

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

**“ESTUDO QUÍMICO DE *PHYTOPHTHORA NICOTIANAE*  
E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE  
PLÂNTULAS DE *CITRUS SINENSIS*. ”**

**Waléria Ferreira Rabêlo\***

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

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

**São Carlos - SP**  
**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Waléria Ferreira Rabêlo, realizada em 29/05/2018:

---

Prof. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva  
UFSCar

---

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati  
ESALQ/USP

---

Prof. Dra. Angela Regina Araujo  
UNESP

---

Prof. Dr. Eli Fernando Pimenta  
UFSCar

---

Prof. Dra. Regina Incenzi Oliveira

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

**Charles Chaplin**

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial à minha querida mãe,  
que sempre me apoiaram e nunca mediram  
esforços para minha formação profissional e  
pessoal. Ao meu irmão que acreditou em meus sonhos e apostou  
sempre em mim.

À toda minha família, ao meu noivo Radell e amigos por tanto carinho e  
apoio nessa jornada.

## Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, não somente pela orientação e ensinamentos, mas por ter confiado em mim no início, e pela sabedoria de lidar com cada um de seus alunos, os fazendo se reinventar a cada obstáculo que essa jornada nos proporciona;

À “família” do Laboratório de Produtos Naturais UFSCar, por cada amizade conquistada, apoio, a troca de experiências e enfim com o passar do tempo um maravilhoso convívio, principalmente na hora do cafezinho com as conversas e risos infinitos após o almoço;

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Maria Fátima, João Batista, Paulo Cezar, Moacir Forim, pelos ensinamentos no dia a dia e colaboração, sempre dispostos a ajudar;

Aos demais professores do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação profissional;

A Embrapa Fruticultura e Mandioca em Cruz das Almas-Ba, pela parceria no trabalho, em especial a Uiara, Abelmon e Magno por toda a ajuda e companheirismo nos meses que passei trabalhando nessa unidade de pesquisa;

À minha querida amiga Poliana, pela amizade, companheirismo, cumplicidade, os maravilhosos conselhos de vida com as melhores gargalhadas, na época aluna de mestrado, que deixou bastante saudade;

A Renata Doricci, que sempre esteve disposta a ajudar e com seu jeitinho especial de ser, dando o apoio necessário quando mais precisávamos;

Aos amigos dessa grande jornada, em especial: Bruno Sacchetto, Leonardo Toffano, Eliane, Luís Guilherme, Marina, Jéssica, Marília,

Júlia, João Gabriel, Michelli, Luciano Rodrigues, Welma Beatriz, Dianne, Alany, Taynara, Carol, Dorai, Romário, Cleiton e Luciano Pinto que alguns desde do início, outros mais recentes, deram força e muito incentivo, apoiando nos momentos mais difíceis dessa caminhada;

Ao laboratório de RMN UFSCar, aos professores Gilberto Ferreira e Tiago Venâncio e em especial a aluna e amiga Thayana Alves, sempre pronta a ajudar;

A técnica Luciana “Lu” do Laboratório de RMN, pela grande ajuda no início e compreensão que teve no momento em que o aparelho de RMN ficava parado;

Aos meus amigos conterrâneos “ a família maranhense” que sempre estiveram ali todos prontos para dar apoio e ajudar quando necessário;

A toda a equipe do Separare, em especial a professora Regina, pela ajuda nos experimentos finais com o LC-MS<sup>E</sup>, sua compreensão ao ceder o equipamento, foi de suma importância no momento da finalização desse trabalho;

À Waters e ao laboratório de produtos naturais da USP, em especial a Fabiana Tessari e a Raquel, pela ajuda nos experimentos de LC-MS<sup>E</sup>;

Ao corpo técnico do Departamento de Química da UFSCar e as secretárias (Cristina, Ariane e Luciani) da PPGQ que sempre foram bastante prestativas, pelo apoio e serviços prestados durante a execução do trabalho;

A todos os colegas que conheci do DQ-UFSCar pelo companheirismo;

Ao meu grande parceiro e agora noivo Radell, por ser esse príncipe em minha vida e por dar-me apoio nos momentos mais difíceis, conseguindo sempre retirar o meu melhor sorriso;

À minha família, minha base, meu alicerce sempre, em especial as palavras de incentivo de minha mãe;

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a

realização deste trabalho;

À FAPEMA e ao meu estado do Maranhão, pela bolsa concedida;

É com imensa gratidão que lhes digo;

Muito obrigada!!!

## Lista de Símbolos e abreviações

J	Constante de acoplamento
$m/z$	Relação massa/carga
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
$CDCl_3$	Clorofórmio Deuterado
CM	Cenoura e Milho
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTSW	Citrumelo Swingle
CTSWRA	Citrumelo Swingle raiz doente
CTSWRATE	Citrumelo Swingle raiz sadia
CTSWCASUP	Citrumelo Swingle caule superior doente
CTSWCAINF	Citrumelo Swingle caule inferior doente
CTSWFO	Citrumelo Swingle folha doente
CTSWFOTE	Citrumelo Swingle folha sadia
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
d	Dubleto
Da	Dalton
DAD	<i>Diodo Arrange Detector</i>
dd	Duplo-dubleto
ESI	<i>Electonspray ionization</i>
eV	<i>Electron volt</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HPLC	<i>High Performance / Pressure Liquid Chromatography</i>

---

HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IE	Impacto eletrônico
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia de varredura eletrônica
MHz	Mega hertz
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSC	Morte Súbita de Citros
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PMFs	<i>Polymethoxylated Flavones</i>
PHY	<i>Phytophthora nicotianae</i>
ppm	partes por milhão
RDA	Retro Diels Alder
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
TST	Tangerina Sunki Tropical
TSTRATE	Tangerina Sunki Tropical raiz sadia
TSTRA	Tangerina Sunki Tropical raiz doente
TSTFO	Tangerina Sunki Tropical folha doente

TSTCASUP Tangerina Sunki Tropical caule superior doente

TSTCAINF Tangerina Sunki Tropical caule inferior

u.m.a. Unidade de massa atômica

UV ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1 - Lista de espécies de Phytophthora registrada no Brasil e seus hospedeiros. (Fonte: SANTOS, 2014).....	7
TABELA 4. 1 - Sistema de eluição HPLC-UV	53
TABELA 4. 2 - Sistema de eluição HPLC-UV para as amostras de citros .....	60
TABELA 4. 3 - Condições cromatográficas utilizadas para UHPLC-MS (linha A: H <sub>2</sub> O + 0,1% Ác. Fórmico e linha B: ACN + 0,1% Ác. Fórmico).....	63
TABELA 5. 1 - Correlação <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC e HMBC para o composto 1, referente ao pico 3.....	84
TABELA 5. 2 - Correlação <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC e HMBC para o composto 2, referente ao pico 5. ....	87
TABELA 5. 3 - Parâmetros estabelecidos para as análises em UPLC-QToF. ....	100
TABELA 5. 4 - Valores de rendimento das extrações de TST e CTSW (n=3) das amostras de diferentes partes das plântulas. ....	101
TABELA 5. 5 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico nas raízes das plântulas de TST. ....	136
TABELA 5. 6 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico nas raízes das plântulas de CTSW.....	150
TABELA 5. 7 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico no caule inferior das plântulas de TST. ....	157
TABELA 5. 8 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico no caule inferior das plântulas de CTSW.....	160
TABELA 5. 9 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico no caule superior das plântulas de TST no modo negativo. ....	175
TABELA 5. 10 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico no caule superior das plântulas de CTSW no modo negativo.....	180
TABELA 5. 11 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de área relativa de perfil químico nas folhas doentes das plântulas de TSTCASUP versus CTSWCASUP (ESI- no modo negativo).....	181
TABELA 5. 12 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico nas folhas das plântulas de TSTFOTE versus TSTFO (ESI- no modo negativo). ....	184
TABELA 5. 13 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença	

---

de perfil químico nas folhas das plântulas de CTSWFOTE versus CTSWFO (ESI- no modo negativo). .....	184
TABELA 5. 14 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico em relação a área relativa nas folhas doentes das plântulas de TSTFO versus CTSWFO (ESI- no modo negativo). .....	184
TABELA 5. 15 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cumarina xantiletina por CLAE-UV. ....	187
TABELA 5. 16 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cumarina seselina por CLAE-UV. ....	187
TABELA 5. 17 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cumarina 5-metoxiseselina por CLAE-UV. ....	187
TABELA 5. 18 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do flavonoide hesperidina por CLAE-UV. ....	188
TABELA 5. 19 - Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções de controle de qualidade de xantiletina. ....	191
TABELA 5. 20 - – Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções de controle de qualidade de seselina. ....	191
TABELA 5. 21 - Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções de controle de qualidade de 5-metoxiseselina. ....	192
TABELA 5. 22 - Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções de controle de qualidade da hesperidina....	192
TABELA 5. 23 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico...193	193
TABELA 5. 24 - Quantificação da xantiletina em plântulas doentes de <i>Citrus sinensis</i> . ....	195
TABELA 5. 25 - Quantificação da seselina em plântulas doentes de <i>Citrus sinensis</i> . ....	195
TABELA 5. 26 - Quantificação da 5-metoxiseselina em plântulas doentes de <i>Citrus sinensis</i> . ....	195
TABELA 5. 27 - Quantificação da hesperidina em plântulas doentes de <i>Citrus sinensis</i> . ....	195
TABELA 5. 28 - Composição química dos voláteis de Tangerina Sunki Tropical no órgão da raiz doente inoculados com <i>Phytophthora nicotianae</i> obtidos por HS/GC-MS.	

.....	199
TABELA 5. 29 -Composição química dos voláteis de Citrumelo Swingle no órgão da raiz doente inoculados com <i>Phytophthora nicotianae</i> obtidos por HS/GC-MS.....	200
TABELA 5. 30 - Composição química dos voláteis de Tangerina Sunki Tropical no órgão do caule inferior doentes inoculados com <i>Phytophthora nicotianae</i> obtidos por HS/GC-MS. ....	203
TABELA 5. 31 - Composição química dos voláteis de Citrumelo Swingle no órgão do caule inferior doentes inoculados com <i>Phytophthora nicotianae</i> obtidos por HS/GC-MS. ....	204
TABELA 5. 32 - Composição química dos voláteis de Tangerina Sunki Tropical no órgão da folha doente matrizes inoculados com <i>Phytophthora nicotianae</i> obtidos por HS/GC-MS. ....	208
TABELA 5. 33 - Composição química dos voláteis de Citrumelo Swingle no órgão da folha doente matrizes inoculados com <i>Phytophthora nicotianae</i> obtidos por HS/GC-MS. ....	211

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1- oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> em meio de cultivo de cenoura e milho (CM) com 15 dias de crescimento micelial. ....	4
FIGURA 1. 2 - Aumento do número de espécies relatadas de <i>Phytophthora</i> no mundo desde 1876 até 2010. (Fonte: SANTOS, 2014). ....	5
FIGURA 1. 3 - Ciclo evolutivo do oomiceto <i>P.nicotianae</i> . (Fonte: DPIE Canberra, 1993). ....	13
FIGURA 1. 4 - Modelos de infestação por <i>Phytophthora</i> : a) infecção primária de raízes e/ou radículas; setas azuis com crescimento secundário na casca ou xilema do tronco b) infecção primária pelo tronco; setas vermelhas mostra a infecção primária via lenticelas ou pelas feridas; c) infecção primária das folhas –setas vermelhas; as setas azuis crescimento secundário em pecíolos e galhos. (Fonte: OBWALD et al.,2014). ....	14
FIGURA 1. 5 - Alguns sintomas da doença em estágio mais avançado: a) necrose de laranjeira; b) tombamento de laranjeira; c) imagem de uma cicatriz ocasionada por gomose; d) exsudação de goma; e) exsudação de goma na base do tronco da planta. ....	17
FIGURA 1. 6 - Lesão do tronco, fendilhamento longitudinais contaminadas pelo oomiceto. (Fonte: DPIE Canberra, 1993). ....	18
FIGURA 1. 7 -. Estruturas dos flavonóides isolados de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar (RIBEIRO et al., 2008). ....	23
FIGURA 1. 8 - Estruturas dos limonóides, triterpeno e alcalóide isolados de citros pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar (RIBEIRO et al., 2008). ....	23
FIGURA 1. 9 - Estruturas das cumarinas lineares xantiletina e xantoxiletina. ....	24
FIGURA 1. 10 - Estrutura química das isoflavonas: a) daidzeína e b) genisteína, responsáveis pela atração dos zoósporos em raízes nas espécies de <i>Phytophthora</i> . ....	28
FIGURA 1. 11 - Esquema ilustrativo da classe majoritária de alcaloides nas Rutaceae formado pela combinação de ácido antranílico e acetato (WATERMAN, 1999). ....	32
FIGURA 1. 12 - Esqueletos básicos de cumarinas encontradas na família Rutaceae. ....	33
FIGURA 1. 13 - Os íons formados no processo Electrospray são conduzidos para o contraprato pelo campo elétrico aplicado. ....	36

FIGURA 1. 14 - Fases do frasco do <i>headspace</i> . Fonte:(MELQUIADES,2006).....	37
FIGURA 4. 1 - Meio líquido de cultivo em CM de <i>Phytophthora</i> autoclavados. ....	50
FIGURA 4. 2 - Esquema de procedimento das análises em microextração dos meios de cultivos com o oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> . ....	51
FIGURA 4. 3 - Crescimento micelial do oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> em diferentes meios de cultivos: respectivamente em: Cenoura-milho-ágar (CMA); Cenoura-ágar (CEA); Aveia-ágar (AVA); Batata ágar (BDA). (Fonte: Projeto Sisbiota, 2013).....	52
FIGURA 4. 4 - Esquema para participação líquido-líquido e obtenção dos extratos de acetato de etila, butanol e hidroalcolico das amostras de CM, AV, CE e BD. ....	55
FIGURA 4. 5 - Esquema dos extratos do micélio do pseudofungo e do meio aquoso para as análises em HPLC-UV.....	55
FIGURA 4. 6 - Imagens do reisolamento do patógeno em limão siciliano: a) limão com sete dias de infectado; b) retirada do material infeccionado pelo oomiceto; c) pedaços do inóculo em meio de cultivo de cenoura e milho; d) inóculo de <i>Phytophthora</i> ativado. ....	57
FIGURA 4. 7 - Metodologia de extração das amostras referentes às mudas das plântulas de TST e CTSW, procedimento feito para cada parte analisada das amostras (raiz, caule inferior, caule superior e folhas) Fonte: (BELLETE,2014). ....	59
FIGURA 4. 8 - Representação esquemática de analisador de massas quadrupolo TOF com aceleração ortogonal e lentes refletoras com configuração V. (Fonte: Manual eletrônico do Cromatógrafo Acquity UPLC H-Class). ....	61
FIGURA 4. 9 - Analisador híbrido Q-TOF, operando no modo MS (acima) e no modo MS/MS (abaixo). Os módulos em cinza significam que estes estão ativos, enquanto os módulos em brancos significam que estão desativados (Fonte: <a href="http://www.astbury.leeds.ac.uk/">http://www.astbury.leeds.ac.uk/</a> ).....	62
FIGURA 4. 10 -Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Agilent 1200 acoplado ao espectrômetro de massa triplo quadrupolo com detector de UV. ....	68
FIGURA 5. 1 - Dados estatísticos do crescimento micelial em meio sólido de <i>P.nicotianae</i> monitorado até 96 horas nos diferentes meios de cultivo.....	74
FIGURA 5. 2 - Crescimento em meio líquido dos diferentes meios de cultivos de <i>P.nicotianae</i> . A) meio de aveia; B) meio de cenoura e milho; C) meio de czapek; D) meios de batata dextrose e cenoura. ....	76

FIGURA 5. 3 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (MeOD, 400 MHz) da fração acetato de etila do meio líquido de cultivo cenoura e milho (CM). A) Meio de cultivo sem o oomiceto; B) meio de cultivo com o oomiceto. ....	76
FIGURA 5. 4 - Plotagem do cromatograma comparativo do meio CM da Fração Acetato de etila – A) meio líquido; B) meio sólido e C) meio com o micélio da fração etanólica. Linha vermelha – extratos somente com meio de cultivo; Linha verde – extratos com o meio de cultivo e oomiceto. ....	78
FIGURA 5. 5 - Cromatograma para trapeamento dos picos em meio de cultivo cenoura e milho com a presença do oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> . ....	80
FIGURA 5. 6 - Composto isolado da fração de acetato de etila do meio de cultivo CM do oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> da classe das Antronas. ....	80
FIGURA 5. 7 -Espectro de RMN <sup>1</sup> H- 600 MHz (D <sub>2</sub> O), com sua ampliação na região aromática do pico três da fração de acetato de etila do oomiceto desenvolvido em meio de cultivo de CM. ....	81
FIGURA 5. 8 - Mapa de correlação COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H) (D <sub>2</sub> O, 600MHz) da antrona do composto 1. ....	82
FIGURA 5. 9 - Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) (D <sub>2</sub> O, 600MHz) da antrona do composto 1. ....	83
FIGURA 5. 10 - Espectro de massas para o íon m/z 341,2686 no tr 4,65 min encontrado no composto 1 referente ao pico 3 da fração de acetato de etila em meio de CM de <i>P.nicotianae</i> (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da antrona (acima). ....	85
FIGURA 5. 11 - Proposta para a fragmentação da antrona (ESI, positivo). ....	85
FIGURA 5. 12 - Composto 2 isolado da fração de acetato de etila do meio de cultivo CM do oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> da classe das Antronas. ....	86
FIGURA 5. 13 -Espectro de RMN <sup>1</sup> H- 600 MHz (MeOD), com sua ampliação na região aromática do composto do pico 5 da fração de acetato de etila do oomiceto desenvolvido em meio de cultivo CM. ....	86
FIGURA 5. 14 - Ampliação da região aromática e alifática do mapa de contorno HMBC (MeOD, 600MHz). ....	88
FIGURA 5. 15 - Espectro de massas para o íon m/z 305,0648 no tr 1,28 min encontrado no composto 2 referente ao pico 5 da fração de acetato de etila em meio de CM de <i>P.nicotianae</i> (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e	

espectro do íon molecular da antrona (acima). .....	89
FIGURA 5. 16 - Proposta para a fragmentação da antrona com m/z 305. (ESI, modo negativo). .....	89
FIGURA 5. 17 - Comparativo de crescimento micelial de <i>P.nicotianae</i> – a) meio de CM com o inóculo após várias repicagens e b) meio de CM com o inóculo após o reisolamento.....	90
FIGURA 5. 18 - Esquema para as análises das mensurações verticais e horizontais das plântulas de TST e CTSW após a inoculação do oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> .....	91
FIGURA 5. 19 - Médias obtidas através dos métodos de inoculação de disco de micélio e suspensão de zoósporos. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em 5% de significância pelo teste de Tukey. ....	92
FIGURA 5. 20 - Plotagem do Cromatograma comparativo das plântulas de <i>Citrus sinensis</i> em HPLC-UV. A) Cromatograma comparativo do caule inferior do extrato de plântulas de Tangerina Sunki Tropical; B) Cromatograma comparativo do caule inferior do extrato de plântulas de Citrumelo Swingle.....	94
FIGURA 5. 21 - Imagens por Microscopia eletrônica de varredura do caule inferior inoculado por <i>Phytophthora nicotianae</i> com 60 dias de infecção em plântulas de TST. a) órgão do caule onde foi inoculado o oomiceto todo tomado por zoósporos de <i>P.nicotianae</i> , através da técnica de inserção de zoósporos pelo método da agulha; b) presença de zoósporos e esporângios; c) zoósporos próximo a estômatos; d) penetração das hifas cenocíticas em todo redor de onde foi feito o ferimento no caule. ....	97
FIGURA 5. 22 - Imagens por Microscopia eletrônica de varredura do caule inferior inoculado por <i>Phytophthora nicotianae</i> com 60 dias de infecção em plântulas de CTSW. a) órgão do caule onde foi inoculado o oomiceto, através da técnica de inserção de zoósporos pelo método da agulha; b) hifa cenocítica; c) presença de zoósporos e esporângios próximo a estômatos; d) imagem ampliada de penetração das hifas cenocíticas e zoósporos em todo redor de onde foi feito o ferimento no caule; e) imagem ampliada da penetração da hifa no local do ferimento e cistos germinativos. ....	98
FIGURA 5. 23 - Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada de TST (ESI, positivo), infectadas com gomose (verde) e sadias (vermelho). A: Raízes;	

B: Caule inferior; C: Caule superior; D: folhas. ....	103
FIGURA 5. 24 - Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada de CTSW (ESI, positivo), infectadas com gomose (verde) e sadias (vermelho). A: Raízes; B: Caule inferior; C: Caule superior; D: folhas. ....	104
FIGURA 5. 25 - Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada de TST (ESI, negativo), infectadas com gomose (verde) e sadias (vermelho). A: Raízes; B: Caule inferior; C: Caule superior; D: folhas. ....	105
FIGURA 5. 26 - Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada de CTSW (ESI, negativo), infectadas com gomose (verde) e sadias (vermelho). A: Raízes; B: Caule inferior; C: Caule superior; D: folhas. ....	106
FIGURA 5. 27 -- Análise de PCA: gráfico de loadings da TST X CTSW das análises realizadas no modo positivo de ionização dos órgãos vegetais.....	110
FIGURA 5. 28 - PCA para os diferentes órgãos de citrus de TST, comparando entre o tratamento doente e sadio (ESI, modo positivo). A: folhas; B: caule superior; C: caule inferior; D: raiz. Vermelho - grupo destinado as amostras sadias; Preto - grupo destinado as amostras infectadas pelo oomiceto. ....	111
FIGURA 5. 29 - PCA para os diferentes órgãos de citrus de CTSW, comparando entre o tratamento doente e sadio (ESI, modo positivo). A: folhas; B: caule superior; C: caule inferior; D: raiz. Vermelho - grupo destinado as amostras sadias; Preto - grupo destinado as amostras infectadas pelo oomiceto. ....	112
FIGURA 5. 30 - Gráfico de S-Plot das raízes de TST (ESI, modo positivo). ....	113
FIGURA 5. 31 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes das raízes de TST. a) Cromatograma de íons totais; b) Cromatograma ampliado nas bandas com maiores diferenças entre as amostras sadia (vermelho) versus a doente (verde).....	114
FIGURA 5. 32 – Cromatograma de íons extraídos das cumarinas linear xantiletina (15,94 min) e angular seselina (16,15 min). ....	115
FIGURA 5. 33 - Estrutura química das cumarinas linear xantiletina e angular seselina. ....	115
FIGURA 5. 34 - Espectro de massas para o íon m/z 229,08 no tr 15,9 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular xantiletina (acima). ....	116
FIGURA 5. 35 - Esquema de proposta de fragmentação para a cumarina linear	

xantiletina (ESI, modo positivo) .....	117
FIGURA 5. 36 -- Esquema ilustrativo da proposta de fragmentação do íon m/z 185 a m/z 157 .....	117
FIGURA 5. 37 - Espectro de massas para o íon m/z 229,08 no tr 16,17 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da seselina (acima). .....	118
FIGURA 5. 38 - Esquema de proposta de fragmentação para a cumarina angular seselina (ESI, modo positivo). .....	119
FIGURA 5. 39 - Estrutura das piranocumarinas de massa neutra m/z 258,08 Da, referente a m/z 259,0985 e m/z 259,0802. ....	120
FIGURA 5. 40 – Cromatogramas de íons extraídos das piranocumarinas 5-metoxiseselina (17,00) e xantoxiletina (17,80). ....	120
FIGURA 5. 41 - Espectro de massas para o íon m/z 259,05 no tr 16,99 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular 5-metoxiseselina (acima). ....	121
FIGURA 5. 42 - Esquema de proposta de fragmentação para a piranocumarina angular 5-metoxiseselina (ESI, modo positivo). ....	122
FIGURA 5. 43 -Espectro de massas para o íon m/z 259,0558 no tr 17,80 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular xantoxiletina (acima). ....	123
FIGURA 5. 44 - Esquema de proposta de fragmentação para a piranocumarina xantoxiletina (ESI, modo positivo). ....	124
FIGURA 5. 45 - Espectro de massas para o íon m/z 259,0952 no tr 17,94 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da luvangetina (acima). ....	125
FIGURA 5. 46 - Esquema de proposta da fragmentação para a luvangetina (ESI, modo positivo).....	125
FIGURA 5. 47 - Espectro de massas para o íon m/z 245,0719 no tr 10,58 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da suberenona (acima). ....	126
FIGURA 5. 48 - Esquema de proposta da fragmentação para a suberenona (ESI, modo positivo). ....	127
FIGURA 5. 49 – Cromatograma de íon extraído da cumarina suberenona (10,59). 127	

FIGURA 5. 50 - Estrutura das cumarinas de massa neutra 260,1048 Da referente ao m/z 261,1142. ....	128
FIGURA 5. 51 – Cromatograma de íon extraído da cumarina tamarina (12,33). ....	129
FIGURA 5. 52 - espectro de massas para o íon m/z 245,0719 no tr 10,58 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da tamarina (acima). ....	129
FIGURA 5. 53 - Esquema de proposta da fragmentação para o suberenol (ESI, modo positivo).....	130
FIGURA 5. 54 - Esquema de proposta da fragmentação para a tamarina (ESI, modo positivo).....	130
FIGURA 5. 55 - Estrutura das cumarinas de massa neutra 244,1099Da referente ao m/z 245,1172. ....	131
FIGURA 5. 56 - Espectro de massas para o íon m/z 245,1188 no tr 19,35 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do ostol (acima). ....	131
FIGURA 5. 57 - Esquema de proposta da fragmentação para a cumarina ostol (ESI, modo positivo).....	132
FIGURA 5. 58 – Cromatograma de íons extraídos da cumarina ostol (19,35). ....	133
FIGURA 5. 59 - Espectro de massas para o íon m/z 313,1413 no tr 19,71 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da nordentatina (acima). ....	134
FIGURA 5. 60 – Cromatograma de íons extraídos da cumarina nordentatina 19,71 min. ....	134
FIGURA 5. 61 - Esquema de proposta da fragmentação para a cumarina nordentatina (ESI, modo positivo). ....	135
FIGURA 5. 62 - Gráfico de S-Plot das raízes de CTSW (ESI, modo positivo). ....	137
FIGURA 5. 63 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes das raízes de CTSW.- a) Cromatograma de íons totais de CTSWRA; b) Cromatograma ampliado nas bandas com maiores diferenças entre as amostras sadia (vermelho) versus a doente (verde).....	137
FIGURA 5. 64 - Espectro de massas para o íon m/z 229,0897 no tr 16,12 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular xantiletina (acima). ....	139

FIGURA 5. 65 - Espectro de massas para o íon m/z 229,0866 no tr 16,33 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular seselina (acima).....	140
FIGURA 5. 66 - Biossíntese das cumarinas (adaptado de Dewick, 2009). .....	141
FIGURA 5. 67 - Estruturas das cumarinas com massa neutra 262,0842 Da referente ao m/z 263,0639. ....	142
FIGURA 5. 68 -Espectro de massas para o íon m/z 263,0639 no tr 5,81; 6,62 e 6,99 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos: a) xantoarnol; b) diidrosuberenol e c) decursinol. ....	142
FIGURA 5. 69 - Proposta para a fragmentação da cumarina xantoarnol (ESI, modo positivo).....	143
FIGURA 5. 70 - Proposta de fragmentação para a cumarina diidrosuberenol (ESI, modo positivo).....	144
FIGURA 5. 71 - Proposta de fragmentação para a cumarina decursinol (ESI, modo positivo).....	145
FIGURA 5. 72 - Espectro de massas para o íon m/z 259,0985 no tr 17,16 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular 5-metoxiseselina (acima). ....	147
FIGURA 5. 73 - Espectro de massas para o íon m/z 259,0985 no tr 17,96 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular xantoxiletina (acima). ....	148
FIGURA 5. 74 - Espectro de massas para o íon m/z 259,0985 no tr 18,17 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular luvangetina (acima).....	149
FIGURA 5. 75 - Espectro de massas para o íon m/z 245,1185 no tr 18,51 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da cumarina Ostol (acima). ....	150
FIGURA 5. 76 - Gráfico S-Plot do caule inferior de TST no modo positivo de ionização. ....	152
FIGURA 5. 77 -Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes de caule inferior de plântulas de TST (ESI, modo positivo). ....	152
FIGURA 5. 78 - Estruturas das flavonas polimetoxiladas de massa neutra 402,1314 Da referente ao m/z 403,1392.....	153

FIGURA 5. 79- Espectro de massas para o íon m/z 403,1392 no tr 15,60 min encontrado no caule inferior de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da flavona nobiletina (acima). .....	153
FIGURA 5. 80 - Proposta de fragmentação para a flavona polimetoxilada nobiletina (ESI, modo positivo). .....	154
FIGURA 5. 81 - Espectro de massas para o íon m/z 389,1219 no tr 17,39 min encontrado no caule inferior de TST (ESI, modo positivo). Espectro do íon molecular do flavonoide.....	155
FIGURA 5. 82 - : Espectro de massas para o íon m/z 373,1287 no tr 17,80 min encontrado no caule inferior de TST (ESI, modo positivo). Espectro do íon molecular do flavonoide.....	155
FIGURA 5. 83 - Estruturas de flavonoides polimetoxiladas de massa referente ao m/z 373,1287.....	156
FIGURA 5. 84 -- Fórmulas estruturais dos flavonóides 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona, 6-hidroxi-3',4',5,7,8-pentametoxiflavona e 7-hidroxi-3',4',5,6,8-pentametoxiflavona. ....	156
FIGURA 5. 85 - Gráfico S-Plot do caule inferior de CTSW no modo positivo de ionização.....	158
FIGURA 5. 86 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes de caule inferior de plântulas de CTSW (ESI, modo positivo).....	158
FIGURA 5. 87 - Espectro de massas para o íon m/z 455,1887 no tr 13,14 min encontrado no caule inferior de TST (ESI, modo positivo). Espectro do íon molecular de limonoíde obacunona ou deoxilimonina.....	159
FIGURA 5. 88 - Fragmentações características de Flavonoides C-glicosilados e O-glicosilados (Fonte: Bellete, 2014).....	162
FIGURA 5. 89 - Gráfico S-Plot do caule superior de TST no modo negativo de ionização.....	163
FIGURA 5. 90 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes de caule superior de plântulas de TST (ESI, modo negativo).....	163
FIGURA 5. 91 - Estrutura dos flavonoides de massa neutra 594,1584 Da referente ao m/z 593,1487. ....	164
FIGURA 5. 92 - Espectro de massas para o íon m/z 593,1486 no tr 5,37 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos	

(abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide vicenina-2 (acima).....	165
FIGURA 5. 93 -Mecanismo de fragmentação proposto para perda de 120 Da. ....	165
FIGURA 5. 94 - Proposta de fragmentação para o flavonoide vicenina-2, identificado no caule. ....	166
FIGURA 5. 95 - Espectro de massas para o íon $m/z$ 593,1486 no tr 7,52 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide didimina (acima).....	167
FIGURA 5. 96 - Proposta de fragmentação para o flavonoide didimina, identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).....	167
FIGURA 5. 97 - Espectro de massas para o íon $m/z$ 623,1592 no tr 8,46 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide 6,8-Di-C-Glu-diosmetina (acima). ....	168
FIGURA 5. 98 - Estrutura do flavonoide de massa referente ao $m/z$ 623,1593. ....	169
FIGURA 5. 99 - Proposta de fragmentação para o flavonoide 6,8-di-C-glu-diosmetina , identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo). ....	169
FIGURA 5. 100 - Estrutura do flavonoide de massa referente ao $m/z$ 607,1681.....	170
FIGURA 5. 101 - Espectro de massas para o íon $m/z$ 607,1681 no tr 8,94 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide diosmina (acima).....	170
FIGURA 5. 102 - Proposta de fragmentação para o flavonoide diosmina, identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).....	171
FIGURA 5. 103 - Estrutura do flavonoide de massa referente ao $m/z$ 609,1879.....	172
FIGURA 5. 104 - Espectro de massas para o íon $m/z$ 609,1878 no tr 9,23 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide hesperidina (acima). ....	172
FIGURA 5. 105 - Proposta de fragmentação para o flavonoide hesperidina, identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).....	173
FIGURA 5. 106 - Estrutura da cumarina de massa neutra 246,0892 Da referente ao $m/z$ 245,0804. ....	173
FIGURA 5. 107 - Espectro de massas para o íon $m/z$ 245,0804 no tr 9,63 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da cumarina 7- demetilisotamarina (acima)..	174

FIGURA 5. 108 - Proposta de fragmentação para a cumarina 7-demetilisotamarina, identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).....	174
FIGURA 5. 109 - Gráfico S-Plot do caule superior de CTSW no modo negativo de ionização.....	176
FIGURA 5. 110 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes de caule superior de plântulas de CTSW (ESI, modo negativo).....	176
FIGURA 5. 111 - Espectro dos íons moleculares no modo negativo de ionização: a) vicenina-2, com m/z 593,1509; b) didymina, com m/z 593,1509; c) 6,8-di-c-glu-diosmetina, com m/z 623,1615; d) NI, com m/z 579,1769; e) diosmina, com m/z 607,1652; f) hesperidina, com m/z 609,1899 e g) 7-demetilisotamarina, com m/z 245,0824.....	177
FIGURA 5. 112 - Continuação do espectro dos íons moleculares no modo negativo de ionização: a) vicenina-2, com m/z 593,1509; b) didymina, com m/z 593,1509; c) 6,8-di-c-glu-diosmetina, com m/z 623,1615; d) NI, com m/z 579,1769; e) diosmina, com m/z 607,1652; f) hesperidina, com m/z 609,1899 e g) 7-demetilisotamarina, com m/z 245,0824. ....	178
FIGURA 5. 113 - Continuação do espectro dos íons moleculares no modo negativo de ionização: a) vicenina-2, com m/z 593,1509; b) didymina, com m/z 593,1509; c) 6,8-di-c-glu-diosmetina, com m/z 623,1615; d) NI, com m/z 579,1769; e) diosmina, com m/z 607,1652; f) hesperidina, com m/z 609,1899 e g) 7-demetilisotamarina, com m/z 245,0824. ....	179
FIGURA 5. 114 - Gráfico S-Plot das folhas de TST versus CTSW no modo negativo de ionização.....	182
FIGURA 5. 115 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes das folhas no modo negativo de ionização. a) Cromatograma ampliado de íons totais de TST FOTE (vermelho) versus TSTFO (verde); b) Cromatograma ampliado de íons totais de CTSW FOTE (vermelho) versus CTSWFO (verde). ....	182
FIGURA 5. 116 - Sobreposição das bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes das folhas no modo negativo de ionização: Cromatograma ampliado de íons totais de TST FO (vermelho) versus CTSWFO (verde). ....	183
FIGURA 5. 117 - Curva analítica das soluções padrões de xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina e hesperidina. ....	189
FIGURA 5. 118 - Cromatograma de quantificação das cumarinas xantiletina e	

seselina, obtido por CLAE-UV. Condições: Zorbax™ C18 (4,6x150 mm, 5 µm), H <sub>2</sub> O/ACN (60:40), 35°C, 1,00 mL/min, vol. inj. 15,0 µL, λ = 260 nm, 35 min. ....	194
FIGURA 5. 119 - Cromatograma de plotagem de íons totais dos voláteis de Citrus sinensis. a) amostras das raízes de TST – sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa); b) amostras das raízes de CTSW- sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa).....	198
FIGURA 5. 120 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de TSTRA nas raízes doentes inoculados com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS. ....	201
FIGURA 5. 121 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de CTSWRA nas raízes doentes inoculados com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS. ....	201
FIGURA 5. 122 - Cromatograma de plotagem de íons totais dos voláteis de Citrus sinensis. a) Amostras do caule inferior de TST – sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa); b) amostras do caule inferior de CTSW- sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa). ....	202
FIGURA 5. 123 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de TSTCAINF inoculados com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS.....	205
FIGURA 5. 124 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de CTSWCAINF inoculados com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS. ....	206
FIGURA 5. 125 - Cromatograma de plotagem de íons totais dos voláteis de Citrus sinensis. a) amostras das folhas de TST – sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa); b) amostras das folhas de CTSW- sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa).....	207
FIGURA 5. 126 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de TSTFO-folhas inoculados com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS.....	209
FIGURA 5. 127 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de CTSWFO-folhas inoculados com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS. ....	209
FIGURA 5. 128 Rota metabólica resumida dos metabólitos secundários oriundos da rota Chiquimato.....	210

## RESUMO

“ ESTUDO QUÍMICO DE *PHYTOPHTHORA NICOTIANAE* E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE *CITRUS SINENSIS*”. O presente trabalho descreve o estudo da variação do perfil químico de citros após a inoculação do oomiceto “*Phytophthora nicotianae*”, responsável pela gomose de citros que é uma das doenças que vem causando prejuízos na citricultura brasileira. Para isso, inoculou-se a “*P.nicotianae*” em mudas de “Valência” [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas em “Citrumelo Swingle” [*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*] e Tangerina Sunki Tropical [*Citrus Sunki* Hort. ex Tan] onde avaliou-se a variação do perfil químico dos principais metabólitos secundários através do desenvolvimento de métodos analíticos como HPLC-UV, LC-MS/MS, CG/MS e UHPLC- MS/MS com ferramentas quimiométricas. Essas ferramentas quimiométricas aplicadas aos dados obtidos nos estudos de UHPLC-MS/MS permitiram discriminar as plantas infectadas com o oomiceto daquelas saudáveis, e também a caracterização dos compostos que mais contribuem para essa diferenciação. Ao analisar a variação do perfil químico dos citros estudados através da técnica de UHPLC-MS/MS foi possível detectar a variação principalmente de algumas cumarinas nas raízes e caule inferior, flavonoides glicosilados nas folhas e caule superior entre as mudas infectadas com gomose e as saudáveis, indicando que estes compostos podem estar envolvidos no mecanismo de defesa das plantas, e podem ser considerados uma fitoantecipinas. Na metodologia utilizada para o estudo de biomarcadores voláteis no HS/GC-MS, foi possível observar variações e os principais marcadores voláteis para as matrizes estudadas, foi D-limoneno e guaiacol em caules e folhas, em matrizes inoculadas com o patógeno causador da doença gomose de citros. Também foi feito o estudo químico do oomiceto em alguns meios de cultivos, além de comparações de crescimento micelial com o objetivo de obter substâncias padrões, que resultou no isolamento de metabólitos secundários da classe das antronas.

## ABSTRACT

“*PHYTOPHTHORA NICOTIANAE* CHEMICAL STUDY AND ITS INFLUENCE ON THE CHEMICAL PROFILE OF *CITRUS SISENSIS* SEEDLINGS.” The present work describes the study of the variation of the citrus chemical profile after the inoculation of the oomiceto "*Phytophthora nicotianae*", responsible for citrus gomose disease, which is one of the diseases that is causing damages in Brazilian citriculture. For this, "*P.nicotianae*" was inoculated in "Valencia" seedlings [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] grafted on "Citrumelo Swingle" (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) and Sunki Tropical Tangerine [*Citrus Sunki* Hort. ex Tan], where it was evaluated chemical profile of the major secondary metabolites through the development of analytical methods such as HPLC-UV, LC-MS / MS, CG / MS and UHPLC-MS / MS with chemometric tools. These chemometric tools applied to the data obtained in the UHPLC-MS / MS studies allowed discriminating the infected plants with the oomiceto of healthy plants, as well as the characterization of the compounds that contribute most to this differentiation. When analyzing the chemical profile variation of the citrus studied by the UHPLC-MS / MS technique it was possible to detect the variation mainly of some coumarins in the roots and lower stem. Glycosylated flavonoids in the leaves the gomose infected seedlings and the healthy ones indicating that these compounds may be involved in the plant defense mechanism, and may be considered a phytoanticipal. In the methodology used for the study of volatile biomarkers in the HS / GC-MS, it was possible to observe variations and the main volatile markers for the studied matrices, was D-limonene and guaiacol in stems and leaves, matrices inoculated with the pathogen causing the disease gomose of citrus. In addition, the chemical study of the oomiceto in some culture was done, in addition to comparisons of mycelial growth with the objective of obtaining standard substances, which resulted in the isolation of lesser known secondary metabolites of the anthron class.

## SUMÁRIO

Lista de Símbolos e abreviações .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xxvi
ABSTRACT .....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Citricultura no Brasil e no mundo.....	1
1.2. <i>Phytophthora</i> ssp. ....	3
1.2.1. Espécies de <i>Phytophthora</i> Registradas no Brasil, Distribuição Geográfica e Hospedeiros.....	6
1.3. <i>Phytophthora nicotianae</i> Breda de Haan (syn <i>P.parasítica</i> ).....	10
1.4. Gomose, Tombamento e Podridão Parda em <i>Phytophthora</i> ssp. ....	14
1.5. Uso de Porta Enxertos em Plantas de Citrus .....	19
1.6. Interações Patógeno-Planta .....	24
1.7. Análise Metabolômica e sua Quimiosistemática .....	30
1.8. LC-MS <sup>E</sup> e Massas de Alta Resolução .....	34
1.9. Processo de extração dos Voláteis por “ <i>Headspace</i> ” estático associada a GC-MS 36	
1.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	38
2. Justificativa .....	39
3. Objetivo .....	41
3.1. Objetivo Geral.....	41
3.2. Objetivos Específicos .....	41
4. Procedimento Experimental .....	43
4.1. Obtenção do fungo <i>Phytophthora nicotianae</i> .....	43
4.1.1. Materiais.....	43
4.1.2. Suportes usados nos estudos cromatográficos .....	43

4.1.3. Eluentes .....	44
4.1.4. Colunas.....	44
4.1.5. Reveladores .....	44
4.1.6. Detectores.....	44
4.1.7. Filtros .....	44
4.1.8. Micropipetas.....	45
4.1.9. Papel de filtro.....	45
4.2. Materiais utilizados para o isolamento- identificação- cultivo e conservação do microrganismo.....	45
4.2.1. Isolamento do Fungo – Oomiceto .....	45
4.2.2. Cultivo do Fungo – meios de cultivos .....	45
4.3. Equipamentos.....	46
4.3.1. Evaporadores.....	46
4.3.2. Balanças analíticas.....	46
4.3.3. Cromatógrafo líquido de alta eficiência .....	46
4.3.4. Espectrômetros de Massas .....	46
4.3.5. Ressonância Magnética Nuclear .....	47
4.3.6. Centrífuga.....	47
4.3.7. Homogeneizadores.....	47
4.3.8. Unidade de Extração em Fase Sólida (SPE).....	47
4.3.9. Moinhos .....	48
4.3.10. Câmara de Fluxo Laminar .....	48
4.3.11. Autoclaves Verticais .....	48
4.3.12. Estufa Incubadora (B.O.D) .....	48
4.3.13. Banho de Ultra-som .....	48
4.4. Avaliação do crescimento micelial de <i>P.nicotianae</i> em diferentes meios de cultivos .....	49

4.4.1. Cultivo do meio líquido e sólido.....	49
4.4.2. Análises de microextração para comparação de meio de cultivo.....	50
4.4.3. Cultivo do oomiceto em meio sólido.....	51
4.4.4. Coleta do Material Vegetal – Plântulas de <i>Citrus sinensis</i> .....	52
4.4.5. Metodologias utilizadas para análise da variação do perfil químico do oomiceto e das plântulas de <i>Citrus sinensis</i> .....	52
4.4.6. Preparação das soluções padrões para a construção da curva de calibração.....	69
5. Resultados e Discussão.....	73
5.1. Avaliação da produção metabólica do oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> em diferentes meios de cultivos.....	73
5.2. Crescimento do oomiceto <i>P.nicotianae</i> em larga escala para otimização de metodologia para isolamento e identificação de metabolitos secundários.....	76
5.3. Reisolamento de <i>P. nicotianae</i> para teste de patogenicidade.....	90
5.4. Estudo de indução de resistência em plântulas de <i>Citrus sinensis</i> frente ao patógeno.....	91
5.5. Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura dos caules inferiores das plântulas de TST e CTSW.....	95
5.6. Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-MS <sup>E</sup> .....	98
5.7. Análise de Dados Multivariados.....	107
5.7.1. Organização dos dados e Análise de componentes principais.....	107
5.7.2. Análises dos biomarcadores via <i>S-plot</i> dos pés francos (TST e CTSW) das análises no modo positivo de ionização.....	112
5.7.3. Análises do caule inferior dos pés francos no modo positivo de ionização.....	151
5.7.4. Análises do caule superior dos pés francos no modo negativo de ionização.....	160
5.7.5. Análises das folhas dos pés francos no modo negativo de ionização..	181
5.8. Validação do método analítico para quantificação das cumarinas e flavonoides	

nos órgãos das plântulas de <i>Citrus sinensis</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV).....	185
5.8.1. Faixa dinâmica do trabalho – Linearidade .....	186
5.8.2. Precisão e Exatidão do método analítico.....	190
5.8.3. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) .....	193
5.8.3. Quantificação do teor de cumarinas e flavonoides nas matrizes de TST e CTSW por CLAE-UV .....	194
5.9. Busca de biomarcadores voláteis em <i>Citrus sinensis</i> quando inoculados ao oomiceto <i>Phytophthora nicotianae</i> .....	197
6. Conclusões e Perspectivas .....	212
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	218
ANEXO .....	230

# *Introdução*

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Citricultura no Brasil e no mundo**

A citricultura, do ponto de vista convencional, é praticada em diferentes regiões do mundo e em consequência desse cultivo, a cultura passou por uma adaptação às distintas condições climáticas, desde o clima tropical, subtropical até o equatorial, com plantios localizados nas regiões úmidas e áridas (SENTELHAS, 2005). As plantas cítricas, embora, possuam determinadas exigências edáficas, elas adaptam-se bem aos vários tipos de solos. Na atualidade, o cultivo de citros é realizado em uma ampla faixa ao redor do mundo, as principais áreas produtoras concentram-se nas regiões subtropicais, sendo que nessas áreas, a temperatura de cultivo oscila entre 25 a 30 °C, consideradas ótimas para a atividade fotossintética da planta (AGUSTÍ, 2003).

Os citros mais utilizados em plantios comerciais estão distribuídos em seis grupos básicos: laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas, pomelos e outro de menor importância, como a lima comum. O grupo das laranjas doces (*C. sinensis*) apresenta maior expressividade e predominam na maioria dos países citrícolas. As plantas cítricas, como as do gênero *Citrus* L. (pertencentes ao gênero Swingle), o trifoliata (*Poncirus*), entre outros gêneros correlatos à subfamília Aurantioideae, família Rutaceae, são originárias das regiões tropicais e subtropicais do sudeste do continente asiático, com vários ramos filogenéticos espalhados pelo mundo (CHAPOT, 1975; MABBERLEY, 1997).

Esses citros englobam um grupo dessas plantas do gênero *Citrus* e híbridos, além de outros gêneros da família Rutaceae na qual se encontram as laranjas doces - Laranja Lima, Baia, Baianinha, Piralima, Pera, Natal, Rubi, Westin, Valencia e outras (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limão siciliano (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e as limas doces - Lima da Pérsia (*Citrus limettíoides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (POMPEU JUNIOR, 1991).

A produção da laranja é uma atividade agrícola moderna que se dá

hoje sob o comando técnico-científico das grandes empresas que atuam no setor de sucos (Citrosuco, Cutrale, Citrovita, Coinbra/Dreyfuss e Cargill, entre outras). Essas empresas atuam em pontos do território nacional onde são encontradas as melhores condições para a otimização de sua produção e comercialização. (SANTOS & SILVEIRA, 2001).

O Brasil se mantém como o maior produtor mundial de laranja (58%), especialmente o estado de São Paulo, responsável por cerca de 80% do total da produção nacional. O segundo maior produtor são os Estados Unidos, com 31% do total mundial (principalmente o estado da Flórida) (SALOMÃO, 2017). São Paulo e Flórida concentram em torno de 89% da produção mundial de laranja. As demais regiões produtoras são: Espanha (2%), México (2%) e China (5%) (ABECITRUS, 2017). Tanto São Paulo quanto Flórida destinam as maiores proporções da sua produção para o processamento do suco, 80 e 90% respectivamente. Estima-se que a produção de citros se situa ao redor de 102 milhões de toneladas ao ano, ocupando uma área de 7,3 milhões de hectares (IAC, 2017).

O Brasil tem participação superior a 80% no comércio internacional de suco de laranja concentrado congelado. O Produto Interno Bruto (PIB) do segmento citrícola ainda é maior no mercado interno, somando US\$ 4,4 bilhões em 2009 antes US\$ 2,2 bilhões arrecadados com vendas ao mercado externo. Aos produtores de citros, coube um faturamento de US\$ 1,9 em 2009, que chegou a US\$ 14,6 bilhões quando considerados todos os elos da cadeia produtiva. (FNP, 2017).

Entretanto, a citricultura nacional apresenta inúmeras pragas e doenças que limitam sua produção e comprometem a biossegurança alimentar. Dentre elas, várias doenças que atacam citros em todo o mundo. As doenças relacionadas à utilização de porta-enxertos sempre foram impactantes ao sistema produtivo. Com o intuito de prevenir essas patologias de fungos e bactérias de solo, como a gomose e aquelas causadas por nematoides, o uso de porta enxertos resistentes tem sido o método mais viável e econômico utilizado, esses genótipos através da enxertia, visa contribuir com o sistema radicular para melhorar a produção, a qualidade dos frutos, além de aumentar a longevidade das plantas, reduzindo a alturas das árvores e o tempo necessário para o início da produção

(espécie copa). Novos porta-enxertos, resistentes por exemplo ao declínio e a morte súbita de citros, passaram a ter maior participação nos pomares citrícolas, como as tangerinas Sunki e Cleópatra, porém sendo mais suscetíveis a gomose (POMPEU JUNIOR, 2005).

As principais espécies e variedades foram separadas em cinco classes de acordo com sua suscetibilidade às infecções. Na classe de suscetibilidade muito alta, enquadram-se os limões verdadeiros, como suscetibilidade alta, citam-se as laranjas doces, limas ácidas, limões rugosos. A classe de suscetibilidade moderada traz as tangerinas Sunki e Cleópatra, o limão cravo, Volkameriano. A laranja azeda possui uma suscetibilidade baixa e o Citrumelo Swingle com a trifoliata, de suscetibilidade muito baixa, ou seja, são as mais resistentes ao patógeno da gomose de citros (FUNDECITRUS, 2017).

## **1.2. *Phytophthora* ssp.**

*Phytophthora* ssp. (FIGURA 1.1), são patógenos do solo e agentes causais de importantes doenças em centenas de hospedeiros em todo o mundo. Em viveiros, eles atacam as radículas, as raízes e o colo das plântulas, causando-lhes tombamento e mela; infectam folhas e ponteiros, principalmente em telhados sem proteção contra a chuva. No campo e em pós-colheita, infectam também os frutos. No Brasil, *P. nicotianae* (sin. *P. parasítica*) e *P. citrophthora* são os mais comuns e danosos agentes etiológicos desta doença (ROSSETTI, 2001), sendo *P. nicotianae* a espécie predominante nas principais regiões produtoras de cítricos (FEICHTENBERGER, 2001).

O gênero *Phytophthora* foi descrito pela primeira vez por Anton De Bary, tendo *P. infestans* como a espécie em estudo, depois desse trabalho, um número elevado de espécies tem sido descrito e, em 2010, este gênero já compreendia mais de 100 espécies (ÉRSEK & RIBEIRO, 2010). Deve-se enfatizar que este aumento foi mais acentuado nos últimos 10 anos, sendo explicado, por um lado, devido à disponibilidade de ferramentas mais sofisticadas para a definição das espécies e, por outro lado, ao maior número de levantamentos para a presença

de novas espécies de *Phytophthora* em ambientes naturais e agrícolas (HANSEN ET AL., 2013; KROON ET AL., 2012).

Diversas doenças dos citros tem limitado a produtividade de pomares, e aquelas causadas pelo gênero *Phytophthora ssp.* correspondem as mais sérias doenças de solo e ocorrem em todas as regiões produtoras de citros e os danos provocados pelo oomiceto são estimado em 10 a 30 % da produção mundial, causando prejuízos de milhões de dólares, uma vez que afetam todas as fases de desenvolvimento e conseqüentemente, a sua produção. Os danos causados por *P. nicotianae*, por exemplo, são mais prejudiciais às plantas que as de *P. citrophthora* por causarem lesões mais extensas e atingirem maior número de elementos dos vasos, ocasionando o anelamento do tronco e, posterior, morte da planta (CHIACCHIO, 1978).



FIGURA 1. 1- oomiceto *Phytophthora nicotianae* em meio de cultivo de cenoura e milho (CM) com 15 dias de crescimento micelial.

A incidência e a severidade das doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil, tem aumentado bastante nas últimas décadas como mostra a FIGURA 1.2, várias espécies do gênero foram descritas como capazes de induzir doenças em plantas cítricas. As doenças incitadas por *Phytophthora spp* em citros são comumente referidas como gomose, que são conhecidas desde o século X, na Península Ibérica. A primeira grande epidemia de gomose dos citros ocorreu nas ilhas Açores, a partir de 1832, tendo sido observada desde 1845 em Portugal, com manifestações bastante severas. A partir desse foco, alastrou para a Espanha, tendo sido observada no sul da França em 1851, no norte da Itália em 1855, e, mais

tarde na Grécia. Na América do Norte foi relatada em 1875 na Califórnia, tendo o primeiro surto importante da doença ocorrido na Flórida quatro anos mais tarde. Na América do Sul, o primeiro caso documentado ocorreu em 1709 em Lima, no Peru, e somente em 1917 foi detectada no Brasil. (SWINGLE, 1967).

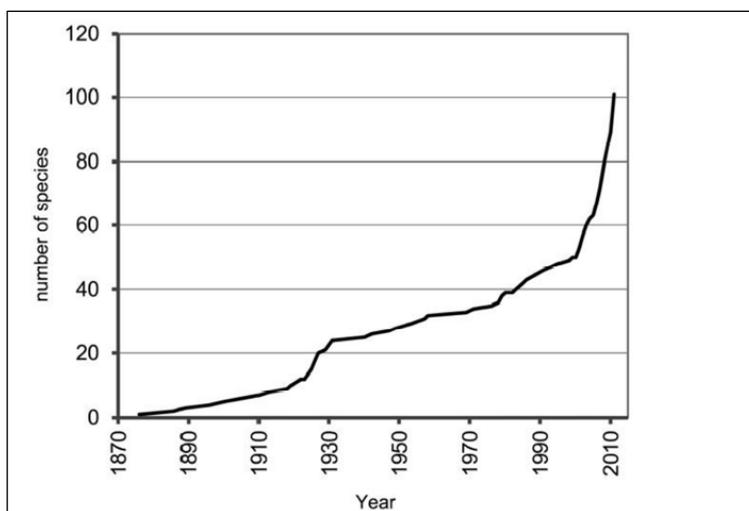


FIGURA 1. 2 - Aumento do número de espécies relatadas de *Phytophthora* no mundo desde 1876 até 2010. (Fonte: SANTOS, 2014).

Os sintomas da infecção, são lesões na casca da base da planta, raízes e nos galhos baixos, com exsudação de goma pelo fendilhamento da casca. Pode-se observar ainda, na parte interna dessa casca, uma coloração pardacenta. A água do solo é a forma de umidade que mais torna a planta suscetível a esses agentes patogênicos (BEDENDO, 2011). A irrigação excessiva ou a má drenagem do solo podem levar ao encharcamento do mesmo. O encharcamento diminui a disponibilidade de oxigênio para as raízes, prejudica a absorção de água e nutrientes e cria condição propícia aos zoósporos (AMORIM, 2011). Essa situação ocorre principalmente em viveiros de mudas, onde a densidade de plantas é elevada, provocando a elevação da severidade de doenças causadas pelo gênero *Phytophthora* (BEDENDO; AMORIM, 2011).

É importante lembrar que, como *Phytophthora spp* produzem estruturas de resistência, a eliminação desses patógenos dos solos é extremamente difícil. Assim, a exclusão é o principal método de controle de doenças provocadas por *Phytophthora spp* (BELTRAME, 2010). Com o progresso

da doença, os tecidos apodrecem e quando a lesão envolve toda a circunferência do tronco, a planta morre rapidamente (MUNIZ, 2004). Outras medidas importantes que podem ser usadas como controle são altura de enxertia, evitar ferimentos de tronco e raízes, utilizar água de irrigação livre do patógeno e utilizar adubos orgânicos para favorecer a microbiota antagônica a *Phytophthora spp* (BELTRAME, 2010).

O controle curativo dessa doença pode ser realizado com controle químico utilizando-se fosetil-Al ou fosfitos (FEICHTENBERGER et al., 2005). A aplicação indiscriminada de fungicidas nos pomares além de favorecer a seleção de linhagens resistentes do patógeno aos ingredientes ativos, aumenta o risco de contaminação ambiental e à saúde dos agricultores e consumidores (SCHWAN-ESTRADA et al., 2010).

### **1.2.1. Espécies de *Phytophthora* Registradas no Brasil, Distribuição Geográfica e Hospedeiros**

De acordo com o levantamento bibliográfico feito por SANTOS conduzido até 2013, tem-se o registro de algumas espécies de *Phytophthora* no Brasil (TABELA 1.1). *P. nicotianae* continua sendo a espécie predominante, sendo assinalada em 34 hospedeiros, compreendendo 22 famílias botânicas (TABELA 1.1), seguida de *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. palmivora* e *P. cinnamomi*. Estas estatísticas evidenciam que *P. nicotianae* é a principal espécie encontrada no Brasil, atacando cultivos agrícolas, principalmente de citrus e florestais; enquanto que algumas espécies como *P. boehmeriae*, *P. glovera*, *P. richardiae* e *P. sojae* apresentam somente uma planta hospedeira assinalada em todo o país.

***ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.***

TABELA 1. 1 - Lista de espécies de *Phytophthora* registrada no Brasil e seus hospedeiros. (Fonte: SANTOS, 2014).

<b>Espécie - Número de hospedeiros</b>	<b>Hospedeiros Família - nome comum e (nome científico)</b>	<b>Referência</b>
<i>Phytophthora boehmeriae</i> Sawada (1927) – 1	Mimosaceae - acácia-negra ( <i>Acacia mearnsi</i> )	Santos et al. (2006); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora cactorum</i> (Leb. & Cohn) Schröeter (1886) - 5	Orchidaceae, - catleia ( <i>Cattleya sp.</i> ); Rutaceae – citros ( <i>Citrus spp.</i> ); Rosaceae – morango ( <i>Fragaria sp.</i> ) e macieira ( <i>Malus domestica</i> );	Mendes et al. (1998); Luz et al. (2001); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian (1922) emend. Alizadeh & Tsao (1988);	Cucurbitaceae – melão ( <i>Cucumis melo</i> ), pepino ( <i>Cucumis sativus</i> ), abóboras ( <i>Cucurbita máxima</i> , <i>C. moschata</i> , <i>C. pepo</i> , <i>Cucurbita spp.</i> ); Euphorbiaceae – seringueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Hevea spp.</i> ),	Mendes et al. (1998); Luz et al. (2001)
Tsao (1991); Mchau & Coffey (1995)– 21	Mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> ); Fabaceae: feijão - vagem ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ); Malvaceae – cacaueteiro ( <i>Theobroma cacao</i> ); Piperaceae - pimenta-do-reino ( <i>Piper nigrum</i> ); Rosaceae - pêsego ( <i>Prunus persica</i> ), nectarina ( <i>Prunus pérsica var. nectarina</i> ); pimentão e pimenta para páprica ( <i>Capsicum annuum</i> ), pimenta ( <i>Capsicum spp.</i> ), tomateiro ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ).	Ribeiro (1996)
	Rosaceae – Morango ( <i>Fragaria vesca</i> )	Carmo et al. 2011
	Cucurbitáceae – Melancia	Reis et al. 2007
<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands ( 1922 ) var. <i>cinnamomi</i> – 12	Alliaceae - cebola ( <i>Allium cepa</i> ); Araucaceae – araucária ( <i>Araucartia angustifolia</i> ); Bromeliaceae, - abacaxi ( <i>Ananas comosus</i> ); Lauraceae – abacateiro ( <i>Persea americana</i> , <i>P. gratíssima</i> ); Myrtaceae – eucalipto ( <i>Eucaliptus ssp</i> ) Passifloraceae – maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> ); Pineaceae – pínus ( <i>Pinus patula</i> ); Rutaceae – citros ( <i>Citrus spp.</i> );  Manikara máxima; Harleyodendron unifoliatum	Magalhães (2009); Luz et al. (2001); Erwin & Ribeiro (1996)

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

<i>Phytophthora citricola</i> Sawada (1927) - 2	Lauraceae – abacate ( <i>Persea americana</i> ); Myrtaceae – goiaba ( <i>Psidium guajava</i> )	Luz et al. (2001); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora citrophthora</i> (Smith & Smith) Leonian (1925) – 13	Araceae – antúrio ( <i>Anthurium andreanum</i> , <i>Anthurium spp.</i> ); Euphorbiaceae – seringueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Hevea spp.</i> ); Malvaceae – cacaueteiro ( <i>Theobroma cacao</i> ); Rutaceae – lima da Pérsia ( <i>Citrus aurantifolia</i> ), laranja azeda ( <i>C. aurantium</i> ), limão Sicília ( <i>C. lemon</i> ), limão cravo ( <i>C. limonia</i> ), tangerina ( <i>C. reticulata</i> ), laranja China ( <i>C. sinensis</i> ), citros ( <i>Citrus spp.</i> ), poncírus ( <i>Poncirus trifoliata</i> ).	Mendes et al. (1998); Luz et al. (2001); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora cryptogea</i> Pethybridge & Lafferty (1919) - 2	Rosaceae - macieira ( <i>Malus domestica</i> )	Mendes et al. (1998); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora drechsleri</i> Tucker (1931) - 2	Euphorbiaceae – mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> ); Rosaceae - macieira ( <i>Malus domestica</i> )	Mendes et al. (1998); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora heveae</i> Thompson (1929) - 6	Lecythidaceae - castanha-do-Pará ( <i>Bertholetia excelsa</i> ); Anacardiaceae – cajueiro ( <i>Anacardium sp.</i> ); Malvaceae – cacaueteiro ( <i>Theobroma cacao</i> ); Plantas endêmicas da Mata Atlântica - <i>Parinari alvimi</i> ; <i>Manikara máxima</i> ; <i>Harleyodendron unifoliatum</i>	Albuquerque et al. (1974); Luz et al. (1989); Luz; Freire (1998); Magalhães (2009);
<i>Phytophthora hibernalis</i> Carne (1925) - 1	Rutaceae – citros ( <i>Citrus spp.</i> )	Luz et al. (2001); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary (1876) - 2	Solanaceae - tomateiro ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ), batata ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Viegas; Teixeira (1943); Erwin & Ribeiro (1996)

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

<p><i>Phytophthora megasperma</i> Drechsler (1931) – 3</p>	<p>Piperaceae - pimenta do reino (<i>Piper nigrum</i>); Rosaceae – macieira (<i>Malus domestica</i>); Rutaceae - citros (<i>Citrus sp.</i>)</p>	<p>Mendes et al. (1998); Erwin &amp; Ribeiro (1996)</p>
<p><i>Phytophthora nicotianae</i> Breda de Haan (1896) = <i>Phytophthora parasitica</i> Dastur (sinonímias: <i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>, <i>P. nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>, <i>P. terrestris</i>, <i>P. parasitica</i> var. <i>sesami</i>) – 34</p>	<p>Alliaceae - cebola (<i>Alium cepa</i>); Amaranthaceae - espinafre (<i>Spinacia oleracea</i>) Annonaceae - fruta-do-conde (<i>Annona squamosa</i>), graviola (<i>A. muricata</i>); Apiaceae – coentro (<i>Coriandrum sativum</i>)</p>	
	<p>Bromeliaceae, - abacaxi (<i>Ananas comosus</i>); Caricaceae - mamoeiro (<i>Carica papaya</i>); Euphorbiaceae - flor-de-papagaio (<i>Euphorbia pulcherrima</i>), mandioca (<i>Manihot esculenta</i>); Gernericeae – violeta (<i>Saintpaulia ionantha</i>); Lamiaceae – alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>); hortelã miúda (<i>Mentha vilosa</i>); Leguminosae – ervilha (<i>Pisum sativum</i>); Malvaceae – vinagreira (<i>Hibiscus sabdariffa</i>); Mimosaceae - acácia-negra (<i>Acacia mearnsi</i>); Moraceae – figueira (<i>Ficus carica</i>); Pedaliaceae – gergelim (<i>Sesamum indicum</i>); Piperaceae – pimeta do reino (<i>Piper nigrum</i>); Rosaceae – morango (<i>Fragaria sp.</i>); Ruscaceae – dracena baby (<i>Dracaena sanderiana</i>) Rutaceae – citros (<i>Citrus sp.</i>); laranja (<i>Citrus sp.</i>); limão Siciliano (<i>Citrus lemon</i>), limão cravo (<i>Citrus limonia</i>), tangerina (<i>Citrus reticulata</i>), laranja China (<i>Citrus sinensis</i>), poncirus (<i>Poncirus trifoliata</i>); Solanaceae – fumo (<i>Nicotiana tabacum</i>), tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>), berinjela (<i>Solanum melongena</i>); jiló (<i>Solanum gilo</i>)</p>	<p>Mendes et al. (1998); Santos et al. (2005); Santos; Luz, 2011; Santos et al. (2011); Santos et al. (2013); Erwin &amp; Ribeiro (1996)</p>
	<p>Apocynaceae - vinca (<i>Vinca rosea</i>)</p>	<p>Reis &amp; Henrique (2007)</p>
	<p>Solanaceae – jiló (<i>Solanum gilo</i>)</p>	<p>Laureano &amp; Reis</p>

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

<i>Phytophthora palmivora</i> (Butler) Butler (1919) var. <i>palmivora</i> (sinonímia: <i>P. faberi</i> , <i>P. carica</i> ) - 10	Annonaceae - fruta-do-conde ( <i>Annona squamosa</i> ); Arecaceae ( <i>Palmae</i> ) - coqueiro ( <i>Cocos nucifera</i> ), pupunheira ( <i>Bactris gasipaes</i> ); Caricaceae - mamoeiro ( <i>Carica papaya</i> ); Euphorbiaceae - seringueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Hevea spp.</i> ); Lamiaceae - manjeriço ( <i>Ocimum gratissimum</i> ); Piperaceae, - pimenta-do-reino ( <i>Piper nigrum</i> ); Rutaceae, - citros ( <i>Citrus sp.</i> ); Malvaceae - cacaueteiro ( <i>Theobroma cacao</i> )	Mendes et al. (1998); Luz et al. (2001); Santos (2010); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora phaseoli</i> Thaxter (1889) - 3	Fabaceae - fava ( <i>Phaseolus lunatus</i> ); feijão-mungo ( <i>Vigna radiata</i> ); feijão ( <i>P. vulgaris</i> )	Siqueira et al. (1985); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora richardiae</i> Buisman (1927) - 1	Euphorbiaceae - mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> )	Poltronieri et al. (1997); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora sojae</i> Kaufmann & Gerdemann (1958) (sinonímia: <i>Phytophthora megasperma</i> f.sp.glycinea) - 1	Fabaceae - sojae ( <i>Glycine max</i> )	Costamilan et al. (1996); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora syringae</i> (Klebahn) Klebahn (1909) - 2	Alliaceae - cebola ( <i>Allium cepa</i> ); Rutaceae - citros ( <i>Citrus spp.</i> )	Mendes et al. (1998); Erwin & Ribeiro (1996)
<i>Phytophthora tropicalis</i> Aragaki & Uchida (2001) - 2	Moraceae - fruta-pão ( <i>Artocarpus altilis</i> ); Piperaceae - pimenta-do-reino ( <i>Piper nigrum</i> )	Cerqueira et al (2006); Aragaki, M; Uchida, JL. (2001); Gallegly & Hong (2008)

### 1.3. *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (syn *P. parasítica*)

De origem grega, o termo *phyto* (planta) e *phthora* (destruição), significa “destruição da planta”, termo esse associado aos sintomas de “podridão” que desenvolve na planta após a infecção. *P. nicotianae* (syn. *P. parasítica*) pertence à família *Pythiaceae*. As espécies do gênero *Phytophthora* deixaram de ser consideradas fungos verdadeiros há um certo tempo, depois passaram a fazer parte do reino Chromista e atualmente estão classificadas no reino Straminipila, sub-reino Chromophyta, filo Heterokonta, subfilo Peronosporomycotina, classe

Peronosporomycetes, subclasse Peronosporomycetidae, ordem Pythiales, família Pythiaceae, de acordo com a classificação proposta por DICK (2001). Apesar de não se encontrarem dentro do reino fungi, os oomicetos são estudados juntamente com os fungos verdadeiros devido ao seu crescimento micelial. No entanto, várias diferenças existem entre esses grupos de microrganismos. Uma delas é a composição química da parede celular. Em *Phytophthora*, quitina está ausente, salvo poucas exceções, e estão presentes  $\beta$ -1,3 glucanos e celulose (DICK, 2001).

Esse agente causal é polífago e cosmopolita, possui uma ampla gama de hospedeiros, causando danos em cultivos agrícolas ou em ecossistemas naturais no Brasil e no mundo, tem natureza de caráter policíclico ao ocasionar uma epidemia, sobrevive por muito tempo no solo, por meio das estruturas de resistências, como clamidósporos e oósporos (esporos sexuais), além de atuar, como um importante fitopatógeno da parte aérea das plantas (infectando caule, ramos, folhas, flores, frutos e vagens, quando o inóculo atinge esses órgãos), e, principalmente, como fitopatógeno habitante do solo, atacando as raízes e a região do coleto das plantas de inúmeras culturas, o que faz dessa espécie, uma das mais importantes nas regiões de climas tropicais, subtropicais e temperados de todo o mundo, em termo de distribuição geográfica (HALL, 1994; LUDOWICI et al., 2013).

Esse grupo de microrganismos é favorecido por água livre no solo e folhagens, possui micélio cenocítico, ou seja, com poucos ou nenhum septo e celulose na constituição da parede celular (ERWIN; RIBEIRO, 1996). A reprodução assexual do gênero leva à formação de zoósporos, os quais não apresentam parede celular e são biflagelados, sendo um flagelo liso e outro do tipo *tinsel* que se formam dentro ou a partir de esporângios globosos, por clivagem citoplasmática (FEICHTENBERGER et al., 2005; TYLER, 2002).

As espécies *P. citrophthora* e, principalmente *P. nicotianae* produzem esporângios com a presença de uma papila proeminente, dentro dos quais forma-se um número representativo (de 10 a 30) de zoósporos unicelulares biflagelados. Os esporângios de *P. nicotianae* podem formar tubo germinativo (germinação direta) ou, por clivagem citoplasmática, produz zoósporos que são liberados através de um poro (germinação indireta). Na FIGURA 1.3, os zoósporos

são esporos assexuais móveis, biflagelos e sem parede celular. Podem nadar a curtas distâncias e quando encontram o hospedeiro perdem os flagelos, encistam (formam parede celular) e emitem o tubo germinativo. Mesmo sem encontrar seu hospedeiro, os zoósporos podem encistar e permanecer no solo. Também no solo, se encontram os principais esporos de resistência de *P.nicotianae*, os clamidósporos, e os esporos sexuais, os oósporos (FEICHTENBERGER, 2001).

O tamanho do zoósporo varia de 7 a 11 µm de comprimento (CARLILE 1986; HOLDCROFT, 2013; TYLER, 2007; WANG et al., 2010). Os zoósporos, dentre todos os propágulos de disseminação do fitopatógeno, são a via mais importante de infecção das raízes (os chamados propágulos infecciosos), principalmente quando o solo se encontra sob o efeito de alta umidade (por exemplo, nas condições de irrigação) e são liberados através de uma abertura da papila, chamada de opérculo (WANG, 2010). A alta umidade presente no solo faz com que o hospedeiro libere exsudatos radiculares que são carregados pela lâmina d'água até o local onde se encontram os propágulos infecciosos (zoósporos, esporângios, talo micelial, clamidósporos, etc.). Na reprodução sexual, formam-se o oogônio (gametângio feminino) e o anterídio (gametângio masculino), por meio de meiose gametangial, tornando-os haplóides (MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011).

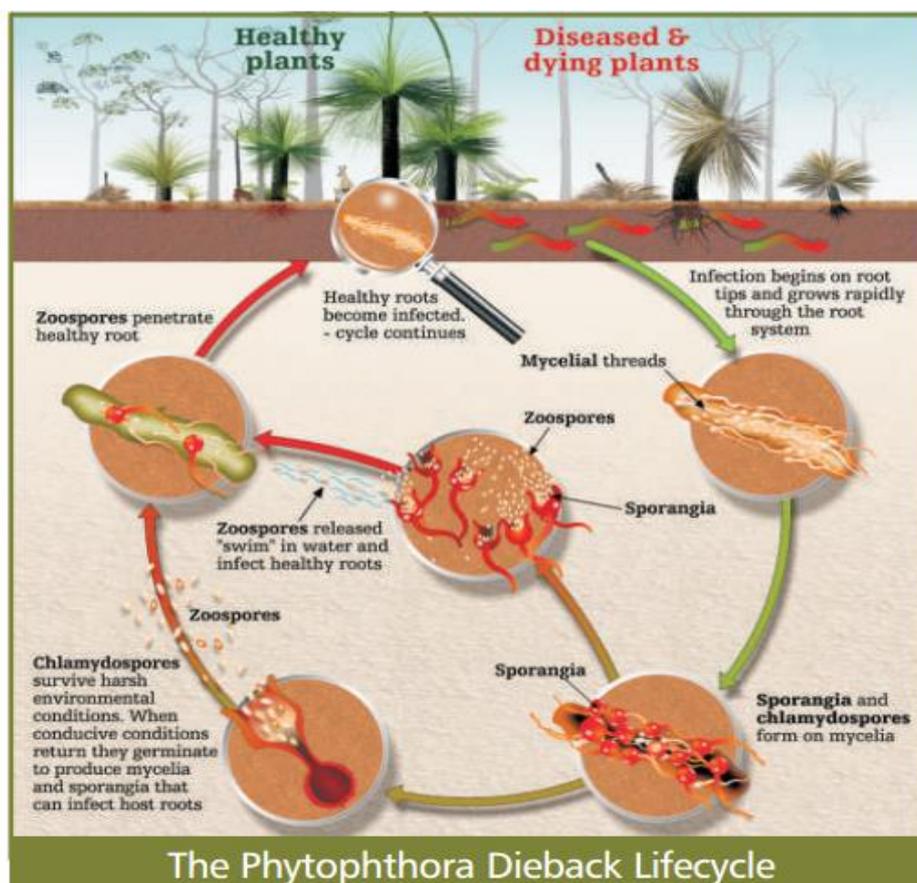


FIGURA 1. 3 - Ciclo evolutivo do oomiceto *P.nicotianae*. (Fonte: DPIE Canberra, 1993).

O gênero *Phytophthora* é o maior causador de doenças de solo em citros (GRAHAM, 2000). Os zoósporos se prendem a ferimentos ou a zona de crescimento das raízes de citros, encistam, germinam e penetram diretamente, como mostra a (FIGURA 1.4). Sendo as raízes finas (radicelas), a principal via primária para o meio de infecção da planta, pois a maioria das espécies são agentes patogênicos diretamente do solo e, portanto, a fonte mais direta que infecta essas plantas hospedeiras. A infecção das raízes mais grossas ocorre possivelmente através do crescimento interno dessas raízes ou pela via de infecção da ferida. A infecção bem-sucedida é geralmente iniciada pelos os zoósporos biflagelados que são quimiotaticamente atraído para as raízes mais próximas. (OBWALD et al., 2014).

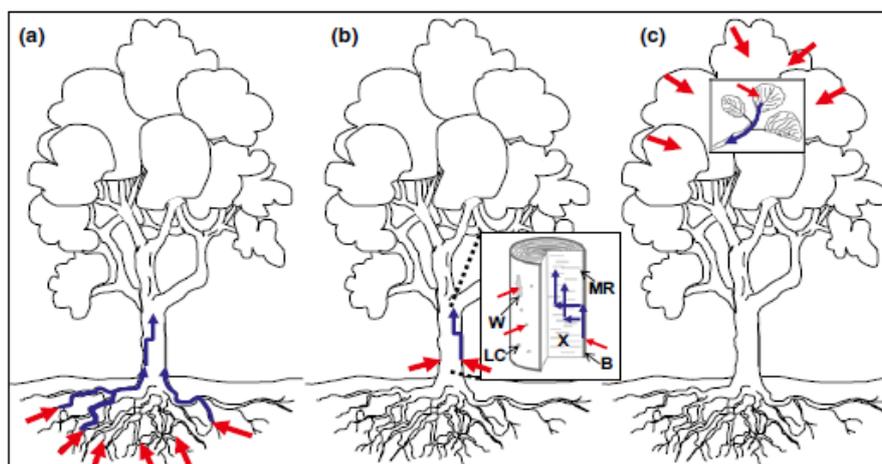


FIGURA 1. 4 - Modelos de infestação por *Phytophthora*: a) infecção primária de raízes e/ou radículas; setas azuis com crescimento secundário na casca ou xilema do tronco b) infecção primária pelo tronco; setas vermelhas mostra a infecção primária via lenticelas ou pelas feridas; c) infecção primária das folhas –setas vermelhas; as setas azuis crescimento secundário em pecíolos e galhos. (Fonte: OBWALD et al.,2014).

Vários são os problemas causados por *P. nicotianae* em citros, tanto em viveiro como em campo. Os danos começam na sementeira, onde o patógeno pode causar o tombamento de mudas. Ainda em viveiro, o patógeno pode provocar lesões em folhas, brotos novos e hastes. Porém, os problemas mais delicados são as podridões de raízes e radículas que por não serem facilmente detectáveis, muitas vezes não são considerados e disseminam a doença para o campo. Nos pomares ocorrem, então, a podridão do pé e gomose em troncos e ramos (FRANÇA, 2004). A temperatura ótima para o crescimento de *P.nicotianae* é de 27 a 32° C. Segundo a FUNDECITRUS (2017), a gomose constitui-se na mais importante doença fúngica em nosso país e continua em expansão no Estado de São Paulo devido ao uso de mudas contaminadas.

#### **1.4. Gomose, Tombamento e Podridão Parda ocasionadas por *Phytophthora ssp.***

A gomose de *Phytophthora* ocorre em todas as regiões produtoras de citros do globo. No Brasil, é a principal doença fúngica da cultura. Sua ocorrência em pomares novos é muito elevado devido, principalmente, à utilização de mudas contaminadas. Das várias manifestações da doença, a podridão do pé e as

podridões de raízes e radículas são as mais comuns. O tombamento, mela ou “damping-off” é quando a doença resulta do ataque do fungo em sementeiras. Ocorre quando o fungo infecta tecidos da base do caulículo de plântulas recém-geminadas, onde aparecem lesões deprimidas de coloração escura (ESCANFERLA, 2011).

Quando a umidade e temperatura são elevadas, há rápido crescimento das lesões, provocando a morte das plântulas. O fungo pode também infectar as sementes antes da germinação, provocando podridões e a morte das mesmas, comprometendo o estande das sementeiras. Porém, outros fungos podem provocar essa doença, em pré ou pós-emergência, como *Rhizoctonia solani* e várias espécies do gênero *Pythium*, principalmente *P. aphanidermatum*. As lesões em folhas, brotos novos e hastes são muito frequentes em viveiros. Em folhas, formam-se lesões escuras e encharcadas. Em brotações novas, as lesões são semelhantes, provocando a morte dos brotos, da ponta para a base. Quando o ataque se dá na haste da muda, o fungo coloniza somente os tecidos cambiais. As lesões produzidas exsudam goma e provocam o escurecimento dos tecidos cambiais infectados. As lesões exsudativas de caule são geralmente iniciadas por ferimento. Em mudas recém-enxertadas, é comum a ocorrência de lesões na região de enxertia como resultado da penetração do fungo pelo ferimento provocado durante a operação de enxertia (LIMA, 2010). Essas lesões, como mostra as FIGURAS 1.5 e 1.6 (rachaduras e fendilamentos longitudinais) causadas por *Phytophthora* em plantas de citros podem causar o anelamento das raízes, pois o “fungo” invade os tecidos mais tenros das pontas das raízes (na região lisa ou de crescimento, onde ocorre o alongamento celular das células multiplicadas na ponta protegida pela coifa) (ESCANFERLA, 2011), com a infecção avançando até os tecidos externos do córtex, sem que haja o comprometimento da parte central lenhosa das raízes, indo em direção ao tronco, circundando-os, nas infecções severas. Isso faz com que a planta fique incapaz de se desenvolver normalmente, uma vez que ocorre a deterioração do sistema radicular fibroso. Dessa forma, há impedimento do fluxo da seiva elaborada das folhas para as raízes, assim como ocorre a insuficiência na substituição de raízes pela planta, levando esta, ao rápido declínio (ESCANFERLA, 2011).

A podridão do pé e gomose em tronco e ramos, constituem-se nas manifestações mais sérias e as mais facilmente reconhecidas e, portanto, as que mais preocupam o citricultor. Elas resultam do ataque do fungo ao tronco e raízes principais, produzindo exsudação de goma em lesões de tronco e colo em porta-enxertos suscetíveis. A exsudação pode também ocorrer na região do tronco acima do ponto de enxertia, quando a copa é de cultivo suscetível. As lesões exsudativas de tronco são mais frequentes em plantas muito enterradas, ou quando o tronco é ferido durante a realização de tratos culturais. Raramente as lesões exsudativas ocorrem em ramos. A exsudação de goma é um dos sintomas típicos, embora não exclusivo, da doença (FEICHTENBERGER, 2005).

