeriu-se a substância como a *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 4.131).

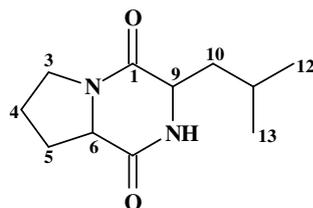


FIGURA 4.131: Estrutura da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu).

Através de APCI no modo positivo de ionização, foi observado o íon molecular protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  211. O qual juntamente com os dados espectrais comparados com a literatura (TABELA 4.10) [LI *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009] permitiu a identificação da substância como *ciclo* (Pro-Leu).

TABELA 4.10: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) em comparação com os dados da literatura.

	$\delta_{\text{H}}$ (multip. $J=$ Hz)	$\delta_{\text{H}}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) Li <i>et al.</i> , 2008	$\delta_{\text{H}}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) Furtado <i>et al.</i> , 2005
1	-	-	-
2	-	-	-
3	3,49 ( <i>m</i> ) 3,59 ( <i>m</i> )	3,56 ( <i>td</i> , $J=$ 9,0; 3,6) 3,61 ( <i>m</i> )	3,47-3,51 ( <i>m</i> )
4	1,56 ( <i>m</i> ) 1,68 ( <i>m</i> )	1,91 ( <i>m</i> ) 2,02 ( <i>m</i> )	1,96-2,05 ( <i>m</i> ) 1,81-1,94 ( <i>m</i> )
5	1,95 ( <i>m</i> ) 2,35 ( <i>m</i> )	2,13 ( <i>m</i> ) 2,35 ( <i>m</i> )	2,24-2,34 ( <i>m</i> ) 1,96-2,05 ( <i>m</i> )
6	4,25 ( <i>m</i> )	4,12 ( <i>dd</i> , $J=$ 9,0 e 7,8)	4,25 ( <i>ddd</i> , 11,1; 6,3; 1,7)
7	-	-	-
8	4,57 <i>s</i>	6,07 <i>sl</i>	4,56 <i>sl</i>
9	3,84 ( <i>dd</i> , 5,3; 9,3 Hz)	4,02 ( <i>dd</i> , $J=$ 9,3 e 3,6)	4,09-4,15 ( <i>m</i> )
10	1,56 ( <i>ddd</i> , 5,2; 8,5 e 13,5 Hz) 1,68 ( <i>ddd</i> , 5,2; 9,4 e 13,7 Hz)	1,53 ( <i>ddd</i> , $J=$ 14,4; 9,3 e 5,1) 2,06 ( <i>m</i> )	1,81-1,94 ( <i>m</i> ) 1,47-1,56 ( <i>m</i> )
11	1,94 ( <i>m</i> )	1,76 ( <i>m</i> )	1,81-1,94 ( <i>m</i> )
12	0,96 ( <i>d</i> , 6,7 Hz)	0,96 ( <i>d</i> , $J=$ 6,0)	0,94 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)
13	0,99 ( <i>d</i> , 6,7 Hz)	1,00 ( <i>d</i> , $J=$ 6,6)	0,95 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)

Entretanto, o sinal cromatográfico com tempo de retenção em 31,03 min mostrou na RMN  $^1\text{H}$  vários sinais além dos sinais de hidrogênios da *ciclo* (Pro-Leu). Com isso, esta amostra foi submetida à CG-EM, na qual através do cromatograma de íons totais (FIGURA 4.132, A, p. 147) mostrou quatro picos majoritários. Através da comparação com espectros de massas da literatura [CHRISTIE, 2011; WANG *et al.*, 2009] e na comparação computadorizada com a biblioteca NIST 08 e NIST 08s, confirmou-se a dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 4.132, B, p. 147), além da identificação dos ésteres metílicos com  $m/z$  270 (hexadecanoato de metila) e 298 (16-metil-heptadecanoato de

metila) (FIGURA 4.132, A e B, respectivamente) e o ácido graxo com  $m/z$  296 (undecenóico) (FIGURA 4.132, C).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.134, p. 148) apresentou dois dupletos na região dos aromáticos, com constante de acoplamento 8,5 Hz, um centrado em  $\delta$  6,68 e outro em  $\delta$  7,01, característico ao sistema de anel aromático *p*-disubstituído. Além disso, também foi observado um singlete largo em  $\delta$  4,57, o qual sugeriu a existência de mais um componente nesta amostra. Desta forma, através da CG-EM foi identificado o *p*-etoxibenzoato (FIGURA 4.133).

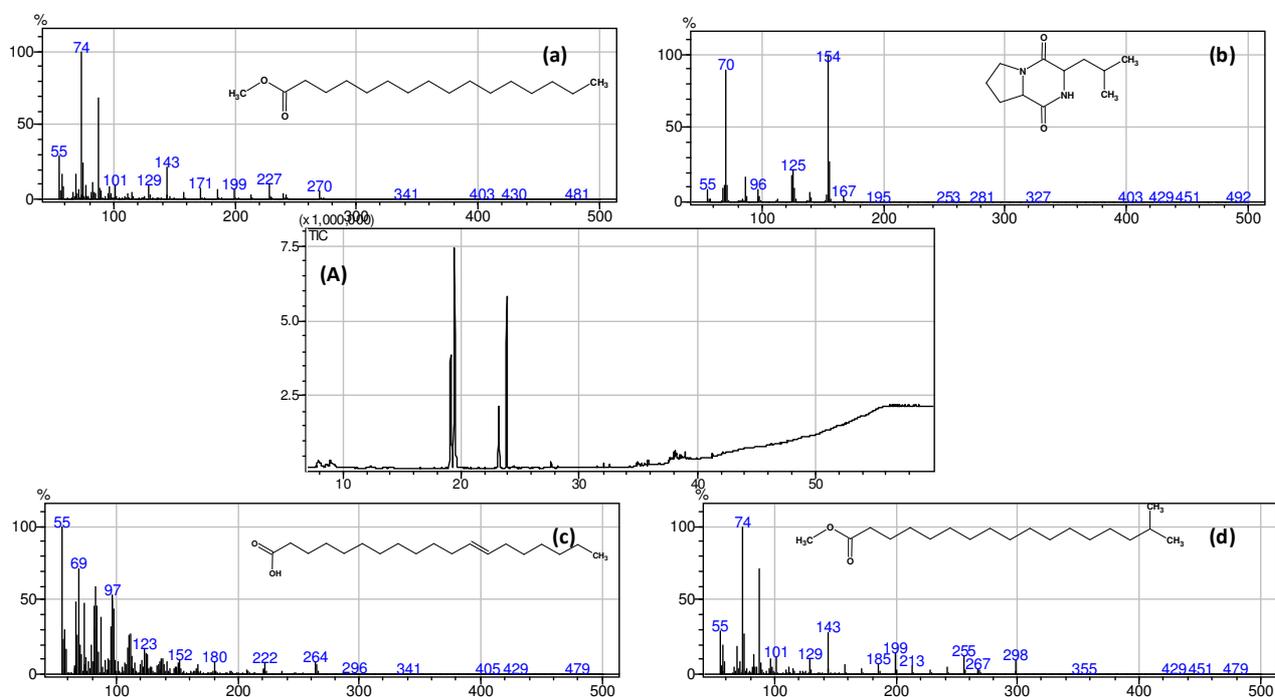


FIGURA 4.132: (A) Cromatograma de íons totais. Espectro de massas: (a) hexadecanoato de metila, (b) *ciclo* (Pro-leu), (c) ácido undecenóico e (d) 16-metil-heptadecanoato de metila.

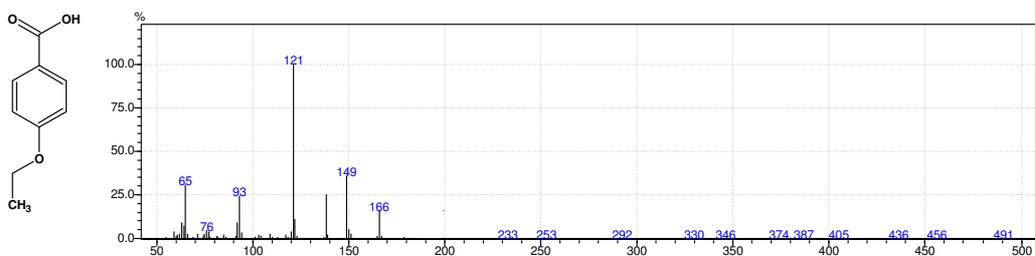


FIGURA 4.133: Espectro de massas do composto *p*-etoxibenzoato.

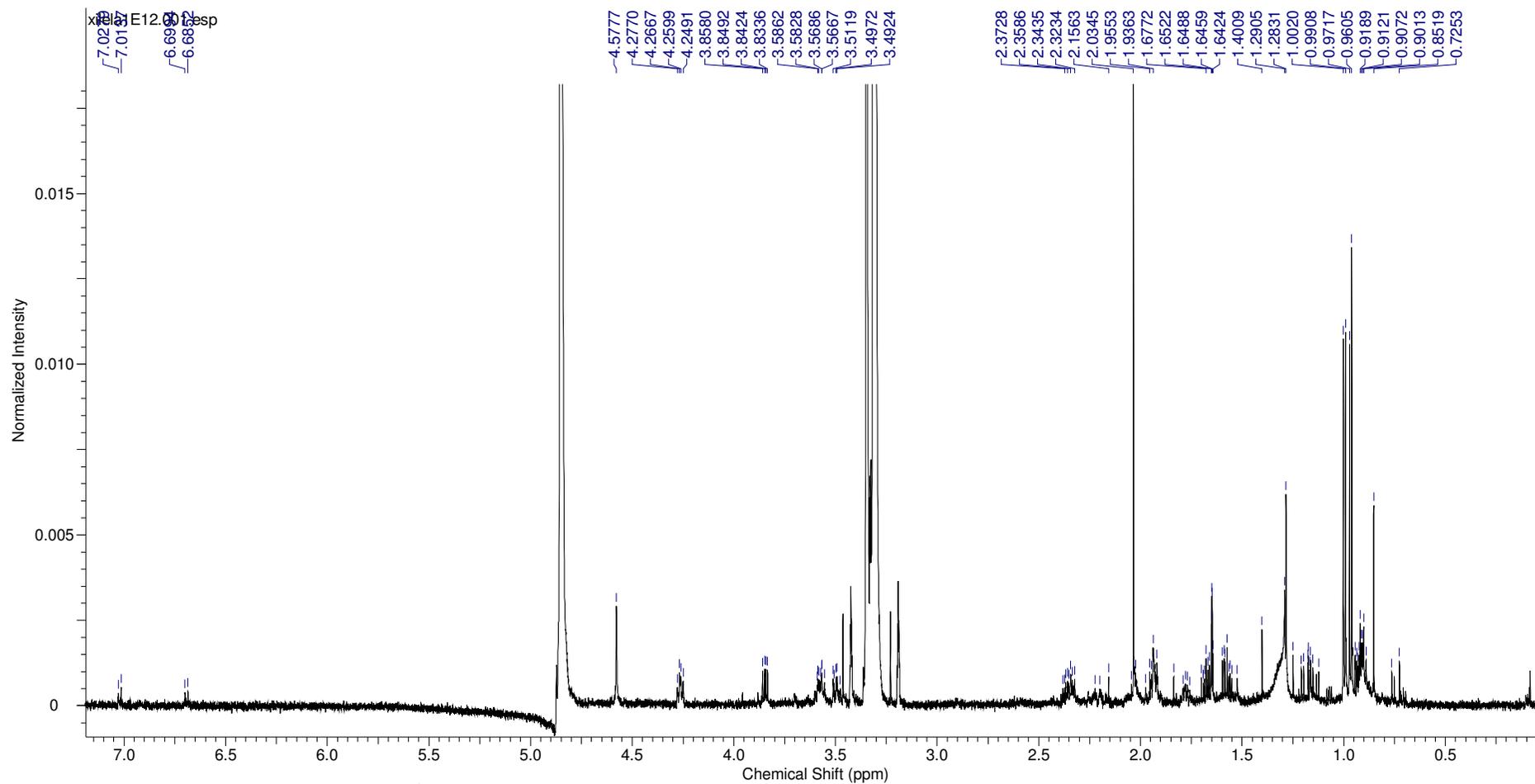


FIGURA 4.134: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 31,03.

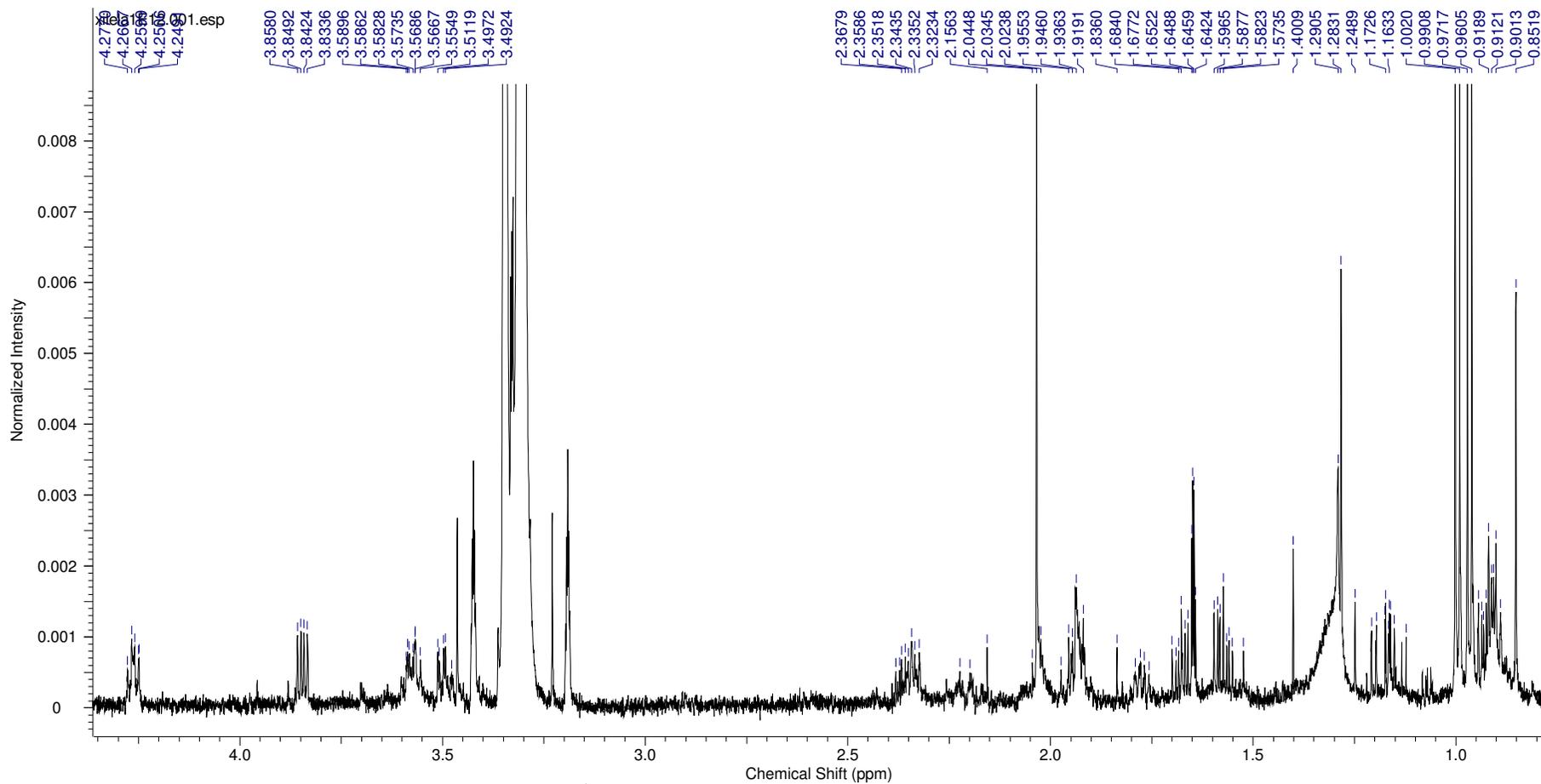


FIGURA 4.135: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 31,03.

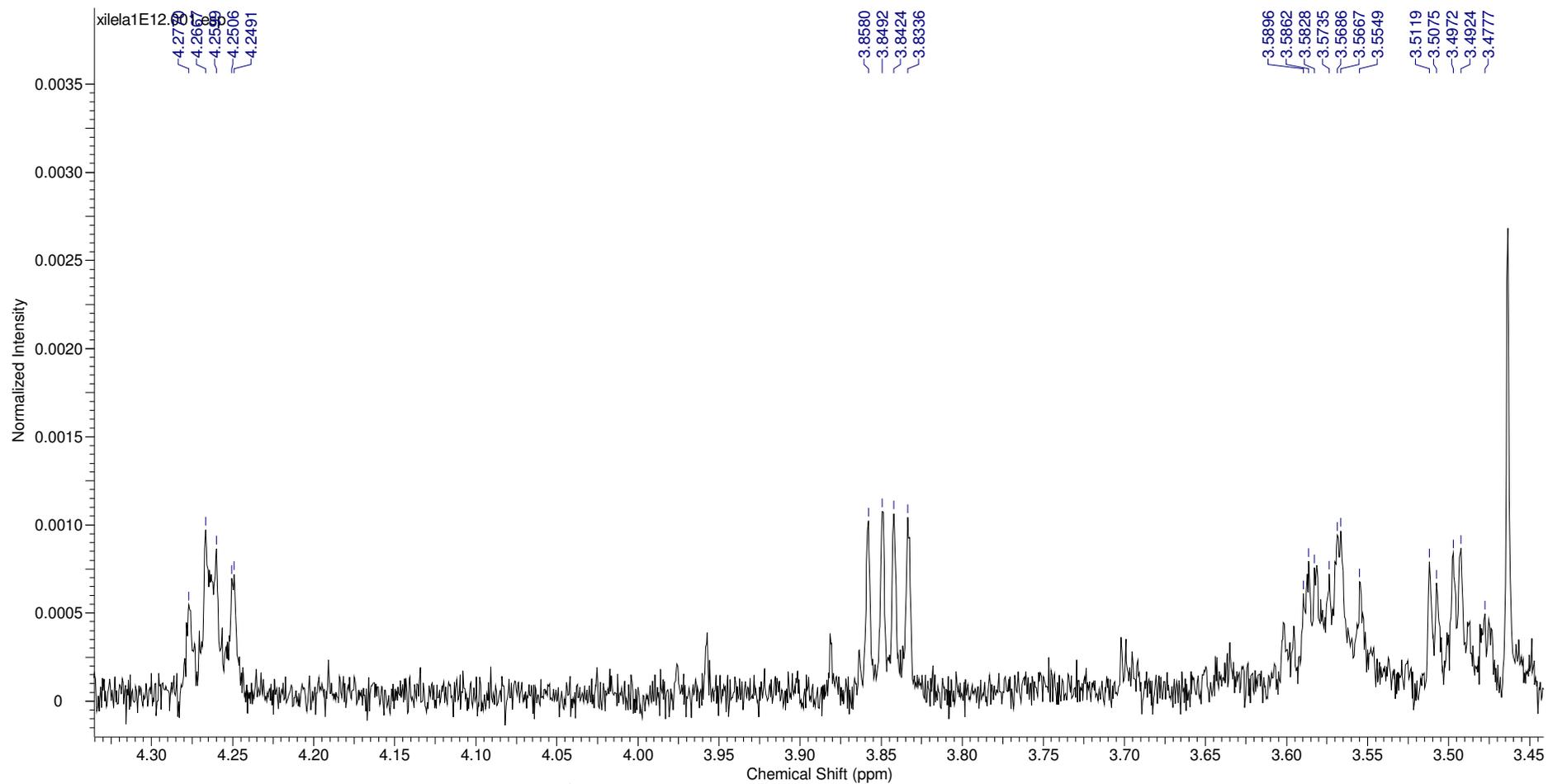


FIGURA 4.136: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 31,03.

#### 4.5.5. Determinação estrutural da substância *ciclo* (Pro-Leu) que produz o sinal cromatográfico t.r. 32,91 min

A determinação estrutural do sinal cromatográfico com tempo de retenção em 32,91 min foi baseada nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e espectrometria de massas. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 141, p. 155) apresentou um tripleto em  $\delta$  4,25, com constante de acoplamento de 7,3 Hz e um multipletto em  $\delta$  4,12, característicos de hidrogênios  $\alpha$ -carboxílico do sistema de anel dicetopiperazínico. O mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.144, p. 157) mostrou as correlações destes hidrogênios aos respectivos átomos de carbono (FIGURA 4.137).

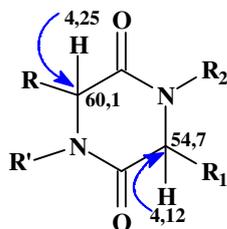


FIGURA 4.137: Correlações HSQC do anel dicetopiperazínico.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 142, p. 156) apresentou dois dupletos em  $\delta$  0,95 ( $J= 6,4$  Hz) e  $\delta$  0,96 ( $J= 6,1$  Hz), característicos de hidrogênios metílicos e um mutipletto em  $\delta$  1,89, indicando a presença de grupo isopropila. Juntamente com a presença de dois mutiplettos em  $\delta$  1,91 ( $m$ ) e 1,42 ( $m$ ), pode-se sugerir a presença do aminoácido leucina. Através do mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.144, p. 157) estes hidrogênios correlacionaram com o carbono em  $\delta$  46,7 (FIGURA 4.138), corroborando a hipótese da presença do aminoácido leucina.

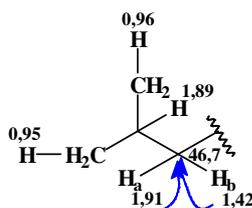


FIGURA 4.138: Correlações HSQC do resíduo de aminoácido Leucina.

Continuando, observou-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  um sinal em  $\delta$  3,51, característicos de hidrogênio metilênico ligado a carbono-nitrogênio, o qual sugeriu o resíduo de aminoácido prolina. Este se correlaciona com o sinal do carbono em  $\delta$  43,0 no mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.144, p. 157). Assim, corroborando a está hipótese foi observado sinais de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  1,52 (*m*) e 1,93 (*m*);  $\delta$  2,02 (*m*) e 2,30 (*m*) no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , caracterizando hidrogênios da unidade prolina da DKPs. Através da correlação em HSQC permitiu atribuir aos hidrogênios os respectivos carbonos (TABELA 4.11, p. 153).

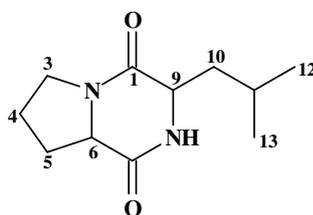


FIGURA 4.139: Estrutura da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu).

Os dados espectrais foram comparados com a literatura [LI *et al.*, 2008; FURTADO *et al.*, 2005] permitindo a identificação da substância como *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 4.139). A proposta estrutural foi confirmada na análise por CG-EM (FIGURA 4.140).

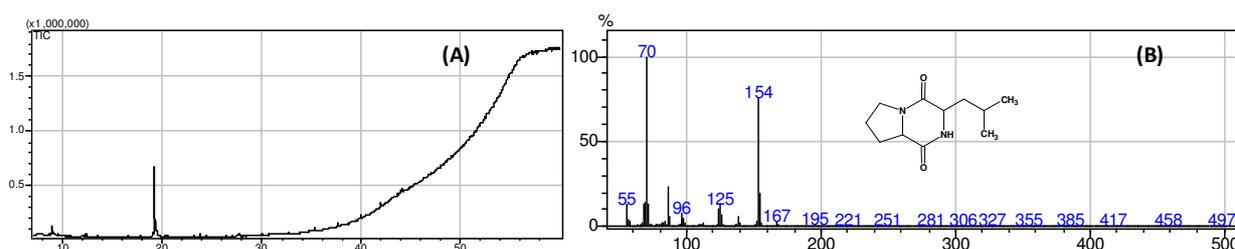


FIGURA 4.140: (A) cromatograma de íons totais e (B) espectro de massas do pico no t.r. 19,30 min.

TABELA 4.11: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) em comparação com os dados da literatura.