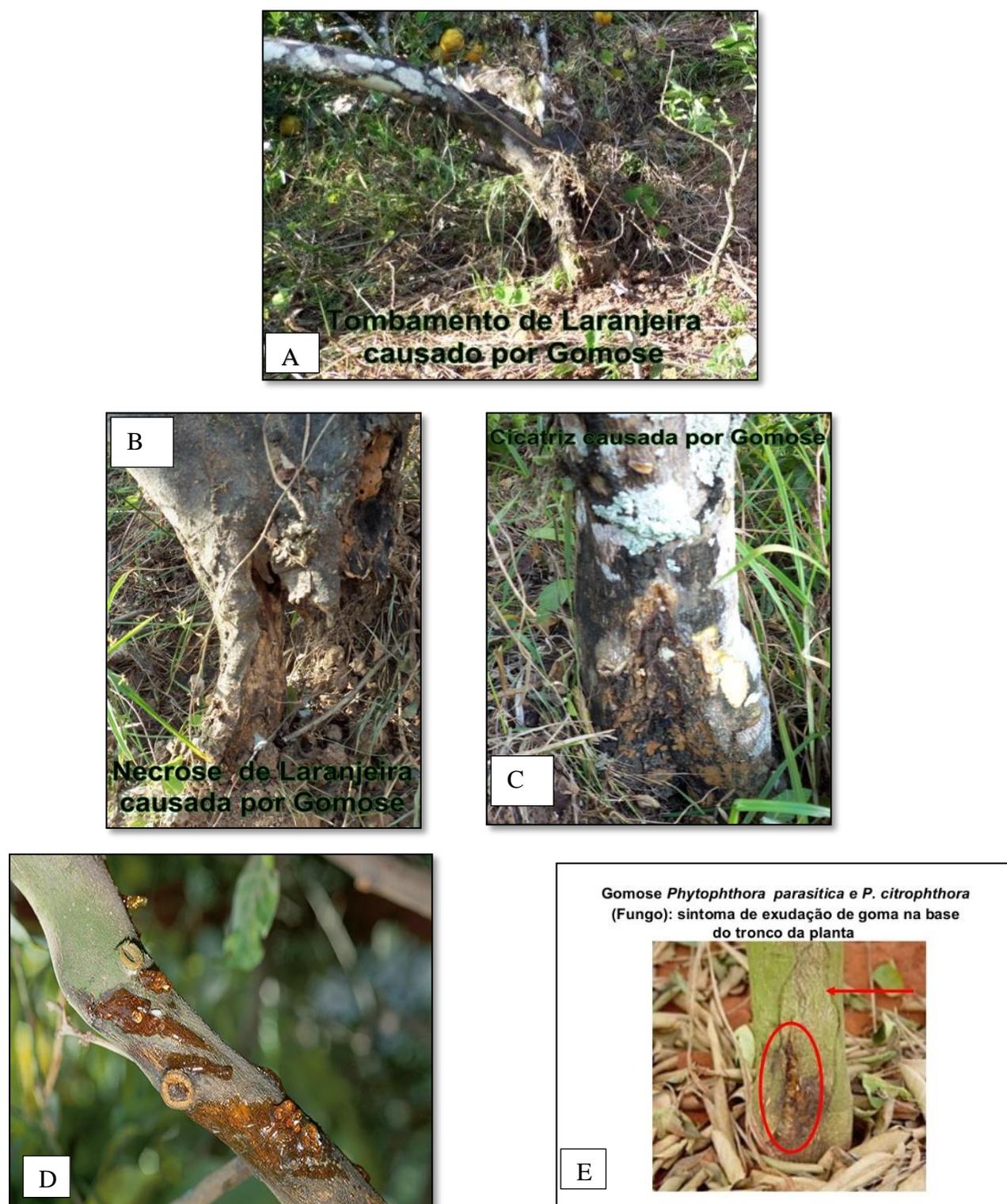


FIGURA 1. 5 - Alguns sintomas da doença em estágio mais avançado: a) tombamento de laranjeira; b) necrose de laranjeira c) imagem de uma cicatriz ocasionada por gomose; d) exsudação de goma; e) exsudação de goma na base do tronco da planta. (Fonte: Vale do Mundaú Agrícola).



FIGURA 1.6 - Lesão do tronco, fendilhamento longitudinais contaminadas pelo oomiceto. (Fonte: DPIE Canberra, 1993).

Essas lesões nessas regiões do colo (FIGURA 1.5 D) também exsudam goma. Contudo, ela é de difícil constatação, pois a goma é facilmente dissolvida pela água do solo, podendo ocorrer escurecimento dos tecidos localizados abaixo da casca, na superfície do lenho, devido à infiltração de goma nesses tecidos. Em troncos e ramos, os tecidos infectados de casca permanecem firmes até secarem completamente, quando começam a apresentar rachaduras e fendilhamento longitudinais (FIGURA 1.6). (LIMA, 2010). O “oomiceto” causa na planta, florescimentos e frutificações frequentes. Em frutas, as podridões são secas, de coloração marrom parda e com cheiro típico de ranço. Em condições de alta umidade, micélio de coloração branca se forma sobre a casca do fruto infectado (FEICHTENBERGER et al., 2005; POMPEU JÚNIOR, 2005).

A podridão de raízes e de radículas pode ocorrer tanto em viveiros quanto em pomares, em plantas de todas as idades, todavia, as plantas mais jovens são as mais sensíveis, devido à tenacidade dos tecidos (FEICHTENBERGER et al., 2005). A utilização de mudas produzidas em viveiros que estão contaminados é um dos principais fatores responsáveis pela elevada incidência das doenças incitadas por *Phytophthora spp.* em cultivos comerciais, pois nos viveiros, onde a irrigação é intensa, aliada a altas densidades de plantio, são condições favoráveis e ideais para a proliferação do patógeno e incidência da doença. As espécies desse gênero são encontradas com bastante frequência nas inspeções realizadas nos viveiros de

mudas cítricas do Estado de São Paulo (FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER et al., 2000; BROADBENT, 2003).

O método de controle recomendado vem sendo o uso de porta-enxertos resistente às doenças provocadas por *Phytophthora* em citros, principalmente podridão do pé e as podridões de raízes e radículas. O uso desses porta-enxertos resistentes, como é o caso do Citrumelo Swingle e os híbridos de trifoliata para o controle da doença gomose, vem sendo o método mais adequado de convivência com a doença, tanto em campo, como nos viveiros. A utilização desse material resistente é o motivo pelo qual a determinação do grau de resistência de novos porta-enxertos em estudo seja um dos constituintes como critério de seleção em um programa de melhoramento de citros (POMPEU JUNIOR, 2005).

## **1.5. Uso de Porta Enxertos em Plantas de Citrus**

A enxertia, como método, consiste em unir duas ou mais partes de tecidos, mais precisamente, dois materiais vegetais geneticamente distintos, com a finalidade de que a união destas partes possa constituir uma nova planta, levando está a compartilhar uma série de fatores essenciais à sobrevivência de ambas as partes (SCHÄFER; BASTIANEL, 2001).

Uma planta enxertada compõe-se de duas partes: o cavaleiro ou garfo, que também se pode chamar de enxerto; e, o cavalo, ou seja, o porta-enxerto, propriamente dito. O cavaleiro, geralmente, é um fragmento ou parte da planta que se pretende multiplicar por enxertia. Ao passo que o cavalo é representado por uma planta jovem, bastante rústica e resistente às condições adversas de fitossanidade (CÉSAR, 1996). O uso de plantas cítricas enxertadas, nos campos de produção, deu-se no início do século XX, quando a citricultura brasileira alcançou enorme expressão de cunho comercial. Antes, a propagação era realizada utilizando os pés-francos, que tem a desvantagem de demorar bastante tempo para entrar na fase plena de produção (OLIVEIRA et al., 2008).

De acordo com AUGUSTÍ 2003, o porta-enxerto provoca na copa alterações no vigor e tamanho, na precocidade da produção, na época de maturação e peso dos frutos, no teor de açúcares e de ácido dos frutos, na permanência dos

frutos na planta, na capacidade de absorção, síntese e utilização de nutrientes, na adaptação às condições do solo, como salinidade, pH e excesso de água, na tolerância a seca e ao frio, na resistência e tolerância a fitopatógenos e pragas, entre outros. A seleção do porta-enxerto é de fundamental importância para o sucesso do pomar, pois apresenta diversas outras importantes funções além de suportar a copa. Para que ocorra uma combinação bem-sucedida é necessária a instalação do mesmo em ecossistema apropriado, o recebimento de tratamentos culturais e o harmônico relacionamento entre copa e porta-enxerto (POMPEU JÚNIOR, 2005).

No Brasil o porta-enxerto inicialmente utilizado foi a laranjeira Caipira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], a qual por apresentar suscetibilidade ao patógeno *Phytophthora* e à seca, foi substituída pela laranjeira Azeda (*C. aurantium* L.), que passou a corresponder a 90% do porta enxerto da citricultura paulista (POMPEU JÚNIOR, 2005). Hoje, uma grande variedade de espécies dos grupos cítricos é utilizada como porta enxerto no Estado de São Paulo, como laranjas doces e azedas [*C. aurantium* L.], limeira da Pérsia [*C. limettioides* Tanaka], limão Cravo [*C. limonia* Osbeck], Volkameriano [*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.] e Rugoso (*C. jambhiri* Lush.), tangerineiras Cleópatra [*C. reshni* hort. Tanaka], Sunki [*C. sunki* (Hayata) hort. Tanaka], dentre outras. No ano de 2001, foi relatado pela primeira vez o surgimento de uma nova doença - a Morte Súbita dos Citros - MSC, com isso houve a perda significativa de milhões de plantas cítricas enxertadas sobre limoeiro Cravo, até então, o porta-enxerto mais utilizado na citricultura do Estado de São Paulo onde este, representava aproximadamente 85% das 200 milhões de árvores existentes naquele ano e, dessa forma, houve um novo impulso para a diversificação do uso de novos porta-enxertos tolerantes e resistentes para essa doença, assim houve um aumento considerável na utilização dos porta-enxertos nos plantios de citros com a Tangerina Sunki e Citrumelo Swingle (YAMAMOTO, 2003; BASSANEZI, 2007). E de acordo com um levantamento realizado pelo Fundecitrus, em maio de 2003, mostrou que apenas 39,8% das mudas estavam enxertadas em limoeiro Cravo, seguido por 32,6% em tangerineira Cleópatra, 13,8% em citrumeleiro Swingle e 7,1% em tangerineira Sunki (POMPEU JÚNIOR, 2005).

A tangerina Sunki (sinônimos: *C. reticulata* Blanco var. *austera* Swingle, *C. nobilis* Lour. var. *sunki* Hayata, *C. aurantium* L. var. *sunki* Makino & Nemoto) (HANELT; BÜTTNER; MANSFELD, 2001), também conhecida como “Suen Kat” e “Sun Kat”, foi reclassificada, em 1927, pelo botânico e micologista japonês Tanaka (TANAKA, 1927). A espécie é originária do sul da China e amplamente empregada como porta-enxerto naquele país e em Taiwan (HODGSON, 1967; TANAKA, 1954). O grande problema da utilização de Sunki, como porta-enxerto, é a sua alta susceptibilidade à gomose ou podridão das raízes e do tronco (AGUILAR-VILDOSO; POMPEU JÚNIOR, 1997; CARVALHO et al., 1997; FEICHTENBERGER, 2001). Portanto, trata-se de um porta-enxerto tão ou mais susceptível a essas doenças que as laranjeiras doces. Os genótipos de tangerina Sunki é bastante sensível à seca, tem alta resistência ao frio, alta qualidade e boa produtividade de frutos, quando em combinações com copas de laranjeiras, mas especificamente para a variedade Pêra, Valência, tangerineiras e pomeleiro (POMPEU JÚNIOR, 2005).

A tangerina Sunki e a Sunki Tropical, passou a fazer parte do percentual dos principais porta enxertos em São Paulo a partir de 1985, com 0,2% de participação das mudas presentes em viveiros, devido a sua resistência ao declínio dos citros e pela indução de produções de frutos, em geral, superiores às proporcionadas pela tangerineira Cleópatra. Após a constatação de que plantas enxertadas em tangerineira Sunki não eram afetadas pela morte súbita dos citros, houve aumento de 5,1% em 2002 para 7,1% em 2003 (POMPEU JÚNIOR, 2005).

Na citricultura paulista, o citrumelo Swingle é o segundo porta-enxerto mais utilizado, possuindo baixa a média resistência à seca e moderada resistências às geadas boa resistência ao frio; uma alta qualidade; produção aos frutos, com alta longevidade e tem como características marcantes sua tolerância a MSC (que neste caso, ele é usado como sub-enxerto) e tolerância ao vírus da tristeza (Citrus tristeza vírus, CTV) e ao viroide da xiloporose [*Citrus viroid II* (CVd-II)]. O interesse pelo estudo de Citrumeleiro Swingle, iniciou-se na década de 80, devido à tolerância ao declínio e resistência à gomose.

As principais limitações de citrumeleiro Swingle são menor resistência à seca que os limoeiros Cravo e Volkameriano (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.),

a incompatibilidade com laranjeira Pêra (*C. sinensis*), tangeleiro Murcott (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis*) e limoeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.] cv. Siciliano e Eureka (MACHADO FILHO et al., 2003; POMPEU JÚNIOR, 2005).

O Citrumeleiro Swingle possui resistência ao nematoide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*) e ao nematoide das lesões radiculares dos citros (*Pratylenchus jaehni*) e, principalmente aos oomicetos do gênero *Phytophthora*, agente causal da doença conhecida como gomose, entre outras, uma vez que a sua resistência, observada nos plantios comerciais e em condições experimentais, é igual ou superior à dos porta-enxertos cítricos que são substituídos, como os de trifoliata (AMARO, 2010; CALZAVARA, 2007).

O grupo de Produtos Naturais da UFSCar já vem realizando estudos fitoquímico direcionado as diferentes partes de enxertos, visando principalmente comparar o perfil químico encontrado com aqueles das plantas de origem (não enxertadas) ou estudos de comparação de perfil com plantas enxertadas sadias versus plantas doentes, quando estas estão infestada com o hospedeiro causador da doença.

De acordo com RIBEIRO 2008, o estudo do enxerto de *Citrus sinensis* (laranja doce) sobre *C. limonia* (limão cravo) foi possível observar nesse estudo da copa (caule superior e folhas) analisadas, que praticamente levou ao isolamento de flavonoides (FIGURA 1.7), apenas duas cumarinas foram isoladas e identificadas, xantiletina nas folhas e caule, xantoxiletina apenas no caule superior da enxertia. Um limonóide, limonina, foi encontrado em suas folhas, na parte área (FIGURA 1.8).

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

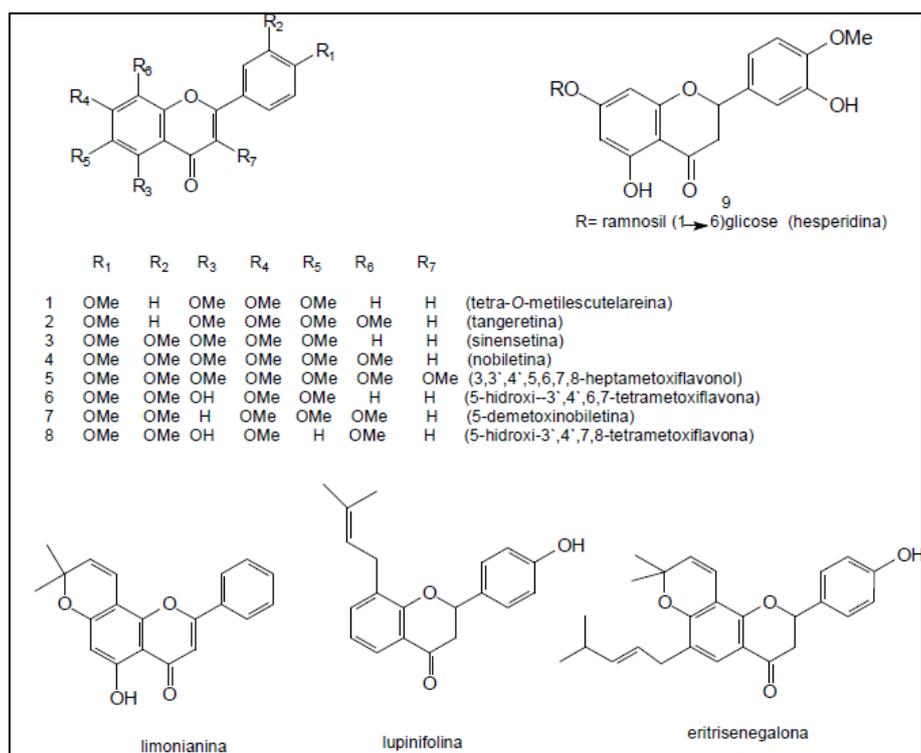


FIGURA 1. 7 - Estruturas dos flavonóides isolados de *C. sinensis* sobre *C. limonia* pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar (RIBEIRO et al., 2008).

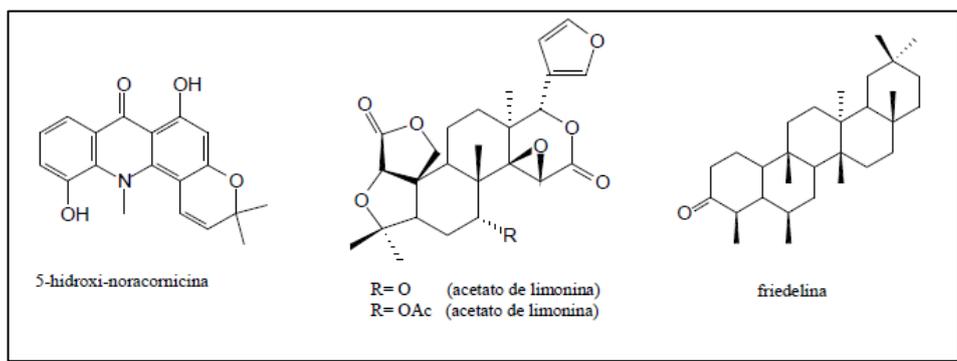


FIGURA 1. 8 - Estruturas dos limonóides, triterpeno e alcalóide isolados de citros pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar (RIBEIRO et al., 2008).

As plantas de *C. sinensis* e *C. limonia* tem sido bastante investigadas, no entanto até o momento, não há dados de estudos de enxertos trabalhados separadamente. A única investigação dos caules inferiores e superiores de *C. limonia* revelou a presença das cumarinas imperatorina, xantotoxina, bergapteno, isopinelina, limetina, escopoletina, umbeliferona, xantotoxol e a esculetina (ABDEL-FATTAH, et al., 2003). As cumarinas xantiletina e xantoxiletina (FIGURA 1.9) não haviam sido relatadas nas folhas e caules de *C. sinensis*, apenas nas raízes (RIBEIRO et al., 2008).

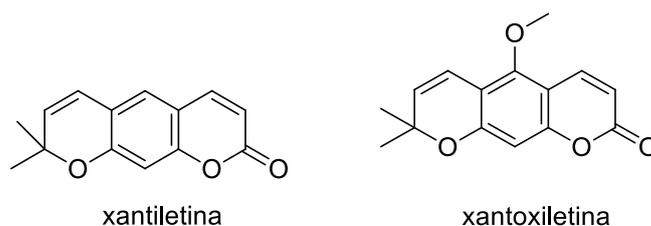


FIGURA 1. 9 - Estruturas das cumarinas lineares xantiletina e xantoxiletina.

## 1.6. Interações Patógeno-Planta

Microrganismos podem ter distintas formas de associações ou interações com plantas. Algumas delas podem ser observadas a níveis macroscópicos, logo algumas dessas associações são ditas neutras, outras são benéficas e outras ainda podem ser classificadas como prejudiciais. A associação entre esses seres vivos é uma condição vital para aquelas espécies incapazes de conseguir por si mesmas, meios de sobrevivência, como nutrientes e a sua proteção contra espécies predadoras e parasitárias (CAVALCANTI, 2005).

Entre os microrganismos estão os fungos e os oomicetos, os que se encontram mais frequentemente associados às interações com plantas. Os fungos não produzem clorofila, pois são heterotróficos e sua parede celular é constituída principalmente de quitina. Assim, sua sobrevivência depende do sucesso da sua associação com outros seres vivos, especialmente as plantas, ou de sua capacidade de assimilar nutrientes do meio ambiente. Dentre os microrganismos patogênicos, os fungos e os oomicetos são os responsáveis por mais de 80% das doenças vegetais já descritas. As estratégias desenvolvidas pelos fungos para invadir tecidos vegetais, aperfeiçoar seu crescimento e se propagar incluem mecanismos para transpor as barreiras estruturais (como a cutícula e parede celular de células da epiderme); a secreção de toxinas ou de outros compostos que modifiquem a fisiologia do vegetal em seu benefício e a liberação de moléculas que interferem no processo de reconhecimento dos mesmos ou que suprimem a resposta de defesa das plantas (GUIMARÃES, 2006).

A resistência a doenças pode ser definida como a habilidade da planta em prevenir ou restringir o crescimento do patógeno e sua multiplicação em seus

tecidos. Embora as plantas na natureza estejam expostas ao ataque de microrganismos, a resistência mostra-se como regra, enquanto a suscetibilidade, como exceção. (ROMEIRO, 2008).

Vários mecanismos de defesa podem ser induzidos pela planta para prevenir o ingresso e a progressão de potenciais organismos patogênicos, podem reagir ativa ou passivamente ao ataque de agentes fitopatogênicos, utilizando mecanismos ou fatores de defesa pré-infeccionais, onde esses podem ser passivos (constitutivos), que já existem nas plantas antes da infecção, ou os pós-infeccionais que são os ativos (induzidos), que são inexistentes ou até presentes, porém em baixos níveis antes da infecção e esses serão ativados em resposta a invasão do tecido pelo próprio patógeno. Existem dois tipos de resistência, designadas de acordo com a especificidade das interações, controlam as infecções por fungos e oomicetos: a resistência inespecífica, na qual a planta é considerada não-hospedeira e que confere proteção a uma grande diversidade de fungos, e a resistência raça-específica, a qual atua somente contra raças específicas de patógenos (JACKSON AND TAYLOR, 1996; KNOGGE, 1996; MYSORE AND RYU, 2004).

Os mecanismos de defesa da planta podem ser estruturais e bioquímicos. Os estruturais constituem-se em verdadeiras barreiras físicas à penetração ou colonização do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro. Dentro desses mecanismos estão os pré-formados como fenóis, alcaloides glicosilados, lactonas insaturadas, inibidores protéicos, quitinase e fototoxinas. Os pós-formados são as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, espécies reativas de oxigênio e fototoxinas. A indução de resistência, definida como a ativação de mecanismos de resistência latentes na planta em resposta ao tratamento bióticos ou abióticos, podem contribuir na redução da doença (VILLA, 2010).

Nas plantas a indução de resistência caracteriza-se pela ausência de toxicidade do agente indutor sobre o patógeno; pela necessidade de um intervalo de tempo para expressão de resistência após aplicação do tratamento indutor; pela

inespecificidade da proteção; por ser dependente do genoma da planta; pela ausência de resposta em níveis crescentes do indutor, e por se defender passivamente ou ativamente; esses mecanismos são subdivididos nos já citados acima, em pré-formados (passivos; constitutivos) e pós-formados (ativos; induzíveis), isto é, que existem antes da chegada do patógeno ou são ativados após a chegada do patógeno. No caso dos pré-formados, os fatores estruturais, são a cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores ou fatores bioquímicos. Já para os mecanismos pós-formados, as barreiras estruturais podem envolver a lignificação, suberificação, formação de papilas e de camadas de abscisão e de cortiça, bem como as tiloses. Os mecanismos estruturais podem ser vistos como defesas físicas que restringem o desenvolvimento do patógeno. (LAMOTTE; MÉTRAUX, 2010).

Algumas considerações ainda são levantadas quando se relata em reconhecimento do hospedeiro por estraminipilas do gênero *Phytophthora* quando relacionado ao seu mecanismo de interação patógeno versus hospedeiro. O reconhecimento, entre a planta e o oomiceto é o primeiro passo em qualquer interação direta em si, além de observar qual a maneira mais simples, pode ser explicada pela resposta de um organismo a uma substância molecular produzida por outro organismo. A essa substância molecular, são conhecidas como elicitor. Esse reconhecimento ocorre devido à influência mútua de uma molécula elicitora, que pode ser lançada pelo patógeno ou emitida pela própria planta (liberada mediante a ação do patógeno) e de um receptor proteico, que está presente na membrana plasmática da parede celular da célula da planta (HAHN,1996; MÉTRAUX, 2001; SILVA et al., 2008a; TYLER, 2002; UMEMOTO et al., 1997). O termo “elicitor” foi originalmente usado para se referir a moléculas e outros estímulos que induzem, nas células vegetais, a síntese e o acúmulo de compostos antimicrobianos nos sítios de infecção que são as fitoalexinas.

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixa massa molecular e produzidos por plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. São capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos, sendo a taxa de produção e acúmulo dependente dos genótipos do hospedeiro ou patógeno. São considerados compostos biocidas, sendo prejudiciais a bactérias, fungos, oomicetos, nematoides, plantas e animais. As fitoalexinas

apresentam grande diversidade e mais de trezentos tipos já foram caracterizados entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonoides, entre outras classes, tendo sido identificados em mais de vinte famílias de vegetais superiores. A indução para a produção dessas fitoalexinas pode ocorrer em resposta à penetração fúngica, ao tratamento com eliciadores bióticos ou abióticos e como respostas a ferimentos sofridos. As fitoalexinas gliceolina que é um pterocarpenoíde, mostrou-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos. Sua síntese ocorre em resposta à infecção e também pelo tratamento com agentes bióticos. Portanto, os compostos que são sintetizados em resposta ao ataque de patógenos ou estresses como parte de resposta de defesa da planta são conhecidos como fitoalexinas enquanto que os compostos pré-formados, já presentes em plantas saudáveis que podem representar uma barreira química às infecções por patógenos em potencial, são chamados de compostos antimicrobianos ou fitoantecipinas (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

As investigações atuais sobre o reconhecimento entre as espécies de *Phytophthora* e seus hospedeiros são separadas em: reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno e reconhecimento do patógeno pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (TYLER, 2002). Esse reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno inclui a detecção pelo micro-organismo das diversas propriedades inerentes ao hospedeiro, tais como as propriedades químicas, elétricas e físicas dos tecidos vegetais, incluindo, principalmente, as substâncias químicas, que se difundem a partir da superfície dos tecidos da planta.

A atração dos zoósporos das espécies de *Phytophthora*, como o acúmulo nas raízes, o “aprisionamento”, o rápido encistamento, a germinação do cisto, a origem morfogênica de zoósporos e, o tropismo da hifa (crescimento direcionado dos tubos germinativos) em direção ao tecido do hospedeiro são comportamentos, na maioria das vezes, desencadeados por sinais provenientes da planta hospedeira, como a exsudação de compostos químicos provenientes das raízes (HO, 1999). A infecção primária nos hospedeiros ocorre por meio dos zoósporos de *Phytophthora ssp.* e o reconhecimento de uma planta hospedeira por espécies de *Phytophthora*, habitantes do solo, é essencial para que dê início e ocorra, com sucesso, a infecção de raiz (TYLER, 2002). Uma gama de compostos

químicos é secretada e liberada pelas raízes das plantas em forma de exsudatos e estes são conhecidos por fazer a mediação de muitas interações na rizosfera. De acordo com HO 1999, os compostos químicos exsudados pelas raízes podem responder das seguintes maneiras aos zoósporos: atividade de atração; atividade repelente; atividade estimulante; atividade de inibição da motilidade e natação ao acaso; e, atividade zoosporicida.

Os zoósporos da maioria das espécies de *Phytophthora* são atraídos por quimiotaxia positiva, por ácidos orgânicos, por uma variedade de açúcares como a sacarose, dextrose, frutose, raminose e maltose (DUKES; APPLE, 1961) e por alguns aminoácidos, particularmente, aspartato, glutamato, arginina, metionina, asparagina e glutamina (CAHILL 1994; HARDHAM 2009; DEACON; DONALDSON, 1993). Zoósporos de *P. sojae* são atraídos por nutrientes liberados pelo sistema radicular da soja [*Glycine max* (L.) Merr. ] e essa atração, se dá, especialmente, em relação às concentrações nanomolares de isoflavonas (daidzeína e genisteína a 10 nM) (MORRIS; WARD, 1992; TYLER et al., 1996). Essas duas isoflavonas, FIGURA 1.10, são as mais investigadas para a especificidade na atração de zoósporos e são encontradas em concentrações elevadas nas sementes. Quando do processo de germinação do hospedeiro, a liberação dessas duas isoflavonas ocorre pelas raízes, na região da rizosfera (OBWALD et al., 2014; ZHU et al., 2005).

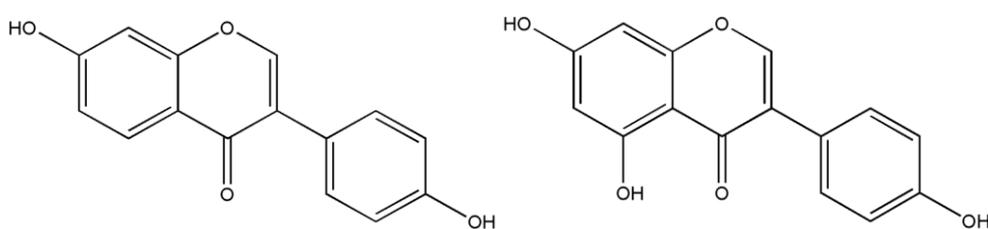


FIGURA 1. 10 - Estrutura química das isoflavonas: a) daidzeína e b) genisteína, em raízes responsáveis pela atração dos zoósporos de espécies de *Phytophthora*.

MORRIS e WARD 1992, observaram que os zoósporos de outras espécies de *Phytophthora* não são atraídos pelas isoflavonas liberadas pelas plântulas da cultura da soja, sugerindo que a quimiotaxia seletiva pode desempenhar um papel importante na determinação da gama de hospedeiros. A ação da corrente elétrica na motilidade de zoósporos também é outro tipo de taxia

que vem sendo estudado, pois muitos zoósporos são atraídos eletrostaticamente para as diversas superfícies de potenciais plantas hospedeiras (TYLER, 2002).

Os gradientes elétricos gerados pelas raízes das plantas na rizosfera são condições que influenciam na direção dos zoósporos, levando-os para perto ou para longe da superfície das raízes. TROUTMAN e WILS 1964, foram os primeiros a relatar o fenômeno da eletrotaxia em *P. parasitica* var. *nicotianae*. A atração desses zoósporos foi direcionada para o polo negativo, com a passagem de uma corrente elétrica fraca. Outros relatos também indicam a diferença significativa entre essas respostas eletrotáxicas na reação dos zoósporos para a raiz (ZENTMYER, 1970). Apesar de ser bastante evidente que as moléculas quimiotáticas podem estar envolvidas nas respostas de atração de zoósporos às raízes das plantas, a mais recente evidência sugere que as correntes elétricas e, não os exsudados radiculares (como os aminoácidos), estão envolvidas nesta resposta quimiotática. As raízes das plantas geram campos elétricos fracos na rizosfera que pode estimular a motilidade eletrostática de zoósporos. A coifa e a zona de alongamento (meristema apical) têm a característica de atuar como ânodos, enquanto que a zona pilosa (pelos radiculares) e as feridas são caracteristicamente catódicas (WEST et al., 2002).

O reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro tem-se concentrado, principalmente na identificação e isolamento das substâncias produzidas pelos patógenos e que provocam diretamente uma resposta de defesa do hospedeiro, ou seja, da produção dos elicitores, e também na identificação dos genes dos patógenos que são responsáveis pela produção de tais substâncias, mas especificamente, dos genes de avirulência (TYLER 2007; TYLER et al., 2006). Os agentes fitopatogênicos atacam as plantas justamente porque durante o seu desenvolvimento evolutivo conseguiram assimilar as substâncias produzidas pelo hospedeiro, mas para que ocorra tal feito, ele tem que vencer diversas barreiras opostas impostas pelo hospedeiro, as quais já foram citadas acima, seus mecanismos de defesa pré e pós- formados. A interação entre planta versus microrganismo, no que diz respeito aos eventos de defesa e de ataque, foi se desenvolvendo ao longo de um processo de coevolução.

De acordo com OSWALD et al. (2014), várias reações fisiológicas e bioquímicas ocorrem em plantas lenhosas infectadas por *Phytophthora*, como uma redução gradual no consumo de água, o fechamento rápido dos estômatos e, a posteriori, uma redução na fotossíntese. OSWALD et al. ainda consideram que os desequilíbrios hormonais que ocorrem na planta podem estar envolvidos nestas alterações dos processos ecofisiológicos. De vários flavonoides presentes no gênero *Citrus*, as flavanonas glicosídicas são acumuladas em maior quantidade, embora a concentração destes compostos seja dependente da idade da planta (DEL RÍO et al., 1998).

### **1.7. Análise Metabolômica e sua Quimiosistemática**

É um estudo que visa identificar e quantificar o conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo. O metaboloma representa o conjunto de todos os metabólitos em uma célula, fluido biológico, tecido ou organismo, sendo estas substâncias consideradas os produtos finais dos processos celulares. A metabolômica tem sua origem nos primeiros estudos de perfil metabólito primário (rotas principais) e secundário (funções específicas), porém atualmente é uma área em rápida expansão de pesquisa científica. As ferramentas da metabolômica encontram aplicações em diversas áreas como a toxicologia, a biologia sistêmica e genômica funcional, portanto a Metabolômica (ou metabonômica) foi rotulada como uma das novas técnicas "ômica", juntando-se à genômica, transcriptômica e proteômica (ROCHFORT, 2005). As análises metabolômicas podem ser classificadas como aquelas destinadas a um grupo específico de metabólitos de interesse e que são conhecidas como "alvo" - target, pois tem o objetivo de identificar e quantificar uma maior quantidade de metabólitos dentro de uma determinada classe, e também podemos ter as análises denominadas "não -alvo"- untarget, que são aquelas destinadas ao screening e classe de metabólitos e/ou marcadores químicos, para obtenção de padrões ou impressões digitais, sem a necessidade de identificação ou quantificação de um composto específico (ROCHFORT, 2005).

A diferença de uma análise "alvo" para " não-alvo", é que a metabolômica "target" normalmente exige um maior preparo de suas amostras

para a obtenção de maior seletividade, enquanto que a “untarget” a seletividade não será tão precisa e essa vem sendo mais utilizada nas análises de identificação de possíveis “fingerprints” de processos biológicos, como as doenças em plantas (BELLETE, 2014).

Após a extração e preparo das amostras, baseando-se nos tratamentos e obtenção dos dados e no objetivo específico da análise, a maioria dos estudos metabolômico podem ainda ser classificados como discriminativo, informativo ou preditivo. As análises discriminativas são destinadas a encontrar diferenças entre amostragens, sem necessariamente criar modelos estatísticos ou avaliar possíveis rotas que possam elucidar tais diferenças. Essas análises, são geralmente obtidas através da utilização de análise multivariada de dados, técnicas destinadas a maximizar a classificação. Já as análises informativas, concentra-se na identificação e quantificação de metabólitos “alvos” ou “não alvos” para obter informações intrínsecas da amostra. Possíveis rotas metabólicas, descoberta de novos compostos bioativos, compostos marcadores, e criação de bancos de dados específicos também podem ser obtidos fazendo-se uso de análises metabolômica informativas. As análises preditivas são modelos estatísticos baseados no perfil metabólito e também na sua abundância e são criados para prever uma variável que é difícil de quantificar por outros meios (BELLETE, 2014).

Um conhecimento de quimiosistemática aliado a esses bancos de dados metabolômico pode eliminar uma boa parte dos metabólitos que não fazem parte do grupo quimiotaxonômico da espécie estudada. A quimiosistemática estabelece relações entre a posição da planta e exata compreensão da evolução biológica e relação natural. O uso de metabólitos secundários como caracteres de importância taxonômica em classificações botânicas tornou-se mais frequente, fato este impulsionado pela importância farmacológica destas substâncias. O conhecimento quimiosistemática não permite somente classificar um determinado grupo taxonômico como também pode ser utilizado na procura de um composto bioativos. Tal informação pode ser empregada na determinação estrutural de uma substância química ao prever quais possíveis compostos podem ser biossintetizados naquele determinado grupo taxonômico, eliminando assim classes

de compostos naturais não pertencentes àquele grupo. A *Rutaceae* (família que abriga o gênero *Citrus*) destaca-se das demais famílias devido a sua vasta variedade de metabólitos secundários que não são comuns nas outras famílias da ordem Sapindales.

Essa família destaca-se por produzir uma vasta gama de alcalóides baseados em uma combinação inicial de ácido antranílico com uma ou mais unidades de acetato, como mostra o esquema abaixo na FIGURA 1.11. Onde os mais representativos, além dos alcalóides derivados do ácido antranílico, são as cumarinas, os flavonóides e limonóides. (CRAWFORD; GIANNASI, 1982).

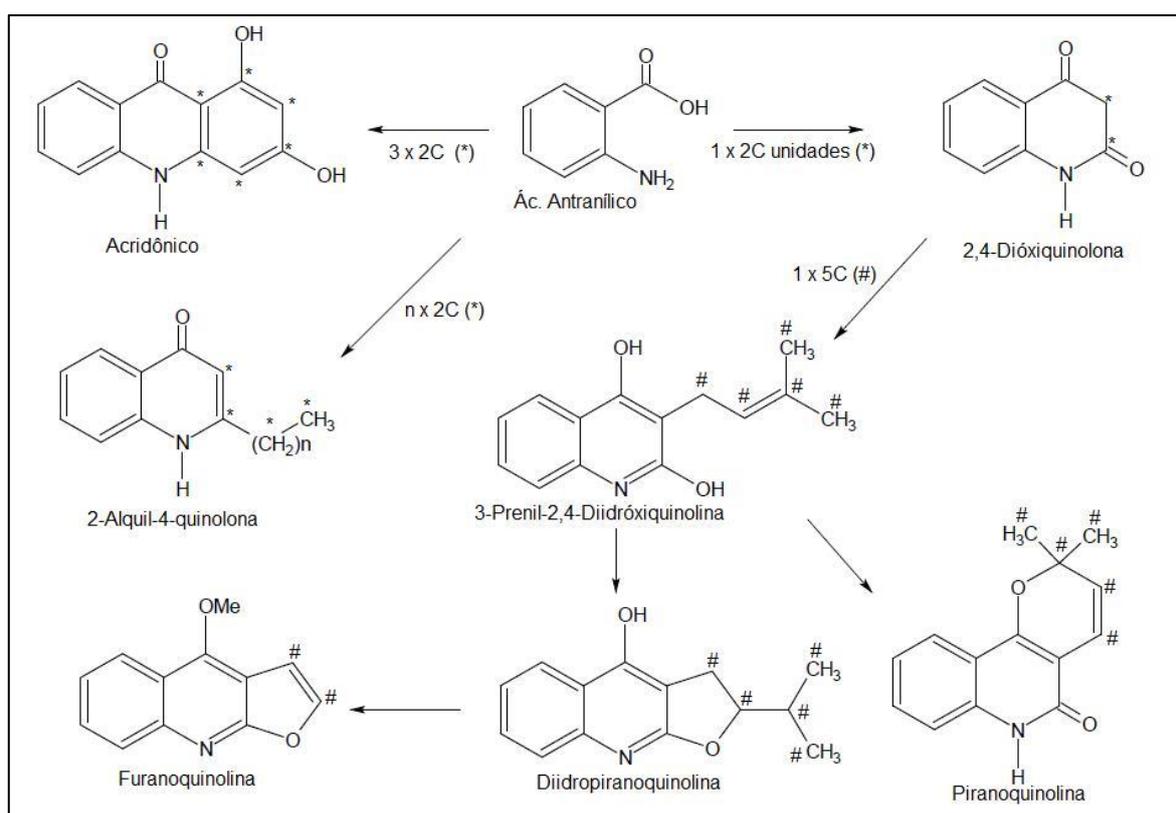


FIGURA 1. 11 - Esquema ilustrativo da classe majoritária de alcalóides nas Rutaceae formado pela combinação de ácido antranílico e acetato (WATERMAN, 1999).

As cumarinas são uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos nas plantas, mas que apresentam um maior número de ocorrência e diversificação estrutural do esqueleto básico nas famílias Apiaceae e Rutaceae (RIBEIRO; KAPLAN, 2002). Seu valor como marcador quimiotaxonômico

nas Rutaceae se deve à grande variedade do esqueleto básico. Nessa família é possível encontrar seis tipos diferentes (FIGURA 1.12) – cumarina simples, furanocumarina linear e angular, piranocumarina linear e angular e biscumarina, as demais famílias do reino vegetal (excetuando a Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymelaeaceae) produzem em sua grande maioria apenas cumarinas simples sendo rara a presença dos outros esqueletos (GRAY; WATERMAN, 1978; WATENNAN, 1993; RIBEIRO; KAPLAN, 2002).

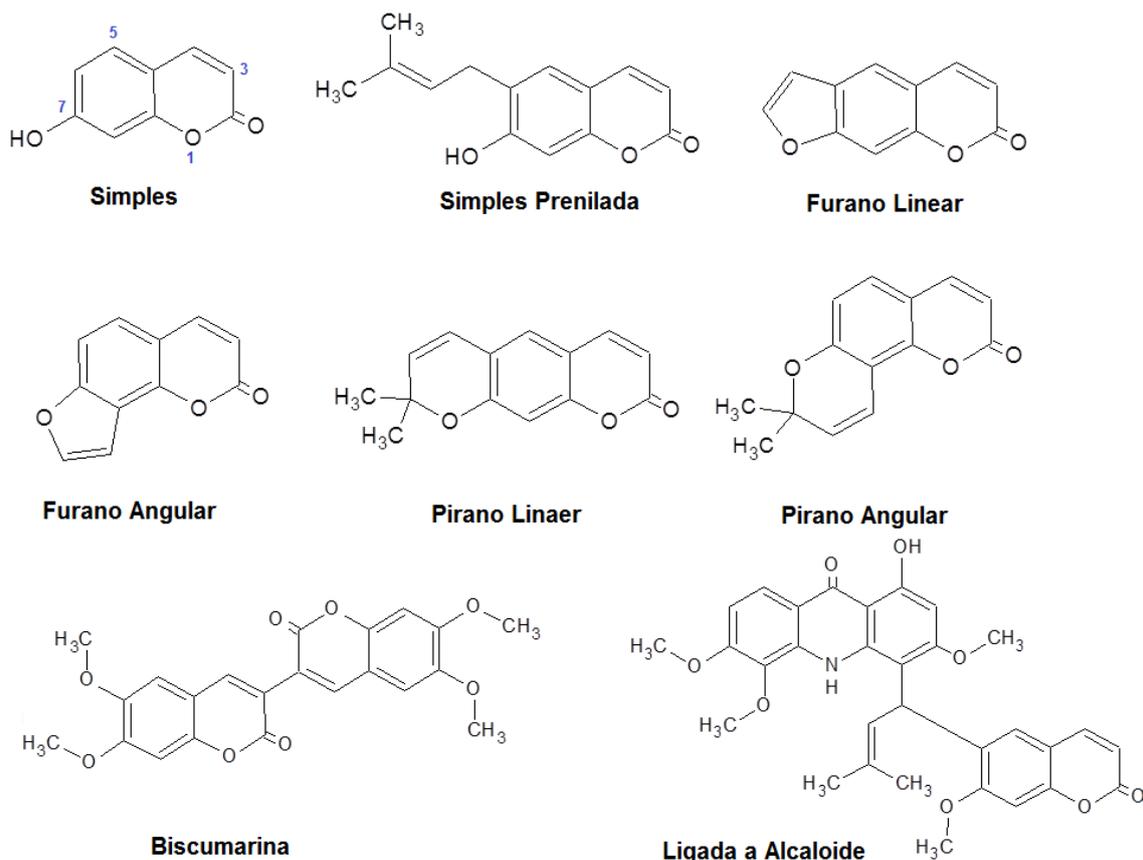


FIGURA 1. 12 - Esqueletos básicos de cumarinas encontradas na família Rutaceae.

Portanto, os fatores que podem também influenciar nas análises metabolômicas durante a seleção do organismo a ser analisado são o tratamento, a idade e o tamanho. Durante o preparo das amostragens também é necessário observar a quantidade da amostra, a maceração, horário de coleta, principalmente quando se trata de um estudo voltado a comparação de perfil químico, o caso deste trabalho. Com isso, as análises metabolômicas exigem uma sequência de etapas, incluindo a preparação de amostras e a extração dos possíveis metabólitos. Já o

estudo quimiotaxonômico inclui a investigação de padrões de ocorrência de metabólitos secundários nas plantas e, em especial, em várias partes individuais desta como, por exemplo, raiz, caule, folhas e frutos. A escolha das etapas depende do tipo de estudo (“alvo” ou “não alvo”), ou tipo de amostra, a instrumentação a ser usada na separação e método de detecção. A análise dos dados de metabolômica é em grande parte realizada por diversas ferramentas quimiométricas (CEVALLOS-CEVALLOS, 2009).

### **1.8. LC-MS e Massas de Alta Resolução**

O modo de aquisição de dados do tipo MS<sup>E</sup> tem se mostrado uma estratégia fundamental para estudos de metabolômica. A principal vantagem e característica para a espectrometria de massas de alta resolução é a identificação ou confirmação das fórmulas moleculares dos novos compostos. Nestes experimentos, as medições de alta resolução são utilizadas para determinar com exatidão a massa do íon molecular e, a partir desta informação, atribuir uma fórmula molecular (RUSSELL, 1997). O MS<sup>E</sup> nos permite que em uma única corrida, extraímos tanto a massa exata de cada composto detectável, como também seus respectivos fragmentos, pode registrar dados sem discriminação ou seleção, assim dessa maneira tem-se uma amostragem bem explorada em uma única corrida uma aquisição completa de dados (*full-scan- MS data*) ou modo de varredura total de íons. Esse método pode alternar rapidamente entre duas funções, a primeira função adquire dados em baixas energias, gerando assim um espectro de íon molecular precursor da massa exata, enquanto que na segunda função adquire dados utilizando energias bem mais elevadas, obtendo-se dessa maneira espectro de íons fragmentos, que também possuem a massa exata.

A ferramenta de alta resolução é possível através de analisadores do tipo TOF (time of flight), FT-ICR (Fourier transform ion cyclotron resonance), e Orbitraps, por exemplo. Além de alta resolução, estes equipamentos costumam ser também mais sensíveis, quando comparados a outros equipamentos do gênero. Os analisadores híbridos do tipo Quadrupolo -Time-Of-Flight (QTof), estão substituindo outras tecnologias LC-MS. O desenvolvimento de equipamentos híbridos teve início no final da década de 1970 e visava combinar diferentes características de

desempenho oferecidas pelos vários tipos de analisadores em um único espectrômetro de massas (CASS, 2011). Em um sistema do tipo TOF, os íons formados na fonte de ionização são extraídos e acelerados em alta velocidade por um campo elétrico em um tubo longo denominado usualmente “drift tube”, após o qual atingem o detector.

O princípio de operação do TOF baseia-se na medida do “tempo de voo” de um íon dentro do espectrômetro de massas. O sistema Q-TOF é caracterizado por uma alta velocidade de transmissão de íons, tem rapidez na aquisição de dados, é bastante versátil, possibilitando assim experimentos tanto qualitativos quanto quantitativos. Essa técnica do Cromatógrafo acoplado é uma classe líder em sensibilidade UPLC –MS/MS; garante uma transferência de íons com máxima sensibilidade, aumenta em até 25 vezes o sinal da amostra, ativamente remove os nêutrons para evitar contaminação, maximiza método robustos com matrizes bem complexas, além de sua compatibilidade com UPLC e multimodos de velocidades de aquisição de dados de MS.

A ionização pelo processo Electrospray (ESI) permite a criação de íons na pressão atmosférica ao invés de vácuo. Neste processo, a amostra é dissolvida em um solvente, usualmente não polar, e transportada através de um tubo capilar aquecido e feito de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 4.500 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente (são dessolvatadas) e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (lembrar que apenas o processo de ionização ocorre à pressão atmosférica; a partir deste ponto, o espectrômetro de massas se encontra sob “vácuo”) (LANÇAS, 2009).

No modo de ionização, com o emprego da fonte Electrospray (ESI), o efluente da coluna de cromatografia líquida entra na sonda do ESI com carga balanceada; quando a deixa, carrega uma carga iônica líquida. Para assegurar que a ESI seja um processo contínuo, a solução precisa compensar a carga por processos eletroquímicos nos quais uma superfície condutiva age como eletrodo, no qual ocorre transferência de elétrons (FIGURA 1.13). O Electrospray pode ser

operado no modo positivo ou negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. No modo positivo, as gotículas que saem do “spray” terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons, ocorrendo um processo de oxidação. De forma análoga, no modo negativo o oposto ocorrerá. (LANÇAS, 2009).

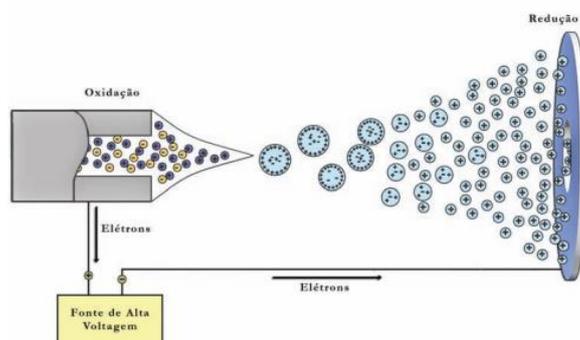


FIGURA 1. 13 - Os íons formados no processo Electrospray são conduzidos para o contrapolo pelo campo elétrico aplicado.

### 1.9. Processo de extração dos Voláteis por “*Headspace*” estático associada a GC-MS

As técnicas de amostragem de voláteis que vem sendo mais empregadas utilizam pouco ou nenhum solvente orgânico em suas análises. Como em qualquer outro método de amostragem, dependem diretamente da partição entre os analitos da matriz e uma fase extratora que pode ser um gás, um líquido, ou um adsorvente. A microextração em fase sólida, amostragem estática do espaço livre (“*headspace*” estático) e a amostragem dinâmica do espaço livre (extração por purga e captura, do inglês “purge and trap”, denominado “*headspace* dinâmico) são as principais técnicas usadas para a extração de voláteis.

Essas utilizam, quando necessário, pequenas quantidades de solventes e não é necessário o uso de altas temperaturas, que varia com o analito de interesse, reduzindo assim, a possibilidade de degradação das substâncias quando comparado a métodos tradicionais de extração de voláteis, como a hidrodestilação (AGELOPOLUS, 1998).

A técnica de *headspace* estático é relativamente simples e de fácil operação. Nela, a amostra é preparada em um frasco que, além da amostra, contém quando necessário o solvente de diluição e a solução modificadora (FIGURA 1.14).

O “*headspace*” estático é o caminho mais simples para avaliar a

composição química de um aroma. Nesta técnica, a amostra é fechada em frasco como descrito acima, onde o equilíbrio é atingido entre o *headspace* e a fase extratora a uma determinada temperatura. Os voláteis presentes no *headspace* são retirados através de uma seringa e injetados no cromatógrafo (AGELOPOLUS e PICKETT,1998).

A microextração em fase sólida no modo “*headspace*” utiliza uma fibra revestida por fases de diferentes polaridades. Dentre os principais revestimentos estão: polidimetilsiloxanos (PDMS), poliacrilato (PA), carboxen/polidimetilsiloxanos (CAR/PDMS) e polidimetilsiloxanos /divinilbenzeno (PDMS/DVD). A seleção do uso da fibra depende da aplicação, assim como das características dos voláteis que são adsorvidos ou absorvidos pela fase da fibra. O equilíbrio é controlado pelo coeficiente de partição da amostra entre as três fases (*headspace*, a matriz da amostra e o revestimento da fibra).

A cromatografia gasosa é uma das técnicas mais utilizadas em análises qualitativas e quantitativas quando se pensa em estudos de composição química de compostos voláteis, devido sua alta sensibilidade, rapidez nas análises, boa precisão quantitativa e alto poder de resolução (MELQUIADES,2006).

A técnica quando utilizada de forma hifenizada, com a espectrometria de massas é o mais aplicado para a identificação de compostos voláteis. E para a determinação e confirmação dos voláteis, pode-se utilizar o índice de retenção ( $K_i$ ), onde os mais utilizados para essas amostras são o índice de Kovats e índice de retenção com programação linear de temperatura.

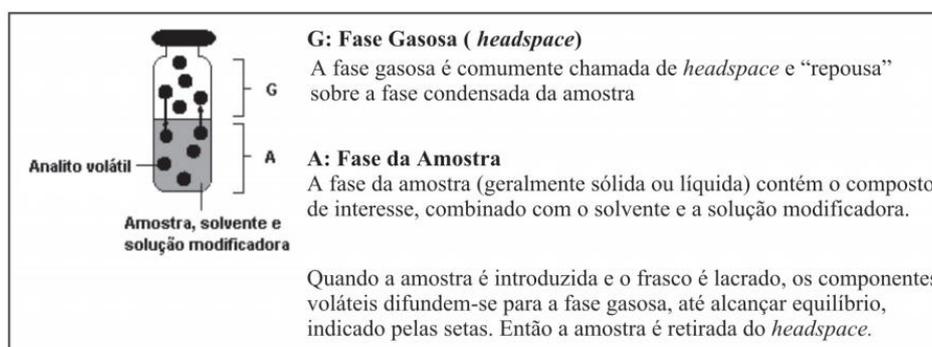


FIGURA 1. 14 - Fases do frasco do *headspace*. Fonte:(MELQUIADES,2006).

### **1.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química dentre outras áreas de pesquisa. O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características de microestruturas de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas. Valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al. 1987).

Uma outra característica que é extremamente importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. A técnica nos permite também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica. Como resultado tem-se que os aparelhos modernos permitem aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas.

## **2. Justificativa**

O desafio para os citricultores no controle da gomose em citros, causada pelo fungo *Phytophthora nicotianae*, tem aumentado cada vez mais a exigência por produtos livres de resíduos químicos tóxicos. Com isso há um estímulo para a implantação de novos ensaios de avaliação da atividade antifúngica de metabólitos secundários frente à *P.nicotianae*. A gomose, causada por diferentes espécies desse patógeno é uma importante doença veiculada pelo solo, essa interação apresenta plantas hospedeiras com diferentes níveis de resistência ao fungo, além de ser uma doença bastante evidenciada nos municípios produtores de laranja em todo o mundo. Esses patógenos provocam alterações fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros, que prejudicam o desenvolvimento da planta, podendo causar até o tombamento, podridão das raízes, radículas e dos pés. Alguns trabalhos foram realizados a fim de compreender os mecanismos de resistência de alguns citros e *Phytophthora*, no entanto, os mesmos ainda não foram totalmente esclarecidos. Os conhecimentos dessas informações estimulam a implantação de ensaios que, com a avaliação da atividade antifúngica de metabólitos secundários identificados em seu perfil químico frente à *P. nicotianae*, poderá tornar o trabalho pela busca de antifúngico mais econômico, viável e rápido. Uma alternativa para inibir o desenvolvimento do oomiceto é entender os eventos metabólicos relacionados à comunicação fungica intracelular e conseqüentemente inibir o crescimento do microrganismo. Desta forma, poderíamos realizar o estudo dos aspectos químicos envolvidos em todo o processo de desenvolvimento do mesmo. Esses conhecimentos podem prover meios para controlar o desenvolvimento desse fitopatógeno e adicionalmente, conhecendo as substâncias que sofrem alterações quantitativa ou qualitativamente nos diferentes tratamentos poderá mostrar qual ou quais constituintes estão envolvidos no mecanismo de defesa da planta quando estiver em contato com o oomiceto.

***Objetivo***

### **3. Objetivo**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Realizar o estudo químico do fungo *Phytophthora nicotianae* quando o mesmo está inoculado em plântulas de *Citrus sinensis* e estudar a busca de futuros inibidores frente ao desenvolvimento da doença.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Cultivar em larga escala o fungo *P. nicotianae*;
- Realizar o estudo químico dos extratos obtidos do meio aquoso e do micélio formado no desenvolvimento de *P. nicotianae*;
- Avaliar a variação do perfil químico no hospedeiro (Tangerina Sunki e Citrumelo Swingle) após a inoculação do oomiceto *P. nicotianae* em amostras sadias e doentes;
- Desenvolver métodos analíticos HPLC -UV-MS e UHPLC -MS<sup>E</sup> para o estudo do perfil químico;
- Identificar biomarcadores químicos voláteis e/ou semivoláteis presentes em *Citrus sinensis* após a inoculação do oomiceto causador da doença gomose de citros por “*headspace*” estático associados à GC-MS

*Procedimento*

*Experimental*

## **4. Procedimento Experimental**

Os procedimentos químicos, como a preparação dos meios de cultivo, crescimento do microrganismo, os extratos das frações do meio sólido e líquido e os extratos vegetais, como isolamento, identificação das substâncias, com os estudos analíticos da variação do perfil químico foram realizados no laboratório de pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos e as análises no UHPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> foram realizados no laboratório de química de produtos naturais da Universidade Estadual de São Carlos –USP e no laboratório Separare do Departamento de Química da UFSCar.

As preparações das mudas utilizadas neste trabalho, assim como as devidas inoculações, foram realizadas em telado e câmara de crescimento da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no município de Cruz das Almas-BA.

### **4.1. Obtenção do fungo *Phytophthora nicotianae***

O isolado de *P. nicotianae* foi proveniente do Estado de São Paulo, fornecido pelo Pesquisador Eduardo Feichtenberger (APTA). Esse isolado foi inoculado e mantido em meio de cenoura-ágar (200 g de cenoura + 20 g de ágar L<sup>-1</sup> de água destilada) a 28°C, no escuro, a fim de propiciar condições para o desenvolvimento do patógeno.

#### **4.1.1. Materiais**

#### **4.1.2. Suportes usados nos estudos cromatográficos**

- Sílica gel 60 (70-230 mesh e 230-400 mesh) da Merck, para cromatografia por adsorção em coluna aberta;
- Sílica gel 60 F254, usando folhas de alumínio com 0,2 mm de diâmetro (Merck), para cromatografia em camada delgada analítica.

#### **4.1.3. Eluentes**

- Solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar, para cromatografia em coluna aberta;
- Solventes grau HPLC (Merck, Tedia, HoneyWell, J. T. Baker, Panreac), para cromatografia líquida de alta eficiência;
- Solventes deuterados (Merck e Aldrich), para obtenção de espectros de RMN;
- Solvente grau massas LC-MS (Panreac e J.T. Baker) para análises de espectrometria de massas de infusão direta.
- Água ultrapura, obtida no Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka);

#### **4.1.4 . Colunas**

- Coluna Gemini C18 Phenomenex (250 x 4,60 mm, partículas de 10nm) e (25,0 x 2,1 cm, partículas de 10nm);
- ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, com partículas de 5µ m, da marca Agilent, acoplado com uma coluna guarda C18 (4x3 mm).

#### **4.1.5. Reveladores**

- Radiação UV (254 e 365 nm);
- Solução de Vanilina;
- Reagente de Dragendorff.

#### **4.1.6. Detectores**

- UV-Vis Shimadzu SPD-10AV

#### **4.1.7. Filtros**

- Filtro de Seringa (PVDF e PTFE), não estéril, 25 mm x 0,45 µm (Millipore ®)

#### **4.1.8. Micropipetas**

- Micropipetas marca Eppendorf de 1-10 mL, 20-200 mL e 200- 1000 mL

#### **4.1.9. Papel de filtro**

- INLAB Tipo, porosidade 3,0 µm

### **4.2. Materiais utilizados para o isolamento- identificação- cultivo e conservação do microrganismo**

#### **4.2.1. Isolamento do microrganismo – Oomiceto**

- Álcool 70%
- Água destilada
- Alça de platina
- Alça de Drigalski
- Bico de Bunsen
- Lâminas de bisturi
- Pinça;
- Funil analítico;
- Placas de Petri;
- Erlemneyers

#### **4.2.2. Cultivo do Fungo – meios de cultivos**

- Czapeck Himedia®)
- Batata Dextrose (Himedia®)
- Aveia – orgânico
- Cenoura – orgânico
- Ágar (Himedia®)
- Cenoura e milho: orgânicos

### **4.3. Equipamentos**

#### **4.3.1. Evaporadores**

- 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.
- BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.
- BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

#### **4.3.2. Balanças analíticas**

- Shimadzu Corporation modelo AUW220D

#### **4.3.3. Cromatógrafo líquido de alta eficiência**

- Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Amostrador automático G1329A, e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A. Software utilizado para processamento dos dados: EZCrom Ellite;
- Agilent Technologies 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, degaseificador interno no módulo da bomba, amostrador automático G1329B e detector de ultravioleta G1314B, forno de coluna G1316A. Software utilizado para processamento dos dados: EZCrom Ellite – Open Lab;

- 

#### **4.3.4. Espectrômetros de Massas**

- API 200 (APPLIED BIOSYSTEMS). Fonte de ionização: ESI e APCI. Analisador “triplo quadrupolo”.
- GC-MS Shimadzu QP 2010 baixa resolução, Fonte de ionização por impacto

eletrônico.

- Synapt G2-S (Waters Technologies). Fonte de ionização ESI. Analisador híbrido Q-TOF (Quadropole - Time of Flight).

#### **4.3.5. Ressonância Magnética Nuclear**

- Bruker DRX - 9,8 T (400 MHz para RMN <sup>1</sup>H), equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®) e bobina de gradiente de campo em z, unidade geradora de gradiente de campo e unidade de temperatura variável – equipamento utilizado para o trabalho de rotina;
- Bruker avance III - 14,1 T (600 MHz para RMN <sup>1</sup>H), equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI (1H/13C/15N) de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching) e gradiente de campo em z, sonda BBI de 5 mm com ATMA®, gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade cryo-fit® e unidade LC-SPE acoplada.

#### **4.3.6. Centrífuga**

- Centrífuga marca Eppendorf modelo 5810R com sistema de refrigeração

#### **4.3.7. Homogeneizadores**

- T 10 standard ULTRA-TURRAX® (IKA)
- T 25 ULTRA-TURRAX® (IKA)

#### **4.3.8. Unidade de Extração em Fase Sólida (SPE)**

- Bruker/Spark Prospect II unit (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany; Spark, Emmen, The Netherlands) para retenção seletiva das bandas cromatográficas, e concentração dos analitos. Os cartuchos de SPE empregados foram do tipo

HySphere C18 end capped sílica (2mm i.d., 10 m).

#### **4.3.9. Moinhos**

- Moinho de facas tipo Willye – Tecnal
- Moinho analítico básico A 11 (IKA)

#### **4.3.10. Câmara de Fluxo Laminar**

- Veco VL FS-12M

#### **4.3.11. Autoclaves Verticais**

- - Phoenix AV 30
- - Phoenix AV 50
- - Phoenix AV 75

#### **4.3.12. Estufa Incubadora (B.O.D)**

- Fanem – 347 CD

#### **4.3.13. Banho de Ultra-som**

- Branson 1510, Danburcy, CT

#### **4.4. Avaliação do crescimento micelial de *P.nicotianae* em diferentes meios de cultivos**

##### **4.4.1. Cultivo do meio líquido e sólido**

Os meios de cultivo utilizados foram:

- I) Meio de Batata (BDA): Infusão de 200 g L<sup>-1</sup> de batata, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar;
- II) Meio de Aveia (AVA): 60 g L<sup>-1</sup> de aveia em flocos e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar;
- III) Meio de Cenoura (CA): 20 g L<sup>-1</sup> de cenoura e 17 g L<sup>-1</sup> de ágar;
- IV) Meio de Milho e Cenoura (CMA): 30 g L<sup>-1</sup> de milho, 30 g L<sup>-1</sup> de cenoura e 16 g L<sup>-1</sup> de ágar;
- V) Meio de Czapek enriquecido com Glutamina (CZA) e 16 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Foram analisados parâmetros como massa micelial e possíveis quantidades de metabólitos presentes nos extratos brutos. A partir de culturas puras dos isolados de *Phytophthora*, cinco discos de 5 mm de diâmetro das extremidades da colônia, foram transferidos assepticamente para erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de água destilada e o respectivo meio de cultura utilizado. Após alguns dias de incubação, tempo de crescimento otimizado (em torno de 15 a 21 dias) variando de acordo com o controle da temperatura (27° a 32° C) e época do ano para o preparo dessas amostras, de acordo com a FIGURA 4.1, foram realizadas a coleta da massa micelial através da filtração a vácuo da cultura, utilizando-se papel de filtro para tirar excesso de umidade.



FIGURA 4. 1 - Meio líquido de cultivo em CM de *Phytophthora nicotianae* autoclavados.

A massa seca ao ar foi transferida para um erlenmeyer contendo metanol (foram feitos testes também com etanol), onde ficaram em repouso por aproximadamente 4 horas. Após esse intervalo de tempo a massa micelial foi triturada em um triturador (turrax) elétrico, onde permaneceu em repouso durante 48 horas, cada amostra. Depois de submetido à filtração a vácuo, o extrato metanólico do micélio foi concentrado e posteriormente analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

O meio líquido fermentado foi submetido à partição líquido-líquido, três vezes com acetato de etila e posteriormente butanol. Os solventes orgânicos foram evaporados em rotaevaporadores, fornecendo os extratos de acetato de etila, butanólico e hidroalcolico e seus respectivos brancos. O solvente foi devidamente rotulado e enviado para descarte. Após serem concentrados, os extratos foram analisados por CLAE e RMN.

#### **4.4.2. Análises de microextração para comparação de meio de cultivo**

Os extratos de cultura foram preparados por corte de três plugues de 6mm de diâmetro a partir de uma ou várias colônias, usando uma broca de cortiça da seguinte maneira, um do centro da colônia, uma na borda da colônia, outra da borda da colônia mais distante o possível das outras colônias e uma outra na borda da colônia bem mais próxima, para apresentar a variabilidade em uma colônia.

Os inoculos foram transferidos para um amostrador automático descartável com 500 microlitros de mistura de solventes metanol-diclorometano e acetato de etila (01:02:03) contendo 1% (v/v) de ácido fórmico. Em seguida, os tampões foram extraídos por ultra-som durante 60 minutos.

Os extratos foram transferidos para um frasco limpo, utilizando uma pipeta de Pasteur e a fase orgânica foi evaporada com nitrogênio. Os resíduos foram novamente dissolvidos no ultra-som por 10 minutos em 400 microlitros de metanol contendo 0,6% (v/v) de ácido fórmico, 0,02%(v/v) de ácido clorídrico e 2,5%(v/v) de água. Após a evaporação do solvente, todas as amostras foram preparadas para análises em CLAE e RMN, de acordo com o FIGURA 4.2, mostrado abaixo:

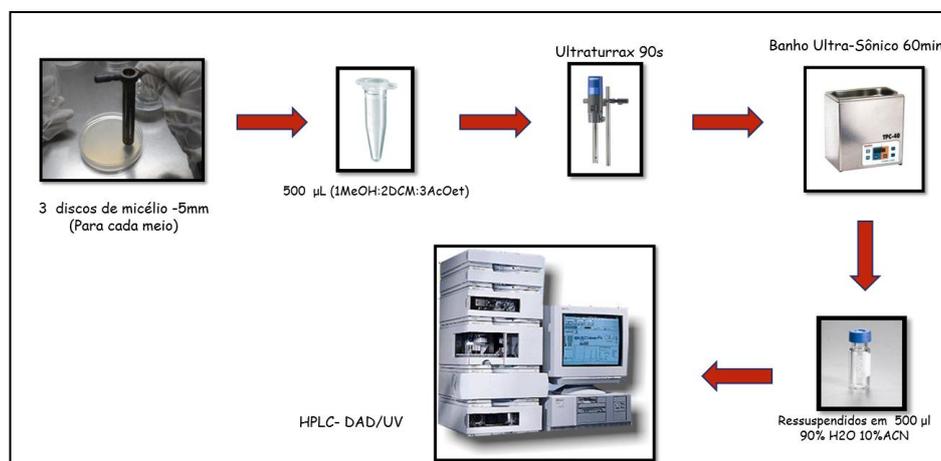


FIGURA 4. 2 - Esquema de procedimento das análises em microextração dos meios de cultivos com oomiceto *Phytophthora nicotianae*.

#### 4.4.3. Cultivo do oomiceto em meio sólido

Paralelamente ao crescimento do fungo em meio líquido, foi realizado o mesmo experimento para meio sólido, adicionando-se o ingrediente ágar. Um disco de aproximadamente 5 mm do isolado (previamente reativado) foi transferido assepticamente para 3 placas de petri contendo 25 mL do respectivo meio (BDA, AVA, CA, CZA, CMA) e ágar, previamente autoclavados e deixados sob temperatura de 25°C. Para o branco, foi vertido apenas o meio de cultura e ágar, sem adição do oomiceto, que serve de controle para análise do crescimento micelial, de acordo com a FIGURA 4.3 abaixo.



FIGURA 4. 3 - Crescimento micelial do oomiceto *Phytophthora nicotianae* em diferentes meios de cultivos: respectivamente em: Cenoura-milho-ágar (CMA); Cenoura-ágar (CEA); Aveia-ágar (AVA); Batata ágar (BDA).

#### **4.4.4. Coleta do Material Vegetal – Plântulas de *Citrus sinensis***

Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizada a coleta do material vegetal na Embrapa Fruticultura e Mandioca, localizada no município de Cruz das Almas na Bahia, no período de setembro de 2015. Nesta visita foi coletada a variedade “Valência” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) enxertadas em “Swingle” (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) e Tangerina Sunki Tropical (*Citrus Sunki* Hort. ex Tan). Tratava-se de plântulas jovens com seis meses de enxertia. Essas mudas foram utilizadas neste trabalho na etapa de avaliação da variação do perfil químico na presença do oomiceto (contato hospedeiro x patógeno com 45 dias) causador da doença gomose de citrus.

#### **4.4.5. Metodologias utilizadas para análise da variação do perfil químico do oomiceto e das plântulas de *Citrus sinensis***

##### **4.4.5.1. Varredura das análises para *Phytophthora nicotianae***

###### **4.4.5.1.1. Detector DAD**

O screening do perfil cromatográfico do oomiceto foi feito inicialmente em um Cromatógrafo Líquido Shimadzu- modelo SPD – M10A com detector de arranjo de diodo (DAD) no modo reverso de eluição e sistema de gradiente exploratório. A

corrida cromatográfica iniciava-se, com 5% de solvente orgânico (ACN) e 95% de H<sub>2</sub>O e após 42 minutos, atingia 100% de solvente orgânico. Utilizou-se para esta análise uma coluna analítica C18- zorbax eclipse e XDB- analítica (4.6 X 150 mm, 5 mm). Realizou-se uma varredura de comprimentos de onda que se iniciava em 200nm e atingia o máximo em 800nm. Três comprimentos de ondas neste intervalo foram selecionados (254, 280, 320), para análises posteriores no HPLC-UV.

#### **4.4.5.1.2. Detector Ultravioleta –UV**

A análise do perfil cromatográfico do oomiceto foi feita, comparando-se o perfil do meio de cultura com o oomiceto e o meio de cultura sem o oomiceto, usado como controle. Essa análise foi feita utilizando cromatográfico líquido de alta eficiência 1260 – Agilent Technologies, no modo reverso de eluição, cujo princípio da retenção baseia-se na hidrofobia e na interação entre a parte não polar do soluto e a fase estacionária (CASS, et al., 2009). Para a análise utilizou-se uma coluna C18- Zorbax eclipse e XDB- analítica 4.6 x 150 mm 5 microm e fase móvel uma mistura de água (A) Acetonitrila (B), conforme mostrado na TABELA 4. 1 abaixo, acidificado com 0.1% de ácido fórmico e vazão de 0,65/min. O volume de injeção dos extratos foi de 20 µl e concentração da amostra de 1 mg/mL. Após algumas análises de varredura em outros comprimentos de onda no DAD, seguimos trabalhando com um comprimento de onda que foi ajustado para 254 nm em HPLC-UV.

TABELA 4. 1 - Sistema de eluição HPLC-UV.

Tempo (min)	0	5	15	20	30	35	37	50
Porcentagem (%) A	<b>95</b>	<b>95</b>	<b>70</b>	<b>55</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>95</b>	<b>95</b>
Porcentagem (%) B	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

#### **4.4.5.2. Crescimento do oomiceto em larga escala para o estudo químico**

O oomiceto *P. nicotianae* foi cultivado em meio líquido de cenoura e milho em escala ampliada para a obtenção do extrato bruto. O cultivo foi feito em erlenmeyers de 1000 mL, os quais foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C, sob pressão de 1 atm por aproximadamente 20 minutos com o meio de cultura. Em seguida foram adicionados aos frascos 8 discos de 5 mm de diâmetro das extremidades da colônia, que permaneceram em meio estático, a uma temperatura controlada de 27°C. Após o período de crescimento (21 dias) foi realizada a extração do oomiceto. Em seguida foram realizados os devidos fracionamentos, onde foram analisados em UHPLC-MS<sup>E</sup> onde a coluna utilizada nos experimentos de massa de alta resolução foi Javelin Betasil C18 (10x2 mm). A corrida cromatográfica foi realizada no modo reverso com gradiente de eluição ACN: H<sub>2</sub>O (5:95), ambas as linhas acidificadas com ácido fórmico (0,1%), com um fluxo de 0,350 uL/ min e temperatura da coluna em 40°C.

##### **4.4.5.2.1. Preparação dos extratos do oomiceto**

A preparação dos extratos segue conforme ilustrado na FIGURA 4. 4, os extratos obtidos através de filtração à vácuo após os 21 dias de crescimento do oomiceto com sua partição líquido-líquido com acetato de etila e butanol, resultou em seis extratos de cada meio de cultivo analisado e o extrato do micélio, que são os seguintes:

- Extrato Acetato de Etila (AE) + Branco AE;
- Extrato Butanólico (BU) + Branco BU;
- Extrato Hidroalcolico (HOH) + Branco HOH.
- Extrato do Micélio em EtOH + Branco

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

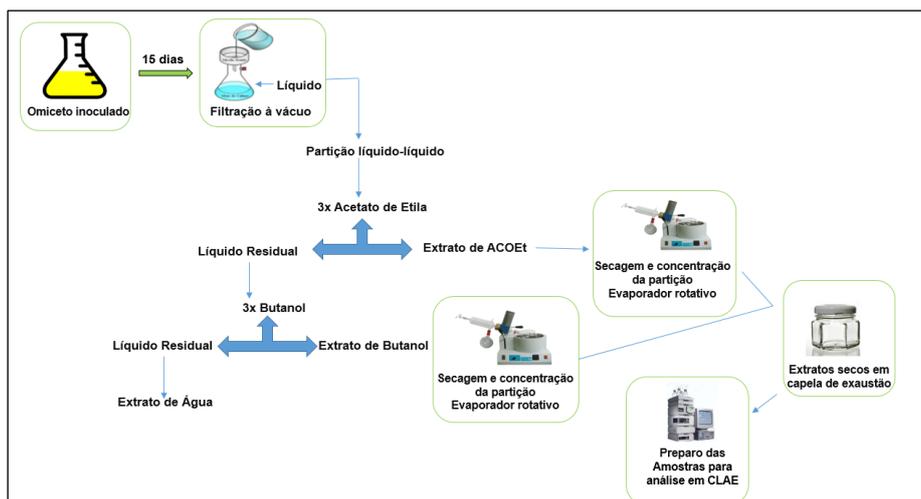


FIGURA 4. 4 - Esquema para participação líquido-líquido e obtenção dos extratos de acetato de etila, butanol e hidroalcolóico das amostras de CM, AV, CE e BD.

Todos os procedimentos para os extratos dos meios de cultivos estudados foram feitos em triplicata de acordo com a FIGURA 4.5 abaixo, que foram submetidas as devidas análises através de técnicas espectroscópicas.

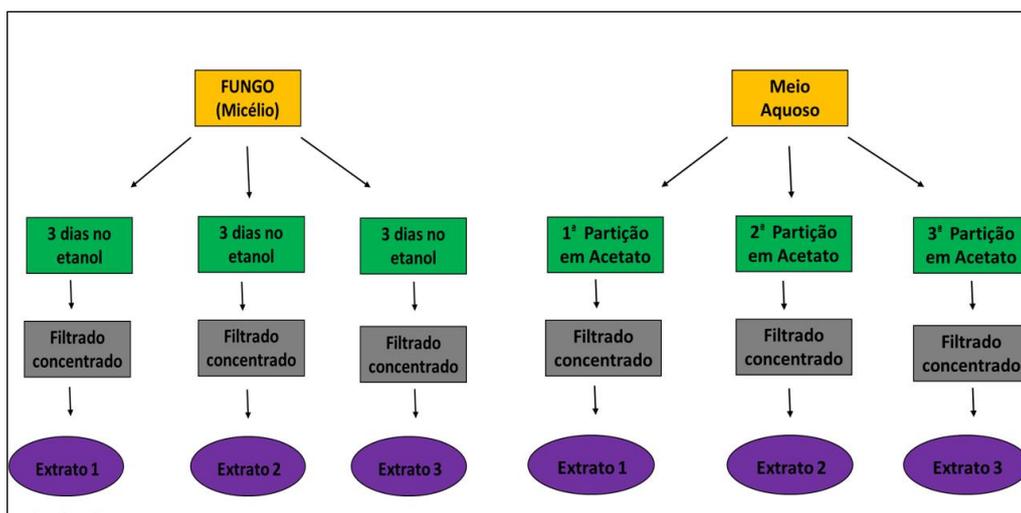


FIGURA 4. 5 - Esquema dos extratos do micélio do pseudofungo e do meio aquoso para as análises em HPLC-UV.

#### **4.4.5.2. Preparação e inoculação das mudas de plântulas de *Citrus sinensis***

No intuito de avaliar a variação na composição química de citros com gomose através das técnicas já mencionadas, foi montado um experimento com as mudas, incluindo tanto espécies sadias quanto inoculados com o oomiceto. A amostragem consistiu-se de mudas de laranjeira Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas sobre citrumeleiro Swingle (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) e Tangerineira Sunki Tropical. A escolha da copa e dos porta-enxertos foram feitas com base na elevada importância comercial dessa combinação em escala mundial (POMPEU JÚNIOR, 2008) e crescente utilização por citricultores brasileiros, além do fato de que tanto a copa quanto os porta-enxertos utilizados para essas análises tinham o mesmo tempo de vida, ambos com oito meses de enxertia. Esse experimento de enxertia e preparação das plântulas para inoculação do oomiceto foi conduzido em telado e câmara de crescimento da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas –BA.

Metade das mudas de TST e CTSW foram conservadas sadias, as quais usamos como controle, enquanto que as outras metades sofreram a inoculação artificial do oomiceto *Phytophthora nicotianae* pelo processo do método da agulha que consiste em inocular com auxílio de uma agulha de metal ou espinhos de plantas cítricas (previamente desinfestados com álcool 70%), estruturas do patógeno obtidas em colônias de *P. nicotianae* com cinco a oito dias de crescimento micelial. A haste da planta é perfurada à altura de 2,0 cm do colo, introduzindo-se uma agulha até atingir a extremidade oposta da haste e, em seguida, insere-se a agulha infestada no ponto de inoculação, retirando-a posteriormente. O ponto de inoculação é protegido com algodão umedecido e vedado com auxílio de fita de enxertia. A avaliação é realizada de 20 a 30 dias após a inoculação. O método da agulha é indicado para uso em plântulas com 75 a 120 dias de idade e altura aproximada de 10 cm. A avaliação é realizada pelo número de plantas mortas ou pelo comprimento das lesões (SIVIERO, 2001).

Um outro procedimento adotado no preparo de inoculação do fitopatógeno foi ter a certeza que esse inóculo estava ativo para assim garantir a infecção no hospedeiro. Logo, foi feito um reisolamento para garantir a patogenicidade

do oomiceto.

Os isolados de *P. nicotianae* foram reisolados de frutos de limão siciliano que é bastante susceptível ao patógeno. Para tal, os frutos foram previamente imersos por 15 min em solução de hipoclorito de sódio 2,5%, seguido de lavagem em água destilada esterilizada para remoção do excesso. Com auxílio de um furador de rolha (12 mm de diâmetro) flambado, o fruto foi furado penetrando-se a casca e o albedo, sendo removida esta camada e adicionado no local um disco no meio ágar, contendo o micélio do respectivo isolado de *P. nicotianae*.

O orifício foi novamente coberto com a casca inicialmente removida e protegido com esparadrapo. Os frutos do limão foram mantidos durante 7 dias em incubadora tipo BOD à 28°C, no escuro. Após esse período, pedaços da área lesionada pelo patógeno foi coletada e transferida para o meio de cenoura milho-ágar, a fim de propiciar as condições para o desenvolvimento do patógeno. Essas culturas foram observadas até o crescimento característico de *Phytophthora*, para assim fazer a transferência da colônia pura, como mostra a FIGURA 4. 6 e com isso tivemos um material bem mais ativo.

A escolha de plântulas ao invés de plantas adultas foi necessária, em primeiro lugar, por uma questão de economia de espaço, mas também foi conveniente devido ao fato de que nestas tendem a manifestar os sintomas mais rapidamente. Todos os experimentos foram realizados com plantas da mesma idade e nas mesmas condições, evitando assim resultados equivocados de quantificação e de variação do perfil químico devido a fatores como sazonalidade, temperatura e disponibilidade hídrica.

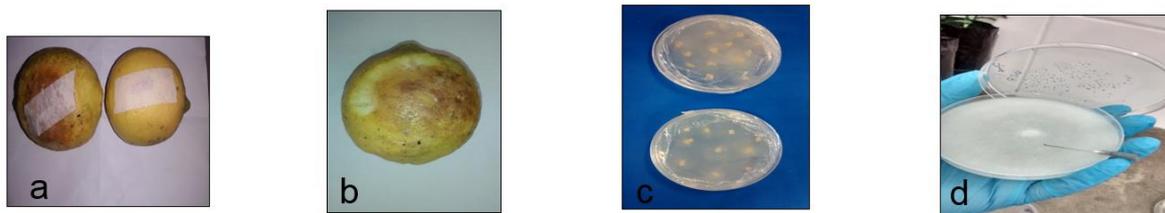


FIGURA 4. 6 - Imagens do reisolamento do patógeno em limão siciliano: a) limão com sete dias de infectado; b) retirada do material infeccionado pelo oomiceto; c) pedaços do inóculo em meio de cultivo de cenoura e milho; d) inóculo de *Phytophthora* ativo.

#### **4.4.5.3. Preparação dos extratos das plântulas de TST e CTSW**

As mudas foram transportadas de Cruz das Almas, BA para o Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, em seguida foram acondicionadas para seu tratamento. Primeiramente as plantas foram separadas em raiz, caule inferior, caule superior e folhas. Estas foram liofilizadas em estufa de circulação a 37°C durante aproximadamente 7 dias, e posteriormente trituradas em moinho analítico. O material moído era peneirado em peneira molecular, a fim de se homogeneizar o tamanho de partícula e minimizar dessa maneira erros experimentais. Esse material seco foi estocado e congelados à -80°C.

Com a extração, desejou-se extrair a maior quantidade e uma boa concentração de compostos nas amostras. Por esta razão, a extração é provavelmente uma das etapas mais importantes quando se fala de estudo metabolômico. Em estudos “não alvo”, a natureza dos metabólitos de interesse é na maioria das vezes desconhecida. Dessa maneira, diversos solventes e métodos de extração costumam ser testados e comparados, assim alguns testes foram feitos e os melhores resultados foram obtidos com a seguinte metodologia: De acordo com o FIGURA 4. 7, pesou-se cerca de 50 mg do material já moído, transferiu-se para um tubo falcon e adicionou-se 2 mL uma mistura de solvente contendo MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1). Este foi em seguida submetido a extrações com o auxílio de um homogeneizador/dispersor (Turax), à 6000 rpm/min, durante 90 segundos. No intuito de maximizar o número e também a quantidade de metabólitos extraídos da matriz de interesse, além de reduzir o tempo de extração, métodos de rompimento celular como o dispersor mencionado acima tem sido bastante utilizado. Após a extração em turrax, o material foi centrifugado à temperatura de 25°C por 10 minutos à 10000 rpm. O sobrenadante foi filtrado com filtro de seringa (PTFE MILLIPORE; 0,45µm poro; Ø = 13 mm), e com o precipitado foi adicionado mais 2 ml da mesma proporção de solvente, repetindo-se mais uma vez o processo mencionado. O sobrenadante foi seco em evaporador de solvente à vácuo (SpeedVac) e ressuspendido em 2 ml de MeOH: H<sub>2</sub>O para posterior análise cromatográfica em HPLC-UV.

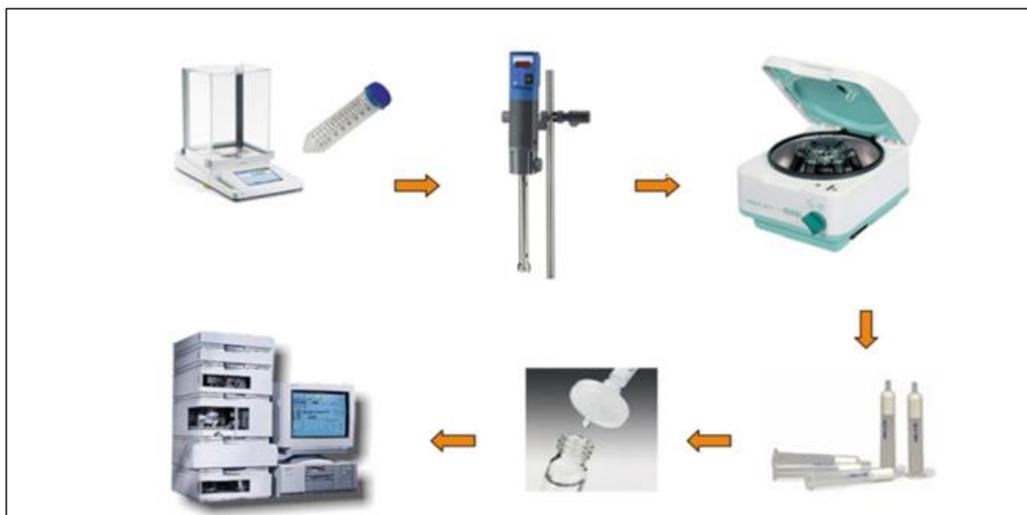


FIGURA 4. 7 - Metodologia de extração das amostras referentes às mudas das plântulas de TST e CTSW, procedimento feito para cada parte analisada das amostras (raiz, caule inferior, caule superior e folhas) Fonte: (BELLETE,2014).