	$\delta_{\text{H}}$ (multip. $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{H}}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) Li <i>et al.</i> , 2008	$\delta_{\text{H}}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) Furtado <i>et al.</i> , 2005
1	-	-	-
2	-	-	-
3	3,51 ( <i>m</i> )	3,56 ( <i>td</i> , $J = 9,0$ ; 3,6) 3,61 ( <i>m</i> )	3,47-3,51 ( <i>m</i> )
4	1,52 ( <i>m</i> ) 1,93 ( <i>m</i> )	1,91 ( <i>m</i> ) 2,02 ( <i>m</i> )	1,96-2,05 ( <i>m</i> ) 1,81-1,94 ( <i>m</i> )
5	2,02 ( <i>m</i> ) 2,30 ( <i>m</i> )	2,13 ( <i>m</i> ) 2,35 ( <i>m</i> )	2,24-2,34 ( <i>m</i> ) 1,96-2,05 ( <i>m</i> )
6	4,25 ( <i>t</i> , 7,3 Hz)	4,12 ( <i>dd</i> , $J = 9,0$ e 7,8)	4,25 ( <i>ddd</i> , 11,1; 6,3; 1,7)
7	-	-	-
8	-	6,07 <i>sl</i>	4,56 <i>sl</i>
9	4,12 ( <i>m</i> )	4,02 ( <i>dd</i> , $J = 9,3$ e 3,6)	4,09-4,15 ( <i>m</i> )
10	1,89 ( <i>m</i> )	1,53 ( <i>ddd</i> , $J = 14,4$ ; 9,3 e 5,1) 2,06 ( <i>m</i> )	1,81-1,94 ( <i>m</i> ) 1,47-1,56 ( <i>m</i> )
11	1,91 ( <i>m</i> ) 1,42 ( <i>m</i> )	1,76 ( <i>m</i> )	1,81-1,94 ( <i>m</i> )
12	0,95 ( <i>d</i> , 6,4 Hz)	0,96 ( <i>d</i> , $J = 6,0$ )	0,94 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)
13	0,96 ( <i>d</i> , 6,1 Hz)	1,00 ( <i>d</i> , $J = 6,6$ )	0,95 ( <i>d</i> , 6,5 Hz)

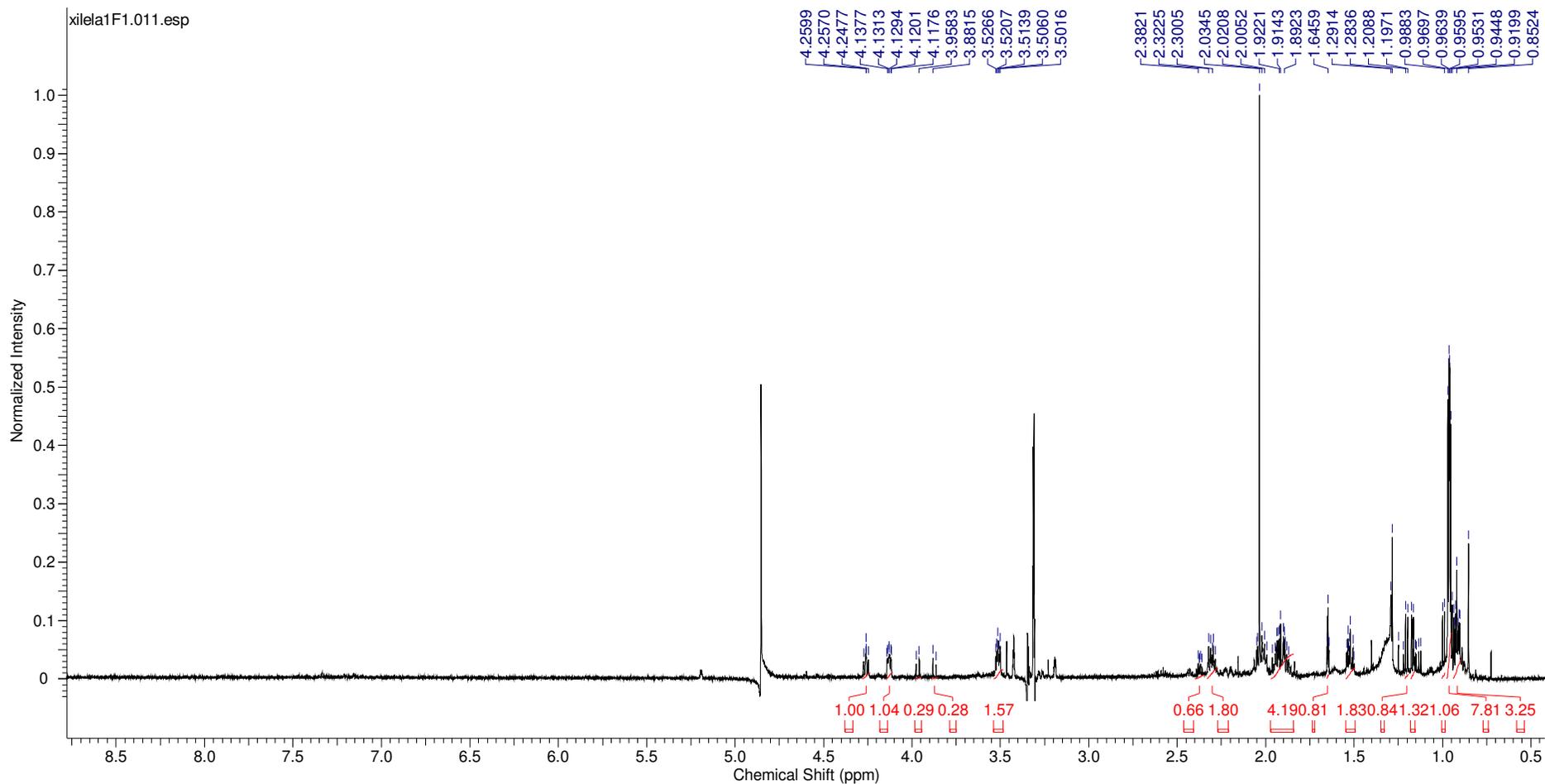


FIGURA 4.141: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica no t.r. 32,91.

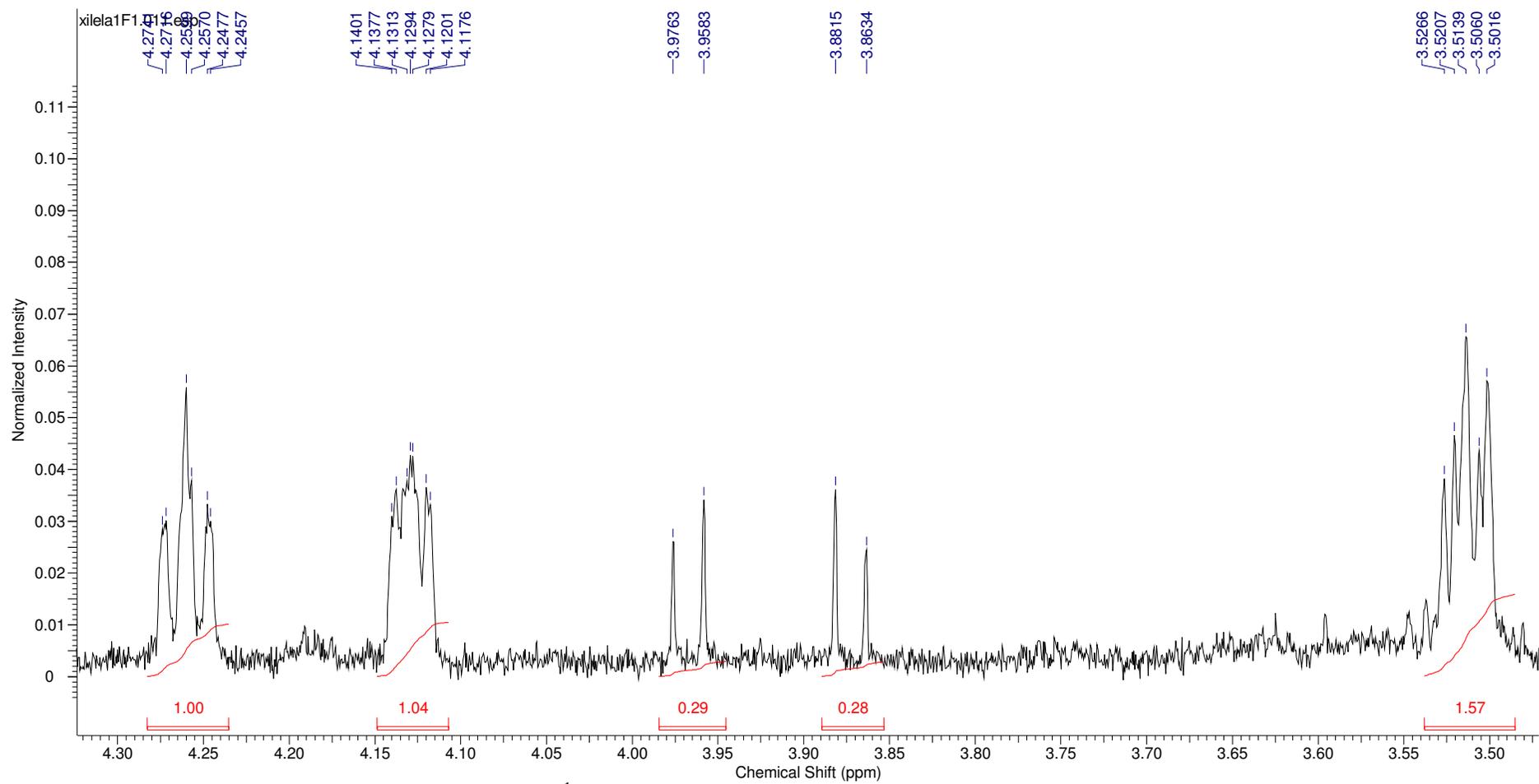


FIGURA 4.142: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica no t.r. 32,91.

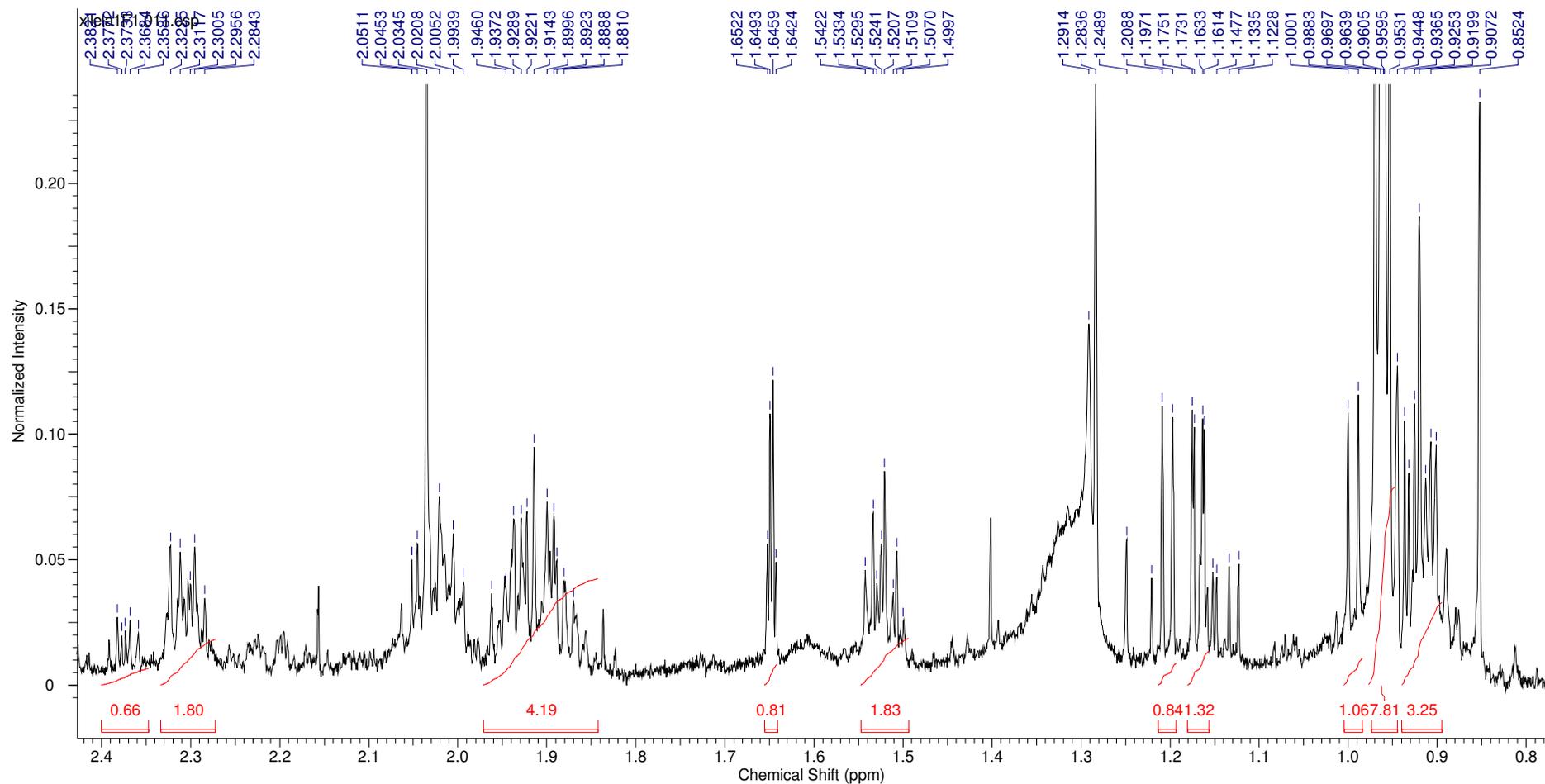


FIGURA 4.143: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 32,91.

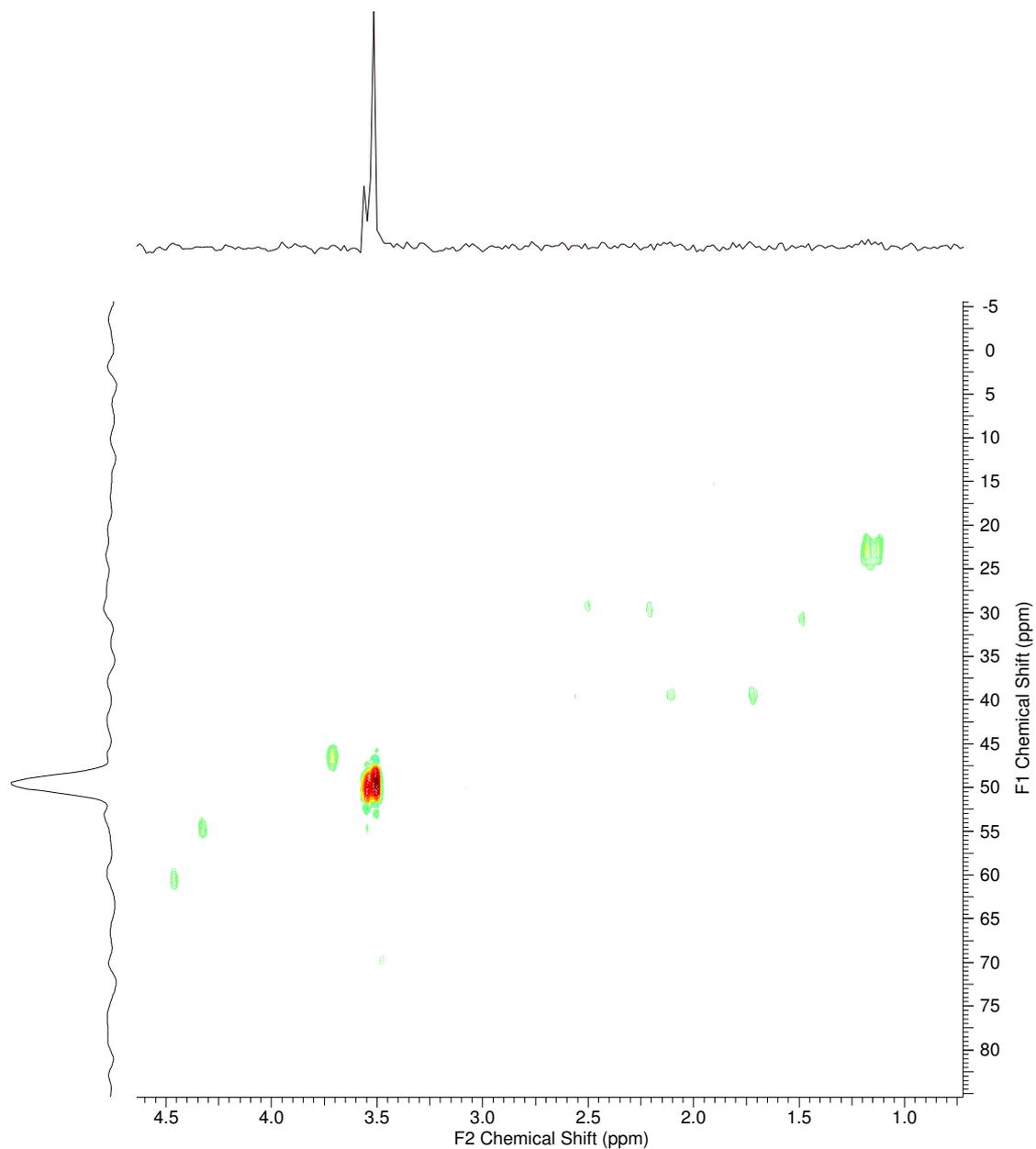


FIGURA 4.144: Ampliação do mapa de contorno HSQC (CD<sub>3</sub>OH+H<sub>2</sub>O, 150 MHz) da banda cromatográfica no t.r. 32,91

#### 4.5.6. Determinação estrutural da substância *ciclo* (Pro-Phe) que produz o sinal cromatográfico t.r. 34,17 min

A determinação estrutural do sinal cromatográfico com tempo de retenção em 34,17 min foi baseada nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e espectrometria de massas.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.148, p. 161) mostrou dois conjuntos de sinais, um centrado em  $\delta$  7,18, outro centrado em  $\delta$  7,30, que juntamente com a presença de duplo duplete em  $\delta$  2,98 e  $\delta$  3,00 com constante de acoplamento de 4,5; 13,5 Hz e 4,7; 13,5, respectivamente, sugerem a presença de uma unidade benzílica. Adicionalmente, também foi observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  um triplete em  $\delta$  4,19, com constante de acoplamento 5,1 Hz. Com isso, os dados sugeriram a presença do resíduo de aminoácido Fenilalanina com N dissustituído (FIGURA 4.145).

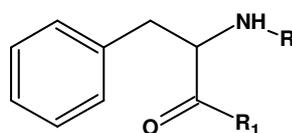


FIGURA 4.145: Estrutura do resíduo de aminoácido Fenilalanina com N dissustituído.

Neste estudo da bactéria *Xylella fastidiosa* foi mostrado uma especificidade a formação de compostos denominados dicetopiperazinas, formados da condensação de dois aminoácidos. Desta forma, o sinal cromatográfico com t.r. 34,17 min, apresenta estrutura parcial a DKPs *ciclo* (Phe-Axx). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.148, p. 161) apresentou bastantes sinais nas regiões de hidrogênios metilênicos, os quais também é a região das interferências provindas dos cartuchos da unidade SPE do sistema LC-SPE-NMR. Sendo assim, a determinação estrutural foi auxiliada por espectrometria de massas.

Através de APCI no modo positivo de ionização, foi observado o íon molecular protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  245, sugerindo à fórmula molecular  $C_{14}H_{16}N_2O_2$ . Contudo, através da CG-EM foram observados três picos cromatográficos e seus respectivos espectros de massas mostraram o íon molecular com  $m/z$  244, 270 e 298. No espectro de massas do íon molecular  $m/z$  244 foram observados fragmentos comuns das dicetopiperazinas, destacando-se os íons  $m/z$  125, 91 e 70 (FIGURA 4.146). Através da comparação com espectros de massas da literatura [XING *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2004] e na comparação computadorizada com a biblioteca NIST 08 e NIST 08s, sugeriram a dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Phe).

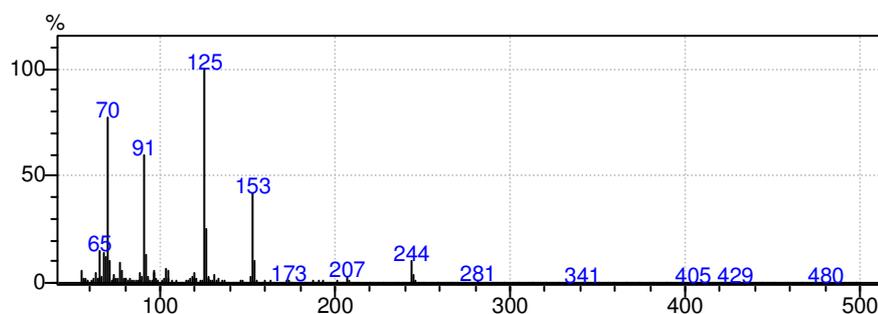


FIGURA 4.146: Espectro de massas obtido da fração no t.r. 34,17 min para *ciclo* (Pro-Phe).

Desta forma, os dados espectrais de RMN  $^1H$  foram comparados com a literatura [FURTADO *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2008] (TABELA 4.12, p. 160) permitindo a identificação da substância como *ciclo* (Pro-Phe) (FIGURA 4.147).

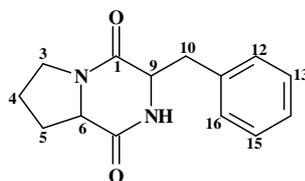


FIGURA 4.147: Estrutura química da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Phe).

TABELA 4.12: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) em comparação com os dados da literatura.

No.	$\delta_{\text{H}}$ (multip. $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{H}}$ [Li <i>et al.</i> , 2008] ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ [Furtado <i>et al.</i> , 2005] ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)
1	-	-	-
2	-	-	-
3	3,53-3,60 ( <i>m</i> )	3,52 ( <i>m</i> ); 3,48 ( <i>m</i> )	3,48 – 3,56 ( <i>m</i> ) 3,33 – 3,39 ( <i>m</i> )
4	1,80-1,91 ( <i>m</i> )	1,80 ( <i>m</i> ); 2,01 ( <i>m</i> )	1,75 – 1,83 ( <i>m</i> )
5	2,36 ( <i>m</i> ) 2,60 ( <i>m</i> )	2,01 ( <i>m</i> ); 2,60 ( <i>m</i> )	1,15 – 1,24 ( <i>m</i> ) 2,04 – 2,12 ( <i>m</i> )
6	4,19 ( <i>t</i> , 5,1 Hz)	4,07 ( <i>t</i> , 7,8 Hz)	4,06 ( <i>ddd</i> , 11,8; 5,8 e 1,8 Hz)
7	-	-	-
8	5,19 ( <i>sl</i> )	5,68 ( <i>sl</i> )	4,56 ( <i>sl</i> )
9	4,19 ( <i>t</i> , 5,1 Hz)	4,28 ( <i>dd</i> , 10,8 e 3,6 Hz)	4,44 ( <i>ddd</i> , 5,0; 4,8 e 1,0 Hz)
10	2,98 ( <i>dd</i> , 13,5; 4,5 Hz) 3,00 ( <i>dd</i> , 13,5; 4,7 Hz)	3,50 ( <i>m</i> ); 2,79 ( <i>dd</i> , 14,4 e 10,8 Hz)	3,14 ( <i>dd</i> , 14,4 e 5,0 Hz) 3,18 ( <i>dd</i> , 14,4 e 4,8 Hz)
11	-	-	-
12 e 16	7,18-7,30 ( <i>m</i> )	7,23 ( <i>d</i> , 7,2 Hz)	7,20 – 7,29 ( <i>m</i> )
13 e 15	7,18-7,30 ( <i>m</i> )	7,35 ( <i>dd</i> , 7,8 e 7,2 Hz)	7,20 – 7,29 ( <i>m</i> )
14	7,18-7,30 ( <i>m</i> )	7,29 ( <i>t</i> , 7,8 Hz)	7,20 – 7,29 ( <i>m</i> )

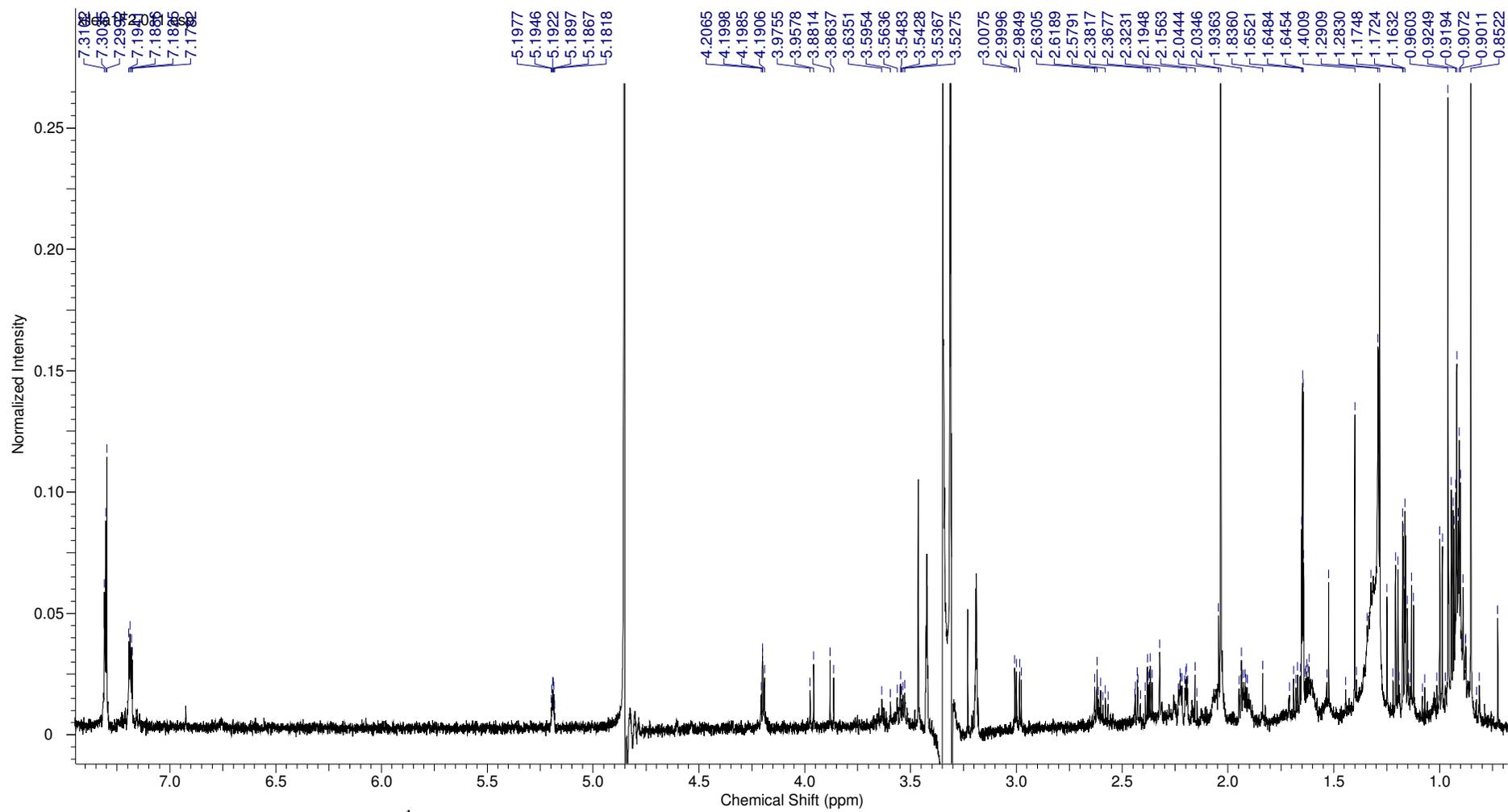


FIGURA 4.148: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OH+H<sub>2</sub>O, 600 MHz) da banda cromatográfica no t.r. 34,17

#### 4.5.7. Determinação estrutural das substâncias *ciclo* (Pro-Phe) e *ciclo* (Phe-Ile) que produz o sinal cromatográfico t.r. 36,40 min

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.154, p. 165) apresentou um tripleto largo em  $\delta$  4,44, integrando para 1H e com constante de acoplamento de 4,7 Hz, e um mutipletto centrado em  $\delta$  4,07, integrando para 1H, característicos de hidrogênios  $\alpha$ -carboxílicos, sugerindo um sistema de anel dicetopiperazínico. Também apresentou dois sinais na região dos aromáticos, multipletos centrado em  $\delta$  7,30 e 7,23, sugerindo unidade benzílica, os quais juntamente a um tripleto em  $\delta$  3,16, com constante de acoplamento de 4,7 Hz, sugeriram a formação da DKPs na presença do resíduo de aminoácido fenilalanina, *ciclo* (Phe-Axx) (FIGURA 4.149).

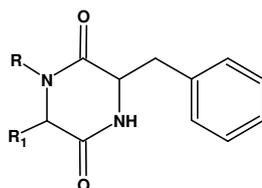


FIGURA 4.149: Proposta estrutural da *ciclo* (Phe-Axx).

Continuando, observa-se multipletos em  $\delta$  3,50 e 3,55, característicos de hidrogênios ligados a carbono contendo heteroátomo, e multipletos centrados em  $\delta$  1,93, 2,16 e 2,32, referentes aos hidrogênios metilênicos, os quais sugerem o resíduo de aminoácido prolina. Desta forma, os dados de RMN  $^1\text{H}$  sugeriram a dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Phe).

No entanto, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do sinal cromatográfico tr 36,40 apresentou outros sinais, um dupletto com constante de acoplamento 6,9 Hz, em  $\delta$  0,99 e um tripleto com constante de acoplamento 7,3 Hz, em  $\delta$  0,95. Além disso, foi observado um dupletto em  $\delta$  3,66 (*d*,  $J=6,2$  Hz), característicos ao resíduo de aminoácido isoleucina. Com isso, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou sinais característicos de dicetopiperazinas *ciclo* (Phe-Axx) (A), *ciclo* (Pro-Axx) (B) e *ciclo* (Ile-Axx) (C) (FIGURA 4.150).

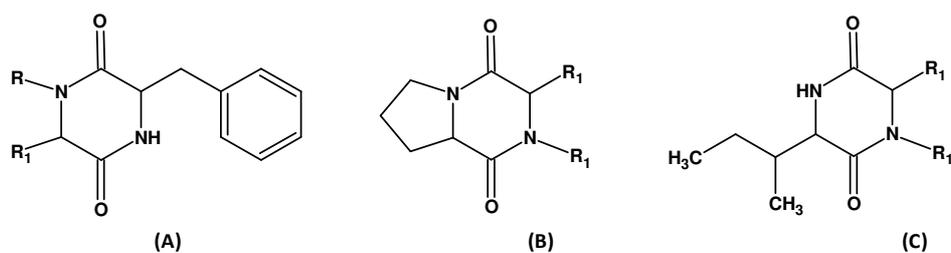


FIGURA 4.150: Possíveis estruturas: *ciclo* (Phe-Axx) (A), *ciclo* (Pro-Axx) (B) e *ciclo* (Ile-Axx) (C).

Com a finalidade de auxiliar a determinação estrutural do sinal cromatográfico t.r. 36,40, a amostra foi submetida a CG-EM. O cromatograma de íons totais (FIGURA 4.151, A) mostrou cinco picos cromatográficos e a partir destes foram obtidos os respectivos espectros de massas (FIGURA 4.151).

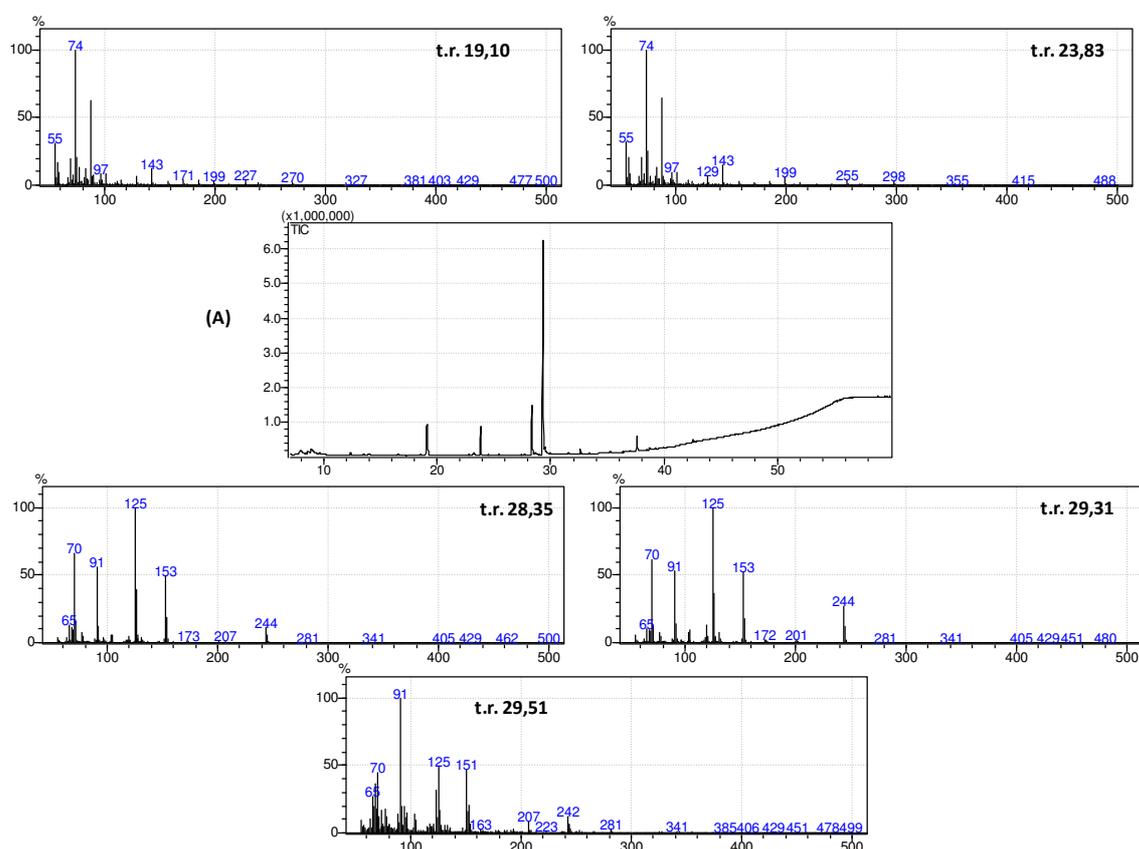


FIGURA 4.151: (A) cromatograma de íons totais e os respectivos espectros de massas obtidos por CG-EM dos picos cromatográficos com t.r. 19,10, 23,83, 28,35, 29,31 e 29,51 min.

O espectro de massas com t.r. 19,10 e 23,83 min. mostrou o íon molecular  $m/z$  270 e 298, estes caracterizados anteriormente como hexadecanoato de metila e 16-metil-heptadecanoato de metila, respectivamente. As bandas cromatográficas no t.r. 28,35 e 29,31 (FIGURA 4.151) indicam que os espectros

de massas dos picos referem-se a dois isômeros com tempo de retenção diferentes na coluna cromatográfica. Em comparação com o EI-MS da literatura [WANG *et al.*, 2010] estes dados sugerem a presença de dois isômeros da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Phe) com íon molecular  $m/z$  244 (FIGURA 4.152).

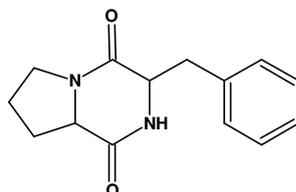


FIGURA 4.152: Diketopiperazina *ciclo* (Pro-Phe) identificada por CG-EM e RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz).

Contudo, a banda cromatográfica em t.r. 29,51 (FIGURA 4.151, p. 163) mostrou no seu espectro de massas fragmentos característicos do resíduo de aminoácido fenilalanina com  $m/z$  91 e 125, no entanto, ao retornar aos sinais de RMN de hidrogênio, este sugeriu a presença de uma unidade isoleucina. Desta forma, os dados sugerem que a provável estrutura é a DKPs *ciclo* (Phe-Ile) (FIGURA 4.153).

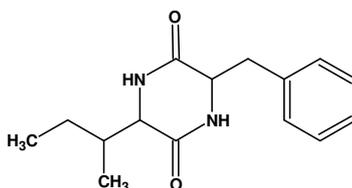


FIGURA 4.153: Proposta estrutural da banda cromatográfica em t.r. 29,51 obtida por CG-EM.

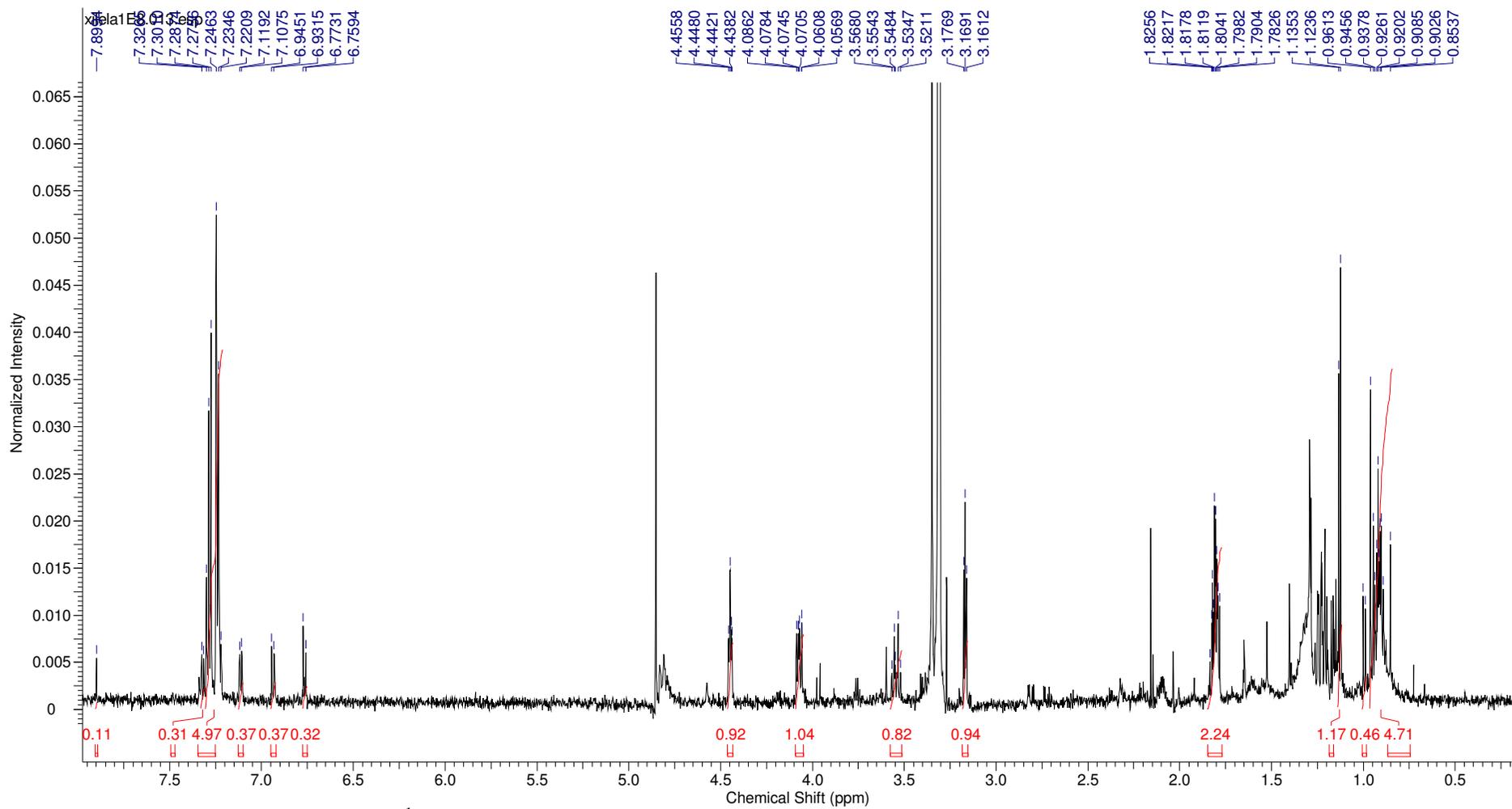


FIGURA 4.154: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$ , 600 MHz) da banda cromatográfica com t.r. 36,40

*Parte*

**5**

*Conclusões*

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho representa um avanço para o grupo de Produtos naturais da UFSCAR, sendo este, o primeiro estudo químico do grupo visando à química da comunicação bacteriana, o qual abrirá caminhos para uma série de estudos na tentativa de interferir nos processos de comunicação intercelular.

A análise dos extratos hexânicos por CG-EM permitiu a identificação de derivados de ácidos graxos e alcalóides dicetopiperazinas (DKPs). A CG-EM se mostrou bastante viável e constituiu uma importante técnica na busca de possíveis moléculas sinalizadoras. Estes resultados confirmam a análise do genoma de *X. fastidiosa*, que sugere a existência de mecanismos de sinalização independentes da acil-homoserinas lactonas e semelhantes aquelas que ocorrem em *Xanthomonas campestris*.

No estudo dos voláteis produzidos pela bactéria *Xylella fastidiosa* utilizando microextração em fase sólida (SPME) foram identificados metil cetonas e álcoois de cadeia longa, particularmente octadecen-2-ol, nonedecen-2-ol, undecan-2-ona, hept-6-ene-2-ona, 2,7-diidroxi octano, tetradecan-2-ona, pentadecan-2-ona, 9-iril-2-hidroxi nonano, 12-iril-2-hidroxi nonano, 2-nonadecanol, 2-uneicosanol, 2-doeicosanol e trieicosan-2-ona.

O uso da técnica por LC-MS foi importante na identificação *on line* das dicetopiperazinas presentes no extrato acetato de etila do sobrenadante da *Xylella fastidiosa*. No qual foram identificadas dicetopiperazinas formados com aminoácidos não proteinogênicos e proteinogênicos. As dicetopiperazinas encontradas foram *ciclo* (Pro-Val), *ciclo* (Val-Phe), *ciclo* (Tyr-Tyr), *ciclo* (Phe-Tyr), *ciclo* (Pro-Phe), *ciclo* (Leu-Leu), *ciclo* (Leu-Ile), *ciclo* (Val-Leu), *ciclo* (Ala-Leu), *ciclo* (Pro-Leu), *ciclo* (Pro-Tyr).

A técnica de LC-SPE-NMR foi extremamente útil na determinação estrutural das dicetopiperazinas e derivados de ácidos graxos. No qual em escala de miligramas do extrato acetato de etila do sobrenadante foram identificadas a *ciclo* (Pro-Leu), ácido *p*-hidroxibenzóico, *ciclo* (Leu-Leu), *p*-etoxibenzoato, *ciclo* (Tyr-Pro), *ciclo* (Tyr-Val), *ciclo* (Pro-Ile), *ciclo* (Phe-Ile), *ciclo* (Pro-Phe), hexadecanoato de metila e 16-metil-heptadecanoato de metila.

Os resultados mostrados neste trabalho serão valiosos na detecção dos sítios receptores para dicetopiperazinas, com grande potencial para estudos de controle da bactéria *Xylella fastidiosa* baseado na bioquímica fundamental.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNUR, P. V. Estudo fitoquímico de *Citrus*: resistência a *Xylella fastidiosa* e interação com *Oncometopia facialis*. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos**. São Carlos, SP.: [s.n.], 2006.
- ADRIANA, F. Ecologia Química em *Maxillariinae*, *Spathodea campanulata* e *Meliponiinae*. Tese – Universidade Estadual de Campinas-IQ. Campinas, SP: [s.n.], 2005.
- AMEUR, R. M. B; MELLOULI, L; CHABCHOUB, F.; FOTSO, S. E BEJAR, S. Purification and structure elucidation of two biologically active molecules from a new isolated *Streptomyces* sp. US 24 strain. **Chem. Nat. Compd.**, 40, 510-513. 2004.
- ANDERSEN, P. C.; BRODBECK, B. V.; ODEN, S.; SHRINER, A.; LEITE, B. Influence of xylem fluid chemistry on planktonic growth biofilm formation and aggregation of *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiol Lett**; 274, 210–217. 2007.
- ATKINSON, S. & WILLIAMS, P. *Quorum sensing* and social networking in the microbial world. **J. R. Society Interface**; 6, 959-978. 2009.
- BASSLER, B. L. Small talk. *Cell-to-cell* communication in bacteria. **Cell**, 109, 421. 2002.
- BERISHA, B.; CHEN, Y. D.; ZHANG, G. Y.; XU, B. Y.; CHEN, T. A. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104 (11), p. 427-433, 1998.
- BREDENBRUCH, F.; NIMTZ, M.; WRAY, V.; MORR, M.; MÜLLER, R.; HAUSSLER, S. Biosynthetic Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines. **Journal of Bacteriology**, v. 187 (11), p. 3630-3635, 2005.
- BRELLES-MARINO, G.; BEDMAR, E. J. Detection, purification and characterization of quorum-sensing signal molecules in plant associated bacteria. **J. Bacteriol.** v. 91 197-209, 2001.
- BULL, S. D.; DAVIES, S. G.; PARKIN, R. M.; SÁNCHEZ-SANCHO, F. The biosynthetic origin of diketopiperazines derived from D-proline. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, 2313-2320. 1998.
- BULTEL-PONCE, V. ; BERGE, J. P. ; DEBITUS, C. ; NICOLAS, J. L. ; GUYOT, M. Metabolites from the Sponge-Associated Bacterium *Pseudomonas* Species. **Marine Biotechnology**, v. 1 (4), p. 384-390, 1999.
- CARRILHO, E.; SIMIONATO, A. V. C.; DA SILVA, D. S.; LAMBAIS, M. R. Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS. **J. Mass Spectrom.** 42: 1375–1381. 2007
- CARVALHO, L. M. J. Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Pérola: obtenção e avaliação de suco clarificado por membranas. **Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.** 209f. : il. 2004.
- CHANG, C. J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J. M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v.27, p. 137-142, 1993.
- CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G.R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 101, 5048-5052. 2004.

- CHRISTIE, W. W. *Mass Spectra of Methyl Esters of Fatty Acids: Part 1. Normal Saturated Fatty Acids*, <http://www.lipidlibrary.co.uk>. Acessado em janeiro de 2011.
- CHRISTIE, W. W. *Mass Spectra of Methyl Esters of Fatty Acids: Part 2. Branched-chain Fatty Acids*, <http://www.lipidlibrary.co.uk>. Acessado em janeiro de 2011.
- COLLADO, I. G.; GARCÍA-PAJÓN, C. M. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Natural Product Reports*, v.20 (4), p. 426-431, 2003.
- DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*; 28, 261–289. 2004.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64 (4), p. 847-867, 2000.
- DAVIS, M. J.; ALEX H. PURCELL, and SHERMAN V. THOMSON. Pierce's Disease of Grapevines: Isolation of the Causal Bacterium. *Science*, v. 199, p. 75-77, 1978.
- DAVIS, M. J.; FRENCH, W. J.; SCHAAD, N. W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology*, 6 (5), p.309-314, 1981.
- DE KIEVIT, T.R., AND IGLEWSKI, B.H. Bacterial quorum-sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* 68:4839-4849. 2000.
- De OLIVEIRA, C. G. Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum*. *Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina* para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. 2005.
- De ROSA, S.; MITOVA, M.; TOMMONARO, G. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. *Biomolecular Engineering*, v.20, p. 311-316, 2003.
- De SOUZA, A. A. Análise comparativa da expressão de genes de *Xylella fastidiosa* associados a patogenicidade e formação de biofilme. *Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas*. Campinas, SP : [s.n.], 2004.
- De SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; YANAI, G. M.; MUTO, N. H.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; MACHADO, M. A. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, p. 341-353, 2004.
- De SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; PEREIRA, E. O.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* *in plant* and *in vitro*. *Current Microbiology*, v. 50 (4) p. 223-228, 2005.
- DEGRASSI, G.; AGUILAR, C.; BOSCO, M.; ZAHARIEV, S.; PONGOR, S.; VENTURI, V. Plant Growth-Promoting *Pseudomonas putida* WCS358 Produces and Secretes Four Cyclic Dipeptides: Cross-Talk with Quorum Sensing Bacterial Sensors. *Current Microbiology*, v. 45 p. 250–254, 2002.
- DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; GARCÍA-PARRA, J.; RAMÍREZ, R. Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry: Analytical Methods*; 118, 182–189. 2010.
- DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; HE, J.; MINDRINOS, M. M.; TOMPKINS, R. G.; RAHME, L. G. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101 (5), p. 1339-1344, 2004.

DIGGLE, S. P.; MATTHIJS, S.; WRIGHT, V. J.; FLETCHER, M. P.; CHHABRA, S. R.; LAMONT, I. L.; KONG, X.; HIDER, R. C.; CORNELIS, P., CAMARA, M.; WILLIAMS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in *Quorum Sensing* and Iron Entrapment. *Chemistry & Biology*; 14, 87–96. 2007.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganism. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 15, p. 167-193, 2002.

FARAG, M. A.; RYU, C-M.; SUMNER, L. W.; PARE, P. W. GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*; 67, 2262–2268. 2006.

FUNDECITRUS. Relatório Anual 2009. Acessado em 23 de março de 2011. [http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/FCKEditor/file/pdf/relatorio\\_anual\\_2009.pdf](http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/FCKEditor/file/pdf/relatorio_anual_2009.pdf)

FURTADO, N. A. J. C.; VESSECCHI, R.; TOMAZ, J. C.; GALEMBECK, S. E.; BASTOS, J. K.; LOPES, N. P.; CROTTI, A. E. M. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*, v. 42, p. 1279-1286. 2007.

GAI, C.S.; Comunidade bacteriana associadas às cigarrinhas (Hemíptera: Cicadellidae), insetos vetores de *Xylella fastidiosa*. *Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*. Piracicaba, SP.: [s.n.], 2006.

GINZ, M.; ENGELHARDT, U. H. Identification of new diketopiperazines in roasted coffee. *Eur. Food Res. Technol.*, v.213, p. 8-11, 2001.

GRAM, L.; CHRISTENSEN, A. B.; SØREN MOLIN, L. R.; GIVSKOV, M. Production of Acylated Homoserine Lactones by Psychrotrophic Members of the *Enterobacteriaceae* Isolated from Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65 (8), p. 3458-3463, 1999.

GUILHABERT, M.R. AND KIRKPATRICK, B.C. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute a biofilm maturation to *X. fastidiosa* and colonization and attenuate virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v.18, p.856-868, 2005.

HE, Y. & ZHANG, L. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 842–857. 2008.

HOFMANN, T.; STARK, T. Structures, Sensory Activity, and Dose/Response Functions of 2,5-Diketopiperazines in Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma Cacao*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 7222-7231. 2005.

HOLDEN, M. T. G., CHHABRA, S. R., DE NYS, R., STEAD, P., BAINTON, N. J., HILL, P. J., MANEFIELD, M., KUMAR, N., LABATTE, M., ENGLAND, D., RICE, S., GIVSKOV, M., SALMOND, G. P. C., STEWART, G., BYCROFT, B. W., KJELLEBERG, S. A., AND WILLIAMS, P. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria, *Mol. Microbiol.* 33, 1254-1266. 1999.

HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 27, p. 271-290, 1989.

HOPKINS, D. L.; MOLLENHAUER, H. H. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. *Science*, v. 179, p. 298-300, 1973.

- LABOWS, J. N.; MCGINLEY, K. J.; WEBSTER, G. F.; LEYDEN, J. J. Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*; 12 (4), 521-526. 1980.
- LAM, H; OH, D-C.; CAVA, F.; TAKACS, C. N.; CLARDY, J.; DE PEDRO, M. A.; WALDOR, M. K. D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria. *Science* ; Vol. 325 no. 5947 p. 1552-1555. 2009.
- LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIM-Fº, A.; VILDOSO, C. I. A.; DELLA-COLETTA Fº, H. Fungos, procariotas e doenças abióticas. *Citros*, 1a Edição, FAPESP, 2005.
- LAZDUNSKI, A. M.; VENTRE, I. & STURGIS, J. N. Regulatory Circuits and Communication in Gram-Negative Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 581-592, 2004.
- LEITE JUNIOR, R. P.; LEITE, R. M. V. B. C. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 17, p. 7, 1991.
- LEU, L. S.; SU, C.C. Isolation, cultivation and pathogenicity of *xylella fastidiosa* the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Disease*. v. 77, p. 642-646, 1993.
- LONCHAMP, J.; BARRY-RYAN, C.; DEVEREUX, M. Identification of volatile quality markers of ready-to-use lettuce and cabbage. *Food Research International*; 42, 1077-1086. 2009.
- MACHAN, Z. A.; TAYLOR, G. W. ; PITT, T. L. ; COLE, P. J. ; WILSON, R. 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 30 (5), p. 615-623, 1992.
- MARQUES L. L. R., CERI H., MANFIO G. P., REID D. M., AND OLSON M. E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. *Plant Disease*, v. 86, p. 633-638, 2002.
- MARSAIOLI, A. J.; TRIGO, J. R.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. Ecologia Química. *Chemkeys* – Liberdade para aprender. Disponível em: <http://www.portalmedquimica.com.br/arquivos/articleI.php.pdf>, acessado em 13 de abril de 2011.
- MASSENA, R. V. Interações entre plantas e microrganismos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (*Embrapa Agrobiologia*. Documentos, 194). 2005. 24 p..
- MICHAEL, J. P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. **Previous review:** *Natural Product Reports*, 14 (11): p. 605-618, 1997.
- MICHAEL, J. P., Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. **Previous review:** *Natural Product Reports*, v. 22, p. 627-646, 2005.
- MILLAR, K. F., HAYNES, J. G. **Methods in Chemical Ecology**. USA: Chapman & Hall, 1998.
- MOON, S. S.; KANG, P. M.; PARK, K. S.; KIM, C. H. Plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinones from *Pseudomonas cepacia*. *Phytochemistry*, v. 42 (2), p. 365-368, 1996.
- MORI, K. Semiochemicals: Synthesis, Stereochemistry and Bioactivity. *Eur. J. Org. Chem.*, 1479-1489, 1998.
- MOSSIALOS, D. ; MEYER, J. M. ; BUDZIKIEWICZ, H. ; WOLFF, U. ; KOEDAM, N. ; BAYSSE, C. ; ANJIAH, V. ; CORNELIS, P. Quinolobactin, a New Siderophore of

*Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the Production of Which Is Repressed by the Cognate Pyoverdine. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66 (2), p. 487-492, 2000.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.H. & LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.101, p.1737-1742, 2004.