#### **4.4.5.4. Avaliação dos perfis químicos via HPLC -UV**

As técnicas de separação mais utilizadas hoje em dia na literatura são cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e também de ultra performance (UHPLC) para as análises de nosso interesse. Portanto, para a análise da variação do perfil químico de *Citrus* utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Agilent 1260. As análises foram realizadas no modo reverso de eluição, utilizando H<sub>2</sub>O (sistema A) e ACN (sistema B) como fase orgânica, ambas (acidificada com 0,1 % de ácido fórmico). A opção por eluição gradiente é feita quando as substâncias presentes na amostra apresentam ampla faixa de polaridade. Nesses casos, nenhuma condição isocrática consegue, ao mesmo tempo, oferecer boa resolução, tempo de análise adequado e pequeno alargamento de bandas. As substâncias que eluem rapidamente requerem uma fase móvel fraca, e aquelas que demoram mais para eluir são separadas mais eficientemente com fase móvel mais forte. Quando acontece, o modo de eluição gradiente é a melhor opção a ser adotada, pois permite uma retenção adequada de todos os componentes de interesse, e conseqüentemente, as bandas cromatográficas podem ser melhor detectadas. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas a seguir, e podem ser verificadas na TABELA 4.2.

As condições iniciais da corrida foram em 90-10% (linhas A-B,

respectivamente) subindo para 10-90% em 30 min. Em seguida alterou-se a proporção da fase móvel para 0-100 até os 40 min, permanecendo isocrático em 100% de fase orgânica por 10 min; o retorno do gradiente foi feito em 2 min (90%). Entre as corridas foi utilizado um tempo para reequilibrar a coluna. Normalmente utiliza-se um volume de fase móvel de 5 a 10 vezes o volume interno da coluna. Caso esse intervalo não seja observado, podem ocorrer modificações nos tempos de retenção e separação das bandas cromatográficas em análises subsequentes.

O detector utilizado foi UV de comprimento de onda variável, sendo as corridas monitoradas em 254 e 260 nm. A quantidade de amostra injetada foi de 20 microlitros e a vazão foi de 1,0 mL/min. A coluna utilizada para todas as separações cromatográficas foi a ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, com partículas de 5µm, da marca Agilent. Para prevenir a entrada de interferentes que poderiam diminuir o desempenho e até mesmo entupir a entrada das colunas, foi usada uma coluna guarda ligada à entrada principal, sendo esta do tipo C18 (4x3 mm), também da Agilent.

TABELA 4. 2 - Sistema de eluição HPLC-UV para as amostras de citros

Tempo (min)	0	30	35	40	42	60
Porcentagem (%) A	<b>90</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>90</b>	<b>90</b>
Porcentagem (%) B	<b>10</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

#### **4.4.5.5. Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-MS<sup>E</sup>**

Com essas análises de variação química, visou-se caracterizar diferenças no perfil metabolômico entre plantas infectadas com gomose e plantas saudas, através da técnica hifenada UHPLC-MS<sup>E</sup>. Acredita-se que alterações no perfil metabolômico possam estar ocorrendo durante a infecção, e que essas alterações possam também ser quantificadas, a fim de determinar quais os principais

compostos que estão sendo produzidos e/ou consumidos durante a resposta fisiológica da planta. Utilizou-se o Cromatógrafo Acquity UPLC H-Class (Waters), de acordo com a FIGURA 4.8, acoplado a um espectrômetro de massas Xevo G2-XS (Waters), e o analisador de massas usado foi o Quadrupolo – Tempo de Vôo (Q-TOF), combinando diferentes características de desempenho oferecidas por esses diferentes analisadores.

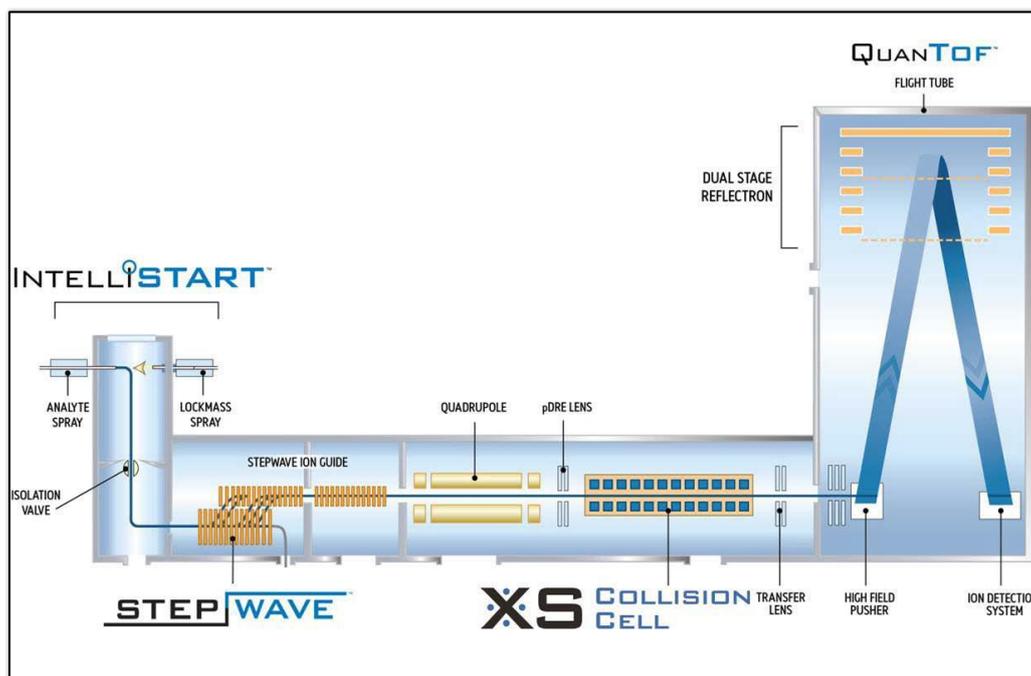


FIGURA 4. 8 - Representação esquemática de analisador de massas quadrupolo Q-TOF com aceleração ortogonal e lentes refletoras com configuração V. (Fonte: Manual eletrônico do Cromatógrafo Acquity UPLC H-Class).

Neste trabalho, o espectrômetro de massa foi operado tanto no modo de aquisição de dados "MS" quanto no modo "MS/MS". No modo "MS" o quadrupolo não é utilizado como um analisador, trabalhando somente com rádio frequência. Se comporta meramente como uma lente para focar o feixe de íons para o segundo analisador. Em seguida, o espectrômetro de massa Q-TOF é ligado no modo "MS/MS", como podemos observar na FIGURA 4.9. Nesse modo os íons moleculares podem ser selecionados e transmitidos através do analisador quadrupolar, que desta vez é de fato utilizado como um analisador, transmitindo apenas os íons de interesse para dentro da célula de colisão que fica entre o primeiro e segundo analisador. Um

gás inerte é introduzido na câmara de colisão e os íons são bombardeados com as moléculas de gás de colisão, produzindo os fragmentos. Esses fragmentos gerados são em seguida analisados pelo segundo analisador (tempo-de-voo). Desta forma, um espectro de MS/MS é produzido mostrando todos os íons fragmentos que surgem diretamente de um íon precursor escolhido.

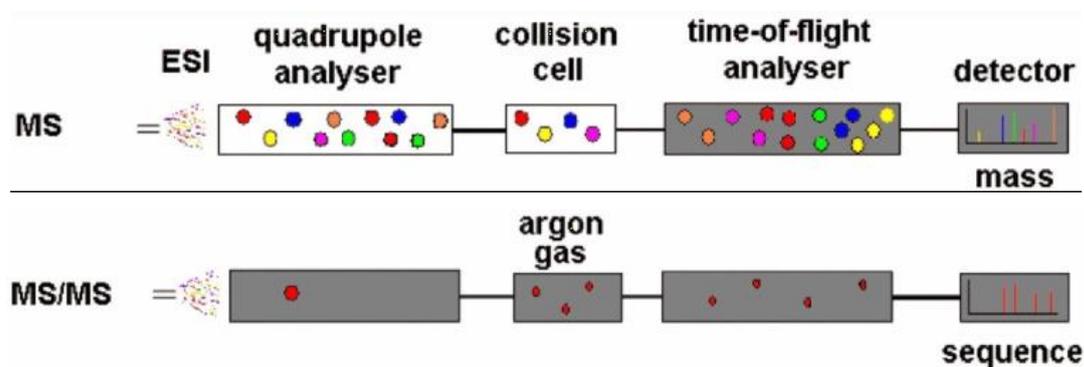


FIGURA 4. 9 - Analisador híbrido Q-TOF, operando no modo MS (acima) e no modo MS/MS (abaixo). Os módulos em cinza significam que estes estão ativos, enquanto os módulos em brancos significam que estão desativados (Fonte: <http://www.astbury.leeds.ac.uk/>).

A coluna utilizada para este estudo é uma Waters Acquity UPLC BEH C-18 (2.1x100 mm), com tamanho de partículas de 1.7  $\mu\text{m}$ . A corrida cromatográfica foi realizada no modo reverso com gradiente de eluição, usando-se fase aquosa acidificada com 0,1% de ácido fórmico, e como fase orgânica acetonitrila, também acidificada com 0,1% de ácido fórmico. As condições cromatográficas podem ser observadas na TABELA 4.3 abaixo. As amostras utilizadas para as análises passaram por um pré-tratamento (SPE), resultando em 3 frações obtidas com diferentes sistemas de solventes. Estas frações foram secas e ressuspendidas em MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1) com uma concentração de 0,1 mg/mL. A vazão utilizada foi de 0,5 mL/min, e o volume de injeção foi de 1,0  $\mu\text{L}$ . Em análises consecutivas, foi utilizado para m/z nas massas de interesse o modo MS/MS -MS<sup>2</sup> para identificação das substâncias que mais variaram dentro do perfil químico das plântulas em estudo.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

---

TABELA 4. 3 - Condições cromatográficas utilizadas para UHPLC-MS (linha A: H<sub>2</sub>O + 0,1% Ác. Fórmico e linha B: ACN + 0,1% Ác. Fórmico).

TEMPO	LINHA A	LINHA B
0	97	3
7,5	83	17
23,5	35	65
27	15	85
32	15	85
33	97	3
35	97	3

Após otimizada a metodologia cromatográfica, foi necessário otimizar os parâmetros do espectrômetro de massas. Nesta etapa do trabalho, optou-se por trabalhar tanto no modo positivo quanto no modo negativo, na tentativa de ionizar uma maior quantidade de compostos que estivessem variando o seu perfil químico. Neste estudo metabolômico “não-alvo”, a voltagem capilar utilizada foi de + 0,5 e – 0,5 Kv (para o modo positivo e modo negativo, respectivamente). A voltagem do cone utilizada foi de 40V, a temperatura de dessolvatação foi mantida em 550°C, o fluxo do gás de dessolvatação em 900 L/h e energia de colisão variando de 20 a 40 V. A faixa de massa que foi trabalhada para esses experimentos foi de 100 a 1800 Da. O modo de aquisição foi do tipo MS<sup>E</sup>, que é considerado uma ferramenta fundamental em estudo de metabolômica e possibilita espectros de MS e MS/MS na mesma análise.

Todas as amostras vegetais (raiz, caule inferior, caule superior e folhas) das plântulas de TST e CTSW foram preparadas em triplicatas e analisadas tanto as amostras de cada parte da plântula doente (inoculada com o oomiceto) versus as amostras sadias (sem a presença do oomiceto, usada como controle e/ou controle), além do branco de cada amostra (H<sub>2</sub>O:ACN na proporção 1:1), totalizando 9 experimentos para cada amostragem dessas plântulas.

#### **4.4.5.6. Aplicação de análises Quimiométricas nos dados de UHPLC-MS<sup>E</sup>**

Hoje em dia, é comum empregar as técnicas quimiométricas em estudos com análise multivariada, devido à grande dificuldade em analisar espectros com uma gama de informações somente por análise visual. Dessa forma, essas análises vêm auxiliando na interpretação desses dados químicos. O uso de alguns programas estatísticos (UNIFI, MATILAB) nos permite distinguir com melhor clareza as sutilezas tanto em relação à variação dos constituintes químicos quanto da sua quantidade em cada amostra que foi analisada. Quando se consegue unir técnicas analíticas com as quimiométricas em análises acopladas à massa, podemos separar amostras em grupos conforme as suas semelhanças ou diferenças, além de identificar variáveis que possam apresentar propriedades particulares para a amostra de nosso interesse.

Quando se começa a analisar uma amostra quimiometricamente, a amostragem gera um conjunto de dados, onde esses dados experimentais serão separados por uma determinada matriz. Dessa forma, os cromatogramas de íons totais obtidos das diferentes partes das plântulas de *Citrus sinensis* foram transformados em dados numéricos e estatísticos, organizados como deveriam em uma matriz de dados, onde as amostras correspondem às linhas e as variáveis dos experimentos às colunas. Nesse estudo, trabalhou-se com a espectrometria de massas e considerou-se como variáveis o tempo de retenção dos picos cromatográficos das amostras e sua área relativa, levando em consideração aquelas que mais sofreram variações quando comparado a amostras doentes (com o inóculo) das amostras sadias de plântulas de TST e CTSW. Foram analisados em conjunto todos os espectros de massa obtidos das partes das plântulas estudadas, os quais geraram uma matriz para cada comparação feita.

A matriz gerada para o estudo comparativo de plântulas de TST continha 72 linhas e a mesma quantidade para as análises feitas para as amostras de plântulas de CTSW, gerando um total de 144 linhas, onde essas linhas eram referentes às amostras analisadas de quatro diferentes órgãos das plântulas no tratamento sadio e doente, e em triplicata experimental, totalizando nove replicatas

para cada estudo. No momento das análises se fez necessário, eliminar algumas regiões dos espectros, não informativas, pois foi possível notar que mesmo com a subtração do branco, na região final do espectro haviam picos relacionados com a injeção do branco em todas as partes analisadas, logo os espectros foram rodados de 0 a 22 min. Para essas análises utilizou-se o software MassLynx e UNIFI de análise quimiométrica, fazendo-se o uso de técnicas como PCA (Análise de Componentes Principais), Loadings Plot e S-Plot.

#### **4.4.5.7. Metodologia para “*headspace*” estático associado ao GC-MS**

A extração estática das amostras de plântulas de TST (tolerante / susceptível) e CTSW (resistente) ao patógeno causador da gomose de citros, foi realizada colocando a cada amostra analisada da parte vegetal (raiz, caule inferior e folha) 300 mg de cada amostra em frascos de 43 mL tampado com um septo com aquecimento a temperaturas diferentes por quase 60 min. Cada amostra foi injetada com uma seringa de aproximadamente 1mL no cromatógrafo gasoso com o injetor no modo dividido. Com os primeiros testes, foi possível observar que os melhores resultados para as análises de interesse na busca de biomarcadores em plântulas de TST e CTSW na presença da infecção por gomose, foram obtidos entre 100 a 150°C. Todas as análises foram realizadas usando o gás da série CE 8001 cromatógrafo equipado com um injetor Split-splitless de 10 e um detector de ionização de chama (FID). Nesse estudo foi utilizado uma coluna DB-1, 30m de comprimento, 0,251 mm i.d, com uma película de 0,25  $\mu$ m, e o gás Hélio como transportador a 1mL/ min.

A injeção utilizada foi dividida (1:16) a 230°C, com volume de injeção de 1-3  $\mu$ L na dinâmica espaço da cabeça, purga e armadilha, e os métodos SDE e 1mL no espaço de cabeça estático. O programa de temperatura nas amostras variou de 40°C em 6 min a 160°C com 3 min a 250°C/min. O detector da temperatura foi ajustado a 275°C. E a identificação dos componentes das partes vegetais em plântulas de *Citrus sinensis* foi baseada na comparação entre o índice de retenção e o espectro de massa das amostras autênticas e dados retirados da literatura (ADAMS, 2007), ou ainda por comparação com uma outra biblioteca de dados com

espectros de massas registrados no banco de dados da (NIST e WILEY).

A fim de permitir uma comparação entre os tempos de retenção dos diferentes compostos obtidos com os dados da literatura, amostras autênticas e com o banco de dados, foi utilizado o índice de retenção de Kovats. Esse índice utiliza uma série de alcanos saturados de cadeia normal (C5 a C29) e para evitar erros devidos a variações do tempo de retenção dos compostos decorrentes de alterações como temperatura, fluxo e operador. O índice de retenção corrigido varia muito pouco e de maneira linear com a temperatura. Os índices de retenção calculados foram, então, comparados com os da literatura ou com amostras autênticas (COLLINS & BRAGA, 1988).

#### **4.4.5.8. Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)**

O preparo dos materiais biológicos, em geral, após passar pelo processo de fixação e desidratação, foram transferidos para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico do CO<sub>2</sub> (CPD - critical point drying). Com a câmara isolada, em um volume de etanol absoluto ou acetona, injetou-se o CO<sub>2</sub> líquido, fazendo-se várias substituições até remoção total do etanol ou acetona, esta troca ocorreu entre 0 e 5°C. Após a retirada de solvente a amostra é levada para câmara e então, despressurizada até pressão atmosférica, após, amostra foi montada em um suporte metálico e metalizada para ser observada no microscópio eletrônico de varredura. Um outro teste também foi feito no preparo das amostras do caule inferior das plântulas de TST e CTSW, já que essas amostragens já teriam passado pelo processo de liofilização e estavam guardadas em -80°C. Houve um recobrimento da parte de interesse (onde houve a inoculação do oomiceto *Phytophthora nicotianae*), esse recobrimento foi feito por deposição de íons metálicos de ouro (Au).

Neste processo, as amostras foram colocadas em uma câmara com pressão em torno de 0,1 a 0,05 mbar e o alvo metálico foi bombardeado com átomos de gás inerte como, por exemplo, argônio. Os átomos do alvo foram depositados sobre a amostra. As máquinas utilizadas para esta finalidade são denominadas metalizadoras e oferecem como parâmetros de ajuste: corrente aplicada (em mA), tempo de deposição e altura da amostra em relação ao alvo, a fim de que seja

calculada a espessura do metal depositado, o tempo para o recobrimento em cada amostra foi de 30 minutos.

Os recobrimentos metálicos utilizados por estes procedimentos visam apenas tornar as amostras condutoras de modo a gerar imagens com boa resolução no MEV, portanto, é preciso um controle da espessura depositada a fim de evitar artefatos na imagem que podem mascarar a superfície real da amostra.

#### **4.4.5.9. Quantificação das substâncias nas raízes, caule inferior e folhas de TST e CTSW**

Na validação do método analítico para a quantificação das piranocumarinas angulares e lineares, flavonoides glicosilados nas plântulas de TST e CTSW foi necessária uma seleção de métodos para a construção de suas curvas de calibração, onde a quantificação foi feita para algumas amostras que continham padrões analíticos e as demais substâncias que variaram dentro do perfil químico estudado das demais partes dessas plântulas, foi feito uma análise comparativa de suas áreas relativas, para observação da variação de concentração (possíveis produção e/ou consumo) de metabólitos.

O equipamento utilizado para o trabalho de quantificação das amostras foi um cromatógrafo Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) configurado com degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, auto-injetor G1329A, forno de coluna G1316A e detector de ultravioleta G1314B (FIGURA 4.10). Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna C18 ZORBAX XDB™ (4,6 x 150mm, 5 µm da marca Agilent). Para prevenir a entrada de interferentes que poderiam diminuir o desempenho e até mesmo entupir a entrada das colunas, foi usada uma coluna de guarda ligada à entrada principal, sendo esta do tipo C18 (4x3 mm), também da Agilent.



FIGURA 4. 10 -Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Agilent 1200 acoplado ao espectrômetro de massa tripla quadrupolo com detector de UV.

As análises cromatográficas foram realizadas no modo reverso de eluição, com um sistema gradiente. A fase móvel composta por uma mistura de água e acetonitrila (60:40, v/v), com uma vazão de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , aumentando para 10 % de água e 90 % de acetonitrila em 30 minutos, em seguida aumentando para 100 % de acetonitrila por 5 minutos. Essa proporção foi mantida por mais 5 min e voltou-se as condições iniciais em 2 min. Em seguida a coluna foi reequilibrada em torno de 20 minutos nas condições iniciais, antes de iniciar uma nova análise. A temperatura da coluna foi mantida em  $35^\circ\text{C}$  e o volume de injeção de cada padrão foi de  $10,0 \mu\text{L}$  e comprimento de onda de detecção fixado em 264 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  absorção) para as análises das cumarinas xantiletina, seselina e 5-metoxiselina. As bandas cromatográficas referentes às cumarinas foram determinadas através de comparação do tempo de retenção obtido analisando a solução dos padrões. Para a quantificação da hesperidina, a otimização da temperatura da fonte foi feita na maior proporção da fase aquosa com condições iniciais de 90 % de água e 10 % de acetonitrila, como descrito no item 4.4.5.4. De acordo com parâmetros utilizados no método para a identificação do mesmo.

A vazão utilizada foi de  $1 \text{ mL} / \text{min}$ . A fonte de ionização operou nesse caso, no modo negativo, devido as características químicas da molécula. Um dos flavonoides identificados por LC-MS<sup>E</sup> tinha como transição 609/301. O controle do equipamento HPLC-UV, aquisição e processamento dos dados foram realizados pelo

software Analyst®1.5.1 (Applied Biosystems). O objetivo dessa parte do estudo, foi avaliar comparativamente as concentrações de variação dessas cumarinas e os flavonoides em plântulas doentes (aquelas que mais sofreram diferença dentro do estudo) de *Citrus sinensis* nos porta enxertos de Tangerina Sunki Tropical (Susceptível) e Citrumelo Swingle (Resistente) ao oomiceto *Phytophthora nicotianae* em suas raízes, caule inferior e na parte superior, a copa (as folhas de laranja Valência - enxerto) em amostras de comparação de perfil químico em citros sadios e infectados pelo oomiceto causador da doença Gomose.

#### **4.4.5.10. Quantificação das substâncias no caule superior de TST e CTSW**

Para a quantificação das demais substâncias encontradas por exemplo, no caule superior dos citros não foram construídas curvas de calibração, sendo realizada apenas uma análise comparativa. Pode-se verificar que os extratos dos diferentes tratamentos apresentaram uma diferença pequena tanto quantitativa quanto qualitativamente nas bandas referentes às cumarinas e flavonoides. Para comprovar se houve um aumento ou diminuição na quantidade, obteve-se, a partir do software do equipamento, a área de cada pico referente à substância de interesse que estava variando e calculou-se a área relativa entre eles. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, logo calculou-se a média dos tempos de retenção e das áreas dos picos dos extratos semelhantes e comparativos. As amostras do caule superior de TST e CTSW sadias (controle) e infectadas (inoculada com o oomiceto) foram preparadas e analisadas de acordo com o item 4.4.5.5 e 4.4.5.6.

#### **4.4.6. Preparação das soluções padrões para a construção da curva de calibração**

A validação dos métodos foram realizados, seguindo as instruções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), observando alguns parâmetros como estabilidade da amostra, seletividade do método, a recuperação, o efeito da matriz, os limites de detecção, a quantificação (LOQ), linearidade e precisão.

Para a quantificação das cumarinas e do flavonoide foi preparada para cada amostragem de interesse uma solução estoque, dissolvendo com precisão em torno de 1mg de amostra padrão de xantiletina, seselina, 5-metoxiselina e hesperidina em 10,0 mL de MeOH (J.T. Baker, grau LC-MS) em um balão volumétrico de 10,0 mL (Pyrex®) para cada amostras e armazenadas a -5°C. A solução estoque preparada apresentou concentração nominal de 1000 µg mL<sup>-1</sup> e a faixa linear de trabalho foi estabelecida entre 1,00 e 100 µg mL<sup>-1</sup>. Com as soluções padrão de cada amostra, foram preparadas soluções de trabalho para a construção das curvas de calibração. As soluções de trabalho foram preparadas nas seguintes concentrações: 1,00; 2,50; 5,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100 µg mL<sup>-1</sup>. Todas as soluções de trabalho para as curvas foram preparadas em triplicatas.

As soluções foram utilizadas para construir a curva de calibração e avaliar a linearidade, intervalo dinâmico linear, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método. Também foram preparadas, outras três soluções padrões de xantiletina, seselina, 5-metoxiselina e hesperidina (1,20; 50,0 e 95,0 µg mL<sup>-1</sup>) para cada substância e preparadas independentemente em quintuplicata, a partir da solução estoque de cada amostra (1000 µg mL<sup>-1</sup>), seguindo o procedimento descrito anteriormente. Essas três soluções de trabalho representaram o controle a baixa, média e alta qualidade (LQC, MQC e HQC, respectivamente), usados para avaliar a exatidão e precisão do método.

Com a linearidade da curva de calibração foi possível obter o cálculo da análise da regressão linear, mediante a integração das bandas cromatográficas das cumarinas (xantiletina, seselina e 5-metoxiselina) e do flavonoide (hesperidina) nas diferentes concentrações avaliadas versus a concentração nominal e para isso usou-se, a metodologia linear dos mínimos quadrados. Nas amostras quantificadas até o momento, foram utilizadas nove concentrações diferentes de 1,00 a 100 µg mL<sup>-1</sup>, com três repetições para cada valor. A regressão linear ponderada foi aplicada para minimizar a variância desigual dos valores mais elevados. A linearidade foi avaliada por meio dos coeficientes linear de correlação (R<sup>2</sup>), além das análises dos respectivos fatores de resposta, que é área do pico dividida pela concentração de cada uma da amostra padrão.

O limite de quantificação foi obtido diluindo a solução estoque dos

padrões das amostras (1000 µg mL<sup>-1</sup>) até observar uma relação sinal/ruído (S/N) de 10. Em relação ao limite de detecção (LOD), foi utilizada uma proporção de três vezes a relação sinal/ ruído. Quanto a precisão, esta foi avaliada para cada amostra de interesse, como intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Analisadas em quintuplicata, as soluções de controle de qualidade nas concentrações baixas, médias e altas (1,20; 50,0 e 95,0 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente), com relação à curva de calibração de cada substância, foram preparadas e utilizadas como padrões para avaliação. Com o desvio padrão relativo (RSD), foi possível avaliar a precisão, utilizamos um dia dos resultados para avaliar pela repetibilidade e três dias consecutivos foram utilizados pela precisão intermediária. A exatidão foi medida aplicando o método de quantificação às amostras e avaliando a porcentagem de tendência. As concentrações das amostras foram as mesmas usadas na determinação da precisão.

#### **4.4.6.1. Análises estatísticas das quantificações**

Para confirmação da validação do método analítico, foi realizado análise de variância de um único fator (ANOVA) com os dados da regressão linear para avaliar o significado do método de proposta. A significância estatística foi definida em  $p$ -valor < 0,05, indicando que o modelo é explicado pela regressão proposta em um intervalo de confiança de 95%

# *Resultados*

## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Avaliação da produção metabólica do oomiceto *Phytophthora nicotianae* em diferentes meios de cultivos**

Os seres heterotróficos necessitam de nutrientes para se manterem vivos, assim podem promover o seu crescimento, substituir os constituintes celulares, suprir a demanda energética necessária para as reações metabólicas e promover o seu movimento celular. Como os microrganismos não produzem por si só seu próprio alimento, eles retiram esses nutrientes do meio de cultivo utilizado para seu crescimento e quando se varia essa composição, cada fungo, oomiceto ou bactéria pode se comportar de uma forma totalmente diferente, variando assim, seu crescimento micelial, sua esporulação e/ou pigmentação do microrganismo.

Em busca então de melhores meios de cultivos para o crescimento e extração de metabólitos secundários que permitisse conhecer um pouco o perfil químico do patógeno, foi feito estudos de crescimento micelial em meios sólido e líquido, onde foi selecionado cinco meios de cultivo diferentes, CM, CE, BD, AV e CZP para o screening inicial do perfil químico do oomiceto. Para certificar que os metabólitos encontrados em cada meio eram produzidos pelo pseudofungo e não pelo meio de cultivo estudado, foi feito um estudo comparativo entre os extratos e seus respectivos brancos. As análises foram feitas comparando-se sinais nos espectros de RMN (vide anexo) e pelo perfil cromatográfico, observando o tempo de retenção de cada banda de absorção no UV que foi obtida via HPLC-DAD e HPLC-UV.

Primeiramente, como tratava-se de um patógeno ainda não estudado, foi feita uma varredura de comprimentos de onda, pois não se conhecia as possíveis classes de substâncias que esse oomiceto podia produzir. Utilizou-se um detector de arranjo de diodo (DAD) para todos os extratos dos meios citados acima. Foi feito análises inicialmente em três comprimentos de onda 254nm, 280nm, 330nm, onde após as análises foi possível escolher para dar continuidade aos estudos um comprimento de onda fixo, que foi o de 254nm, pois o mesmo apresentou um perfil cromatográfico mais diversificado, em relação a quantidade de bandas que se diferenciaram dos meios de cultivos utilizados como controle.

De acordo com comparações feitas com análises realizadas em um estudo de crescimento micelial de fungos pela rede SISBIOTA – “ Bioprospecção de fungos sapróbios no PPBIO/ semi-árido nordestino para o controle de doenças infecciosas em plantas: indução de resistência” , o fitopatógeno *P. nicotianae* tanto no procedimento de microextração (placas de petri em meio sólido) quanto em meio líquido (erlenmeyer), obteve-se resultados bem aproximados em relação ao crescimento micelial do oomiceto em meio de aveia-ágar (AVA) seguido do meio CMA, CEA, BDA e por último o meio CZPA, o qual apresentou um crescimento bastante reduzido (FIGURA 5.1). Adicionalmente, as hifas são menos abundantes e seu crescimento assemelha-se a um crescimento de um leveduriforme.

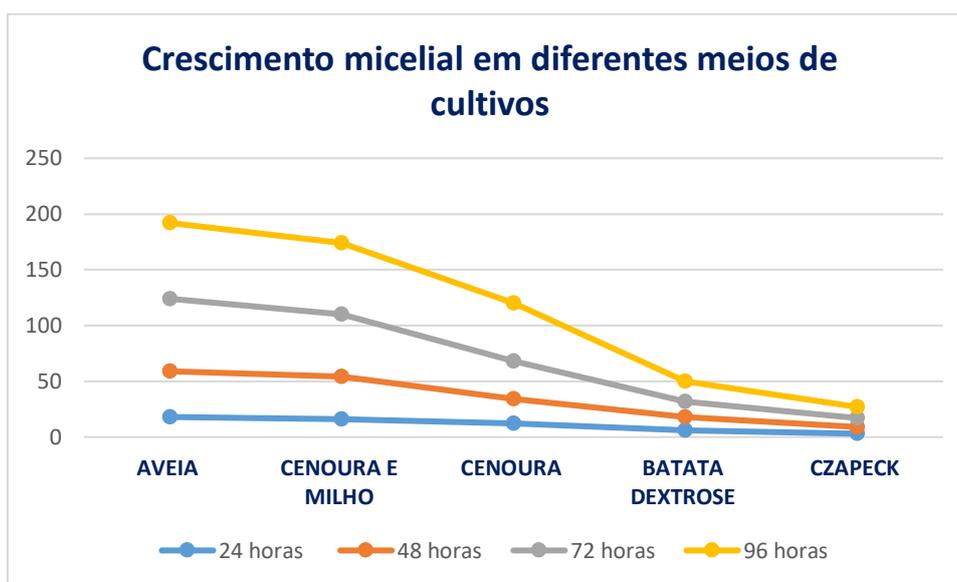


FIGURA 5. 1 - Dados estatísticos do crescimento micelial em meio sólido de *P.nicotianae* monitorado até 96 horas nos diferentes meios de cultivo.

Todas as amostras foram feitas em quintuplicata e foi possível observar que para o crescimento micelial o meio de aveia-ágar e cenoura-milho ágar foram os que apresentaram maior massa micelial. No entanto, isso não significa que será o meio de cultivo que produzirá maior quantidade de metabólitos secundários.

De acordo com o comparativo dos ensaios em microescala do crescimento do fungo em diferentes meios de cultivos (batata, cenoura, cenoura e milho, aveia, czapek e czapek enriquecido com glutamina) e o cultivo em meio líquido, deixou-se crescer tanto em meio estático, quanto com agitação o microrganismo por um período de 21 dias com a temperatura controlada em 28°C, para decidir em qual

condição de meio de cultivo o oomiceto desenvolvia-se melhor, obtendo-se então o meio de cenoura e milho o mais eficaz, com crescimento micelial abundante como ilustrado na FIGURA 5.2 e sendo confirmado com a análise do seu extrato na fração acetato de etila por RMN de próton FIGURA 5.3.

O “pseudofungo” apresentou sinais em ampla região espectral ( $\delta_H$  1,0 a  $\delta_H$  8,5 ppm), apontando para a presença de hidrogênios ligados a carbonos  $sp^2$ , assim como hidrogênios em região mais blindada que indica a presença de possíveis grupos alifáticos, na comparação entre os espectros do meio sem o oomiceto versus com o oomiceto, onde mostra um possível perfil químico interessante de *P.nicotianae*, enquanto que no meio de cultivo de aveia, a princípio ao analisar os seus espectros dos extratos brutos e de suas frações de acetato de etila por RMN (vide anexo) fazendo um comparativo direto entre meio usado como controle e o meio com o oomiceto, observou-se bastante sinais de maiores intensidades, principalmente nas regiões entre 4,5 a 5,5 ppm e uma ausência de sinais na região do aromático em 6,0 a 6,5 ppm, deixando a princípio uma dúvida em qual meio de cultivo trabalhar, mas quando pensou em ampliação da escala, esse meio traria bastante trabalho, por dois motivos, o oomiceto não era bem visto em seu crescimento no meio de cultivo, pois ambos são de coloração enbranquecida, após autoclavados os meios líquidos com o passar dos dias de crescimento esse cultivo ficava bastante pastoso, onde se teve muita dificuldade em microescala na separação do micélio e de seu meio fermentado (com os possíveis metabólitos), assim foi decido trabalhar com o meio cenoura-milho em larga escala no intuito de ter em mãos mais massa para posteriores estudo analítico de separação por CLAE, identificação por RMN e confirmação por LC-MS e o isolamento desses possíveis metabólitos.

**ESTUDO QUÍMICO DE *PHYTOPHTHORA NICOTIANAE* E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE *CITRUS SINENSIS*.**

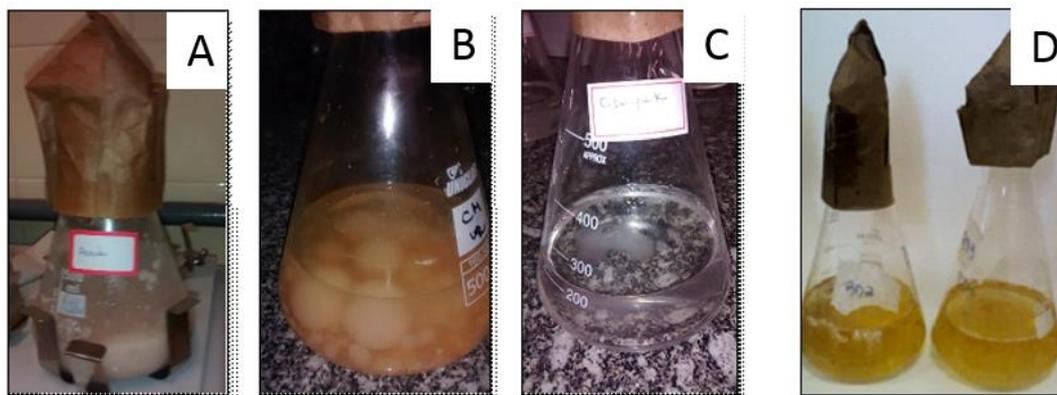


FIGURA 5. 2 - Crescimento em meio líquido dos diferentes meios de cultivos de *P.nicotianae*. A) meio de aveia; B) meio de cenoura e milho; C) meio de czapek; D) meios de batata dextrose e cenoura.

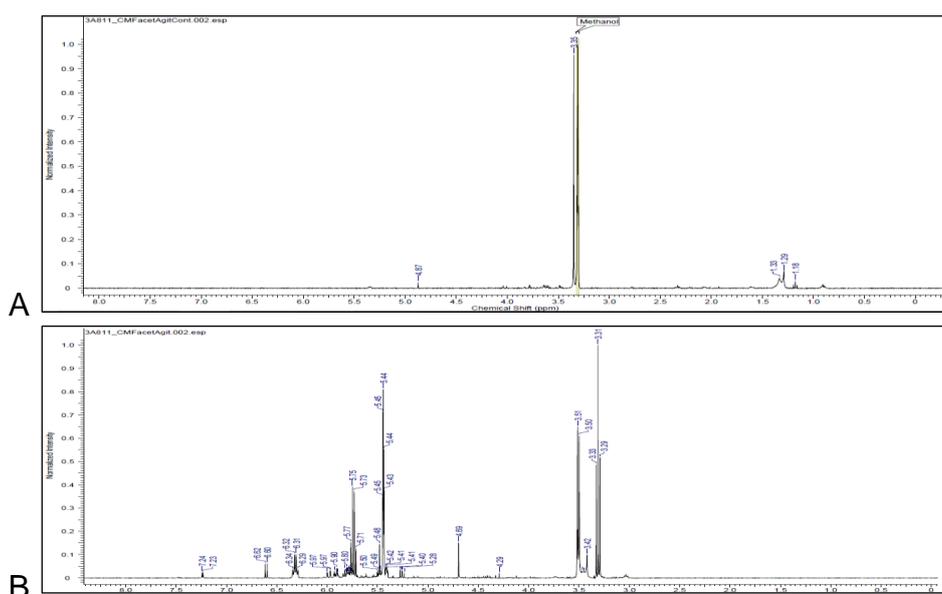


FIGURA 5. 3 - Espectro de RMN 1H (MeOD, 400 MHz) da fração acetato de etila do meio líquido de cultivo cenoura e milho (CM). A) Meio de cultivo sem o oomiceto; B) meio de cultivo com o oomiceto.

## 5.2. Crescimento do oomiceto *P.nicotianae* em larga escala para otimização de metodologia para isolamento e identificação de metabólitos secundários

O oomiceto *P. nicotianae* foi cultivado em meio líquido de cenoura e milho, meio este rico em nutrientes e betacaroteno, em escala ampliada para a obtenção do extrato bruto. O cultivo foi feito em erlenmeyers de 1000 mL, os quais foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C, sob pressão de 1 atm por aproximadamente 20 minutos com o meio de cultura. Em seguida foram adicionados aos frascos 8 discos de 5 mm de diâmetro das extremidades da colônia, que

permaneceram em repouso, a uma temperatura de 27°C. Após o período de crescimento (21 dias) de incubação, foi realizada a coleta da massa micelial através da filtração a vácuo, utilizando-se papel de filtro para tirar excesso de umidade. O desenvolvimento do micélio nesse meio de cultivo foi bastante significativo, apresentando um rendimento de massa seca de micélio em torno de 0,7642g quando comparado aos demais meios de cultivos para o crescimento, indicando um aumento de quase 3 vezes. Essa massa seca ao ar foi transferida para um erlenmeyer contendo metanol onde ficou em repouso por aproximadamente 4 horas, depois desse intervalo de tempo a massa micelial foi triturada em Ultraturrax (triturador elétrico), onde permaneceu em repouso durante 48 horas. Depois de submetido à filtração a vácuo, o extrato metanólico do micélio foi concentrado e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

O meio líquido fermentado e separado do micélio por filtração foi particionado com acetato de etila e butanol e seus respectivos extratos analisados por CLAE. Após serem analisadas, as condições cromatográficas para as partições líquidas foram otimizadas, chegando a seguinte condição: Coluna- ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, 5µm - Gradiente 5%- 95% 50min ACN/H<sub>2</sub>O. De acordo com o sistema de eluição descrito na TABELA 2 no HPLC –UV.

E de acordo com o cromatogramas da FIGURA 5.4, verificando algumas diferenças entre o meio com e sem o oomiceto, partiu-se então para o isolamento de frações no HPLC-UV.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

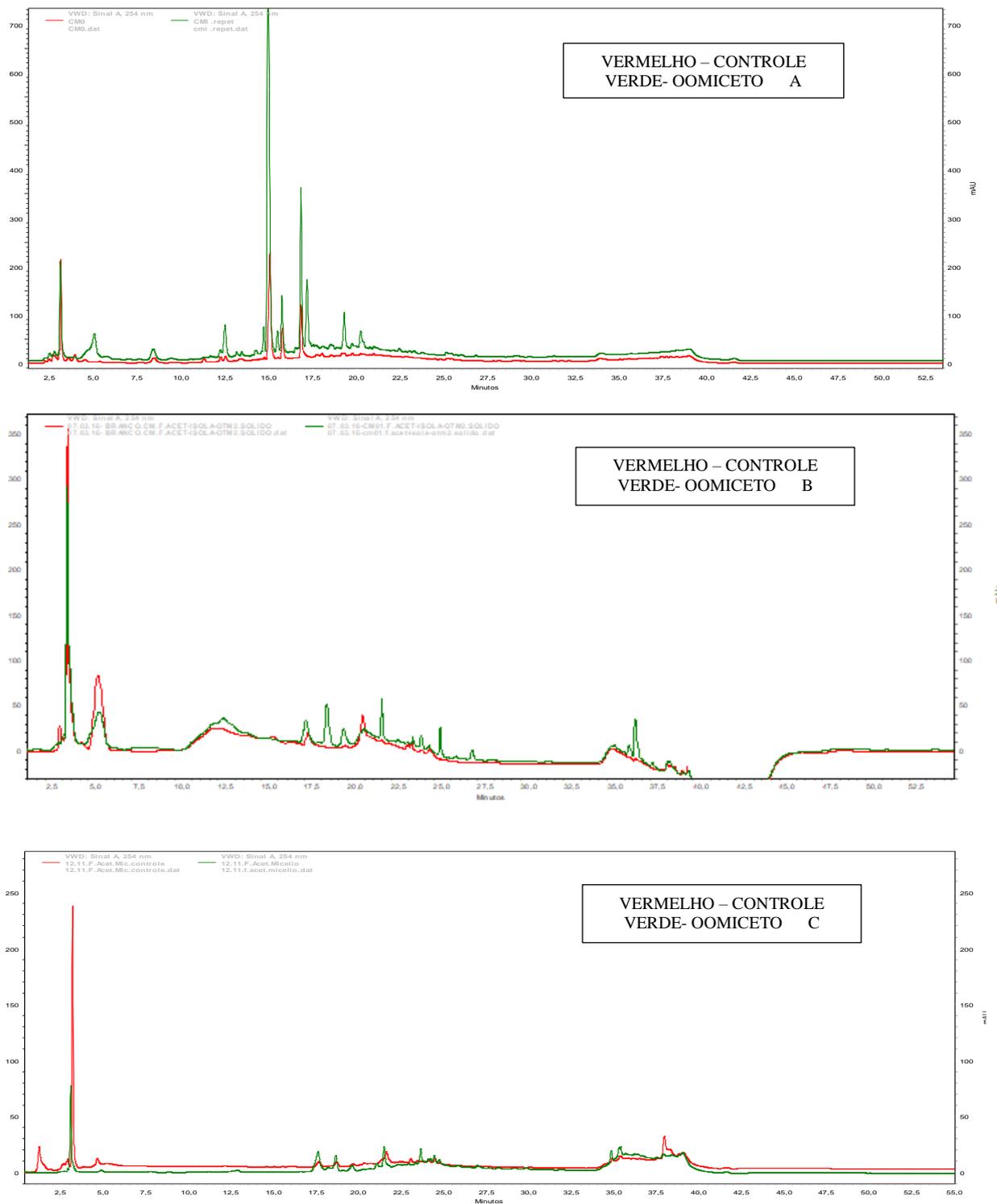


FIGURA 5. 4 - Plotagem do cromatograma comparativo do meio CM da Fração Acetato de etila – A) meio líquido; B) meio sólido e C) meio com o micélio da fração etanólica. Linha vermelha – extratos somente com meio de cultivo; Linha verde – extratos com o meio de cultivo e oomiceto.

De acordo com a FIGURA 5.4, a fração acetato de etila do micélio do meio de cultivo de cenoura e milho (CM) não se diferenciou do meio sem o patógeno,

evidenciando que os possíveis metabólitos foram excretados para o meio líquido fermentado, logo o isolamento foi direcionado para a fração de acetato de etila no cultivo de CM do oomiceto em meio líquido, já que o mesmo quando comparado com o meio sólido são bem parecidos em relação ao perfil químico produzido com o oomiceto. As demais frações também não mostraram diferenças significativas quando comparados ao meio de controle com o meio com o inóculo de *Phytophthora* (vide anexo).

Verificando algumas diferenças entre o meio com e sem o patógeno de acordo com a FIGURA 5.4 A e B, partiu-se então para o isolamento manual no HPLC-UV. Utilizou-se cartuchos de SPE C18 500mg/6mL, com uma massa de aproximadamente 50 mg de extrato bruto e sistema de condicionamento com 1 mL de metanol, limpeza com 1 mL de água, e sucessivas lavagens com água/metanol, obteve-se uma massa de 23,4 mg de amostra que foi ressuspensa nas condições iniciais da corrida cromatográfica (5% ACN: 95% H<sub>2</sub>O). Como se tratava de um HPLC analítico foram necessárias aproximadamente 60 injeções, na tentativa de concentrar o máximo de massa, para que assim obtivéssemos uma maior concentração em massa desse material e em seguida levar para análises via Ressonância Magnética Nuclear (RMN), porém em todas as tentativas de isolamento e identificação de suas bandas coletadas, sempre se teve problemática com a quantidade dessa massa e principalmente das bandas não estarem totalmente puras. Na primeira tentativa, as amostras foram levadas ao RMN, 600 MHz com o auxílio de criosonda de a sensibilidade do equipamento chega a 900 MHz, e o que foi possível observar que nas bandas coletadas tinham muitas impurezas e essas em relação a intensidade chegavam próximas as intensidades das possíveis substâncias de interesse, tornando assim impossível a caracterização e identificação de tais compostos. Em seguida, continuou-se na tentativa de uma melhor purificação dessas frações e uma maior quantidade de massa para as posteriores análises. Com uma nova fração de acetato de etila com massa 19,46 mg, essa fração foi preparada e levada para HPLC preparativo e monitorado alguns comprimentos de onda em DAD. Foram traçados em torno de oito bandas cromatográficas para posterior isolamento como mostra a FIGURA 5.5.

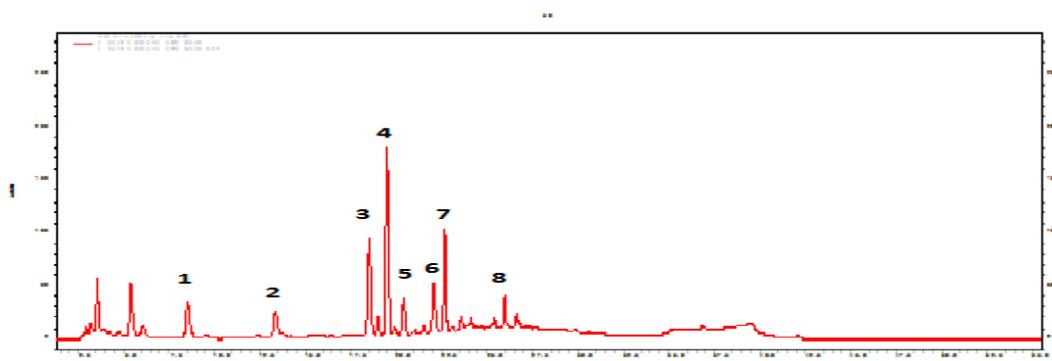


FIGURA 5. 5 - Cromatograma para trapeamento dos picos em meio de cultivo cenoura e milho com a presença do oomiceto *Phytophthora nicotianae*.

O composto isolado e identificado 1 (FIGURA 5.6) referente à banda 3 cromatográfica (FIGURA 5.5.), foi isolado a partir da coleta da subfração entre a região 3 e 4 e teve a sua estrutura determinada baseada em experimentos de RMN 600 MHz (com criosonda) 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), 2D (COSY, HSQC, HMBC) e com experimentos de LC-MS<sup>E</sup>. O pico 3 coletado não estava puro e foi possível observar presença de compostos minoritários em seu espectro 1D de  $^1\text{H}$ , provavelmente apresentam três substâncias, às quais duas delas não foi ainda possível a identificação. No espectro do RMN  $^1\text{H}$  podem-se observar um singleto em 8.4 ppm que integra a um próton, típico de um fenol. Na região do espectro correspondente aos deslocamentos químicos de prótons aromáticos aparecem sete sinais deslocados da seguinte forma: em  $\delta_{\text{H}}=7.42$  ppm aparece um dubleto que integra a um próton com constante de acoplamento de 7.5 Hz, assim como em 7.36 (td,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 7.15 (td,  $J=7.5\text{Hz}$ ) e 7.0 (d,  $J=7.8\text{Hz}$ ). Os dados RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 5.7).

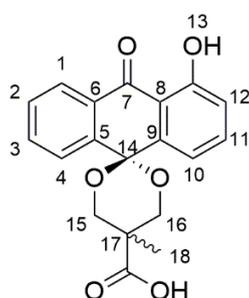


FIGURA 5. 6 - Composto isolado da fração de acetato de etila do meio de cultivo CM do oomiceto *Phytophthora nicotianae* da classe das Antronas.

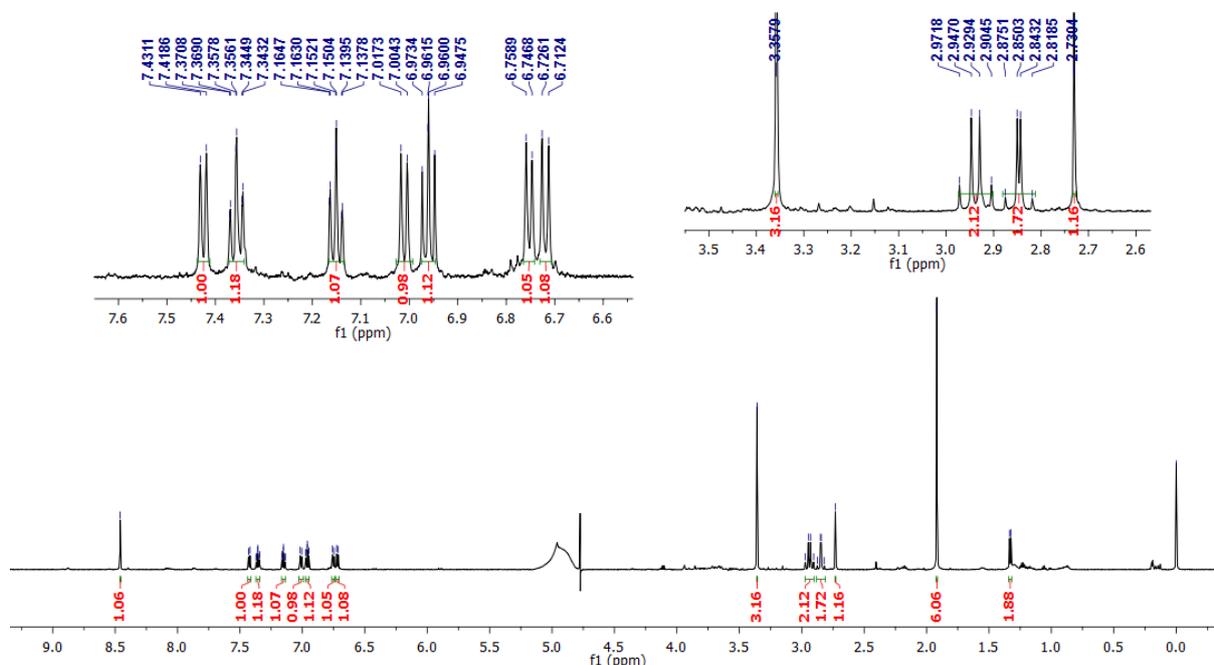


FIGURA 5. 7 -Espectro de RMN <sup>1</sup>H- 600 MHz (D<sub>2</sub>O), com sua ampliação na região aromática do pico três da fração de acetato de etila do oomiceto desenvolvido em meio de cultivo de CM.

O composto foi isolado como um óleo de cor amarela bem clara. Sua fórmula molecular determinada pelo LC-MS<sup>E</sup> foi de C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> que indica a presença de doze insaturações (calculado pelo índice de deficiência de hidrogênio). No espectro de massas foi detectado o ion molecular *m/z* 341,2686 no modo positivo de ionização [M+H]<sup>+</sup> e *m/z* 339,2013 no modo negativo de ionização [M-H]<sup>-</sup>. No espectro de RMN <sup>13</sup>C, foram detectados treze sinais de carbono distribuídos do seguinte modo: na região dos carbonos com hibridação sp<sup>2</sup> aparecem oito sinais na região de 110 até 174 ppm que demonstram a presença de dois anéis aromáticos, e ao carbono em 174 ppm a presença de uma carbonila de um ácido carboxílico. Seguidamente aparecem três sinais na região de menor deslocamento químico que correspondem a carbonos com hibridação sp<sup>3</sup>. Com os valores da constante de acoplamento e com o auxílio do experimento COSY foi possível estabelecer que estes sinais acoplam entre si e formam parte de um mesmo anel aromático, sendo os deslocamentos químicos de 7.42 e 7.15 ppm correspondentes aos prótons H-1 e H-2 vizinhos e no caso de 7.36 e 7.0 ppm aos prótons de H-3 e H-4. De forma similar, o mesmo acontece com os outros

sinais em 6.75, 6.96 e 6.72 ppm pertencendo aos H-10, H-11 e H-12, respectivamente e que apresentam acoplamentos entre si, como mostra a FIGURA 5.8.

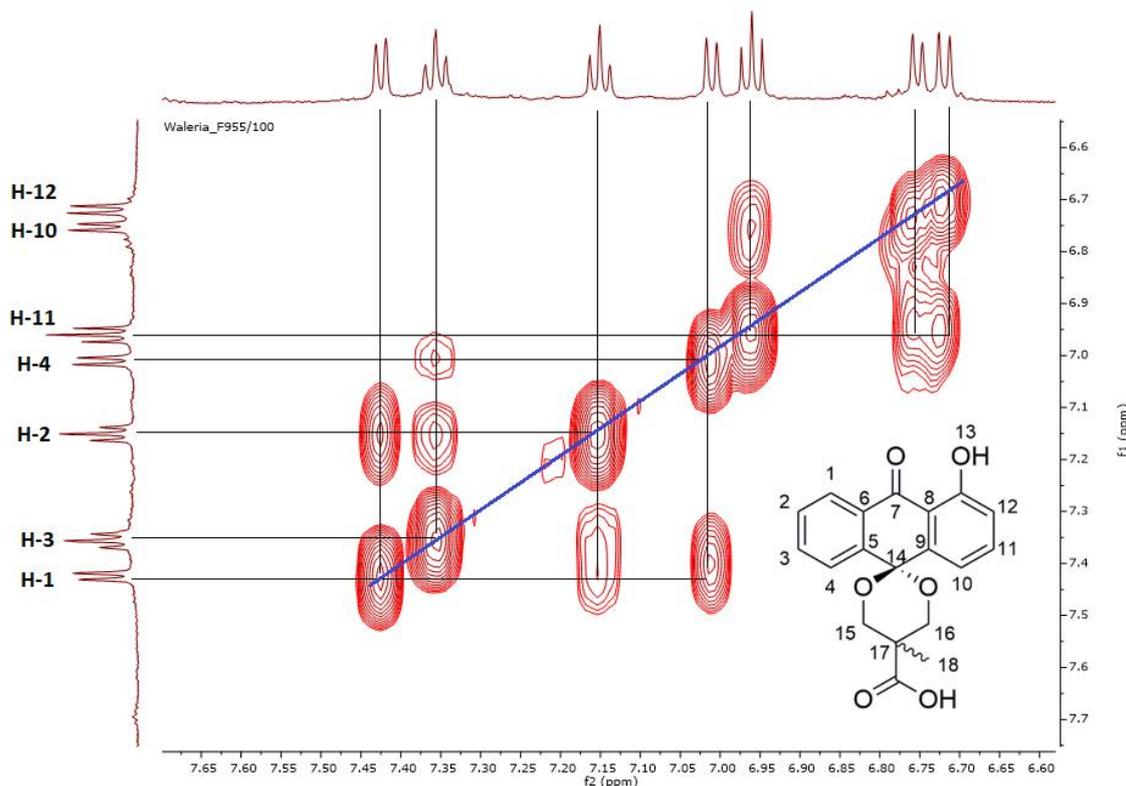


FIGURA 5. 8 - Mapa de correlação COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz) da antrona do composto 1.

Através dos experimentos bidimensionais  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e HMBC foi possível determinar valores de hidrogênio e carbonos ligados diretamente, e/ou a uma, duas e até três ligações de distância conforme apresentados na TABELA 5.1. No caso do  $\delta_{\text{H}}$  2.86 e 2.83 (H-16a e H-16b) pode ser observado que ambos os sinais integram a um próton e a constante de acoplamento de 14.9 Hz estão acoplado com o carbono de deslocamento químico em 46.6 ppm, assim com  $\delta_{\text{H}}$  2.96 e 2.91(H-15a e H-15b) que correspondem com o carbono  $\delta_{\text{C}}$  46.8 ppm. Estes sinais, são o indicativo da presença de um centro estereogênico vizinho a ambos os carbonos e sugere que os prótons sejam diastereotópicos e apareçam em diferente deslocamento químico e com constante de acoplamento altas, típicas de acoplamentos geminais.

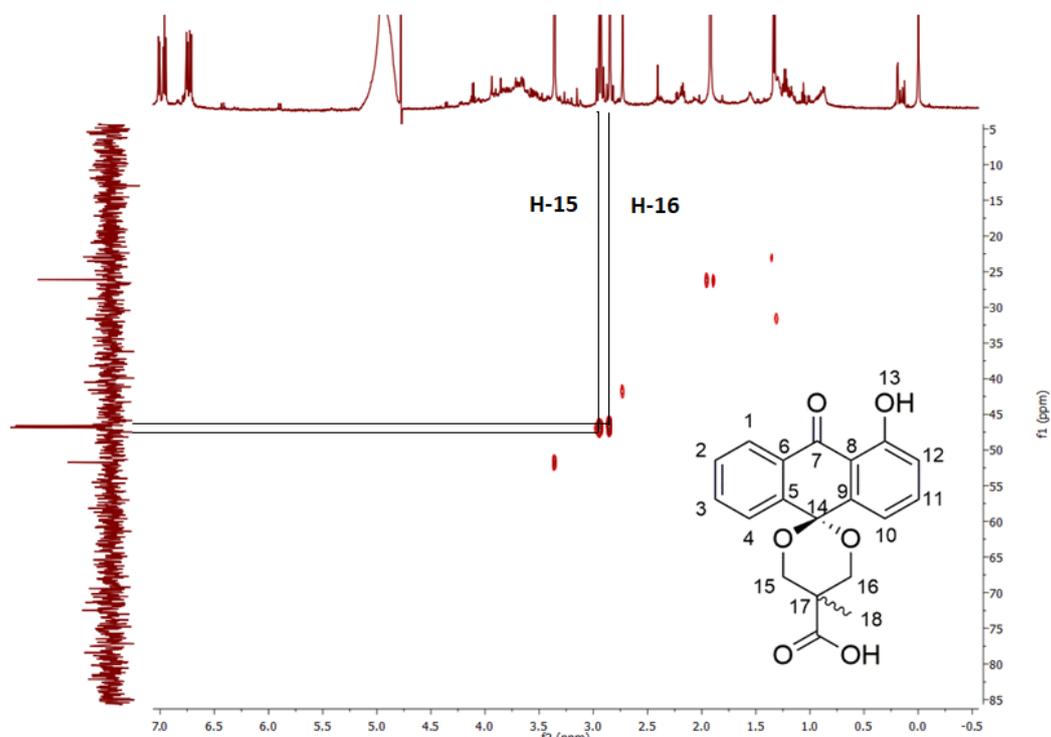
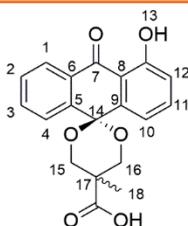


FIGURA 5. 9 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz) da antrona do composto 1.

Com ajuda do experimento do HMBC, foi possível estabelecer a correlações a mais de duas ligações entre carbono e hidrogênio (vide TABELA 5.1). De igual modo, foi possível detectar carbonos quaternários que não aparecem no espectro, mais que apresentam acoplamentos com hidrogênios a mais de duas ligações. Tal é o caso do carbono espiro (C-14), que acopla com os prótons H-15 e H-16. Outros destes carbonos não aparecem nos espectros, devido a pequena quantidade de massas obtida para este composto.

TABELA 5. 1 - Correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e HMBC para o composto 1, referente ao pico 3.



Posição	$^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ =ppm)	HSQC $\delta_{\text{H}}$ (J/Hz)	HMBC ( $\delta_{\text{H}}$ =ppm)
19	173.9	-	2.86, 2.83, 2.96,2.91
3	132.9	7.36, td, 7.8 Hz	7.42, 7.0
11	127.3	6.96, dd, 8.2; 7.3 Hz	-
1	126.5	7.42, d, 7.5 Hz	7.36
2	126.1	7.15, td, 7.5 Hz	7.0
12	122.5	6.72, d, 8.2 Hz	6.75
10	114.4	6.75, d, 7.3 Hz	6.72
4	113.7	7.0, d, 7.8 Hz	7.15
15	46.8	2.86, 2.83, 2xd, 14.9 Hz	-
16	46.6	2.96, 2.91, 2xd, 14.9 Hz	-
18	26.1	1.92	-

Além dos resultados obtidos pela análise dos experimentos de RMN, a espectrometria de massas de alta resolução foi de vital importância, para a confirmação dessa estrutura. O espectro de massas obtido para este composto possibilitou a detecção do íon molecular  $m/z$  341 indicando a presença da molécula protonada, como mostra a FIGURA 5.10. No espectro de  $\text{MS}^2$  para este composto mostrou dois íons com fragmentos intensos,  $m/z$  151 e 133. As propostas para produzir os dois íons estão ilustradas na FIGURA 5.11.

***ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.***

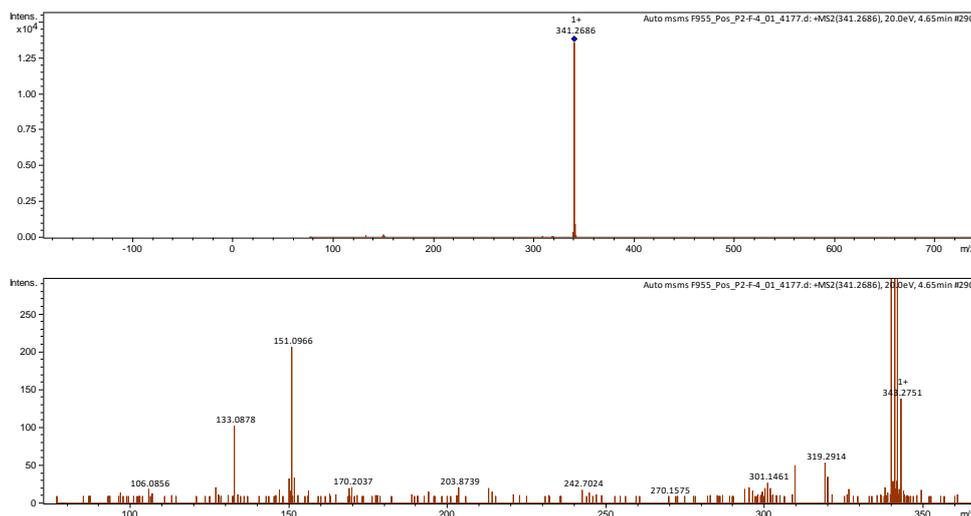


FIGURA 5. 10 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  341,2686 no tr 4,65 min encontrado no composto 1 referente ao pico 3 da fração de acetato de etila em meio de CM de *P.nicotianae* (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da antrona (acima).

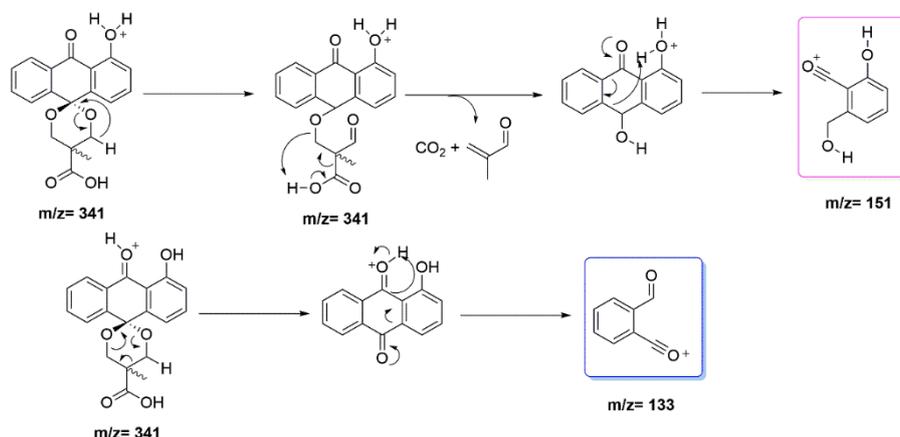


FIGURA 5. 11 - Proposta para a fragmentação da antrona (ESI, positivo).

A determinação da estrutura do composto 2 (FIGURA 5.12), foi feita de modo similar a análise para o composto 1, pois ambos apresentam estruturas similares. Neste caso, o composto também foi isolado e possui uma coloração amarela e sua fórmula molecular proposta pelo LC-MS<sup>E</sup> foi C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>. No espectro de massas no modo negativo foi detectado o íon molecular  $m/z$  305 [M-H]<sup>-</sup>. No espectro do RMN <sup>1</sup>H, pode-se observar um singleto em 8.5 ppm, como já havíamos mencionado, onde o mesmo é característico de um fenol. Na região aromática do espectro aparece dois dubleto em  $\delta_H$  6.97 e 6.73 ppm ( $J= 6.0$  Hz) que indica a disposição meta destes prótons no anel aromático, assim também aparece um triplete que integra a um próton em  $\delta_H$  6.97 ppm ( $J= 6.0$  Hz) que também forma parte do

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

mesmo sistema de spins. Na parte de menor deslocamento químico aparecem dois sinais em  $\delta_H$  2.70 e 2.42 ppm que integram a um próton cada um, com constante de acoplamento de 12 Hz, característico de acoplamento germinal em prótons ligados a carbonos  $sp^3$ , como mostra a FIGURA 5.13. O experimento  $^1H$ - $^1H$ -COSY ratificou que os três sinais aromáticos têm acoplamentos entre si e formam parte de um mesmo anel aromático.

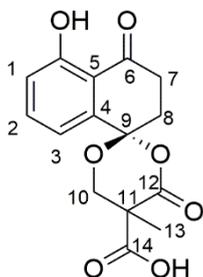


FIGURA 5. 12 - Composto 2 isolado da fração de acetato de etila do meio de cultivo CM do oomiceto *Phytophthora nicotianae* da classe das Antronas.

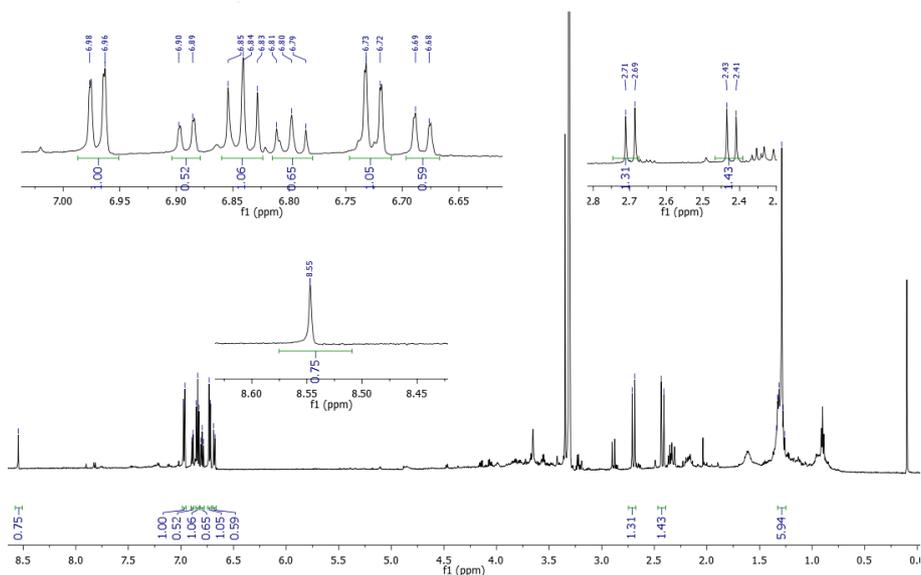
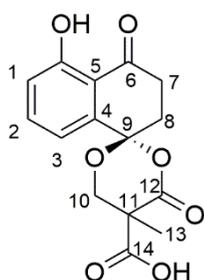


FIGURA 5. 13 -Espectro de RMN  $^1H$ - 600 MHz (MeOD), com sua ampliação na região aromática do composto do pico 5 da fração de acetato de etila do oomiceto desenvolvido em meio de cultivo CM.

Os experimentos bidimensionais de HSQC e HMBC facilitaram o estabelecimento das conectividades diretas e a mais de duas ligações, respectivamente, entre carbonos e próton da estrutura (TABELA 5.2). Tem-se um fato de muito interesse a presença do carbono spiro no deslocamento de carbono em 74.9 ppm e a suas conectividades a mais de duas ligações com os prótons diastereotópicos

H-10a e H-10b. Do mesmo modo, também foi relacionado um sinal em 133.5 ppm, de um outro carbono quaternário que apresenta acoplamento heteronuclear a longa distância com os prótons mencionados anteriormente, assim como o próton  $\delta_H$  6.84 do sistema aromático. Os restantes dos carbonos quaternários não aparecem no espectro e não podem ser correlacionados, devido sua pouca quantidade de massa isolada para este composto em torno de 1mg. Infelizmente isto também impossibilitou a realização dos espectros de NOESY-2D para determinar a configuração relativa dos substituintes em C-11, como é ilustrado no mapa de contorno na FIGURA 5.14.

TABELA 5. 2 - Correlação  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC e HMBC para o composto 2, referente ao pico 5.



Posição	$^{13}C$ ( $\delta_C$ =ppm)	HSQC $\delta_H$ (J/Hz)	HMBC ( $\delta_H$ =ppm)
14	179.5	-	2.70, 2.42
12	176.8	-	2.70, 2.42
4	133.5	-	6.84, 2.70, 2.42
2	122.9	6.84, d, 6.0 Hz	6.73
1	115.9	6.73, d, 6.0 Hz	6.97, 6.84
3	114.8	6.97, d, 6.0 Hz	6.84, 6.73
9	74.9	-	2.70, 2.42
10	42.1	2.70, 2.42, 2xd, 12 Hz	-
7	29.3	1.32, t, 7.0 Hz	0.90
8	13.0	0.90, t, 7.0 Hz	-

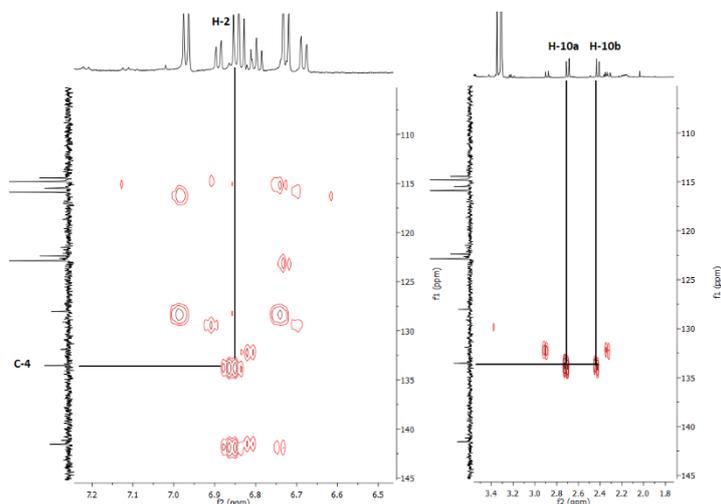


FIGURA 5. 14 - Ampliação da região aromática e alifática do mapa de contorno HMBC (MeOD, 600MHz).

Com o espectro de massas obtido para a confirmação desse segundo composto mostra-se na FIGURA 5.15 que possibilitou prever a estrutura dessa nova antrona, com a resolução da massa a detecção do pico molecular em  $m/z$  305, indicando a presença da molécula desprotonado  $[M-H]^-$ . No espectro de  $MS^2$  para este composto mostrou dois íons com fragmentos intensos em  $m/z$  175 e 146. A proposta para fragmentação desse composto segue ilustrada na FIGURA 5.16.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

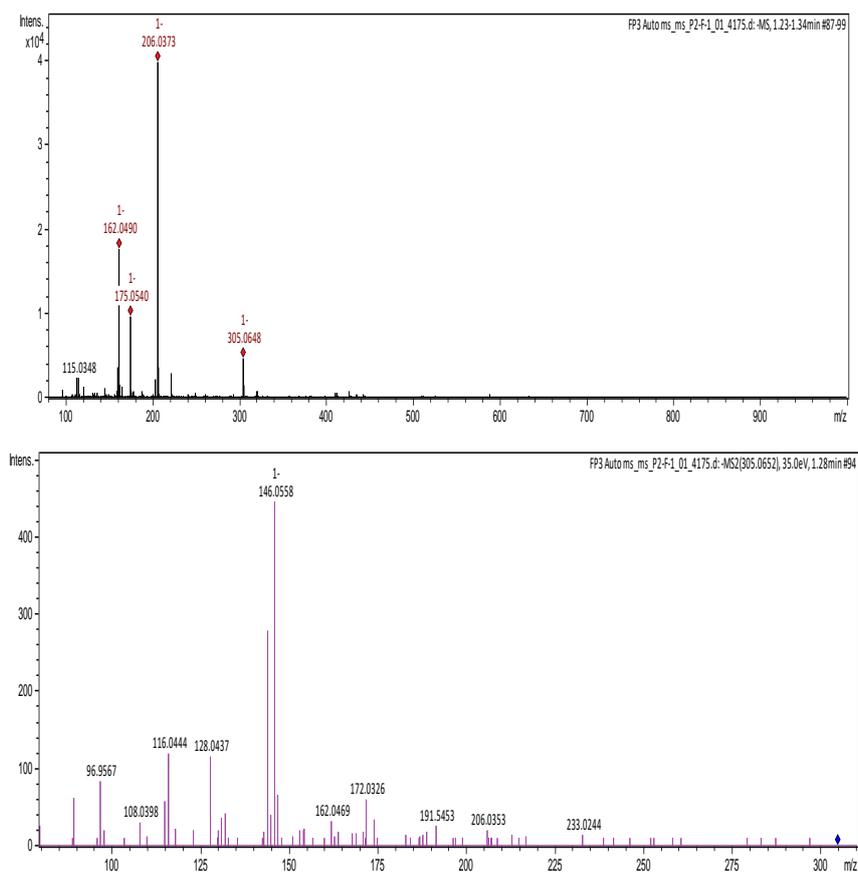


FIGURA 5. 15 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  305,0648 no tr 1,28 min encontrado no composto 2 referente ao pico 5 da fração de acetato de etila em meio de CM de *P.nicotianae* (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da antrona (acima).

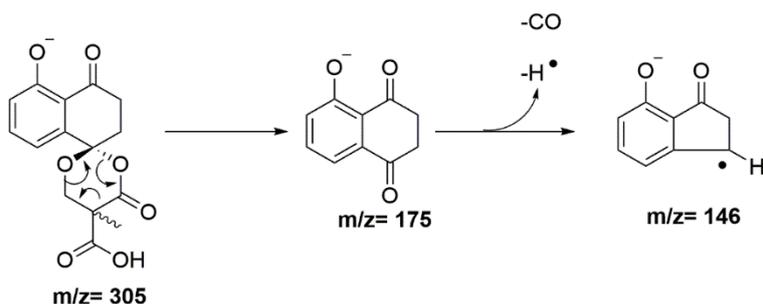


FIGURA 5. 16 - Proposta para a fragmentação da antrona com  $m/z$  305. (ESI, modo negativo).

Os demais picos ainda não foram elucidados, pois os dados que temos em mãos até o momento, são insuficientes para propor as demais estruturas. Serão feitos novos trapeamentos em LC-SPE-NMR, na busca de uma melhor separação, resolução e absorção, pois com essa metodologia os possíveis metabólitos serão aprisionados em cartuchos de SPE, monitorado em vários comprimentos de onda (DAD), afim de se obter com maior facilidade uma maior quantidade de massa que

seja suficiente para proceder com a identificação dos picos e aliado a essa técnica fazer experimentos em LC-MS<sup>E</sup> tanto no modo positivo quanto em modo negativo para obter-se a massa do íon molecular.

### 5.3. Reisolamento de *P. nicotianae* para teste de patogenicidade

Os isolados do oomiceto de *P. nicotianae* foram reisolados de frutos de limão siciliano que é bastante susceptível ao patógeno onde esses frutos seguiram previamente imersos por 15 min em solução de hipoclorito de sódio ao 2,5%, seguido de lavagem em água destilada esterilizada para remoção do excesso. Com auxílio de um furador de rolha (12 mm de diâmetro) flambado, o fruto foi furado penetrando-se a casca e o albedo, sendo removida esta camada e adicionado no local um disco no meio ágar, contendo o micélio do respectivo isolado de *P. nicotianae*. O orifício foi novamente coberto com a casca inicialmente removida e protegido com esparadrapo. Os frutos do limão foram mantidos durante 7 dias em incubadora tipo BOD à 28°C, no escuro. Após esse período, pedaços da área lesionada pelo patógeno foi coletada e transferida para meio cenoura milho-ágar, a fim de propiciar as condições para o desenvolvimento do patógeno. Essas culturas passaram a ser observadas até o crescimento característico de *Phytophthora*, para a transferência da colônia pura e assim termos um material bem mais ativo, para o estudo de interação patógeno versus hospedeiro, como mostra a FIGURA 5.17.

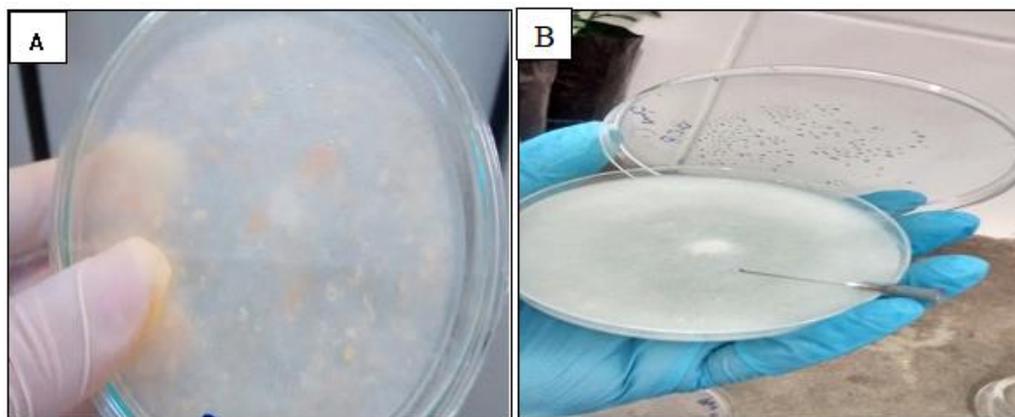


FIGURA 5. 17 - Comparativo de crescimento micelial de *P.nicotianae* – a) meio de CM com o inóculo após várias repicagens e b) meio de CM com o inóculo após o reisolamento.

#### 5.4. Estudo de indução de resistência em plântulas de *Citrus sinensis* frente ao patógeno

O estudo de indução foi iniciado em fase de plântulas a resistência e teste de suscetibilidade à *P. nicotianae* de porta-enxertos híbridos gerados pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura no estado da Bahia. Esse estudo foi desenvolvido em condições de casa de vegetação que durou em torno de 2 (dois) meses após a inoculação do patógeno (foi inoculado uma suspensão de zoósporos na concentração de  $5 \times 10^5$  zoósporos/mL), período mínimo necessário para aparecimento de sintomas, no laboratório de Fitopatologia e em câmara de crescimento com luz, umidade e temperatura controladas. Os tratamentos consistiram de 100 genótipos de citros (50 amostras de TST e 50 amostras de CTSW) inoculados pela inserção de agulha infestada com *P. nicotianae* ativo. A avaliação da doença foi feita medindo-se as áreas internas e externas da lesão provocada pelo patógeno, além de observações visuais de sintomas aéreos na planta e conformidade da lesão, de acordo com a FIGURA 5.18.

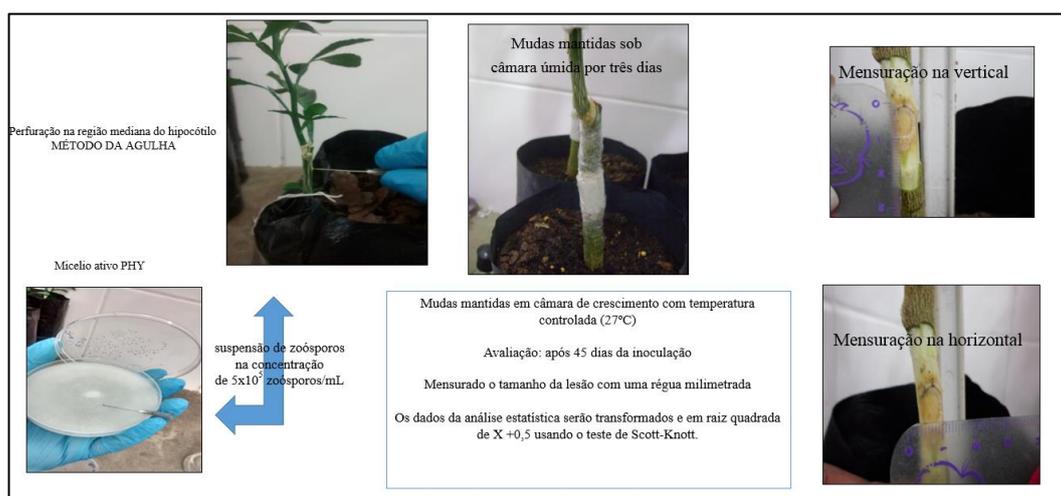


FIGURA 5. 18 - Esquema para as análises das mensurações verticais e horizontais das plântulas de TST e CTSW após a inoculação do oomiceto *Phytophthora nicotianae*.

Efetuuou-se o experimento em delineamento inteiramente de forma casual com 50 genótipos de cada espécie e 3 repetições com avaliação, por meio da

incidência da doença obtida pela porcentagem de plantas mortas e pela severidade, medindo-se o comprimento da lesão em milímetros nas plantas mortas e vivas. Cada parcela experimental foi representada por uma planta. Efetuaram-se inoculações sem a presença do patógeno em plantas controles que não foram incluídas na análise estatística. As médias dos dados de severidade da doença foram transformadas em  $\ln(x + 0,5)$  para a realização das análises estatísticas e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, onde de acordo com a FIGURA 5.19, observou-se a susceptibilidade e/ ou tolerância das plântulas frente ao contato com o patógeno em 60 dias de experimento.

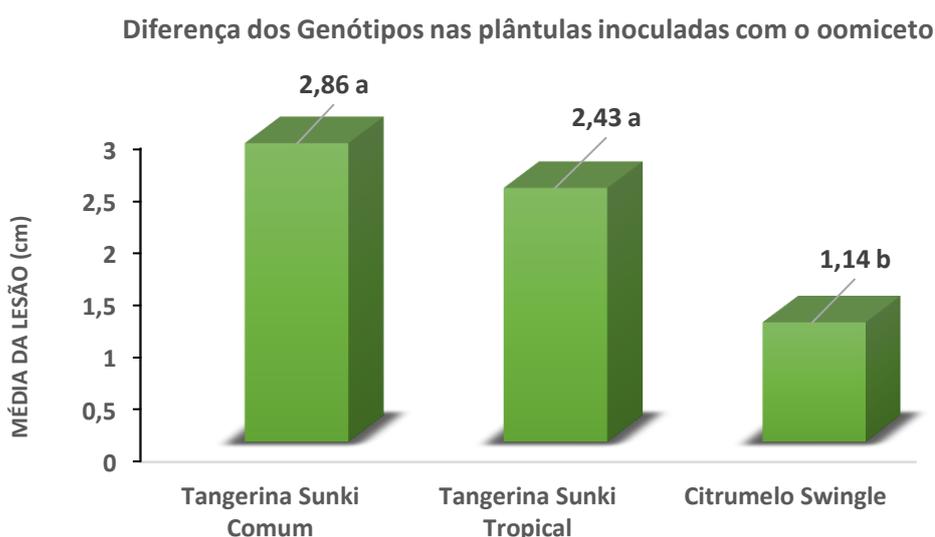


FIGURA 5. 19 - Médias obtidas através dos métodos de inoculação de disco de micélio e suspensão de zoósporos. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em 5% de significância pelo teste de Tukey.

Os genótipos apresentam diferentes reações às infecções de tronco causadas por *Phytophthora*. Em relação aos porta-enxertos utilizados constatou-se que a tangerineira Sunki comum e a Tropical foram mais suscetíveis que o citrumeleiro Swingle que é mais resistente entre os 3 porta-enxertos testados por apresentar as menores áreas de lesão. Este genótipo, é considerado resistente à gomose dos citros, ao dizer que o *P. trifoliata*, apresenta reduzida taxa de infecção em condições de campo e viveiro, assim como em resposta a inoculações experimentais de tronco e raízes (MEDINA FILHO, 2004).

A escolha do método de inoculação de *Phytophthora* em citros depende da idade das plantas. No estágio de plântulas, o método in vitro e o da agulha podem ser adotados para avaliação da gomose. A inoculação de plantas com mais de 4,0 mm de diâmetro pode ser feita pelo método do disco ou por inserção sob casca (SIVIERO, 2001) e, a avaliação, pela medida da área, comprimento da lesão e sobrevivência.

Após o período de infestação das plântulas, essas mesmas, foram separadas em partes aéreas, caule superior, caule inferior e raízes, congeladas com nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer a – 80°C, por um período de 7 dias e em seguida todas as partes das plântulas foram liofilizadas em torno de 5 dias. Com o material seco, foi preparado os extratos metanólico, como descrito no item 4.4.5, seguido de um pré tratamento- SPE, visando limpar mais esses extratos e em seguida foi feito as análises comparativas de variação de perfil químico através da técnica de LC-MS descrita no item 4.4.6, onde de acordo com a FIGURA 5.20, foi possível perceber uma diferença acentuada entre os picos dos cromatogramas das plântulas sadias e com a presença do inóculo – denominadas de doentes, após os 60 dias de infestação, as primeiras análises foram feitas em amostras do caule inferior de cada genótipo, ou seja, no material onde foram feita a contaminação com o patógeno. Ficou notório, com as primeiras comparações das corridas cromatográficas que as amostras das plântulas de Tangerina Sunki Tropical se mostraram variar bem mais ao ataque do hospedeiro do que quando comparada as plântulas de Citrumelo Swingle.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

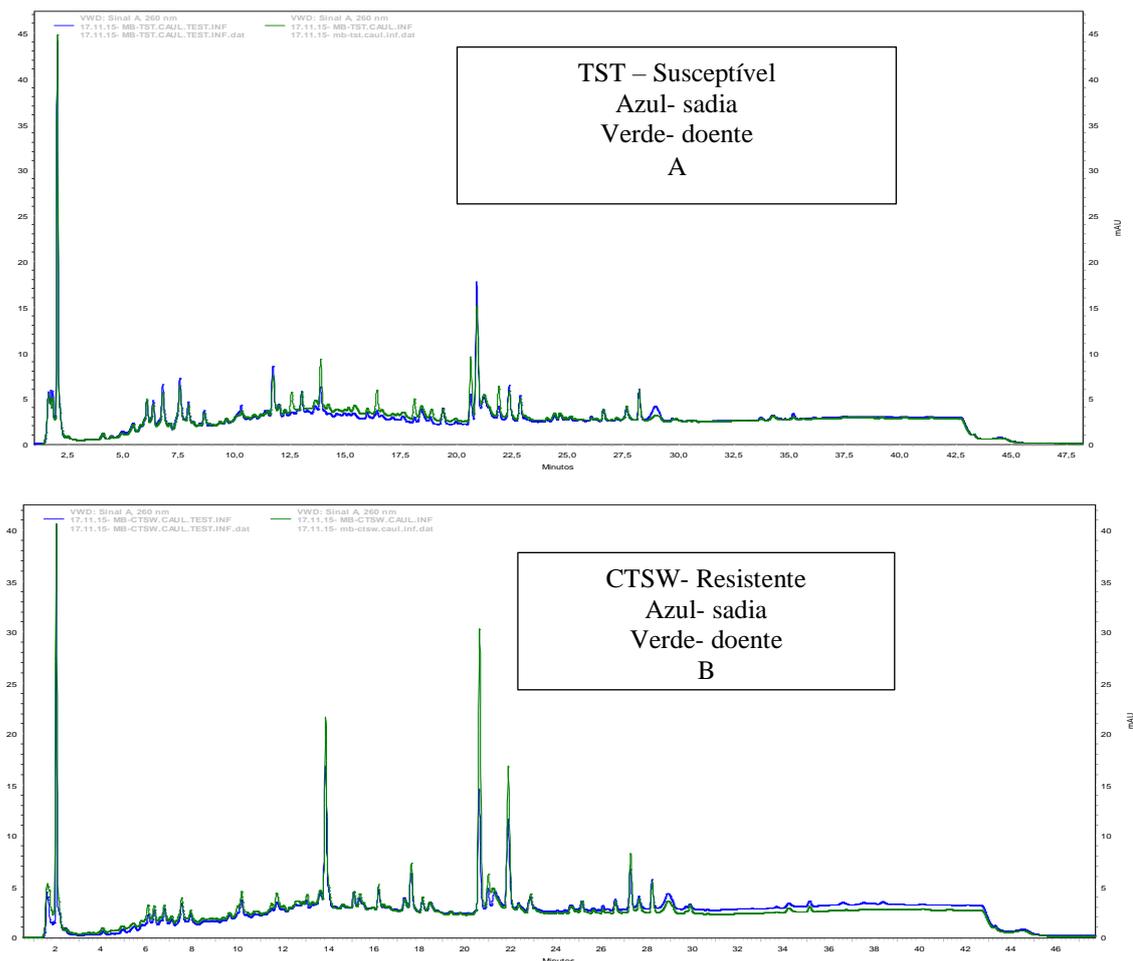


FIGURA 5. 20 - Plotagem do Cromatograma comparativo das plântulas de *Citrus sinensis* em HPLC-UV. A) Cromatograma comparativo do caule inferior do extrato de plântulas de Tangerina Sunki Tropical; B) Cromatograma comparativo do caule inferior do extrato de plântulas de Citrumelo Swingle.

Com relação à tangerineira Sunki Tropical em observações realizadas no campo por Soares et al (2002), na planta matriz da seleção Sunki Tropical (porta enxerto), indica, também, que a mesma possui maior tolerância à gomose de *Phytophthora* em relação a outras seleções dessa tangerineira, sem levar em consideração o método de inoculação usado, a resistência dos citros à gomose é mais fácil de ser avaliada do que a podridão de radículas. O patógeno causador da gomose necessita de ferimento para causar infecção nas plantas. A resistência dos citros à gomose é de caráter quantitativo, sendo controlada por poligenes (SIVIERO, 2001). As análises nas demais partes das plântulas foram efetuadas (vide anexo 2), observando também uma variação significativa tanto no caule superior, raízes quanto

nas partes áreas, denominadas como copa, que de ambos os genótipos, se trata da laranja Valência.

Com esse screening cromatográfico de cada órgão da planta infectada comparada com a sadia, se fez necessário um estudo mais direcionado, logo decidiu-se somar os dados utilizando a técnica acoplada UHPLC-MS<sup>E</sup>. Acredita-se que as alterações no perfil metabolômico possam estar ocorrendo durante a infecção, e que essas alterações possam também ser quantificadas, a fim de determinar quais os principais compostos que estão sendo produzidos e/ou consumidos durante a resposta fisiológica das plântulas.

### **5.5. Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura dos caules inferiores das plântulas de TST e CTSW**

A avaliação do material onde foi feito a inoculação do patógeno nas plântulas de *Citrus sinensis* se fez necessário, para observar e conhecer a estabilidade da manifestação da doença naquele local, pois a técnica possibilita investigar a superfície de amostras com manifestações da ordem de centenas de milhares de vezes.

As amostras de caule inferior com sintomas de gomose das plântulas de Tangerineira Sunki Tropical (TST) e Citrumeleiro Swingle (CTSW), quando analisadas morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentaram diferenças significativas em sua morfologia como pode ser visto na FIGURA 5.21 e 5.22, evidenciando a presença do inóculo com suas hifas cenocíticas, bem próximo a entrada de estômatos, proporcionando possivelmente características evidentes de manifestação de contaminação e início de contágio da doença no órgão da plântula. Muitas espécies de *Phytophthora* são capazes de infectar diretamente o tronco de certas espécies hospedeiras via lenticelas, raízes adventícias e feridas, em seguida invadem e destrói o córtex e o tecido do floema. (TYLER, 2002). Quando as raízes, caule com algum meio de entrada de patógeno (ferida) das plântulas são colocados em contato com suspensões de zoósporos in vitro, esses zoósporos acumulam-se em locais específicos, tipicamente na zona de alongamento radicular e em locais propícios a feridas (ZENTMYER 1961).

Estes são locais de máxima liberação de nutrientes e menor resistência do hospedeiro. Os zoósporos de muitas espécies de *Phytophthora* e *Pythium* são atraídos in vitro principalmente por diferentes aminoácidos, como glutamato, aspartato, asparagina e a glutamina (OBWALD, 2014). Um outro indicativo que podemos observar através da atração dos zoósporos dessas espécies de *Phytophthora* é quando esse acúmulo está se direcionando do ferimento para as raízes, esse aprisionamento em suas radículas e o rápido encistamento com germinação no cisto, além do tropismo das hifas cenocíticas (que vem ser o crescimento direcionado aos tubos germinativos) em direção ao tecido do hospedeiro (TST- susceptível e/ou tolerantes e CTSW – resistente) são comportamentos típicos na maioria das vezes, desencadeados por sinais provenientes da planta hospedeira contra a presença do invasor, e uma das primeiras manifestações é a exsudação de goma ou de compostos químicos provenientes das raízes ou até mesmo nesse caso do caule inferior das plântulas, onde foi inoculado o patógeno. E esse tipo de exsudação pôde ser notado em plântulas mais tolerantes (TST) ao oomiceto nos primeiros sete dias de contato da infestação dos zoósporos.

Com todo esse contexto podemos inferir, ao observar por MEV, que houve um reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, onde a presença desses zoósporos e suas hifas cenocíticas concentraram-se próximo a estômatos da parte do órgão infectado pelo oomiceto. Com isso, espera-se uma resposta do hospedeiro principalmente na identificação das substâncias produzidas pela presença do patógeno e que provocam diretamente uma resposta de defesa do hospedeiro, ou seja, produção de alguns elicitores (fitoalexinas) ou até fitoantecipinas (agentes antimicrobianos).

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

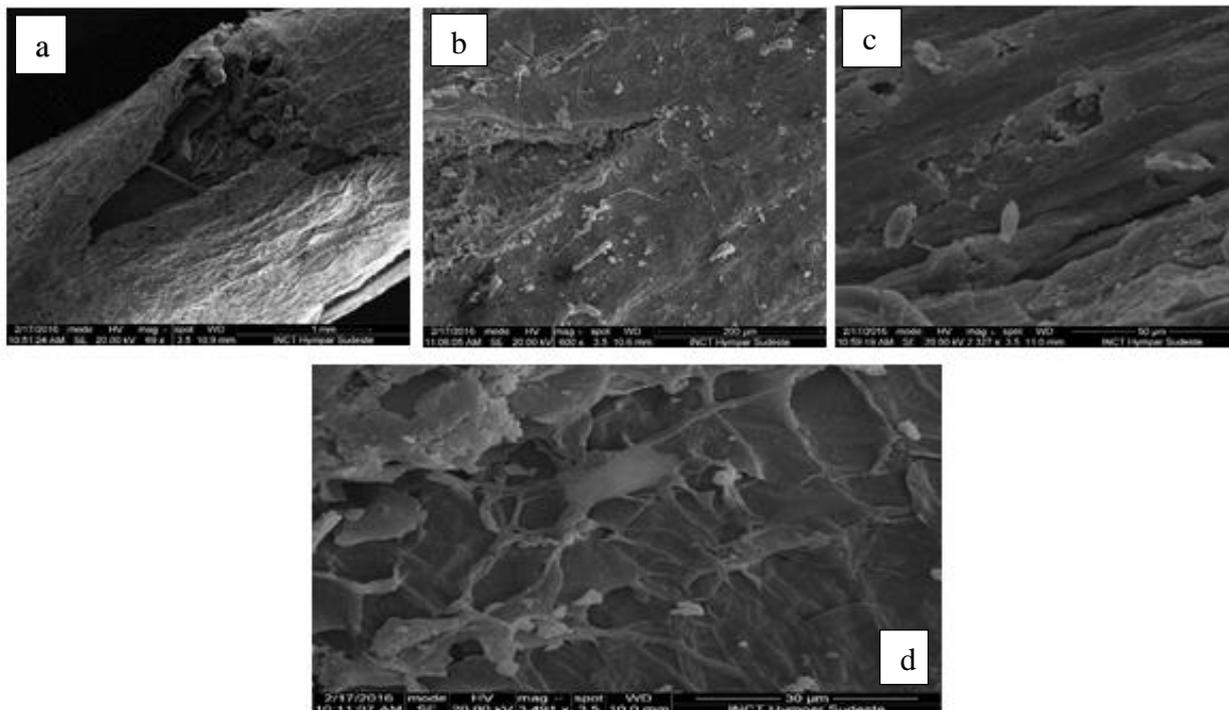


FIGURA 5. 21 - Imagens por Microscopia eletrônica de varredura do caule inferior inoculado por *Phytophthora nicotianae* com 60 dias de infecção em plântulas de TST. a) órgão do caule onde foi inoculado o oomiceto todo tomado por zoósporos de *P.nicotianae*, através da técnica de inserção de zoósporos pelo método da agulha; b) presença de zoósporos e esporângios; c) zoósporos próximo a estômatos; d) penetração das hifas cenocíticas em todo redor de onde foi feito o ferimento no caule.

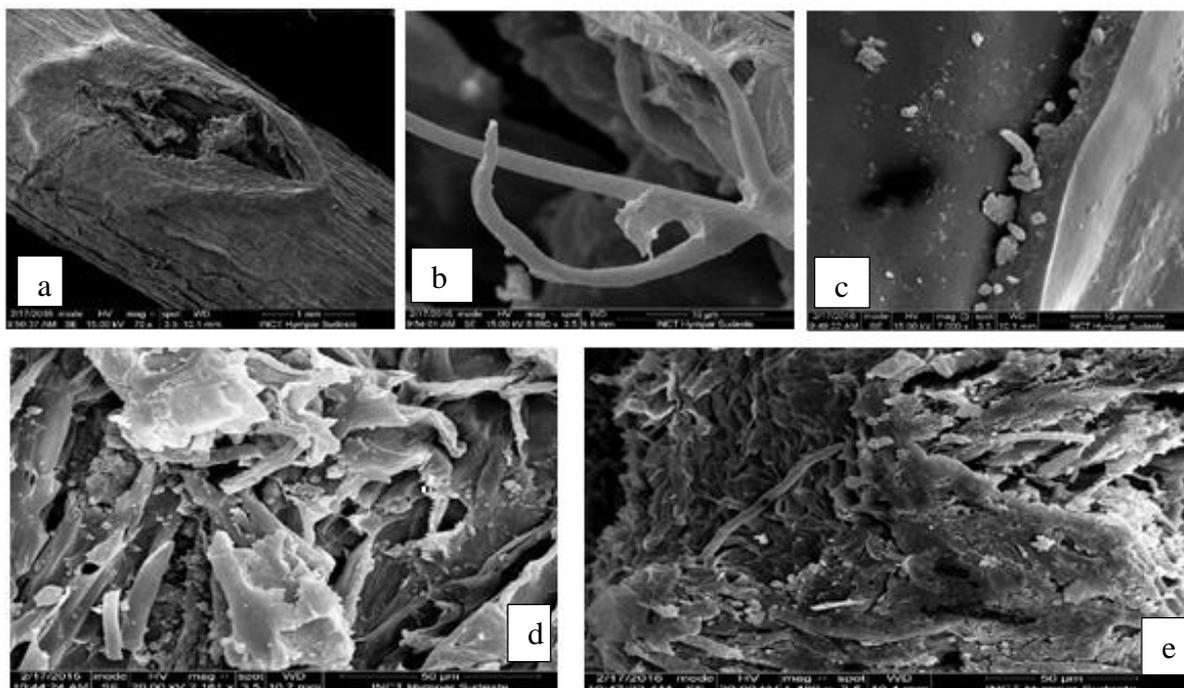


FIGURA 5. 22 - Imagens por Microscopia eletrônica de varredura do caule inferior inoculado por *Phytophthora nicotianae* com 60 dias de infecção em plântulas de CTSW. a) órgão do caule onde foi inoculado o oomiceto, através da técnica de inserção de zoósporos pelo método da agulha; b) hifa cenocítica; c) presença de zoósporos e esporângios próximo a estômatos; d) imagem ampliada de penetração das hifas cenocíticas e zoósporos em todo redor de onde foi feito o ferimento no caule; e) imagem ampliada da penetração da hifa no local do ferimento e cistos germinativos.

## 5.6. Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-MS<sup>E</sup>

A análise de um perfil químico de uma dada espécie constitui-se em um método qualitativo, onde se pode ou não validar o método utilizando as propriedades de reprodutibilidade e precisão. A escolha de um bom método de extração das amostras a serem analisadas também é de suma importância, logo nesse caso, pensando em todas as variações das amostras possíveis foram feitas pré análises por micro extrações para selecionar o melhor método de extração, já que estávamos trabalhando com uma amostragem não alvo (untarget). A escolha do método de extração levou em consideração a eficiência e o tempo total necessário para o preparo das amostras. O processo de divisão dos órgãos vegetais estudados das plântulas de TST (porta enxerto) e CTSW (porta enxerto) foi separado em raiz, caule inferior, caule superior e folhas para cada espécie de *Citrus sinensis* em estudo, os quais foram

rotulados e discriminados como segue abaixo:

Tangerineira Sunki Tropical – Porta Enxerto Controle\_ sadio  
TSTRATE – raízes do porta enxerto  
TSTCATEINF – Caule inferior do porta enxerto  
TSTCATESUP- Caule superior da enxertia laranja Valência  
TSTFOTE – folhas da enxertia laranja Valência

Citrumeleiro Swingle – Porta Enxerto Controle\_ sadio  
CTSWRATE – raízes do porta enxerto  
CTSWCATEINF- Caule inferior do porta enxerto  
CTSWCATESUP- Caule superior da enxertia laranja Valência  
CTSWFOTE- folhas da enxertia laranja Valência

Tangerineira Sunki Tropical - Porta Enxerto inoculado com o patógeno\_  
doente

TSTRA – raízes do porta enxerto  
TSTCAINF – Caule inferior do porta enxerto  
TSTCASUP- Caule superior da enxertia laranja Valência  
TSTFO – folhas da enxertia laranja Valência

Citrumeleiro Swingle – Porta Enxerto inoculado com o patógeno\_ doente  
CTSWRA – raízes do porta enxerto  
CTSWCAINF- Caule inferior do porta enxerto  
CTSWCASUP- Caule superior da enxertia laranja Valência  
CTSWFO- folhas da enxertia laranja Valência

Os códigos citados acima serão utilizados deste ponto em diante nos resultados e discussões posteriores. As análises foram efetuadas em um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) acoplado a um espectrômetro de massas equipado com um analisador híbrido Triplo Quadrupolo – Tempo de Vôo (Q-TOF). A coluna utilizada para este estudo foi a Acquity UPLC BEH C-18 Waters® (2.1 x 100 mm, partículas de 1.7 µm). A corrida cromatográfica foi realizada em modo

reverso de eluição gradiente.

Por se tratar de um estudo metabonômico “não direcionado”, decidiu-se trabalhar tanto no modo positivo quanto no modo negativo de ionização, na tentativa de ionizar o maior número possível de compostos. Os parâmetros usados de energias e fluxos de gás, entre outros utilizados seguem como descrito na TABELA 5.3.

TABELA 5. 3 - Parâmetros estabelecidos para as análises em UPLC-QToF.

Modo de Ionização	ESI Positivo e Negativo
Temperatura da Fonte	120°C
Voltagem do Capilar	+3,0eV /-3,0eV
Cone de Amostragem	40 eV
Temperatura de Dessolvatação	450°C
Fluxo do gás (N <sub>2</sub> ) de Dessolvatação	700,0L/h
Fluxo do gás (N <sub>2</sub> ) do Cone	10,0L/h
Energia de Colisão	Rampa 25-35 eV
Aquisição de Dados	MS <sup>E</sup>
Faixa de Massa Adquirida	130 - 1000 <i>m/z</i>
<i>Lock mass (LeuEnk)</i>	Positivo, <i>m/z</i> 556.2771 e
	278.1141
	Negativo, <i>m/z</i> 554.2615 e
	236.1035

---

Nesse trabalho foram feitas extrações em triplicatas de cada parte vegetal e comparou-se a repetibilidade e a precisão através das sobreposições dos perfis cromatográficos e o seu tempo de retenção de cada parte vegetal. Pode-se concluir que a técnica utilizada para a extração foi bastante reprodutível. A validação da extração foi efetuada ao quantificar metabólitos que será discutida posteriormente. O rendimento dos extratos foi calculado em relação a massa do material seco utilizado para a extração (50 mg), conforme indicado na TABELA 5.4.

TABELA 5. 4 - Valores de rendimento das extrações de TST e CTSW (n=3) das amostras de diferentes partes das plântulas.

<b>Amostra</b>	<b>Extrato (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>CV(%)</b>
<b>TSTFO</b>	5,8	11,6 ± 0,8	6,9
<b>TSTFOTE</b>	5,8	11,6 ± 0,8	6,9
<b>TSTRA</b>	4,5	9,0 ± 0,9	9,9
<b>TSTRATE</b>	4,8	9,6 ± 1,0	10,6
<b>TSTCASUPE</b>	3,5	7,0 ± 0,8	12,7
<b>TSTCATESUP</b>	3,6	7,2 ± 0,9	13,0
<b>TSTCAINF</b>	5,1	10,2 ± 0,4	3,9
<b>TSTCATEINF</b>	5,0	10,1 ± 0,3	3,8
<b>CTSWFOTE</b>	4,8	9,6 ± 0,8	8,3
<b>CTSWFO</b>	3,7	7,4 ± 0,8	10,8
<b>CTSWCATEINF</b>	3,7	7,4 ± 0,6	10,8
<b>CTSWCAINF</b>	3,5	7,0 ± 0,8	12,7
<b>CTSWRATE</b>	3,9	7,8 ± 0,7	9,6
<b>CTSWRA</b>	2,8	5,6 ± 0,5	8,7
<b>CTSWCATESUP</b>	2,6	5,2 ± 0,7	14,3
<b>CTSWCASUP</b>	2,2	4,4 ± 0,5	11,1

\*CV = Coeficiente de variação

No estudo metabólico das partes de cada plântula estudado, todos os resultados foram obtidos das amostragens de plântulas da mesma idade e nas mesmas condições, assim descartando resultados equivocados de variação de perfil químico, devido alguns fatores que podem influenciar na diferenciação dos mesmos, como: sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica e estresses hídricos. O estudo avaliou, ao analisar plantas enxertadas sadias e doentes, prováveis mecanismos bioquímicos envolvendo o metabolismo secundário, como uma resposta de defesa ao estímulo fisiopatológico causados pela Gomose de citros. Os agentes fitopatogênicos atacam plantas justamente porque durante o seu desenvolvimento evolutivo conseguiram assimilar as substâncias produzidas pelo hospedeiro, mas para que ocorra tal efeito, o patógeno precisa vencer diversas barreiras opostas impostas pelo hospedeiro que são seus mecanismos de defesa pré e pós formados.

Nas FIGURAS 5.23 a 5.26 mostram os cromatogramas sobrepostos comparativo de íons totais obtidos de todas as partes vegetais estudadas das

plântulas de TST e CTSW no modo positivo quanto no modo de ionização negativo, onde se obteve uma análise bem explorada de cada composto detectado, com espectro do íon molecular precursor de massa exata, através da baixa energia de ionização, e espectro dos íons fragmentos, também com massa exata, através de energias mais elevadas. Foi possível, observar uma quantidade considerável de variações e uma quantidade de analitos foi encontrada, porém analisando cada banda cromatográfica e seus respectivos íons de massa, detectou-se que no modo positivo para alguns órgãos da planta, como por exemplo o caule superior e as folhas, houve contaminação, onde foi possível verificar *clusters* com perdas simultâneas de 44 Da, que é bastante característico de amostras com o polímero polietileno glicol (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) n (PEG). Essa contaminação pode ter ocorrido pela própria água, ou por polímeros extraídos de plásticos, no momento da extração no procedimento experimental. Através dos cromatogramas de íons totais foi possível também obter a ionização de diversos compostos e como a análise por LC-MS<sup>E</sup> são na maioria das vezes bastante semelhantes e ricas em informação, é difícil identificar diferenças entre as amostras baseando-se em uma simples análise visual. Dessa maneira, fez-se uso de quimiometria para melhor interpretação desses dados.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

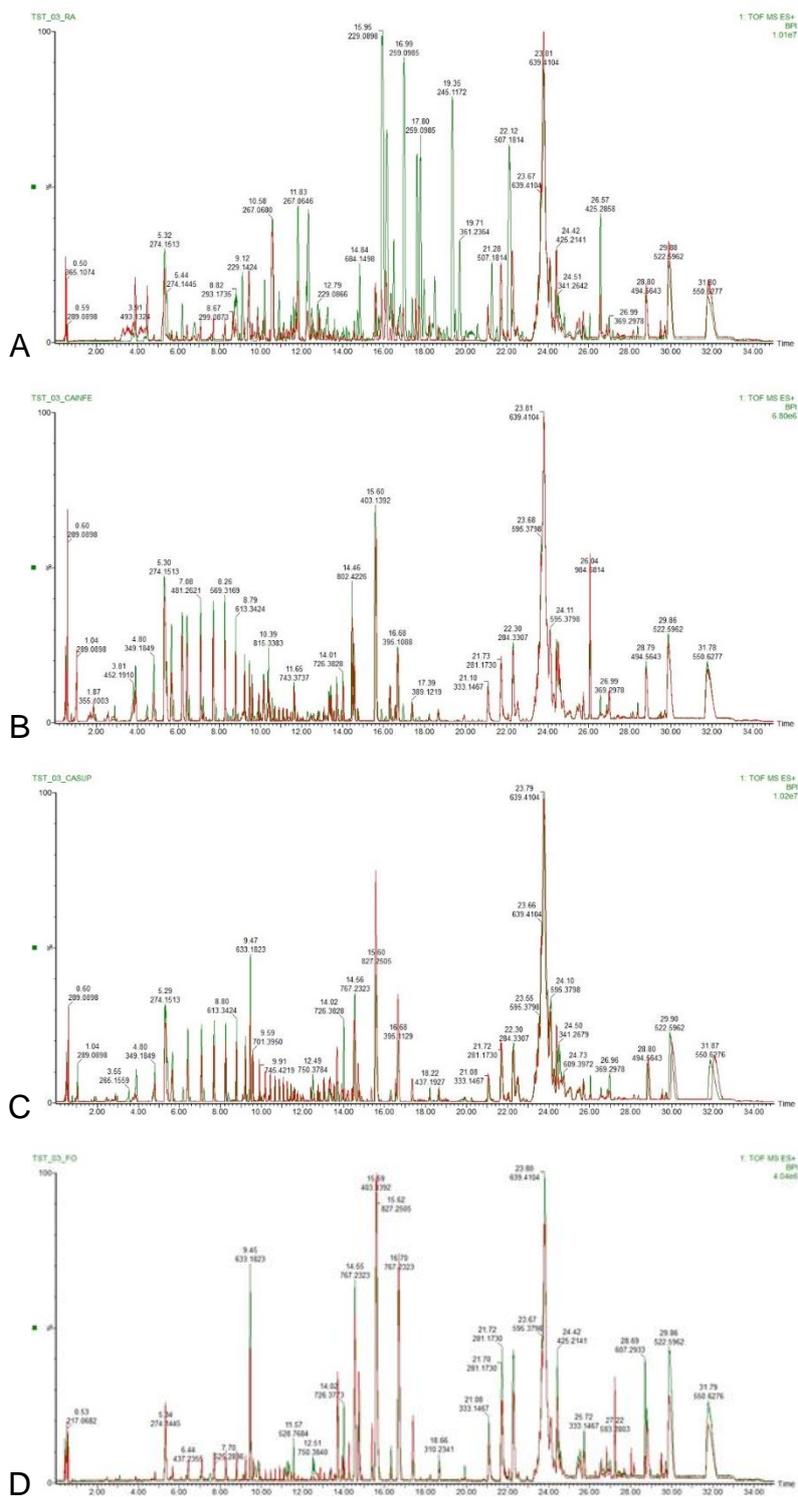


FIGURA 5. 23 - Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada de TST (ESI, positivo), infectadas com gomose (verde) e sadias (vermelho). A: Raízes; B: Caule inferior; C: Caule superior; D: folhas.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

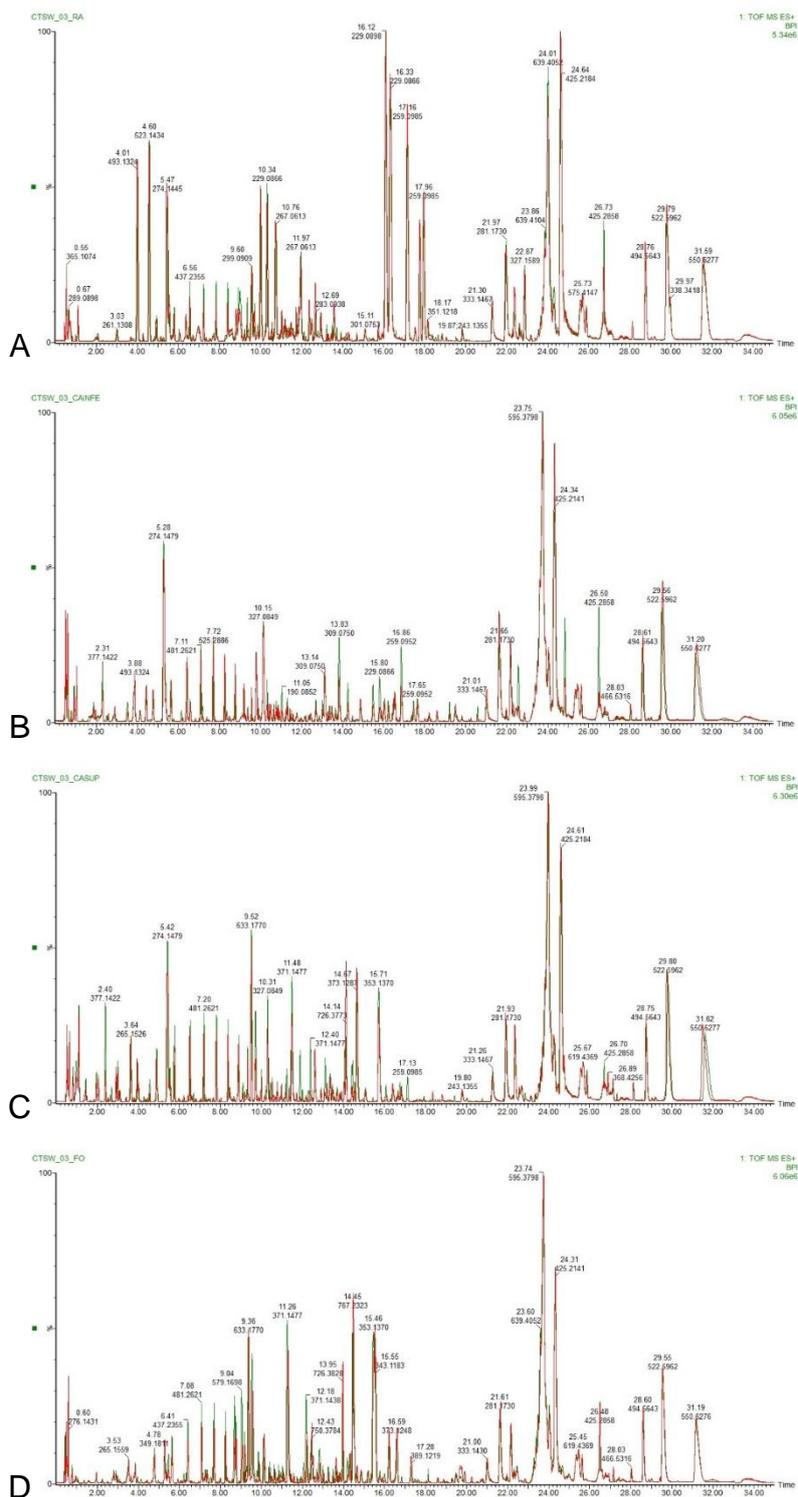


FIGURA 5. 24 - Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada de CTSW (ESI, positivo), infectadas com gomose (verde) e sadias (vermelho). A: Raízes; B: Caule inferior; C: Caule superior; D: folhas.

**ESTUDO QUÍMICO DE *PHYTOPHTHORA NICOTIANAE* E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE *CITRUS SINENSIS*.**

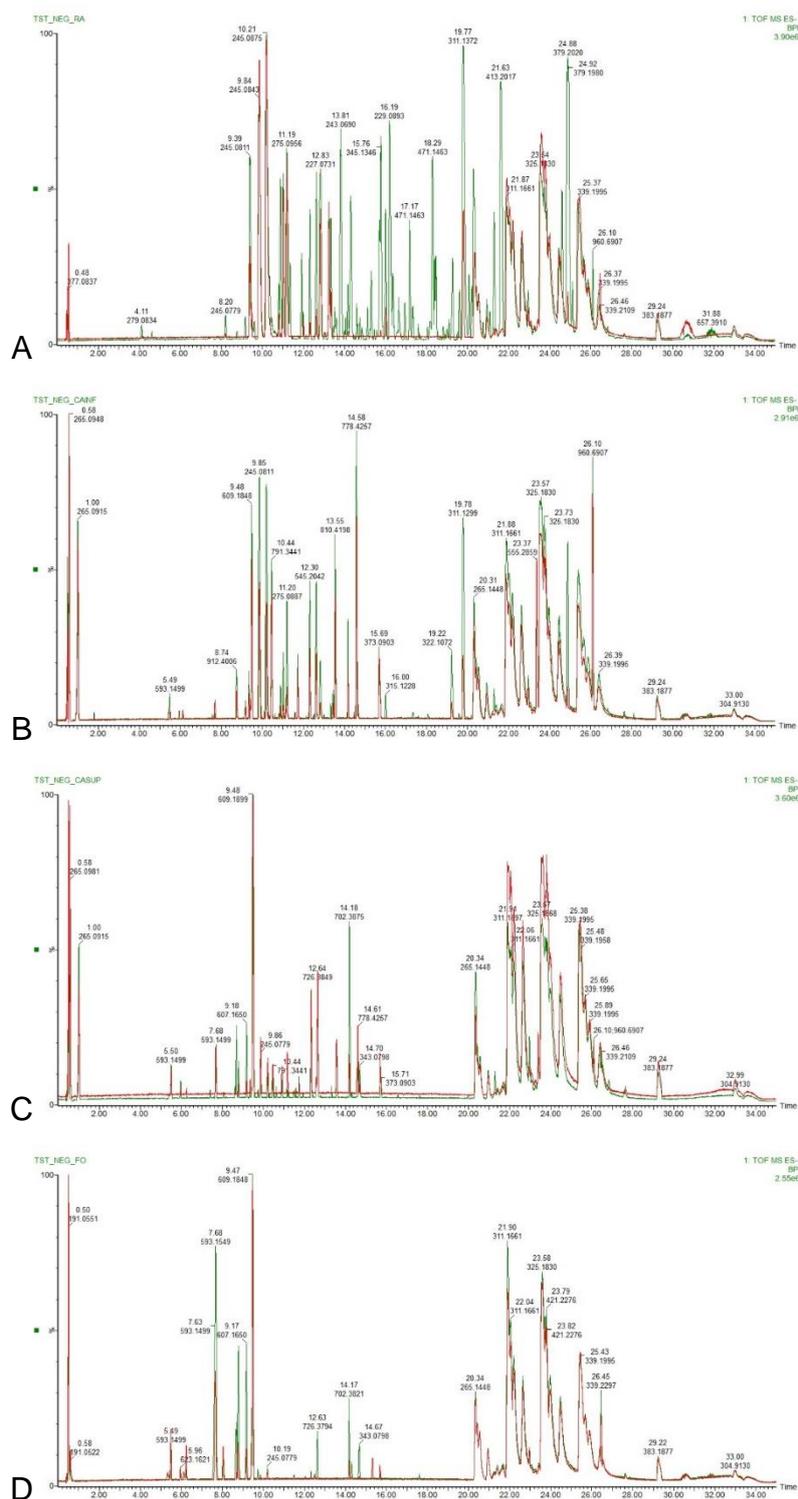


FIGURA 5. 25 - Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada de TST (ESI, negativo), infectadas com gomose (verde) e sadias (vermelho). A: Raízes; B: Caule inferior; C: Caule superior; D: folhas.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

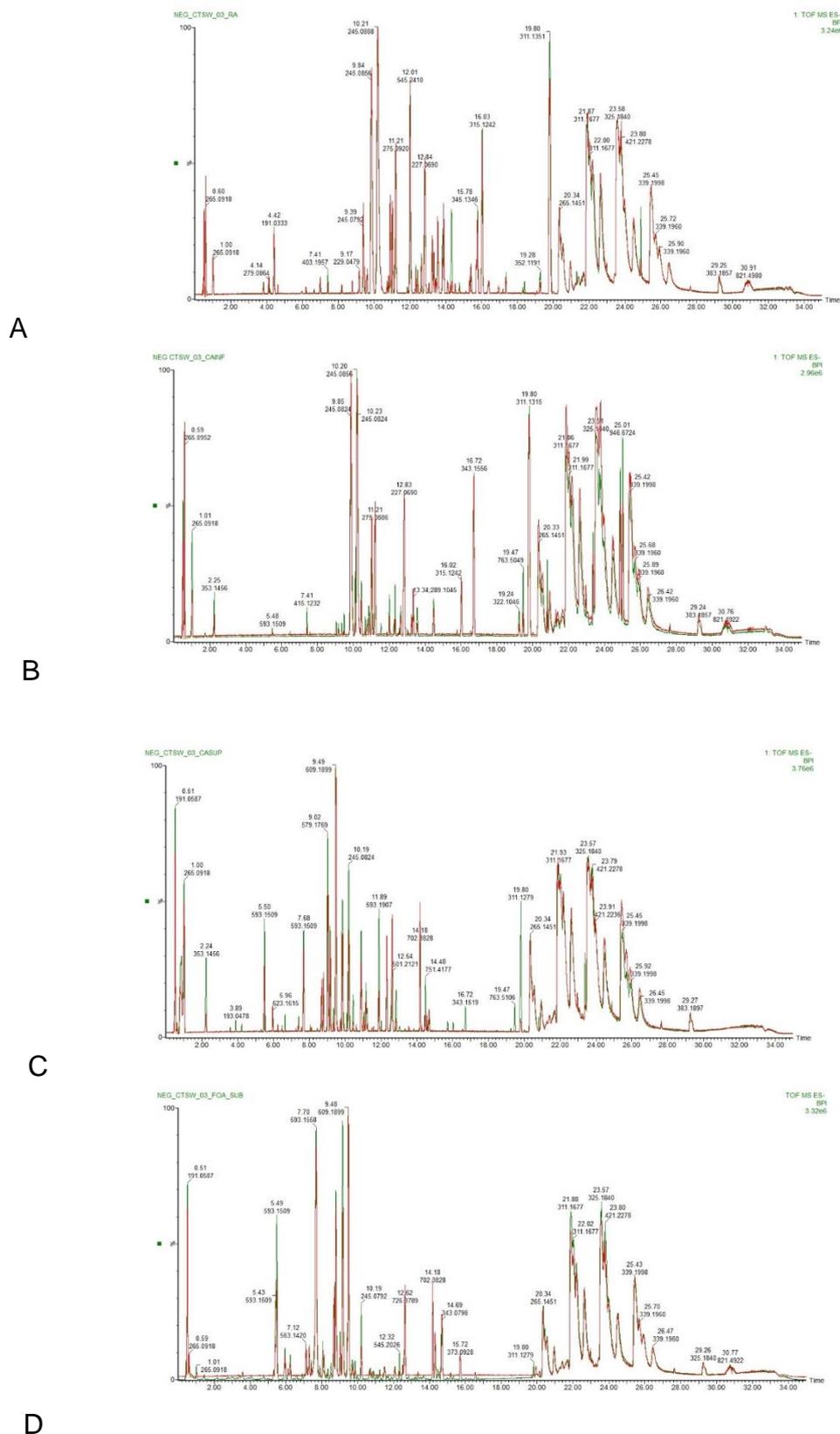


FIGURA 5. 26 - Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada de CTSW (ESI, negativo), infectadas com gomose (verde) e sadias (vermelho). A: Raízes; B: Caule inferior; C: Caule superior; D: folhas.

Na comparação visual dos cromatogramas entre os porta enxertos no modo positivo de ionização (FIGURA 5.23 e 5.24) foi possível observar diferenças entre essas plântulas, tanto em termo de intensidade de picos, como em presença e/ou ausência de bandas cromatográficas, isso sugere que ao comparar uma espécie que é mais susceptível que a outra, que possui uma resistência ao patógeno estudado, ocorre mudanças na variação de seu perfil químico, principalmente quando comparamos plântulas sadias versus doente. Para as análises das partes inferiores dos porta enxertos, o modo de aquisição positivo foi bem melhor, como já era previsto, devido à presença na variação de compostos da classe das cumarinas, estas, se ionizam muito bem nesse modo, devido as suas características químicas (GARCIA, 2005), De vários flavonoides presentes no gênero *Citrus*, as flavanonas glicosídicas são acumuladas em maior quantidade em partes áreas, embora a concentração destes compostos seja dependente da idade da planta, em busca dessa variações e dessa classe de substâncias as demais amostras obtivemos melhor êxito no modo negativo de ionização, principalmente quando se fez estudos mais detalhado para as partes das plântulas TSTFOTE, TSTFO, TSTCATESUP, TSTCASUP, CTSWFOTE, CTSWFO, CTSWCATESUP e CTSWCASUP, foi possível observar melhores diferenças entre os tratamentos, onde estes, serão abordados bem mais detalhados aliados as análises quimiométricas multivariadas.

## **5.7. Análise de Dados Multivariados**

### **5.7.1. Organização dos dados e Análise de componentes principais**

Com os dados dos cromatogramas de íons obtidos pelas análises de LC-MS<sup>E</sup>, foi feito um estudo estatístico, onde os dados cromatográficos foram transformados em dados numéricos através da integração das áreas das bandas cromatográficas, em seguida esses dados foram organizados em uma matriz, na qual as linhas representam as amostras e as colunas as variáveis nas quais são representadas pelos tempos de retenção e a área dos picos, de acordo com sua intensidade. Nas análises mais complexas, em sua grande maioria, os dados antes

de serem submetidos a quimiometria, necessitam de pré-tratamento, pois estes podem não ter uma distribuição adequada para a análise, dificultando a extração de informações úteis e interpretação dos mesmos. Esse tipo de pré-processamento permite que seja dado um mesmo peso a todas as variáveis, ou seja, permite que uma dada variável não se sobreponha às outras de igual importância.

No auto escalamento a matriz é centrada na média dos valores subtraindo-se o valor de cada elemento da matriz da média de cada variável (coluna) e, em seguida, é normalizada pelo desvio padrão dividindo-se o valor de cada elemento centrado na média pelo desvio padrão da variável, conforme a equação abaixo:

$$x_{ij(as)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$$

, onde:

$x_{ij(as)}$  = Valor auto escalado da variável  $j$  na amostra  $i$ ;

$x_{ij}$  = Valor da variável  $j$  na amostra  $i$ ;

$\bar{x}_j$  = Média dos valores das amostras na coluna  $j$ ;

$s_j$  = Desvio padrão dos valores da variável  $j$ .

Com esse pré-processamento as variáveis terão dessa forma média zero e um desvio padrão igual a um. Além do mesmo peso a todas as variáveis, o auto escalamento permite evidenciar e eliminar variáveis anômalas (*outliers*) que possam dificultar as análises quimiométricas (WOLD, 1987). Utilizou-se como referência uma amostra de cada parte vegetal; para as folhas, utilizou-se o cromatograma das amostras das folhas do enxerto sem inóculo (sadia) como controle, para os caules utilizaram-se as amostras do caule inferior e superior do enxerto sem sintomas de gomose e para as raízes as amostras da raiz do enxerto também sem sintomas, após todas as amostras serem descontadas da amostra matriz denominada de branco das análises. Em alguns casos pode-se realizar uma redução do número de variáveis deixando assim os cálculos computacionais mais rápidos, uma vez que o conjunto de dados é menor. Mas, para o alinhamento de cromatogramas ao reduzir o

número de variáveis pode haver distorções nas formas de áreas e bandas, fazendo com que sua aplicação deva ser minuciosamente avaliada. Em algumas amostras, após analisadas minuciosamente, foi possível observar que mesmo fazendo a subtração das corridas realizadas para o branco da amostra (somente solvente, nas condições iniciais), alguns contaminantes, possíveis analitos ionizados pelos solventes não eram de interesse, logo assim foi feita uma redução no tempo de corrida de 35 minutos a 22 minutos para as análises estatísticas comparativas dessas amostras.

Os dados cromatográficos obtidos foram submetidos às análises de componentes principais (PCA), essas análises foram realizadas para cada órgão das plântulas estudada, utilizando-se 95% de informações dos dados originais descrito por três componentes principais. PCA permitem a visualização gráfica de todo o conjunto de dados, mesmo quando o número de amostras e variáveis é elevado. O uso deste tem como objetivo principal aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou a ausência de agrupamentos naturais entre as amostras (CORREIA, 2007).

Na FIGURA 5.27, cada círculo representa uma amostra injetada. O peso de cada variável na descrição dos eixos que são os componentes, é apresentada no gráfico abaixo de PCA *loadings*, os triângulos representam diferentes íons detectados em cada experimento e quanto mais próximos estiverem de um determinado grupo de amostras, significa que os íons são mais representativos dentro daquela amostragem. Íons equidistantes entre dois ou três grupos indicam que os mesmos apresentam abundância semelhante nos diferentes grupos de amostras.

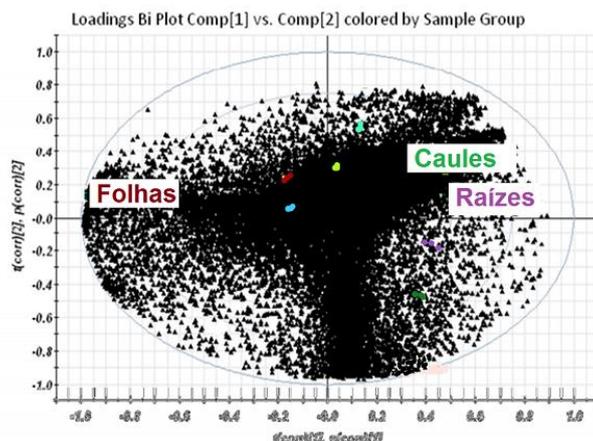


FIGURA 5. 27 -- Análise de PCA: gráfico de loadings da TST X CTSW das análises realizadas no modo positivo de ionização dos órgãos vegetais.

No gráfico acima foi possível verificar que a análise conjunta dos órgãos estudados, há existência de uma gama de íons que são característicos para cada parte específica das plântulas, o que torna difícil somente dessa maneira a compreensão da análise para a indicação das diferenças entre essas amostras. Portanto, seguiu-se trabalhando no estudo comparativo das matrizes por PCA separadamente para cada órgão das plântulas estudadas, decidiu-se assim, fazer o estudo de cada matriz intercalando amostras sadias versus doentes de cada plântula e para cada órgão e depois avaliar comparativamente o que poderia estar variando mais dentro dessas matrizes. Na FIGURA 5.28 e 5.29, mostram as matrizes dos extratos, os órgãos analisados foram raiz, caule inferior, caule superior e folhas para as duas plântulas em estudo (TST e CTSW). Para cada uma das análises, comparou-se entre os diferentes tratamentos as amostragens de plântulas sadias versus doente, aquelas inoculadas com o oomiceto causador da doença gomose de citros, afim de verificar suas diferenças no perfil químico, logo verifica-se em todos os casos sempre dois grupos distintos. O grupo 1 (um) denomina-se pelas matrizes das plântulas sadias (representados pelos círculos vermelho) e o grupo 2 (dois) compreende as matrizes das plântulas doentes (representado pelos círculos pretos). Verificou-se que em ambos os tratamentos separadamente houve uma semelhança quando comparados os grupos que são denominados como doentes ou sadios, mostrando que as amostras em triplicatas se assemelham entre si, onde também foi possível observar que nas

## ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

matrizes sadias de cada plântula no modo positivo elas se diferenciam dos seus grupos quando comparados respectivamente. Somente nas amostras de TST no órgão das raízes em uma das triplicatas, foi possível observar uma tendência de separação das matrizes de uma delas, tanto na doente quanto na sadia, isso pode-se evidenciar que elas se diferenciam um pouco, por exemplo em seu tempo de retenção ou em suas intensidades dos picos, ou seja, quando se correlaciona os gráficos de linhas e *loadings* com os cromatogramas, pode-se relacionar alguns tempos de retenção de substâncias e também a concentração das mesmas com a discriminação obtida, onde leva a crer que a separação quimiométrica está relacionada com a variação de concentração de algumas substâncias, nesse caso podemos estar tratando de variações entre algumas cumarinas, pois já há estudos dessa classe de compostos que são evidenciados nessa parte do órgão da plântula (SOARES, 2011).

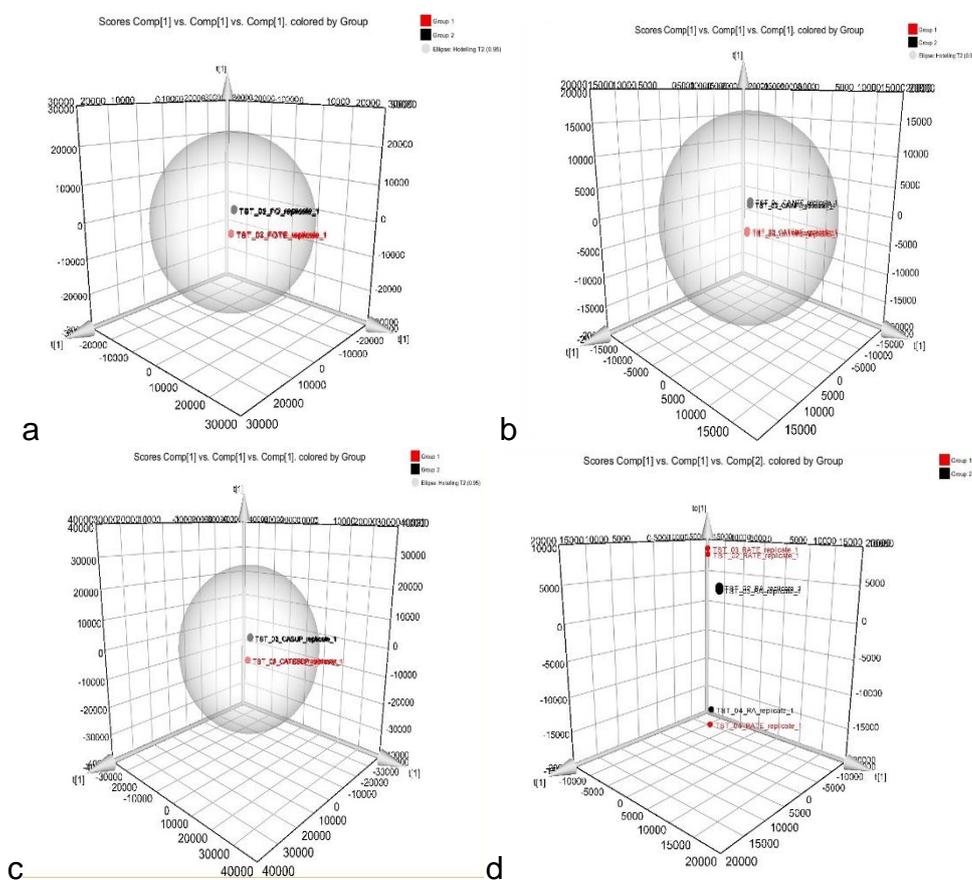


FIGURA 5. 28 - PCA para os diferentes órgãos de citrus de TST, comparando entre o tratamento doente e sadio (ESI, modo positivo). A: folhas; B: caule superior; C: caule inferior; D: raiz. Vermelho - grupo destinado as amostras sadias; Preto - grupo destinado as amostras infectadas pelo oomiceto.

## ESTUDO QUÍMICO DE *PHYTOPHTHORA NICOTIANAE* E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE *CITRUS SINENSIS*.

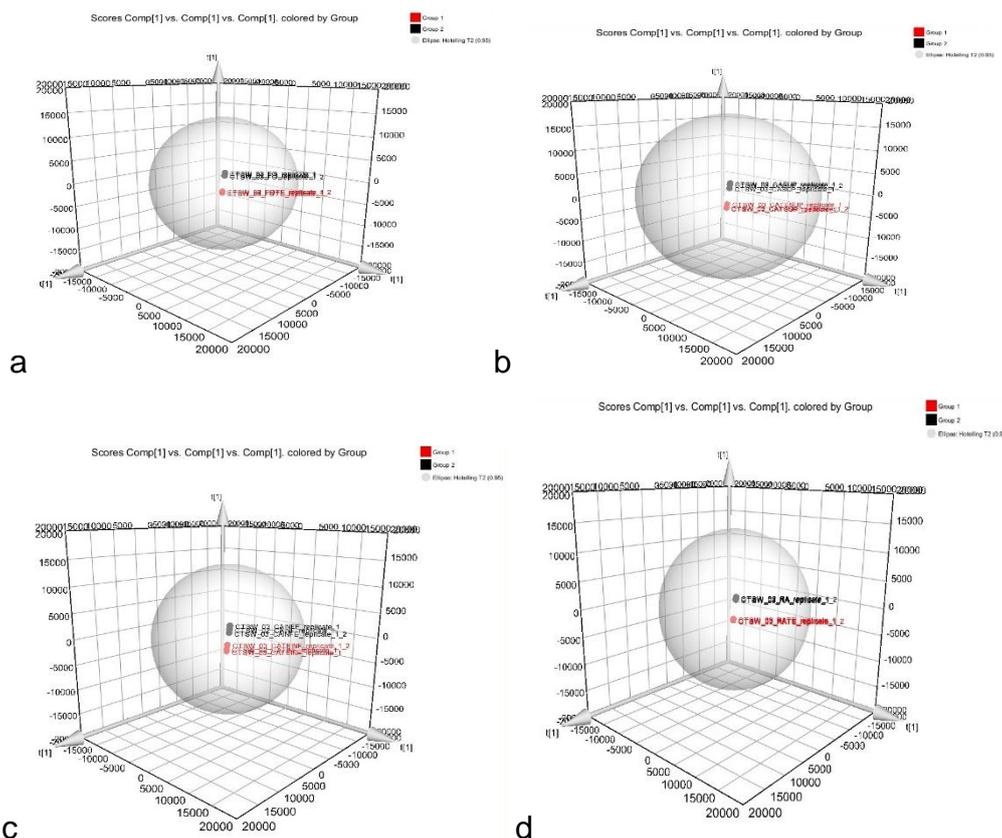


FIGURA 5. 29 - PCA para os diferentes órgãos de citrus de CTSW, comparando entre o tratamento doente e sadio (ESI, modo positivo). A: folhas; B: caule superior; C: caule inferior; D: raiz. Vermelho - grupo destinado as amostras sadias; Preto - grupo destinado as amostras infectadas pelo oomiceto.

Dessa maneira, as matrizes de cada órgão foram novamente reavaliadas separadamente em pares de órgão no qual se teve como objetivo, avaliar suas diferenças diretamente através das análises discriminantes de *S-Plot*.

### 5.7.2. Análises dos biomarcadores via *S-plot* dos pés francos (TST e CTSW) das análises no modo positivo de ionização

A ferramenta estatística *S-plot* é um gráfico de dispersão, que pode ser utilizada para explicar a influência variável sobre um modelo estudado. É um gráfico onde cada círculo representa um composto que foi determinado no experimento. O quadrante superior direito de o *S-plot* mostra os componentes (no caso dessa tese, as bandas cromatográficas) que estão em maior quantidade no grupo de controle, enquanto que o quadrante inferior esquerdo mostra os componentes que estão em

maior quantidade no grupo tratado, neste trabalho os órgãos de cada plântula doentes dos pés francos de *Citrus sinensis*. Quanto mais afastado for do eixo x, mais representativo são os íons de cada amostra, portanto quanto mais distante do eixo y, significa maior confiabilidade nos resultados analíticos. A vantagem ao usar a técnica é devido a possibilidade de identificação dos íons que são mais representativos dentro de cada amostragem, seguindo as análises separadamente para cada órgão.

### 5.7.2.1. Análises das raízes dos pés francos no modo positivo de ionização

No tratamento quimiométrico das amostras de TST nas raízes (FIGURA 5.30), foi possível encontrar íons característicos para cada tipo diferente de tratamento, onde abaixo da linha horizontal representa o tratamento doente com gomose e, acima o tratamento sadio. No momento que estes íons são analisados, o próprio software cria os íons que mais se diferenciam quando comparado entre os dois grupos de amostra. Os íons presentes nesse gráfico foram analisados e no modo positivo de ionização foi possível evidenciar como mais significativos 10 bandas cromatográficas quando comparada a raiz sadia versus a doente (FIGURA 5.31).

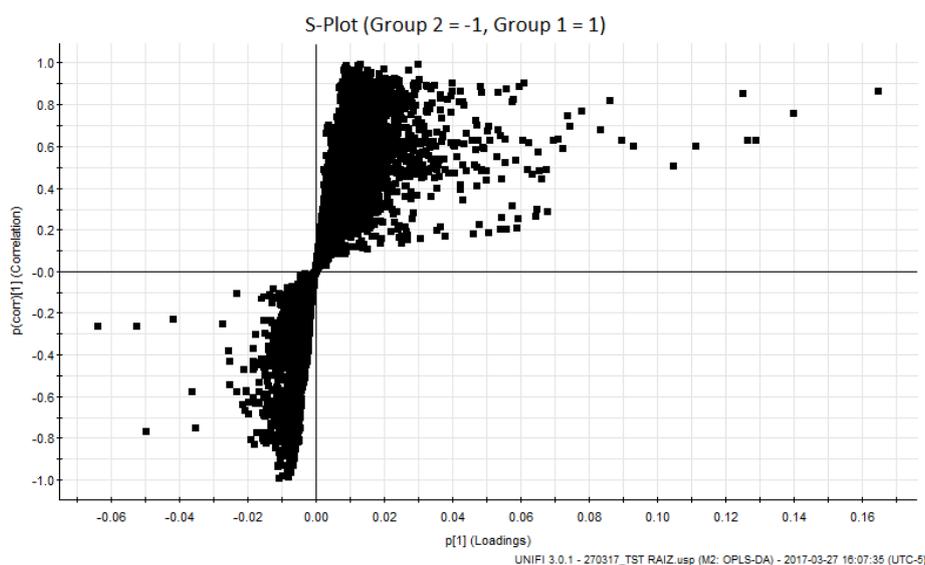


FIGURA 5. 30 - Gráfico de S-Plot das raízes de TST (ESI, modo positivo).

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

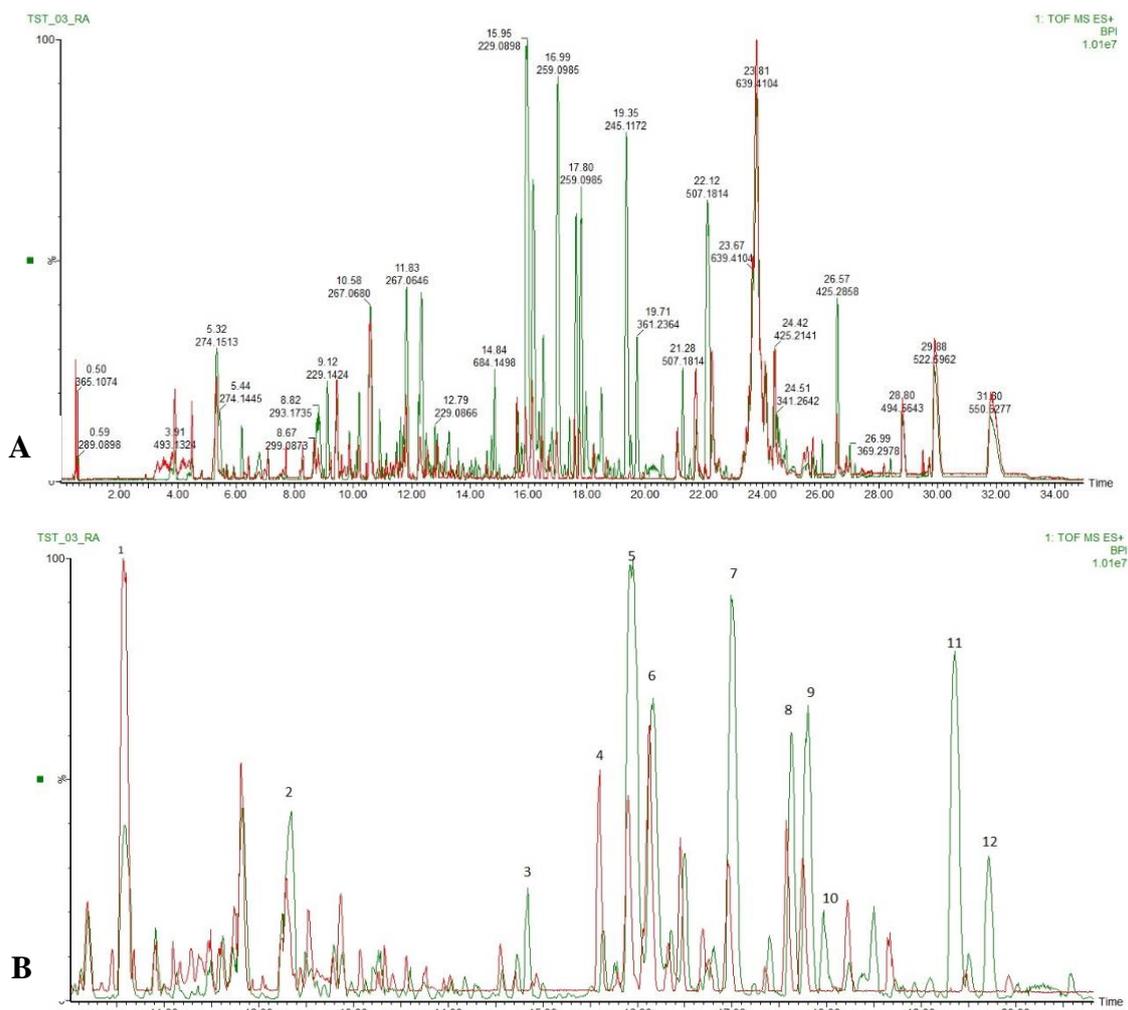


FIGURA 5. 31 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes das raízes de TST. a) Cromatograma de íons totais; b) Cromatograma ampliado nas bandas com maiores diferenças entre as amostras sadia (vermelho) versus a doente (verde).

Nas bandas cromatográficas que se destacaram 5 e 6 (FIGURA 5.31) com os tr de 15,94 e 16,15 min apresentaram um íon  $m/z$  229,0897 referente a  $[M+H]^+$ , cuja massa monoisotópica neutra é de 228,0792 Da, referente a fórmula molecular proposta  $C_{14}H_{12}O_3$ . No banco de dados feito para essa pesquisa essa massa monoisotópica foi correlacionada às cumarinas xantiletina e seselina (FIGURA 5.33). Esses dois isômeros possuem massa monoisotópica exata de 228,0786 Da, onde a diferença da massa teórica para a massa experimental ficou em apenas 0,6 mDa. Foi possível observar analisando os íons moleculares e íons produtos dessas duas bandas cromatográficas, que no tr 15,97 tem-se o íon produto com pico base com a  $m/z$  213 (FIGURA 5.34), que também, já havia sido relato em estudos anteriores com *C.sinensis* e *C.limonia* (SOARES, 2011), mostrando que esse íon de transição de 229

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

para 213 pode-se propor que a substância a qual estamos analisando trata-se da cumarina linear xantiletina, pois Vulfson em 1975, já havia relato que em cumarinas lineares esse fragmento são bem mais estáveis que em cumarinas angulares, isso ocorre devido a linearidade da aromaticidade formada nesse fragmento.

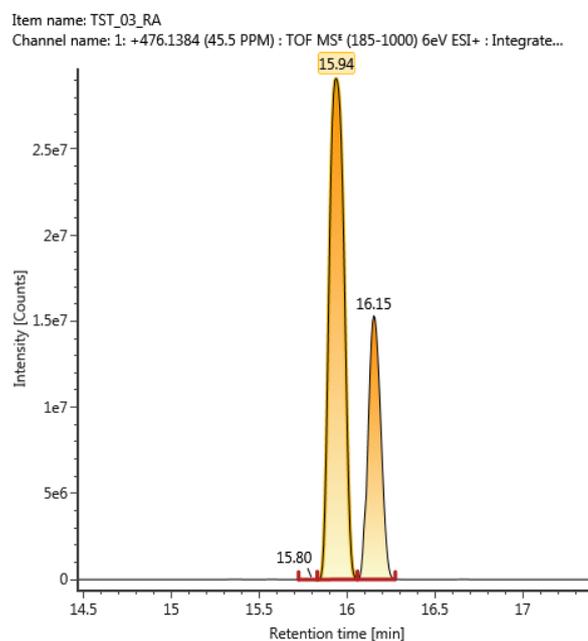


FIGURA 5. 32 – Cromatograma de íons extraídos das cumarinas linear xantiletina (15,94 min) e angular seselina (16,15 min).

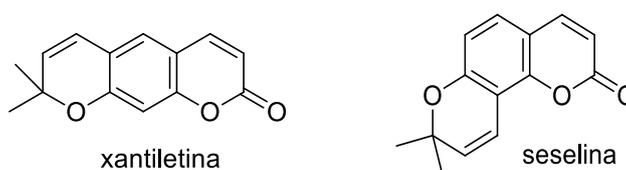


FIGURA 5. 33 - Estrutura química das cumarinas linear xantiletina e angular seselina.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

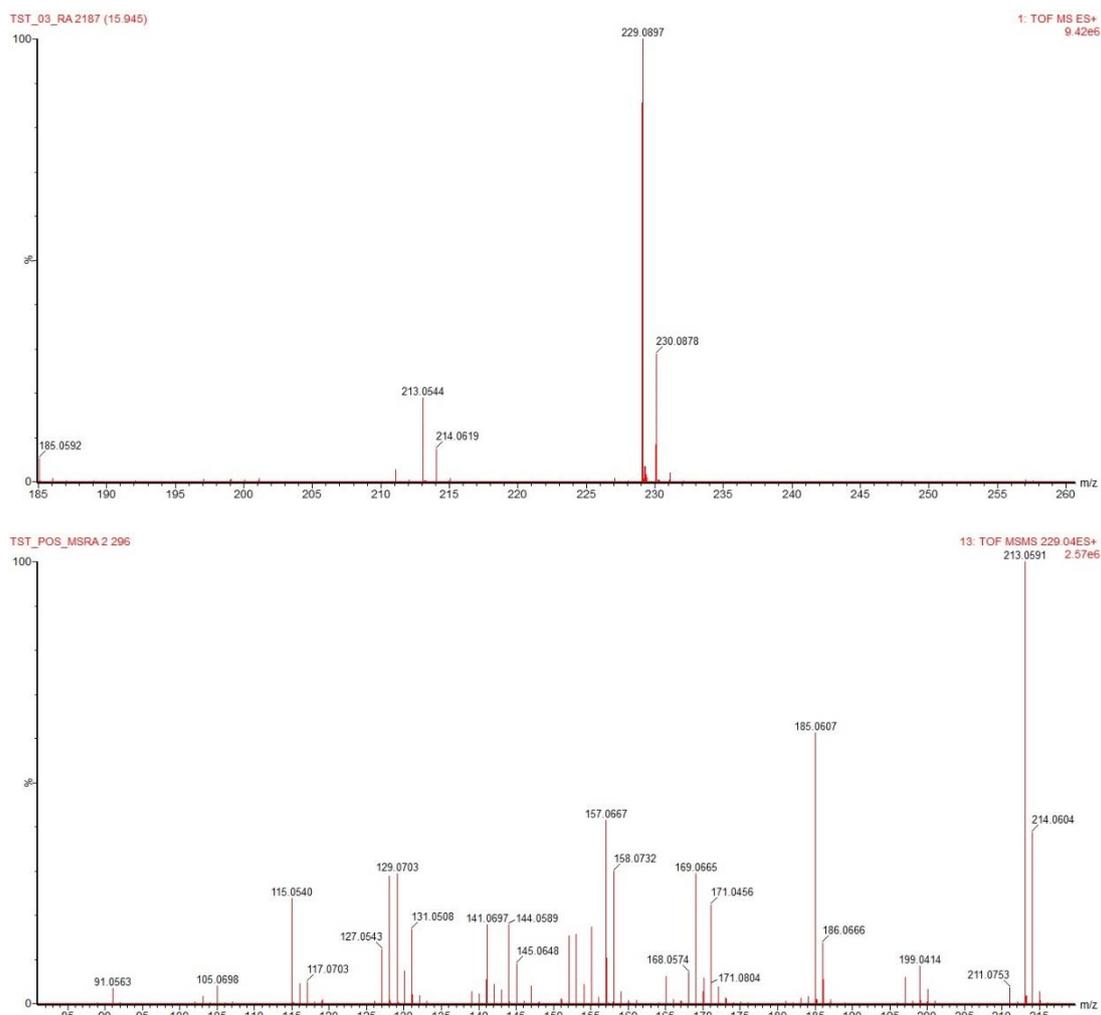


FIGURA 5. 34 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  229,08 no tr 15,9 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular xantiletina (acima).

De acordo com as análises feitas pelo *S-plot* a banda correspondente a cumarina linear xantiletina mostra maiores áreas nas matrizes das raízes de tangerina Sunki Tropical (TSTRA) do que nas matrizes controle das raízes denominadas como sadia (TSTRATE). Aumentando assim a sua concentração. A cumarina xantiletina tem atividades antiplaquetária, anticancerígena, tem bom potencial herbicida e um controle em inibições a determinados fungos (KHAN, 1985). Para as principais fragmentações da cumarina linear xantiletina no modo de ionização positivo, segue abaixo a proposta de fragmentação de acordo com a FIGURA 5.35, assim como a proposta para a fragmentação do íon molecular em  $m/z$  185, como mostra a FIGURA 5.36.

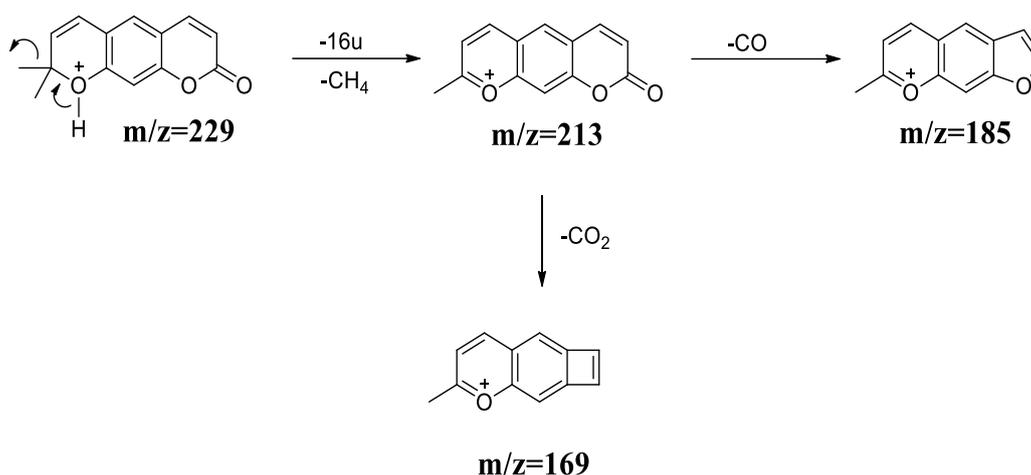


FIGURA 5. 35 - Esquema de proposta de fragmentação para a cumarina linear xantiletina (ESI, modo positivo).

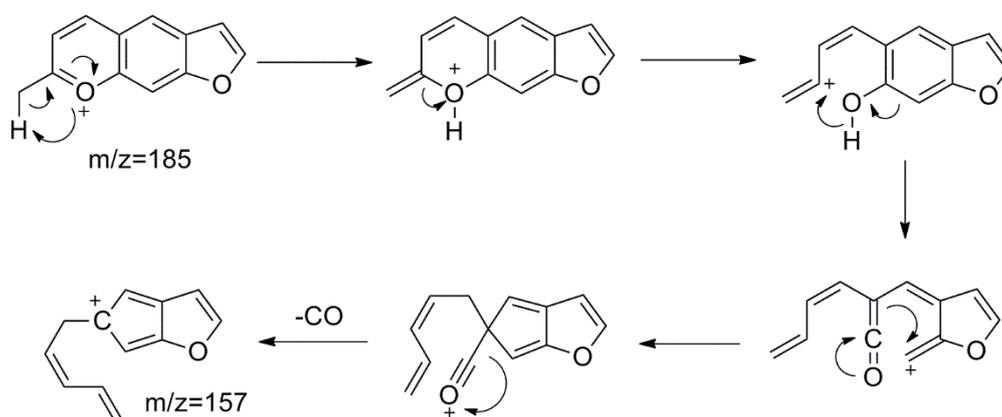


FIGURA 5. 36 -- Esquema ilustrativo da proposta de fragmentação do íon m/z 185 a m/z 157

Na banda 6 com tr de 16,17 min, foi proposto como sendo característico da cumarina angular Seselina, esse composto é comum na família das Rutaceae, presente em quantidades razoáveis nas raízes de citros, com atividade biológica tem se destacado por possuir efeitos anti-proliferativo em várias linhagens de células cancerosas como linfomas e leucemia. O espectro de seu íon produto apresentou um fragmento característico para esse tipo de piranocumarinas, com m/z 175 e m/z 147 como mostra a FIGURA 5. 37 abaixo.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

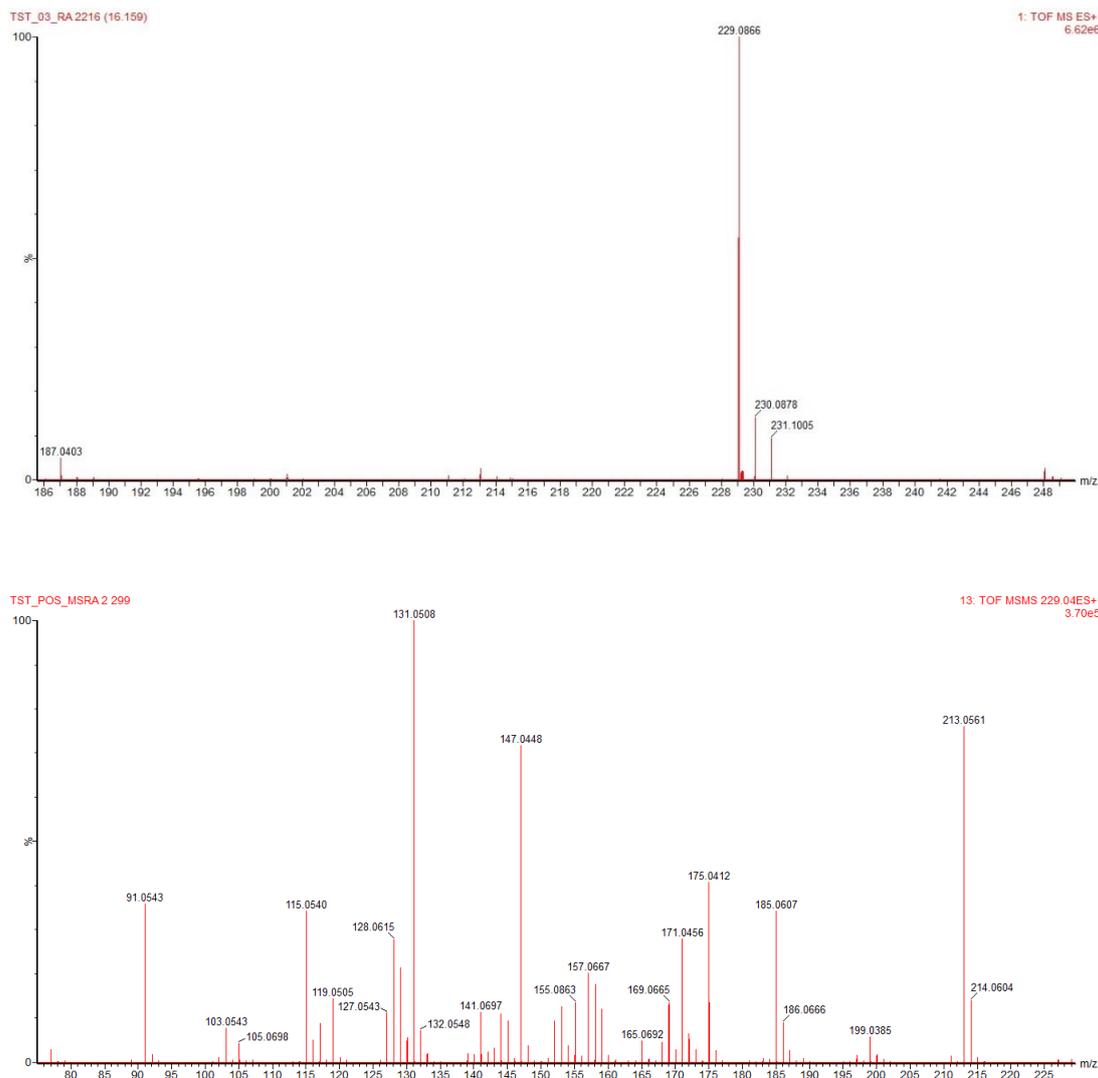


FIGURA 5. 37 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  229,08 no tr 16,17 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da seselina (acima).

Nesse caso, a diferença entre os dois isômeros, cumarina xantiletina e seselina está na presença do fragmento citado acima, essa cumarina tem uma forma angular o que se diferencia da xantiletina que é uma cumarina linear. Apesar desse fragmento  $m/z$  175 não ser o mais abundante no espectro do íon produto na seselina, ele se diferencia quando se compara os espectros de íons dessas cumarinas, pois esse íon não aparece no espectro de íons produtos da xantiletina. Uma outra evidencia foi com estudos de Soares 2011, que ao quantificar essa cumarina, ele utiliza esse íon como fragmento característico para identifica-la em experimentos de MRM. Um outro fato que pode ser considerado importante

também que em análises de MRM em baixa resolução em algumas amostras o pico base característico de xantiletina  $m/z$  213 não foi detectado ou foi detectado em uma intensidade bem menor, isso acontece devido ao detrimento da formação do íon tropílico conjugado ao anel furânico de  $m/z$  131 que parece ser mais estável em cumarinas 8-C alquil substituídas, portanto sugere-se dessa maneira que essa cumarina não seja linear como anterior, mas sim angular, com anel pirano ligado aos C7 e C8.

De acordo com as análises feitas pelo *S-plot* a banda correspondente a cumarina angular seselina mostra maiores áreas nas matrizes das raízes de tangerina Sunki Tropical (TSTRA) do que nas matrizes controle das raízes denominadas como sadia (TSTRATE). Aumentando assim a sua concentração. Como proposta para as fragmentações ilustrada na FIGURA 5.38 nos espectros de íons produtos temos:

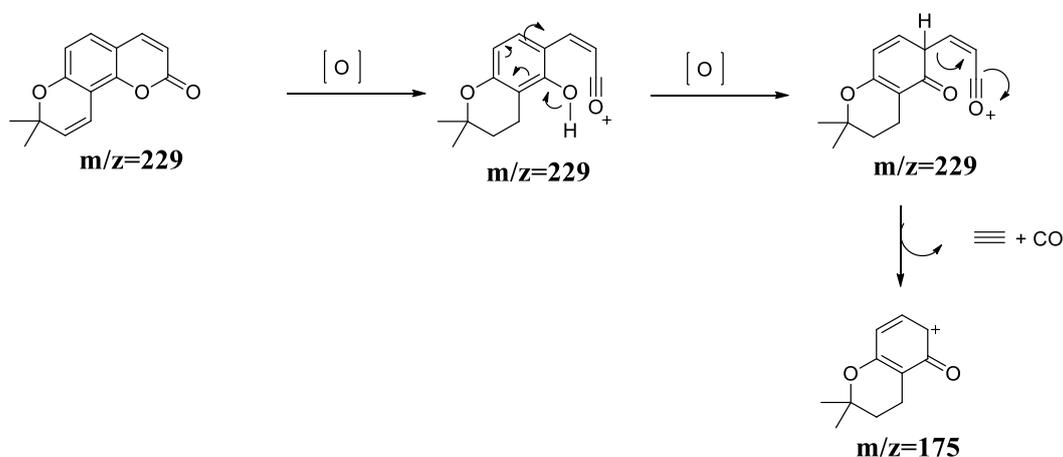


FIGURA 5. 38 - Esquema de proposta de fragmentação para a cumarina angular seselina (ESI, modo positivo).

Para as bandas cromatográficas 7, 9 e 10 com os tr 16,99; 17,80 e 17,94 min respectivamente, apresentaram  $m/z$  259.0985, cuja a massa monoisotópica neutra 258,0894 e 258,0887 Da, referente a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ . A comparação com o levantamento de dados feito para essa tese, levou a três isômeros de furanocumarinas (xantoxiletina, luvangetina, 5-metoxiseselina) como mostra a FIGURA 5.39. As bandas cromatográficas das cumarinas se encontram na FIGURA 5.40.