NICKERSON, K. W.; ATKIN, A. L.; HORNBY, J. M. Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3805-3813. 2006.

NORDLUND, D. A., LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol.*, v. 2, 211-220, 1976.

OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.; OTOBONI, A.M.M.B.; LEMOS, E.G.M.; SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.236, p. 313-318, 2004.

PARSEK, M. R. & GREENBERG, E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Review: TRENDS in Microbiology*, v.13 (1), p. 27-33, 2005.

PESCI, E. C.; MILBANK, J. B. J.; PEARSON, J. P.; MCKNIGHT, S.; KENDE, A. S.; GREENBERG, E. P.; IGLEWSKI, B. H. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, p. 11229–11234, 1999.

POMINI, A. M. Acil-homosserina lactones produzidas pelas bactérias fitopatogênicas *Pantoea ananatis* e *Methylobacterium mesophilicum* e defesa química no opiliaio *Hoplobunus mexicanus*. *Tese* – Universidade Estadual de campinas – IQ. Campinas, SP: [s.n], 2009.

PONCE, A. R. Características fenotípicas controladas pelo sistema *quorum sensing* em *Enterobacter cloacae*. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. xii, 57f. : il. 2007.

PUPO, M. T.; COUTINHO GALLO, M. B.; VIEIRA, P. C. Biologia Química: Uma Estratégia Moderna para a Pesquisa em Produtos Naturais. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 6, 1446-1455, 2007

RIBEIRO, R. V. Influência da temperatura na fotossíntese de laranja “pêra” com clorose variegada de citros. *Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*. Piracicaba, SP.: [s.n.], 2002.

ROITMAN, J. N.; MAHONEY, N. E.; JANISIEWICZ, W. J.; BENSON, M. A new chlorinated phenylpyrrole antibiotic produced by the antifungal Bacterium *Pseudomonas cepacia*. *J. Agric. Food Chem.* v. 38, p. 538, 1990.

RYAN, R. P. & DOW, J. M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Review: Microbiology*, v. 154, p. 1845-1858. 2008.

RYAN, R. P. & MAXWELL, D.J. Communication with a growing family: *diffusible signal factor* (DSF) signaling in bacteria. *Trends in Microbiology*. v. 19, n 3, p 145-152. 2011.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*. v. 4, p. 219-223, 2003.

SCHERTZER, J. W.; MEGAN L. BOULETTE, M. L.; WHITELEY, M. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends in Microbiology*. Vo.17, No.5, p. 189-195. 2009.

SCHOLLER, C.; MOLIN, S.; WILKINS, K. Volatile Metabolites from Some Gram-Negative Bacteria. *Chemosphere*; v. 35, n. 7, p. 1487-1495. 1997.

- SHANK, E. A.; KOLTER, R. New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology*. 12:205–214. 2009.
- SIMPSON, A.J.G., et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v. 406, p. 151-159, 2000.
- SMITH, G. G.; REDDY, G. S.; BOON, J. J. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of the Curie-point Pyrolysis Products of Some Dipeptides and their Diketopiperazine. *Journal Chemical Society Perkin Trans. II*, v., p. 203-211, 1988.
- SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *J Food Prot.* 67(5):1053-70. 2004.
- SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. *Journal Chromatography A*, v. 721, p. 3-14, 1996.
- SOUZA, L. C. A. Produção e caracterização de mutantes do operom *gum* de *Xylella fastidiosa*. *Dissertação (Mestrado)* – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP, 2002.
- SWIFT, S.; DOWNIE, J.A.; WHITEHEAD, N.A.; BARNARD, A.M.; SALMOND, G.P.; WILLIAMS, P. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microb Physiol.* 2001;45:199-270.
- SWIFT, S.; WHITHERS, H.; WILLIAMS, P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-Negative bacteria. *Curr. Op. Microbiol.*, 4, 186-193, 2001.
- TAGA, M. E.; BASSLER, B. L. Chemical Communication among bacteria. *Proceedings of the National academy of Sciences of USA*, v.100, p. 14549-14554, 2003.
- TERESA, R. K. & BARBARA, H. I. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Minireview*, American Society for Microbiology: *Infection and Immunity*. Vol. 68, No. 9, p. 4839–4849. 2000.
- VEKEY, K. Mass Spectrometry and Mass-selective Detection in Chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 921, p. 227-236, 2001.
- XING, J., YANG, Z., BEIBEI, L., XIANG, L. Rapid screening for cyclo-dopa and diketopiperazine alkaloids in crude extracts of *Portulaca oleracea* L. using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 1415–1422. 2008.
- WALKER, T. S.; PAL BAIS, H.; DÉZIEL, E.; SCHWEIZER, H. P.; RAHME, L. G.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiology*, v. 134 (1), p. 320-331, 2004.
- WANG, J-H.; QUAN, C-S; QI, X-H; LI, X.; FAN, S-D. Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 396:1773–1779. 2010.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; JUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* new-genus new-species: Gram-negative xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.37, n.2, p.136-143, 1987.
- WHITEHEAD, N. A., BARNARD, A. M. L., SLATER, H., SIMPSON, N. J.L., SALMOND, G. P. C. Quorum sensing in Gram negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 365-404, 2001.

Y. HOMMA, Z. SATO, F. HIRAYAMA, K. KONNO, H. SHIRAHAMA, T. SUZUI, SOIL. *Biol. Biochem.*, v. 21, p. 723, 1989.

YA-WEN HE & LIAN-HUI ZHANG. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev*; 32, 842–857. 2008.

YORINORI, M.A., RIBAS, A.F., UENO, B., MASSOLA JÚNIOR, N.S. & LEITE JÚNIOR, R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 427-430, 2003.

# CAPÍTULO II

**“Estudo Comportamental de *Diaphorina citri*  
Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)”**

*Parte*

**1**

*Introdução*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A Citricultura Brasileira

O Brasil tornou-se na década de 80, com mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas em seu território, o maior produtor mundial de citros. Em 2007, a área colhida chegou a 779.5 mil hectares, com uma produção em torno de 447.713.137 caixas. A maior parte desta produtividade destina-se à indústria de suco concentrada no Estado de São Paulo, responsável por 80,3% da produção, oriunda da extensa área cultivada, de 565,7 mil hectares, ou seja, correspondente a 73% de toda área colhida [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2008] [TURGANTI, 2008].

A citricultura é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro, gerando cerca de 400 mil empregos diretos, com faturamento médio de três bilhões de dólares por ano. Historicamente, a citricultura nacional teve profundas mudanças devido a problemas fitossanitários, desde a troca de porta-enxerto suscetíveis à gomose e à tristeza, até a obrigação de produção de mudas em ambiente protegido, provocados pela necessidade de evitar insetos vetores. [SASSERON, 2008].

Hoje, dentre as principais ameaças à citricultura, destaca-se o “Huanglongbing” (HLB) ou “Greening” dos citros, considerada a doença mais destrutiva dos citros no mundo, pela severidade dos sintomas, potencial de progressão da doença e por afetar todas as variedades comerciais [BOVÉ, 2006].

### 1.1.1. “Huanglongbing” (HLB) ou “Greening”

O HLB está presente em mais de 40 países distribuídos pelos continentes Asiático, Africano, Oceania e Americano [BOVÉ, 2006]. Após cinco anos da detecção do primeiro foco da doença no Brasil, o HLB encontra-se disseminada por quase todos os municípios produtores de citros de São Paulo

[FUNDECITRUS, 2009], o primeiro registro foi em 2004, na região de Araraquara, Estado de São Paulo [COLETTA-FILHO *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005].

Mundialmente esta doença está associada a bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter*, Gram-negativas restritas aos vasos do floema de plantas, não cultiváveis, pertencentes à subdivisão  $\alpha$  do grupo Proteobacteria [BOVÉ, 2006]. Atualmente são conhecidas três espécies de bactérias causadoras do HLB: *Candidatus Liberibacter africanus*, *Ca. L. americanus*; e *Ca. L. asiaticus*. [COLETTA-FILHO *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005; YAMAMOTO *et al.*, 2006].

No Brasil são conhecidas duas espécies deste gênero, *Ca. L. asiaticus* e a nova espécie *Ca. L. americanus*. A disseminação da doença se dá por enxertia de material infectado ou por psilídeos [TURGANTI, 2008]. Apenas duas espécies de insetos são conhecidas como capazes de transmitir essas bactérias, *Trioza erytreae* Del Guercio (Hemiptera: Triozidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) [HALBERT & MANJUNATH, 2004]. O psilídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama, relatado no Brasil há 60 anos, está estabelecido nos pomares do Estado de São Paulo e é o vetor dessas bactérias [TURGANTI, 2008].

O manejo realizado no Brasil é semelhante ao que tem sido realizado para clorose variegada dos citros (CVC) e é baseada em três medidas fundamentais: uso de mudas sadias, arranquio de árvores contaminadas de qualquer idade e severidade de sintomas e controle dos vetores por meio do monitoramento e aplicação de inseticidas [FUNDECITRUS, 2007]. Para uma melhor adequação desse método de controle biológico, há necessidade de alterações no método convencional de controle das pragas que é feito, basicamente, pela aplicação de agrotóxicos não-seletivos [PADULLA, 2007].

## 1.2. *Diaphorina citri* Kuwayama

A presença do psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) nos pomares de citros no Brasil tem gerado grande preocupação nos últimos anos, com a detecção da presença da bactéria *Candidatus Liberibacter americanus*, agente causal da doença conhecida por “greening” ou Huanglongbing (HLB), nas principais regiões citrícolas do estado de São Paulo em 2004 [LOMBARDI DE, 2008].

A *Diaphorina citri* é um membro da família Psyllidae que apresenta ciclo de vida curto e alta fertilidade, pertencete à ordem Hemíptera e família Psyllidae, foi descrita ocorrendo em citros em Schinchik, no Taiwan em 1907. São insetos diminutos, quando adulto, cerca de 2 mm de comprimento, de coloração marrom-claro quando novo e manchado de escuro quando mais velho, apresenta asas transparentes com manchas pretas nas anteriores (FIGURA 1.1).

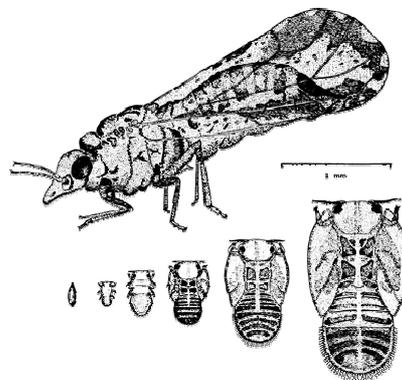


FIGURA 1.1: Diagrama Ilustrativo de vários estágios da *Diaphorina Citri*. Fonte: [http://2.bp.blogspot.com/\\_YRYBZdiMij0/SBxrp6YA3VI/AAAAAAAAABDs/C1u\\_WgJp9k/s400/a\\_cpsyllid.gif](http://2.bp.blogspot.com/_YRYBZdiMij0/SBxrp6YA3VI/AAAAAAAAABDs/C1u_WgJp9k/s400/a_cpsyllid.gif)

Os adultos em temperaturas mais altas vivem em média de 80 a 90 dias, apresentando um longo período para adquirir bactérias [AUBERT, 1987], e em temperaturas baixas este período pode ser estendido para até nove meses [YANG *et al.* 2006]. As formas jovens são achatadas, pouco convexas e apresentam pernas curtas. As ninfas mais evoluídas possuem tecas alares geralmente largas, do lado do tórax, aumentando a largura do corpo

[YAMAMOTO *et al.*, 2001]. Sugam a seiva de brotações novas e, devido às picadas sucessivas, causam elevado dano, enrolando as folhas, retorcendo ou engruvinhando os brotos e causando a morte da gema apical, impedindo o crescimento normal das plantas [YAMAMOTO *et al.* 2001], embora não seja uma praga-chave dos citros.

Os únicos hospedeiros registrados para *D. citri*, pertencem aos gêneros *Citrus* e *Murraya*, ambos da família Rutaceae [HALBERT; MANJUNATH, 2004]. Contudo, não são todas *Murraya* spp. que permitem o completo desenvolvimento de *D. citri*, ocorrendo em alguns casos, somente a postura, sem que haja o desenvolvimento ninfal [AUBERT, 1987]. Por outro lado, a planta murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack é mencionada freqüentemente na literatura como hospedeiro preferencial de *D. citri* [AUBERT, 1987; IKEDA & ASHIHARA, 2008], na qual o inseto pode encontrar condições adequadas para alimentação, reprodução e desenvolvimento [NAVA *et al.*, 2007]. Aparentemente, as contínuas brotações de *M. paniculata* contribuem para a manutenção de altas populações de *D. citri*, especialmente quando não há brotações disponíveis nos pomares de citros [TSAI; LIU, 2000].

Apesar de ser considerada uma praga de citros, sua ocorrência em murta (*Murraya paniculata*) foi descrita pela primeira vez em 1975, por Cheema e Kapur. Outras plantas da família das rutáceas são tidas como hospedeiras desse inseto, tais como *Murraya keonegii*, *Antocarpus heterophyllus*, *Aegle marmelos*, *Afraegle gabonensis*, *A. paniculata*, *Atalantia* sp., *Citropsis gilletiana*, *C. schweinfurthii*, *Clausena anisum-olens*, *C. excavata*, *Eremocitrus glauca*, *E. hybrid*, *Merrillia caloxylon*, *Microcitrus australis*, *M. papuana*, *Microcitronella* sp., *Naringi crenulata*, *Pamburus missionis*, *Toddalia asiatica*, *Vepris lanceolata*, *Zanthoxylum fagara* e *Calodendrum capense* [PADULLA, 2007]. Seu hospedeiro preferencial é a planta ornamental *Murraya paniculata*, conhecida como jasmim-daranja (FIGURA 1.2, p. 182).



FIGURA 1.2: Hospedeira preferencial (Murta) do psilídeo *diaphorina citri*. Fonte: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Murraya\\_paniculata.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Murraya_paniculata.jpg)  
[http://www.gfmer.ch/TMCAM/Atlas\\_medicinal\\_plants/Images/mp0095.jpg](http://www.gfmer.ch/TMCAM/Atlas_medicinal_plants/Images/mp0095.jpg)

A bactéria infecta a maioria das espécies cultivadas de citros, porém existem diferenças de suscetibilidade entre variedades e cultivares. As espécies de citros que apresentam maior suscetibilidade à doença, enumeradas por McClean & Schwarz (1970), são: *Citrus sinensis* (laranja doce); *C. reticulata* (tangerina); *C. sinensis* x *C. reticulata* (tangor); *C. limon* (limão); *C. paradisi* (pomelos); *C. limonia* (limão cravo); *C. limettioides* (lima da pérsia); *C. jambhiri* (limão rugoso); *C. medica* (cidra) [COELHO & MARQUES, 2002].

Na folha o sintoma mais característico da doença são manchas com coloração amarelo pálido, sem uniformidade. Os frutos são frequentemente pequenos e deformados, sendo que a maturação inicia-se pela região do pedúnculo, ao contrário da normal que se inicia pela região estilar (FIGURA 1.3). O suco desses frutos apresenta baixo teor de sólidos solúveis e alto teor de acidez, e as sementes não são viáveis [YAMAMOTO *et al.*, 2001].



FIGURA 1.3: Sintomas característicos em citros causados pelo greening. Fonte: <http://fundecitrus.com.br/doencas/images/greening>

Através de estudos realizados pela ecológica química, tem-se procurado encontrar produtos de origem biológica que atuem somente sobre as pragas alvo, favorecendo o controle biológico natural. A grande preocupação com o *greening* ("Huanglongbing") no Brasil tem exigido o esforço de pesquisadores na busca de meios para minimizar os problemas com a referida doença. A busca para entender interação psilídeo *Diaphorina citri* e hospedeiro (citros) é uma das metas essenciais na pesquisa em andamento, assim fornecendo subsídios para obtenção de um método biorracional de controle baseado na bioquímica fundamental do inseto-planta.

### **1.3. Voláteis na Seleção Hospedeiras**

Em geral as folhas jovens das plantas liberam grandes quantidades de compostos voláteis, que por sua vez podem influenciar no comportamento dos insetos. Insetos sugadores, como os psilídeos dependem dessas brotações para suprir suas necessidades nutricionais e de sua prole. Portanto, plantas com constantes brotações como *M. paniculata*, provavelmente, possuem alta produção de voláteis, que podem ser atrativos para *D. citri*. Assim, muitos dos compostos voláteis produzidos por plantas ou insetos, podem interferir nas relações ecológicas, tanto dos organismos que os emitem, quanto daqueles que os recebem, mediando, complexas interações tróficas e reprodutivas [NORONHA JUNIOR, 2010].

Estudos têm demonstrado que a *D. citri* são atraídos naturalmente as cores verde e amarelo, relatado por Wenninger *et al.* (2009), a capacidade de correlacionar cores com odor demonstram a habilidade de reconhecer a estímulos de seu hospedeiro e diferenciá-lo de vegetação circundante [PATT & TAMOU, 2010]. A atratividade de escolha a odores de plantas de *D. citri* é dependente de sexo, status de acasalamento, e espécies vegetais [WENNINGER *et al.*, 2009]. O psilídeo *D. citri* ovoposita e desenvolve-se exclusivamente sobre

brotações novas, assim, seu ciclo de vida é inteiramente ligado ao padrão de crescimento das plantas hospedeiras [PATT & TAMOU, 2010].

Os voláteis emitidos pelas plantas infectadas por fitopatógenos também têm se mostrado importantes mediadores das relações entre plantas e insetos vetores, promovendo alterações comportamentais nestes últimos. A emissão desses voláteis, em alguns casos, pode tornar as plantas infectadas mais atrativas aos vetores favorecendo assim a disseminação do patógeno [MAUCK; DE MORAES; MESCHER, 2010], sendo assim, Noronha Junior (2010) relatou uma maior atratividade do psilideo a espécies de plantas infectadas com a doença, assim como, também verificou uma diferença nas respostas macho e fêmea frente aos voláteis de plantas.

As relações entre um fitopatógeno, planta hospedeira e inseto vetor mediadas por voláteis de plantas são bastante complexas. O conhecimento desse sofisticado mecanismo de comunicação pode resultar na descoberta de novos compostos voláteis, passíveis de uso no manejo comportamental desses insetos, transmissores de fitopatógenos. Além de compostos atrativos, existem voláteis de plantas com grande potencial repelente aos insetos.

*Parte*

# **2**

*Objetivos*

## 2. PROPOSIÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na agricultura atual, é fundamental o desenvolvimento de táticas que aprimorem não somente o monitoramento, mas o controle de pragas, através do emprego de métodos que eliminem ou reduzam o uso de agrotóxicos, adequando-se, desta forma, as exigências estabelecidas pelas normas da Produção Integrada. Neste sentido, a ecologia química busca alternativas para o desenvolvimento de novas tecnologias auto-sustentáveis, um novo paradigma imposto a ciência pela preservação do meio ambiente.

O conhecimento das alterações comportamentais em *D. citri*, promovidas por voláteis de plantas, representam uma alternativa de novas estratégias para o manejo desta praga, seja mediante a confecção de iscas atrativas, compostos repelentes ou até mesmo por meio da manipulação dos processos bioquímicos que induzem ou regulam a produção de voláteis nas plantas. Uma verdadeira guerra está sendo travada pela citricultura brasileira contra o *greening*, atualmente a mais devastadora doença dos citros. É preciso cada vez mais ampliar os conhecimentos sobre o *greening*, sendo assim, avaliar a resposta olfatométrica de *D. citri* aos óleos essenciais de 21 genótipos de *Citrus*, gêneros afins e de *Murraya paniculata* (L.) Jack (falsa-murta) foi uma estratégia adotada para diferenciar a seleção hospedeira deste psílídeo frente a hospedeiros de rutáceas.

## 2.1. Objetivos Específicos

• Obter e identificar a composição química dos óleos essenciais de 21 espécies de *Citrus*.

- *Citrus sinensis* (L.) Osbeck: laranjas: Pêra, Natal, Valência, Bahia e Hamlin;
- *Citrus reticulata* Blanco: tangerinas: Cravo e Ponkan;
- *Citrus deliciosa* Ten.: mexerica-do-Rio;
- *Citrus limettioides* Tanaka: lima-da-Pérsia;
- *Citrus latifolia* Tanaka: limão Tahiti;
- *Citrus paradisi* Macfad.: pomelo Marsh seedless;
- *Citrus limon* (L.) Burm. f.: limão Siciliano;
- *Citrus aurantium* L.: laranja azeda São Paulo;
- *Citrus grandis* Osbeck: toranja doce;
- *Citrus medica* L.: cidra comum;
- Híbridos de Citrus: Tangor Murcott, citrumelo Swingle, citrange Troyer e um citrandarin;
- Gêneros afins: Poncirus, Fortunella.

• Avaliar a resposta olfatométrica de *D. citri* aos óleos essenciais das folhas de 21 espécies de *Citrus* e gêneros afins e de *Murraya paniculata* (L.) Jack (falsa-murta).

*Parte*

**3**

*Metodologia*

### **3. METODOLOGIA**

O trabalho foi realizado em colaboração ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba e no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, pertencente ao IAC, em Cordeirópolis.

#### **3.1. Materiais e Métodos**

##### **3.1.1. Obtenção dos insetos e plantas**

Para a padronização da idade dos psilídeos nas faixas etárias adequadas aos bioensaios, os insetos recém emergidos foram separados nas gaiolinhas de desenvolvimento ninfal. Deste modo, nas épocas de realização dos bioensaios, todos os adultos foram coletados diariamente, permanecendo na gaiola, apenas as ninfas.

##### **3.1.2. Bioensaios de olfatométria**

Os bioensaios utilizando apenas dois odores foram realizados a fim de discriminar a atratividade. Assim, para verificar o efeito dos voláteis das plantas sobre o comportamento de *D. citri* foi utilizado um olfatômetro ‘Y’ constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (15 x 3 cm) formando um ângulo de 120 aos quais foram conectadas câmaras contendo os tratamentos a serem testados. O fluxo de ar foi gerado por uma bomba de vácuo (FIGURA 3.1, F, p. 190) conectada ao olfatômetro, que permitiu a passagem do ar pelos tubos laterais e a chegada dos odores ao tubo principal. O fluxo utilizado foi de 0,1 L/min nas extremidades da entrada de ar.

Todas as conexões entre o olfatômetro e as câmaras contendo os tratamentos foram feitas com PTFE (Teflon®), e o ar presente no sistema foi inicialmente filtrado por um carvão ativado (FIGURA 3.1, B, p. 190) e

umidificado (FIGURA 3.1, D), sendo ao final desumidificado em sílica gel (FIGURA 3.1, E) e eliminado para uma área externa à sala de bioensaios. Em cada braço do olfatômetro foi disponibilizado um campo de odor, possibilitando assim a livre escolha dos psilídeos em relação aos tratamentos.

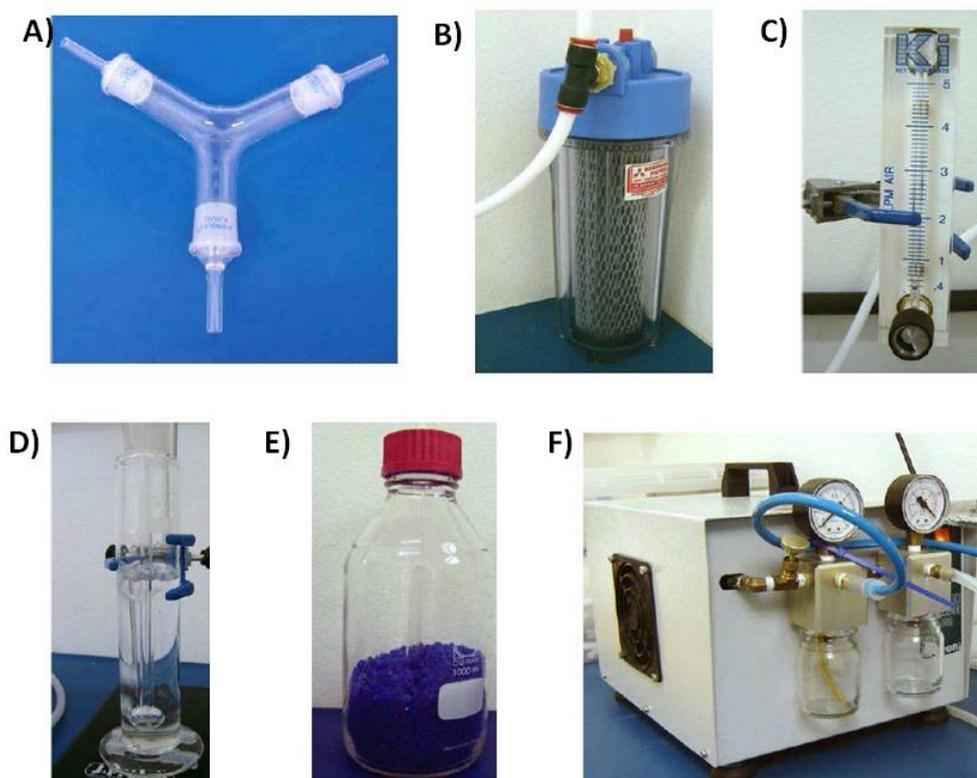


FIGURA 3.1: Equipamentos utilizados no sistema de olfatometria: (A) Tubo “Y” (arena); (B) Filtro de carvão; (C) Fluxometro; (D) Umidificador; (E) Desumificador com grânulos de sílica; (F) Bomba de Vácuo. Figura disponível em NORONHA JUNIOR, 2010.