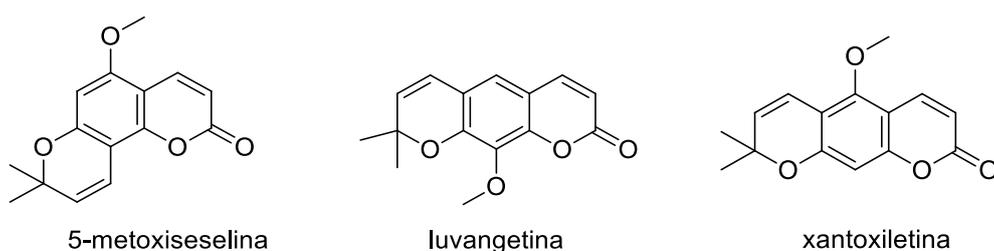


FIGURA 5. 39 - Estrutura das piranocumarinas de massa neutra  $m/z$  258,08 Da, referente a  $m/z$  259,0985 e  $m/z$  259,0802.

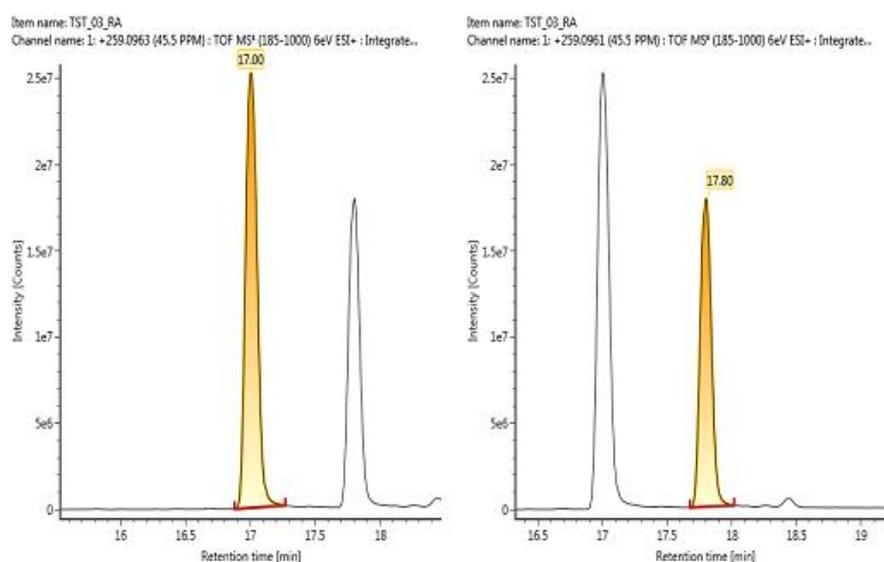


FIGURA 5. 40 – Cromatogramas de íons extraídos das piranocumarinas 5-metoxiseselina (17,00) e xantoxiletina (17,80).

O espectro de massa com  $tr$  16,99 min, mostrou um pico base referente à perda de 70 Da, com a  $m/z$  189, como pode-se observar na FIGURA 5.41, esse pico é característico da piranocumarina 5-metoxiseselina, como pode ser visto em sua proposta de fragmentações, na FIGURA 5.42. Quando se analisa o espectro de íons produtos é possível observar a presença do íon  $m/z$  131 que é característico de uma das fragmentações do íon  $m/z$  189. Sua concentração nas raízes de TST sofreu aumento quando comparado a amostras sadias.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

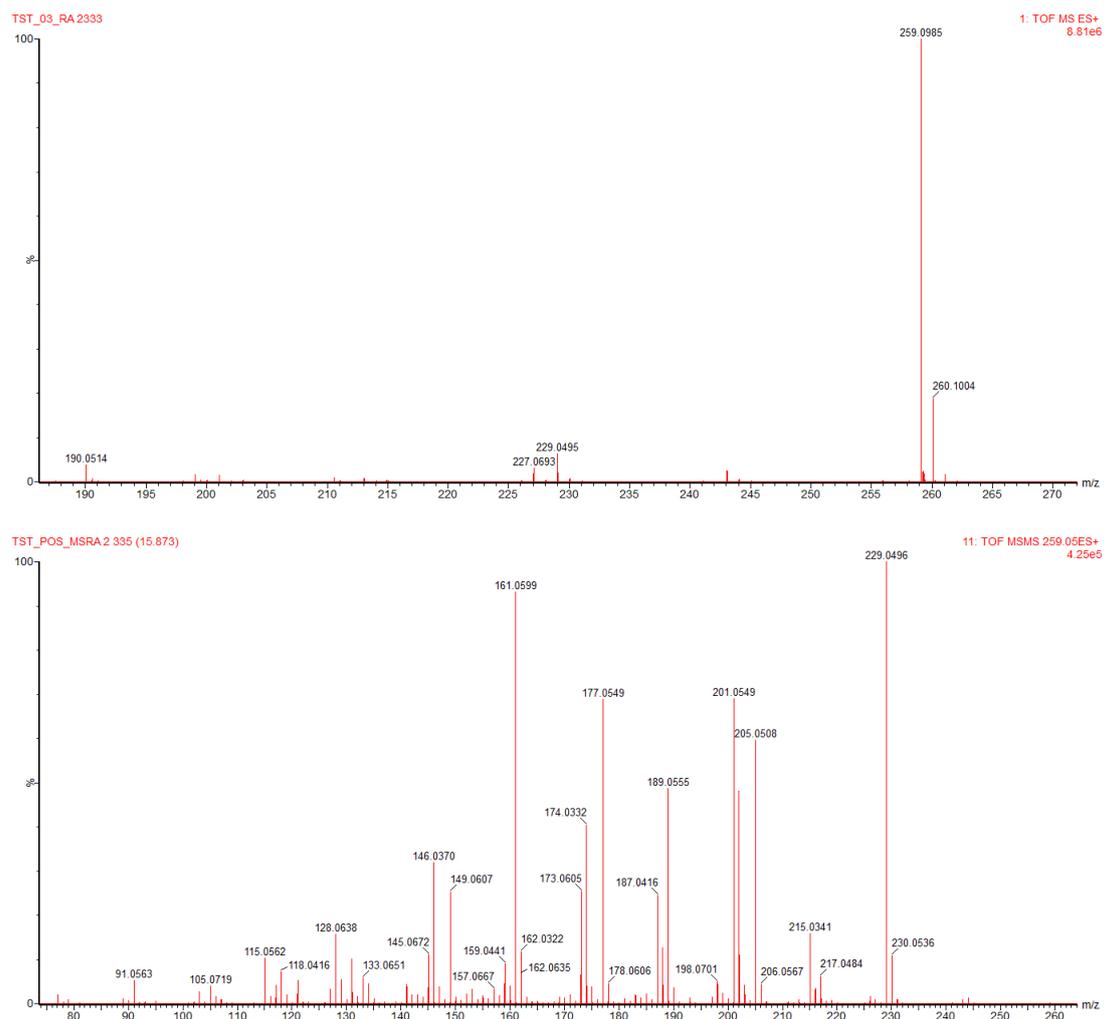


FIGURA 5. 41 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  259,05 no tr 16,99 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular 5-metoxiseselina (acima).

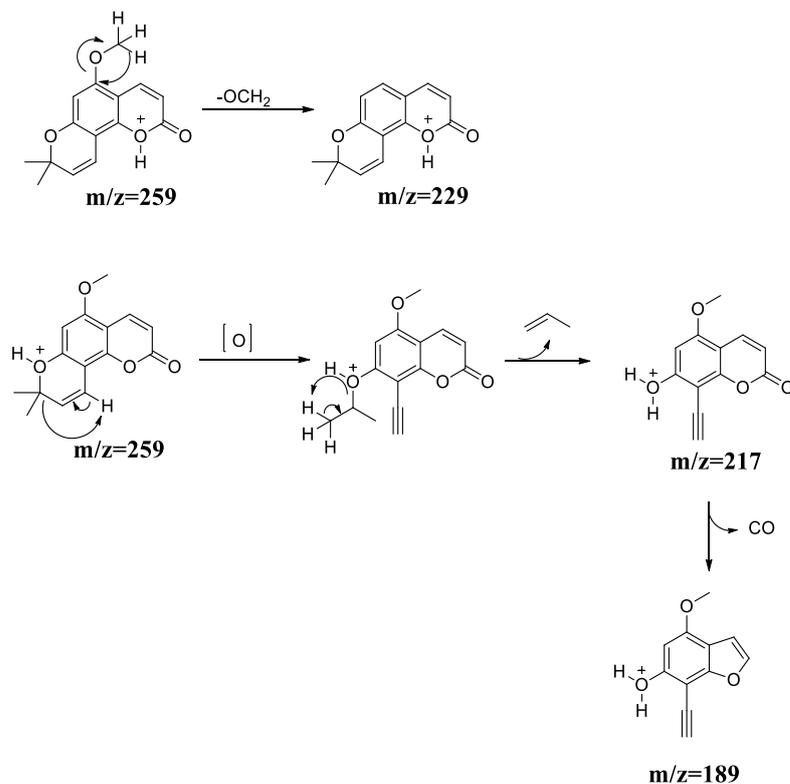


FIGURA 5. 42 - Esquema de proposta de fragmentação para a piranocumarina angular 5-metoxiseselina (ESI, modo positivo).

Na banda 9 com tr 17,80 min, há presença de íons característicos da piranocumarina linear xantoxiletina, pois não foi observado no cromatograma de íons produtos FIGURA 5.43, os picos característicos em  $m/z$  257 e  $m/z$  227, que vem sendo característico de perda de  $H_2$  e logo ocorrendo uma perda da metoxila, quando a mesma se encontra na posição C-7 da cumarina, esse tipo de fragmentação pode ser visto na proposta para xantoxiletina como é mostrado na FIGURA 5.44, dessa maneira, foi descartado nesse tempo de retenção a possibilidade de ser o seu isômero luvangetina. A banda 9 trata-se então da cumarina xantoxiletina, onde é possível observar um fragmento com  $m/z$  201,  $m/z$  173 e  $m/z$  147. Essa cumarina também aumentou a sua concentração nas amostras de TSTRA.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

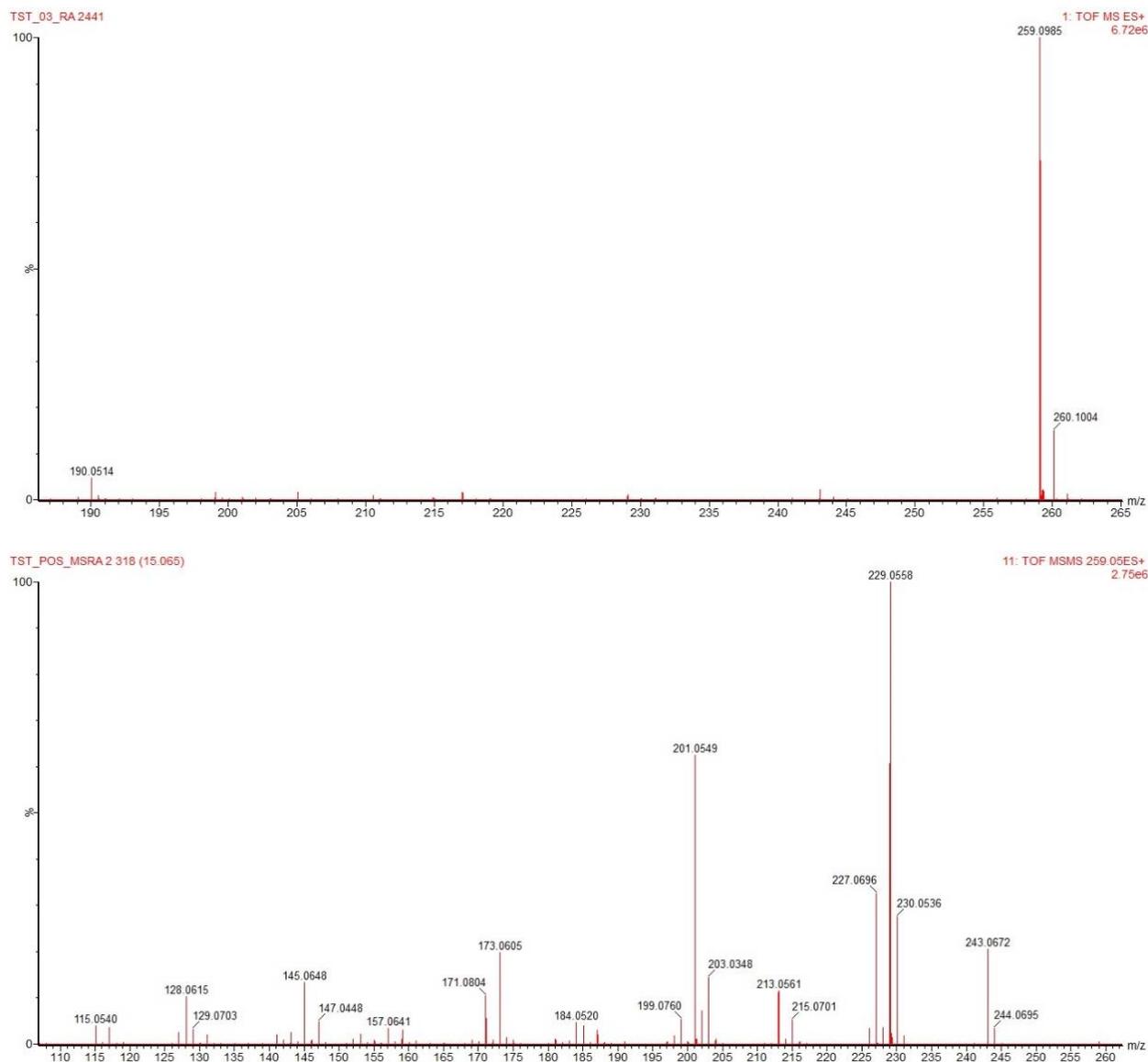


FIGURA 5. 43 -Espectro de massas para o íon m/z 259,0558 no tr 17,80 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular xantoxiletina (acima).

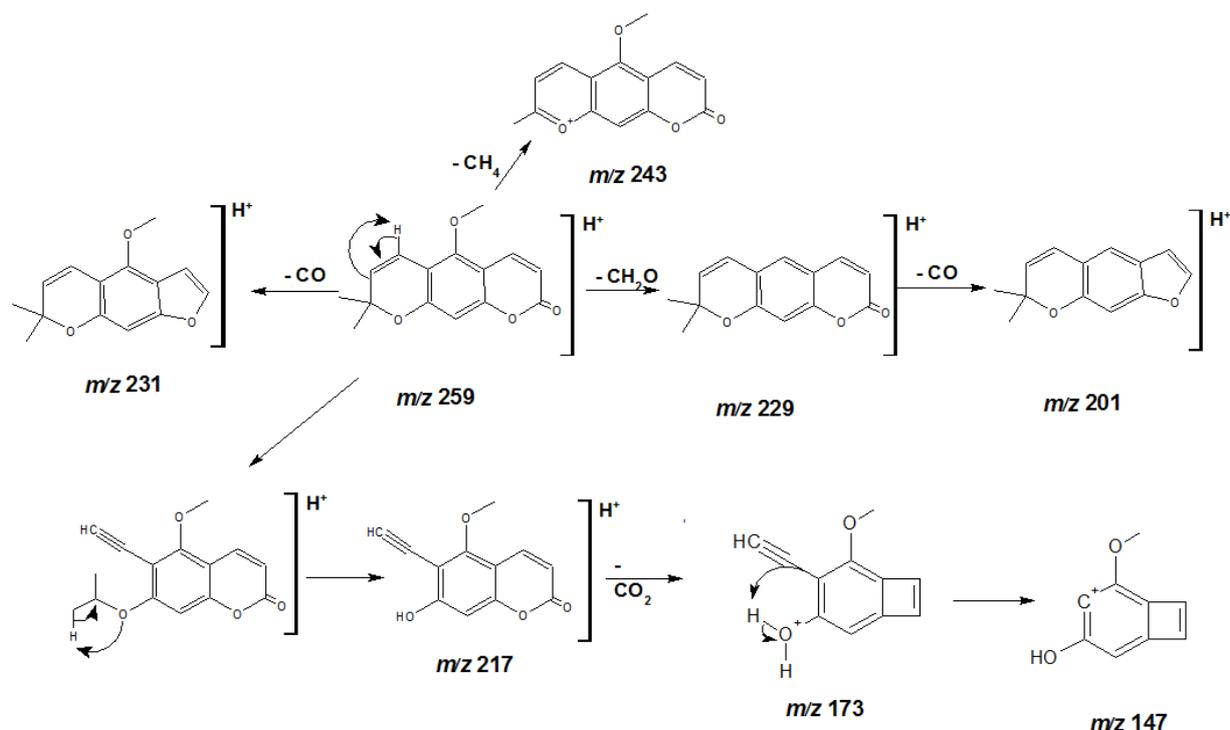


FIGURA 5. 44 - Esquema de proposta de fragmentação para a piranocumarina xantoxiletina (ESI, modo positivo).

Para a banda 10, é proposto a cumarina luvangetina de acordo com suas fragmentações como mostra a FIGURA 5.45, pois foi possível observar que em suas fragmentações ocorre perda de hidrogênios e em seguida de metoxila quando estas estão localizadas no carbono sete (C7), como mostra na FIGURA 5.46, nessa banda também foi possível observar que houve um aumento na concentração nas amostras de TSTRA quando comparados as plântulas saudias das raízes.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

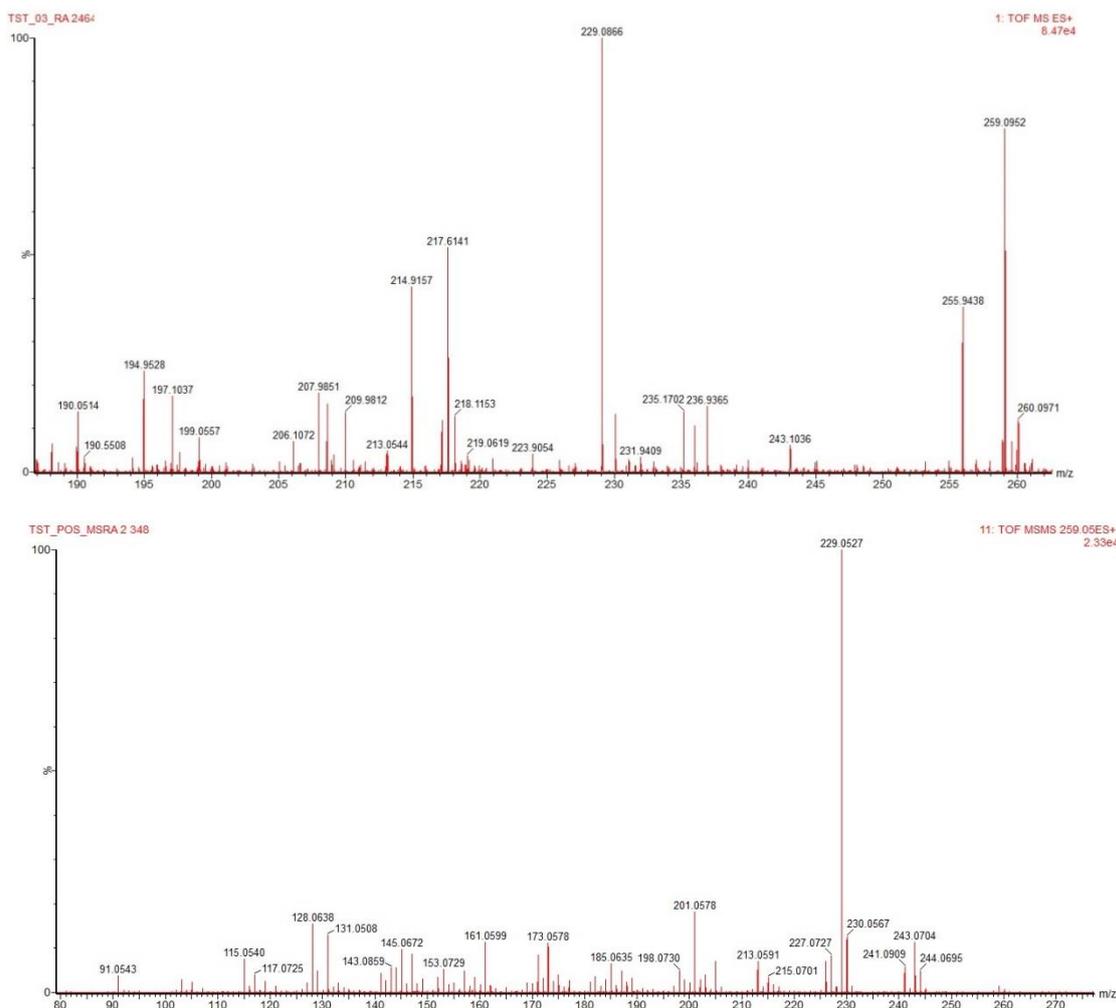


FIGURA 5. 45 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  259,0952 no tr 17,94 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da luvangetina (acima).

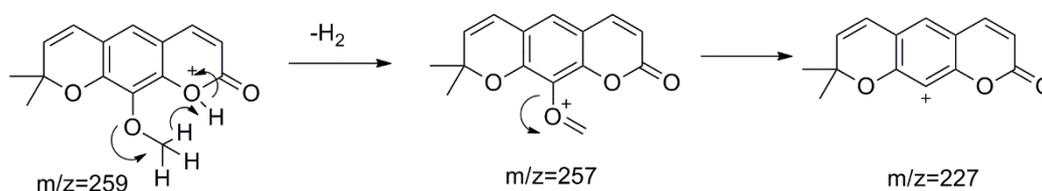


FIGURA 5. 46 - Esquema de proposta da fragmentação para a luvangetina (ESI, modo positivo).

No pico 1 com tr 10,58 min, a banda cromatográfica apresentou íons pseudomolecular com  $[M+H]^+$  de  $m/z$  267,0680 com adutos de  $Na^+$ , referente ao  $m/z$  245,0787, correspondente a fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_4$ , com erro na massa monoisotópica exata calculada e a experimental em 0,6 mDa. Na busca de possíveis

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

compostos para esse valor de massa, foi possível inferir a possibilidade de algumas substâncias como a ostenona, suberenona, seselinol, 5-hidroxiseselina, suberosina, mas ao analisar os íons com detalhes, a presença da  $m/z$  213 (FIGURA 5.47), que é proveniente de uma perda de MeOH, foi possível excluir a possibilidade de ser a cumarina 5-hidroxiseselina.

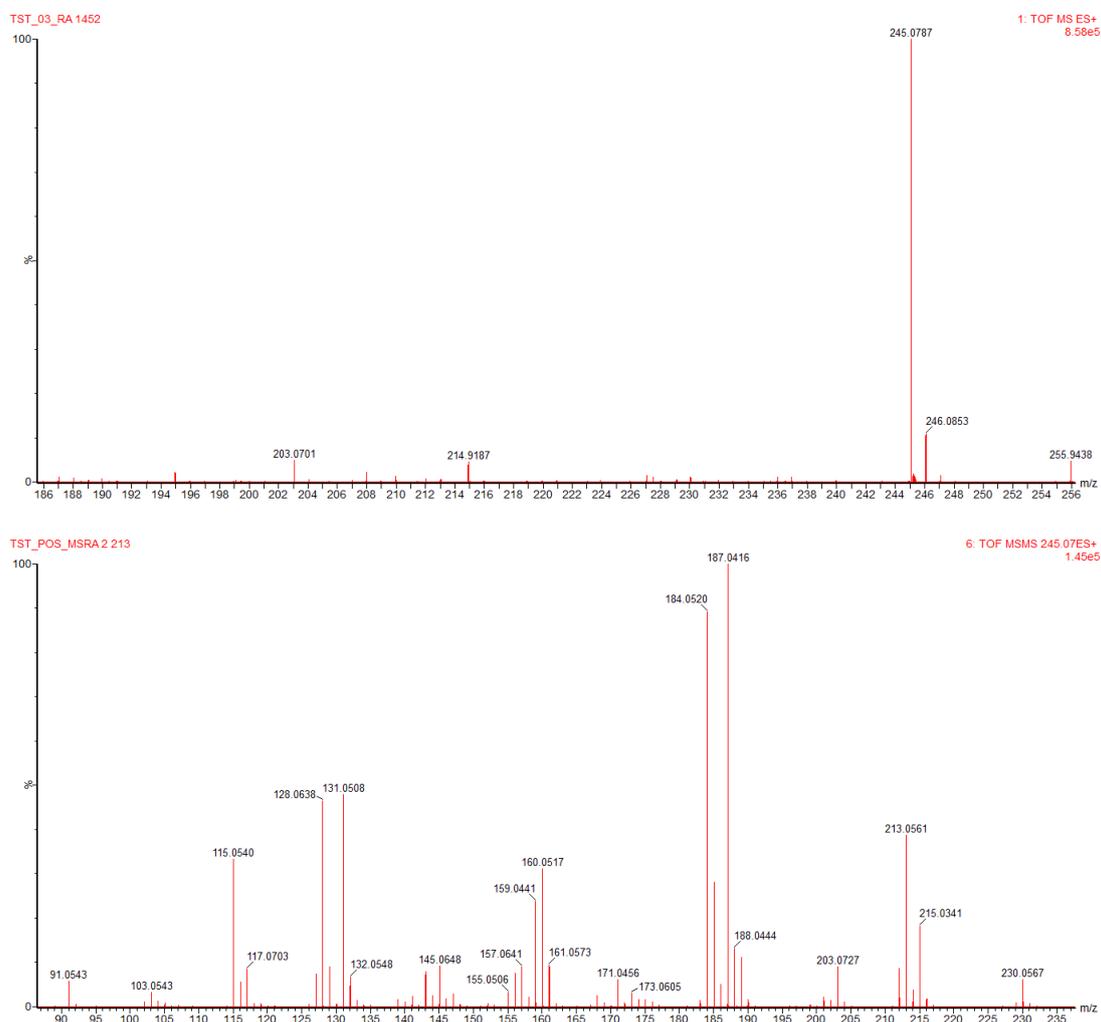


FIGURA 5. 47 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  245,0719 no tr 10,58 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da suberenona (acima).

Observando o pico base  $m/z$  187 foi possível propor que a banda se tratava da cumarina suberenona e não de seus demais isômeros, pois é uma estrutura que permite que ocorra fragmentações via radicalar, assim levando a formação intensa do pico em  $m/z$  187. Um outro pico característico também para essa cumarina

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

é a presença da fragmentação em  $m/z$  131, como é mostrado na proposta de fragmentação dessa cumarina, ilustrada na FIGURA 5.48. Nesse caso na comparação de perfil químico metabolômico essa banda diminuiu na amostra TSTRA, propondo que pode ter sido inibido sua biossíntese quando comparado as demais bandas, que até o momento suas cumarinas identificadas nas raízes dessa plântula estão sofrendo um aumento em sua concentração relativa em relação a sua área, como mostra a FIGURA 5. 49.

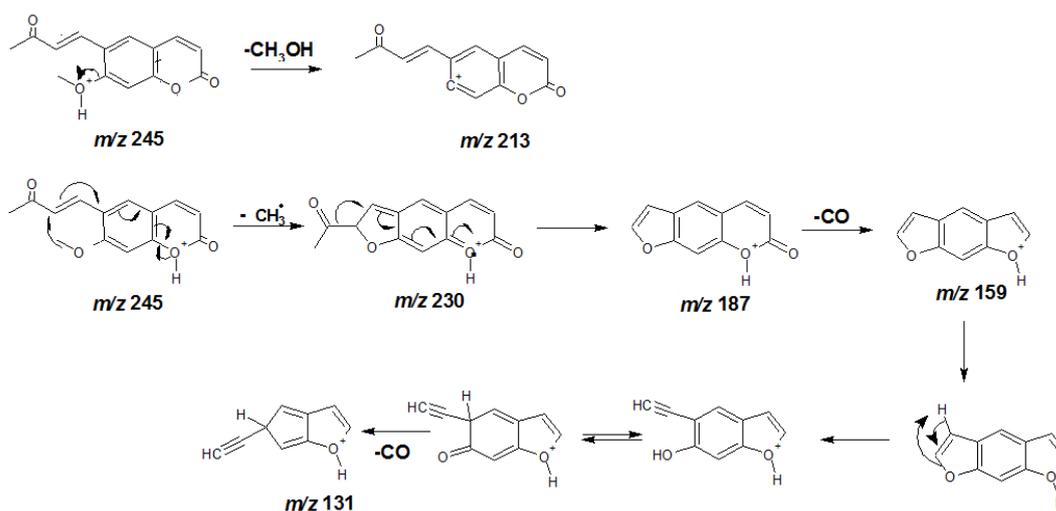


FIGURA 5. 48 - Esquema de proposta da fragmentação para a suberenona (ESI, modo positivo).

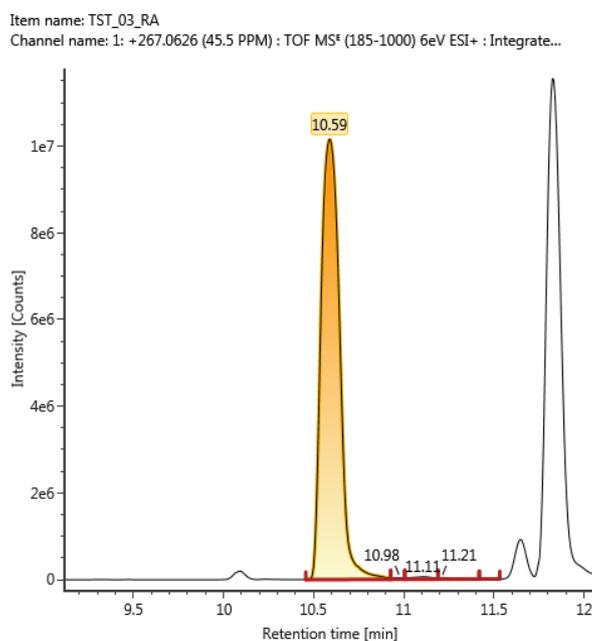


FIGURA 5. 49 – Cromatograma de íon extraído da cumarina suberenona (10,59).

Na banda 2 com tr 12,35 min, levou a um pico com m/z 261,1142 com 0,6 mDa de diferença na massa experimental da massa teórica das cumarinas tamarina, suberenol, merazina, isomerazina e cedrelopsina, como mostra a FIGURA 5.50.

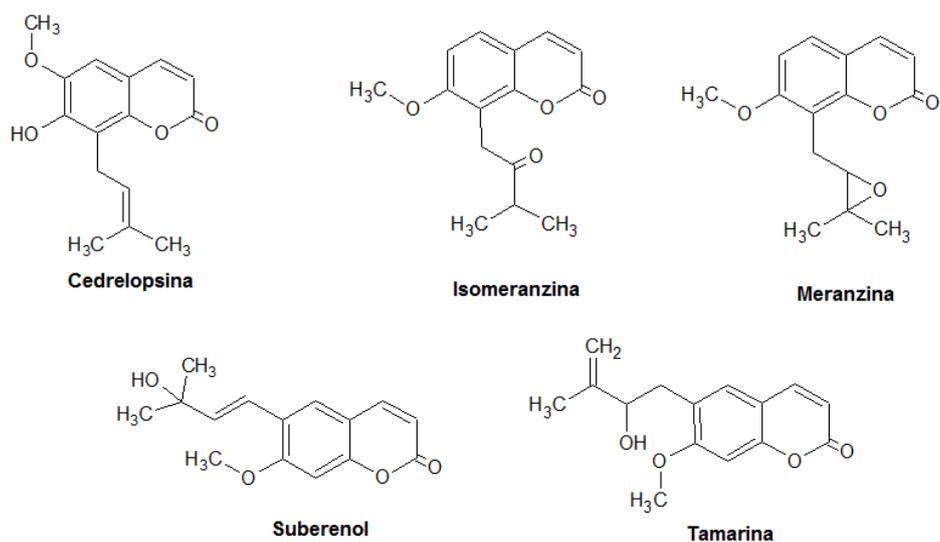


FIGURA 5. 50 - Estrutura das cumarinas de massa neutra 260,1048 Da referente ao m/z 261,1142.

De acordo com o estudo já realizado de SOARES 2011, foi possível observar em seu perfil cromatográfico a presença de um pico base em m/z 203 que é característico de uma perda da unidade de acetona da molécula e das cumarinas com massa neutra de 260,1048 citadas acima, uma das substâncias que podem sofrer esse tipo de fragmentação característica é a cumarina suberenol. Ainda com estudos por identificação de moléculas por HPLC-APCI-EM no modo positivo de ionização, SOARES, observou que para a cumarina tamarina como mostra a FIGURA 5.51, o pico base observado foi m/z 191, com fragmentações características em m/z 189 para m/z 161. Portanto nesse caso, podemos inferir que a cumarina que temos é a tamarina (FIGURA 5.52), que por sua vez está sofrendo um aumento em sua concentração em amostras de TSTRA. A proposta que diferencia as substâncias está nas FIGURAS 5.53 para suberenol e 5.54 para a tamarina.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

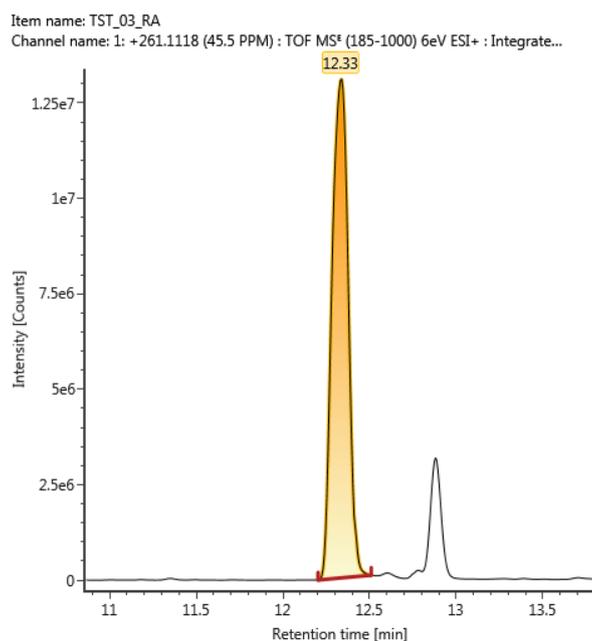


FIGURA 5. 51 – Cromatograma de íon extraído da cumarina tamarina (12,33).

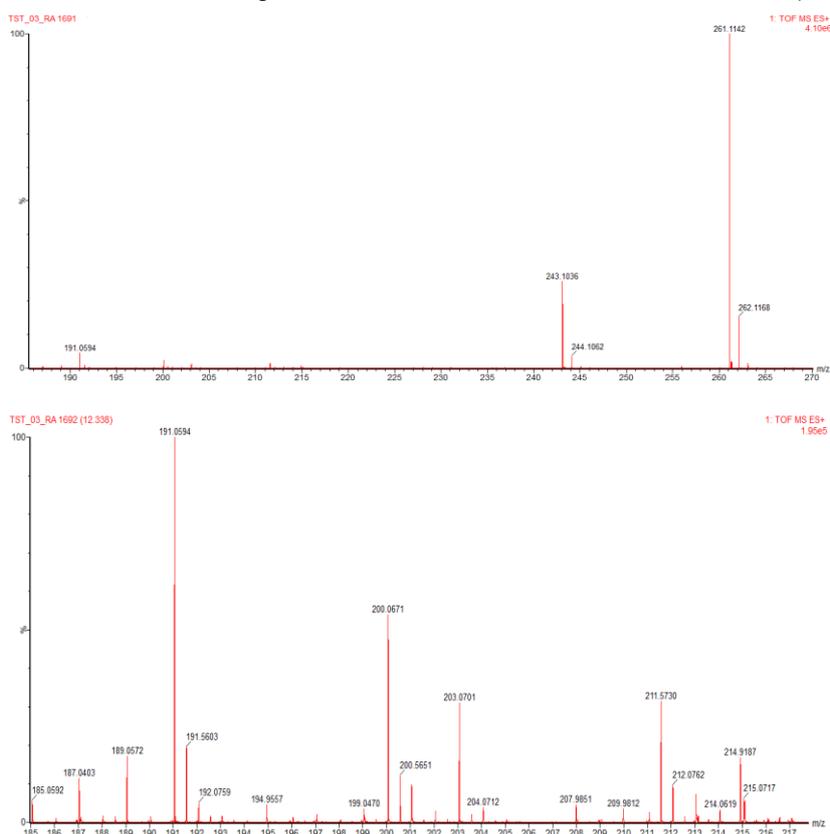


FIGURA 5. 52 - espectro de massas para o íon  $m/z$  245,0719 no tr 10,58 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da tamarina (acima).

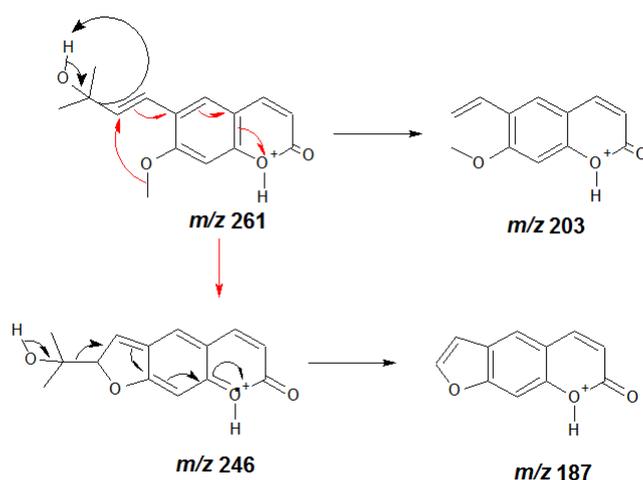


FIGURA 5. 53 - Esquema de proposta da fragmentação para o suberenol (ESI, modo positivo).

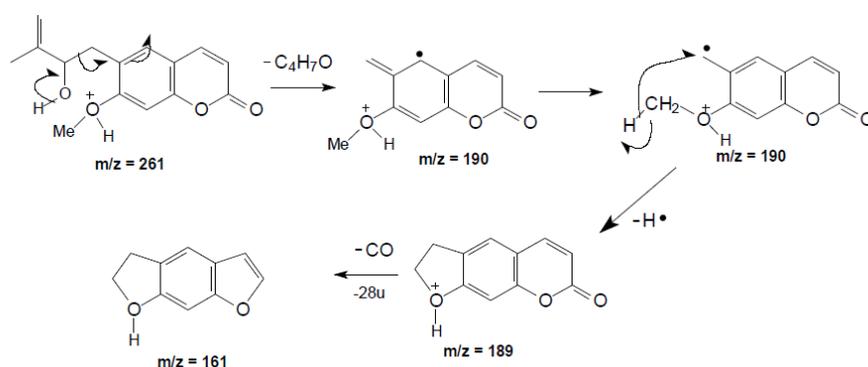


FIGURA 5. 54 - Esquema de proposta da fragmentação para a tamarina (ESI, modo positivo).

No pico 11 do cromatograma de íons com tr em 19,35 min possui uma banda bem intensa em relação ao controle de plântulas saudias nas raízes de tangerina Sunki Tropical, esse pico está relacionado as cumarinas com um íon molecular de  $m/z$  245,1172 com valores de 0,7 mDa de erro em relação as massas teóricas de cumarinas do tipo suberosina e ostol (FIGURA 5. 55). No perfil de suas fragmentações pode-se observar íons fragmentados característicos para as duas cumarinas, como  $m/z$  de pico base 187, como mostra a FIGURA 5.56, porém um pico característico que pode levar a diferenciação desses dois isômeros é a presença de uma  $m/z$  em 131 com grande intensidade, pois este é caracterizado pela baixa estabilidade do fragmento devido a não linearidade da conjugação do sistema aromático formado, portanto tende a se fragmentar até formar o íon tropílio conjugado ao anel furânico, onde ocorre principalmente em cumarinas C8 alquil substituídas, assim leva-se a crer

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

que estamos tratando da cumarina ostol e não da suberosina como pode ser visto em sua proposta de fragmentação na FIGURA 5.57, pois na suberosina a posição da prenila se encontra no C6, onde leva a diferenças, por exemplo em suas propriedades físicas e químicas, nesse caso por exemplo o ostol é bem mais polar do que a suberosina.

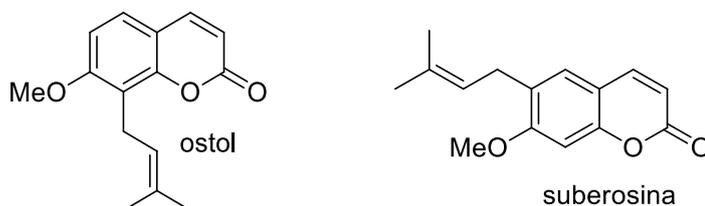


FIGURA 5. 55 - Estrutura das cumarinas de massa neutra 244,1099Da referente ao m/z 245,1172.

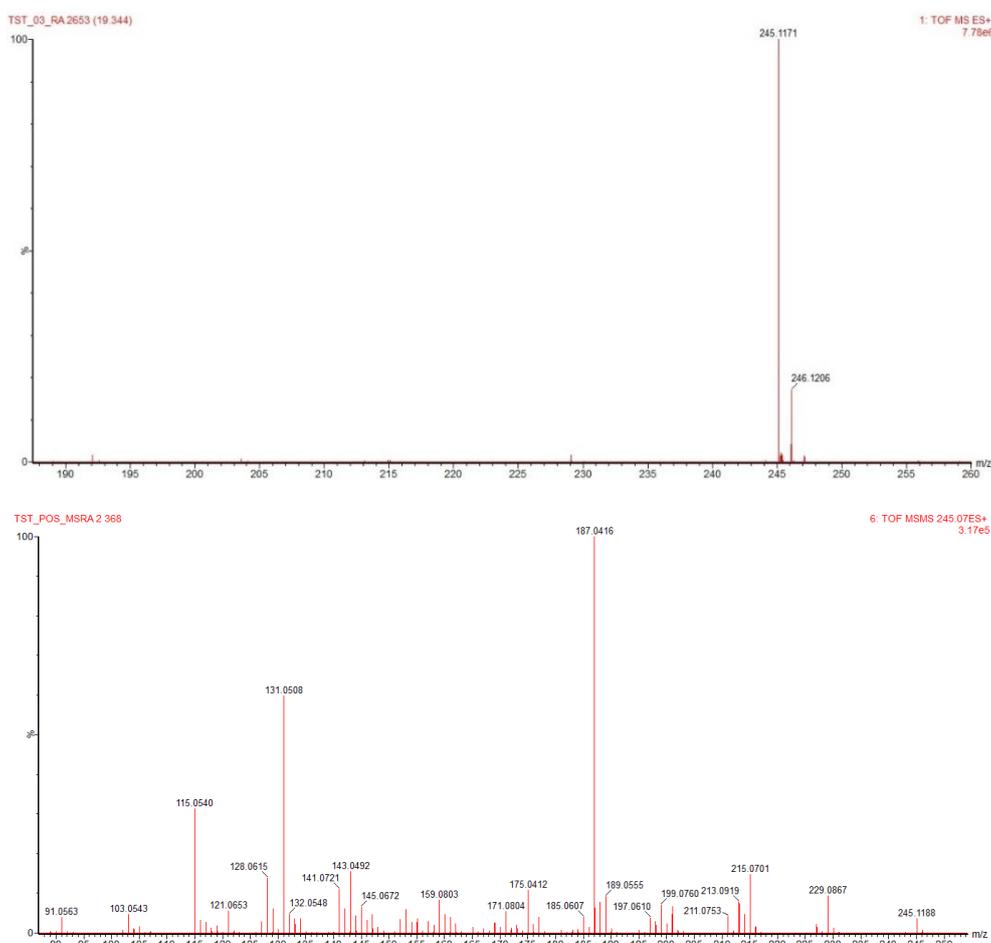


FIGURA 5. 56 - Espectro de massas para o íon m/z 245,1188 no tr 19,35 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do ostol (acima).

Como proposta para a fragmentação temos:

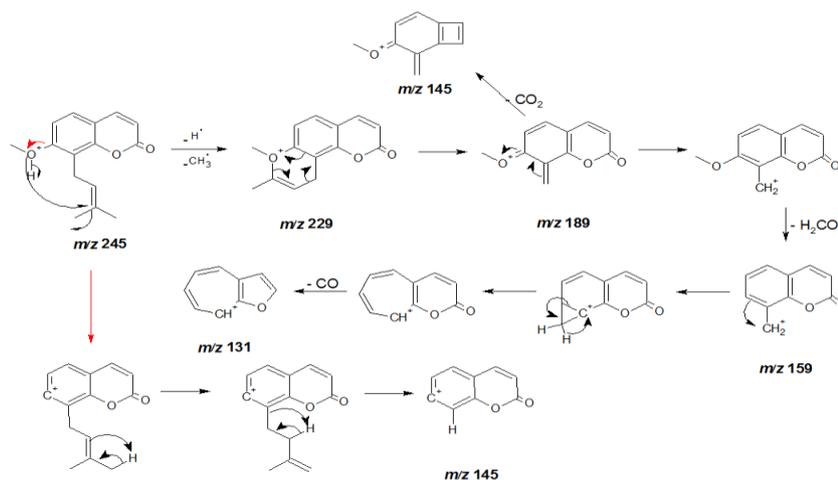


FIGURA 5. 57 - Esquema de proposta da fragmentação para a cumarina ostol (ESI, modo positivo).

No cromatograma de íons mostrado para  $m/z$  245,1188 com as suas respectivas áreas analisadas para cada matriz, foi possível avaliar que a concentração de ostol no porta enxerto de Tangerina Sunki Tropical aumentaram bastante, cerca de quase 100% (FIGURA 5. 58) quando comparadas as amostras de TSTRATE (sadia), onde é notório a produção desse composto nas plântulas com sintomas de gomose de citrus nas raízes de TST. Na comparação dos dados para o ostol com a produção de cumarinas preniladas em C6, como a xantiletina, evidencia que ao aumentar a produção dessa cumarina, conseqüentemente também ocorre um aumento na cumarina prenilada C8 como a seselina e ostol, quando comparadas as plântulas sadias de TST que é susceptível ao oomiceto *Phytophthora nicotianae*, o mesmo conseqüentemente acontece com o próximo pico discutido a seguir.

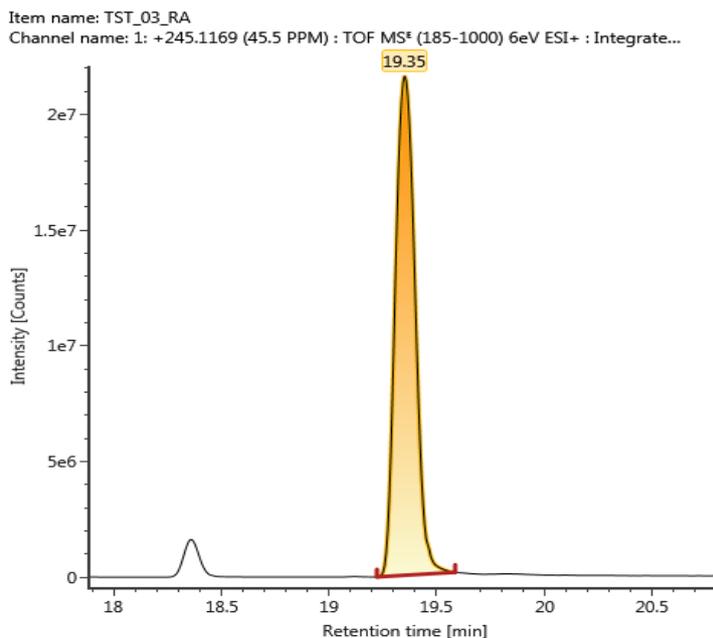


FIGURA 5. 58 – Cromatograma de íons extraídos da cumarina ostol (19,35).

Na análise da banda cromatográfica 12 com tr em 19,71 min mostrou-se um íon quasimolecular  $m/z$  313,1413. O espectro de íons produtos de  $m/z$  313 (FIGURA 5.59) permitiu identificar a cumarina nordentatina. O cromatograma do íon selecionado para  $m/z$  313 com as respectivas áreas para cada matriz estudada mostram a presença dessa cumarina somente na plântula de TSTRA aquela inoculada com o oomiceto, evidenciando que houve uma produção característica para esse composto. Podemos levar em consideração já que a nordentatina deriva biossinteticamente da xantiletina (DEWICK, 2009) por uma hidroxilação em C5 e uma prenilação em C8, mas o ataque ocorre em unidades de dimetilalilpirofosfato (C3), logo que se há um aumento na formação da cumarina xantiletina, leva a crer que essa produção da cumarina nordentatina está sendo favorecida em C6 na presença do patógeno. A cumarina nordentatina em amostras doentes TST teve um aumento considerado quando analisamos a área relativa de seu pico, como mostra a FIGURA 5.60. A proposta de fragmentação para a nordentatina segue na FIGURA 5.61.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

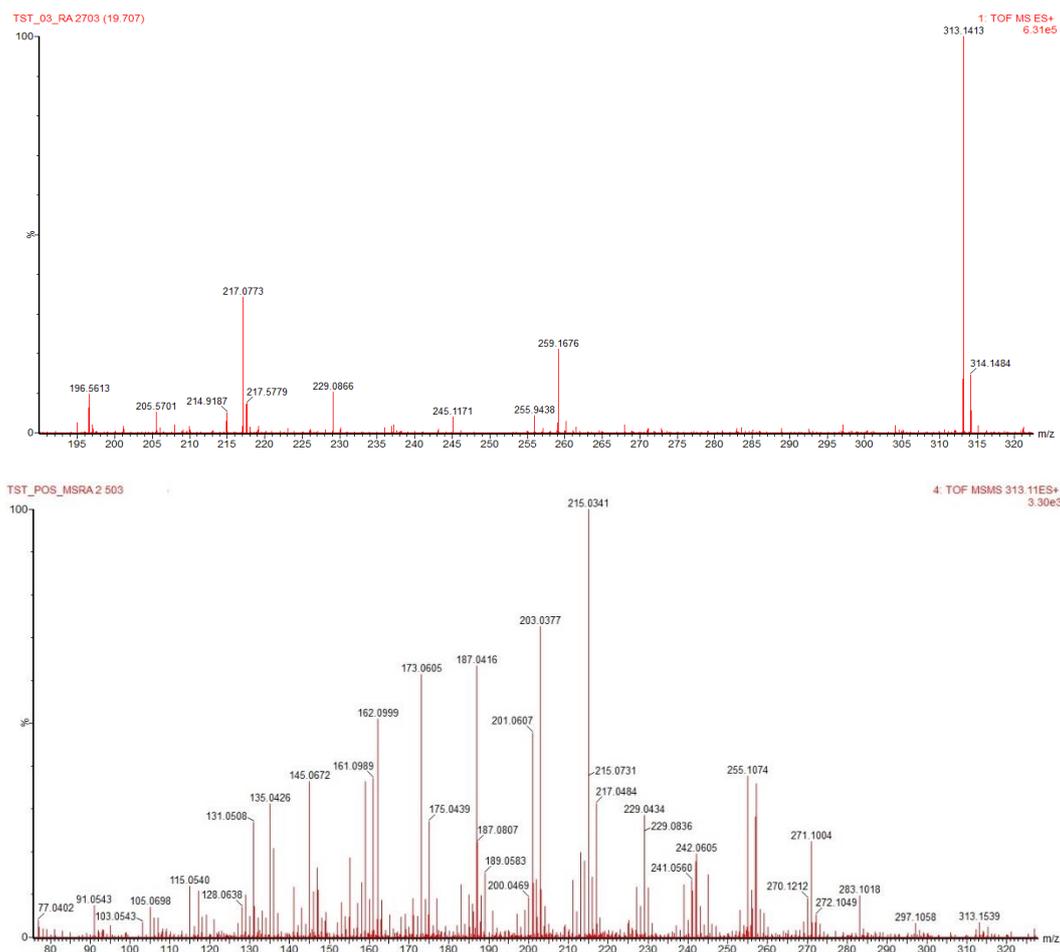


FIGURA 5. 59 - Espectro de massas para o íon m/z 313,1413 no tr 19,71 min encontrado nas raízes de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da nordentatina (acima).

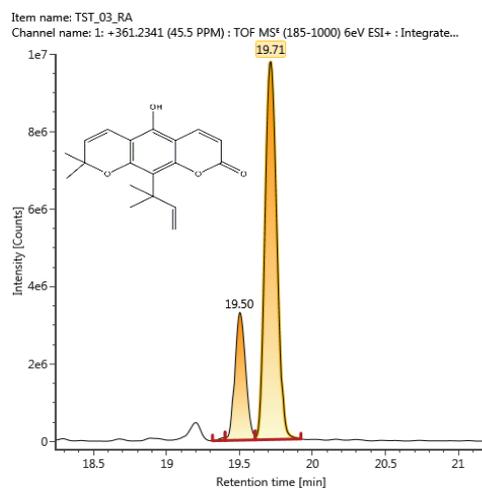


FIGURA 5. 60 – Cromatograma de íons extraídos da cumarina nordentatina 19,71 min.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

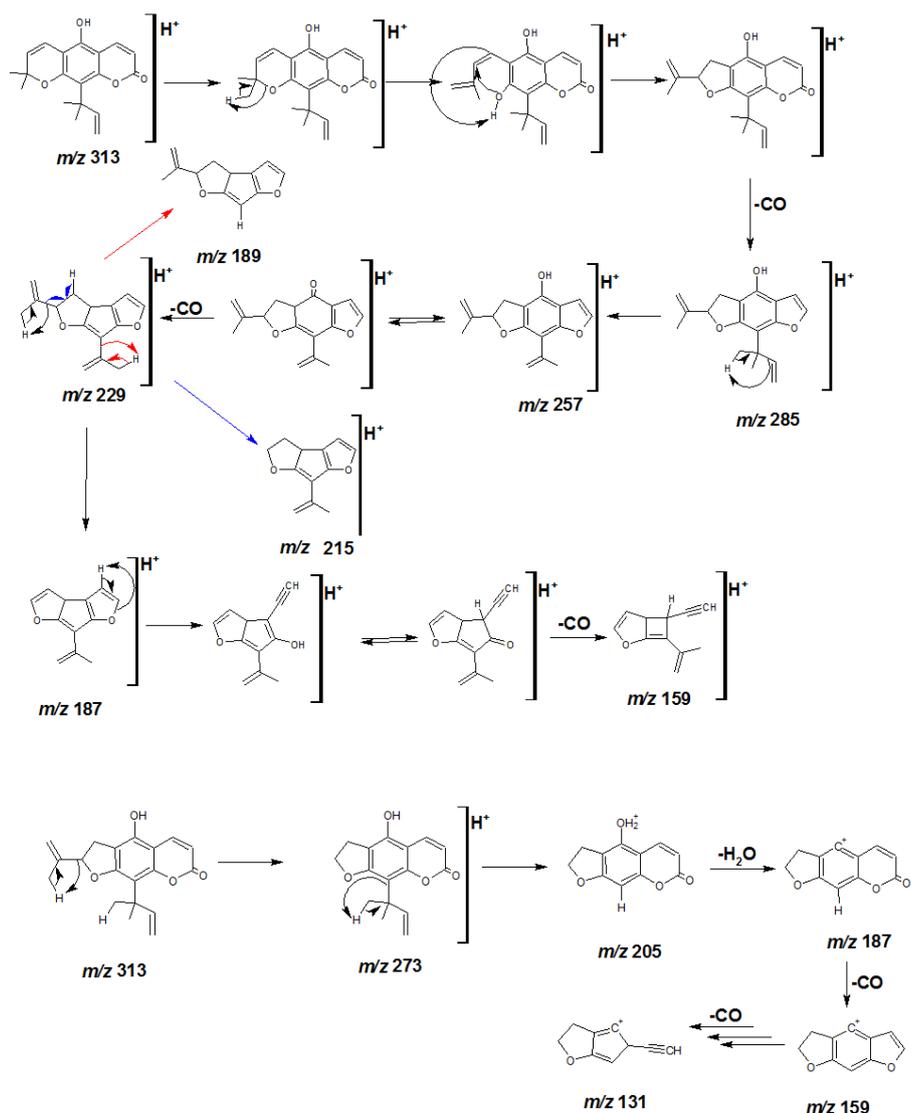


FIGURA 5. 61 - Esquema de proposta da fragmentação para a cumarina nordentatina (ESI, modo positivo).

Por fim as bandas **3 e 7** de  $t_r$  de 14,84 e 17,63 min, mostraram como o íon pseudomolecular  $m/z$  684,1498 e  $m/z$  369,1327 respectivamente. Estes infelizmente, até o momento de escrita da tese, ao consultar o levantamento bibliográfico para *Citrus sinensis* e os bancos de dados disponíveis *online* não foi encontrado nenhuma proposta para esses dois íons moleculares. Torna-se um fato interessante a retornar um estudo mais detalhado, em busca de fragmentos de íons produtos, pois pode se tratar de metabólitos inéditos. Segue abaixo, a TABELA 5.5 dos principais metabólitos que variaram em seu perfil metabolômico de TST nas raízes com suas respectivas massas e tempo de retenção.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

TABELA 5. 5 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico nas raízes das plântulas de TST.

<b>Banda</b>	<b>t<sub>r</sub> (min)</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>Substância</b>	<b>Maior Produção</b>	<b>Variação</b>
<b>1</b>	10,58	267,0680	Suberenona	TSTRATE	2,02
<b>2</b>	12,35	261,1143	Tamarina	TSTRA	9,13
<b>3</b>	14,84	684,1498	NI*	TSTRA	36,43
<b>4</b>	15,95	229,0898	<b>Xantiletina</b>	TSTRA	<b>15,93</b>
<b>5</b>	16,17	229,0866	<b>Seselina</b>	TSTRA	<b>5,78</b>
<b>6</b>	16,99	259,0985	5-Metoxiseselina	TSTRA	1,76
<b>7</b>	17,63	369,1327	NI*	TSTRA	8,90
<b>8</b>	17,80	259,0985	<b>Xantoxiletina</b>	TSTRA	<b>11,76</b>
<b>9</b>	17,94	259,0952	Luvangetina	TSTRA	4,20
<b>10</b>	18,50	377,2296	NI*	TSTRA	7,40
<b>11</b>	19,35	245,1172	<b>Ostol</b>	TSTRA	<b>146,9</b>
<b>12</b>	19,71	313,1413	<b>Nordentatina</b>	TSTRA	<b>55,89</b>

NI= não identificado até o momento da escrita da tese\*

Continuando analisando as demais matrizes das plântulas agora as de Citrumeleiro Swingle (resistente ao patógeno da gomose) nas raízes foi possível observar variações de substâncias similares as descritas acima porém, as seguintes variações em seu perfil químico difere em relação a presença de novas substâncias que não foram relatadas nas matrizes mais susceptíveis, de acordo com as análises quimiométricas feitas através do *S-plot* foi possível analisar de acordo como mostra a FIGURA 5.62 e 5.63.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

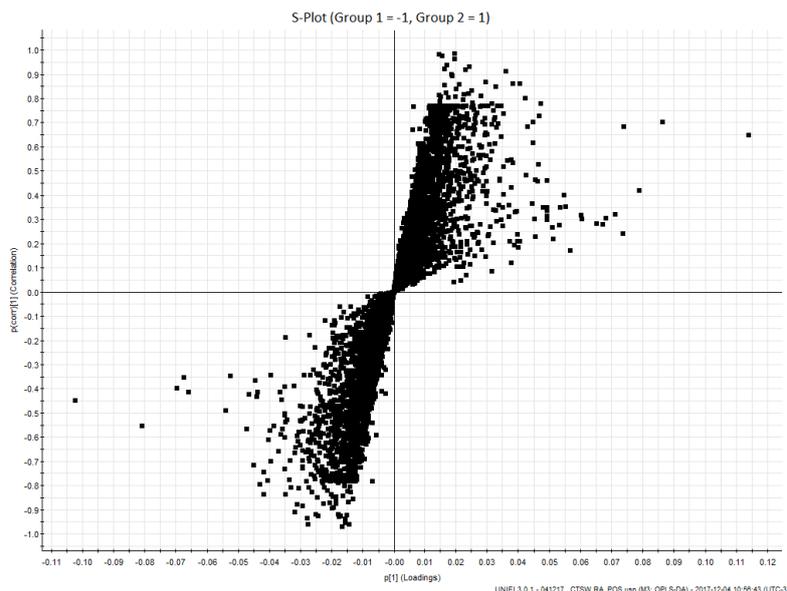


FIGURA 5. 62 - Gráfico de S-Plot das raízes de CTSW (ESI, modo positivo).

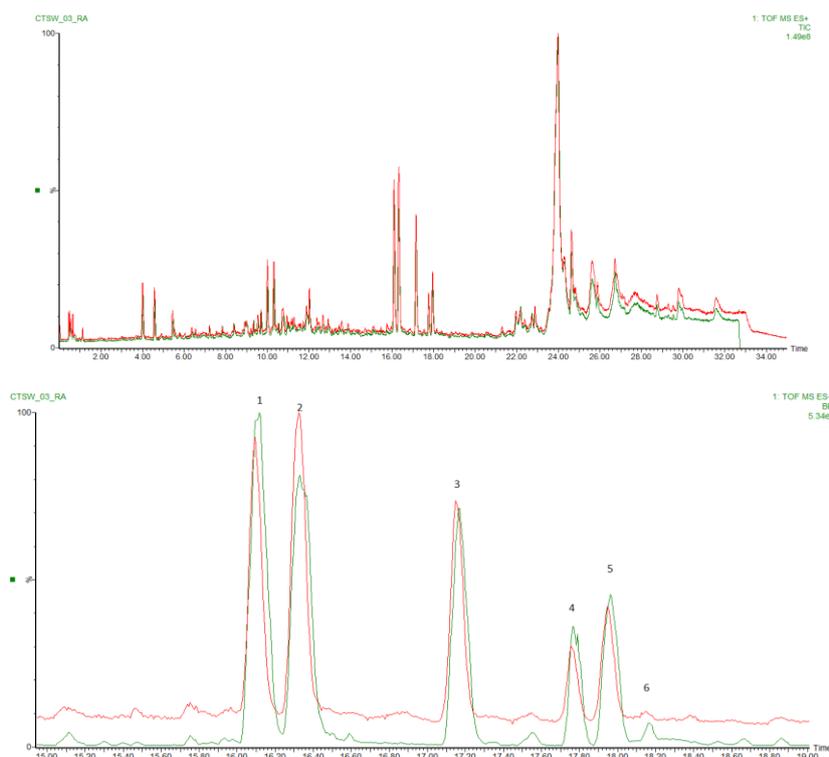


FIGURA 5. 63 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes das raízes de CTSW.- a) Cromatograma de íons totais de CTSWRA; b) Cromatograma ampliado nas bandas com maiores diferenças entre as amostras sadia (vermelho) versus a doente (verde).

Ao analisar os pés francos estudados de *Citrus sinensis* nas raízes, em comparação com os porta enxertos, a TST que é mais susceptível a doença gomose de

citrus, por exemplo, foi possível observar que em seu cromatograma de íons houveram mais diferenças quando assim comparadas com amostras de CTSW que é mais resistente ao patógeno em estudo, portanto nesse trabalho vamos focar na variação, principalmente, dessas cumarinas, as quais mais se destacaram na diferenciação de uma plântula a outra, no intuito de uma comparação direta em relação a esses metabólitos.

Nas bandas cromatográficas em 1 e 2 com tr em 16,12 e 16,33 min, apresentam m/z 209,0898 e m/z 209,0866 respectivamente referente a  $[M+H]^+$ , cuja a massa monoisotópica neutra é de 228,0792 Da, referente a fórmula molecular proposta  $C_{14}H_{12}O_3$ . De acordo com as pesquisas feitas em banco de dados para esse trabalho, as duas bandas em questão também se tratam das piranocumarinas xantiletina e seselina como foi possível observar em amostras de TST, em tr bem aproximados. Fazendo um elo comparativo nesse caso, a cumarina linear xantiletina ocorre um aumento nas amostras que foram inoculadas com o oomiceto, enquanto que acontece o inverso com a cumarina angular seselina, havendo uma diminuição desse metabólito nessas amostras consideradas como doentes.

Analisando os íons moleculares e os íons produtos desses dois isômeros, foi possível observar características similares, mas para a banda 1, está também possui um pico base de m/z 213,05 (FIGURA 5. 64), levando assim a afirmar que estamos com a cumarina xantiletina. Este íon de transição é bem característico (229→213). Segundo a análise feita pelo S-plot essa cumarina teve um aumento em amostras doentes, em relação a sua área relativa quando comparada a espécies sadias, ou seja, houve um aumento na produção desse composto na presença do inóculo em suas raízes e essa variação está aumentando em 11,02 vezes.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

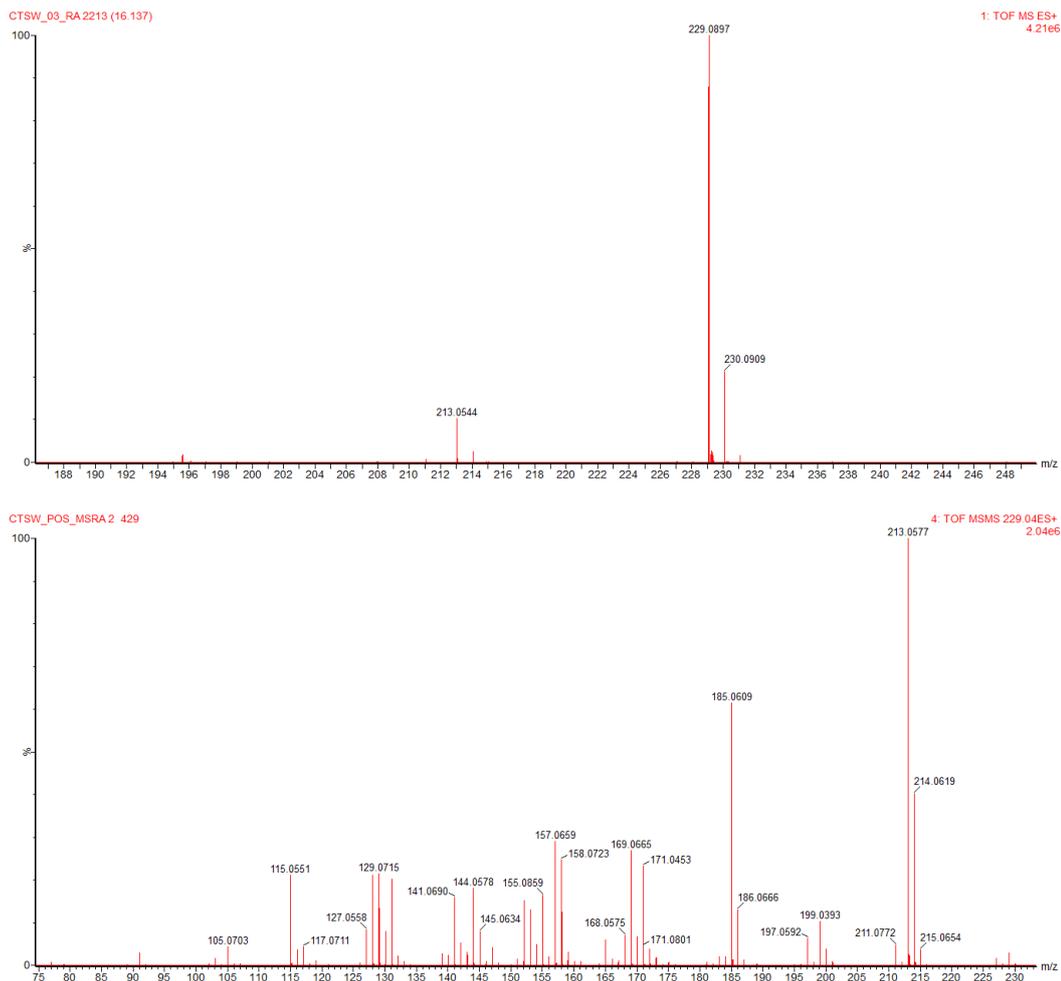


FIGURA 5. 64 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  229,0897 no tr 16,12 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular xantiletina (acima).

Por sua vez, a banda 2 com tr em 16,33 min, foi proposta por ser a cumarina angular seselina, o espectro do seu íon produto apresentou o fragmento em  $m/z$  175 (FIGURA 5.65) como discutido anteriormente torna-se um fragmento característico na diferenciação desses dois isômeros, ressaltando que em espectros de íon molecular pode ou não aparecer o fragmento  $m/z$  213, mas quando este aparece sua abundância relativa não é tão intensa como na cumarina linear.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

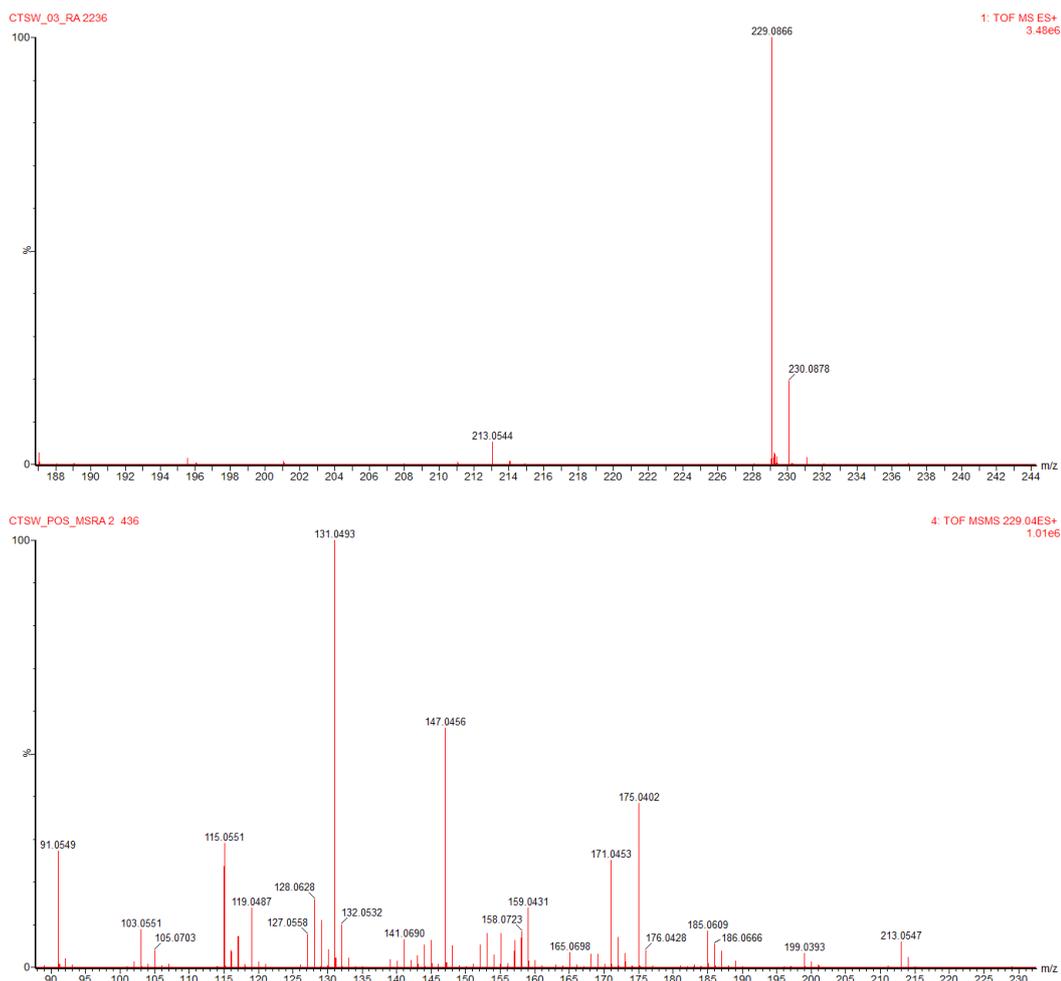


FIGURA 5. 65 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  229,0866 no tr 16,33 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular seselina (acima).

Como ilustrado no espectro de íons produtos acima, uma outra característica que nos evidencia tratando da piranocumarina angular seselina é a presença do fragmento bem intenso em  $m/z$  131, que parece ser mais estável em cumarinas 8-C alquil substituídas. Nas amostras de CTSW a cumarina seselina teve uma diminuição em sua concentração em amostras doentes (aquelas inoculadas com o oomiceto), mostrando um comportamento diferente quando comparadas as amostras de TST, onde foi possível observar um aumento na “produção” desse metabólito, logo para as matrizes de CTSW nas raízes doentes houve uma inibição da biossíntese em concentração dessa cumarina. Estes resultados sugerem que estes enxertos de CTSW inibem a biossíntese da cumarina angular seselina, desviando a prenilação da umbeliferona, ocorrendo um favorecimento na produção da cumarina

xantiletina (C6) prenilada e conseqüentemente uma diminuição na seselina (C8), onde pode reforçar que na presença do patógeno pode ser que venha a induzir a inibição da rota biossintética de prenilação em C8 em favor daquela em C6, como mostra a FIGURA 5.66.

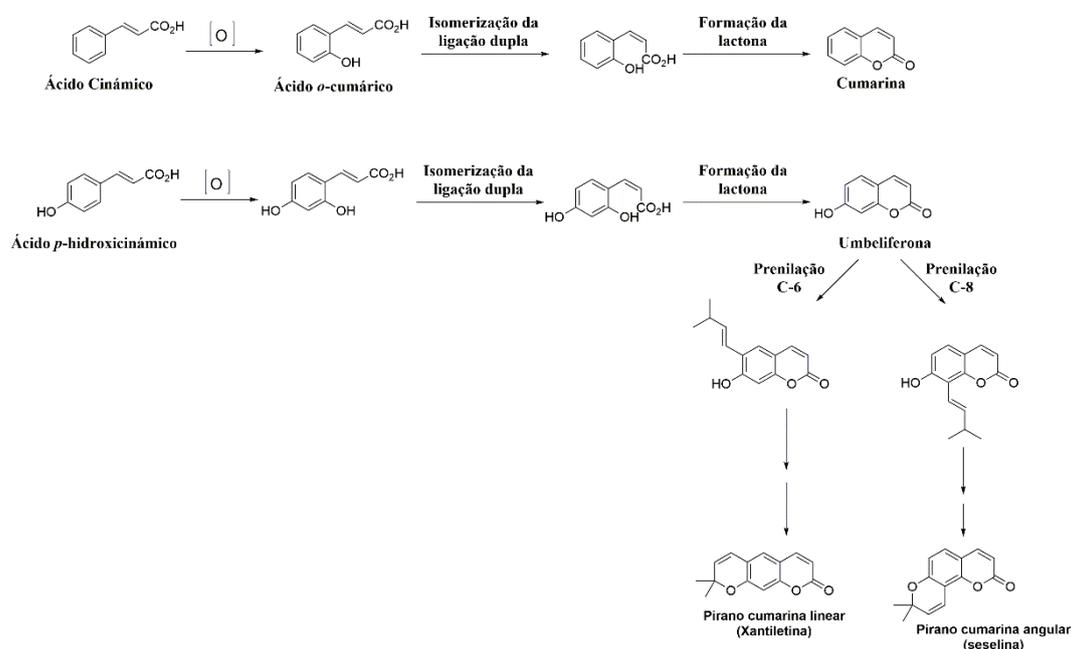


FIGURA 5. 66 - Biossíntese das cumarinas (adaptado de Dewick, 2009).

Nos picos com tempo de retenção em tr 5,81; 6,62 e 6,99 min, suas bandas cromatográficas apresentou íons pseudomoleculares  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  de m/z 263,0639 e m/z 285,0731, respectivamente, sendo referente a fórmula molecular  $C_{14}H_{14}O_5$ , os quais se diferenciaram nessas amostras de CTSW quando comparadas em TST, podemos evidenciar que a presença dessas novas bandas em CTSW, possa estar vinculada ao aumento da produção de xantiletina e inibição da produção de seselina. Na busca em banco de dados, revelou cinco estruturas possíveis - buntansina B, xantoarnol, kelactona, decursidinol e diidrosuberenol (FIGURA 5.67), cuja diferença de massa monoisotópica calculada e experimental foi de apenas 0,2 mDa.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

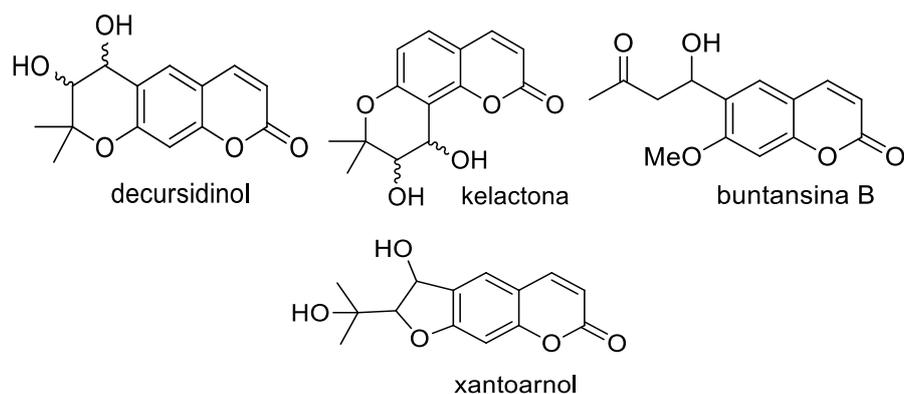


FIGURA 5. 67 - Estruturas das cumarinas com massa neutra 262,0842 Da referente ao m/z 263,0639.

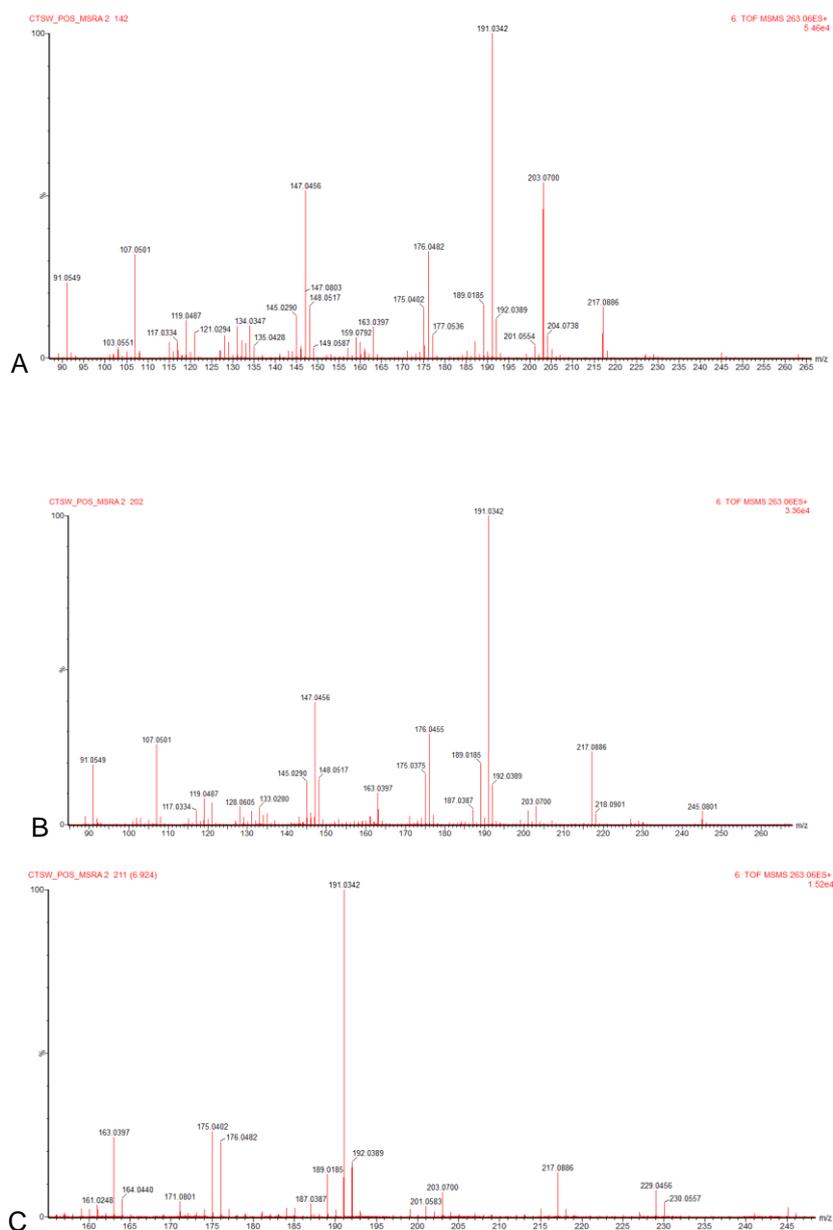


FIGURA 5. 68 -Espectro de massas para o íon m/z 263,0639 no tr 5,81; 6,62 e 6,99 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos: a) xantoarnol; b) diidrosuberenol e c) decursinol.

O espectro de íons produtos de  $m/z$  263 para a banda cromatográfica com o tr em 5,81 min (FIGURA 5.69) sugeriu-se ser a cumarina xantoarnol. A proposta de fragmentação para essa cumarina encontra-se na (FIGURA 5.70). Esta cumarina já foi isolada antes nas raízes de citros pelo grupo de produtos naturais da UFSCar. Devido a presença do pico  $m/z$  203 bem mais intenso e o pico base  $m/z$  175 e  $m/z$  107 nos espectros de íon molecular e íons produtos, a hipótese mais aceitável para esse tipo de fragmentação seria para a estrutura do xantoarnol que permite uma perda inicial de acetona seguida de CO, eliminando assim a possibilidade de serem as estruturas kelactona e buntansina B.

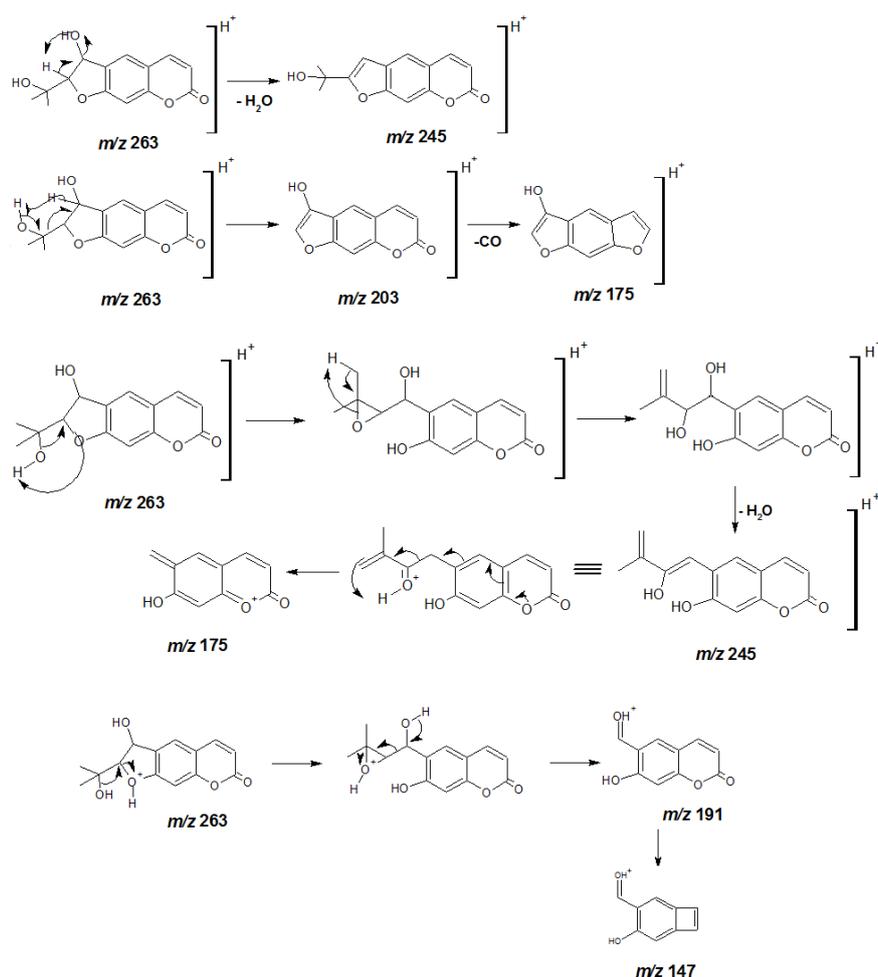


FIGURA 5. 69 - Proposta para a fragmentação da cumarina xantoarnol (ESI, modo positivo).

Os espectros para os tr em 6,56 e 6,99 sugeriu ser das cumarinas diidrosuberenol (FIGURA 5.67) e decursinol (FIGURA 5.67). Soares 2011, em seus

trabalhos com citros, identificou por análises em experimentos de MS/MS por APCI também nas raízes no modo positivo bandas de fragmentações características para cumarina diidrosuberenol, com  $m/z$  263 para  $m/z$  191 com pico base bem intenso, mesmo em baixas concentrações, logo foi possível afirmar que nesse estudo a cumarina em questão é a diidrosuberenol. Já o espectro de íons produtos para o tr em 6,99 inferimos estarmos com a cumarina decursinol, pois mostra íons característicos para a sua fragmentação como  $m/z$  245,  $m/z$  217. A proposta de fragmentação para as duas cumarinas se encontram na FIGURA 5.70 e 5.71, em estudos de Ribeiro em 2008, esta cumarina já havia sido isolada e identificada pelo grupo de produtos naturais nas raízes de citros.

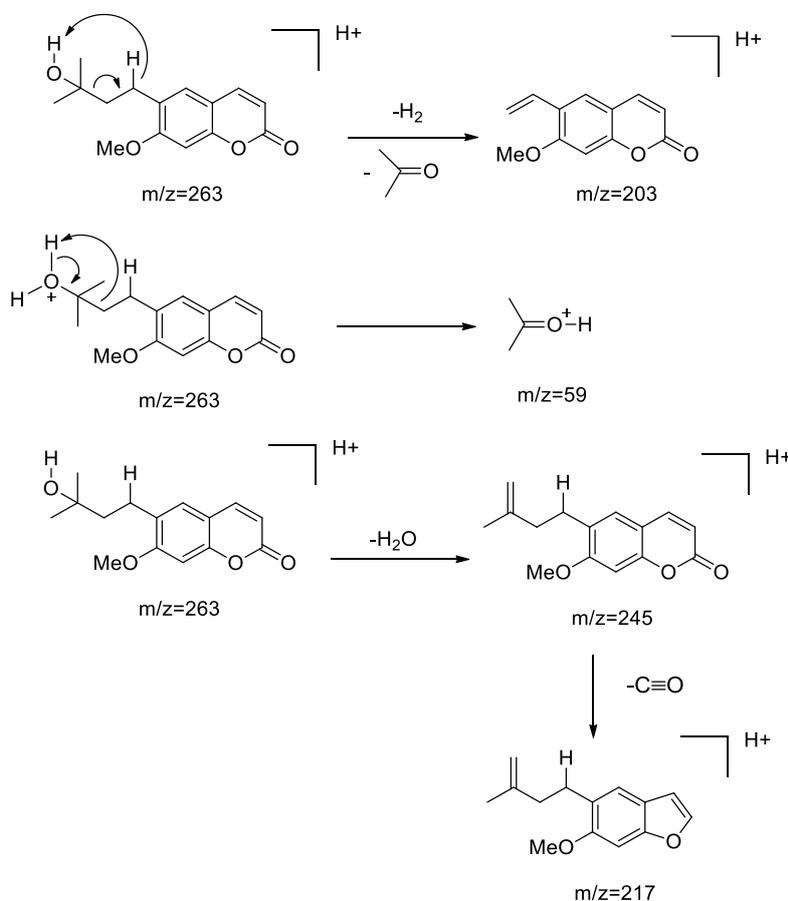


FIGURA 5. 70 - Proposta de fragmentação para a cumarina diidrosuberenol (ESI, modo positivo).

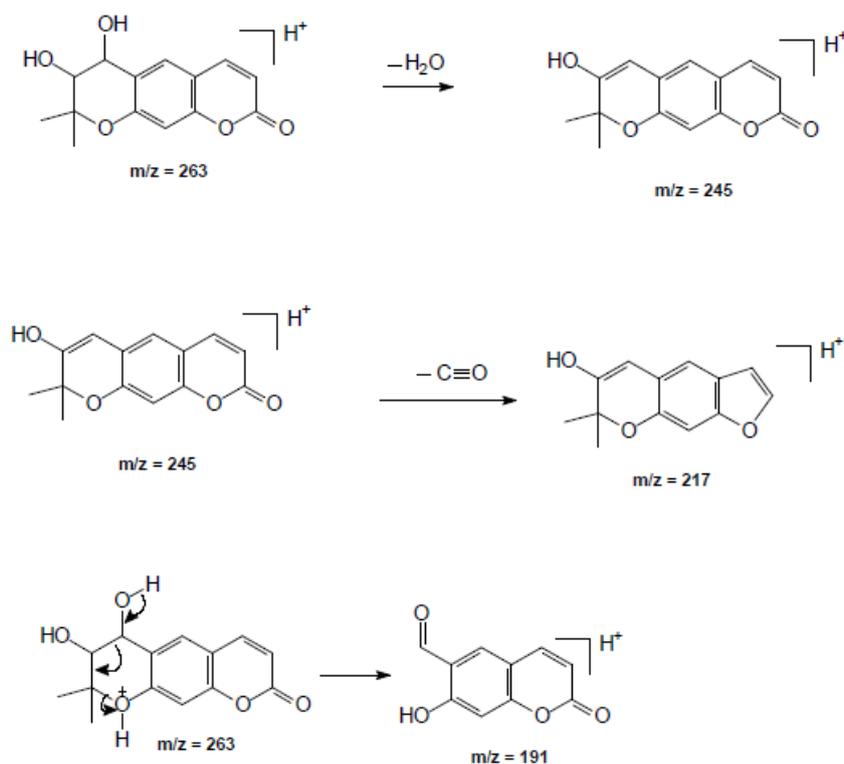


FIGURA 5. 71 - Proposta de fragmentação para a cumarina decursinol (ESI, modo positivo).

Analisando os cromatogramas de íons dessas cumarinas, em relação a sua área para cada matriz estudada, principalmente para as matrizes de CTSWRA, nos permite inferir sobre as diferentes concentrações destas cumarinas. A banda tanto da cumarina xantoarnol, quanto da diidrosuberenol mostram maiores áreas nas matrizes das raízes dos pés francos de Citrumeleiro Swingle quando esse enxerto está inoculado com a *Phytophthora nicotianae*, esses dados podem estar contribuindo aos resultados de quantificação feitos a essas matrizes em suas raízes para as piranocumarinas xantiletina e seselina, quando nessas matrizes de CTSW que são mais resistentes ao patógeno da doença gomose, sugerem que a presença do inóculo inibem a biossíntese da cumarina angular seselina, desviando a prenilação da umbeliferona para o carbono C6, favorecendo a formação assim da cumarina linear xantiletina em uma proporção maior o que não ocorre em plântulas de TST. As cumarinas identificadas nessas matrizes como xantoarnol, diidrosuberenol e decursinol são derivados de intermediários na formação da xantiletina, assim

evidenciando que ao comparar as cumarinas em plântulas de TST e CTSW, é possível reforçar a proposta de que na presença do patógeno em matrizes mais resistentes induz a inibição da rota de prenilação em C-8 em favor da prenilação em C-6 e todas essas três cumarinas tiveram um aumento em amostras com presença do oomiceto.

Na análise das bandas cromatográficas em 3; 5 e 6 com  $t_r$  em 17,16; 17,96; 18,17 min apresentaram  $m/z$  em 259,0985 referente a  $[M+H]^+$  cuja a massa monoisotópica neutra referente a esses isômeros 258,0894 Da, referente a fórmula molecular proposta  $C_{15}H_{14}O_4$ . A comparação pelo banco de dados levou a três furanocumarinas (xantoxiletina, luvangetina e 5-metoxiseselina) no qual a diferença de massa foi de 0,1 mDa, respectivamente. O espectro de massas (FIGURA 5.72) do  $t_r$  de 17,16 min. mostrou um pico base de  $m/z$  189 também referente à perda de 70 Da, onde pela análise das estruturas dos isômeros das piranocumarinas a única provável de favorecer essa perda seria a piranocumarina angular 5-metoxiseselina como pode ser visto no mecanismo proposto (FIGURA 5.41). No espectro de íons produtos foi observado apenas o pico  $m/z$  131 que é proveniente do fragmento  $m/z$  189, o que reforça a identidade da banda **3** como sendo a 5-metoxiseselina. Sua concentração nas matrizes das raízes de CTSWRA foi maior do que nas matrizes CTSWRATE, sendo produzida em matrizes doentes.

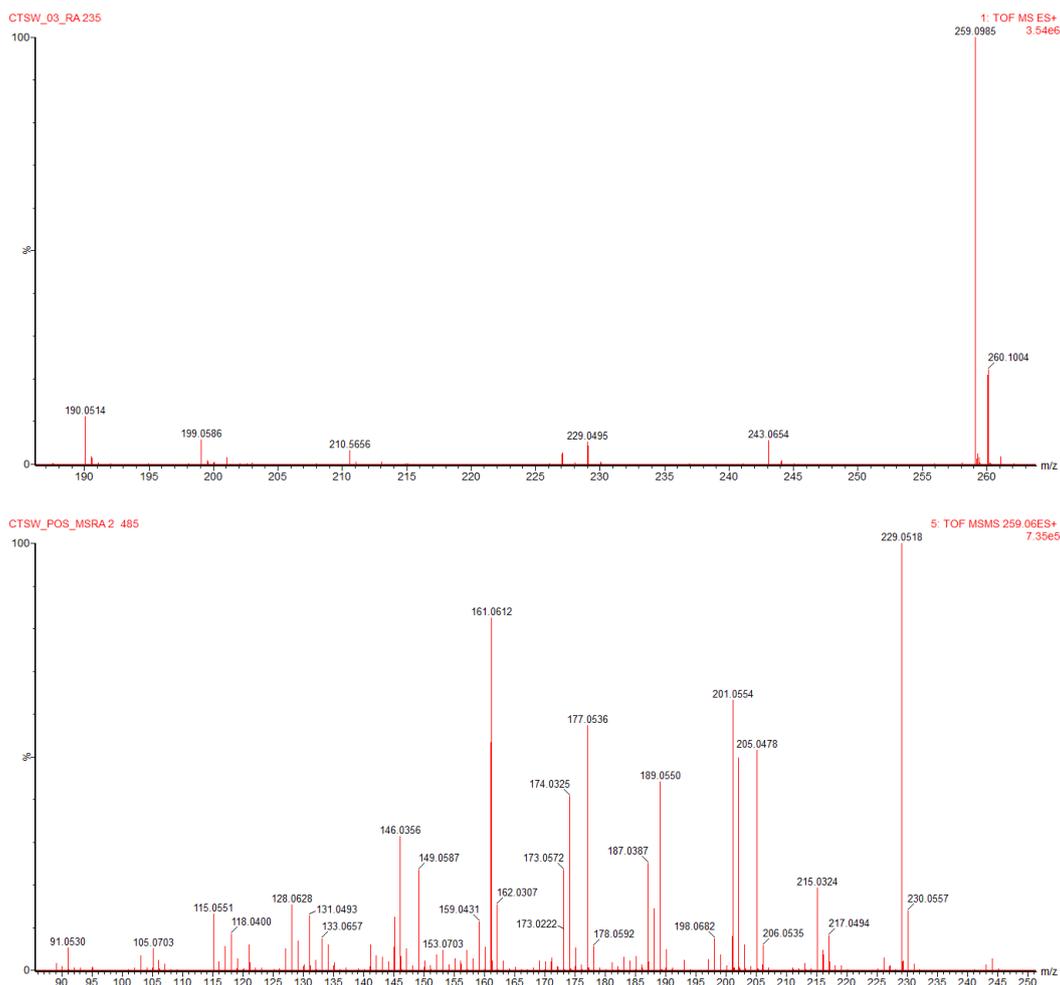


FIGURA 5. 72 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  259,0985 no tr 17,16 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular 5-metoxiseselina (acima).

A banda  $t_r$  de 17,96 min não apresentou os íons  $m/z$  257 e  $m/z$  227, característico da perda de  $H_2$  e subsequentemente de metoxila, quando se encontra na posição C-7 da cumarina, logo foi descartada a possibilidade de ser a luvangetina. Desta, forma a banda 5 foi atribuída como sendo a piranocumarina linear xantoxiletina, onde seus íons produtos (FIGURA 5.73) e proposta de fragmentação encontra-se na (FIGURA 5.42) e a banda 6 sendo a piranocumarina luvangetina (FIGURA 5.74) como mostra a proposta de fragmentação na (FIGURA 5.43). A concentração de ambas as cumarinas aumentaram em matrizes de CTSWRA, como ocorreu nas matrizes de TSTRA.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

---

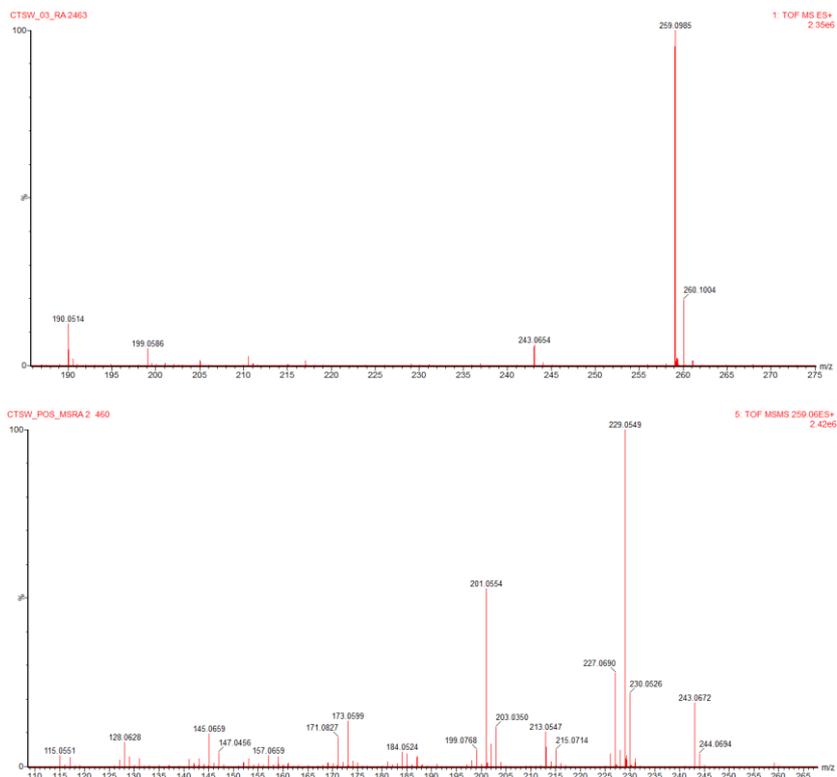


FIGURA 5. 73 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  259,0985 no tr 17,96 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular xantoxiletina (acima).

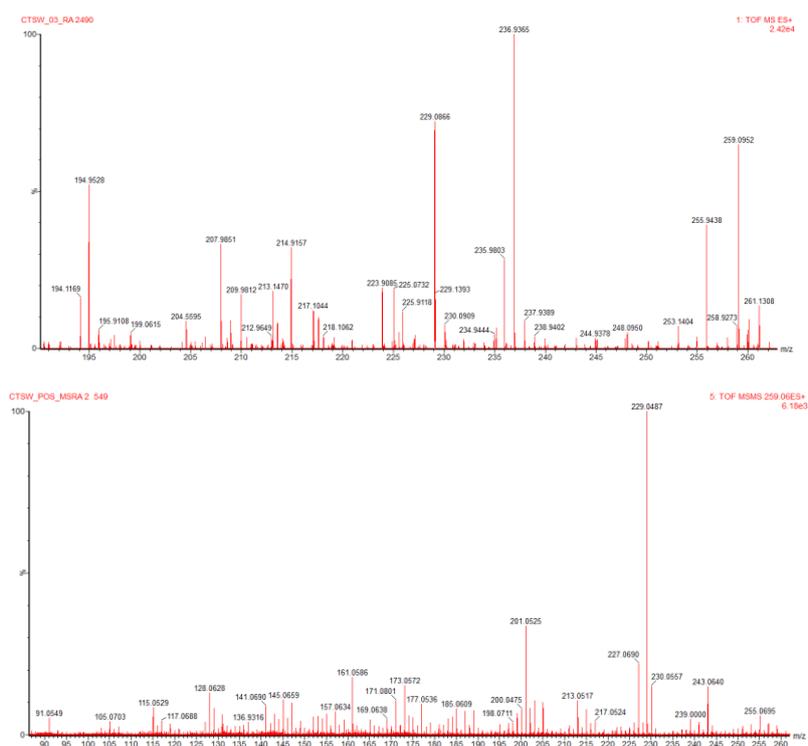


FIGURA 5. 74 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  259,0985 no tr 18,17 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular luvangetina (acima).

A análise na última banda dessa matriz no tr em 18,51 min, no modo positivo de ionização mostrou um íon pseudomolecular em  $m/z$  245,1185 produzido apenas nas matrizes de CTSWRA em uma quantidade bem pequena em relação a sua área quando comparado as matrizes sadias de CTSWRATE, com apenas 0,2 mDa de diferença experimental observada com a massa teórica das cumarinas ostol e suberosina. Como já foi relato nas matrizes de TSTRA, o perfil de fragmentação (FIGURA 5.57) nos íons produtos mostrou vários fragmentos (FIGURA 5.75) que podem ser obtidos para os dois isômeros, entretanto o pico base em  $m/z$  131 tem se mostrado mais comuns nas cumarinas 8-C alquil substituídas, o que levou a propor a banda cromatográfica a cumarina ostol. A cumarina ostol é produzida apenas em plântulas com sintomas de gomose, não sendo observada em matrizes sadias de Citrumeleiro Swingle, evidenciando que essa cumarina foi produzida e pode ser considerada um metabólito utilizado como defesa da plântula (nesse caso, sendo uma fitoalexina).

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

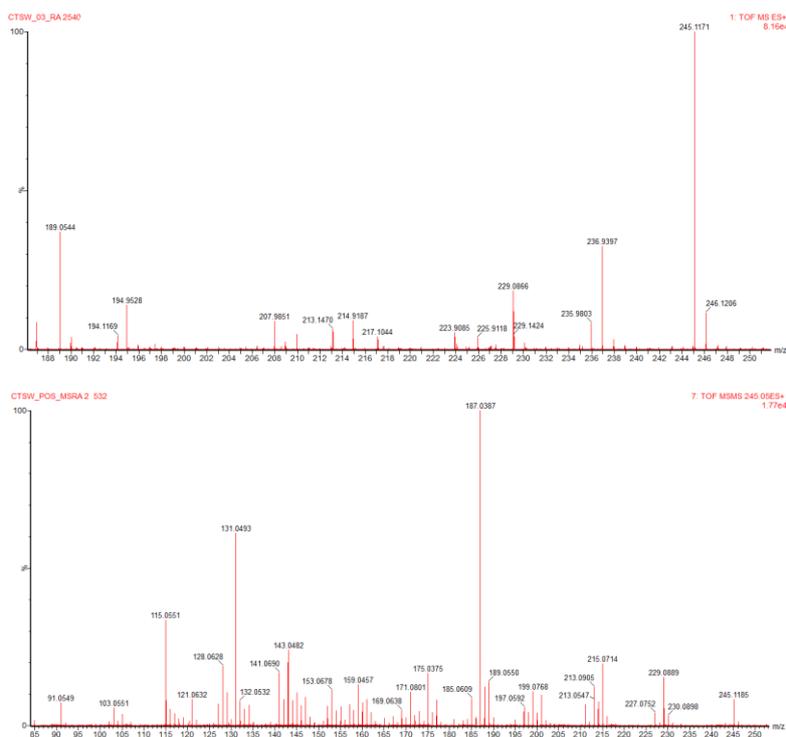


FIGURA 5. 75 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  245,1185 no  $t_r$  18,51 min encontrado nas raízes de CTSW (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da cumarina Ostol (acima).

Segue abaixo a TABELA 5.6 dos principais metabólitos que variaram em seu perfil metabolômico de CTSW nas raízes com suas respectivas massas e tempo de retenção. Foi possível notar que a cumarina ostol apareceu somente nas matrizes doentes nas raízes de CTSW, como houve um favorecimento na prenilação em C6 para aumentar a xantiletina, pode levar a favorecer para a formação do composto, onde podemos inferir que essa cumarina em plântulas mais resistentes ao patógeno pode estar atuando como uma fitoantecipina.

TABELA 5. 6 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico nas raízes das plântulas de CTSW.

Banda	$t_r$ (min)	$[M+H]^+$	Substância	Maior Produção	Varição
1	5,81	263,0639	Xantoarnol	CTSWRA	6,67
2	6,56	263,0639	Diidrosuberenol	CTSWRA	5,29
3	6,99	263,0639	Decursinol	CTSWRA	5,59
4	16,12	229,0898	<b>Xantiletina</b>	CTSWRA	<b>11,02</b>
5	16,33	229,0866	<b>Seselina</b>	<b>CTSWRATE</b>	<b>10,05</b>
6	17,16	259,0985	<b>5-Metoxiseselina</b>	CTSWRA	<b>10,04</b>

<b>7</b>	17,76	369,1288	NI*	CTSWRA	0,14
<b>8</b>	17,96	259,0985	<b>Xantoxiletina</b>	CTSWRA	<b>9,72</b>
<b>9</b>	18,17	259,0985	<b>Luvangetina</b>	CTSWRA	<b>10,01</b>
<b>10</b>	18,51	245,1185	<b>Ostol</b>	<b>Somente em CTSWRA</b>	<b>1256</b>

NI= não identificado até o momento da escrita da tese\*

### **5.7.3. Análises do caule inferior dos pés francos no modo positivo de ionização**

No tratamento quimiométrico via S-plot (FIGURA 5.76) no modo positivo de ionização das plântulas de TST em seus caules, onde foi inoculado o patógeno, foi possível evidenciar algumas substâncias que sofreram diferenciações quando comparadas com as matrizes sadias da mesma. O grupo que se encontra acima da linha horizontal são as matrizes denominadas como sadias, e os que estão abaixo as matrizes doentes, logo aqueles pontos que mais estão distantes são daquelas amostras que mais sofreram variações dentro de uma comparação estatística de dados. Nesse modo de aquisição e ionização evidenciamos para as matrizes tanto do caule inferior como para as matrizes do caule superior de ambas as plântulas em estudo, a presença de *clusters*, evidenciado pela presença de alguns adutos, com perdas simultâneas de 44 Da. As principais diferenças entre as matrizes sadias e doentes encontram-se na FIGURA 5.77.

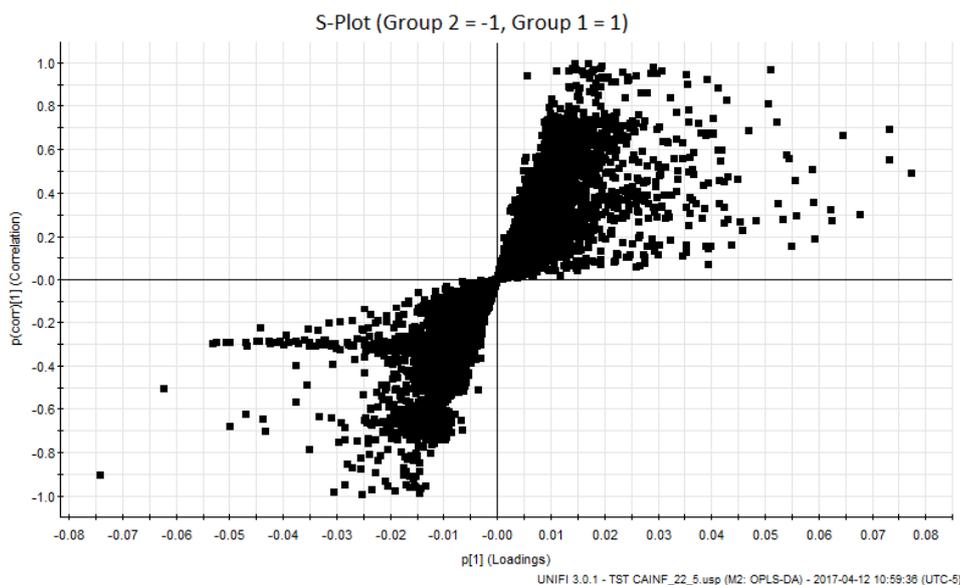


FIGURA 5. 76 - Gráfico S-Plot do caule inferior de TST no modo positivo de ionização.

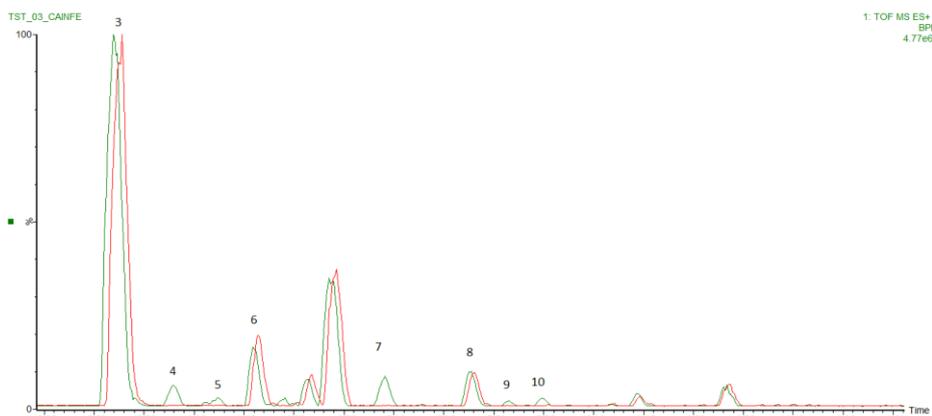


FIGURA 5. 77 -Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes de caule inferior de plântulas de TST (ESI, modo positivo).

Na análise da banda cromatográfica 1, com tr em 15,60 min mostrou um íon pseudomolecular  $m/z$  403, 1392 e em seu cromatograma de íons foi possível observar para essa banda adutos de sódio em  $m/z$  425,1213. Com essa massa podemos estar com flavonas hexametoxiladas como é o caso da nobiletina e quercetogentina (FIGURA 5.78). Nesses compostos, é possível diferenciar através de seus íons produtos, fragmentações que sofrem retro Diels – Alder, principalmente quando se vem do pico  $m/z$  403 (FIGURA 5.80).

Dependendo de sua energia de colisão, estes íons auxiliam a posicionar os grupos metoxilicos nos anéis com mais facilidade.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

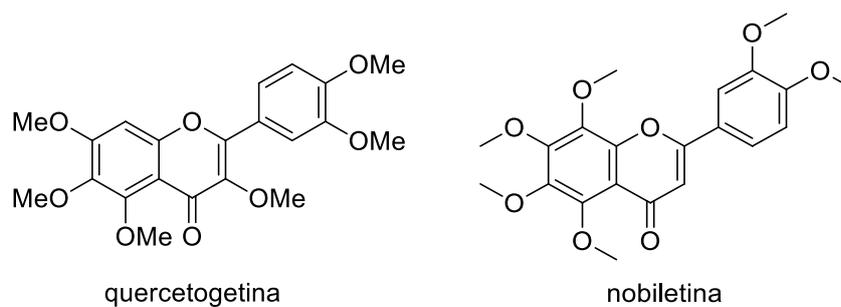


FIGURA 5. 78 - Estruturas das flavonas polimetoxiladas de massa neutra 402,1314 Da referente ao m/z 403,1392.

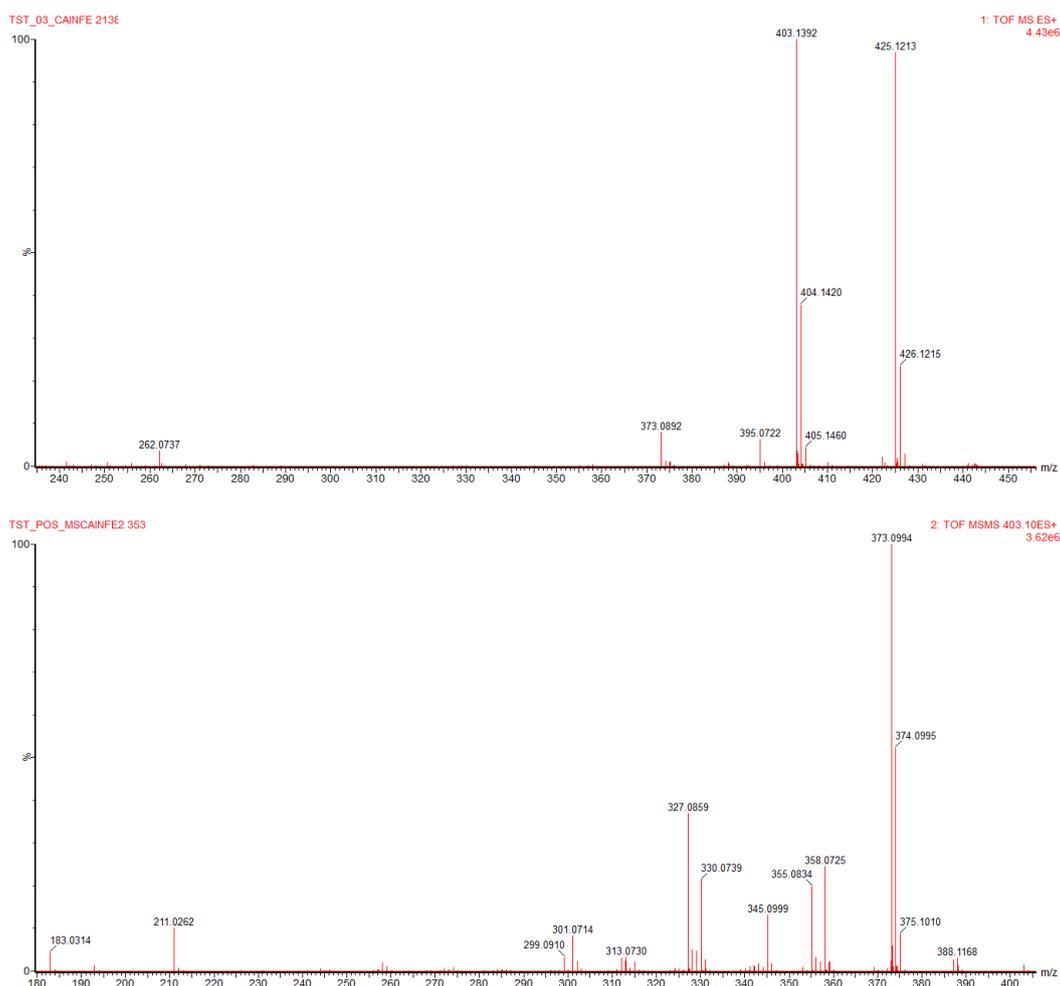


FIGURA 5. 79- Espectro de massas para o íon m/z 403,1392 no tr 15,60 min encontrado no caule inferior de TST (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da flavona nobiletina (acima).

Foi possível observar m/z 373,0994 um pico base característico, que

pode ter se formado pela perda de uma unidade  $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ . A retro Diels-Alder ocorrendo neste íon, leva aos íons  $m/z$  211 e 163, com  $m/z$  163, confirma o anel B da estrutura como sendo dimetoxilado e a ausência de metoxila em C-3. Os íons em  $m/z$  211 a  $m/z$  183 (oriundo do  $m/z$  211 pela perda de CO), sendo o pico base, mostram que a perda do metanal no íon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  para levar ao  $m/z$  373 ocorreu no anel A, confirmando o anel com suas metoxilas, como mostra na proposta de fragmentação para esse composto (FIGURA 5.81). Tais observações levam a propor a banda como sendo a flavona nobiletina, que teve sua produção 1,07 vezes mais expressa nos caules de TST.

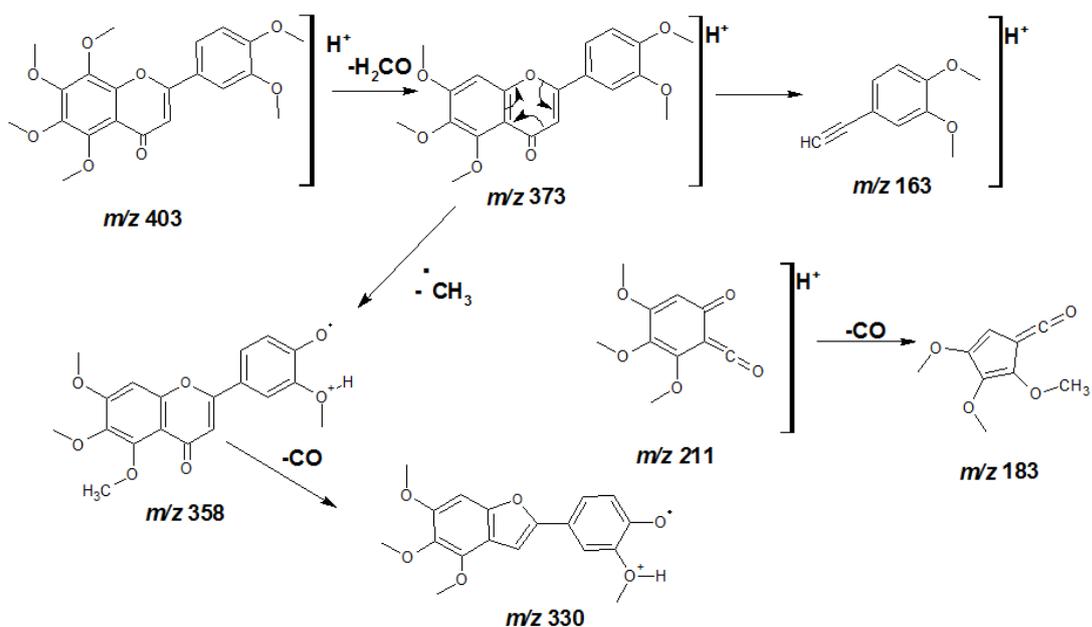


FIGURA 5. 80 - Proposta de fragmentação para a flavona polimetoxilada nobiletina (ESI, modo positivo).

Nas bandas cromatográficas com  $t_r$  em 17,39 e 17,80 min, tivemos uma variação significativa quando correlacionadas às matrizes sadias versus às doentes. Com  $m/z$  389,1219 e  $m/z$  373,1287 respectivamente (FIGURAS 5.82 e 5.83), acreditamos estarmos com compostos da classe dos flavonoides. Os flavonoides são produtos de origem biossintética mista. Eles são biossintetizados através da rota do ácido chiquímico (ou chiquimato) e também do acetato (acetil coenzima A). A via do

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

ácido chiquímico origina o ácido cinâmico e seus derivados (ácidos cafeico, ferúlico, sinápico, etc.) com nove átomos de carbono (ou C<sub>6</sub> C<sub>3</sub>), na forma de coenzima A, e a via do acetato origina um tricetídeo com seis átomos de carbono. A condensação de um destes derivados do ácido cinâmico com o tricetídeo gera uma chalcona com 15 átomos de carbono, que é o precursor inicial de toda a classe dos flavonoides (DEWICK, 2009). Estes metabólitos são importantes não apenas no crescimento e desenvolvimento das plantas, como na defesa contra pragas e microrganismos.

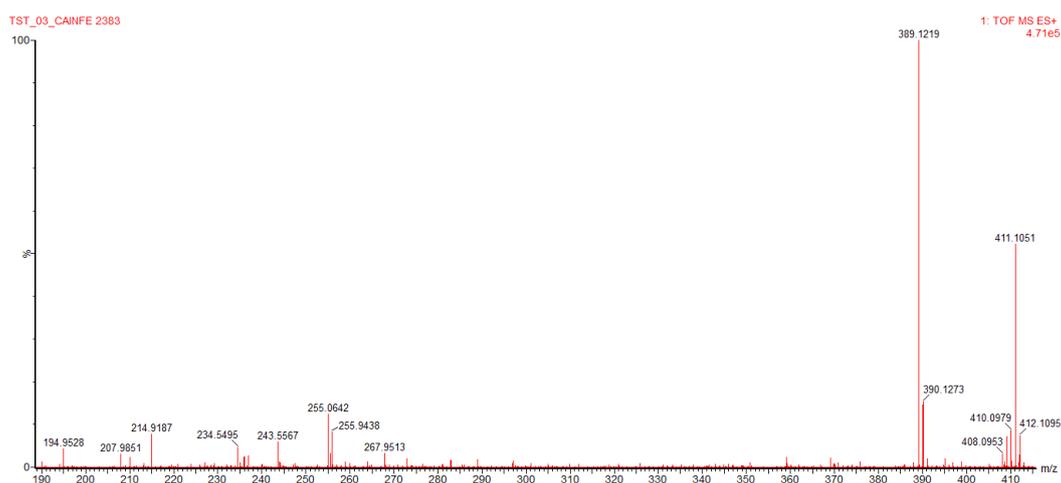


FIGURA 5. 81 - Espectro de massas para o íon m/z 389,1219 no tr 17,39 min encontrado no caule inferior de TST (ESI, modo positivo). Espectro do íon molecular do flavonoide.

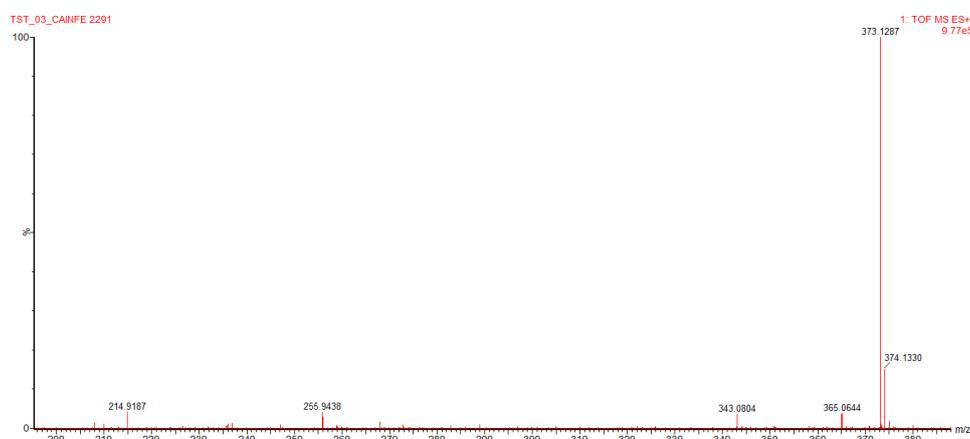


FIGURA 5. 82 - : Espectro de massas para o íon m/z 373,1287 no tr 17,80 min encontrado no caule inferior de TST (ESI, modo positivo). Espectro do íon molecular do flavonoide.

Como para as bandas acima não foi possível obter os espectros dos íons produtos, não podemos inferir com certeza as estruturas dos compostos que estão variando nesse tempo de retenção, até o momento de escrita da tese, seria necessário um MS/MS para confirma-las. Porém com dados de estudos anteriores em citros, com  $m/z$  373 fragmentando para  $m/z$  343, podemos considerar os flavonoides tangeretina, 5-demetoxinobiletina ou a sinensetina (FIGURA 5.84). Um desses flavonoides em matrizes de TST doentes aparecem com um aumento em sua concentração em torno de 1,08 quando comparadas com as matrizes sadias.

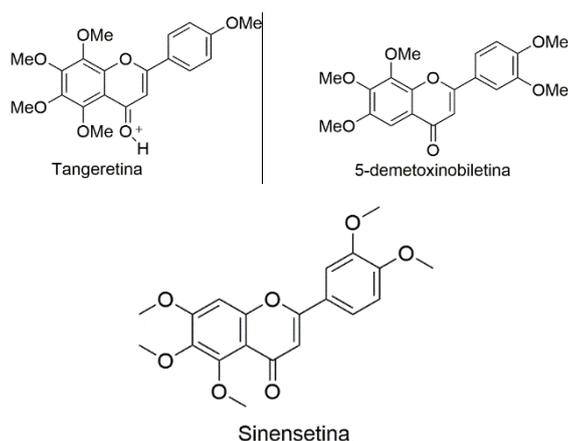


FIGURA 5. 83 - Estruturas de flavonoides polimetoxiladas de massa referente ao  $m/z$  373,1287.

E para os íons pseudomolecular  $m/z$  389, pode-se tratar de um flavonoide monohidroxilado e pentametoxilado, como mostra a FIGURA 5.85, e a concentração desse diminui em 1,13 nas matrizes de TST doentes.

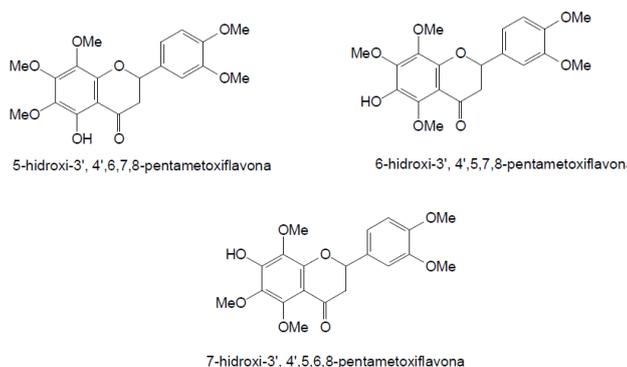


FIGURA 5. 84 -- Fórmulas estruturais dos flavonóides 5-hidroxi-3',4',6,7,8- pentametoxiflavona, 6-hidroxi-3',4',5,7,8-pentametoxiflavona e 7-hidroxi-3',4',5,6,8-pentametoxiflavona.

As demais bandas que sofreram uma diferenciação em suas matrizes já foram discutidas em tópicos acima, nesse caso vamos apenas citá-las mostrando na TABELA 5.7 seu  $t_r$ ,  $m/z$  e sua variação em cada amostra dos caules inferiores de TST.

TABELA 5.7 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico no caule inferior das plântulas de TST.

Banda	$t_r$ (min)	[M+H] <sup>+</sup>	Substância	Maior Produção	Varição
1	10,64	261,1142	Suberenol	TSTCATEINF	1,36
2	11,24	261,1143	Tamarina	TSTCAINF	1,08
3	15,60	403,1392	Nobiletina	TSTCAINF	1,07
4	15,90	229,0866	Xantiletina	Somente TSTCAINF	154,43
5	16,10	229,0866	Seselina	Somente TSTCAINF	36,77
6	16,30	274,2733	Lunacrina	TSTCATEINF	1,17
7	16,96	259,0985	5- Metoxiseselina	Somente TSTCAINF	219,37
8	17,39	389,1219	Flavonoide**	TSTCAINF	1,08
9	17,61	259,0985	Xantoxiletina	Somente TSTCAINF	27,73
10	17,80	373,1287	Tangeretina, Sinesetina ou 5- demetoxiseselina	TSTCATEINF	1,13

\*\* Flavonoide monohidroxilado ou pentahidroxilado o qual precisa fazer o MS/MS para confirmação.

Ao analisar os cromatograma de íons das matrizes do caule inferior para o pé franco de CTSW, através da ferramenta quimiométrica S-plot, foi possível observar que alguns compostos já haviam sido identificados nas matrizes de suas raízes, sendo assim, estes serão citados na TABELA 5.8 com os seus devidos tempo de retenção e seus aumentos ou diminuição em concentração. De acordo como mostra a FIGURA 5.86, os compostos que mais variaram nessa matriz foram.

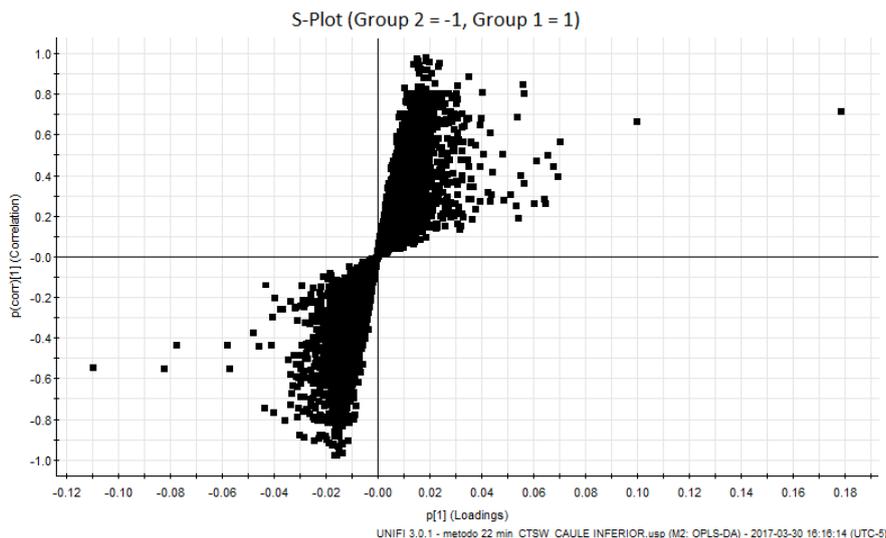


FIGURA 5. 85 - Gráfico S-Plot do caule inferior de CTSW no modo positivo de ionização.

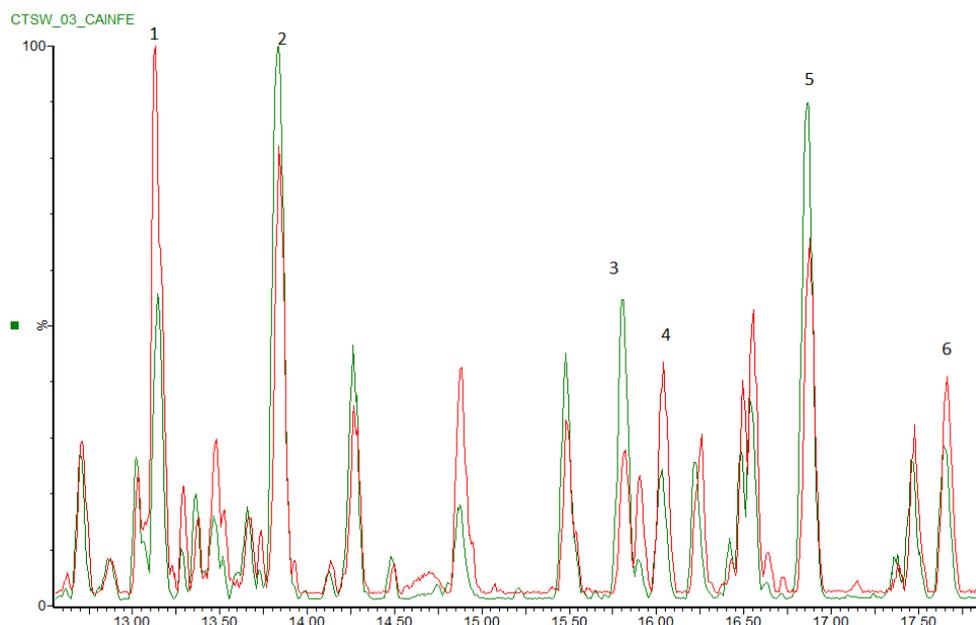


FIGURA 5. 86 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes de caule inferior de plântulas de CTSW (ESI, modo positivo).

Na banda cromatográficas 1 e 2 da FIGURA 5.87 com tr 13,14 e 13,83 respectivamente, até o momento da escrita da tese ainda não foram identificados. Mas, como suas intensidades são bem características, analisando os espectros de íons moleculares de cada banda, no tr 13,14, temos o íon pseudomolecular  $m/z$  455,1887, o qual  $[M+H]^+$  corresponde a uma diferença de massa de 0,6 mDa sugerindo os limonoides obacunona e deoxilimonina, mas não podemos afirmar sem

os espectros de íons produtos. As fragmentações para íon molecular não nos deixam afirmar qual dos dois possíveis limonoides estão variando nessa matriz. Vide FIGURA 5.88, a área dessa banda diminui nas matrizes doentes do caule inferior nas plântulas de CTSW.

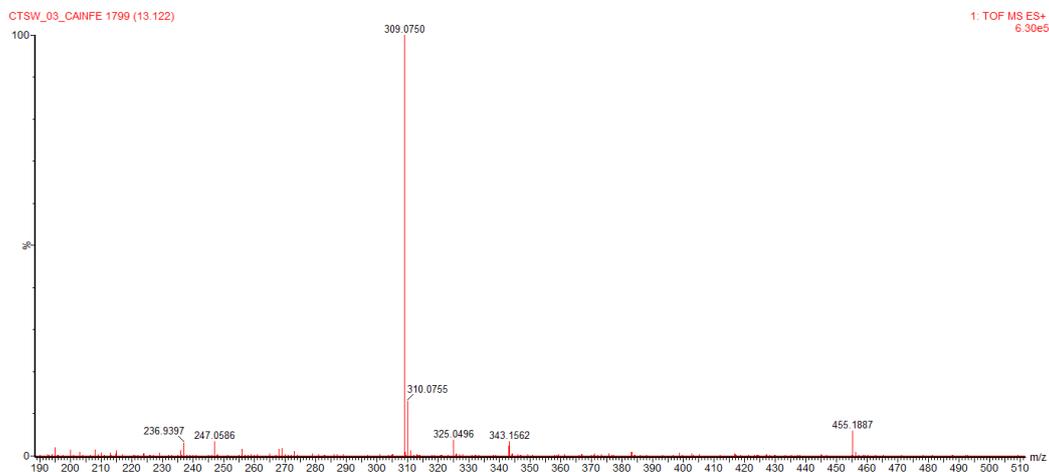


FIGURA 5. 87 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  455,1887 no tr 13,14 min encontrado no caule inferior de TST (ESI, modo positivo). Espectro do íon molecular de limonoíde obacunona ou deoxilimonina.

Ao analisar os cromatogramas de íons totais dos caules inferiores de CTSW, verificou-se que os metabólitos que mais variaram dentro das matrizes sadias versus doentes, já tinham sido analisados e discutidos nas raízes da mesma plântula. Os íons pseudomoleculares  $[M+H]^+$   $m/z$  229,0866 referentes a banda 3 da cumarina linear xantiletina no tr 15,80, essa substância foi encontrada também nas plântulas de TST tanto nas raízes como no caule inferior. A banda 4 é a cumarina angular seselina no tr 16,04, como a xantiletina também está sofrendo variações nas matrizes citadas acima. Porém, em matrizes de CTSW que são mais resistentes ao patógeno da doença gomose, podemos evidenciar mais uma vez que em seus caules inferiores acontece o mesmo que em suas raízes, ocorre um aumento na produção de xantiletina, quando conseqüentemente há uma diminuição da seselina, afirmando a proposta citada na discussão acima nas amostras das raízes.

Nas bandas seguintes, estamos também variando as piranocumarinas, na banda 5 do cromatograma de íons (FIGURA 5.87) com o tr 16,86 com o íon pseudomolecular  $[M+H]^+$   $m/z$  259,0952 referente à cumarina 5-metoxiseselina, onde

percebemos que nas matrizes do caule inferior, onde foi inoculado o oomiceto, estas sofreram um aumento em sua produção quando comparadas as matrizes sadias dessa mesma plântula, assim como ocorre o aparecimento e/ou produção desse metabólito em plântulas doentes de TST. A banda 6 com o tr 17,65 com o mesmo valor do íon pseudomolecular é referente a cumarina xantoxiletina, nesse caso em plântulas de CTSW em seus caules inferiores acontece o inverso do que aconteceu por exemplo com a cumarina na banda 5, aqui há uma diminuição de sua concentração nas matrizes doentes do caule inferior, podemos inferir que nas partes inferiores o porta enxerto ele sendo mais tolerante ou mais resistente a *Phytophthora nicotianae*, esses metabólitos se comportam de maneira diferente.

Logo, abaixo é mostrado os metabólitos que mais foram evidenciados após análises estatísticas dos dados dessas matrizes, como mostra a TABELA 5.8.

TABELA 5. 8 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico no caule inferior das plântulas de CTSW.

Banda	t <sub>r</sub> (min)	[M+H] <sup>+</sup>	Substância	Maior Produção	Varição
1	13,14	455,1907	Obacunona ou Deoxilimonina	CTSWCATEINF	1,26
2	13,83	309,0750	NI	CTSWCAINF	2,22
3	15,80	229,0866	<b>Xantiletina</b>	CTSWCAINF	<b>3,41</b>
4	16,04	229,0866	Seselina	CTSWCATEINF	1,38
5	16,86	259,0952	5-Metoxiseselina	CTSWCAINF	2,34
6	17,65	259,0952	Xantoxiletina	CTSWCATEINF	1,14

NI= não identificado até o momento da escrita da tese\*

#### **5.7.4. Análises do caule superior dos pés francos no modo negativo de ionização**

Nessa etapa do trabalho as matrizes dos pés francos, (análises tanto para o caule superior quanto para as folhas), foram analisadas no modo negativo de ionização, pois, é esperado que para os compostos que mais variaram nessas matrizes, apresentem uma melhor ionização, devido tratar-se destes glicosilados, onde principalmente em partes aéreas, são os flavonoides, uma classe majoritária em

estudos de folhas. Alguns desses compostos já são observados nos caules superiores, muitas vezes translocados da parte aérea ou vice-versa.

Em plantas, os flavonoides podem ocorrer de várias formas modificadas correspondentes a uma adicional hidroxilação, metilação e principalmente a glicosilação. Essa glicosilação pode ocorrer por ligação direta da unidade de açúcar ao núcleo do flavonoide, através de uma ligação C-C, resistente a ácido, para formar flavonoides C-glicosilados. Os flavonoides ocorrem geralmente como O-glicosilados, em que um ou mais grupos hidroxilas da aglicona está ligado a uma unidade de açúcar com a formação de uma ligação O-C glicosídica, o qual é um hemiacetal instável em meio ácido. Qualquer um dos grupos hidroxilas podem ser glicosilados, mas certas posições são favorecidas. São locais de glicosilação comuns a posição C-7 de flavonas, flavanonas e isoflavonas, posição C-3 e C-7 em flavonóis, e posições C-3 e C-5- em antocianidinas (DEWICK, 2009).

Essas duas classes de flavonoides mencionadas, C e O-glicosilados, apresentam diferentes mecanismos de fragmentação, característico para cada um deles (FIGURA 5.89). Em experimentos de MS/MS é comum que as classes de flavonoides O-glicosilados, gerem íons característicos, pois estes são formados por reações de rearranjo nas ligações interglicosídicas. Dessa maneira, é muito comum observar nestes espectros a perda das unidades de açúcar, uma vez que existe uma ligação C-O que vai estar bastante enfraquecida.

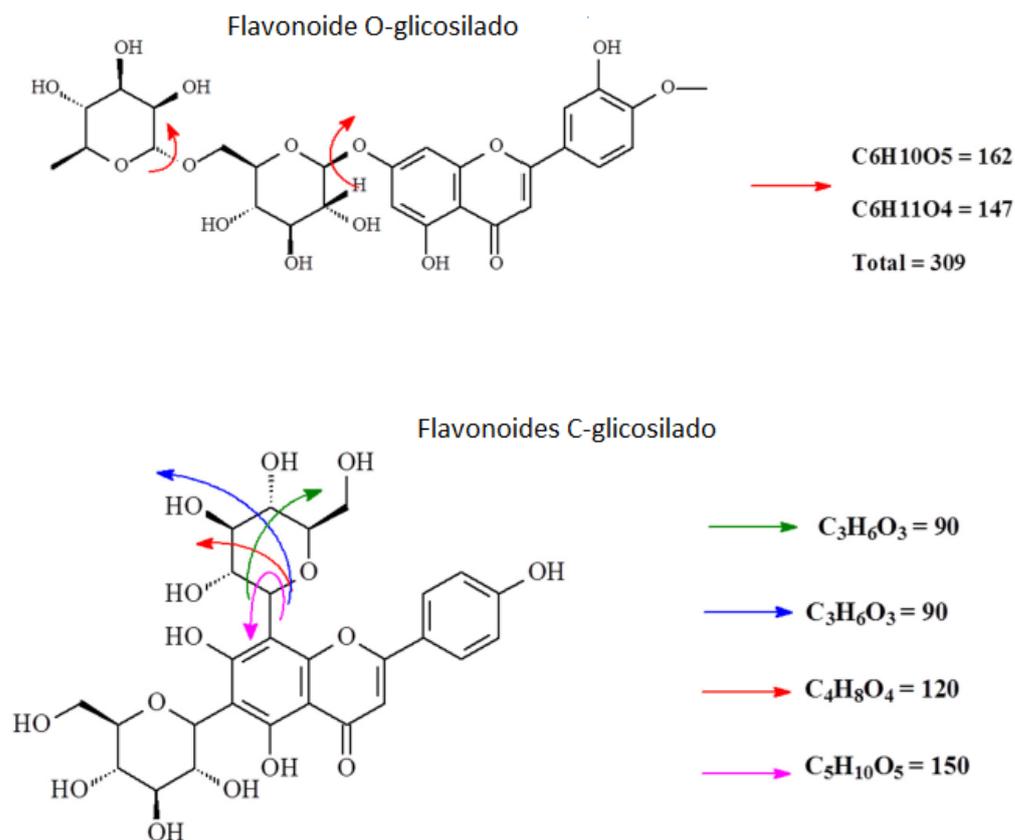


FIGURA 5. 88 - Fragmentações características de Flavonoides C-glicosilados e O-glicosilados (Fonte: Bellete, 2014).

Para os flavonoides C-glicosilados, análises de espectrometria de massas de primeira ordem irão fornecer apenas a massa do íon pseudo-molecular, análises do tipo MS/MS permitem a caracterização destes em ambos os modos de ionização, positivo ou negativo. O principal caminho de fragmentação para essa classe de flavonoides são clivagens através da própria unidade de açúcar, uma vez que estes não apresentam mais a ligação lábil C-O que os O-glicosilados possuem. Existem diversas possibilidades de clivagens para o resíduo de açúcar, sendo característico e mais comum para estas perdas de 90, 120 e 150 Da o que acontece com as hexoses (DEWICK, 2009).

Começando os estudos pelo caule superior de citros Valência enxertados nos pés francos de TST, de acordo com as análises estatísticas feitas pelo S-plot (FIGURA 5.90), as matrizes que mais se diferenciaram das amostras seguem de acordo com a FIGURA 5.91.

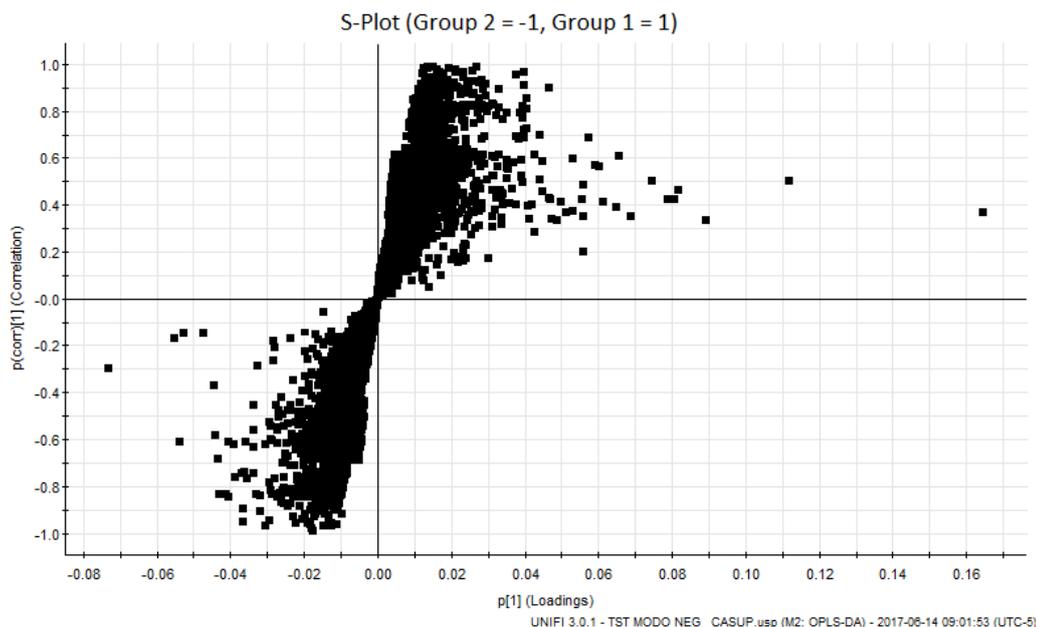


FIGURA 5. 89 - Gráfico S-Plot do caule superior de TST no modo negativo de ionização.

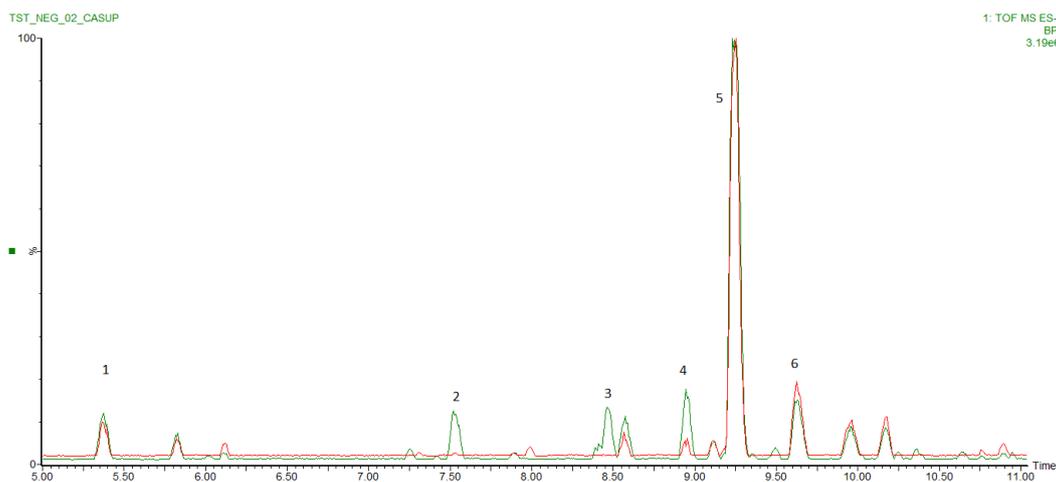


FIGURA 5. 90 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes de caule superior de plântulas de TST (ESI, modo negativo).

Os íons presentes no gráfico da FIGURA 5.90 que estão nos extremos foram os que mais se diferenciaram em plântulas de TST, com  $m/z$  593,1487 no tr em 5,37 e 7,52 min, a banda 1 e 3 no cromatograma de íons totais, infere que estamos com flavonoides glicosilados (FIGURA 5.92). Estes apresentaram uma diferença de massa teórica para experimental em 0,1 mDa. No espectro de íon molecular e de íon

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

produto (FIGURA 5.93) foram observadas para a banda 1, perdas de 240 Da, perdas estas típicas de flavonoides C-glicosilados. Essa perda de 240 Da foi proveniente de duas perdas consecutivas de 120 Da, gerando fragmentos característicos para essa molécula em  $m/z$  473 e  $m/z$  353, que são referentes a unidade de açúcar, que estão ligadas cada uma no carbono C6 e C8, como podemos observar na proposta de fragmentação na FIGURA 5.94 e 5.95.

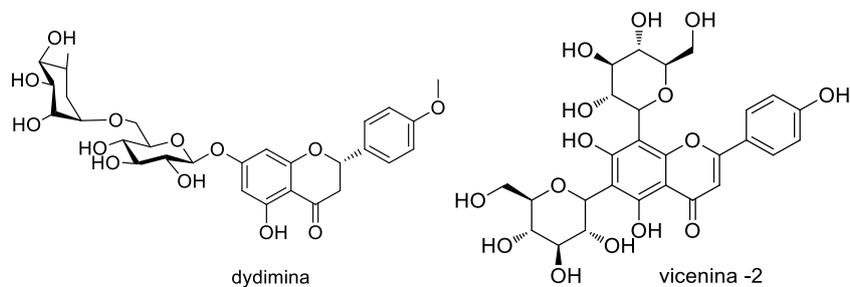


FIGURA 5. 91 - Estrutura dos flavonoides de massa neutra 594,1584 Da referente ao  $m/z$  593,1487.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

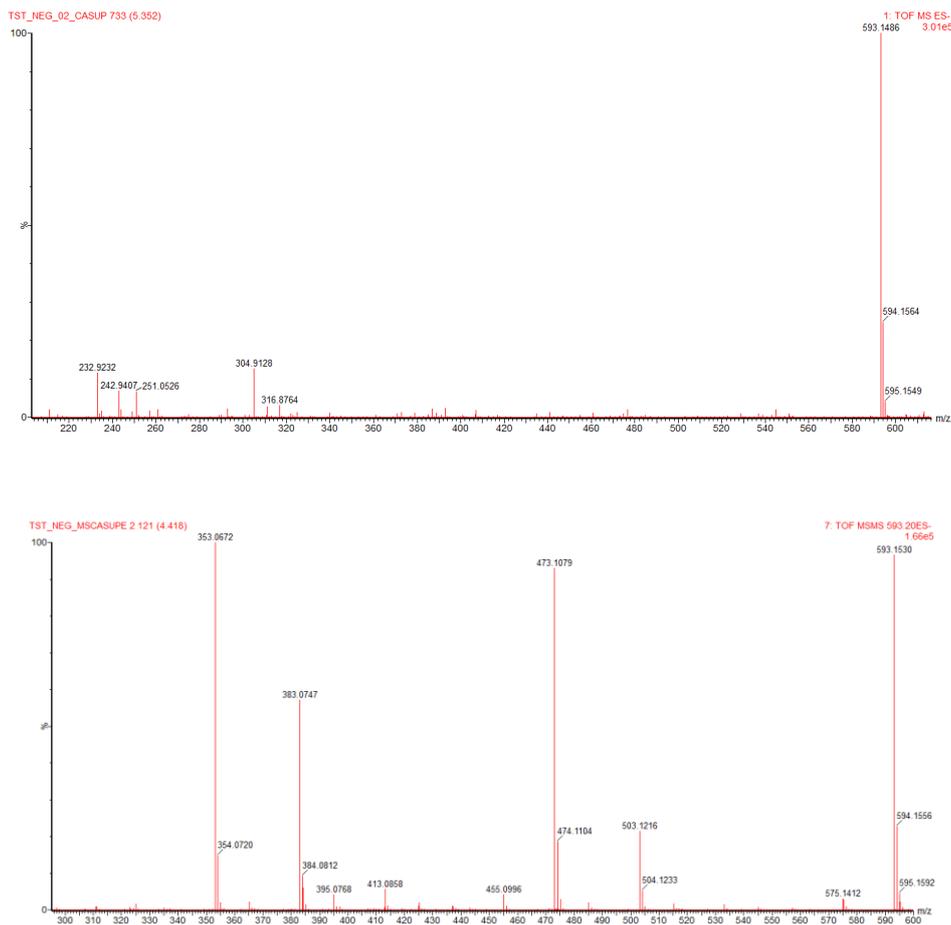


FIGURA 5. 92 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  593,1486 no tr 5,37 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide vicenina-2 (acima).

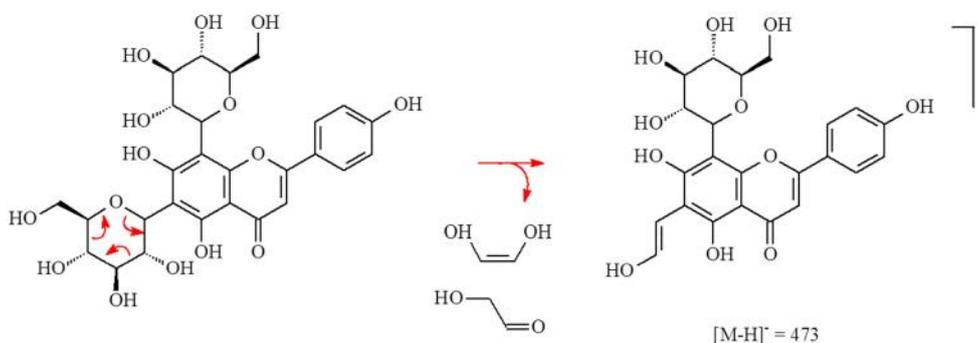


FIGURA 5. 93 -Mecanismo de fragmentação proposto para perda de 120 Da.

***ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.***

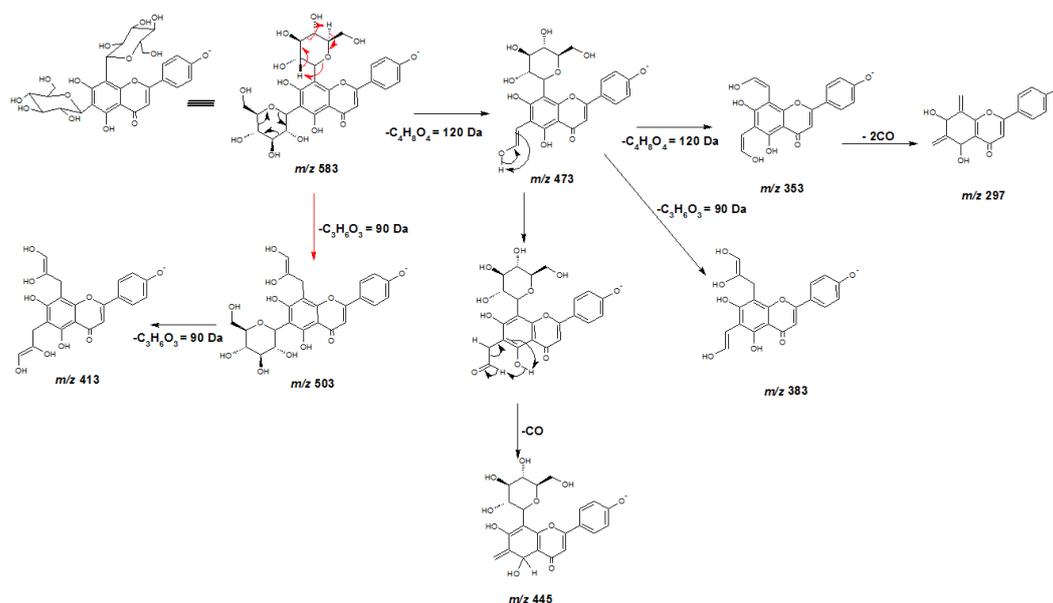


FIGURA 5. 94 - Proposta de fragmentação para o flavonoide vicenina-2, identificado no caule.

Para a banda 2 com tr em 7,52 também foi encontrado o mesmo íon pseudomolecular  $[M-H]^-$  593, porém com características de fragmentações diferentes, em seu espectro de íon produto foi possível observar um único pico bastante estável (FIGURA 5.96), as perdas observadas para esse íon molecular foram diferentes quando comparadas com a banda 1, identificada como vicenina-2. Nesse caso, houve uma perda de 308 Da gerando um fragmento com íon em  $m/z$  285, isso se dá devido uma característica de composto da classe dos flavonoides O-glicosilados como mostrado no esquema da FIGURA 5.89. Esse flavonoide é do tipo 7-O-glicosilado, seus resíduos de açúcar são uma raminose e uma glicose. A glicose está ligada a raminose pelo carbono C5, como podemos observar na proposta de fragmentação ilustrada na FIGURA 5.97.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

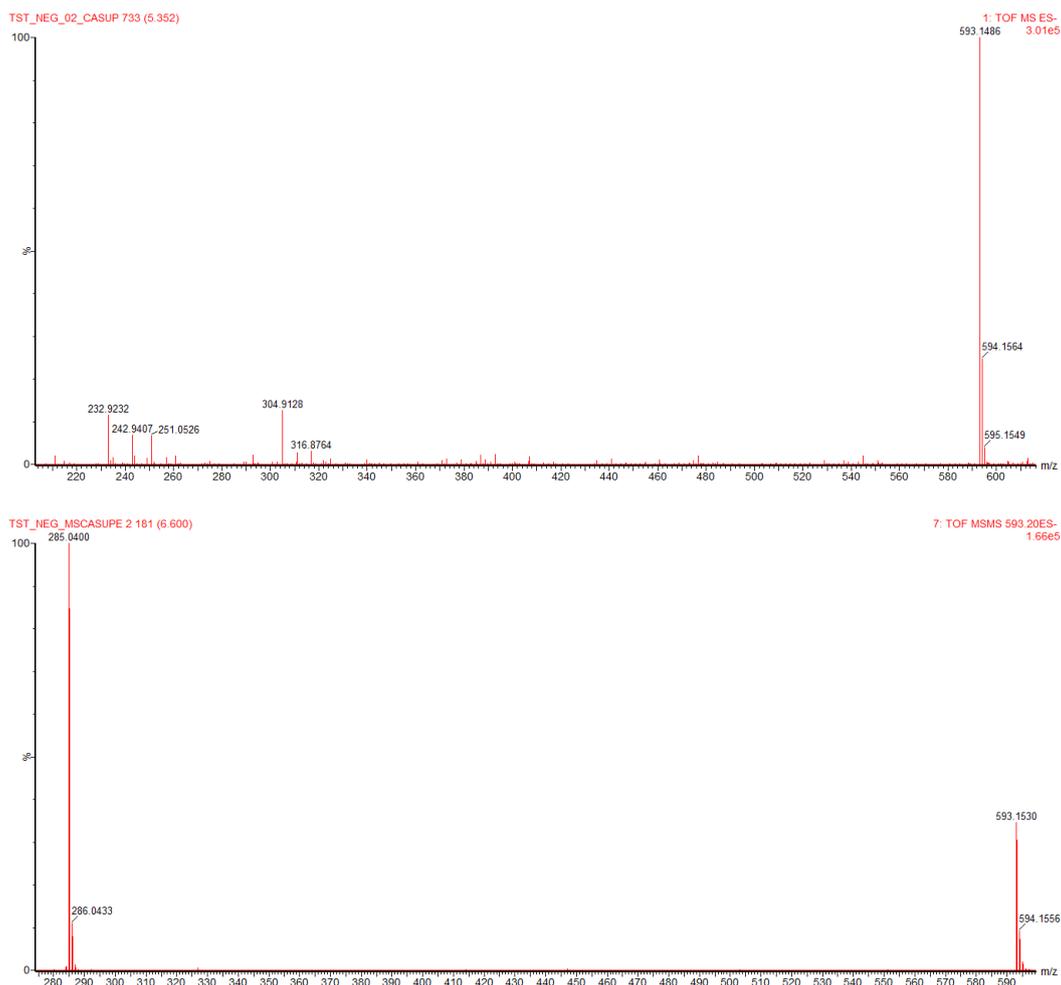


FIGURA 5. 95 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  593,1486 no tr 7,52 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide didimina (acima).

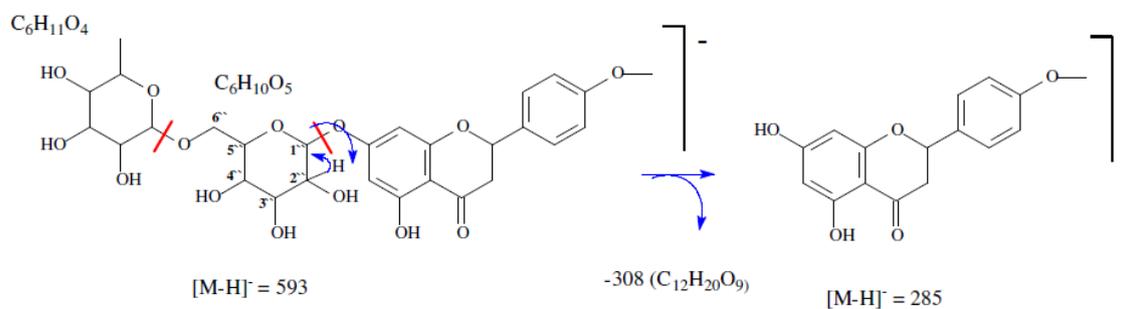


FIGURA 5. 96 - Proposta de fragmentação para o flavonoide didimina, identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

Na banda 3, no tr 8,46 min nos experimentos de *full scan* no modo negativo nas matrizes do caule superior de TST, foi possível detectar um íon pseudomolecular em  $[M-H]^-$  623 e com seus espectros de íon produto (FIGURA 5.98) com íons detectados em  $m/z$  503, 413 e 383, sendo como pico base referente para esse composto  $m/z$  383, foi possível inferir que estávamos com a molécula 6,8 –di-C-Glu-diosmetina (FIGURA 5.99). Ocorreu perda de 120 u.m.a do íon pseudomolecular, levando a  $m/z$  503, este sofre perda de 90 Da levando a  $m/z$  413, sofrendo uma outra modificação agora perdendo 120 Da para ter a fragmentação com íon base  $m/z$  383. Fragmentações estas, típicas de flavonoides C-glicosilados.

Quando o íon  $m/z$  383 perde duas unidades de monóxido de carbono (CO), ele gera íons fragmentos em  $m/z$  355 e 327, referentes a perda de 28 Da para cada fragmentação, como mostra a proposta para essa molécula na FIGURA 5.100.

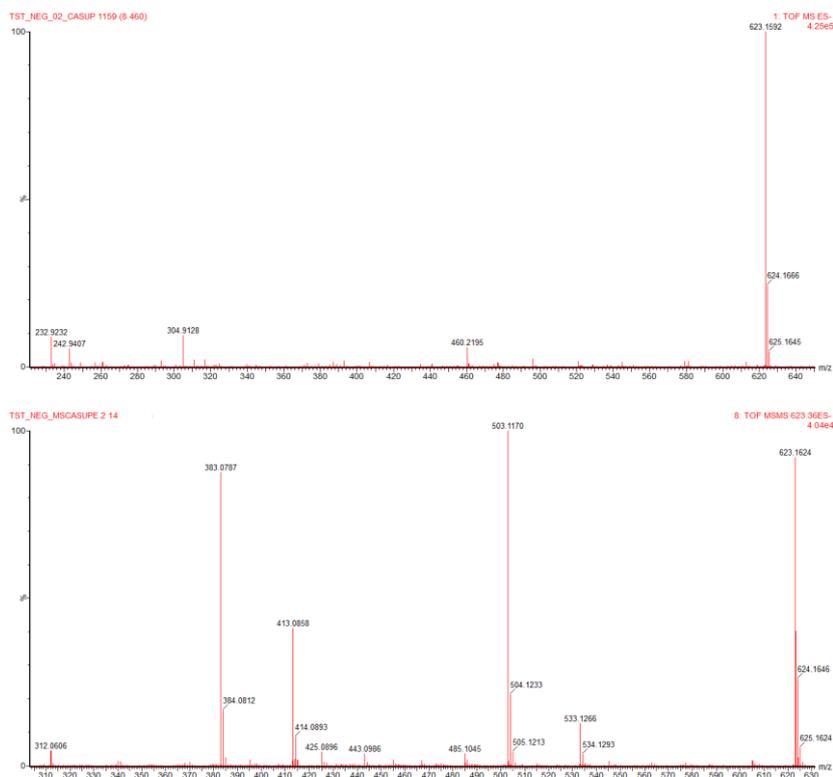
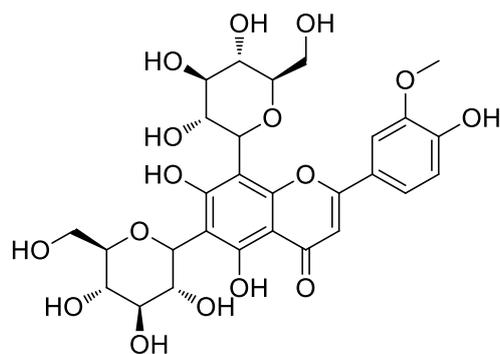


FIGURA 5. 97 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  623,1592 no tr 8,46 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide 6,8-Di-C-Glu-diosmetina (acima).



6,8-di-C-Glu-diosmetina

FIGURA 5. 98 - Estrutura do flavonoide de massa referente ao  $m/z$  623,1593.

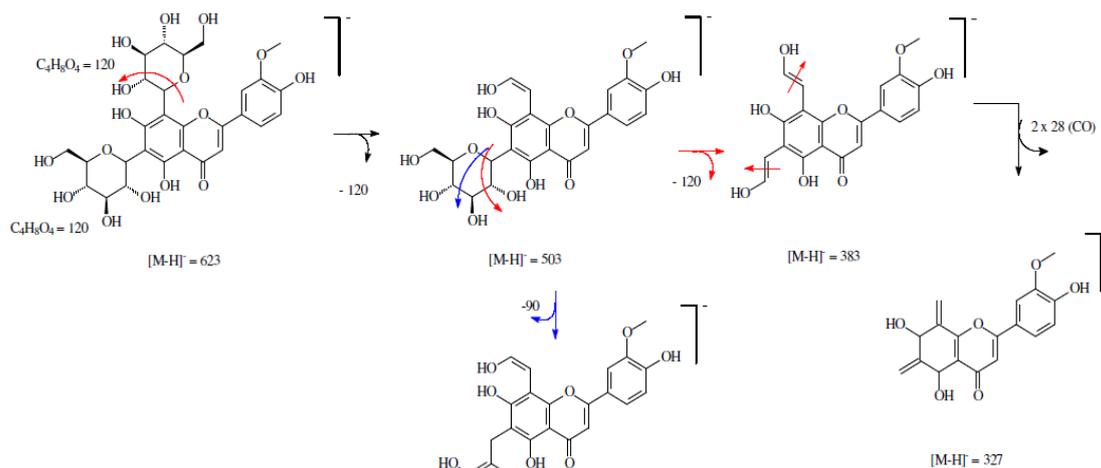


FIGURA 5. 99 - Proposta de fragmentação para o flavonoide 6,8-di-C-glu-diosmetina , identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).

Na banda de variação 4 com tr 8,94 foi observado o íon pseudomolecular desprotonado em  $[M-H]^-$  607,1681 na avaliação dos espectros de seus íons produtos foi possível detectar a presença do íon  $m/z$  301, havendo uma perda de 308 Da, este pico é bastante estável e intenso, caracterizando essa molécula com o tipo que sofre fragmentações como os flavonoides O-glicosilados. O flavonoide em questão é a diosmina, como mostra a FIGURA 5.101. De acordo com o espectro de íons produtos ilustrados na FIGURA 5.102, foi possível propor uma fragmentação para o flavonoide como mostra a FIGURA 5.103.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

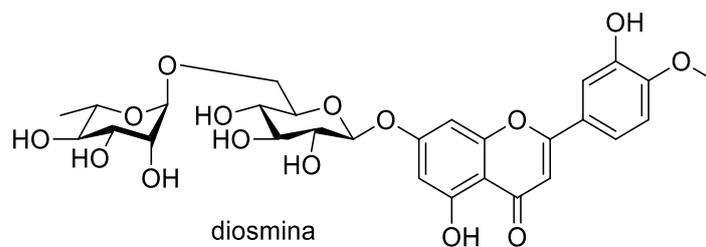


FIGURA 5. 100 - Estrutura do flavonoide de massa referente ao  $m/z$  607,1681.