## 3.2. Procedimentos Experimentais

### 3.2.1. Obtenção e identificação dos Óleos Essências

#### 3.2.1.1. Extração do óleo essencial

Na realização da extração do óleo essencial foi necessário inicialmente, determinar o tempo necessário de extração pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado (FIGURA 3.2, p. 191). Assim, extraíram-se os óleos essenciais das folhas (18,50 g), aquecidas à temperatura de ebulição da água (*ca.* 4 horas); ao sistema,

adicionou-se éter de petróleo no extrator para que todo composto volatilizado permanecesse miscível ao óleo e não retornasse ao balão e nem saísse do sistema, para evitar a perda do mesmo. Após coletado, o óleo foi mantido em um congelador para que não houvesse evaporação do mesmo.

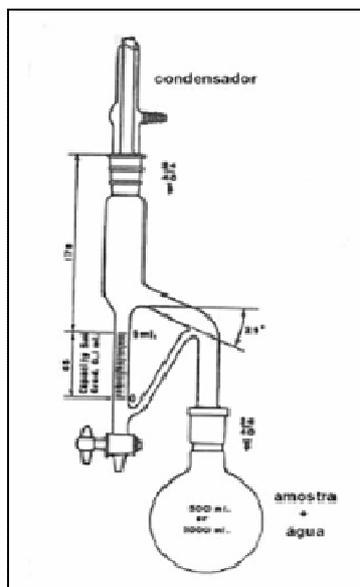


FIGURA 3.2: Figura ilustrativa do aparato tipo clewenger usado para hidrodestilação.

### 3.2.1.2. Análise química do óleo essencial

Os óleos essenciais foram analisados por CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa) com o aparelho Shimadzu QP 5000 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida de dimetilpolisiloxano AT-5ms (30mm x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) e carregado com gás Hélio com um fluxo de 1,2  $\mu$ L/min e temperatura programada de 50°C – 150°C na velocidade de 5°C/min e 150°C – 260°C na velocidade de 10°C/min, uma isoterma de 260°C por 15 min. O injetor e detector foram mantidos a 250°C e 280°C, respectivamente. A identificação dos compostos foi realizada com base na comparação dos Índices de retenção calculado de acordo com Van den dool & Kratz, 1963 e por comparação com Índice de retenção da literatura [ADAMS, 2001], bem como através comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados do sistema CG-EM.

### **3.2.1.3. Bioensaios de olfatometria**

#### **Etapa 1: Otimização do sistema**

Com base em testes preliminares o período de tempo de 15 minutos foi estabelecido para a resposta dos psilídeos. Uma simulação da propagação do odor foi feita para visualizar a distribuição da pluma dentro do sistema. Para isto, ácido clorídrico e hidróxidos de amônia foram misturados. Os testes foram otimizados utilizando os óleos essenciais de Murta, hospedeira preferencial do psilídeo *D. citri*.

#### **Etapa 2: Bioensaios**

Visando-se conhecer as respostas olfativas de *D. citri* aos estímulos das plantas (Rutaceae), machos ou fêmeas, com 4 a 8 dias de idade foram expostos em grupos de 10 indivíduos simultaneamente no olfatômetro 'Y'. Tratamentos: (i) Óleo Essencial (óleo + solvente); (ii) Solvente extrator (controle). Foram realizadas 10 repetições para cada tratamento. As respostas comportamentais de *D. citri* foram registradas em tempos de 15 minutos, contados a partir do início de cada bioensaio. A cada repetição o olfatômetro foi girado em 180° para evitar um possível condicionamento dos insetos em relação ao ambiente. Do mesmo modo, após cada bioensaio, tanto o olfatômetro quanto os tubos laterais e cubas de vidro foram lavados com detergente neutro, assim como, todos os bioensaios foram realizados em sala com  $25 \pm 1$  C e  $70 \pm 10\%$  UR. Os dados referentes aos bioensaios de olfatometria foram analisados pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.2.1.4. Análises Quimiométricas**

Uma análise visual dos cromatogramas obtidos por CC-EM pode não ser totalmente eficaz para uma comparação das amostras em estudo. Ao se realizar uma análise exploratória destes dados a mesma pode evidenciar possíveis

regiões e/ou amostras, separando assim as mais susceptíveis ao vetor *D. citri*. Sendo assim, os dados obtidos por CG-EM foram submetidos á análise de componentes principais (PCA) e a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA). As análises quimiométricas foram realizadas em um microcomputador com sistema operacional Windows XP, utilizando os seguintes *softwares*: Microsoft Office Excel e Pirouette<sup>®</sup> versão 4.0 (Infometrix Inc.; Washington, USA).

*Parte*

# 4

*Resultados e  
Discussões*

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho foi avaliado a resposta olfativa do psilídeo *D. citri* aos óleos essenciais de plantas hospedeiras da família Rutáceas, corroborando no estudo comportamental deste inseto. Neste sentido, um hábito interessante dos insetos sugadores, como os psilídeos é a sua preferência por novas brotações e com isso, estes insetos estabelecem uma relação de dependência com as novas brotações para suprir suas necessidades nutricionais [LIU & TSAI, 2000; TSAI & LIU, 2000]. Conseqüentemente, neste estudo foi adotada a utilização de novas brotações para os ensaios olfativos aos óleos essenciais de espécies hospedeiras e análise por CG-EM.

### 4.1. Bioensaios De Olfatometria

Com base em testes preliminares o período de tempo de 15 minutos foi estabelecido para a resposta dos psilídeos *D. citri*. A escolha se deu quando cada indivíduo cruzou uma linha demarcada na porção final do tubo, denominada linha de escolha (le), situada a 3 cm da conexão final do tubo (FIGURA 4.1).

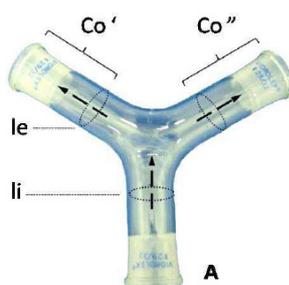


FIGURA 4.1: A) (Co) campos de odor, (le) Campo de escolha e (li) Campo de resposta.

No entanto, considerando o tempo de permanência nos respectivos campos de respostas aos voláteis no olfatômetro, notou-se que *D. citri* possui alta capacidade exploratória, assim observada na figura 4.2, página 196, na qual apresentou um percentual exploratório maior que 80 % para os estímulos. Vale

ressaltar que devido à influências e/ou alterações externas, os psilídeos receberam somente estímulos olfativos.

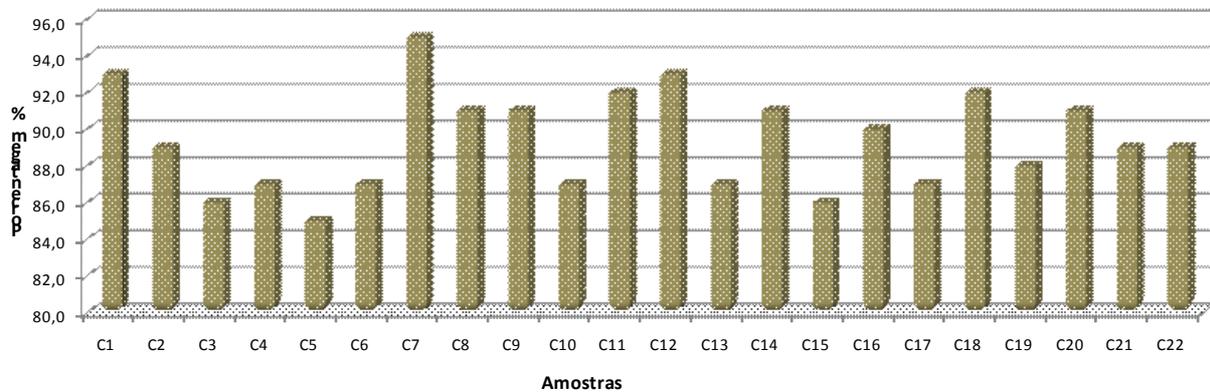


FIGURA 4.2: Percentual de respostas (n=10) para cada estímulo. A legenda das amostras C1-C22 estão descritas na figura 4.4, página 198.

Segundo Wenninger e Hall (2007) a restrição da atividade noturna de *D. citri*, ocorre devido às baixas temperaturas ocorridas durante os experimentos, porém, mesmo com a temperatura mantida por volta dos 24°C a atividade dos psilídeos foi reduzida na ausência de luz, sugerindo que a luminosidade pode ser tão importante quanto à temperatura no comportamento de *D. citri*. Sendo assim, avaliou-se neste trabalho em qual período do dia (manhã e tarde) haveria uma maior atividade dos psilídeos nos experimentos com olfatômetro de dupla escolha ‘Y’, assim como, todos os ensaios foram conduzidos em luminosidade controlada. Os resultados observados no gráfico abaixo (FIGURA 4.3, p. 197) demonstram que os estímulos olfativos de *D. citri* frente aos hospedeiros têm uma maior preferência ao período da tarde. Conseqüentemente, uma das hipóteses a essa preferência são as temperaturas um pouco mais elevada nas tardes, corroborando com dados obtidos por Wenninger e Hall (2007).

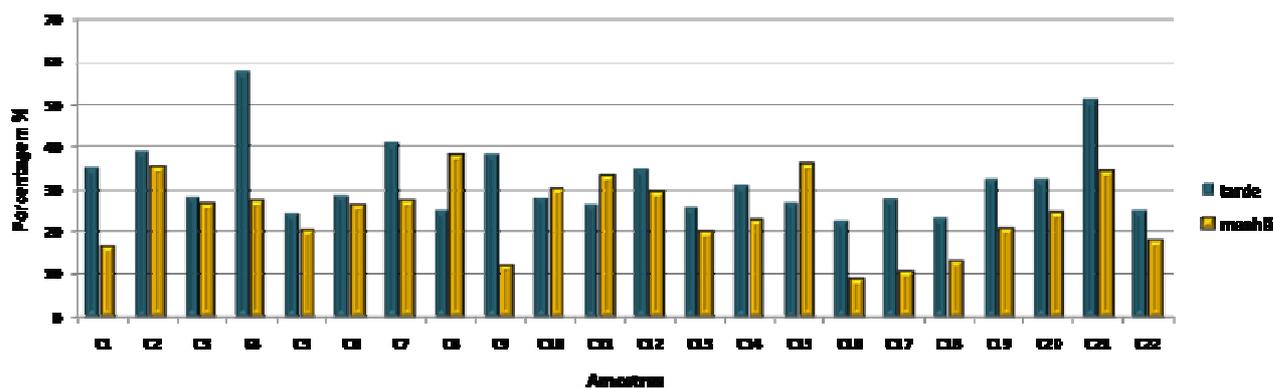


FIGURA 4.3: Porcentagem do número de respostas de *Diaphorina citri* em Olfatômetro em 'Y' da amostra C1 a C22 observados para os períodos da manhã e tarde (n=5). A legenda das amostras C1-C22 estão descritas na figura 4.4, página 198.

Após a avaliação da capacidade exploratória e em qual período do dia, observações no olfatômetro de dupla escolha a uma distância de 30 cm ((Co *campos de odor*) foram analisados. As respostas variaram de acordo com o tipo de estímulo oferecido (FIGURA 4.4, p. 198), contudo, dos 22 tratamentos testados, apenas 8 delas indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $P \leq 0,05$ ) (FIGURA 4.4, p. 198).

No gráfico da figura 171 observa-se que os genótipos *Citrus sinensis* (L.) Osb. (laranjas 'Natal' (C2) e 'Baia' (C4), *Citrus reticulata* Blanco (tangerina 'Ponkan') (C7), *Citrus paradisi* Macfad. (pomelo 'Marsh Seedless') (C11), *C. limon* (L.) Burm. f. (lima ácida 'Siciliano') (C12), *Citrus medica* L. (cidra comum) (C15), *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Trifoliata Limeira) (C20) e *Murraya paniculata* (L.) Jack (falsa-murta) (C21) foram os genótipos mais atrativos, diferindo significativamente do controle por meio de análise do teste Qui-Quadrado ( $p \leq 0,05$ ). Entre estes, destacou-se tangerina 'Ponkan', limão pomelo 'Marsh Seedless', cidra comum e falsa-murta com os maiores índices de atratividade. Deste modo deve haver compostos específicos ou mesmo uma combinação de compostos que são liberados neste que contribuem para um efeito atrativo.

*Citrus sinensis* (L.) Osbeck: laranjas: Pêra (C1), Natal (C2), Valência (C3), Bahia (C4) e Hamlin (C5); *Citrus reticulata* Blanco: tangerinas: Cravo (C6) e Ponkan (C7); *Citrus deliciosa* Ten.: Mexerica-do-rio (C8); *Citrus limettioides* Tanaka: Lima-da-Pérsia (C9); *Citrus latifolia* Tanaka: limão Tahiti (C10); *Citrus paradisi* Macfad.: pomelo Marshseedless (C11); *Citrus limon* (L.) Burm. f.: limão Siciliano (C12); *Citrus aurantium* L.: laranja Azeda São Paulo (C13); *Citrus grandis* Osbeck: toranja doce (C14); *Citrus medica* L.: cidra comum (C15); Híbridos de *Citrus*: Tangor Murcott (C16), citrumelo Swingle (C17), citrange Troyer (C18) e um citrandarin (C19); Gêneros afins: *Poncirus* (C20), *Muraya* (C21), *Fortunella* (C22)..

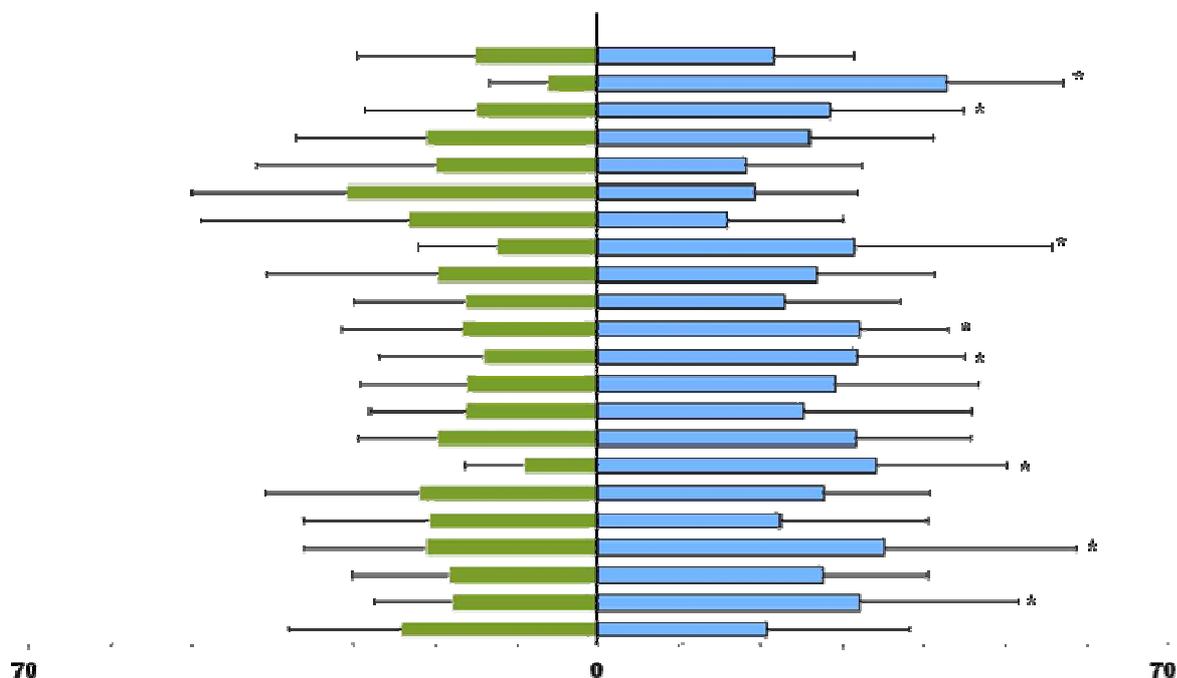


FIGURA 4.4: Porcentagem do número de respostas de *Diaphorina citri* em Olfatômetro em 'Y' da amostra C1 a C22 (baixo para cima, respectivamente). \*Indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $P \leq 0,05$ ).

Em 2002, Coelho & Marques relatou que as espécies de citros que apresentam alguma suscetibilidade à doença do *greening*, enumeradas por McClean & Schwarz (1970), são: *Citrus sinensis* (laranja doce); *C. reticulata* (mandarim); *C. sinensis* x *C. reticulata* (tangor); *C. limon* (limão); *C. paradisi* (pomelo); *C. limonia* (limão cravo); *C. limettioides* (lima da pérsia); *C. jambhiri* (limão rugoso); *C. medica* (cidra). De acordo com o número de respostas de *Diaphorina citri* em Olfatômetro em 'Y' das amostras deste trabalho notou-se que não necessariamente as espécies mais susceptíveis ao psilídeo são as mais susceptíveis a doença.

No entanto, considerando a fase de seleção hospedeira aos estímulos químicos das plantas é fundamental importância a análise química das mesmas. Antenas de insetos desempenham um papel importante na localização e

discriminação do hospedeiro. As antenas dos insetos contém sensilas sensoriais, com função na detecção de estímulos envolvidos no habitat do hospedeiro [ONAGBOLA *et al.*, 2008]. Com isso, baseando-se nos ensaios olfatométricos e a escassez de trabalhos correlacionando ensaios olfativos e CG-EM, analisou-se os óleos essenciais das amostras.

Os cromatogramas de íons totais obtidos por CG-EM podem ser visualizados no apêndice, páginas 210-237. Estes demonstraram que os voláteis de citrus são constituídos basicamente por monoterpenos, sesquiterpenos e monoterpenos ésteres (APÊNDICE, p. 210). A *D. citri* respondeu a uma grande variedade de espécies como mencionado anteriormente, assim, o comportamento de busca a hospedeiros pode ser influenciado por agregados de compostos e/ou classes de compostos voláteis [PATT & TAMOU, 2010].

A fim de comparar as espécies que apresentaram maior e menor atratividade ao tratamento através do bioensaio por olfatometria, analisaram-se os cromatogramas de íons totais obtidos dos óleos por CG-EM. Na figura 172, páginas 185, observam-se semelhanças em sua composição química, contudo, os híbridos de Citrus; *tangor Murcott (C16)*, *citrumelo Swingle (C17)* e *citrange Trover (C18)*, que aos ensaios apresentaram uma menor atratividade a *D. citri*, apresentaram um percentual elevado de compostos sesquiterpênicos em sua composição, observados nos cromatogramas nas regiões com tempo de retenção entre 17 a 30 min (FIGURA 4.5, p. 200) e tabela 4.1, página 200.

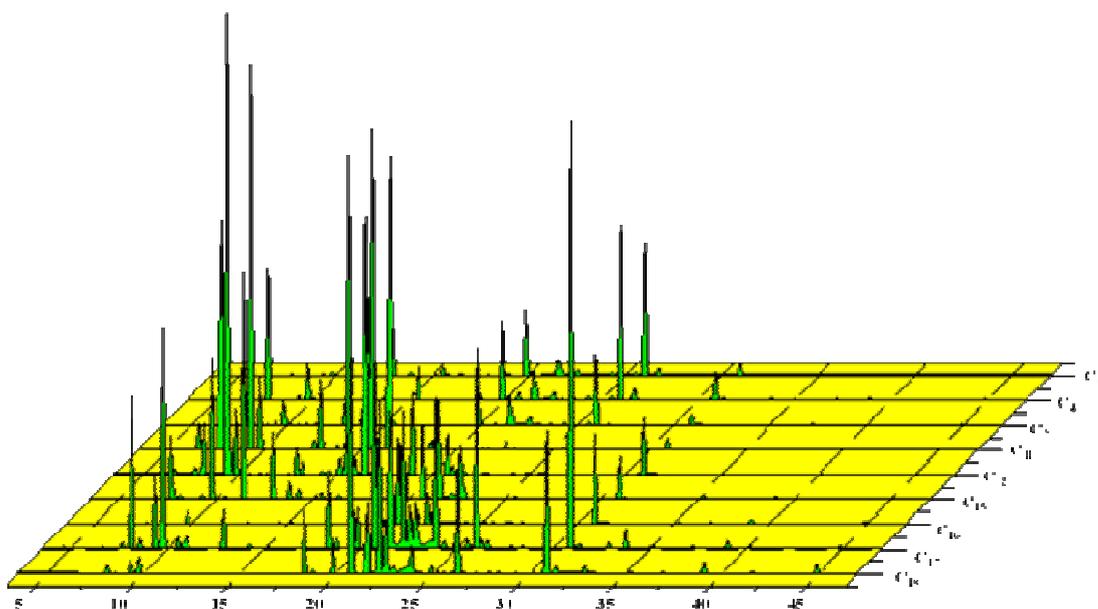


FIGURA 4.5: Comparação dos cromatogramas de Íons Totais dos óleos essenciais das espécies mais atrativas e menos atrativas através do bioensaio por olfatométria. A legenda das amostras C1-C22 estão descritas na figura 4.4, página 198.

Na figura 4.5, as espécies mostradas apresentam bastantes semelhanças qualitativas e diferenças quantitativas (TABELA 4.1), sugerindo que algum composto e/ou alguns compostos em comum dão essa susceptibilidade frente ao psilídeo. Assim, o uso de ferramentas quimiométricas e testes eletrofisiológicos podem auxiliar neste estudo.

TABELA 4.1: Percentual relativo das classes de compostos identificados por CG-EM dos óleos essenciais da figura 4.5.

Classes / Amostras	C2	C4	C7	C11	C12	C15	C16	C17	C18
Derivados de Ácidos Graxos						0,50			
Monoterpenos	3,12	23,22	3,87	30,08	33,05	42,53	18,07	2,14	19,29
Monoterpenos Oxigenados	18,03	23,45	17,20	16,03	51,52	50,30	22,46	1,04	6,93
Sesquiterpenos	32,91	26,67	28,95	23,13	0,67	1,16	49,71	54,72	51,11
Sesquiterpenos Oxigenados	25,35	13,04	36,52	10,22			0,58	9,67	5,45
Benzenoides			4,97						
Diterpeno	16,41	11,98	4,93	14,97	0,75	1,55	4,87	19,54	8,02

Wenninger *et al*, (2009) em testes realizados por EAG (eletroantenografia) relatou que a *D. citri* apresentou resposta eletrofisiológico a voláteis de toranja, contudo, as respostas foram muito fracas (amplitude menor que 1 mV) que foi explicada pela escassez de sensilas nas antenas; mencionado

anteriormente por Onagbola *et al*, 2008, o qual caracterizou apenas 11 sensilas olfativas por antena de *D. citri*. A Escassez de sensilas olfativas parece ser uma característica a espécies psilladae [WENNINGER *et al*, 2009], sendo assim, um desafio frente ao CG-EAD (Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector Eletroantenografico).

## 4.2. Análise Quimiométrica

Conforme dito anteriormente, apenas uma análise visual pode não ser totalmente eficaz para fornecer regiões cromatográficas em comum ou diferente na comparação das espécies em estudo. Ao se realizar uma análise exploratória destes dados a mesma pode evidenciar possíveis regiões, separando assim amostras mais susceptíveis ao vetor *D. citri*. Os dados cromatográficos foram submetidos á análise de componentes principais (PCA) e a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA), ferramentas quimiométricas, objetivando detectar através de dados cromatográficos similaridades ou diferenças entre os espécimes de citros mais e menos susceptíveis a *D. citri*, confrontando com os ensaios analisados anteriormente.

Ao se analisar quimiometricamente um conjunto de dados, organiza-se os dados experimentais obtidos em uma matriz, chamada de matriz de dados, onde os experimentos ou amostras correspondem às linhas e os parâmetros dos experimentos (variáveis) correspondem às colunas. A matriz dos dados originais é constituída por **n** amostras e **m** variáveis. No caso o CG as variáveis são os tempos de retenção de um pico ou banda cromatográfica. Em seguida, na matriz de dados, aplicam-se métodos quimiométricos de análise exploratória como *Principal Components Analysis- PCA* e *Hierarchical Clusters Analysis-HCA*.

No gráfico da figura 4.6, página 202, se pode verificar a variância versus o número de PCs, o qual mostra um decréscimo nítido da variância com o

aumento das PCs, fazendo com que as componentes principais sucessivas contenham cada vez menos informações a respeito dos dados. E quando a “curva” de variância pára de cair bruscamente, o número de PCs correspondente é aquele que deve ser usado para a análise dos dados. Analisando a figura 4.6 conclui-se que após a quinta PC têm-se uma pequena variação de dados.

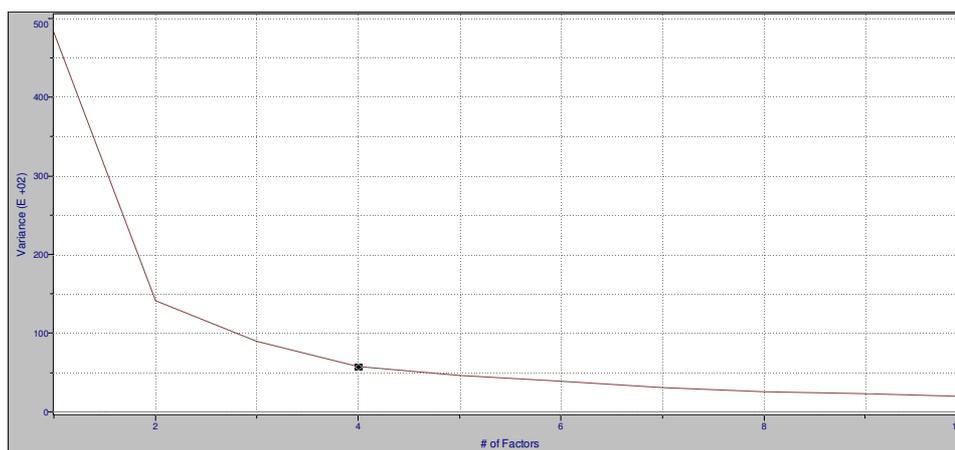


FIGURA 4.6: Gráfico da variância versus os números de PCs.