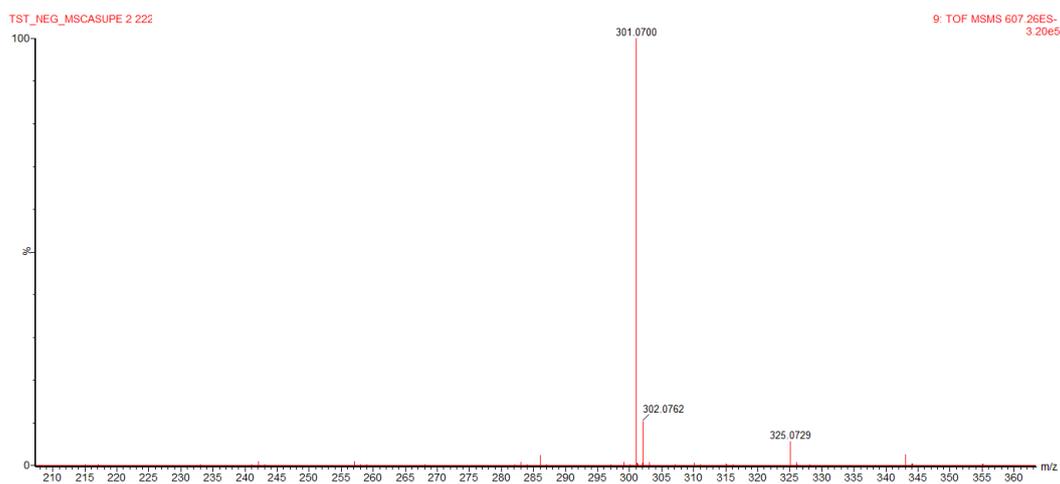
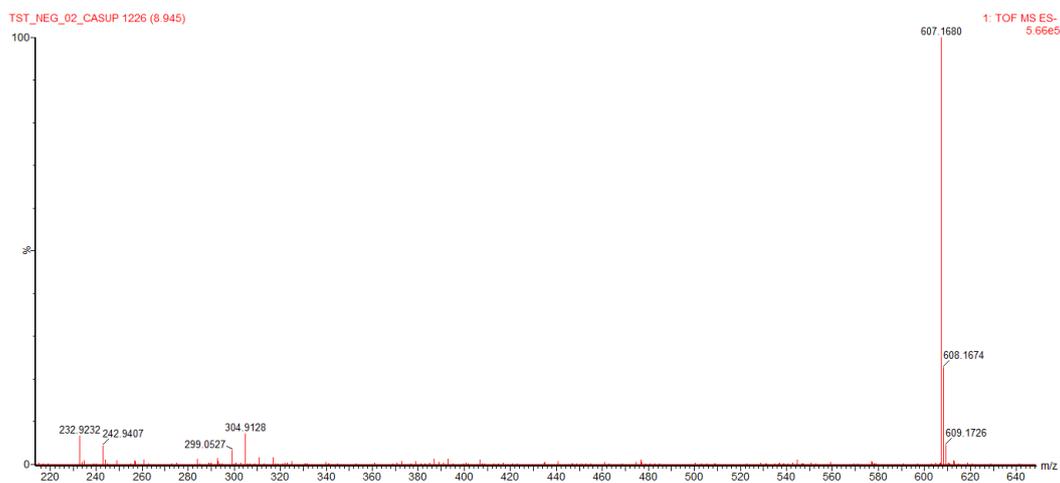


FIGURA 5. 101 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  607,1681 no tr 8,94 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide diosmina (acima).

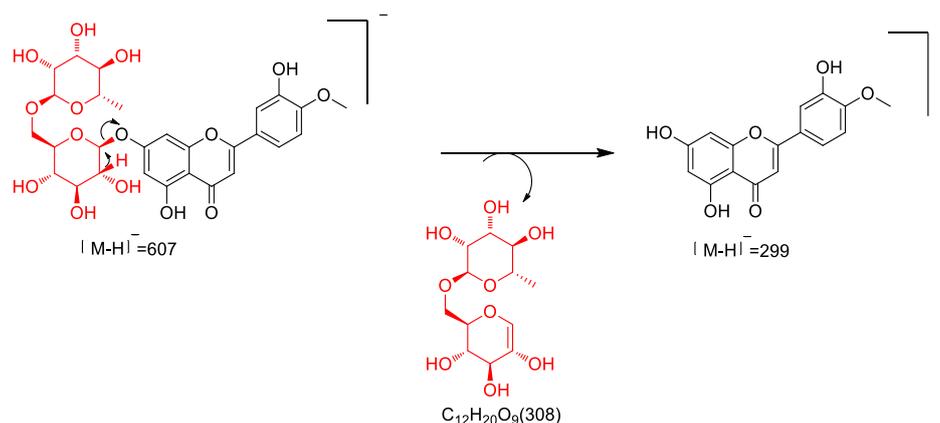


FIGURA 5. 102 - Proposta de fragmentação para o flavonoide diosmina, identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).

A análise da banda cromatográfica 5 com tr 9,23 mostra o íon pseudomolecular desprotonado em  $[M-H]^-$  609, 1897 com o íon de fragmento principal  $m/z$  301, obtido também pela perda de 308 Da.

A partir das informações de íon pseudomolecular, como é característico, como já foi mencionado de flavonoides do tipo O-glicosilado, sugeriu-se dois compostos para essa massa de 609, que seria a possibilidade de ser o flavonoide 7-O-glicosilado hesperidina ou 3-O-glicosilado rutina. Esses flavonoides podem sofrer clivagem tanto homolítica como heterolítica, quando se compara os flavonoides hesperidina e rutina, a rutina produz clivagens mais homo do que heterolítica e essa abundância relativa pode ser utilizada como critério para a posição da unidade de açúcar na molécula. Íons fragmentos de clivagem heterolítica  $m/z$  301 é bem característico para o flavonoide 7-O-glicosilados e para clivagem homolítica  $m/z$  300 com padrão comercial é característico para flavonoide 3-O-glicosilado. Dessa forma, analisando os fragmentos dos íons produtos (FIGURA 5.105) das matrizes de caule superior de TST, leva-se a crer que a molécula em questão é a hesperidina (FIGURA 5.104). A proposta de fragmentação para o flavonoide hesperidina está ilustrado na FIGURA 5.106.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

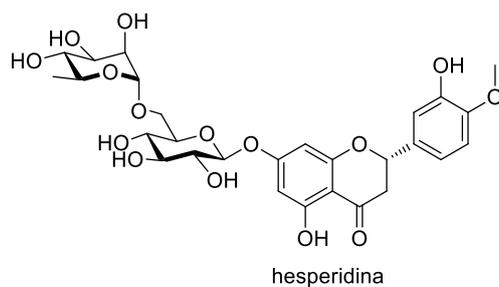


FIGURA 5. 103 - Estrutura do flavonoide de massa referente ao m/z 609,1879.

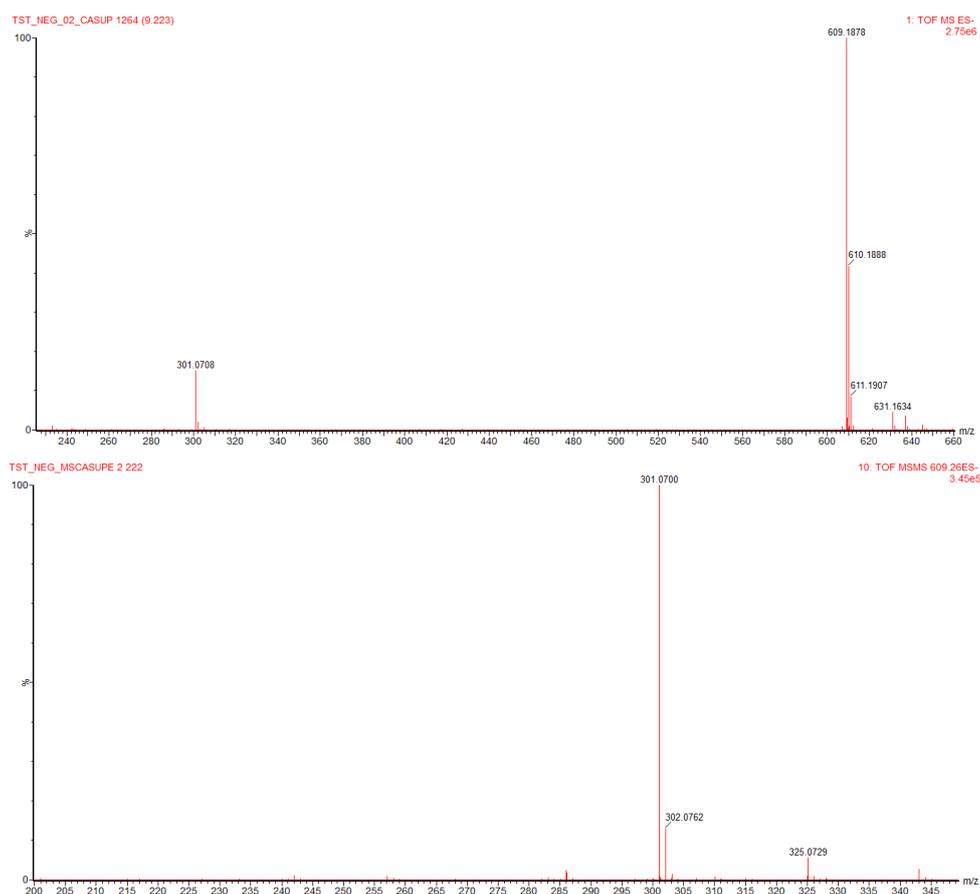


FIGURA 5. 104 - Espectro de massas para o íon m/z 609,1878 no tr 9,23 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular do flavonoide hesperidina (acima).

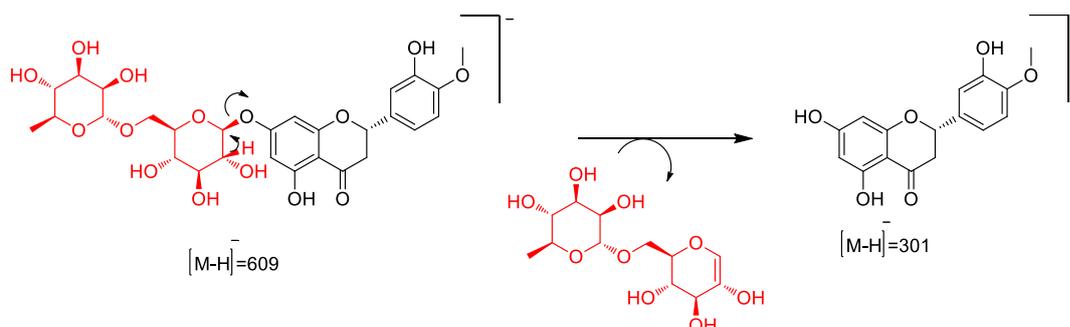


FIGURA 5. 105 - Proposta de fragmentação para o flavonoide hesperidina, identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).

A análise na banda cromatográfica 6 com tr 9,63 min mostrou o íon pseudomolecular  $m/z$  245,0804, o qual na busca no banco de dados feito para esse trabalho foi relacionado às cumarinas, 7-demetilisotamarina (FIGURA 5.107) e 7-hidróxi-5-prenilóxicumarina. A presença do pico  $m/z$  227 oriundos da perda da água levaram a propor a identidade da banda 6 como sendo a cumarina 7-demetilisotamarina como ilustrado na FIGURA 5.108, pois esta é a única das cumarinas com a possibilidade de perder esses 18 Da, inicialmente como pode ser visto na proposta para sua fragmentação na FIGURA 5.109.

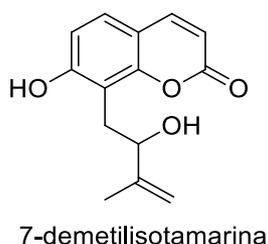


FIGURA 5. 106 - Estrutura da cumarina de massa neutra 246,0892 Da referente ao  $m/z$  245,0804.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

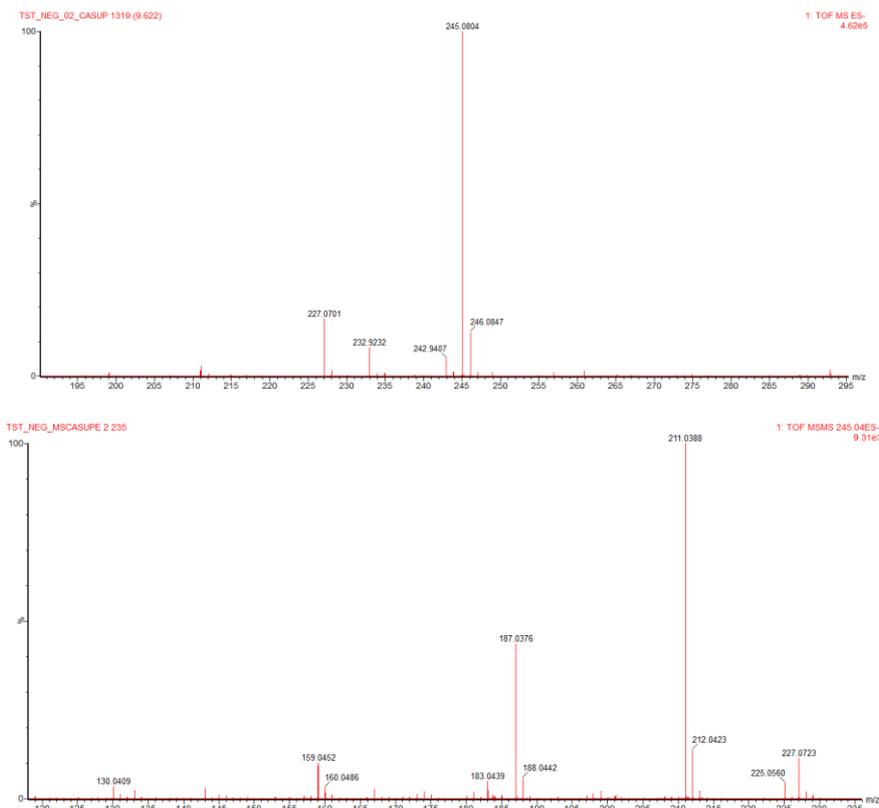


FIGURA 5. 107 - Espectro de massas para o íon  $m/z$  245,0804 no tr 9,63 min encontrado no caule superior de TST (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (abaixo) e espectro do íon molecular da cumarina 7- demetilisotamarina (acima).

Como proposta de fragmentação temos:

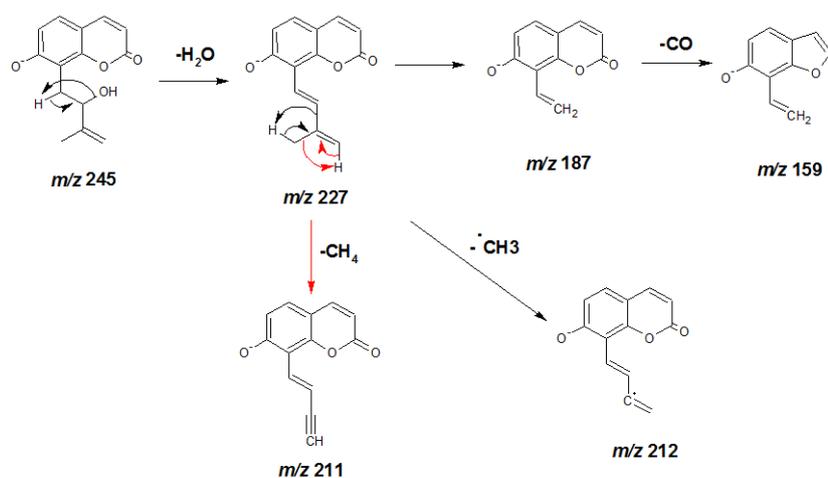


FIGURA 5. 108 - Proposta de fragmentação para a cumarina 7-demetilisotamarina, identificado no caule superior do citrus de TST (ESI, modo negativo).

Logo abaixo é mostrado os metabólitos que mais foram evidenciados após análises estatísticas dos dados dessas matrizes, como mostra a TABELA 5.9 a seguir.

TABELA 5. 9 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico no caule superior das plântulas de TST no modo negativo.

Banda	t <sub>r</sub> (min)	[M-H] <sup>+</sup>	Substância	Maior Produção	Varição
1	5,37	593,1487	Vicenina-2	TSTCASUP	2,06
2	7,52	593,1487	Didymina	TSTCASUP	2,18
3	8,46	623,1593	<b>6,8-di-C-Glu- diosmetina</b>	TSTCASUP	<b>13,09</b>
4	8,94	607,1681	<b>Diosmina</b>	TSTCASUP	<b>11,78</b>
5	9,23	609,1879	Hesperidina	TSTCASUP	1,55
6	9,63	245,0804	7-Demetilisotamarina	TSTCASUP	1,09

Analisando os dados acima, para as matrizes do caule superior nas plântulas susceptível ao oomiceto *Phytophthora nicotianae*, percebe-se que os seis metabólitos que mais se diferenciaram dentro das análises feitas de estudo metabolômico de amostras sadias versus doentes, todos eles variaram de uma mesma forma, houve um aumento, ou seja, provavelmente esteja ocorrendo um desvio em sua rota biossintética para obter nessas matrizes esses metabólitos na presença do patógeno, onde a variação maior para essa matriz foram os metabolitos 6,8 -di-C-glu-diosmetina e diosmina, substâncias essas que podem ser consideradas como fitoantecipinas no estudo do caule superior em plântulas mais susceptíveis a gomose de citros.

Analisando as matrizes das plântulas de CTSW no modo negativo de ionização através da técnica estatística S-plot como mostra a FIGURA 5.110, foi possível observar que a variação foi similar as matrizes de TST, alguns dos metabolitos já descrito acima também sofreram as maiores variações, como mostra as FIGURA 5.111.

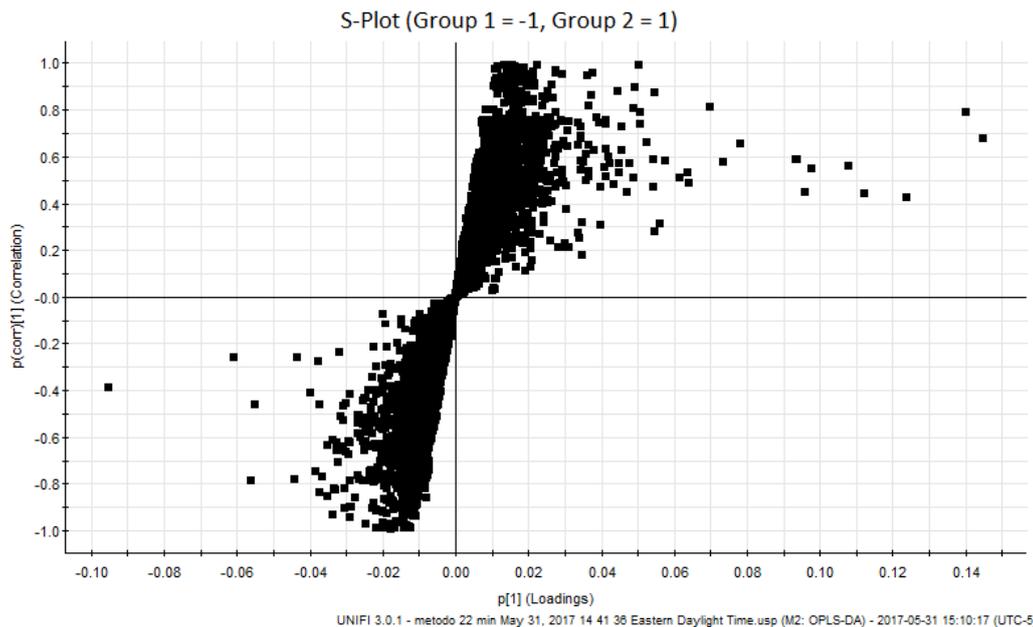


FIGURA 5. 109 - Gráfico S-Plot do caule superior de CTSW no modo negativo de ionização.

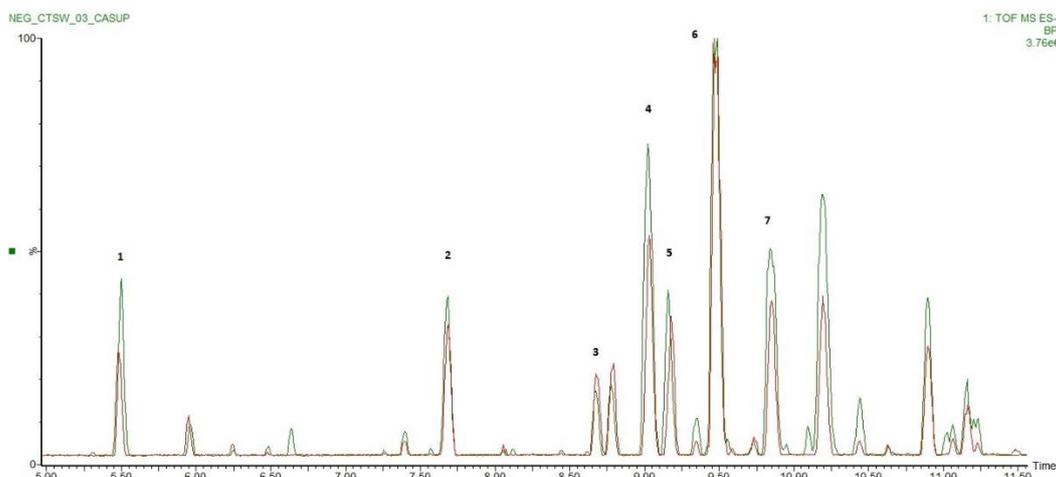


FIGURA 5. 110 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes de caule superior de plântulas de CTSW (ESI, modo negativo).

Nota-se ao analisar o cromatograma de íons acima, que a matriz de CTSW variou alguns picos a mais do que as matrizes de TST, levando em consideração que estamos tratando de estudo comparativo, vamos focar apenas na identificação nesse caso dos metabólitos que mais estão variando, alguns picos até a escrita da tese ainda não estavam concluídos com a identificação de todas as moléculas.

A banda 1 e 2 do cromatograma de íons para as plântulas de CTSW em

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

seu caule inferior já foi identificada nas matrizes de TST. No tr 5,50 e 7,68 min, mostrou o mesmo íon pseudomolecular  $m/z$  593,1509, onde pela identificação de seus espectros de íons molecular e produtos já discutido acima, observou-se que se trata dos flavonoides vicenina-2 e didymina, respectivamente.

A banda discriminada como 3, no tr 8,67 min tem como íon pseudomolecular  $[M-H]^-$  623,1615 tendo como fragmentação características em seu espectro de íons produtos  $m/z$  383, evidenciando estarmos com o flavonoide 6, 8-Di-C-Glu-diosmetina.

A banda 4 no cromatograma de íons no tr 9,02 min, até o momento ainda não foi identificado, possui íon com pico base  $m/z$  579,1769, esse possível composto está variando aumentando a produção nas matrizes de CTSW consideradas como doentes, ou seja, aquelas com a presença do patógeno.

Com as demais bandas, também observamos que há um aumento em sua produção de metabólitos nas matrizes inoculadas com o oomiceto, no tr 9,16; 9,49; 9,84 min, estas respectivamente, possuem íons que já foram identificados e discutidos nessa tese, com  $m/z$  607,1652 trata-se da diosmina;  $m/z$  609,1899 da hesperidina e com  $m/z$  245,0824 a 7-demetilisotamarina, como é ilustrado na FIGURA 5.112.



FIGURA 5. 111 - Espectro dos íons moleculares no modo negativo de ionização: a) vicenina-2, com  $m/z$  593,1509; b) didymina, com  $m/z$  593,1509; c) 6,8-di-c-glu-diosmetina, com  $m/z$  623,1615; d) NI, com  $m/z$  579,1769; e) diosmina, com  $m/z$  607,1652; f) hesperidina, com  $m/z$  609,1899 e g) 7-demetilisotamarina, com  $m/z$  245,0824.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

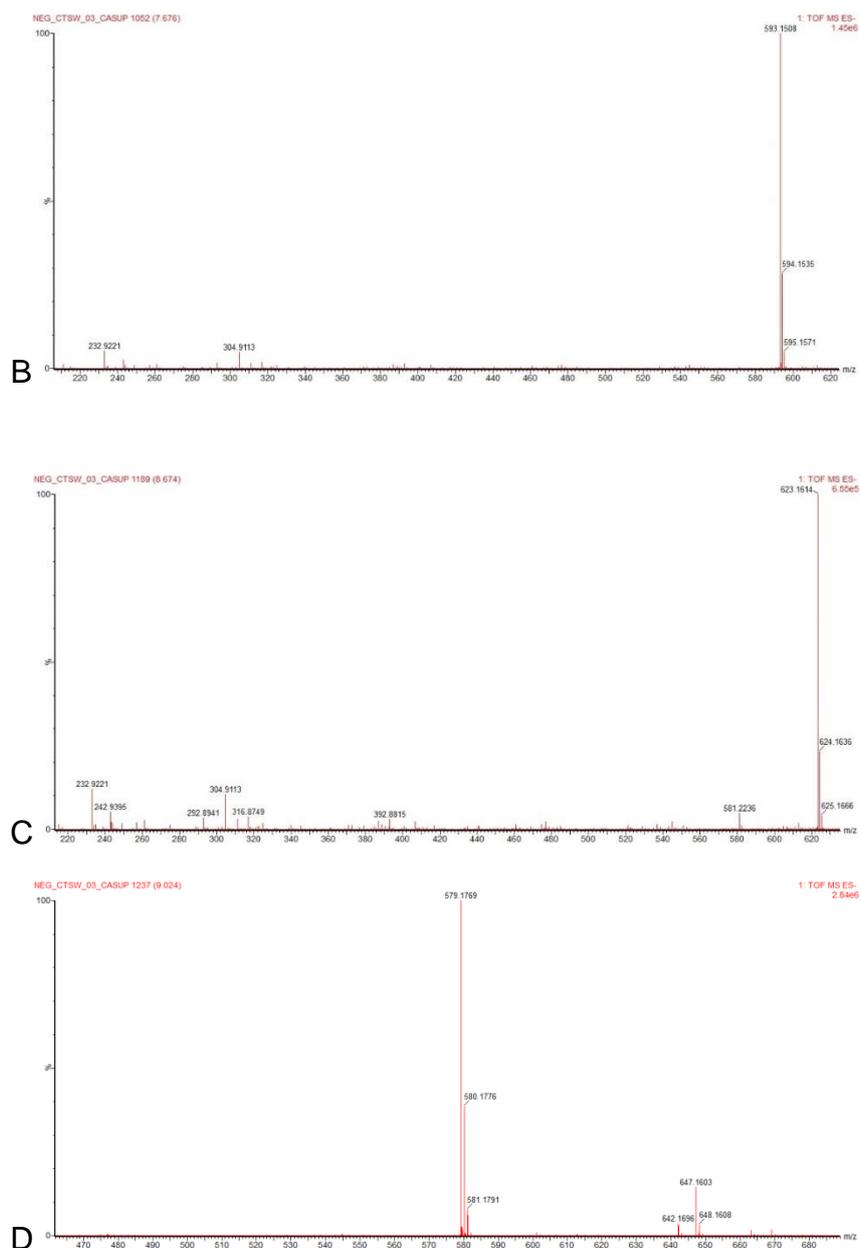


FIGURA 5. 112 - Continuação do espectro dos íons moleculares no modo negativo de ionização: a) vicenina-2, com m/z 593,1509; b) didymina, com m/z 593,1509; c) 6,8-di-c-glu-diosmetina, com m/z 623,1615; d) NI, com m/z 579,1769; e) diosmina, com m/z 607,1652; f) hesperidina, com m/z 609,1899 e g) 7-demetilisotamarina, com m/z 245,0824.

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

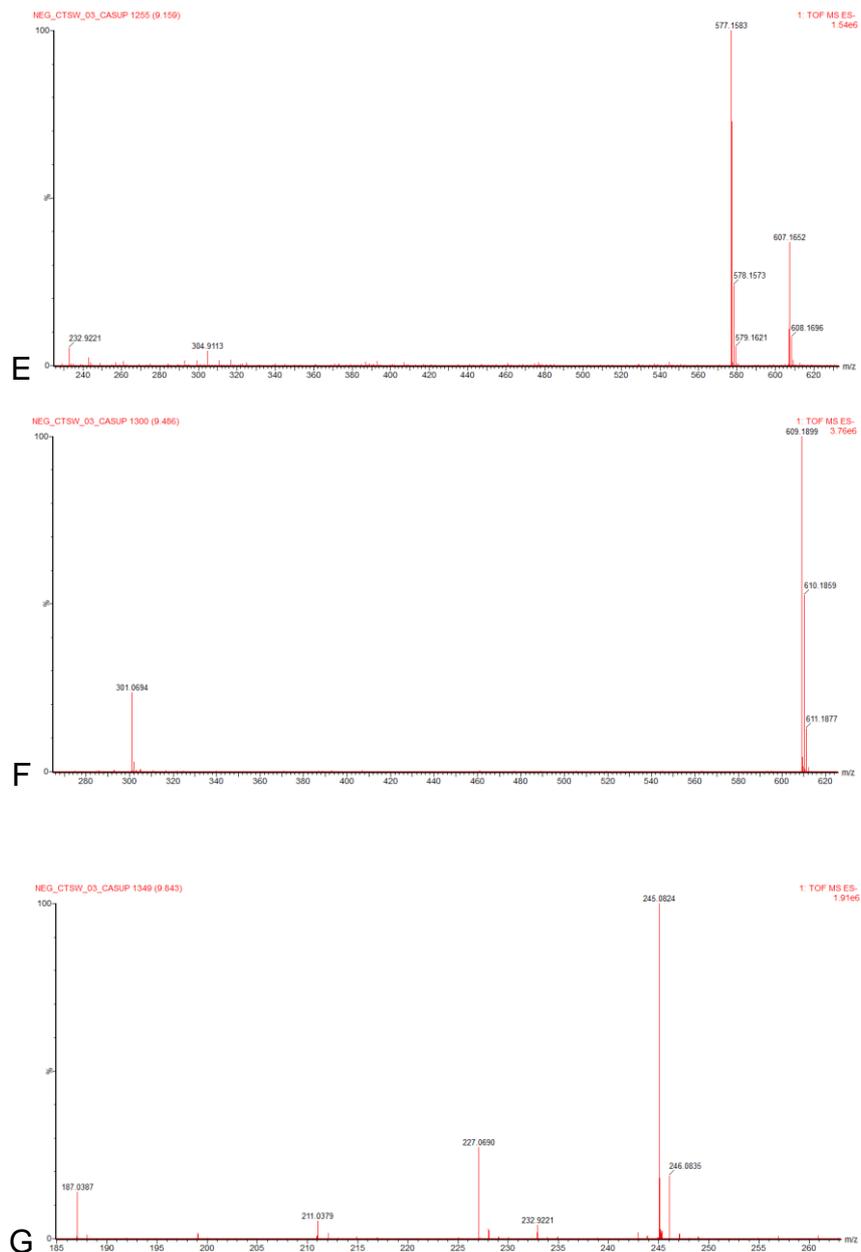


FIGURA 5. 113 - Continuação do espectro dos íons moleculares no modo negativo de ionização: a) vicenina-2, com m/z 593,1509; b) didymina, com m/z 593,1509; c) 6,8-di-c-glu-diosmetina, com m/z 623,1615; d) NI, com m/z 579,1769; e) diosmina, com m/z 607,1652; f) hesperidina, com m/z 609,1899 e g) 7-demetilisotamarina, com m/z 245,0824.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

Logo abaixo é mostrado os metabólitos que mais foram evidenciados após análises estatísticas dos dados das matrizes de CTSW, como mostra a TABELA 5.10 a seguir.

TABELA 5. 10 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico no caule superior das plântulas de CTSW no modo negativo.

Banda	t <sub>r</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup>	Substância	Maior Produção	Variação
1	5,50	593,1509	Vicenina-2	TSTCASUP	1,57
2	7,68	593,1509	Didymina	TSTCASUP	1,18
3	8,67	623,1615	6,8-di-C-Glu-diosmetina	TSTCATESUP	1,30
4	9,02	579,1769	NI	TSTCASUP	1,69
4	9,16	607,1652	Diosmina	TSTCASUP	1,26
5	9,49	609,1899	Hesperidina	TSTCASUP	1,03
6	9,84	245,0824	7-Demetilisotamarina	TSTCASUP	2,20

NI= não identificado até o momento da escrita da tese\*

O que podemos notar ao comparar as duas matrizes em estudo, que no órgão do caule superior onde houve a inoculação pelo método da agulha por suspensão de zoósporos do oomiceto causador da gomose de citros, que para as plântulas de TST e CTSW, os metabólitos que variaram praticamente foram os mesmos, houve um aumento na produção nas matrizes doentes das duas plântulas, com exceção de um composto na matriz de CTSW, o metabólito 6,8-di-C-glu-diosmetina, que nesse caso teve uma diminuição em sua concentração de 1,30 quando comparado a matrizes dessa mesma plântula porém sadias. Em matrizes de TST esse mesmo metabólito variou cerca de 13,09 vezes a mais, ou seja, aumentando sua produção em plântulas mais susceptível a *P.nicotianae*, ocorrendo também uma variação bem elevada no flavonoide diosmina na mesma matriz, esse aumentando sua produção em 11,78 vezes nas matrizes doentes quando estas são comparadas com as do tratamento sadio (TSTCATESUP). O flavonoide hesperidina também ocorre um aumento nas duas plântulas, com um aumento em concentração em matrizes de CTSW em 1,09 vezes a mais do que em matrizes de TST. A cumarina 7-demetilisotamarina também mostrou uma variação bem significativa quando avaliada as plântulas separadas com suas matrizes sadias, e fazendo uma comparação direta

dos porta-enxertos em estudo essa cumarina aumenta a sua produção 7,09 vezes em matrizes mais resistentes ao oomiceto do que em matrizes mais susceptíveis. Esses compostos, podem ser considerados como fitoantecipinas no controle do hospedeiro versus o patógeno. De acordo com a TABELA 5.11 podemos observar a variação direta dos metabólitos de TSTCASUP versus CTSWCASUP.

TABELA 5. 11 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de área relativa de perfil químico nas folhas doentes das plântulas de TSTCASUP versus CTSWCASUP (ESI- no modo negativo).

<b>Banda</b>	<b>Substância</b>	<b>Maior Produção</b>	<b>Varição</b>
<b>1</b>	<b>Vicenina-2</b>	CTSWCASUP	<b>4,16</b>
<b>2</b>	Didymina	CTSWCASUP	2,40
<b>3</b>	6,8-di-C-Glu-diosmetina	TSTCASUP	1,15
<b>4</b>	Diosmina	CTSWCASUP	2,17
<b>5</b>	Hesperidina	CTSWCASUP	1,09
<b>6</b>	<b>7-Demetilisotamarina</b>	CTSWCASUP	<b>7,09</b>

### **5.7.5. Análises das folhas dos pés francos no modo negativo de ionização**

No tratamento via S-plot, como ilustrado na FIGURA 5.113 das matrizes de TST e CTSW no modo negativo de ionização foram possíveis evidenciar 6 bandas cromatográficas como as mais significativas na variação de perfil metabolômico (FIGURAS 5.114). Nesse caso, foi feita uma comparação direta entre as matrizes doentes em busca dos metabólitos que mais sofreram variações, pois como a parte área estávamos com a mesma espécie (Laranja Valência), o intuito era avaliar a diferença que poderia ocorrer entre os porta enxertos em relação a cada plântula.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

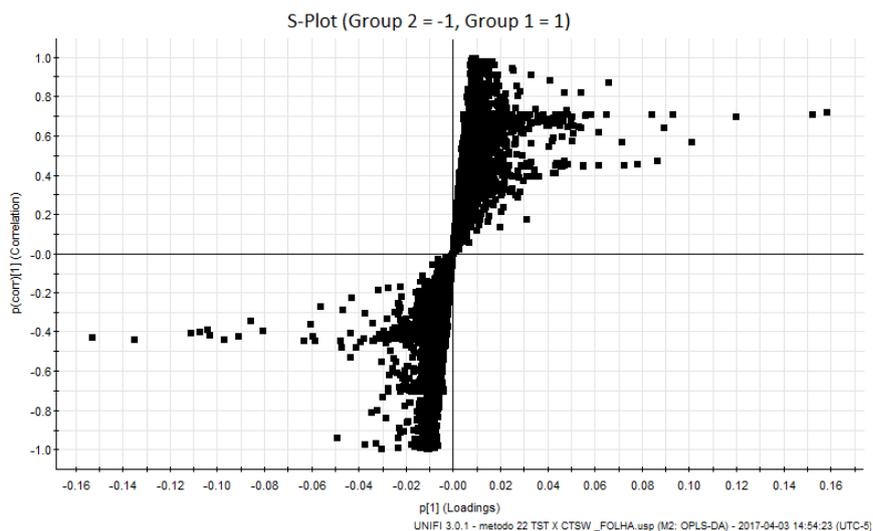


FIGURA 5. 114 - Gráfico S-Plot das folhas de TST versus CTSW no modo negativo de ionização.

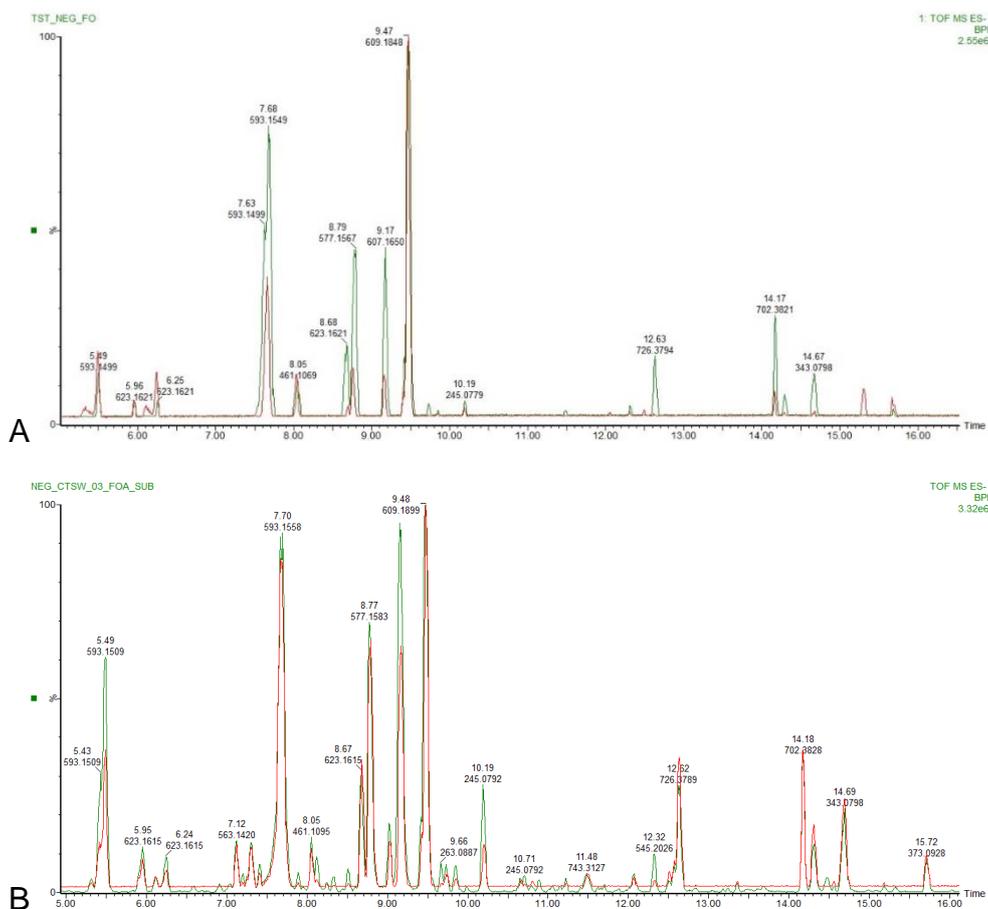


FIGURA 5. 115 - Bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes das folhas no modo negativo de ionização. a) Cromatograma ampliado de íons totais de TST FOTE (vermelho) versus TSTFO (verde); b) Cromatograma ampliado de íons totais de CTSW FOTE (vermelho) versus CTSWFO (verde).

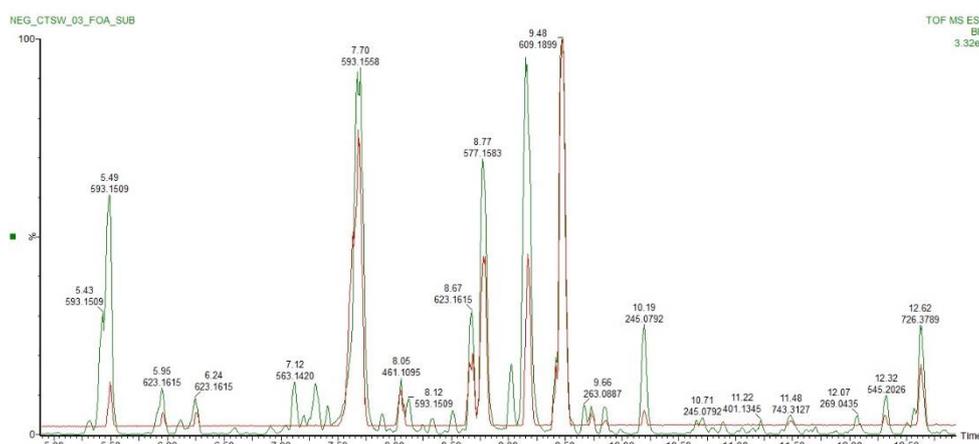


FIGURA 5. 116 - Sobreposição das bandas cromatográficas evidenciadas pelo gráfico S-plot nas matrizes das folhas no modo negativo de ionização: Cromatograma ampliado de íons totais de TST FO (vermelho) versus CTSWFO (verde).

O que foi possível observar nas matrizes analisadas de TST e CTSW em folhas (FIGURAS 5.114 e 5.115), que a variação dos principais metabólitos, referiam àqueles já identificados e discutidos nas matrizes do caule superior de ambas as plântulas. O que se torna notório nesse estudo foi que o porta enxerto pode estar influenciando o aumento ou desvio da biossíntese dessas substâncias, ressaltando que a parte área de ambas as plântulas se trata de Laranja Valência, logo já era esperado que os compostos que tivessem variações fossem bem semelhantes. O que percebemos quando comparamos as duas matrizes em estudo é que ocorre uma maior produção de flavonoides nas plântulas doentes por gomose. Por exemplo, no tr 5,49 min, com íon pseudomolecular  $[M-H]^-$  593,1509 correspondentes ao flavonoide vicenina-2, há um aumento de 16,02 vezes em sua concentração em amostras de CTSW do que em TST. Esse aumento acontece para os demais íons referentes aos tr 7,67; 8,68; 9,17; 9,48 e 10,20 min, dentro dessas matrizes os flavonoides que mais variaram foram: vicenina -2; 6,8-di-C-glu-diosmetina; hesperidina e a cumarina 7-demetilisotamarina, como será mostrado nas TABELAS 5.12 a 5.14.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

TABELA 5. 12 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico nas folhas das plântulas de TSTFOTE versus TSTFO (ESI- no modo negativo).

Banda	t <sub>r</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup>	Substância	Maior Produção	Variação
1	5,49	593,1509	Vicenina-2	TSTFOTE	1,92
2	7,65	593,1558	Didymina	TSTFO	3,0
3	8,68	623,1621	<b>6,8-di-C-Glu-diosmetina</b>	TSTFO	<b>28,6</b>
4	9,16	607,1650	<b>Diosmina</b>	TSTFO	<b>4,22</b>
5	9,47	609,1848	Hesperidina	TSTFO	1,07
6	10,19	245,0779	7- Demetilisotamarina	TSTFO	1,37

TABELA 5. 13 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico nas folhas das plântulas de CTSWFOTE versus CTSWFO (ESI- no modo negativo).

Banda	t <sub>r</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup>	Substância	Maior Produção	Variação
1	5,49	593,1549	<b>Vicenina-2</b>	CTSWFO	<b>2,43</b>
2	7,67	593,1549	Didymina	CTSWFO	1,05
3	8,68	623,1615	6,8-di-C-Glu-diosmetina	CTSWFOTE	1,18
4	9,17	607,1650	Diosmina	CTSWFO	1,59
5	9,48	609,1899	Hesperidina	CTSWFO	1,06
6	10,20	245,0792	7- <b>Demetilisotamarina</b>	CTSWFO	<b>2,56</b>

TABELA 5. 14 - Discriminação dos metabólitos secundários evidenciados na diferença de perfil químico em relação a área relativa nas folhas doentes das plântulas de TSTFO versus CTSWFO (ESI- no modo negativo).

Banda	Substância	Maior Produção	Variação
1	<b>Vicenina-2</b>	CTSWFO	<b>16,08</b>
2	Didymina	CTSWFO	1,65
3	6,8-di-C-Glu-diosmetina	CTSWFO	1,87
4	<b>Diosmina</b>	CTSWFO	<b>4,43</b>
5	Hesperidina	CTSWFO	1,51
6	7- <b>Demetilisotamarina</b>	CTSWFO	<b>15,45</b>

### **5.8. Validação do método analítico para quantificação das cumarinas e flavonoides nos órgãos das plântulas de *Citrus sinensis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV)**

A validação do método analítico envolve processos através dos quais, estudos foram utilizados para garantir que a escolha do método em questão atendesse às exigências desejadas, fornecendo os dados necessários de que o método realiza o propósito que é indicado. A validação da eficiência do método analítico foi desenvolvida pelas técnicas cromatográficas utilizadas para a identificação dos compostos em questão e revalidada no presente trabalho investigando a faixa linear de trabalho, seletividade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e detecção, além da recuperação.

O método de validação por CLAE-UV apresentou seletividade para as matrizes analisadas, pois foi possível observar que no tempo de retenção para as amostras de cumarinas e flavonoide o cromatograma da injeção das amostras com a fase móvel-controle manteve a sua linha de base e não apresentou interferentes.

As curvas analíticas foram desenvolvidas estabelecendo o método para as cumarinas e um outro método para o flavonoide hesperidina, utilizou-se uma coluna de fase reversa ZORBAX XDB- C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm), temperatura de 35°C, a fase móvel de melhor seletividade era constituída de água e acetonitrila (60:40; v/v), vazão 1,0 mL/min, volume de injeção de 15 µL e o comprimento de onda de 260 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  absorção) na detecção no ultravioleta durante a corrida. O tempo total da eluição foi de 35 min, para as cumarinas xantiletina, seselina e 5-metoxiseselina. Para o flavonoide hesperidina, a seletividade foi de água e acetonitrila (90:10), vazão 1,0 mL/min, volume de injeção de 10 µL e o comprimento de onda de 260 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  absorção). Obteve-se os cromatogramas com picos de resolução otimizada para os analitos e amostras do nosso interesse.

### **5.8.1. Faixa dinâmica do trabalho – Linearidade**

A determinação da linearidade foi efetuada através do cálculo de regressão linear obtido a partir do gráfico da área das bandas de interesse versus a concentração das soluções padrões. A construção da curva de calibração da solução padrão de xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina e hesperidina para cada uma, foram feitas nas seguintes faixas de concentração: 1,00; 2,50; 5,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , como ilustrado na FIGURA 5.116.

Os valores experimentais obtidos para cada curva de calibração das cumarinas e do flavonoide por CLAE-UV seguem nas TABELAS 5.15 a 5.18. Os parâmetros como faixa de linearidade, equação de calibração, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) relativos as curvas de calibração, assim como os valores dos tratamentos gráficos dos dados experimentais obtidos para as curvas de calibração, estavam dentro dos padrões de análise de variância (ANOVA), onde estabelecem que as curvas ( $R^2$ ) devem ser maiores que 0,98.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

TABELA 5. 15 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cumarina xantiletina por CLAE-UV.

Concentração (µg/mL)	Área do Pico (mAU)			Média	DP	CV (%)
	Curve 1	Curve 2	Curve 3			
1,00	1,49	1,52	1,50	1,50	0,02	1,00
2,50	2,92	2,94	2,93	2,93	0,01	0,35
5,00	6,33	6,34	6,34	6,00	0,01	0,11
10,0	11,43	11,33	11,34	11,00	0,06	0,51
20,0	25,53	25,20	25,23	25,00	0,18	0,72
40,0	56,63	56,60	57,00	57,00	0,22	0,39
60,0	82,63	84,10	82,90	83,00	0,78	0,94
80,0	103,90	106,57	108,07	106,00	2,11	1,99
100	127,00	128,00	129,00	128,00	1,00	0,78
DP: Desvio padrão, CV (%): Coeficiente de variação					<b>0,49</b>	<b>0,75</b>

TABELA 5. 16 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cumarina seselina por CLAE-UV.

Concentração (µg/mL)	Área do Pico (mAU)			Média	DP	CV (%)
	Curve 1	Curve 2	Curve 3			
1,00	40,10	42,13	41,97	41,40	1,13	2,73
2,50	95,07	81,90	103,73	93,57	10,99	11,75
5,00	201	195	205	200	4,88	2,44
10,0	365	366	387	373	12,23	3,28
20,0	781	739	790	770	27,29	3,55
40,0	1557	1477	1540	1524	42,21	2,77
60,0	2317	2227	2343	2296	61,13	2,66
80,0	3153	2983	3153	3097	98,05	3,17
100	3883	3797	3897	3859	54,30	1,41
DP: Desvio padrão, CV (%): Coeficiente de variação					<b>34,69</b>	<b>3,75</b>

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

TABELA 5. 17 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cumarina 5-metoxiseselina por CLAE-UV.

Concentração (µg/mL)	Área do Pico (mAU)			Média	DP	CV (%)
	Curve 1	Curve 2	Curve 3			
1,00	40,10	42,13	41,97	41,40	1,13	2,73
2,50	95,07	81,90	103,73	93,57	10,99	11,75
5,00	201	195	205	200	4,88	2,44
10,0	365	366	387	373	12,23	3,28
20,0	781	739	790	770	27,29	3,55
40,0	1557	1477	1540	1524	42,21	2,77
60,0	2317	2227	2343	2296	61,13	2,66
80,0	3153	2983	3153	3097	98,05	3,17
100	3883	3797	3897	3859	54,30	1,41
DP: Desvio padrão, CV (%): Coeficiente de variação					<b>34,69</b>	<b>3,75</b>

TABELA 5. 18 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do flavonoide hesperidina por CLAE-UV.

Concentração (µg/mL)	Área do pico (mAU)			Média	DP	CV (%)
	Curve 1	Curve 2	Curve 3			
1,00	2,92	2,94	2,89	2,92	0,03	0,98
2,50	8,91	9,29	8,95	9,05	0,21	2,29
5,00	16	16	16	16	0,20	1,27
10,0	33	33	34	33	0,49	1,48
20,0	64	64	64	64	0,33	0,52
40,0	122	113	115	117	4,79	4,10
60,0	191	184	186	187	3,42	1,83
80,0	248	247	253	249	3,21	1,29
100	314	318	319	317	2,78	0,88
DP: Desvio padrão, CV (%): Coeficiente de variação					<b>1,72</b>	<b>1,62</b>

**ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.**

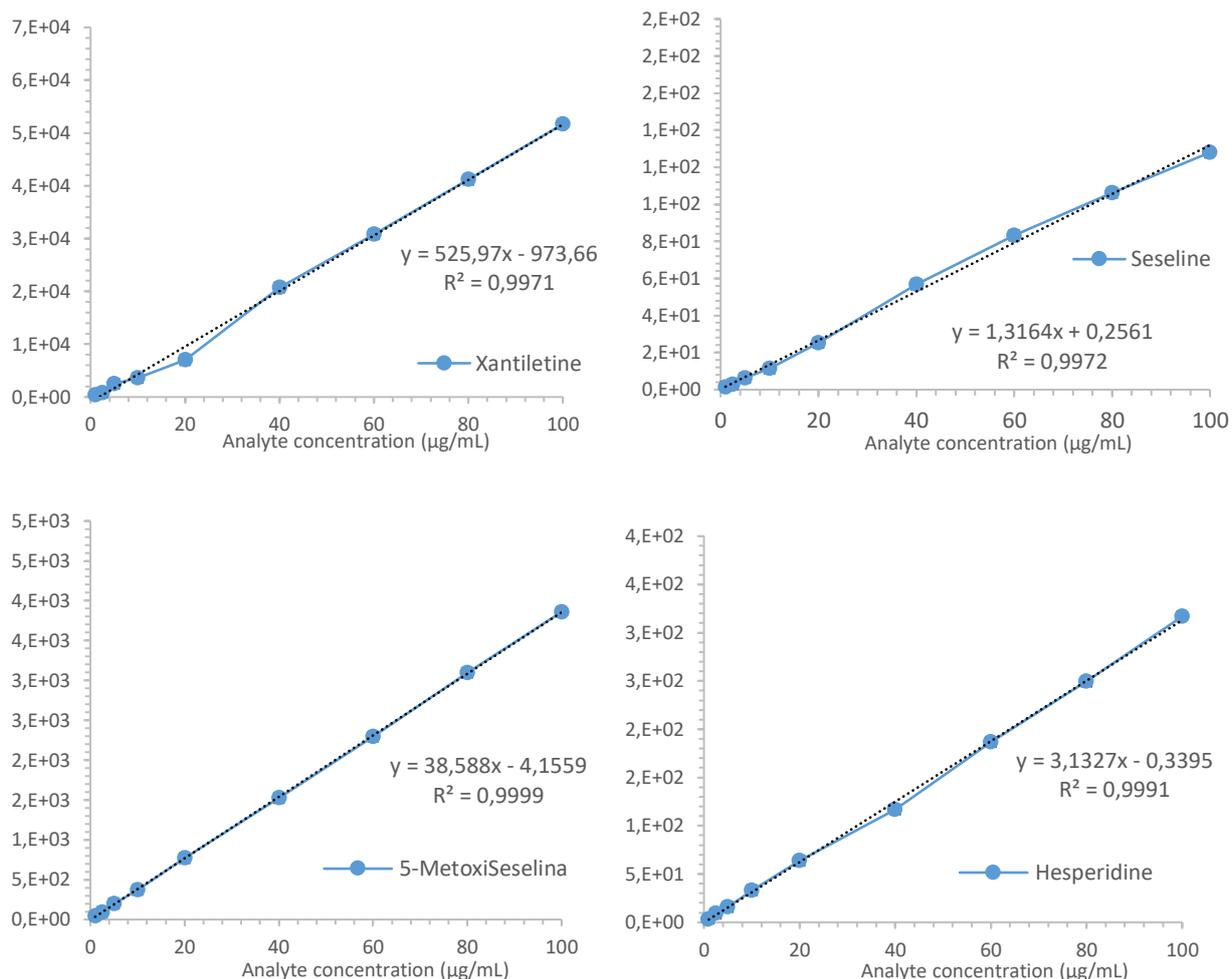


FIGURA 5. 117 - Curva analítica das soluções padrões de xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina e hesperidina.

A avaliação da linearidade do método, das curvas de calibração das cumarinas e do flavonoide apresentaram uma correlação linear estatística coerente entre a faixa de concentração 1,00 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O coeficiente de correlação (r) de todas as curvas mostra a relação dos eixos X e Y com um valor próximo de 1,000. O valor do coeficiente de relação ( $R^2$ ) em 0,99 indicando a confiabilidade no método matemático aplicado. As análises de variância, com uma probabilidade ou valor- $p$  de 0,01, onde o valor- $p$  é menor a  $p > 0,05$ .

### **5.8.2. Precisão e Exatidão do método analítico**

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

A primeira concentração das soluções padrão das cumarinas e do flavonoide (1,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi selecionada para serem 120% maior que o ponto no intervalo de resposta linear. O segundo (50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e terceiro ponto (95,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) referem-se a 50 e 95% dos pontos de concentração mais altos na curva de calibração, respectivamente. A recuperação total média e desvio padrão (DP) encontrados foram de  $99,2 \pm 0,97\%$ , mostrando a relação entre os valores teóricos e experimentais. Os resultados detalhados dos três níveis de concentração testados para as substâncias até agora quantificadas estão apresentados na TABELA 5.19. a 5.22. Nas folhas das matrizes estudadas foi observado a variação de outros flavonoides glicosilados, que variaram bem mais que a hesperidina, como diosmina, vicenina-2 e diosmetina, estes, assim como duas cumarinas nas raízes das matrizes, que são xantoxiletina, ostol e nordentatina, serão quantificadas ainda para acrescentar dados mais relevantes a esse trabalho.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

TABELA 5. 19 - Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções de controle de qualidade de xantiletina.

Concentração (µg/mL)	Dia	Média	DP	CV	Exatidão (%)
<b>Intra-dia (n = 5)</b>					
1,20	1	4,18E+02	1,00	0,24	92,3
50,0	1	1,90E+04	680,69	3,59	73,1
95,0	1	4,85E+04	6165,23	12,71	98,8
1,20	2	4,32E+02	24,01	5,56	95,3
50,0	2	1,94E+04	1365,04	7,02	74,9
95,0	2	4,85E+04	5294,34	10,92	98,8
1,20	3	4,33E+02	16,26	3,76	95,5
50,0	3	2,03E+04	264,58	1,30	88,1
95,0	3	4,85E+04	4455,71	9,19	98,7
<b>Inter-dia (n = 15)</b>					
1,20	-	4,19E+02	1,79	0,43	92,6
50,0	-	1,86E+04	752,99	4,05	80,6
95,0	-	4,94E+04	5463,79	11,07	100,6

TABELA 5. 20 - -- Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções de controle de qualidade de seselina.

Concentração (µg/mL)	Dia	Média	DP	CV	Exatidão (%)
<b>Intra-dia (n = 5)</b>					
1,20	1	1,75E+00	0,06	3,26	96,9
50,0	1	6,27E+01	1,11	1,76	88,3
95,0	1	1,14E+02	1,53	1,34	94,0
1,20	2	1,76E+00	0,11	6,27	97,8
50,0	2	6,44E+01	0,72	1,12	90,8
95,0	2	1,16E+02	0,96	0,83	95,4
1,20	3	1,74E+00	0,08	4,34	96,7
50,0	3	6,29E+01	0,61	0,97	99,8
95,0	3	1,19E+02	2,73	2,30	97,9
<b>Inter-dia (n = 15)</b>					
1,20	-	1,73E+00	0,05	3,03	96,0
50,0	-	6,27E+01	1,04	1,65	99,5
95,0	-	1,15E+02	3,81	3,31	94,6

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

TABELA 5. 21 - Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções de controle de qualidade de 5-metoxiseselina.

<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Dia</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>Intra-dia (n = 5)</b>					
1,20	1	4,98E+01	0,44	0,88	100,2
50,0	1	1,71E+03	80,21	4,70	89,6
95,0	1	3,59E+03	98,66	2,75	97,8
1,20	2	4,72E+01	0,95	2,00	95,1
50,0	2	1,85E+03	20,82	1,13	96,9
95,0	2	3,51E+03	11,55	0,33	95,8
1,20	3	4,94E+01	1,11	2,25	99,4
50,0	3	1,72E+03	60,28	3,51	101,3
95,0	3	3,63E+03	40,41	1,11	99,1
<b>Inter-dia (n = 15)</b>					
1,20	-	4,96E+01	0,50	1,00	99,8
50,0	-	1,69E+03	62,05	3,67	99,8
95,0	-	3,63E+03	90,11	2,48	99,0

TABELA 5. 22 - Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções de controle de qualidade da hesperidina.

<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Dia</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>Intra-dia (n = 5)</b>					
1,20	1	3,44E+00	0,08	2,22	98,4
50,0	1	1,26E+02	3,00	2,38	86,2
95,0	1	2,90E+02	2,31	0,80	96,5
1,20	2	3,36E+00	0,05	1,55	96,0
50,0	2	1,33E+02	4,04	3,05	90,8
95,0	2	3,00E+02	2,00	0,67	99,7
1,20	3	3,31E+00	0,04	1,22	94,7
50,0	3	1,26E+02	6,56	5,20	97,0
95,0	3	3,02E+02	3,79	1,26	100,2
<b>Inter-dia (n = 15)</b>					
1,20	-	3,46E+00	0,06	1,76	99,0
50,0	-	1,30E+02	5,37	4,14	99,8
95,0	-	2,90E+02	3,27	1,13	96,4

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

### **5.8.3. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)**

O limite de detecção é aquele que representa a concentração padrão das amostras analisadas, nesse caso (os padrões de cumarinas e flavonoide) que teoricamente está sendo produzido em cada análise, enquanto que o limite de quantificação é analisado, através da sensibilidade de calibração da curva analítica. Os limites de quantificação e detecção foram determinados de acordo com a relação sinal/ruído. O limite de quantificação nas matrizes, foi menor do que o ponto da curva de calibração (*LQ* real); provando assim ser linear, exato e preciso, dentro da faixa de trabalho utilizada na avaliação do método analítico, como mostra a TABELA 5.23.

TABELA 5. 23 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico.

<b>Parâmetros</b>	<b>Compostos (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>
Faixa de linearidade para todas as amostras	1,00–100,00
Limite de detecção para a xantiletina	3,4
Limite de detecção para a seselina	3,3
Limite de detecção para a 5-metoxiseselina	0,5
Limite de detecção para a hesperidina	1,8
Limite de quantificação para a xantiletina	10,3
Limite de quantificação para a seselina	9,9
Limite de quantificação para a 5-metoxiseselina	1,4
Limite de quantificação para a hesperidina	5,5

---

### 5.8.3. Quantificação do teor de cumarinas e flavonoides nas matrizes de TST e CTSW por CLAE-UV

Os cromatogramas para os padrões de cumarinas e flavonoides apresentaram grau de pureza acima de 95%. A curva de calibração de cada amostra foi plotada através da área das bandas contra a sua respectiva concentração, como mostra a FIGURA 5.117, que está relacionado as médias das triplicatas.

Ao realizar a quantificação das cumarinas (xantiletina, seselina, 5-metoxiseselina) nos extratos das raízes, caule inferior e do flavonoide (hesperidina) nas folhas dos citros infectados por gomose (amostras quantificadas são as que sofreram uma variação significativa nas matrizes doentes para cada órgão), no intuito de saber a real concentração dessas substâncias nessas amostras e verificar a variação entre os tratamentos, quando os mesmos são comparados através dos porta enxertos desse estudo, foi possível observar as seguintes variações em relação as concentrações, como mostra a TABELA 5.24 a 5.27.

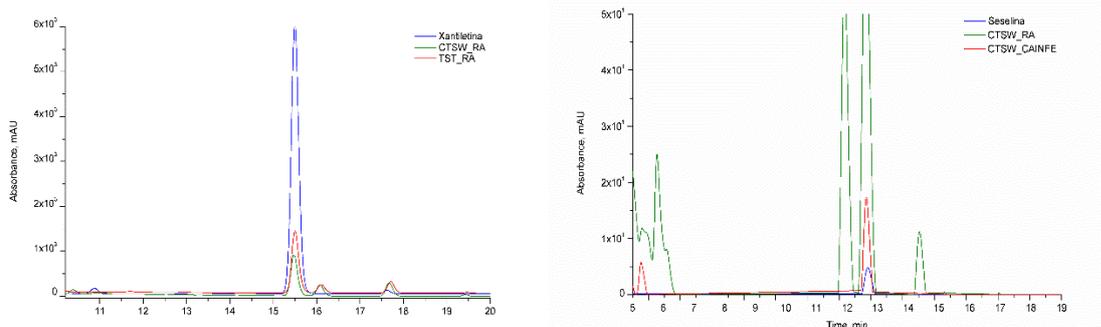


FIGURA 5. 118 - Cromatograma de quantificação das cumarinas xantiletina e seselina, obtido por CLAE-UV. Condições: Zorbax™ C18 (4,6x150 mm, 5 µm), H<sub>2</sub>O/ACN (60:40), 35°C, 1,00 mL/min, vol. inj. 15,0 µL, λ = 260 nm, 35 min.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

---

TABELA 5. 24 - Quantificação da xantiletina em plântulas doentes de *Citrus sinensis*.

---

<b>Amostra</b>	<b>Área do Pico (mAU)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
Amostra TST_RA	1,32E+04	269,5
Amostra TST_CAINFE	6,73E+02	31,3
Amostra CTSW_RA	8,71E+03	184,1
Amostra CTSW_CAINFE	3,70E+03	88,9

---

TABELA 5. 25 - Quantificação da seselina em plântulas doentes de *Citrus sinensis*.

---

<b>Amostra</b>	<b>Área do Pico (mAU)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
Amostra TST_RA	9,21E+02	70,78
Amostra TST_CAINFE	8,78E+01	61,94
Amostra CTSW_RA	1,38E+03	106,91
Amostra CTSW_CAINFE	4,42E+02	59,44

---

TABELA 5. 26 - Quantificação da 5-metoxiseselina em plântulas doentes de *Citrus sinensis*.

---

<b>Amostra</b>	<b>Área do Pico (mAU)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
Amostra TST_RA	7,19E+01	1,97
Amostra TST_CAINFE	5,41E+01	1,51
Amostra CTSW_RA	9,97E+01	2,69
Amostra CTSW_CAINFE	1,62E+01	0,53

---

TABELA 5. 27 - Quantificação da hesperidina em plântulas doentes de *Citrus sinensis*.

---

<b>Amostra</b>	<b>Área do Pico (mAU)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
Amostra CTSW_FO	3,60E+03	1149,26
Amostra CTSW_CASUPE	1,49E+03	475,73
Amostra TST_FO	5,60E+03	1787,68
Amostra TST_CASUPE	6,04E+03	1928,14
Amostra TST_CAINFE	4,48E+02	143,11

---

Pelas curvas de calibração por padronização externa, as concentrações médias da xantiletina em matrizes do extrato considerados doentes nas raízes para TST foi 269,5 µg/mL enquanto que para as matrizes das raízes doentes de CTSW variou em 184,1 µg/mL, mostrando que nas matrizes mais susceptível ao oomiceto obteve um valor maior em relação a concentração. Ambas aumentaram sua concentração em matrizes doentes quando comparadas a matrizes sadias.

Quando comparamos as matrizes das raízes doentes de TST, avaliando a cumarina angular seselina, observamos que ocorre também um aumento em concentração em amostras doentes versus as sadias, com concentração na matriz doente de 70,78 µg/mL, enquanto que em amostras de CTSW que é mais resistente ao patógeno, houve uma diminuição nesse metabólito bem efetivo em níveis de concentração nas matrizes doentes em torno de 106,91 µg/mL. Ambas as cumarinas estão presentes em quantidades relevantes nas raízes tanto de Tangerina Sunki Tropical (susceptível e/ou tolerante) quanto em Citrumelo Swingle (resistente) e podem ser consideradas substâncias marcadoras da presença do oomiceto *Phytophthora nicotianae*, pois estas, foram quantificadas e foi possível notar a variação significativa em suas concentrações, quando estão da presença do patógeno causador da gomose de citrus.

Ao compararmos o flavonoide hesperidina dessas matrizes de *Citrus sinensis* em partes dos órgãos das plântulas doentes, observa-se que é um metabólito que também possuem níveis de concentrações elevados. Esta aumenta em amostras de folhas e caule superior doentes (onde foi inoculado o oomiceto) 1787,68 µg/mL e 1928,14 µg/mL respectivamente.

As matrizes de CTSW de folhas doentes tiveram concentrações um pouco menor em 1149,26 µg/mL e em seu caule superior um valor bem menor ainda ao nível de 475,73 µg/mL. Comparando as áreas relativas, as matrizes de TST de órgão doente variaram apenas em torno de 1,07 vezes das matrizes sadias, enquanto que em CTSW essa variação ficou em torno de 1,06 vezes, o que mostra que esse flavonoide se comporta de maneira igual nas plântulas estudadas. Levando-se a sugerir que em matrizes enxertadas com TST ocorre um aumento mais evidente dos demais metabólitos como os flavonoides 6,8-di-C-glu-diosmetina que varia em

matrizes doentes 28,6 vezes mais que em matrizes de suas folhas sadias. Contudo nas matrizes enxertadas com CTSW esse metabólito praticamente não varia em suas folhas sadias, variando apenas em torno de 1,18 vezes. Estes dados estimulam a quantificação desse último metabólito.

Com base nesses resultados, sugere-se que a planta esteja aumentando a concentração de alguns compostos nas plantas doentes como uma resposta de defesa frente ao oomiceto, podendo estarem atuando como fitoantecipinas ou antimicrobianos pré-formados, pois estes, são compostos, já presente em plantas sadias que podem apresentar uma barreira química às infecções por patógenos em potencial, ou seja, são a primeira linha de defesa química que potenciais agentes patogênicos precisam superar.

### **5.9. Busca de biomarcadores voláteis em *Citrus sinensis* quando inoculados ao oomiceto *Phytophthora nicotianae***

Esta parte do trabalho leva a busca de biomarcadores voláteis nas plântulas de *Citrus sinensis* nas matrizes sadias e inoculadas com o oomiceto *P.nicotianae* em “headspace” estático associados à GC-MS.

A extração dos compostos voláteis de *Citrus sinensis* foi otimizada por HS-SPME avaliando o tempo necessário para adsorção dos compostos. Foram feitos alguns testes iniciais e o tempo de 40 min foi suficiente para a extração dos compostos, assim como forneceu uma intensidade relativa do sinal considerada boa para as análises. A fibra utilizada para otimização foi a PDMS/DVB, pois a mesma tem características para adsorver tanto compostos mais apolares quanto os mais polares.

Vários compostos voláteis diferentes foram identificados, principalmente pelo método de extração HS-SPME e foi possível observar que na natureza das análises das matrizes da raiz, caule inferior e folhas de ambas as plântulas, houve variação dos compostos de acordo com a comparação feita em cada órgão em estudo, essa comparação foi feita analisando matrizes sadias versus a doente (inoculada com o oomiceto) de cada plântula, evidenciando a identificação principalmente nas matrizes que mais ocorreram a variação e que em ambos os estudos foram as matrizes doentes de TST e CTSW.

O perfil químico dos voláteis das plântulas identificado por HS/GC-MS

está descrito nas FIGURAS 5.118 a 5.121 e os compostos que mais variou descritos na TABELA 5.28 e 5.29.

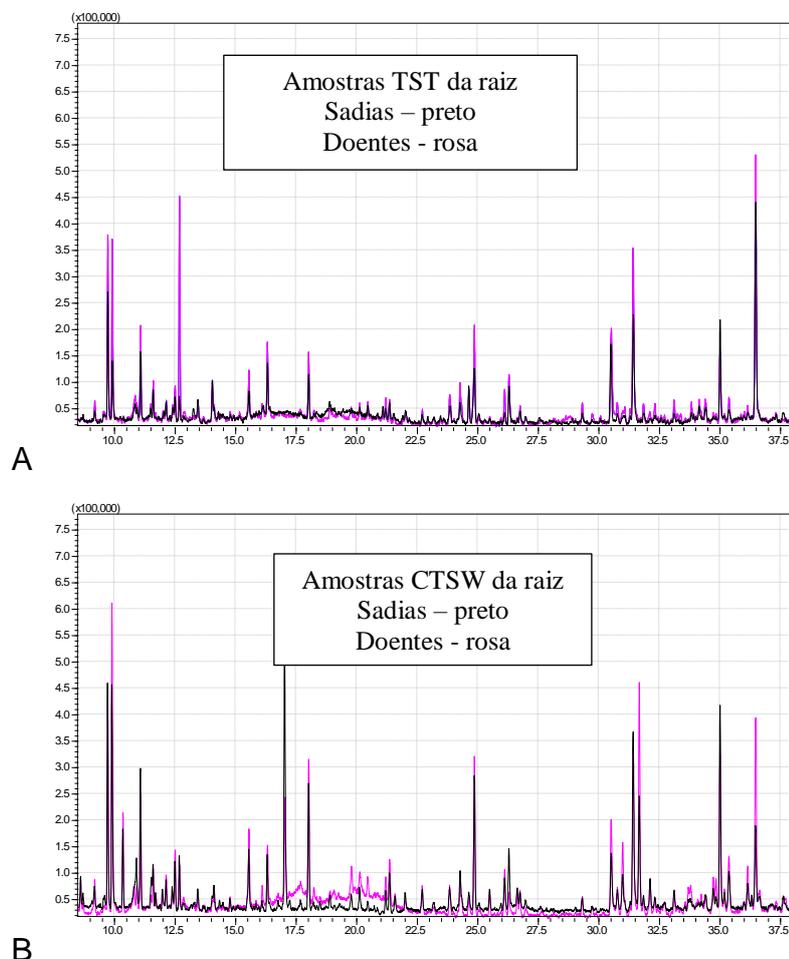


FIGURA 5. 119 - Cromatograma de plotagem de íons totais dos voláteis de Citrus sinensis. a) amostras das raízes de TST – sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa); b) amostras das raízes de CTSW- sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa)

Nas raízes de TST (FIGURA 5.118), houve um aumento na produção dos compostos voláteis nas matrizes doentes quando comparadas as sadias, foram identificadas 22 compostos voláteis de acordo com o índice calculado usando a equação de Van den Dool and Kratz (índice de Kovats) e comparado com o índice da literatura (ADAMS, 2007) e (BABUSHOK, 2011), enquanto que para as matrizes doentes de CTSW foram identificados 29 compostos voláteis.

O composto volátil D-limoneno, guaiacol e um derivado do ácido benzoico (antranilato de metila) tiveram uma maior produção em matrizes de TST nas

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

raízes do que quando comparado as matrizes de CTSW, como mostra a FIGURA 5.119 e 5.120 com os dados da TABELA 5.28 e 5.29.

TABELA 5. 28 - Composição química dos voláteis de Tangerina Sunki Tropical no órgão da raiz doente inoculados com *Phytophthora nicotianae* obtidos por HS/GC-MS.

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	IR exp.	IR lit.
1	3,745	NI	0.95	---	---
2	4,416	HEXANAL	4.75	807	801
3	5,287	(2E) HEXENAL	12.45	849	846
4	5,345	(3Z) HEXENOL	0.52	868	850
5	7,446	HEPTANAL	0.70	902	902
6	7,829	ACETILFURANO	0.98	911	912
7	9,722	BENZALDEIDO	3.54	958	952
8	9,900	FURFURAL	3.56	962	957
9	11,073	2-PENTILFURANO	1.81	991	984
10	12,681	D-LIMONENO	4.27	1027	1024
11	14,036	TAGETONE	0.58	1056	1046
12	15,550	META CIMENENO	0.82	1088	1082
13	16,312	NONANAL	1.40	1105	1100
14	18,015	GEIJERENE	1.33	1140	1138
15	24,861	COGEIJERENE	2.07	1284	1283
16	26,290	GUAIACOL	1.18	1315	1309
17	30,513	ANTRANILATO DE METILA	2.56	1409	1405
18	31,412	DICTAMNOL	4.26	1431	1428
19	35,002	MIRISTICINA	1,46	1516	1517
20	36,470	ELEMOL	6,40	1552	1548
21	39,781	TORREIOL	8.93	1645	1646

\* NI = não identificado pelo índice de retenção da literatura (ADAMS,2007) e pelo banco de dados NIST web book, NIST MS Search 2.0.

\*IR-Exp = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

\*IR-Lit= índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

***ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.***

TABELA 5. 29 -Composição química dos voláteis de Citrumelo Swingle no órgão da raiz doente inoculados com *Phytophthora nicotianae* obtidos por HS/GC-MS.

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	IR exp.	IR lit.
1	3,685	NI	0.70	---	---
2	3,934	NI	0.64	---	---
3	4,415	HEXANAL	2.94	807	801
4	5,145	(2E)-HEXENAL	0.30	849	846
5	5,215	(3Z)-HEXENOL	0.40	868	850
6	5,283	HEPTANAL	10.87	902	902
7	7,443	ACETILFURANO	0.44	911	912
8	7,829	BENZALDEIDO	0,46	958	952
9	9,720	FURFURAL	2.32	958	952
10	9,892	2-FURANOCARBOXALDEIDO	3.58	962	957
11	10,350	BETA PINENO	1.09	973	974
12	11,075	PENTIL FURANO	1.35	991	984
13	11,597	ALFA FELANDRENO	0.39	1003	1002
14	12,504	P-CIMENO	0.62	1023	1020
15	12,684	D- LIMONENO	0.46	1027	1024
16	15,551	META-CIMENENO	0.78	1088	1082
17	16,385	NONANAL	0.0	1106	1100
18	17,036	ISOFORONA	1.29	1120	1118
19	18,015	GEIJERENE	1.86	1140	1138
20	21,358	CARVEOL	0.60	1210	1216
21	24,857	COGEIJERENE	2.29	1284	1283
22	26,108	CICLOISOLONGIFOLENO	0.54	1311	1317
23	30,502	ANTRANILATO DE METILA	1.50	1409	1405
24	30,910	ALFA-SANTALENO	0.90	1419	1416
25	31,412	DICTAMNOL	2.68	1431	1428
26	31,668	CIS-PRENIL LIMONENO	3.37	1437	1443
27	35,005	MIRISTICINA	2.10	1516	1517
28	35,371	CUBENENO	0.88	1525	1526
29	36,385	ELEMOL	2.91	1550	1548

\*NI = não identificado pelo índice de retenção da literatura (ADAMS,2007) e pelo banco de dados NIST web book, NIST MS Search 2.0.

\*IR-Exp = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

\*IR-Lit= índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

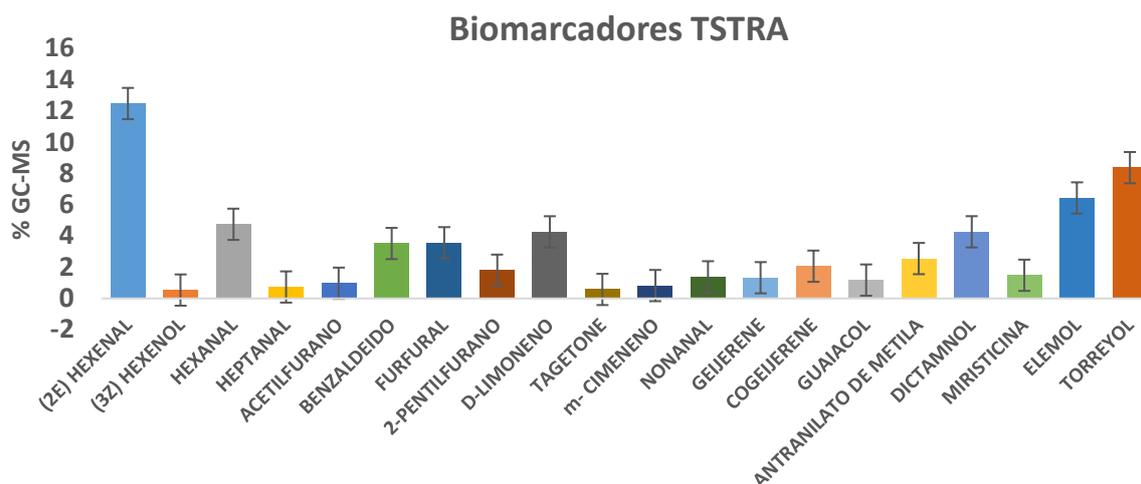


FIGURA 5. 120 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de TSTRA nas raízes doentes inoculadas com oomiceto e obtidos por HS/GC-MS.

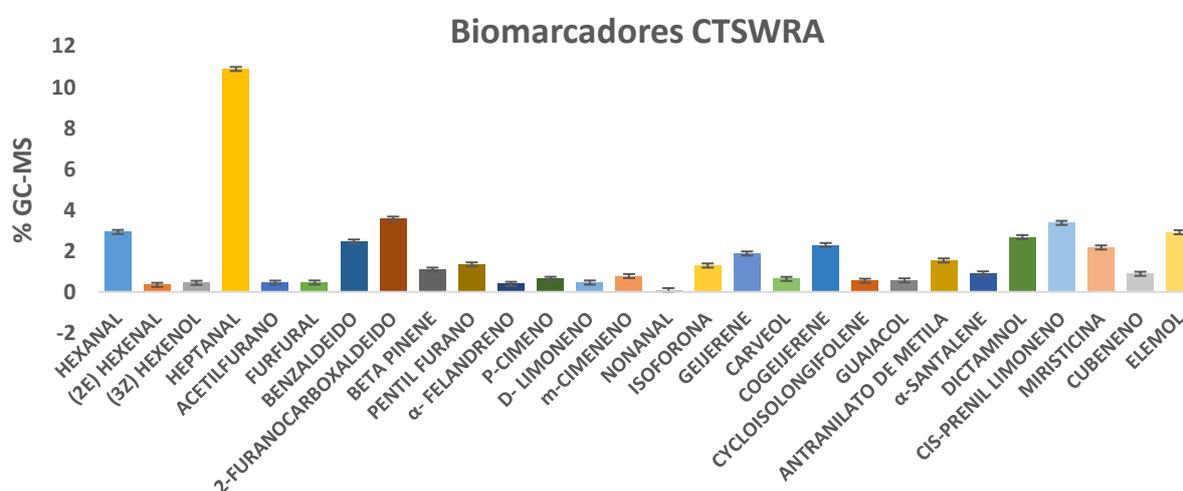


FIGURA 5. 121 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de CTSWRA nas raízes doentes inoculadas com oomiceto e obtidos por HS/GC-MS.

No caule inferior inoculados com o patógeno da gomose de citros tanto nas matrizes de TST quanto em CTSW, também houve um aumento na produção dos compostos voláteis nas matrizes doentes quando comparadas as sadias, foram identificados 13 compostos voláteis em cada matriz (FIGURA 5.121) estudada de acordo com o índice calculado de Kovats e comparado com o índice da literatura

(ADAMS, 2007), os compostos voláteis que mais variaram dentro das matrizes em estudo foram alfa-tujeno, acetilfurano, D-limoneno, guaicol e ácido benzoico (antranilato de metila), este último, já descrito na literatura como responsável pelo alongamento na parte do caule quando em contato com microrganismos invasores, como mostra a FIGURA 5. 122 e 5.123 e a TABELA 5.30 e 5.31.

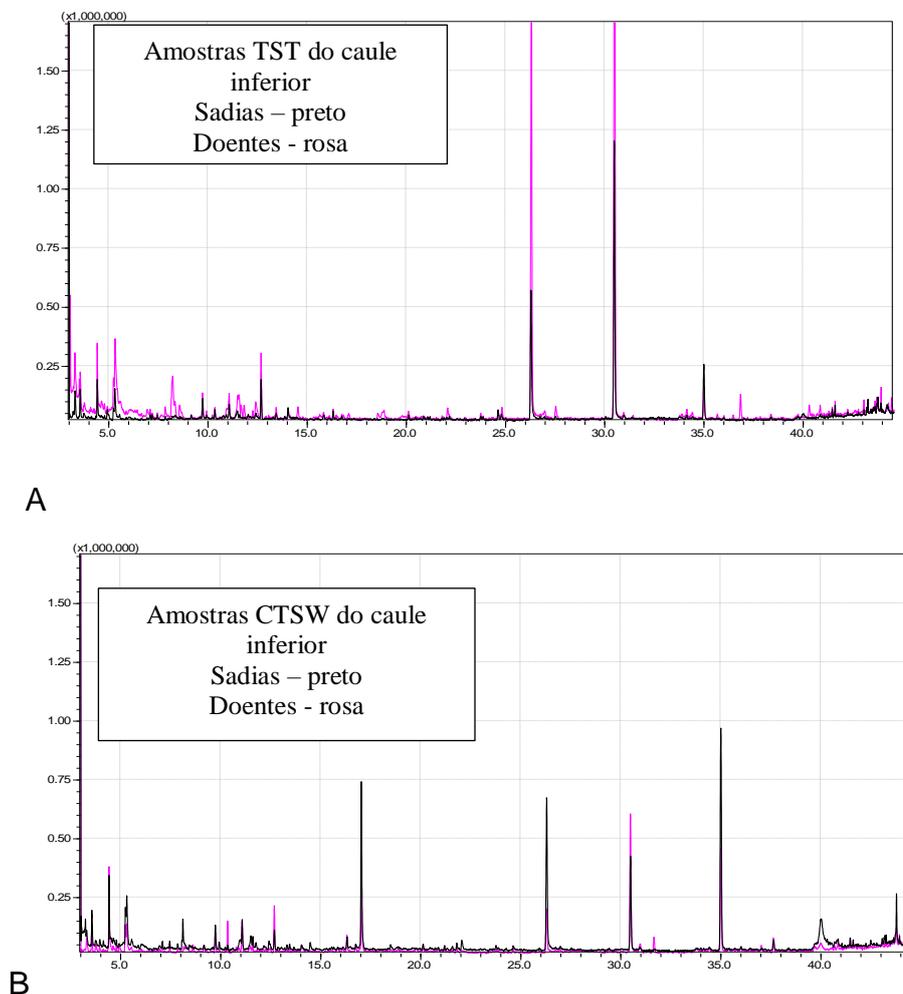


FIGURA 5. 122 - Cromatograma de plotagem de íons totais dos voláteis de Citrus sinensis. a) Amostras do caule inferior de TST – sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa); b) amostras do caule inferior de CTSW- sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa).