Ao realizar a PCA e a HCA, figura 4.7e 4.8, respectivamente (p. 203), observou-se que há uma separação através da PCA, demonstrando que os perfis químicos das diferentes espécies diferem e podem ser separados através da quimiometria. Aplicou-se aos dados gerados numa matriz a análise de PCA em todas as espécies em estudo. Observa-se que quimicamente os híbridos de citrus; *tangor Murcott (C16)*, *citrumelo Swingle (C17)*, que aos ensaios apresentaram uma menor atratividade a *D. citri*, são muitos semelhantes quimicamente.

Os híbridos *tangor Murcott (C16)*, *citrumelo Swingle (C17)* apresentam similaridade principalmente com *Citrus sinensis* (L.) Osb. (laranjas ‘Natal’ (C2) e *Citrus paradisi* Macfad (C11). Esta análise mostrou que os híbridos citados tenderam-se a similaridade com uma das espécies originárias, exemplo; o híbrido *tangor Murcott (Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) se aproximou quimicamente da *Citrus sinensis* (L.) Osb. (C2), assim como *citrumelo Swingle (Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) se

aproximou quimicamente da espécie *Citrus paradisi* Macfad (C11). Desta forma ficou claro que o perfil químico destes híbridos tende assimilar com o perfil químico das plantas que a deram origem.

Contudo analisando o gráfico de PCA na figura 4.7, os genótipos *Citrus reticulata* Blanco (tangerina ‘Ponkan’) (C7), *Citrus paradisi* Macfad. (pomelo ‘Marsh Seedless’) (C11), *Citrus medica* L. (cidra comum) (C15), os quais apresentaram maior atratividade a *D. citri*, diferem quimicamente entre os perfis, representados na localização das mesmas em distintos quadrantes no dendograma na PCA da figura 4.7.

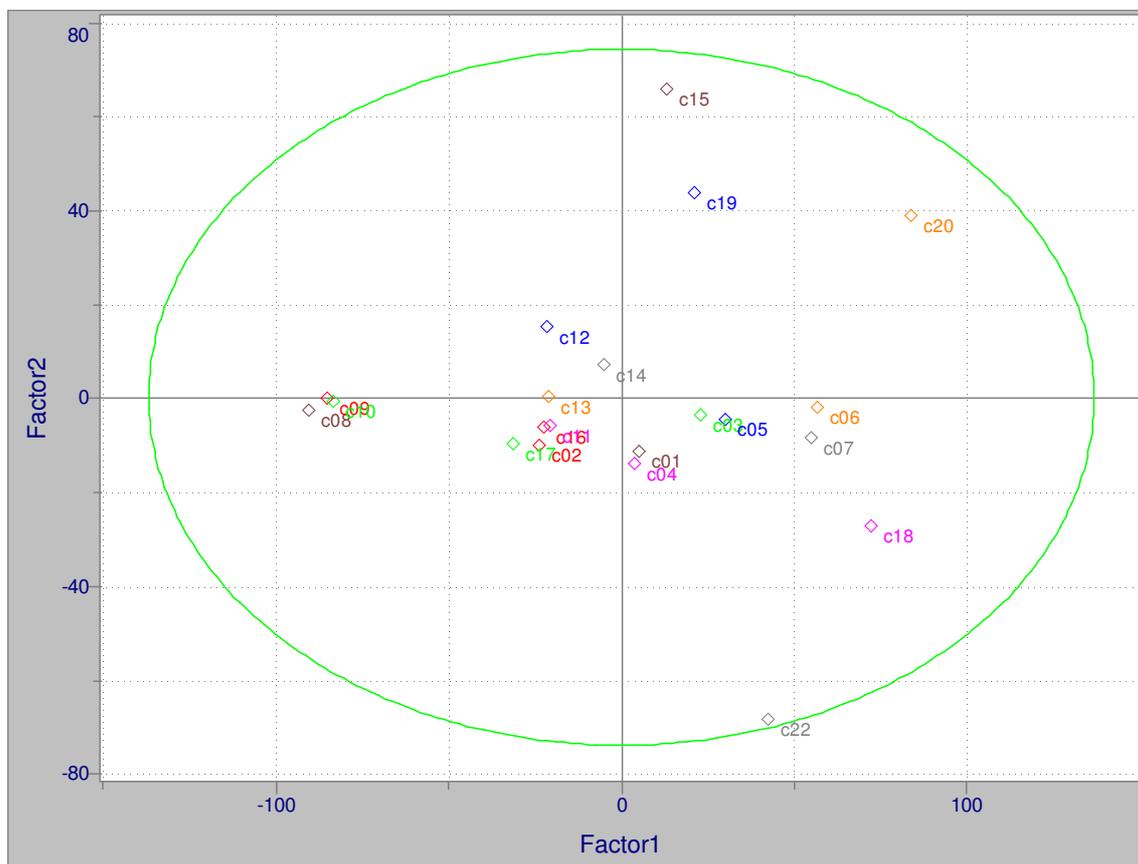


FIGURA 4.7: Gráfico PCA das amostras C1 a C21 dos dados obtidos por CG-EM.

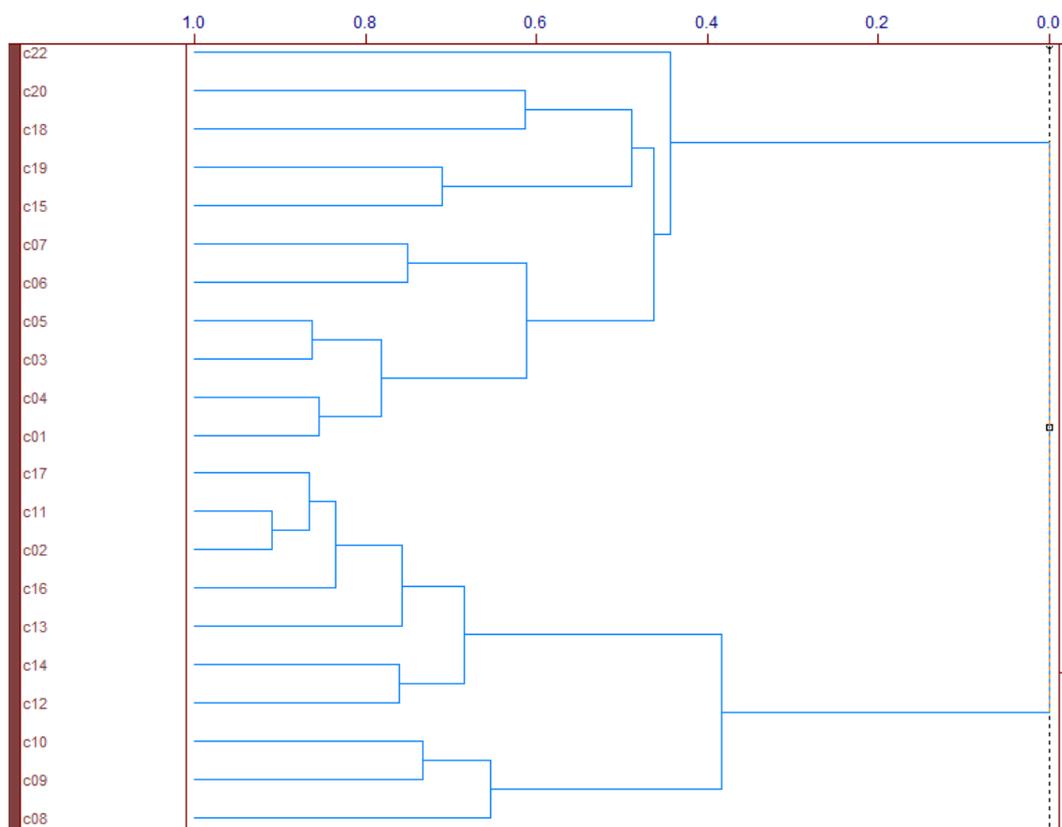


FIGURA 4.8: Dendrograma das amostras C1 a C21 dos dados obtidos por CG-EM.

No dendrograma da análise por HCA dos dados de CG-EM das amostras C1 e C22 (FIGURA 4.8) confirma a separação das espécies *Citrus paradisi* Macfad. (pomelo ‘Marsh Seedless’) (C11), *Citrus reticulata* Blanco (tangerina ‘Ponkan’) (C7), entretanto, está agrupa-se com a espécie *Citrus medica* L. (cidra comum) (C15). Neste dendrograma consideram-se cada amostra como um grupo unitário e fazem-se agrupamentos sistematicamente, por similaridade. E quanto menor a distância entre essas amostras ou pontos no dendrograma mais semelhantes são as mesmas.

Em análise por HCA observa-se que os híbridos de citrus; *tangor Murcott* (C16), *citrumelo Swingle* (C17), que aos ensaios apresentaram uma menor atratividade a *D. citri*, também se agrupam, corroborando aos dados analisados pela PCA. Quimiometricamente as análises nos perfis cromatográficos sugerem uma alternativa em estudos nas espécies chaves para o entendimento na seleção hospedeiras do psilídeo *D. citri* e conseqüentemente, o uso das espécies mais ou

menos atrativas como alvo para ensaios eletrofisiológicos. O uso das espécies menos atrativas intercaladas em grandes cultivares podem ser uma alternativa na diminuição da doença do *Greening* no Brasil.

*Parte*

**5**

*Conclusões*

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho representou um desafio, o qual abrirá caminhos para uma série de estudos de controle do inseto vetor *Diaphorina citri* baseado na seleção hospedeira.

As evidências encontradas neste capítulo demonstram que o psilídeo *Diaphorina citri* respondeu diferentemente aos estímulos olfativos, abrindo novas perspectivas para o entendimento comportamental dessa espécie. Os resultados demonstraram que os estímulos olfativos tiveram uma maior frequência no período da tarde, possivelmente a temperaturas mais elevadas e luminosidade deste período estimula a seleção hospedeira de *D. citri*. Algumas espécies apresentaram uma menor atratividade, principalmente os híbridos de citros, *tangor Murcott*, *citrumelo Swingle* e *citrange Troyer*. Estes através da PCA e HCA demonstraram que *tangor Murcott* e *citrumelo Swingle* são muito semelhantes quimicamente, levando a hipótese que o elevado percentual de compostos sesquiterpênicos identificados por CG-EM podem ser os agentes repelentes.

Neste estudo também se destacou a tangerina ‘Ponkan’, limão pomelo ‘Marsh Seedless’, cidra comum e falsa-murta como as mais atrativas ao psilídeo *D. citri*. A análise quimiométrica (PCA e HCA) dos dados obtidos por CG-EM demonstrou que tangerina ‘Ponkan’, limão pomelo ‘Marsh Seedless’ e cidra comum diferem quimicamente entre os perfis. Estes podem servir como possíveis alvos para testes eletrofisiológicos, na busca de um produto natural baseado na bioquímica fundamental do vetor.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing, Carol Stream, Illinois. 2001.
- AUBERT, B. Trioza erytrae Del Guercio and *Diaphorina Citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits*, Montpellier, n. 42, p. 149-62, 1987.
- BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal Plant Pathology*, Pretoria, v. 88, p. 7-37, 2006.
- COELHO, M. V. S. & MARQUES, A. S. DOS A. “Citrus greening”: Uma bacteriose quarentenária que representa ameaça potencial à citricultura brasileira. *Comunicado Técnico*, 58, Brasília-DF, Julho, 2002.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; NEGRI, J.D. DE; POMPEU, JR., J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter Asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease*, Davis, v. 88, p.1382, 2004.
- FUNDECITRUS,2007.Disponivelem:[http://fundecitrus.com.br/manuais/fdc\\_manual\\_greening\\_0307.pdf](http://fundecitrus.com.br/manuais/fdc_manual_greening_0307.pdf). acesso em 22 de janeiro de 2011.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, Gainesville, v. 87, p. 330-353, 2004.
- LIU, Y. H., AND J. H. TSAI. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Ann. Applied Biol.* 137:210-216. 2000.
- LOMBARDI DE, C. S. P. Toxicidade de inseticidas neonicotinóides sobre o psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) e o parasitóide *Tamarixia radiata* (waterson) (Hymenoptera: Eulophidae). *Tese (Doutorado)* - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Piracicaba, 2008. 58, p.: il.
- MANN, R. S.; TIWARI, S.; SMOOT, J. M.; ROUSEFF, R. L.; STELINSKI, L. L. Repellency and toxicity of plant-based essential oils and their constituents against *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera:Psyllidae). *J. Appl. Entomol.*, v.01. p. 1-10. 2010.
- MAUCK, K.E; DE MORAES, C.M; MESCHER, M.C. Deceptive chemical signals by a plant vírus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Washington, v. 1, n. 1, p. 1- 6, 2010.
- NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, Berlin, v. 131, n. 9, p. 709-715, 2007.
- NORONHA JUNIOR, N. C. Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Homiptera: Psyllidae). *Tese (Doutorado)*-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2010. 72 p. : il.
- ONAGBOLA, E. O.; MEYER, W. L.; BOINA, D. R.; STELINSKI, L. L. Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. *Micron*, 39. p.1184–1191. 2008.

- PADULLA, L. F. L. Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). **Dissertação (Mestrado)**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Piracicaba, 2007. 91 p.: il.
- PATT, J. M. & TAMOU, M. SE'. Responses of the Asian Citrus Psyllid to Volatiles Emitted by the Flushing Shoots of Its Rutaceous Host Plants. **Environ. Entomol.** 39(2): 618-624, 2010.
- SASSERON, G. R. Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros. **Dissertação (Mestrado) Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia** - Instituto Agronômico, Campinas, 2008. 71 p. : il
- 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.; BOVE, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, Oxford, v. 19, p. 173- 179, 2005.
- TSAI, J. H., AND Y. H. LIU. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology.** 93: 1721-1725. 2000.
- TURGANTI, T. D. Efeito de filme de partículas de caulim sobre a seleção hospedeira e desenvolvimento de *Diaphorina citri* Kuwayama em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Dissertação (Mestrado)**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Piracicaba, 2008. 73 p.: il.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D.J.. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, 11, 463-471, 1963.
- WENNINGER, E. J.; STELINSKI, L. L.; HALL, D. G. Roles of Olfactory Cues, Visual Cues, and Mating Status in Orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to Four Different Host Plants. **Environ. Entomol.** 38(1): 225-234, 2009.
- WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily matting and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri*. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 90(4): 715-722, 2007.
- YAMAMOTO PT, FELIPPE MR, GARBIM LF, COELHO JHC, XIMENES NL; MARTINS, EC; LEITE, APR; SOUSA, MC; ABRAHÃO, DP; BRAZ, JD. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter americanus. In: HUANGLONGBING-GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: Fundectrus, 2006. p. 96.
- YAMAMOTO, P. T.; PAIVA, P. E. B.; GRAVENA, S. Flutuação Populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Pomares de Citros na Região Norte do Estado de São Paulo. Comunicação Científica, **Neotropical Entomology**, 30 (1): 165-170, 2001.
- YANG, Y.; MINGDU, H.; ANDREW, G.; BEATTIE, C.; XIA, YULU.; OUYANG, GECHENG.; XIONG, J. Distribution, Biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, major pest of citrus: A status report for china. **International Journal of Pest Management**, London, v.52, n. 4, p.343-352, 2006.

# Apêndice

Amostra C01

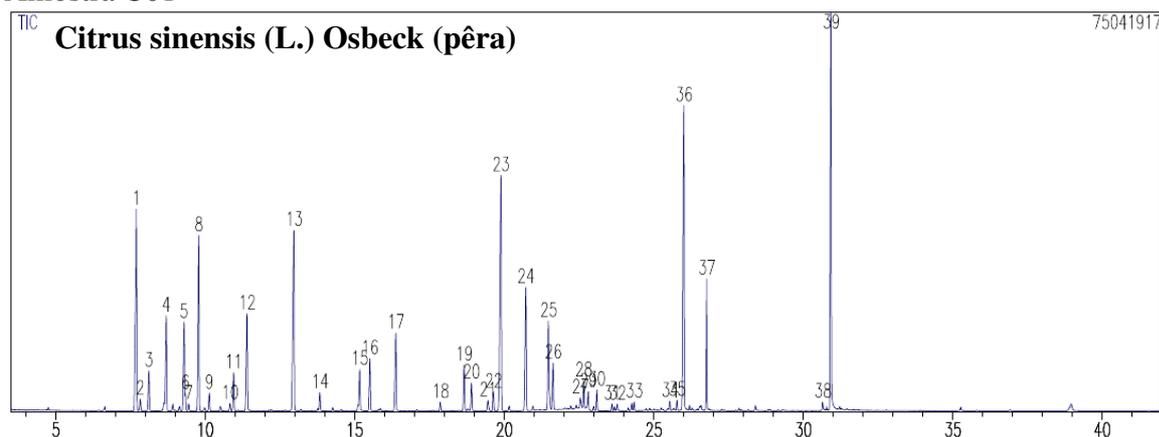


Tabela A1: Composição do percentual relativa do óleo essencial da amostra C01

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	$\beta$ -pineno	969	979	8,61
2	Mirceno	984	991	1,38
3	Felandreno	1005	1003	3,14
4	Limoneno	1026	1029	3,38
5	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1037	6,89
6	$\gamma$ -terpineno	1055	1060	0,57
7	<i>p</i> -Menta-2,4 (8) - dieno	1083	1088	1,29
8	linalol	1099	1097	3,75
9	Citronelal	1147	1153	7,89
10	Ni	1174	-	0,56
11	Ni	1218	-	1,23
12	Neral	1231	1238	1,84
13	Geranial	1263	1267	2,96
14	Ni	1342	-	1,55
15	Acetato de Nerila	1351	1362	0,92
16	Acetato de Geranila	1375	1381	0,67
17	$\beta$ -Elemeno	1383	1391	10,62
18	(E)-Cariofileno	1414	1419	4,89
19	(Z)- $\beta$ -Farneseno	1447	1443	3,38
20	$\alpha$ -Humuleno	1454	1455	1,6
21	Ni	1498	-	0,87
22	Ni	1506	-	0,69

23	Ni	1521	-	0,58
24	$\beta$ -Sinensal	1691	1700	11,62
25	$\alpha$ -Sinensal	1746	1757	3,44
26	Fitol	2107	1943	12,1
Total				96,42

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C02

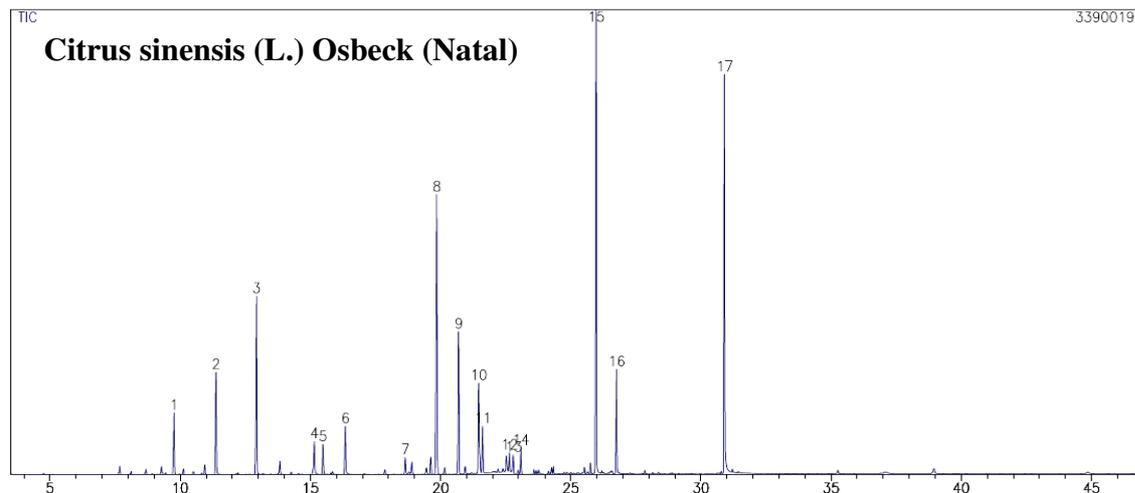


Tabela A2: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C02

Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1 (Z)- $\beta$ -Ocimeno	1042	1037	3,12
2 Linalol	1098	1097	4,99
3 Citronelal	1147	1153	9,20
4 Ni	1218	-	1,43
5 Neral	1230	1238	1,39
6 Geranial	1262	1267	2,45
7 Ni	1342	-	0,72
8 $\beta$ -Elemeno	1382	1391	16,38
9 (E)-Cariofileno	1413	1419	7,96
10 (Z)- $\beta$ -Farneseno	1447	1443	5,42
11 $\alpha$ -Humuleno	1453	1455	2,31
12 Ni	1498	-	0,84
13 Ni	1506	-	0,96
14 Ni	1521	-	1,06

15	$\beta$ -Sinensal	1689	1700	20,97
16	$\alpha$ -Sinensal	1746	1757	4,38
17	Fitol	2105	1943	16,41
Total				99,99

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C03

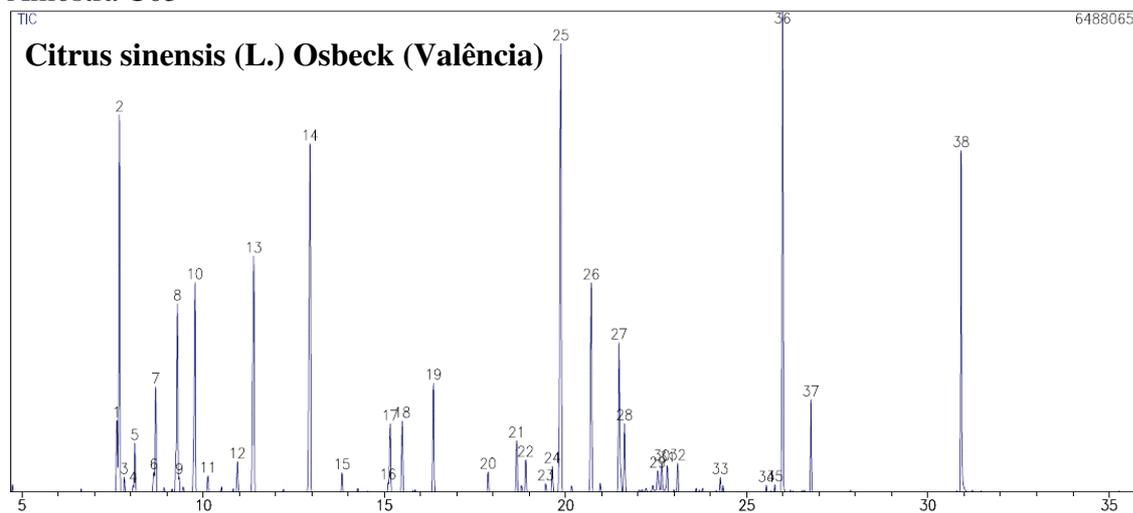


Tabela A3: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C03

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Sabineno	966	975	1,85
2	$\beta$ -pineno	968	979	7,93
3	Ni	973	-	0,40
4	Ni	982	-	0,19
5	Mirceno	984	991	1,02
6	Careno	1003	1002	0,58
7	Felandreno	1005	1003	2,18
8	Limoneno	1025	1029	5,04
9	Ni	1027	-	0,27
10	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1042	1037	5,51
11	$\gamma$ -terpineno	1055	1060	0,38
12	<i>p</i> -Menta-2,4 (8) - dieno	1083	1088	0,78
13	linalol	1098	1097	6,89
14	Citronelal	1147	1153	10,13

15	Ni	1174	-	0,50
16	Ni	1216	-	0,24
17	Ni	1218	-	1,68
18	Neral	1230	1238	1,82
19	Geranial	1262	1267	2,82
20	Ni	1316	-	0,53
21	Ni	1342	-	1,32
22	Acetato de Nerila	1350	1362	0,83
23	Ni	1368	-	0,25
24	Acetato de Geranila	1374	1381	0,70
25	$\beta$ -Elemeno	1382	1391	13,18
26	( <i>E</i> )-Cariofileno	1413	1419	5,80
27	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Farneseno	1447	1443	4,23
28	$\alpha$ -Humuleno	1453	1455	1,71
29	Ni	1493	-	0,58
30	Ni	1498	-	0,57
31	Ni	1505	-	0,54
32	Ni	1521	-	0,63
33	Ni	1583	-	0,35
34	Ni	1651	-	0,14
35	Ni	1675	-	0,16
36	$\beta$ -Sinensal	1689	1700	10,01
37	$\alpha$ -Sinensal	1746	1757	1,78
38	Fitol	2105	1943	6,48
Total				100

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

Amostra C04

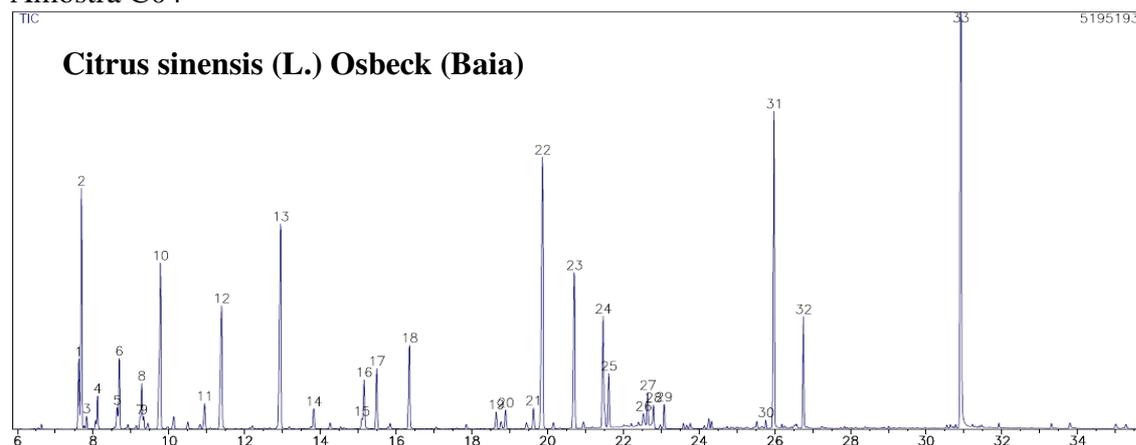


Tabela A4: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C04

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Sabineno	966	975	2,24
2	$\beta$ -pineno	968	979	7,51
3	Ni	973	-	0,44
4	Mirceno	984	991	0,80
5	Careno	1003	1002	0,71
6	Felandreno	1005	1003	2,15
8	Limoneno	1025	1029	1,46
9	Ni	1027	-	0,26
10	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1042	1037	6,79
11	<i>p</i> -Menta-2,4 (8) – dieno	1083	1088	0,86
12	Linalol	1098	1097	5,10
13	Citronelal	1147	1153	9,26
14	Ni	1174	-	0,66
15	Ni	1216	-	0,28
16	Ni	1218	-	1,68
17	Neral	1230	1238	2,10
18	Geranial	1262	1267	3,11
19	Ni	1342	-	0,51
20	Acetato de Nerila	1350	1362	0,58
21	Acetato de Geranila	1375	1381	0,68
22	$\beta$ -Elemeno	1383	1391	11,96

23	(E)-Cariofileno	1414	1419	6,24
24	(Z)- $\beta$ -Farneseno	1447	1443	4,45
25	$\alpha$ -Humeleno	1453	1455	1,87
26	Ni	1493	-	0,49
27	Ni	1498	-	0,96
28	Ni	1506	-	0,61
29	Ni	1521	-	0,70
30	Ni	1675	-	0,19
31	$\beta$ -Sinensal	1690	1700	10,09
32	$\alpha$ -Sinensal	1746	1757	2,95
33	Fitol	2105	1943	11,98
Total				99,67

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C05

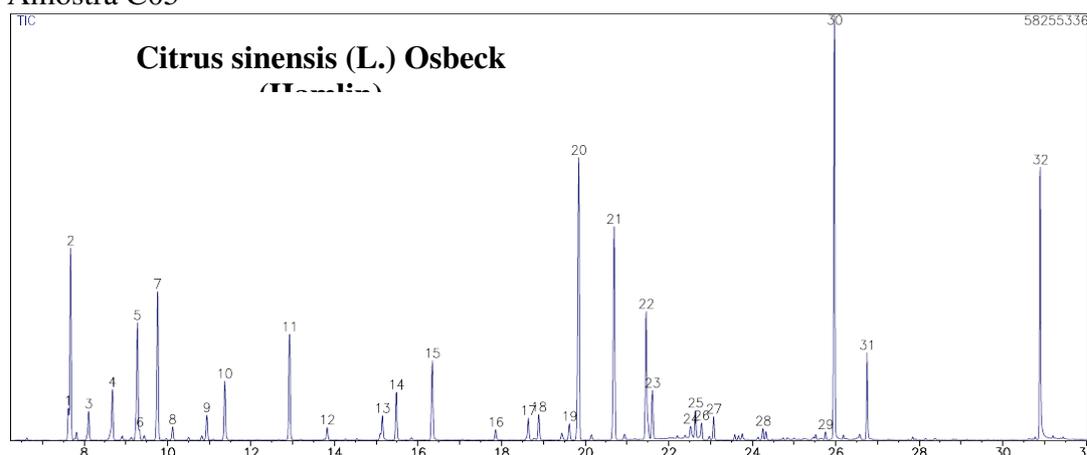


Tabela A5: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C05

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Sabineno	966	975	1,34
2	$\beta$ -pineno	968	979	6,45
3	Mirceno	984	991	0,83
4	$\alpha$ -felandreno	1004	1003	1,54
5	Limoneno	1025	1029	5,04
6	Ni	1027	-	0,23
7	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1042	1037	6,29
8	$\gamma$ -terpineno	1054	1060	0,49

9	<i>p</i> -Menta-2,4 (8) - dieno	1083	1088	1,01
10	linalol	1098	1097	2,31
11	Citronelal	1146	1153	4,36
12	Ni	1174	-	0,48
13	Ni	1218	-	0,76
14	Neral	1230	1238	1,98
15	Geranial	1262	1267	3,35
16	Ni	1316	-	0,36
17	Ni	1342	-	0,78
18	Acetato de Nerila	1350	1362	1,01
19	Acetato de Geranila	1374	1381	0,64
20	$\beta$ -Elemeno	1382	1391	13,01
21	( <i>E</i> )-Cariofileno	1413	1419	9,65
22	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Farneseno	1446	1443	5,82
23	$\alpha$ -Humeleno	1453	1455	2,01
24	Ni	1493	-	0,58
25	Ni	1498	-	1,04
26	Ni	1505	-	0,77
27	Ni	1520	-	0,76
28	Ni	1583	-	0,37
29	Ni	1675	-	0,24
30	$\beta$ -sinensal	1689	1700	14,70
31	$\alpha$ -sinensal	1745	1757	2,77
32	Fitol	2104	1943	9,03
Total				100

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

Amostra C06

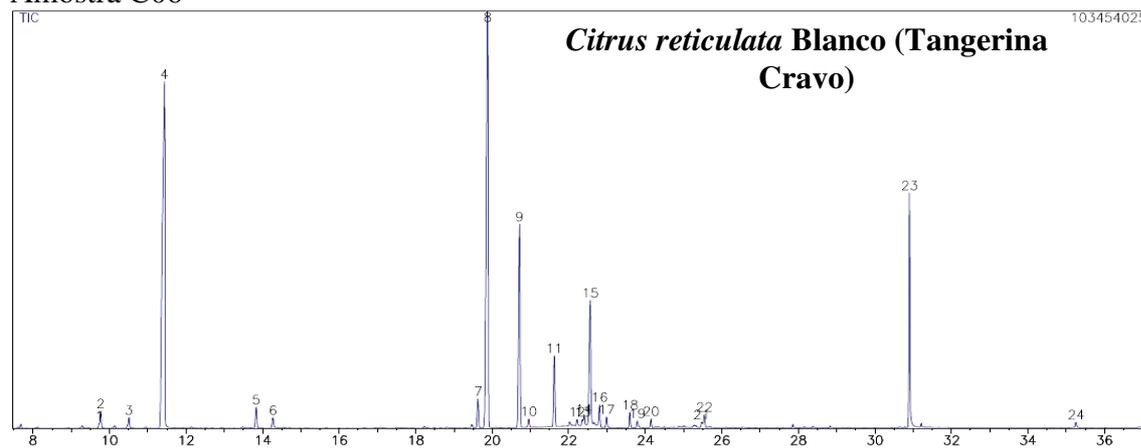


Tabela A6: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C06

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	$\beta$ -pineno	968	979	0,19
2	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1042	1037	0,73
3	Hidrato de Sabineno	1068	1070	0,47
4	linalol	1100	1097	31,05
5	Ni	1174	-	1,08
6	$\alpha$ -Terpineol	1188	1189	0,47
7	Acetato de Geranila	1375	1381	1,38
8	$\beta$ -Elemeno	1383	1391	26,01
9	(E)-Cariofileno	1414	1419	11,01
10	$\beta$ -Copaeno	1424	1432	0,36
11	$\alpha$ -Humulene	1453	1455	3,41
12	Ni	1479	-	0,24
13	Ni	1485	-	0,31
14	$\beta$ -Selineno	1487	1490	0,39
15	$\alpha$ -Selineno	1494	1498	7,5
16	Ni	1506	-	1,56
17	$\delta$ -Amorfeno	1516	1512	0,45
18	Elemol	1548	1550	0,61
19	Germacreno D-4-ol	1577	1576	0,32
20	Ni	1657	-	0,34
21	Ni	1661	-	0,54

22	Fitol	2105	1943	11,18
Total				100

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C07

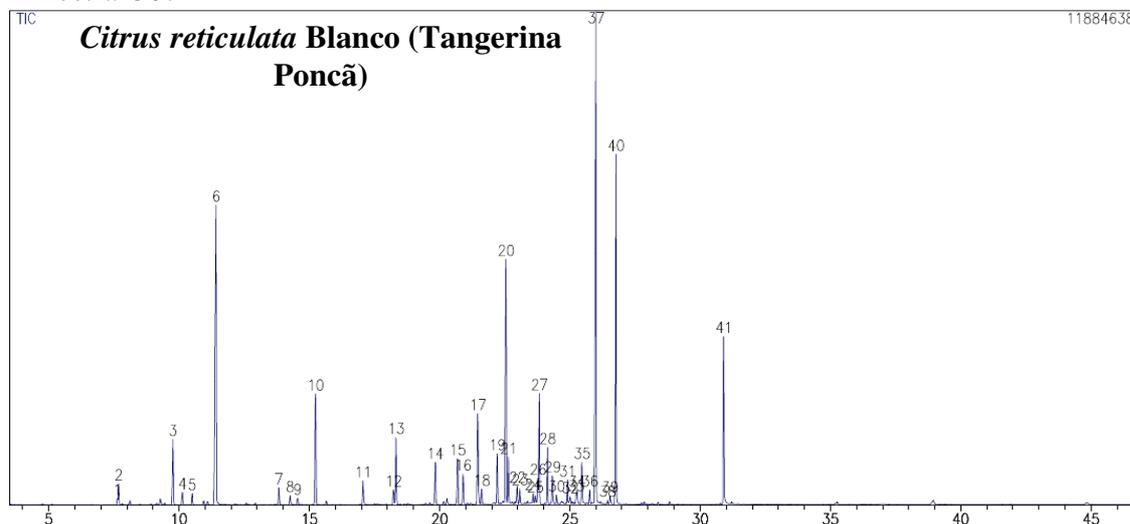


Tabela A7: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C07

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Sabineno	966	975	0,19
2	$\beta$ -pinene	968	979	0,64
3	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1042	1037	2,59
4	$\gamma$ -terpineno	1055	1060	0,45
5	Hidrato de Sabineno	1068	1070	0,42
6	Linalol	1099	1097	16,46
7	Ni	1174	-	0,62
8	$\alpha$ -Terpineol	1188	1189	0,32
9	Ni	1196	-	0,21
10	Timol Metil Éter	1221	1235	4,11
11	Timol	1288	1290	0,86
12	Ni	1328	-	0,56
13	$\delta$ -Elemeno	1331	1338	2,55
14	$\beta$ -Elemeno	1382	1391	1,63
15	(E)-Cariofileno	1413	1419	1,79
16	$\gamma$ -Elemeno	1422	1437	1,15

17	(Z)- $\beta$ -Farneseno	1447	1443	3,79
18	$\alpha$ -Humeleno	1453	1455	0,57
19	$\gamma$ -Muuroleno	1479	1480	1,76
20	Bicliclogermacreno	1494	1500	9,41
21	(E,E)- $\alpha$ -Farneseno	1498	1506	1,54
22	$\delta$ -Amorfeno	1515	1512	0,69
23	$\beta$ -Sesquifelandreno	1521	1523	0,49
24	Elemol	1548	1550	0,3
25	Ni	1552	-	0,27
26	Ni	1557	-	0,95
27	Germacreno B	1560	1561	3,58
28	Germacreno D-4-ol	1577	1576	1,78
29	<i>Trans</i> -Hidrato de Sesquisbineno	1587	1579	0,92
30	Ni	1595	-	0,3
31	Ni	1621	-	0,68
32	Ni	1628	-	0,32
33	Ni	1642	-	0,28
34	Ni	1644	-	0,46
35	$\alpha$ -Cadinol	1656	1654	1,43
36	Ni	1676	-	0,43
37	$\beta$ -sinensal	1690	1700	19,16
38	Ni	1729	-	0,29
39	$\alpha$ -sinensal	1747	1757	11,06
40	Fitol	2105	1943	4,93
Total				99,94

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

Amostra C08

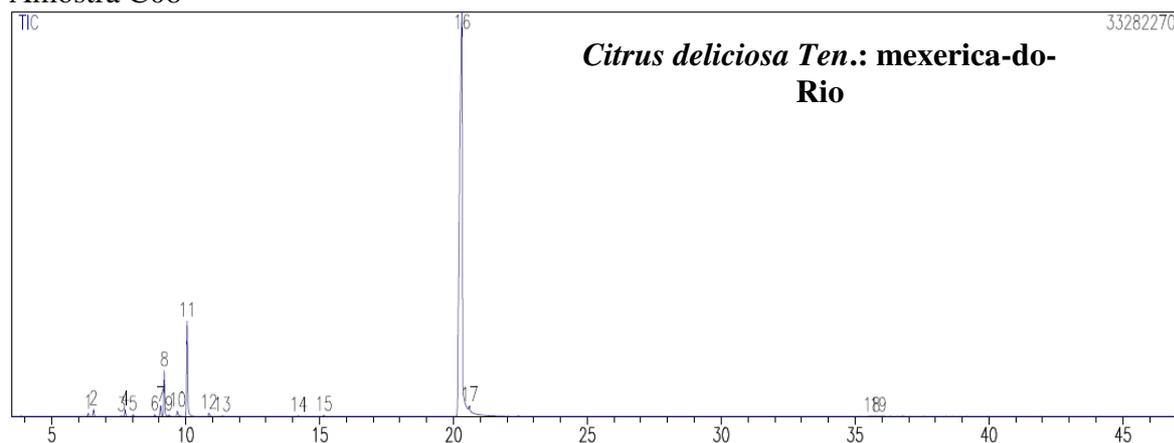


Tabela A8: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C08

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Ni	918	-	0,22
2	$\alpha$ -Pineno	927	930	0,5
3	$\beta$ -Pineno	970	979	0,47
4	Ni	1018	-	0,79
5	Limoneno	1023	1029	3,39
6	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1039	1037	0,52
7	$\gamma$ -terpineno	1052	1060	8,07
8	<i>p</i> -Menta-2,4 (8) - dieno	1080	1088	0,3
9	$\beta$ -Elemeno	1398	1391	84,83
10	(Z)-Cariofileno	1409	1409	0,28
Total				99,37

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

Amostra C09

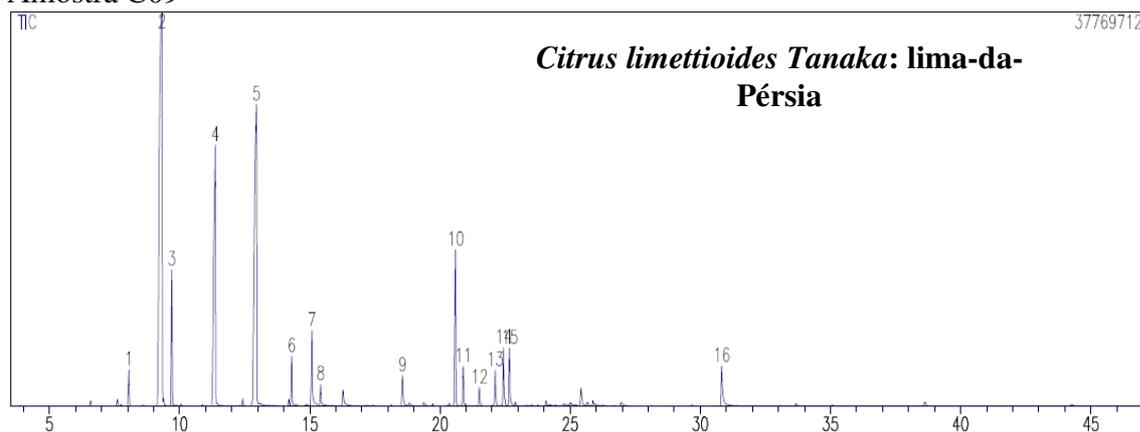


Tabela A9: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C09

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Mirceno	982	991	1,15
2	Limoneno	1027	1029	37,6
3	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1040	1037	4,05
4	Linalol	1098	1097	15,83
5	Citronelal	1147	1153	22,77
6	Ni	1189	-	1,52
7	Citronelol	1215	1226	2,44
8	Nerol	1228	1230	0,54
9	Ni	1339	-	1,12
10	(Z)-Cariofileno	1409	1409	5,6
11	Sesquitujeno	1422	1417	1,14
12	$\alpha$ -Humeleno	1449	1455	0,46
13	9-epi-(E)-Cariofileno	1475	1466	1,06
14	Ni	1489	-	1,49
15	$\beta$ -Bisaboleno	1499	1506	1,76
16	Fitol	2097	1943	1,46
Total				99,99

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

Amostra C10

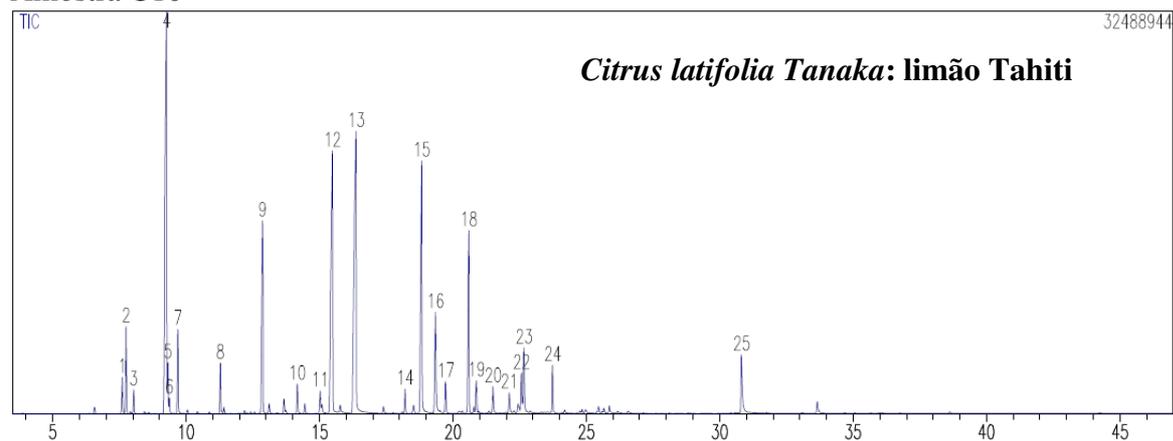


Tabela A10: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C10

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Sabineno	965	975	0,93
2	$\beta$ -pineno	971	979	2,39
3	Mirceno	982	991	0,52
4	Limoneno	1025	1029	21,4
5	Ni	1026	-	1,06
6	$\beta$ -felandreno	1028	1030	0,36
7	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1039	1037	2,34
8	linalol	1095	1097	1,22
9	citronelal	1144	1153	6,3
10	$\alpha$ -terpineol	1185	1189	0,8
11	Ni	1213	-	0,5
12	Neral	1230	1231	14,45
13	Geranial	1263	1267	18,43
14	Ni	1227	-	0,61
15	Ni	1348	-	9,81
16	Acetato de Nerila	1365	1362	3,62
17	Acetato de Geranila	1378	1381	0,81
18	(Z)-Cariofileno	1409	1409	6,25
19	(E)-Cariofileno	1421	1419	0,87
20	(Z)- $\beta$ -Farneseno	1448	1443	0,66
21	$\gamma$ -Gurjuneno	1475	-	0,44

22	Ni	1494	-	1,24
23	$\beta$ -Bisaboleno	1499	1506	1,9
24	Ni	1555	-	1,15
25	Fitol	2096	1943	1,94
Total				100

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C11

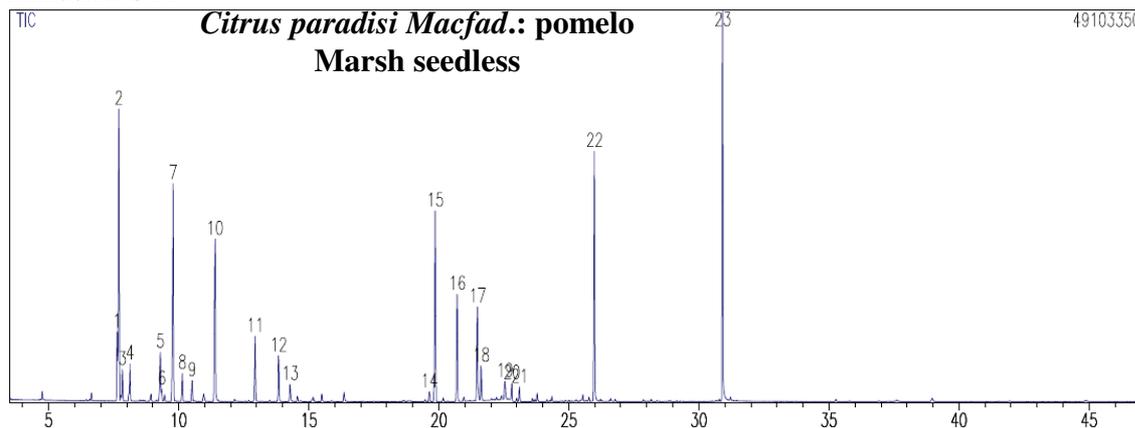


Tabela A11: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C11

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Ni	966	-	3,23
2	Sabineno	969	975	12,48
3	$\beta$ -pineno	974	979	1,43
4	$\beta$ -mirceno	984	991	1,15
5	Limoneno	1026	1029	2,46
6	Ni	1028	-	0,41
7	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1037	11,27
8	$\gamma$ -terpineno	1055	1060	1,29
9	Hidrato de Sabineno	1068	1070	0,92
10	linalol	1099	1097	8,85
11	citronelal	1147	1153	3,22
12	Terpinen-4-ol	1175	1177	2,27
13	$\alpha$ -terpineol	1188	1189	0,77
14	$\beta$ -Elemeno	1382	1391	10,12
15	(E)-Cariofileno	1414	1419	5,67

16	(E)- $\beta$ -Farneseno	1447	1457	5,16
17	$\alpha$ -Humeleno	1454	1455	1,65
18	Ni	1493	-	0,93
19	Ni	1506	-	0,67
20	$\beta$ -sesquifelandreno	1522	1523	0,53
21	$\beta$ -sinensal	1690	1700	10,22
22	Fitol	2106	1943	14,97
Total				99,67

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

### Amostra C12

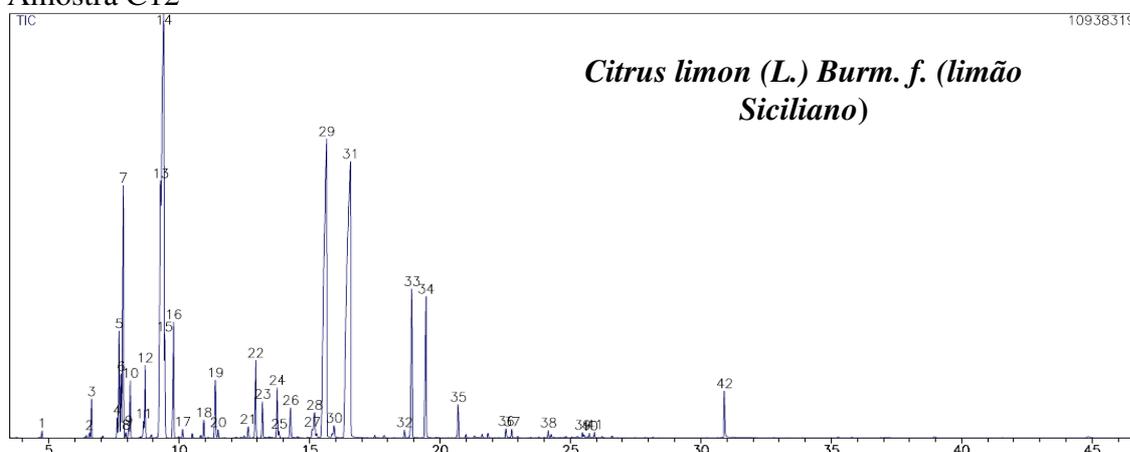


Tabela A12: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C12

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	$\alpha$ -pineno	930	939	0,56
2	Ni	966	-	0,33
3	Sabineno	969	975	2,02
4	Ni	971	-	1,05
5	$\beta$ -pineno	975	979	5,41
6	$\beta$ -mirceno	984	991	0,98
7	Careno	1003	1002	0,33
8	$\alpha$ -felandreno	1005	1003	1,21
9	Ni	1026	-	7,2
10	Limoneno	1030	1029	19,83
11	Ni	1031	-	1,58
12	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1050	2,38

13	p-Menta-2,4 (8)-dieno	1083	1088	0,33
14	Linalol	1098	1097	1,24
15	Citronelal	1146	1153	1,58
16	Ni	1155	-	0,71
17	Ni	1172	-	1
18	$\alpha$ -terpineol	1188	1189	0,68
19	Citronelol	1219	1226	0,64
20	Neral	1237	1238	18,51
21	Geranial	1270	1267	22,03
22	Acetato de Nerila	1351	1362	3,49
23	Acetato de Nerila	1369	1362	3,35
24	(E)-Cariofileno	1413	1419	0,67
25	Fitol	2105	1943	0,75
Total				97,86

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 1995)

#### Amostra C13

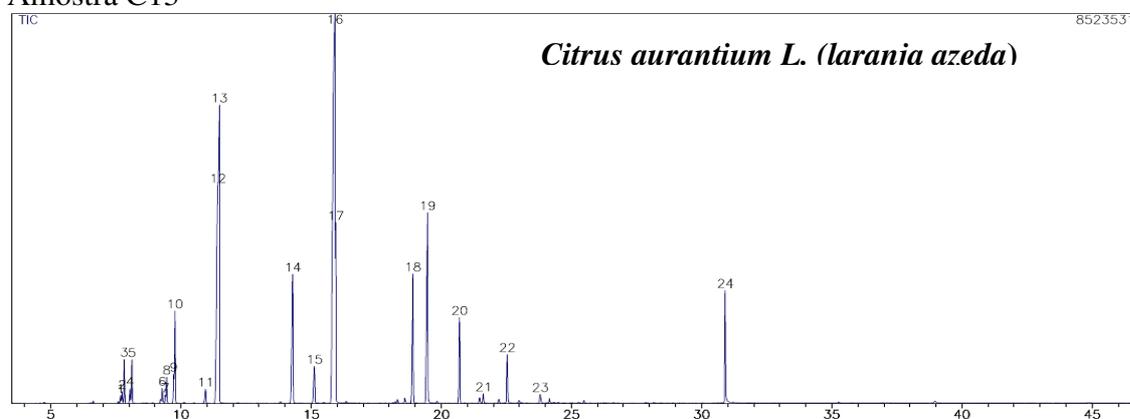


Tabela A13: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C13

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Ni	970	-	0,34
2	$\beta$ -pineno	973	979	1,26
3	Ni	981	-	0,42
4	$\beta$ -mirceno	984	991	1,22
5	Limoneno	1025	1029	0,34
6	$\beta$ -felandreno	1031	1030	0,74

7	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1041	1037	0,85
8	(E)- $\beta$ -Ocimeno	1042	1050	2,82
9	linalol	1099	1097	12,62
10	Tetrahidrolinalol	1101	1099	12,77
11	$\alpha$ -terpineol	1189	1189	6,14
12	Ni	1217	-	1,61
13	Acetato de Linalil	1246	1257	33,29
14	Geraniol	1247	1253	3,33
15	Ni	1351	-	4,96
16	Acetato de Nerila	1369	1362	8,28
17	(E)-Cariofileno	1414	1419	3,18
18	Biclogermacreno	1493	1500	1,56
19	fitol	2105	1943	2,92
Total				98,65

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C14

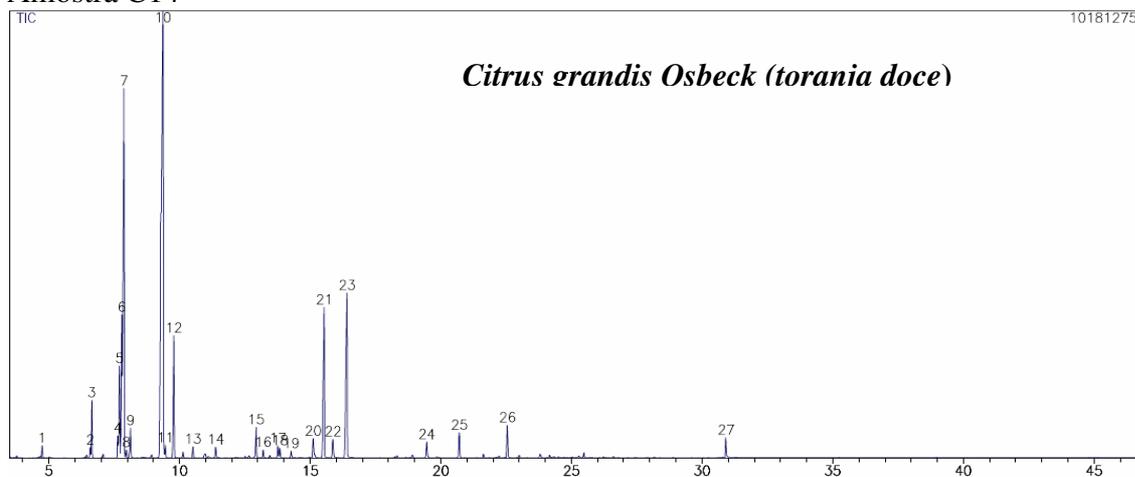


Tabela A14: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C14

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Ni	928	-	0,35
2	$\alpha$ -pineno	930	939	1,65
3	Ni	966	-	0,77
4	Sabineno	969	975	3,66
5	Ni	972	-	5,68

6	$\beta$ -pineno	975	979	17,9
7	$\beta$ -mirceno	984	991	1,14
8	Limoneno	1028	1029	38,02
9	$\beta$ -felandreno	1031	1030	0,41
10	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimeno	1043	1050	4,78
11	Ni	1068	-	0,39
12	Ni	1098	-	0,36
13	Citronelal	1146	1153	1,07
14	Ni	1172	-	0,42
15	Ni	1174	-	0,36
16	Ni	1217	-	0,68
17	Nerol	1232	1230	7,61
18	Geraniol	1244	1253	0,8
19	Geranial	1264	1267	9,49
20	Acetato de Nerila	1369	1362	0,67
21	$\alpha$ -Farneseno	1500	1506	1,04
22	Germacrene B	1548	1561	1,15
23	Fitol	2105	1943	0,57
Total				98,97

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C15

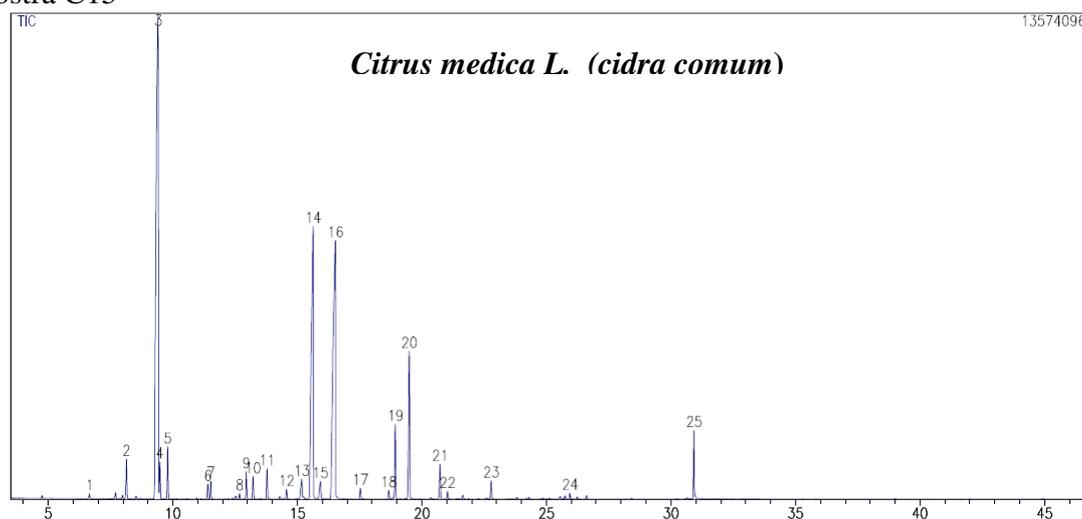


Tabela A15: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C15

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Mirceno	985	991	1,26
2	Limoneno	1030	1029	38,64
3	$\beta$ -Felandreno	1032	1030	1
4	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1037	1,43
5	Linalol	1099	1097	0,44
6	Nonanal	1103	1101	0,5
7	citronellal	1147	1153	0,76
8	Ni	1155	-	0,62
9	Ni	1173	-	0,84
10	Ni	1219	-	0,86
11	Neral	1236	1238	18,34
12	Geraniol	1246	1253	0,76
13	Geranial	1269	1267	22,35
14	Acetato de Nerila	1352	1362	2,27
15	Acetato de Geranila	1371	1381	5,38
16	(E)-Cariofileno	1415	1419	1,16
17	Ni	1505	-	0,47
18	Fitol	2107	1943	1,55
Total				98,63

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 1995)

#### Amostra C16

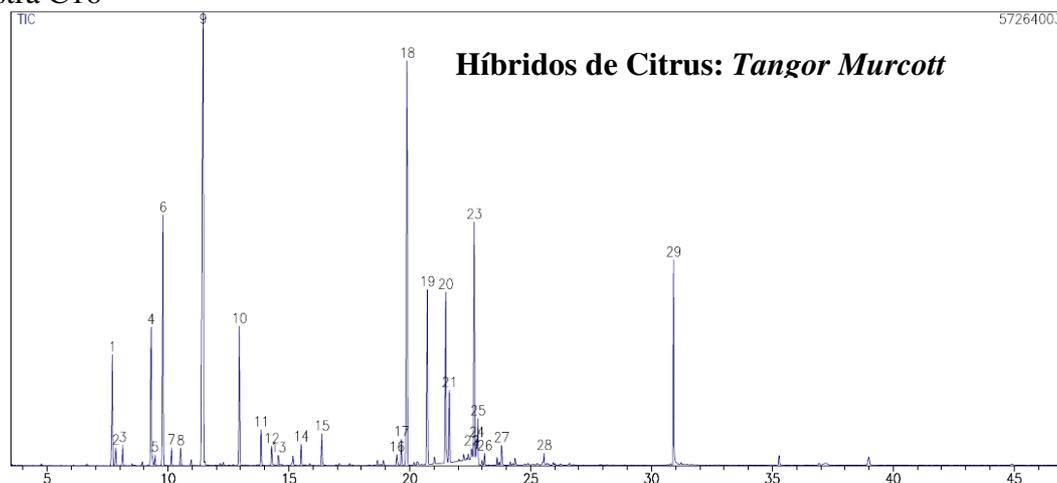


Tabela A16: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C16

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Sabineno	969	975	3,8
2	Ni	974	-	0,58
3	Mirceno	984	991	0,56
4	Limoneno	1026	1029	4,8
5	Ni	1032	-	0,51
6	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1037	8,44
7	(E)- $\beta$ -Ocimeno	1055	1050	0,47
8	Hidrato de Sabineno	1068	1070	0,5
9	linalol	1101	1097	24,09
10	citronelal	1147	1153	4,48
11	Terpinen-4-ol	1175	1177	1,13
12	$\alpha$ -terpineol	1188	1189	0,6
13	Neral	1231	1238	0,64
14	Geranial	1263	1267	1,02
15	Ni	1375	-	0,86
16	$\beta$ -Elemeno	1383	1391	16,65
17	(E)-Caroifileno	1415	1419	6,43
18	$\beta$ -Farneseno	1448	1443	5,65
19	$\alpha$ -Humeleno	1454	1455	2,39
20	Ni	1494	-	0,46
21	$\alpha$ -Farneseno	1499	1506	7,18
22	Ni	1504	-	0,8
23	Germacrene A	1507	1509	1,41
24	(E)-Nerolidol	1559	1563	0,58
25	Fitol	2106	1943	4,87
	Total			98,9

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

Amostra C17

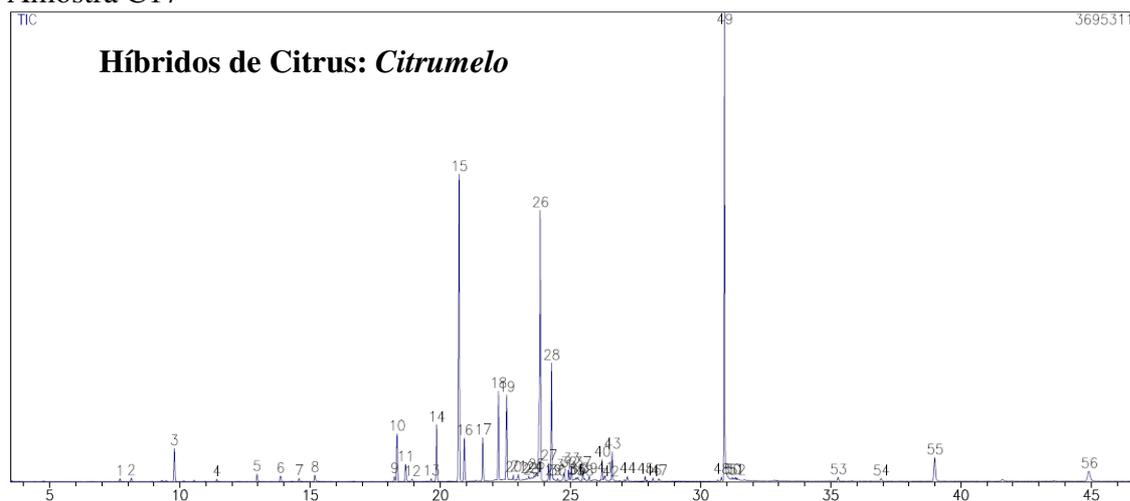


Tabela A17: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C17

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Mirceno	985	991	0,21
2	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1037	1,93
3	Ni	1147	-	0,39
4	Ni	1175	-	0,29
5	Ni	1219	-	0,35
6	Ni	1329	-	0,31
7	$\delta$ -Elemeno	1332	1338	2,6
8	Acetato de Citronelil	1343	1353	1,04
9	$\beta$ -Elemeno	1383	1391	3,27
10	(E)-Cariofileno	1415	1419	18,71
11	$\gamma$ -Elemeno	1424	1437	2,55
12	$\alpha$ -Humeleno	1454	1455	2,33
13	Germacreno D	1480	1485	4,5
14	Biciclogermacreno	1494	1500	4,54
15	Ni	1506	-	0,26
16	Ni	1516	-	0,33
17	Ni	1543	-	0,25
18	Ni	1549	-	0,26
19	Ni	1553	-	0,68
20	Germacreno B	1561	1561	16,76

21	Germacreno D-4-ol	1578	1576	0,81
22	Oxido de Cariofileno	1584	1583	6,07
23	Ni	1612	-	0,5
24	Ni	1623	-	0,49
25	Ni	1630	-	0,74
26	Ni	1640	-	0,3
27	$\alpha$ -Cadinol	1658	1654	0,58
28	Ni	1673	-	0,26
29	(2Z,6E)-Farnesol	1705	1701	0,84
30	Ni	1714	-	0,33
31	(2E,6E)-Farnesol	1734	1725	1,37
32	Fitol	2107	1943	19,54
Total				93,39

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C18

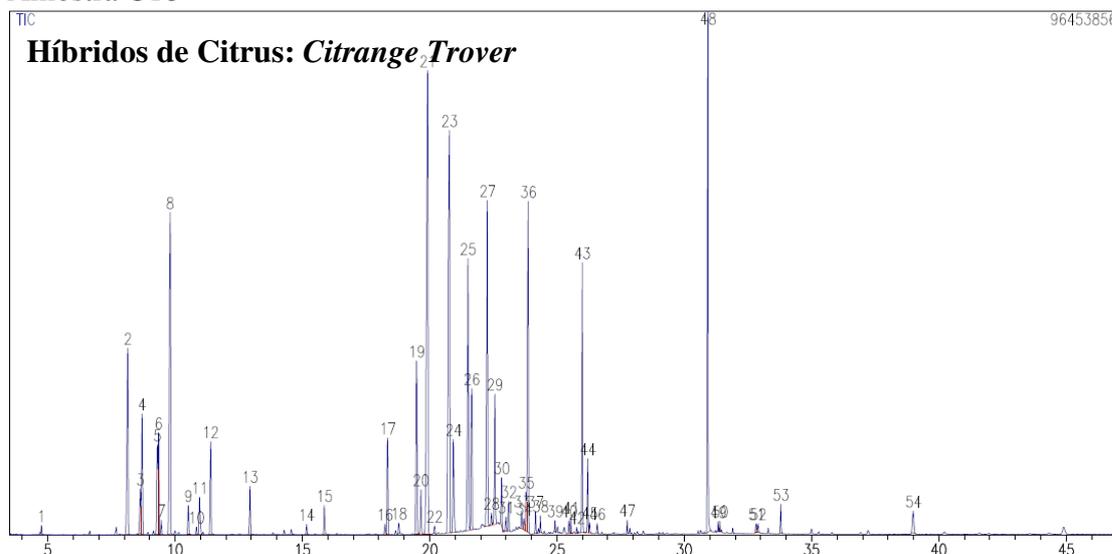


Tabela A18: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C18

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Mirceno	985	991	3,88
2	$\alpha$ -Felandreno	1003	1003	0,88
3	<i>para</i> -Menta-1(7),8-dieno	1005	1004	2,37
4	Limoneno	1026	1029	1,99
5	$\beta$ -Felandreno	1028	1030	1,59

6	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1032	1037	0,24
7	(E)- $\beta$ -Ocimeno	1044	1050	7,5
8	Oxido de linalool	1068	1073	0,53
9	<i>para</i> -Menta-2,4(8)-dieno	1084	1088	0,84
10	Linalol	1099	1097	1,7
11	Citronelal	1147	1153	0,84
12	Geraniol	1244	1253	0,47
13	Ni	1329	-	0,17
14	$\delta$ -Elemeno	1332	1338	1,77
15	Ni	1347	-	0,18
16	Acetato de Nerila	1370	1362	3,39
17	Ni	1376	-	0,84
18	$\beta$ -Elemeno	1385	1391	13,38
19	(E)-Cariofileno	1417	1419	11,24
20	$\gamma$ -Elemeno	1424	1437	1,97
21	(Z)- $\beta$ -Farneseno	1449	1443	5,56
22	$\alpha$ -Humuleno	1455	1455	2,62
23	Germacreno D	1482	1485	6,64
24	Ni	1489	-	0,2
25	Ni	1494	-	2,37
26	Germacreno A	1507	1509	0,85
27	Ni	1516	-	0,24
28	$\beta$ -Sesquifelandreno	1522	1523	0,44
29	Ni	1549	-	0,29
30	Ni	1553	-	0,25
31	(E)-Nerolidol	1558	1563	0,73
32	Germacreno B	1563	1561	6,64
33	Germacreno D-4-ol	1578	1576	0,32
34	Ni	1588	-	0,31
35	Ni	1657	-	0,21
36	Ni	1662	-	0,24
37	$\beta$ -Sinensal	1691	1700	4,4
38	Ni	1705	-	1,05

39	Fitol	2107	1943	8,02
Total				97,15

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

### Amostra C19

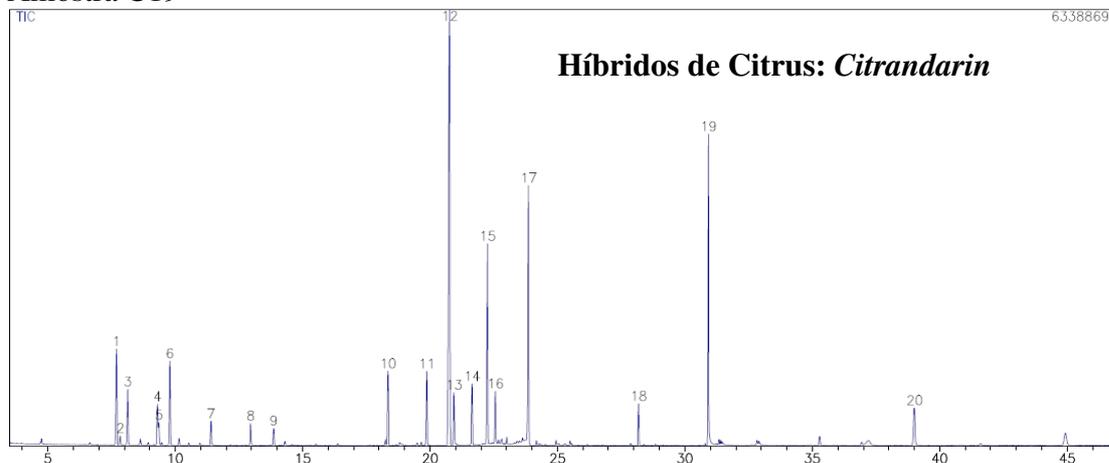


Tabela A19: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C19

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	$\beta$ -Pino	969	979	5,12
2	Ni	974	-	0,43
3	Mirceno	985	991	2,68
4	Limoneno	1026	1029	2,16
5	$\beta$ -Felandreno	1028	1030	0,94
6	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1037	4,11
7	Linalol	1099	1097	1,08
8	Citronelal	1147	1153	1
9	Terpinen-4-ol	1175	1177	0,74
10	$\delta$ -Elemeno	1332	1338	3,8
11	$\beta$ -Elemeno	1383	1391	3,75
12	(E)-Cariofileno	1416	1419	28,84
13	$\gamma$ -Elemeno	1424	1437	2,64
14	$\alpha$ -Humuleno	1455	1455	3,04
15	Germacreno D	1481	1485	9,44
16	Biciclogermacreno	1494	1500	2,46
17	Germacreno B	1562	1561	12,02

19	Fitol	2107	1943	11,26
Total				95,51

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C20

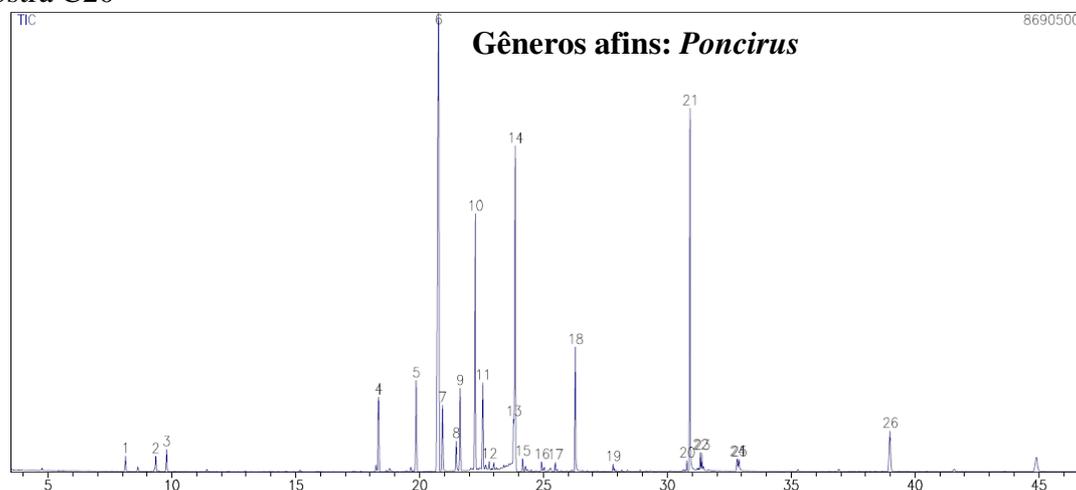


Tabela A20: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C20

Compostos		IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	Mirceno	984	991	0,58
2	$\beta$ -Felandreno	1026	1030	0,51
3	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1037	0,88
4	$\delta$ -Elemeno	1331	1338	3,18
5	$\beta$ -Elemeno	1382	1391	4,05
6	(E)-Cariofileno	1416	1419	30,41
7	$\gamma$ -Elemeno	1423	1437	2,84
8	(Z)- $\beta$ -Farneseno	1447	1443	1,2
9	Ni	1454	-	3,42
10	Germacreno D	1481	1485	11,26
11	Biciclogermacreno	1494	1500	3,45
12	Ni	1506	-	0,26
13	(E)-Nerolidol	1559	1563	1,73
14	Germacreno B	1562	1561	13,93
15	Germacrene D-4-ol	1578	1576	0,39
16	Ni	1622	-	0,27
17	$\alpha$ -Cadinol	1657	1654	0,26

18	(2Z,6Z)-Farnesol	1710	1718	4,05
19	Ni	2094	-	0,31
20	Fitol	2106	1943	12,10
21	Ni	2148	-	0,46
22	Ni	2155	-	0,44
Total				95,98

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)

#### Amostra C21

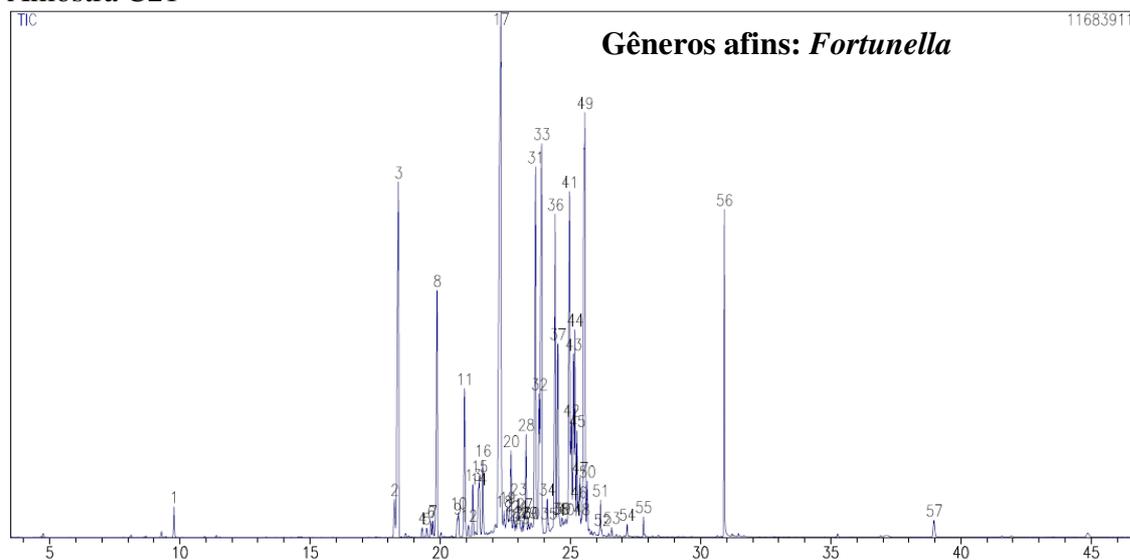


Tabela A21: Composição percentual relativa do óleo essencial da amostra C21

	Compostos	IRa (calc)	IRb (lit)	%
1	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1043	1037	0,44
2	Ni	1329	-	0,7
3	$\delta$ -Elemeno	1334	1338	7,84
4	Ni	1378	-	0,23
5	$\beta$ -Elemeno	1383	1391	4,36
6	Ni	1412	-	0,3
7	(E)-Cariofileno	1414	1419	0,32
8	$\gamma$ -Elemeno	1424	1437	2,46
9	Ni	1438	-	0,69
10	Aromadendreno	1447	1441	0,71
11	(Z)- $\beta$ -Farneseno	1448	1443	0,8
12	$\alpha$ -Humeleno	1454	1455	1,1

13	Germacreno D	1484	1485	16,89
14	$\beta$ -Selineno	1489	1490	0,26
15	Ni	1495	-	0,51
16	<i>trans</i> - $\beta$ -Guaieno	1502	1503	1,5
17	Ni	1507	-	0,27
18	$\delta$ -Amorfeno	1516	1512	0,57
19	Ni	1519	-	0,18
20	Ni	1529	-	0,22
21	Ni	1532	-	1,3
22	Ni	1542	-	0,29
23	Elemol	1552	1550	6,83
24	( <i>E</i> )-Nerolidol	1559	1563	1,91
25	Germacreno B	1564	1561	7,63
26	Ni	1576	-	0,43
27	Ni	1592	-	5,01
28	Guaiol	1597	1601	3,51
29	Ni	1625	-	6,3
30	Ni	1629	-	1,82
31	Eremolignol	1635	1631	2,76
32	Ni	1638	-	2,34
33	Agarospinol	1643	1648	1,23
34	Ni	1647	-	0,45
35	Ni	1650	-	0,69
36	$\alpha$ -Eudesmol	1663	1654	10,51
37	Ni	1668	-	0,6
38	Ni	1701	-	0,44
39	Fitol	2106	1943	3,34
Total				97,74

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 2001)