No caule inferior inoculados com o patógeno da gomose de citros tanto nas matrizes de TST quanto em CTSW, também houve um aumento na produção dos compostos voláteis nas matrizes doentes quando comparadas as sadias, foram identificados 13 compostos voláteis em cada matriz (FIGURA 5.121) estudada de

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

acordo com o índice calculado de Kovats e comparado com o índice da literatura (ADAMS, 2007), os compostos voláteis que mais variaram dentro das matrizes em estudo foram alfa-tujeno, acetilfurano, D-limoneno, guaicol e ácido benzoico (antranilato de metila), este último, já descrito na literatura como responsável pelo alongamento na parte do caule quando em contato com microrganismos invasores, como mostra a FIGURA 5. 122 e 5.123 e a TABELA 5.30 e 5.31.

TABELA 5. 30 - Composição química dos voláteis de Tangerina Sunki Tropical no órgão do caule inferior doentes inoculados com *Phytophthora nicotianae* obtidos por HS/GC-MS.

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	IR exp.	IR lit.
1	3,054	NI	1.66	--	--
2	3,292	HEXANAL	1.89	807	801
3	3,559	2E-HEXENAL	0.85	849	846
4	4,416	3Z-HEXENOL	2.01	868	850
5	5,230	HEPTANAL	1.20	902	902
6	5,313	ACETILFURANO	3.57	911	912
7	8,223	ALFA -TUJENO	3.05	921	924
8	9,722	BENZALDEIDO	1.18	958	952
9	12,605	D-LIMONENO	2.97	1025	1024
10	26,300	GUAICOL	27.63	1316	1309
11	30,494	ANTRANILATO DE METILA	50.15	1409	1405
12	35,002	MIRISTICINA	1.47	1516	1517
13	36,845	ELEMICINA	1.44	1561	1555

\*NI = não identificado pelo índice de retenção da literatura (ADAMS,2007) e pelo banco de dados NIST web book, NIST MS Search 2.0.

\*IR-Exp = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

\*IR-Lit= índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

Nas matrizes de TST no caule inferior quando comparamos amostras sadias versus doentes, observa-se como mostra na FIGURA 5.121, que há um aumento nos compostos voláteis bem acentuado nos Tr 26, 300 e Tr 30,494 min, picos

ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.

estes característicos dos compostos guaiacol e do derivado do ácido benzoico (antranilato de metila) respectivamente.

Quando comparamos matrizes mais resistentes ao patógeno causador da doença gomose de citros CTSW no caule inferior, o composto no Tr 26,284 min, identificado como guaiacol ocorre uma diminuição em amostras doentes, ocorrendo o inverso quando comparado a matrizes mais susceptíveis (TST) a doença, ou seja há um aumento em matrizes doentes do composto antranilato de metila, porém em uma porcentagem menor como mostra a TABELA 5.31. Podemos inferir que esses compostos voláteis podem ser um dos principais biomarcadores necessários para o diagnóstico precoce da gomose de citros no caule inferior de plântulas de *Citrus sinensis* como mostra a FIGURA 5.122 e 5.123.

TABELA 5. 31 - Composição química dos voláteis de Citrumelo Swingle no órgão do caule inferior doentes inoculados com *Phytophthora nicotianae* obtidos por HS/GC-MS.

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	IR exp.	IR lit.
1	3,054	NI	1.66	--	--
2	3,292	HEXANAL	2.69	807	801
3	3,559	2E-HEXENAL	9.11	849	846
4	4,416	3Z-HEXENOL	4.29	868	850
5	5,230	HEPTANAL	3.49	902	902
6	5,313	ACETILFURANO	3.57	911	912
7	8,223	ALFA -TUJENO	3.05	921	924
8	9,722	BENZALDEIDO	2.92	958	952
9	12,605	D-LIMONENO	6.66	1025	1024
10	17,039	ISOFORONA	9.33	1120	1118
11	26,284	GUAIACOL	7.69	1316	1309
12	30,494	ÁCIDO BENZOICO (ANTRANILATO DE METILA)	25.47	1409	1405
13	35,002	MIRISTICINA	17.73	1516	1517

\*NI = não identificado pelo índice de retenção da literatura (ADAMS,2007) e pelo banco de dados NIST web book, NIST MS Search 2.0.

\*IR-Exp = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

\*IR-Lit= índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

Podemos notar ainda que em matrizes de TST no órgão do caule inferior onde foi inoculado o oomiceto, os compostos voláteis derivado do ácido cinâmico, da classe do fenilpropenos, a miristicina e a elemicina variaram em 1,47 e 1,44 vezes menos em matrizes doentes respectivamente. Quando esses dois óleos voláteis são comparados com as matrizes de CTSW, observou-se que a mesma diminui em 17,73 vezes da miristicina em matrizes doentes do caule inferior, contudo, nessa matriz não foi identificado a elemicina.

Um outro indicativo que pode ser usado como biomarcadores na diferenciação desses dois porta enxertos quando inoculados com *Phytophthora nicotianae*.

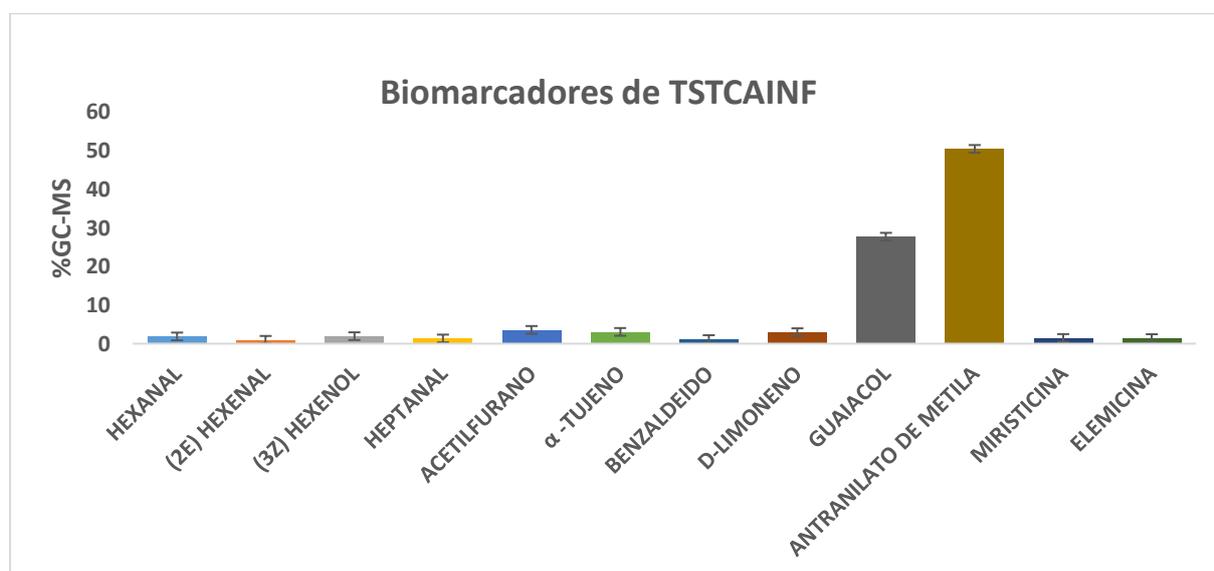


FIGURA 5. 123 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de TSTCAINF inoculados com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS.

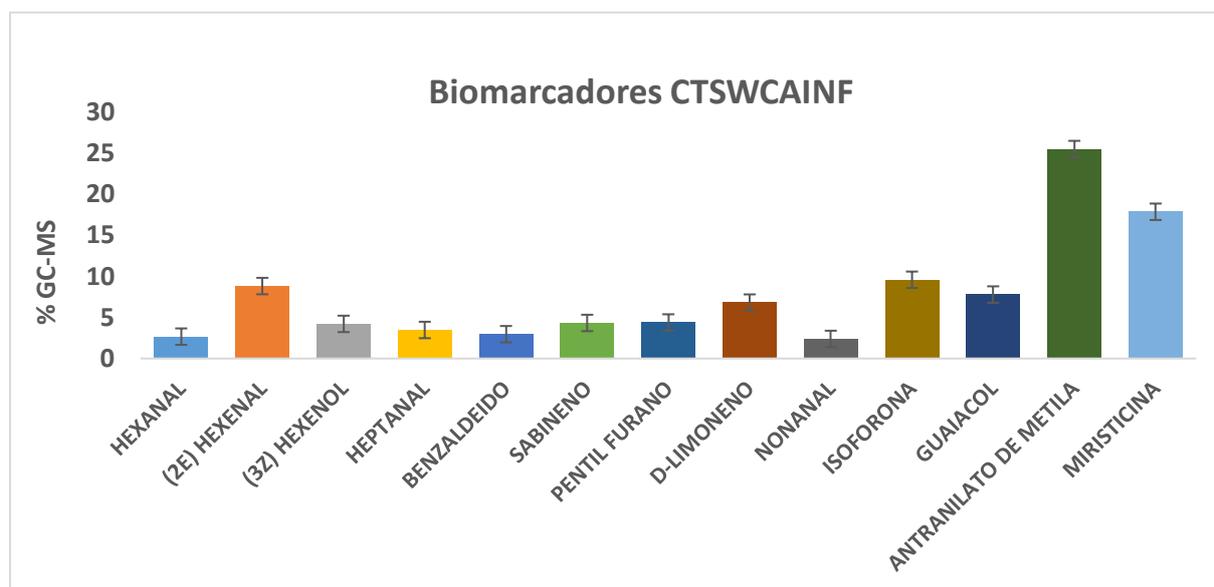
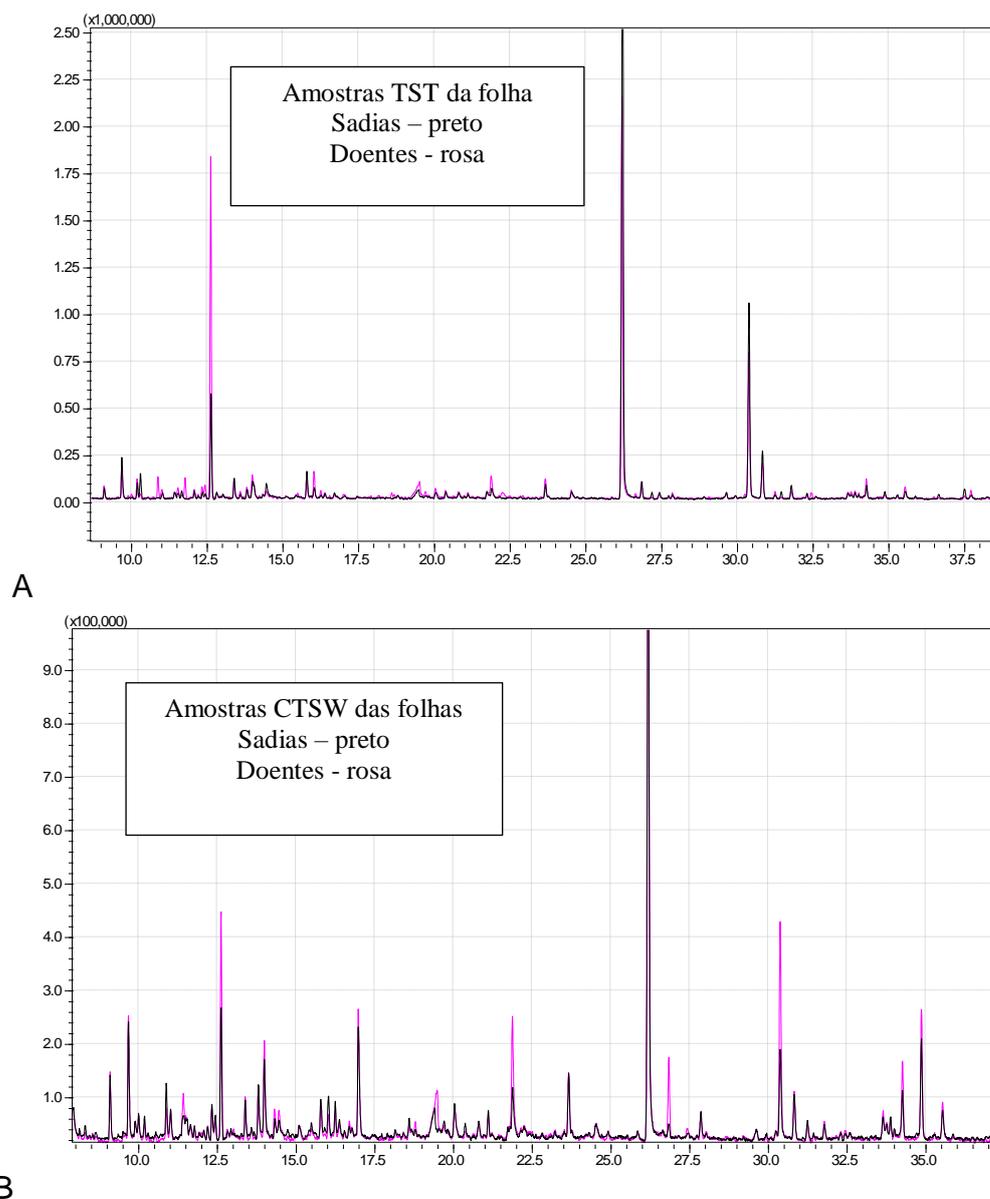


FIGURA 5. 124 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de CTSWCAINF inoculados com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS.

Analisando as matrizes da parte área de ambas as plântulas, nas folhas de TST houve uma variação pequena em relação as amostras sadias versus as doentes no aumento dos compostos voláteis, foram identificados 18 compostos de acordo com o seu KI calculado e comparado com índice da literatura. Em matrizes doentes de CTSW foram identificados 21 compostos voláteis e foi possível observar que para essas amostras houveram maiores variações em seu perfil químico cromatográfico, como mostra a FIGURA 5.124 e as TABELAS 5.32 e 5.33.



**B**  
FIGURA 5. 125 - Cromatograma de plotagem de íons totais dos voláteis de Citrus sinensis. a) amostras das folhas de TST – sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa); b) amostras das folhas de CTSW- sadias (amostras em preto) e doentes (amostras em rosa).

***ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.***

TABELA 5. 32 - Composição química dos voláteis de Tangerina Sunki Tropical no órgão da folha doente matrizes inoculados com *Phytophthora nicotianae* obtidos por HS/GC-MS.

<b>Pico</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Composto</b>	<b>(%) GC-MS</b>	<b>IR exp.</b>	<b>IR lit.</b>
01	3,276	HEXANAL	7.48	807	801
02	3,527	ALFA TUJENO	9.15	918	924
03	4,394	ALFA PINENO	0.87	934	932
04	4,751	CANFENO	0.63	949	946
05	9,675	BENZALDEIDO	2.14	957	952
06	10,183	SABINENO	1.20	969	969
07	10,872	BETA-MIRCENO	1.33	986	988
08	11,769	GAMA-3-CARENO	1.31	1007	1008
09	12,614	D-LIMONENO	23.02	1025	1024
10	13,381	BENZENO ACETALDEIDO	1.08	1042	1036
11	15,784	BENZOATO DE METILA	1.54	1093	1088
12	16,022	LINALOL	1.90	1099	1095
13	23,657	GERANIOL	1.43	1248	1249
14	26,188	GUAIACOL	33.24	1313	1309
15	26,838	GERANIATO DE METILA	1.07	1328	1322
16	30,475	ÁCIDO BENZOICO (ANTRANILATO DE METILA)	-0.00	1409	1405
17	30,825	(E) - CARIOFILENO	3.15	1417	1417
18	34,255	ALFA-SELINENO	1.39	1498	1498

\*NI = não identificado pelo índice de retenção da literatura (ADAMS,2007) e pelo banco de dados NIST web book, NIST MS Search 2.0.

\*IR-Exp = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

\*IR-Lit= índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

*ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.*

Nas matrizes de TST nas folhas (FIGURA 5.124), foi possível observar no Tr 12,614 min, um aumento também na variação do composto volátil D-limoneno em matrizes das folhas com sintomas de gomose aumentando 23.02 vezes mais, enquanto que no Tr 26,188 min, houve uma diminuição no composto guaiacol em 33.23 vezes. Nessa amostra de TST em folhas inoculadas com o patógeno o derivado do ácido benzoico (antranilato de metila) não aparece nas matrizes doentes, como é ilustrado na FIGURA 5.125 e em matrizes de CTSW o guaiacol e o canfeno que não aparecem como mostra a FIGURA 5.126.

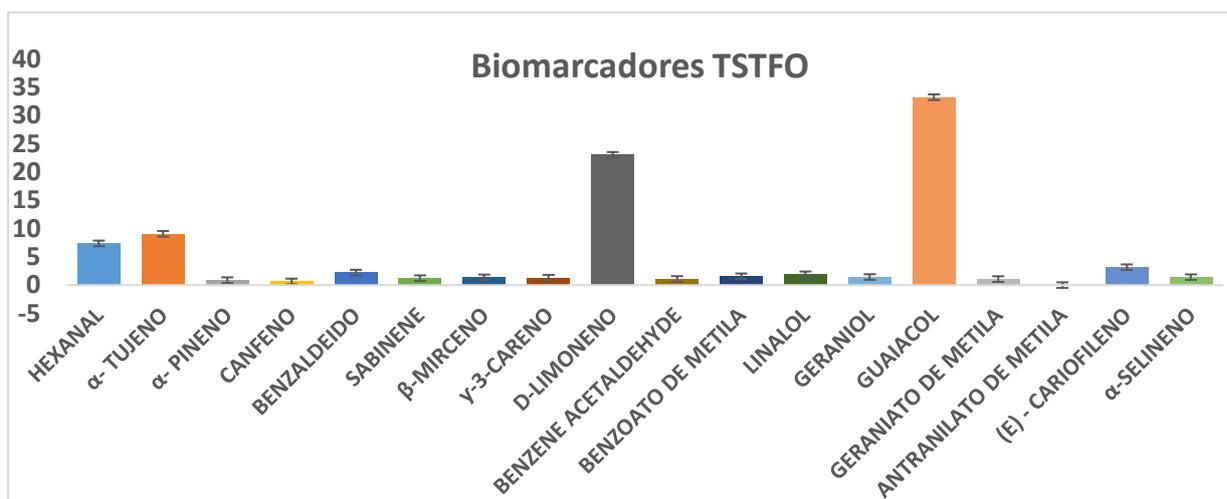


FIGURA 5. 126 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de TSTFO-folhas inoculadas com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS.

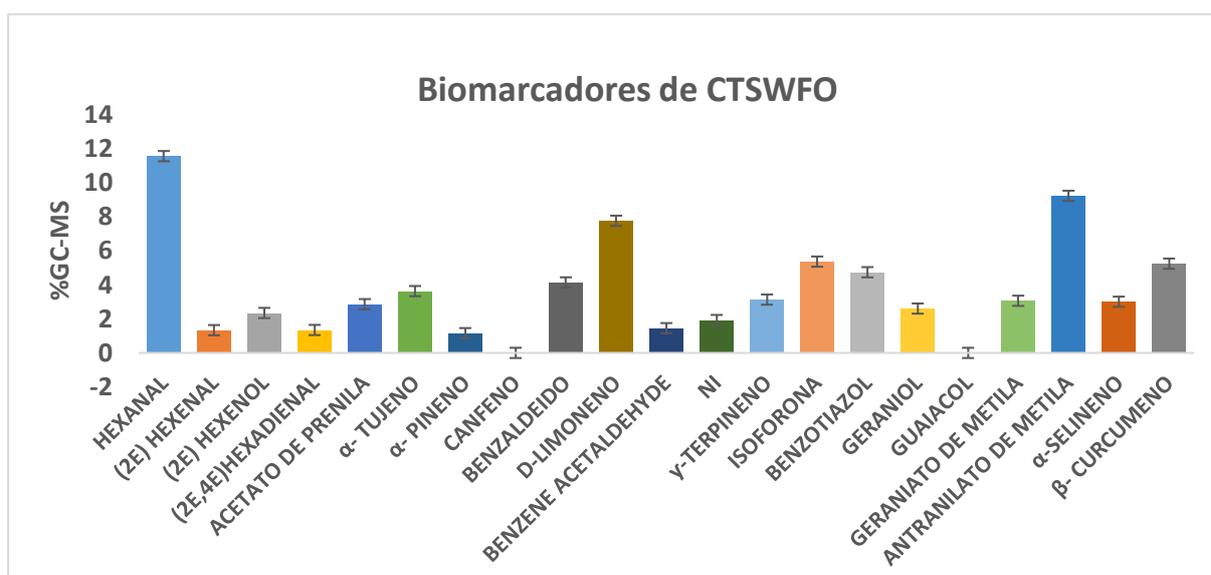


FIGURA 5. 127 - Gráfico mostrando a variação da composição química dos voláteis de CTSWFO-folhas inoculadas com o oomiceto e obtidos por HS/GC-MS.

Em matrizes de CTSW em suas folhas doentes foi possível observar que o composto volátil que mais sofreu variação foi o ácido benzoico (antranilato de metila) havendo um aumento característicos em 9.19 vezes nessas matrizes resistentes ao oomiceto como mostra a FIGURA 5.126. Nas matrizes susceptíveis como foi discutido acima, esse composto não aparece nas amostras de folhas doentes e quando comparamos o composto volátil guaiacol e o canfeno nas matrizes de folhas doentes da CTSW, é possível observar que ele também não aparece como é ilustrado na TABELA 5.33. Esses dados permitem inferir que em plântulas de Laranja Valência enxertadas com TST que é susceptível/tolerante ao patógeno *Phytophthora nicotianae* os compostos voláteis que podem ser considerados como biomarcadores da doença são o guaiacol (presença) e o antranilato de metila, derivado de um ácido benzoico (ausência), enquanto que para as plântulas de Laranja Valência enxertadas com CTSW resistente ao patógeno, evidencia-se o contrário, os compostos voláteis guaiacol (ausência) e o antranilato de metila (presente) em sua variação de perfil químico, como mostra o esquema, na FIGURA 5.128, resumido da rota biossintética desses compostos que mais sofreram variações dentro dessas matrizes estudadas.

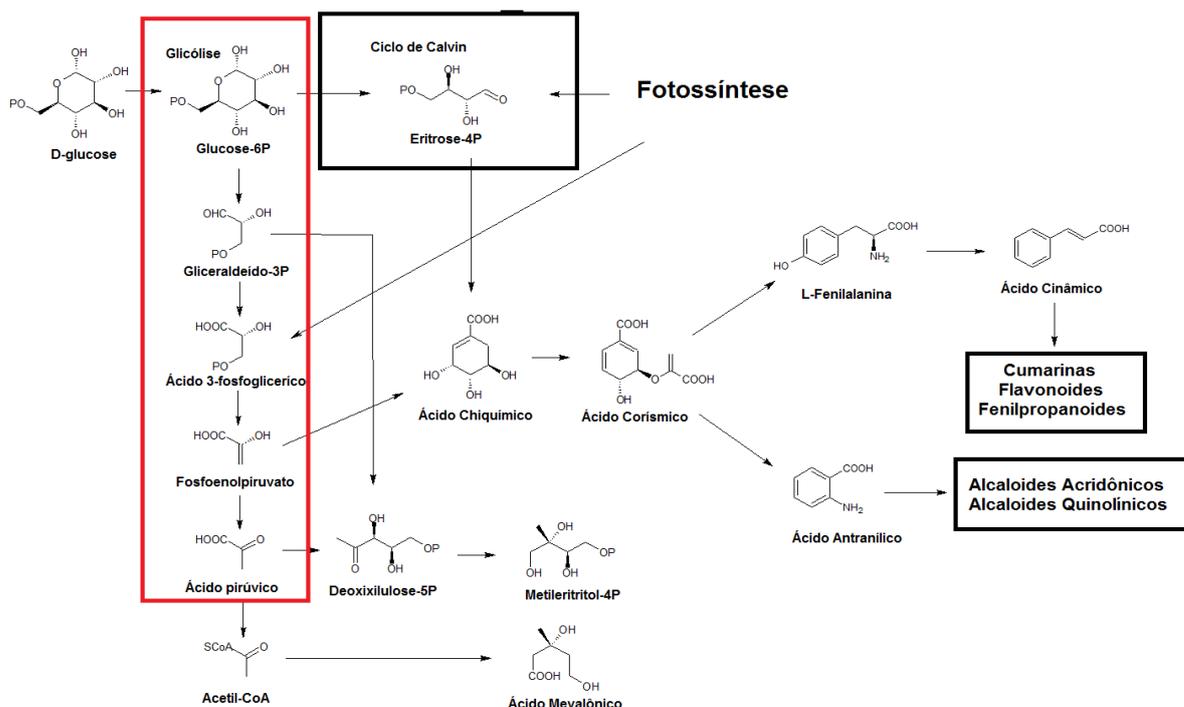


FIGURA 5. 128 Rota metabólica resumida dos metabólitos secundários oriundos da rota Chiquimato.

***ESTUDO QUÍMICO DE PHYTOPHTHORA NICOTIANAE E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE PLÂNTULAS DE CITRUS SINENSIS.***

TABELA 5. 33 - Composição química dos voláteis de Citrumelo Swingle no órgão da folha doente matrizes inoculados com *Phytophthora nicotianae* obtidos por HS/GC-MS.

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	IR exp.	IR lit.
01	3,277	NI	7.71	--	--
02	3,526	HEXANAL	11.82	807	801
03	4,393	2E- HEXENAL	1,34	849	846
04	4,750	2E- HEXENOL	2,34	871	854
05	5,003	ACETATO DE PRENILA	2,90	919	914
06	5,506	ALFA TUJENO	3,67	918	924
07	5,828	ALFA PINENO	1,17	934	932
08	9,165	CANFENO	-0.00	949	946
09	9,671	BENZALDEIDO	4.00	957	952
10	12,614	D-LIMONENO	7.71	1025	1024
11	13,380	BENZENO ACETALDEIDO	1.42	1042	1036
12	13,8745	NI	1.93	1052	----
13	13,989	Y-TERPINENO	3.13	1055	1054
14	16,971	ISOFORONA	5.25	1118	1118
15	21,868	BENZOTIAZOL	4.58	1201	1208
16	23,655	GERANIOL	2.45	1247	1249
17	26,182	GUAIACOL	-0.00	1313	1309
18	26,836	GERANIATO DE METILA	3.02	1328	1322
19	30,373	ANTRANILATO DE METILA	9.19	1406	1405
20	34,256	ALFA- SELINENO	2.96	1498	1498
21	34,858	BETA- CURCUMENO	5.14	1513	1514

\*NI = não identificado pelo índice de retenção da literatura (ADAMS,2007) e pelo banco de dados NIST web book, NIST MS Search 2.0.

\*IR-Exp = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

\*IR-Lit= índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

# *Conclusões e Perspectivas*

## **6. Conclusões e Perspectivas**

Este trabalho em seu estudo do perfil químico do oomiceto *Phytophthora nicotianae* através das análises dos extratos brutos nos diferentes meios de cultivos, usando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV), foi possível evidenciar que em meios de cultivos líquidos de cenoura-milho (CM) obtidos para as análises, estes tiveram um rendimento maior quando comparado aos meios de cultivos sólidos. Este meio foi escolhido e trabalhou-se ampliando assim a sua escala de produção, no intuito de ter em mãos mais material para o isolamento e caracterização. Este patógeno causador da doença gomose de citros, é um oomiceto que não produz grandes quantidades de metabólitos, mesmo quando se amplia a produção. É importante ressaltar que o mesmo só produz em temperaturas controladas em torno de 28°C e que seu perfil químico não muda quando testado seu crescimento em meio estático ou por agitação, aumentando assim apenas a quantidade de massa micelial quando seu crescimento é exposto a agitação, mas não diferenciando em quantidades de metabólitos produzidos. No meio de CM na fração de acetato de etila foi possível observar que está se mostrou mais ativa quando comparado o seu perfil químico, sendo, portanto possível isolar os metabólitos de interesse. O estudo químico de isolamento dos metabólitos secundários produzidos por *P.nicotianae* na fração de acetato de etila, conduziu o isolamento total de seis bandas, substâncias essas que mostram ser isoladas pela primeira vez nessa espécie de patógeno, da classe das antronas. As antronas são derivadas do antraceno, sua biossíntese vem do acetil CoA e Malonil CoA e as enzimas que atuam são as PKS do tipo três para a formação das antronas mais simples. Quando ocorre um processo redutivo nas antronas, forma-se o antranol e quando as antronas sofrem oxidação formam as antraquinonas (via acetato-mavelonato), portanto quanto maior o grau de redução maior será a atividade desses compostos. Onde torna-se interessante o estudo mais direcionado há esses compostos isolados. Algumas das demais substâncias ainda estão sendo analisadas com experimentos de massa de alta resolução e novos trapeamentos em LC-SPE-NMR, para obtenção com exatidão

da elucidação completa dessa classe de compostos.

No estudo biomonitorado das plântulas de TST e CTSW ao analisar o perfil metabolômico das plântulas infectadas por gomose e as matrizes sadias via HPLC-UV e LC-MS<sup>E</sup>, foi possível observar que as plântulas de TST (Susceptível) e CTSW (Resistente) respondem de maneiras diferentes, aumentando ou diminuindo alguns metabólitos, ou seja, desviando sua rota biossintética para favorecer uma quantidade maior ou menor de um determinado composto, quando este se encontra em contato direto com o oomiceto, ou seja, uma possível resposta a presença do microrganismo.

Nas análises via LC-MS<sup>E</sup> quando comparou-se qualitativamente suas áreas relativas de matrizes sadias versus as infectadas e/ou doentes, foi possível observar que em plântulas de Tangerineira Sunki Tropical (TST) que são mais susceptíveis a gomose, a rota biossintética está favorecendo a formação de ambas as cumarinas a xantiletina e seselina em raízes doentes, assim como as demais piranocumarinas que também sofreram aumento nessas matrizes, como é o caso da xantoxiletina (11,76 vezes), 5-metoxiseselina (1,76 vezes), ostol (146,9 vezes) e nordentatina (55,89 vezes), dando ênfase principalmente a essas duas últimas cumarinas que tiveram uma variação bastante elevada nas amostras infectadas por gomose nas raízes. Nos demais extratos analisados de TST, como é o caso do caule inferior, caule superior e folhas, houve também uma diferenciação significativa na variação da quantidade desses metabólitos. Em partes áreas (copa), em suas folhas, o flavonoide hesperidina aumenta em matrizes doentes, porém em concentração mais baixa (1,07 vezes) quando comparado por exemplo, aos demais compostos que variaram dentro dessas matrizes, em compostos como diosmina (há um aumento em 4,22 vezes em matrizes doentes) e a 6, 8-di-C-glu-diosmetina (aumentando em 28,6 vezes).

Em matrizes de Citrumeleiro Swingle (CTSW), que é mais resistente ao patógeno, observou-se que a variação das cumarinas em suas raízes doentes variaram de forma diferente quando comparada as matrizes de TST. Em CTSW, a cumarina xantiletina aumenta (11,02 vezes) em matrizes doentes e conseqüentemente, ocorre também o aparecimento de novos compostos que também variaram nessas matrizes que são as cumarinas xantoarnol (6,67

vezes), diidrosuberenol (5,29 vezes) e decursinol (5,59 vezes), pois estas, são precursoras diretas da xantiletina, ocorrendo assim conseqüentemente um aumento em matrizes doentes, levando assim a formação dessas cumarinas que não foram evidenciadas por exemplo, em matrizes doentes das susceptíveis (TST), porém ainda nesse caso em CTSW, a cumarina angular seselina diminui (10,05 vezes) em matrizes doentes, levando a inferir que há uma preferência na formação em via de rota biossintética na prenilação em C6 do que em C8, levando a uma maior formação da cumarina xantiletina do que a formação da seselina. Em suas folhas doentes a variação dos flavonoides diosmina (1,59 vezes) e 6, 8-di-C-glu-diosmetina (1,18 vezes) foi bem menor quando comparado as matrizes das folhas de TST. Nota-se que de acordo com o porta-enxerto, podemos evidenciar que ocorre uma variação diferente nessas substâncias. Esses compostos que sofreram tais variações podem ser considerados como fitoantecipinas.

A aplicação da quimiometria nessas matrizes em estudo, permitiu de um modo rápido e eficiente, a separação das amostras com os diferentes tratamentos e a sua caracterização daqueles compostos que mais estavam contribuindo para essa diferenciação. Com as análises de PCA nos órgãos das plântulas em estudo, foi possível em todos os casos, verificar sempre dois grupos distintos. O grupo das matrizes sadias (1) e o grupo das matrizes doentes (2). Verificou-se que em PC1 há uma tendência de separação das matrizes doentes daqueles referentes às amostras padrões (PC2) onde o oomiceto não havia sido inoculado, podendo com esses estudos ainda observar a existência daqueles íons característicos (íons que mais diferenciaram) para cada parte da plântula em estudo (S-plot).

Com os dados obtidos nas plântulas de *Citrus sinensis* em nosso estudo de interação patógeno versus hospedeiro, sugere-se que a defesa de cada plântula frente ao oomiceto parece evidenciar em suas raízes, inibindo o caminho do ácido cinâmico nas plântulas, que leva a formação dos flavonoides nos demais órgãos, para ativar aquele que conduz a formação das piranocumarinas. Essa ativação que leva a formação das cumarinas, sugere que essas podem ter a função de sinalizadoras na defesa contra o patógeno. As cumarinas podem ser

mensageiras que ativam o mecanismo de defesa para os demais órgãos da planta, ou seja, essas cumarinas como já mencionado, podem ser consideradas como fitoanticipinas. Por sua vez, os caules possuem características metabólicas que se assemelham tanto às raízes quanto às folhas, já que é o órgão intermediário de transporte.

A metodologia usada para avaliação do perfil químico por HS/GC-MS mostrou-se promissora para a identificação da variação dos principais compostos voláteis na doença gomose de citros nos órgãos estudados das plântulas. Na busca desses biomarcadores químicos, foi possível constatar principalmente a variação de compostos na classe dos aromáticos quando a planta apresenta o sintoma da gomose. Os principais biomarcadores para esta metodologia são o benzaldeído, furfural, D-limoneno, guaiacol, ácido benzoico (metil antranilato), os quais apresentaram maior área percentual. Nas matrizes doentes de TST e CTSW em suas raízes foi possível observar a presença do composto volátil dictaminol que é um sesquiterpeno, composto já isolado em raízes de *Dictamnus dasycarpus*. E ainda nas raízes dessas plântulas foi possível ao compará-las observar que em matrizes resistentes ao oomiceto observamos a presença de novos compostos voláteis como: r2-furanocarboxaldeído, cis-prenil-limoneno, alfa-santaleno, cubeneno, isoforona, dentre outros, evidenciando assim a diferença na composição química de voláteis em matrizes de raízes doentes de TST versus CTSW. Um outro dado de suma importância nesse estudo de HS/GC-MS foi observado na parte área dos porta enxertos, a presença e/ou ausência de dois compostos voláteis em folhas dessas plântulas, pois quando estudou as matrizes de Laranja Valência enxertadas nas matrizes mais susceptíveis (TST), notou-se uma variação acentuada em folhas doentes do composto aromático guaiacol e a ausência do ácido benzoico, haja visto que ao comparar as matrizes de Laranja Valência enxertadas nas mais resistentes (CTSW) ocorre o inverso, ausência do composto aromático guaiacol com um aumento no ácido benzoico (metil antranilato), esses compostos podem ser considerados fitoalexinas e/ou elicitor.

Estas informações abrem a possibilidade de estudos futuros em engenharia genética da biossíntese dos compostos que mais estão variando

dentro das matrizes estudadas, com a possibilidade de ver a indução de resistência em citros diagnosticados com a gomose. Logo, com base nesse trabalho, foi possível concluir que os objetivos do projeto foram alcançados, os estudos dos perfis químicos permitiram diferenciar as plantas infectadas (doentes) das sadias de cada plântula em estudo, indicando assim potenciais fungicidas para futuros estudos frente à *Phytophthora nicotianae*, além que ao somar os dados levantados de perfil químico das plântulas de *Citrus sinensis* é notório que de acordo com o porta enxerto a variação desses compostos se comportam de maneira diferentes, possibilitando assim a diferenciação entre eles e a abertura para novos estudos, no intuito de entender a interação direta do patógeno e a planta quando testado por exemplo, em ensaios as substâncias que se mostraram promissoras no estudo de variação do perfil químico quando inoculados ao oomiceto.

# *Referências Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos Exportação de FCOJ – Safra Histórica. Disponível em: <[http://www.abecitrus.com.br/exporta\\_br.html](http://www.abecitrus.com.br/exporta_br.html)>. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

ABDEL-FATTAH, M. E.; TAHA, K. E.; ABDELAZIZ, M. H.; MISSALEM, A. A.; ELKHRISY, E. A. M. Chemical constituents of Citrus limonia and Foeniculum Vulgare. J. Heterocycl. Chem. 13: 45–48, 2003.

ADAMS, R.P. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography Mass Spectrometry. Carol Stream, USA, 2009.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; POMPEU JÚNIOR, J. Inoculação de *Phytophthora* parasitica em caules de plântulas de variedades cítricas, pelo método do palito. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 22, p. S240, 1997.

AGUSTÍ, M. El clima. In: AGUSTÍ, M. Citricultura. 2. ed. Madri: Ediciones Mundi Prensa, 2003. p. 105–119.

AMARO, A.A.; BAPTISTELLA, C.S.L. Viveiros de citros — uma visão econômica. Araraquara: São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 2010. 13 p. (Instituto de Economia Agrícola. Textos para Discussão, 23). Acesso em: 29 agosto 2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Brasil. “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”. Resolução RE no 899. 29 de maio de 2003.

BASSANEZI, R.B.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T. Introdução. In: Morte súbita dos citros. Araraquara: Fundecitrus; Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2003a. p. 1–7. (Fundecitrus. Boletim Citrícola, 24).

BABUSHOK, V.I. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plants Essential Oils. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland 20899, USA, 2011.

BEDENDO, I.P.; AMORIM, L. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, 2011. p.133–147.

BELTRAME, A.B. Interação *Phytophthora nicotianae* – porta enxerto de citros (Tangerina Sunki e Citrumelo Swingle): Efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos. 2010. 137 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba,

2010.

BELLETE, B. S. Estudo da variação do perfil químico de citros com hlb e sadios , buscando informações sobre mecanismo de defesa. 2014. 188 f. São Carlos, Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2014.

CAHILL, D.M.; HARDHAM, A.R. Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 84, n. 2, p. 193–200, 1994.

CALZAVARA, S.A.; SANTOS, J.M.; FAVORETO, L. Resistência de porta-enxertos cítricos a *Pratylenchus jaehni* (Nematoda: Pratylenchidae). *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 7–11, 2007.

CARLILE, M.J. Motility, taxis and tropism in *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983. p. 95–107.

CARPENTER, J.B & FURR, J.R. Evaluation of tolerance to root rot caused by *Phytophthora parasitica* in seedlings of *Citrus* and related genera. *Phytopathology* 52:1277-1285. 1962.

CARVALHO, M.T.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R.M.L.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; MEDINA FILHO, H. P. Aspectos biológicos do reduzido número de sementes da tangerina 'Sunki'. *Bragantia*, Campinas, v. 56, n. 1, p.69–77, 1997.

CASS, Q. B.; BARREIRO, J. C. “Os avanços tecnológicos na química analítica: sucessos e desafios”. *Cienc. Cult.* 63(1), 37-40, 2011.

CAVALCANTI, L.S.; RESENDE, M.L.V. Efeito da época de aplicação e dosagem do CERQUEIRA A.O. First Record of *Phytophthora tropicalis* causing leaf blight and fruit rot on breadfruit in Brazil. *Plant Pathology* 55:296.

CÉSAR, H.P. A enxertia. In: CÉSAR, H.P. *Manual prático do enxertador e criador de mudas de árvores frutíferas e dos arbustos ornamentais*. 15. ed. São Paulo: Nobel, 1996. p. 11–17.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; ETXEBERRIA, E.; DANYLUK, M. D.; RODRICK, G. E. Metabolomic analysis in food science : a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, n. 11-12, p. 557–566, 2009.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: CIBA-GEIGY AGROCHEMICALS. *Citrus*. Basle: Ciba-Geigy Agrochemicals, 1975. p. 6–13. (Ciba-Geigy Agrochemicals. *Citrus Technical Monograph*, 4).

CHIACCHIO, F.P.B.; GALLI, F. Influência da copa e do vigor das plantas cítricas sobre o comportamento do porta-enxerto em relação à *Phytophthora parasitica*

Dastur e *Phytophthora citrophthora* (SM & SM) Leonian. Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas, v. 1, n. 3, p. 35–44, 1978.

CRAWFORD, D. J.; GIANNASI, D. E. Plant Chemosystematics. BioScience, v. 32, n. 2, p. 114–118, 1982.

DASTUR, J.F. On *Phytophthora parasitica* nov. sp.: a new disease of the castor oil plant. Memoirs of the Department of Agriculture in India (Botanical Series), Calcutta, v. 5, n. 4, p. 177–231 [p. 226], 1913.

DEL RIO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; JIMÉNES, A.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; HERNÁNDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. Plant Physiology, Rockville, v. 116, p.1195-1200, 1998.

DEWICK P.M. Medicinal natural products : John Wiley & Sons, 2009. - Vol. 3.

DEWICK, P. M. “Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach”. John Wiley & Sons, second edition, 2002.

DICK, M.W. Systematics (The Straminipila). In: DICK, M.W. Straminipilous fungi: Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 267–432. [p. 275].

E.D.M.N.; SANTOS, A.F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. (Ed.). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Livraria Rural, 2001. p.283-342.

EMBRAPA. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: janeiro de 2014. Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2002.

ÉRSEK T. e Ribeiro O. Mini review article: an annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996, Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica . - 2010. - Vol. 45. - pp. 251-266.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (1896) *Phytophthora parasitica* Dastur (1913). In: ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. (Ed.). *Phytophthora* diseases worldwide. Saint Paul: The American Phytopathological Society Press, 1996. p. 391–407.

ESCANFERLA, M.E. Histologia e bioquímica da interação entre porta-enxertos de citros resistente e suscetíveis a *Phytophthora nicotianae*. 2011. 101p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K.; SANTOS, A.F. (Ed.). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Piracicaba; Livraria Rural, 2001. cap. 10, p. 283-342.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.M.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR. Doenças dos citros. IN: KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). Manual de fitopatologia. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. cap. 28, v.2, p. 239- 269.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M B.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L. Seleção de tangerinas e híbridos de citros para a tolerância à Mancha Marrom de *Alternaria*. Citricultura atual. Cordeirópolis, n.45, v.8, 2005. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 30, n. 1, p. 67-71, 2005.

FNP Consultoria e Informações em Agronegócio 20/10/2017 – Citros FUNDECITRUS. 2017. Gomose de *Phytophthora*. Disponível em: <http://fundecitrus.com.br/doencas/gomose.html> . Acesso em: 20 out.2017.

GARCIA, C. Estudo comparativo de pés-francos e enxertos do gênero citrus: correlação entre seus metabólitos e o processo de enxertia. 2005. São Carlos, Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2005.

GRAHAM, J.H. Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore infested soil. Plant Disease 74:743-746. 1990.

GRAHAM, J.H. Root regeneration and tolerance of citrus rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. Phytopathology, Lancaster, v. 85, n. 1, p. 111-117, 1995.

GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Coumarins in the Rutaceae. Phytochemistry, v. 17, n. 1976, p. 845–864, 1978.

GUIMARÃES, D.O. Prospecção química e biológica em fungos endófitos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae). Dissertação de Mestrado, apresentada à FCFRP/USP/DEPT de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, 2006. 208p.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 387–412, 1996.

HALL, G. *Phytophthora nicotianae*. Mycopathologia, Den Haag, v. 126, n. 1, p. 61–63, 1994. [IMI (International Mycological Institute). Descriptions of Fungi and Bacteria, 1200].

HANELT, P.; BÜTTNER, R.; MANSFELD, R. Rutaceae. In: HANELT, P.; BÜTTNER, R.; MANSFELD, R.; INSTITUTE OF PLANT GENETICS AND CROP PLANT RESEARCH. (Ed.). Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops (except ornamentals). Berlin: Springer-Verlag, v. 2, 2001. p. 996–1039.

HANSEN, E.M, REESER P.W, SUTTON W. (2013). *Phytophthora* Beyond Agriculture. Annual Review of Phytopathology 50:359-378.

HARDHAM, A.R.; SHAN, W. Cellular and molecular biology of Phytophthora–plant interactions. In: DEISING, H.B. (Ed.). Plant relationships. 2 nd. ed. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. p. 3–27. (Springer-Verlag. The Mycota: a Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research, 5).

HICKMAN, C.J.; HO, H.H. Behavior of zoospores in plant-pathogenic Phycomycetes. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v. 4, n. 1, p. 195–220, 1966.

HO, P.; HOGG, T.A.; SILVA, M.C.M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. Food Chemistry, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 115–122, 1999.

HOLDCROFT, A.M. Alternative methods of control for Phytophthora nicotianae of tobacco. 2013. 95p. Thesis (Master of Science) – College of Agriculture, University of Kentucky, Lexington, 2013.

IAC, 2009. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. Disponível em:

<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>. Acesso em: 06 out. 2017.

JACKSON, A.O., TAYLOR, C.B. (1996). Plant-microbe interactions: life and death at the interface. The Plant Cell, 8: 1651-1668.

JACKSON, A.O., TAYLOR, C.B. (1996). Plant-microbe interactions: life and death at the interface. The Plant Cell, 8: 1651-1668.

KAPLAN, A. “LC-NMR: theory and experiment”. On-line LC-NMR .Relat. Tech., 1-22, 2002.

KLAUS, A. “Liquid Chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy”. Journal of Chromatography A, 856 (1-2), 199-211, 1999.

KNOGGE, W. (1996). Fungal infection of plants. The Plant Cell, 8: 1711-1722.

KROON L.P.N.M, BROUWER H, COCK A.WAM, GOVERS F. The Genus Phytophthora, 2012. Phytopathology 102: 348-364.

LAMOTTE, O.; LA CAMERA, S.; MÉTRAUX, J.P. Innate immunity in plantas and how virulent pathogens cope-with – Studies on the Interaction of *Arabidopsis thaliana* and *Botrytis cinerea*. In: Indução de resistência novos conceitos e aplicações. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 5., 2010. Lavras. **Anais...** Lavras, 2010. p. 17-28.

LANÇAS F. M. The hole of the separations science in the 21th century, Journal of the Brazilian Chemical Society. - 2009. - 2 : Vol. 24. - pp. 183-197.

LARANJEIRA, F. F.; FEICHTENBERGER; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B. Manejo integrado de doenças dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D. de; NEGRI, J. D. de; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas, SP: Instituto

Agrônomo; Fundag, 2005. p. 511-566.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). Citros. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira; Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola, 2005. p. 509–566.

LIMA, M.L.P; Estudo em doenças de Plantas - Revisão de Literatura de doenças em citrus. IF-Goiano, Campus Urutaí, 2010. Disponível em <http://fitopatologia1.com.br> . Acesso em: janeiro de 2014.

LIMA, M.L.P; Estudo em doenças de Plantas - Revisão de Literatura de doenças em citrus. IF-Goiano, Campus Urutaí, 2010.

LUCAS, G. B. Black shank. In: LUCAS, G. B. Disease of tobacco. New York: The Scarecrow Press, 1958. p. 115–139.

LUDOWICI, V.A.; ZHANG, W.; BLACKMAN, L.M.; HARDHAM, A.R. *Phytophthora nicotianae*. In: LAMOUR, K. (Ed.). *Phytophthora: a global perspective*. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2013. p. 113–123. (Centre for Agriculture and Biosciences International. Plant Protection Series, 2).

MABBERLEY, D.J. A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea*, Sydney, v. 7, n. 2, p. 167–172, 1997.

MACHADO FILHO; J.A.; SIQUEIRA, D.L.; SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, W.E. Características dos principais porta-enxertos de citros. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; Pró-reitora de Extensão e Cultura, 2003. 22p. (UFV. Boletim de Extensão, 45).

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; DALIO, R.; FLEISCHMANN, F.; OSSWALD, W. A new method to quantify zoospore chemo-attraction. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL UNION OF FOREST RESEARCH ORGANIZATIONS (IUFRO) 145 WORKING PARTY S07-02-09, 6. 2011, Córdoba. Proceedings Vienna: International Union of Forest Research Organizations, 2011. p. 60.

MATHERON, M.E.; WRIGHT, G.C. & PORCHAS, M. Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and nursery characteristics of several citrus rootstocks. *Plant Disease* 82:1217-1225. 1998.

MATERN, U. "Coumarins and other phenylpropanoid compounds in the defense response of plant cells." *Planta Med.*, 57(7), 815-20, 1991.

MENDES M.A.S, Fungos em plantas no Brasil. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998.569p.

MEDINA FILHO, H.P., BORDIGNON, R., SIQUEIRA, W., FEICHTENBERGER, E., CARVALHO, M.R.T.: Tolerância de híbridos e de clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. Fitopatologia Brasileira 2004, 29:169-178.

MÉTRAUX, J.P. Induced defenses in plants. In: RODRIGUEZ, F.; ROMEIRO, R. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 3. 2007. VIÇOSA. Anais.Viçosa, 2007. p. 7-24.

MORRIS, P.F.; WARD, E.W.B. Chemoattraction of zoospores of the soybean pathogen, *P.sojae*, by isoflavones. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 40, p. 17-22,1992.

MUNIZ, M.F.S., QUEIROZ, F.M. & MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora* patogênicos a *Citrus sinensis* no Estado de Alagoas. Fitopatologia Brasileira 29:201-204. 2004.

MURASHIGUE, T. & TUCKER, W. F. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In.: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1. 1968, Riverside. Anais... Riverside: SIC 1969. v.3, p.1155-1166.

MYSORE, K.S., RYU, C.M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? Trends in Plant Science, 9: 97-104.

OLIVEIRA, J.M. Caracterização morfológica, molecular e patogênica de espécies de *Phytophthora* associadas aos citros. 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ORWALD, W.; FLEISCHMANN, F.; RIGLING, D.; COELHO, A.C.; CRAVADOR, A.; DIEZ, J.; DALIO, R.J.; HORTA-JUNG, M.; PFANZ, H.; ROBIN, C.; SIPOS, G.; SOLLA, A.; CECH, T.; CHAMBERY, A.; DIAMANDIS, S.; HANSEN, E.; JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L.B.; PARKE, J.; PROSPERO, S.; WERRES, S. Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. Forest Pathology, Hamburg, v. 44, n. 3, p. 169–190, 2014.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). Citros. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira; Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola, 2005. p. 61–104.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.C.P.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.). Citricultura brasileira. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, 1991. p. 265–280. (Fundação Cargill, Série Técnico-científica, 176).

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. *Quimica Nova*, v. 25, n. 4, p. 533–538, 2002.

RIBEIRO, A. B.; ABDELNUR, P. F.; GARCIA, C. F.; BELINI, A.; SEVERINO, V. G. P.; DA SILVA, M. F. G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A.; Chemical Characterization of Citrus sinensis Grafted on C. limonia and the Effect of Some Isolated Compounds on the Growth of Xylella fastidiosa. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (17): 7815-7822, 2008.

ROCHFORT, S. Metabolomics reviewed: A new “Omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 1813–1820, 2005.

RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C., Serrano-Pérez, P., Palo, C., 2016. Effect of biofumigation with brassica pellets combined with Brassicaceae cover crops and plastic cover on the survival and infectivity of inoculum of *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. *Pest Manag. Sci.* 72, 1295–1301.

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. IN: PASCHOLATI, S.F.; LEITE.; B.; STANGARLIN, J.R.; Cia, P. (Ed.) *Interação planta - patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 411-431.

ROSSETTI, V. Estudos sobre a “gomose de Phytophthora” dos citrus. I — Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de “Phytophthora”. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 18, n. 1, p. 97–124, 1947–1948.

ROSSETTI, V.V. *Manual Ilustrado de Doença dos Citros*. Piracicaba. ealq/Fundecitros. 2001.

RUSSELL, D.; EDMONDSON, R. D. “High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry”. *Journal of mass spectrometry*, 32, 263-276, 1997.

SALOMÃO, Alexa. Suco de Laranja – Não tem para ninguém. Blog do Agronegócio. Disponível em: <<http://agribizz.blogspot.com/2007/05/suco-de-laranja-no-tem-para-ningum.html>>. Acesso em: 12 de jul. 2017.

SANTOS, G.R.; DIAS NETO, J.J.; NASCIMENTO, I.R.; CASTRO, H.G.; CASTRO NETO, M.D. Influência da idade, número de repicagens e coloração dos micélios na esporulação de isolados de *Magnaporthe oryzae*, causador da brusone em arroz no Estado do Tocantins. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, Guarapuava, v. 3, n. 3, p. 113–124, 2010.

SANTOS, M.V.O. *Phytophthora spp. em cultivos diversos no Sul da Bahia e identificação de agentes de biocontrole a estes patógenos*. 2014. 92 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2014.

SANTOS, A.F.; LUZ, E.D.M.N; REIS, A. *Phytophthora* spp: Distribuição e Associação com espécies florestais. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2014.

SANTOS, Milton; SILVEIRA, Maria L. O Brasil: Território e Sociedade no início do século XXI. Rio de Janeiro: Record, 2001. 474p.

SANTOS MVO dos (2010) Identificação de *Phytophthora* spp. e de agentes de Biocontrole em diversos cultivos no Sul da Bahia. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 91p.

ASSERON, G.R. Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros. Dissertação de Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia – Instituto Agrônomo, Campinas, 2008. 71p.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723–733, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. d. L., & POHLMANN, A. R. "Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nano particulados para administração de fármacos". *Química Nova*, 26(5), 726-737. (2003a).

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; OLIVERIA, J.S.B.; MAIA, A.J.; STANGARLIN, J.R. Extratos de plantas medicinais na indução de resistência. In: *Anais do X Simpósio de controle de doenças de plantas*. Lavras, MG, 2010. Pag.143-150 (cap. 10).

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação planta–patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2008. p. 227– 248.

SCORA, R.W. On the history and origin of citrus. *The Bulletin of the Torrey Botanical Club*, New York, v. 102, n. 6, p. 369–375, 1975.

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Org.). *Citros*. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira; Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola, 2005. p. 317–344.

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Estratégias de ataque desenvolvidas por fitopatógenos. In: SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. *Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008b. p. 29–33. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 250).

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Processos de indução de

resistência. In: SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008a. p. 12–19. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 250).

SIVIERO, A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora* parasítica e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose. 2001. 114 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; MACHADO, M.A. Métodos de inoculação e avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* em citros. Laranja, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 203–219, 2002.

SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. Limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’: variedade com maior número de sementes. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 4p. il.

SOARES-FILHO, W.S., DIAMANTINO, M.S.A.S., MOITINHO, E.D.B., SOBRINHO, A.P.C., PASSOS, O.S. (2002) „Tropical”: a new selection of „Sunki” mandarin. Ver Bras Frutic 24:127–132.

SWINGLE W.T. The botany of Citrus and its relatives. Revisão de Philip C. Reece // The citrus Industry. - California : Berkeley, 1967. - Vol. Vol.1.

TANAKA, T. *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka. In: TANAKA, T. Species problem in Citrus: a critical study of wild and cultivated units of Citrus, based upon field studies in their native homes. (Revisio Aurantiacearum IX). Tōkyō: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. p. 137. (Japanese Society for the Promotion of Science. Tōkyō Agricultural University, Technical Paper, 10).

TANAKA, T. Ecological and geographical view of Citrus culture in the Pacific region. The Memoirs of the Tanaka Citrus Experiment Station, Tanushimaru, v. 1, n. 1, p. 37–49, [p. 42], 1927.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; BROADBENT, P. Diseases of Citrus. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). Diseases of tropical fruit crops. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 2003. p. 163–195. [175–176].

TIMMER, P. Identification and control of *Phytophthora* diseases. Citrus Industry 4:73-75. 1991.

TROUTMAN, J.L.; WILLS, W.H. Electrotaxis of *Phytophthora parasitica* zoospores and its possible role in infection of tobacco by the fungus. Phytopathology, Saint Paul, v. 54, n. 2, p. 225–228, 1964.

- TYLER, B. M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology*, London, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2007.
- TYLER, B.M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 137–167, 2002.
- TYLER, B.M.; WU, M.-H.; WANG, J.-M.; CHEUNG, W.; MORRIS, P.F. Chemotactic preferences and strain variation in the response of *Phytophthora sojae* zoospores to host isoflavones. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, n. 8, p. 2811–2817, 1996.
- UMEMOTO, N.; KAKITANI, M.; IWAMATSU, A.; YOSHIKAWA, M.; YAMAOKA, N.; ISHIDA, I. The structure and function of a soybean  $\beta$ -glucan-elicitor-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 94, n. 3, p. 1029–1034, 1997.
- van BREDA DE HAAN, J. De bibitziekte in de Deli-tabak veroorzaakt door *Phytophthora nicotianae*. *Mededeelingen uit Lands Plantentuin, Batavia (Jakarta)*, v. 15, n. 1, p. 1–107 [p. 57], 1896.
- van WEST, P.; MORRIS, B.M.; REID, B.; APPIAH, A.A.; OSBORNE, M.C.; CAMPBELL, T.A.; SHEPHERD, S.J.; GOW, N.A.R. Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v. 15, n. 8, p. 790–798, 2002.
- van WEST, P.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A. The *Phytophthora infestans*–potato interaction. In: TALBOT, N.J. (Ed.). *Plant–Pathogen interactions*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; Boca Raton: CRC Press LLC, 2004. p. 219–242. (Blackwell Publishing. *CRC Press. Annual Plant Reviews*, 11).
- WANG, Y.; LI, A.; WANG, X.; ZHANG, X.; ZHAO, W.; DOU, D.; ZHENG, X.; WANG, Y. GPR11, a putative seven-transmembrane G protein-coupled receptor, controls zoospore development and virulence of *Phytophthora sojae*. *Eukaryotic Cell*, Washington, v. 9, n. 2, p. 242–250, 2010.
- WATENNAN, P. G. PHYTOCHEMICAL DIVERSITY IN THE ORDER RUTALES. In: DOWNUM, K. R.; ROMEO, J. T.; STAFFORD, H. A. (Ed.). *Recent advances in phytochemistry: Volume 27 - Phytochemical Potential of Tropical Plants*. New York: Plenum Press, 1993. p. 203–228.
- WATERS, I. An overview of the principles of MSE, the engine that drives MS performance. *Waters Technical Note*. [s.l.: s.n.].
- WATERS, II. “SYNAPT G2: Breakthrough quantitative e qualitative performance for UPLC/MS e MS/MS (MS<sup>E</sup>) applications”; *Waters Technical Note*.

WOLD, S. Principal Component Analysis. *Chemom. Intell. Lab. Sys*, v. 2, p. 37–52, 1987.

YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B. *Manual de morte súbita dos citros*. Araraquara: Fundecitrus, 2006. 12p.

YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B. *Manual técnico de morte súbita dos citros*. Araraquara: Fundecitrus, 2007. 12p.

YANG, Y.-L.; XIAO, L.-T.; HU, X.-Q. Study on the relationship between the toxin of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and resistance of potato. *Agricultural Sciences in China*, Beijing, v. 10, n. 2, p. 238–245, 2011.

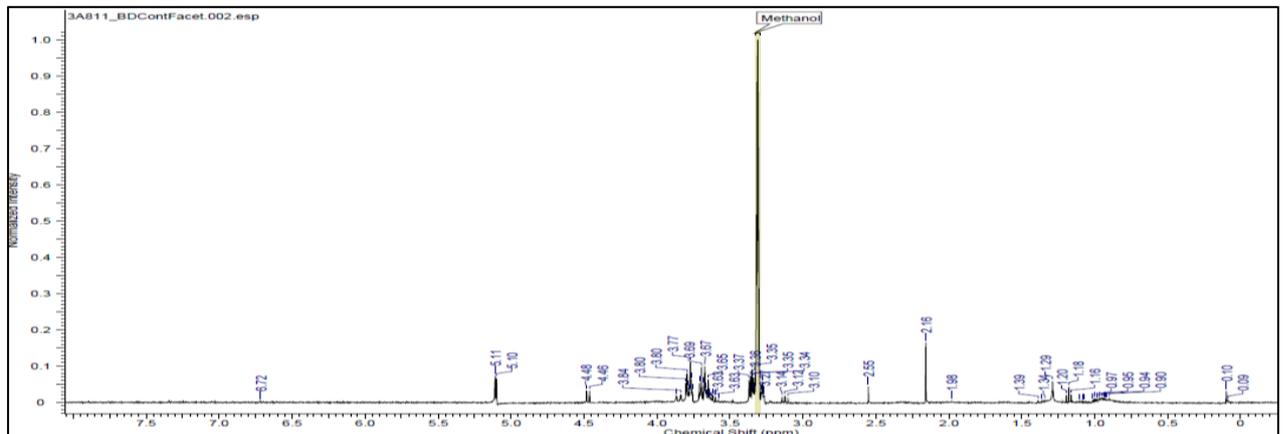
ZENTMYER, G.A.; ERWIN, D.C. Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology*, Saint Paul, n. 60, n. 7, p. 1120–1127, 1970.

ZENTMYER, G. A., 1961: Chemotaxis of zoospores for root exudates. *Science* 133, 1595.

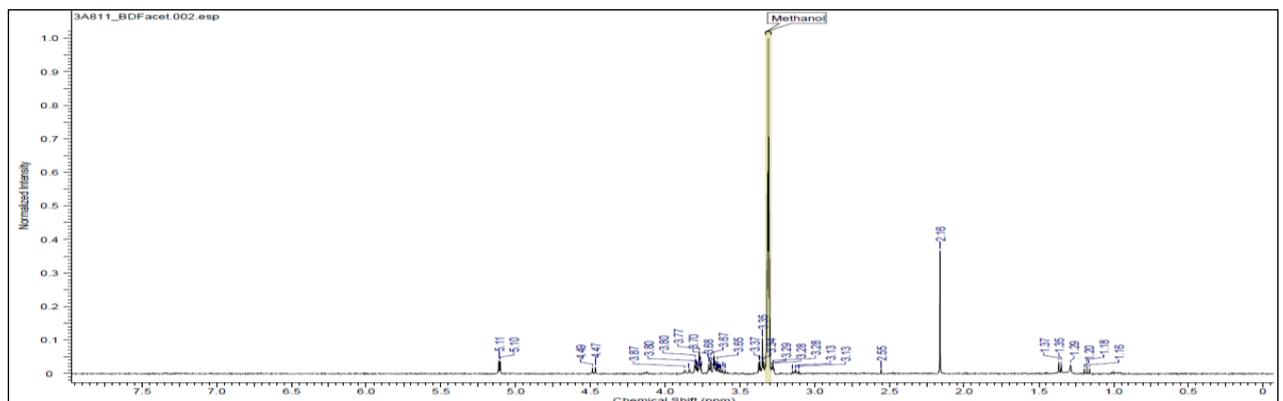
ZHU, D.; HETTIARACHCHY, N.S.; HORAX, R.; CHEN, P. Isoflavone contents in germinated soybean seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, New York, v. 60, n.3, p. 147–151, 2005.

# ANEXO

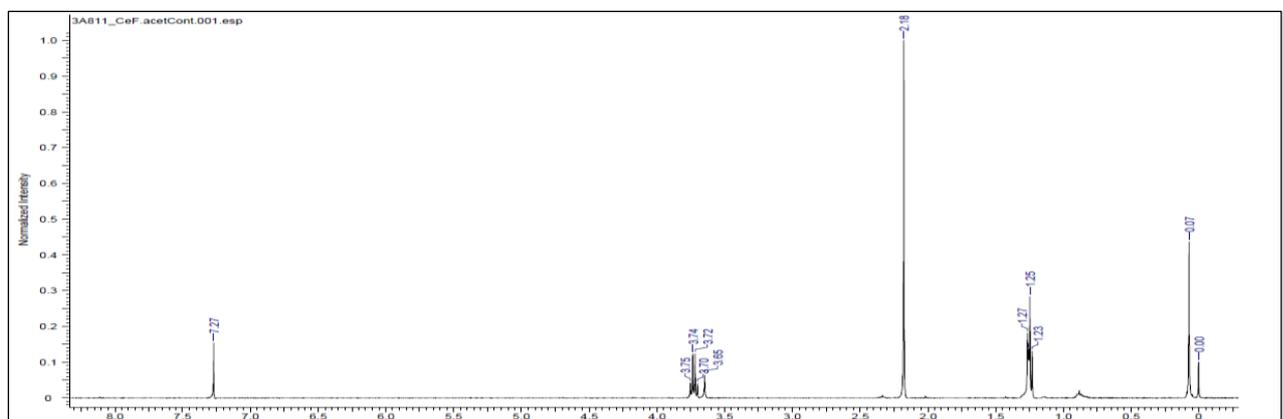
## Anexo 01 – Meios de Cultivos Análises de RMN $^1\text{H}$



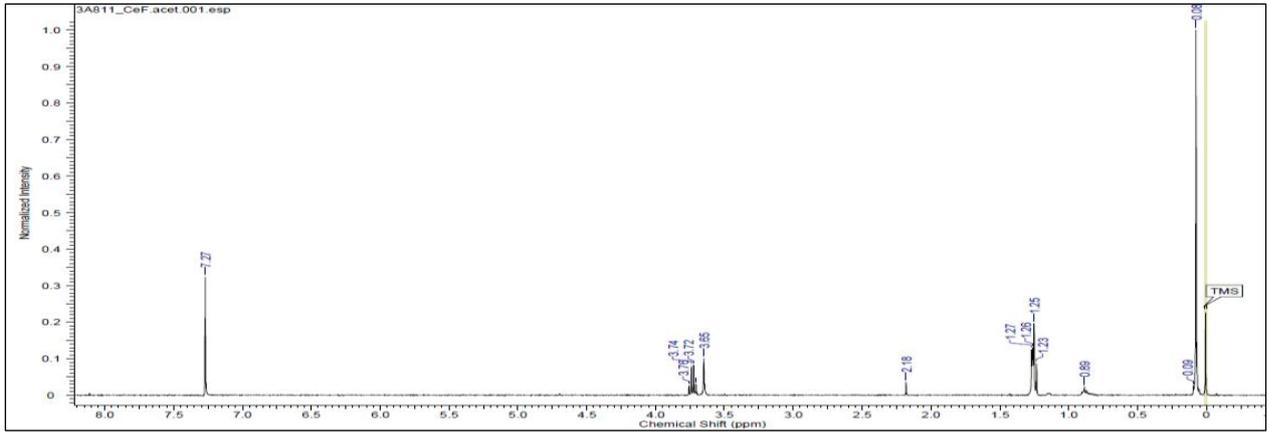
Espectro de RMN do controle do meio de cultivo BD da fração acetato de etila.



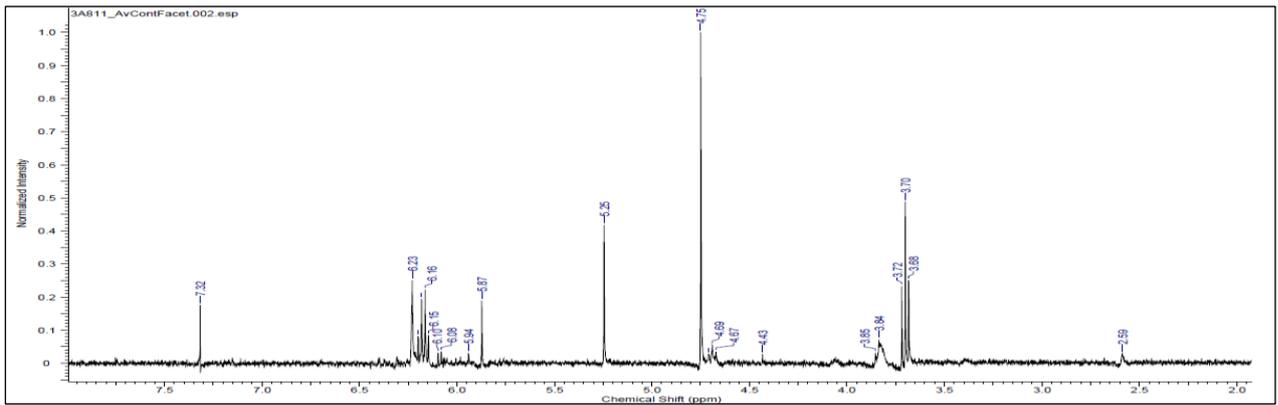
Espectro de RMN do meio de cultivo BD com Phy da fração acetato de etila.



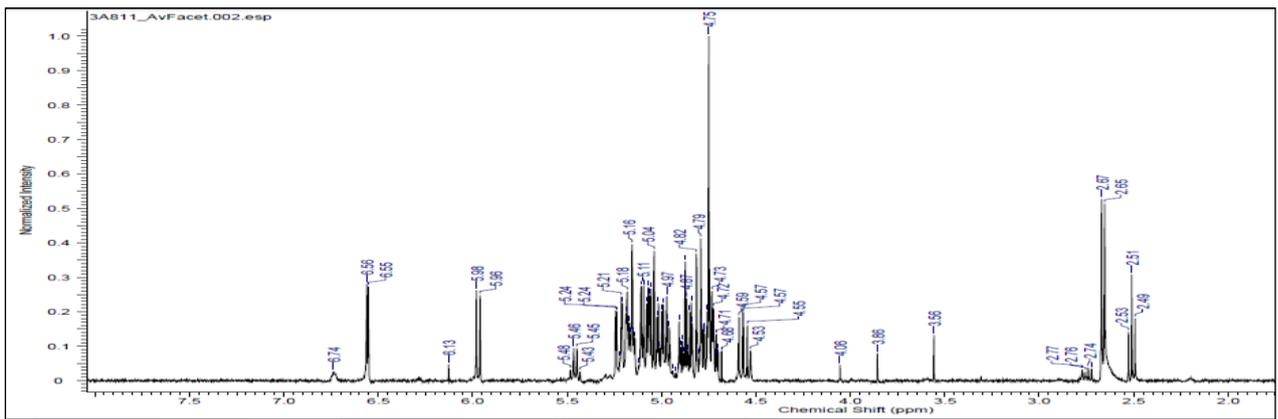
Espectro de RMN do controle do meio de cultivo de CE da fração acetato de etila.



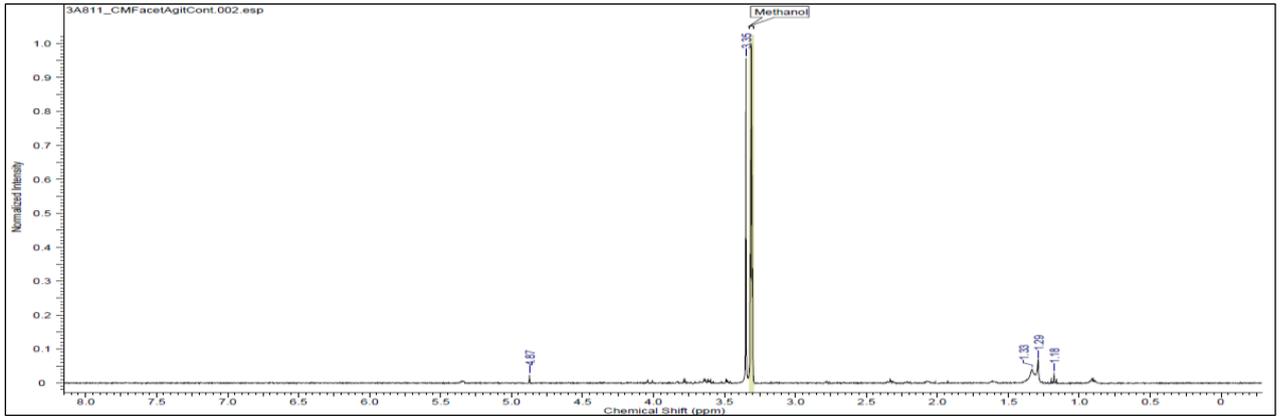
Espectro de RMN do meio de cultivo de CE com Phy da fração acetato de etila.



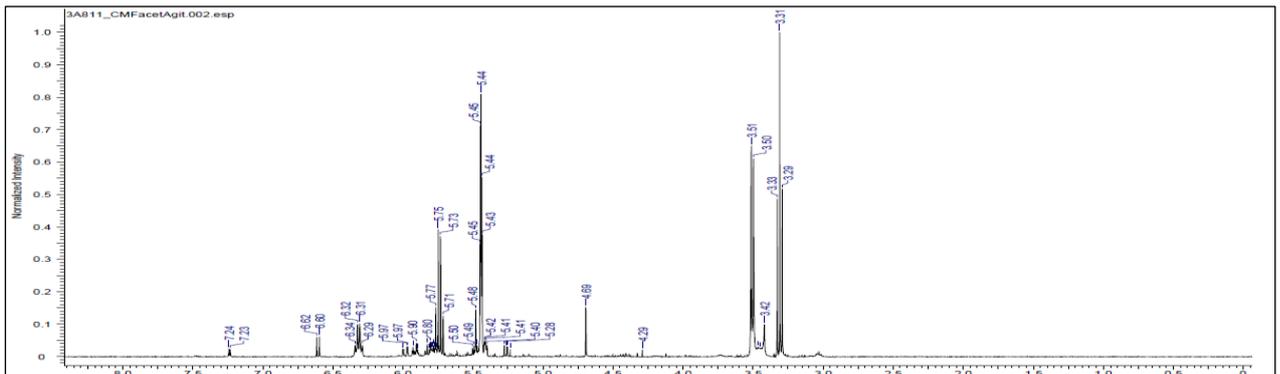
Espectro de RMN do controle do meio de cultivo de AV da fração acetato de etila.



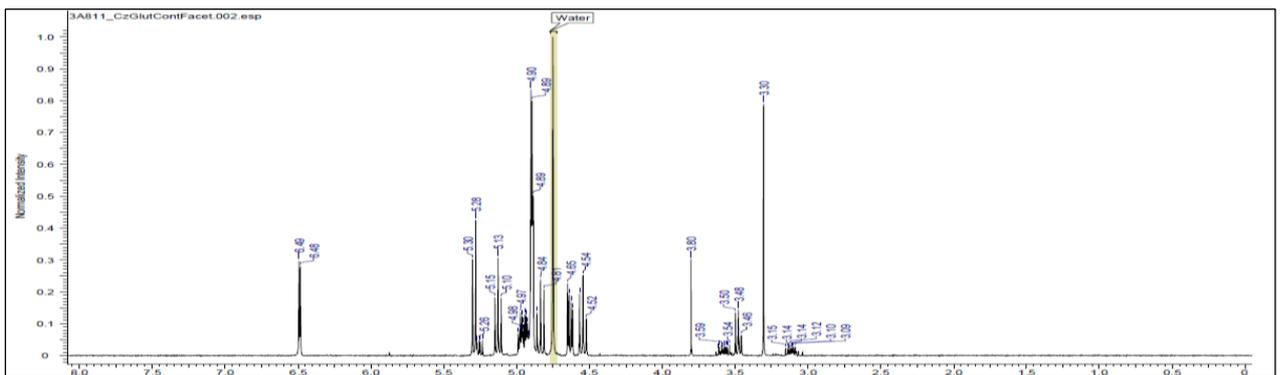
Espectro de RMN do meio de cultivo de AV da fração acetato de etila.



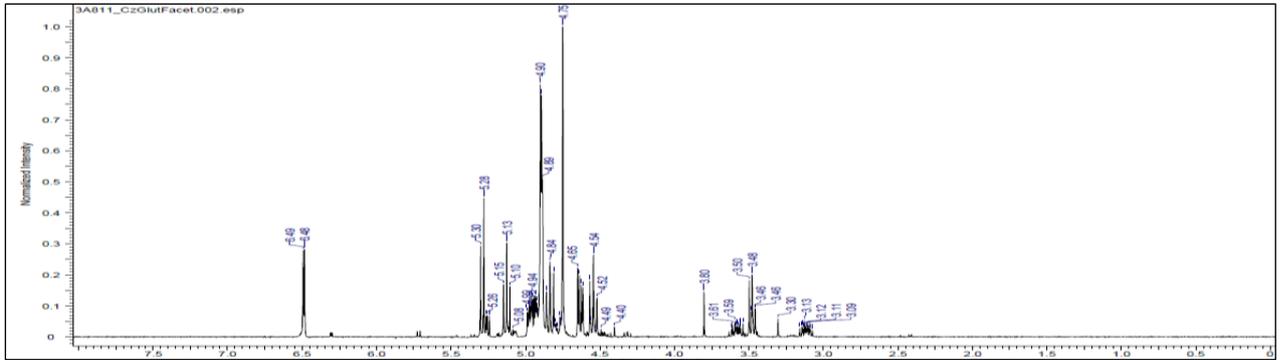
Espectro de RMN do controle do meio de cultivo de CM na fração acetato de etila.



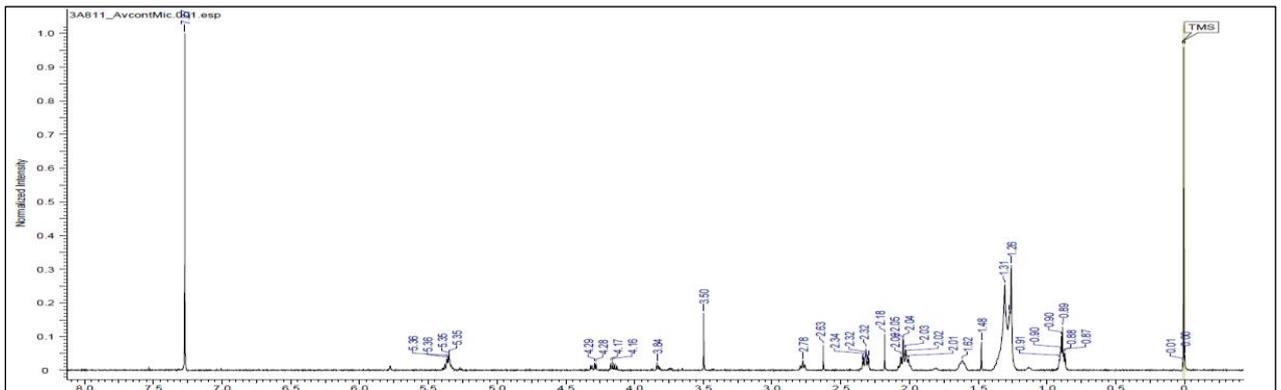
Espectro de RMN do meio de cultivo de CM com Phy na fração acetato de etila.



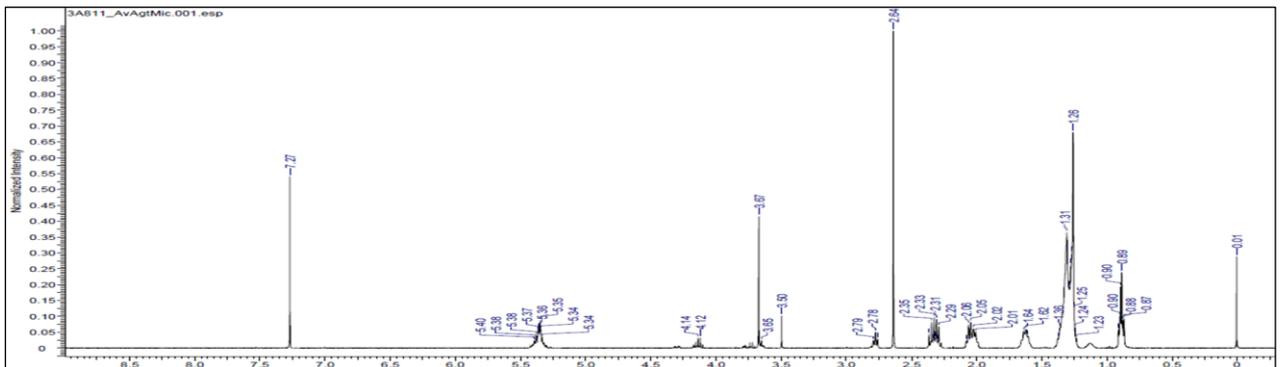
Espectro de RMN do controle do meio de cultivo de CZP na fração acetato de etila.



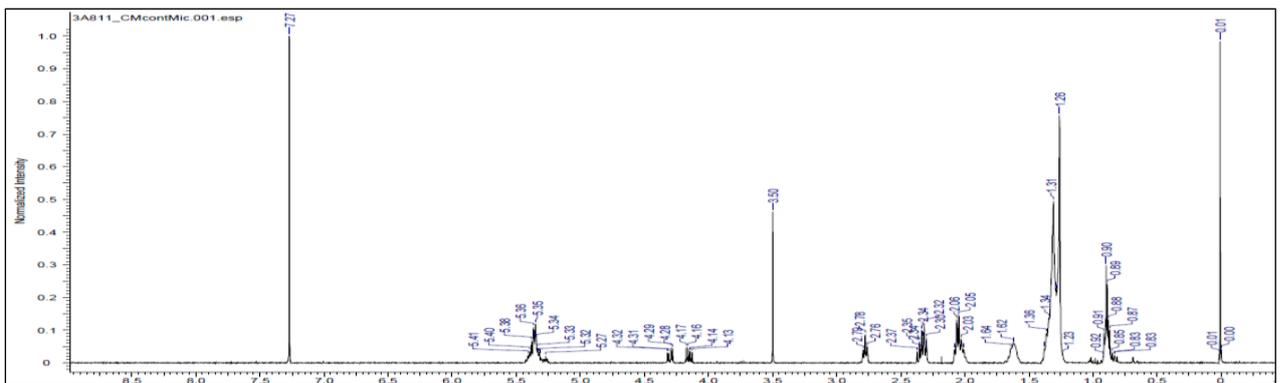
Espectro de RMN do meio de cultivo de CPZ com Phy na fração acetato de etila.



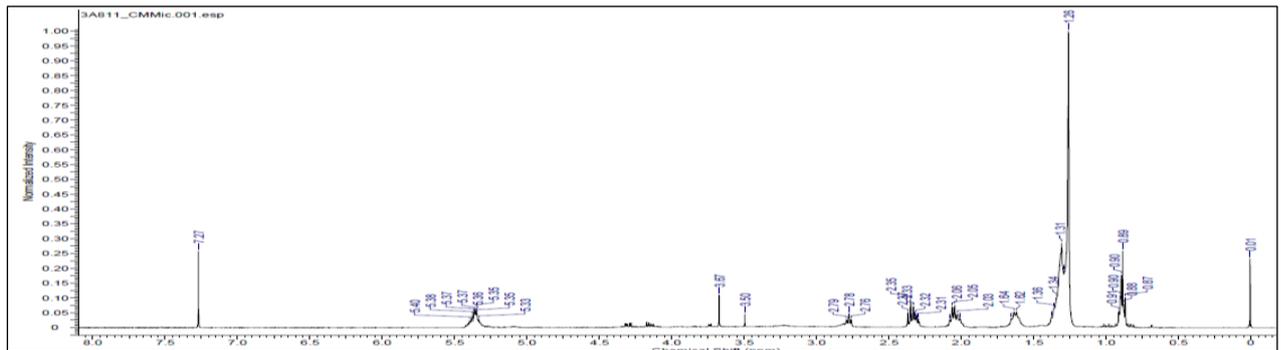
Espectro de RMN do controle do extrato do micélio AV na fração etanólica.



Espectro de RMN do extrato do micélio AV na fração etanólica.

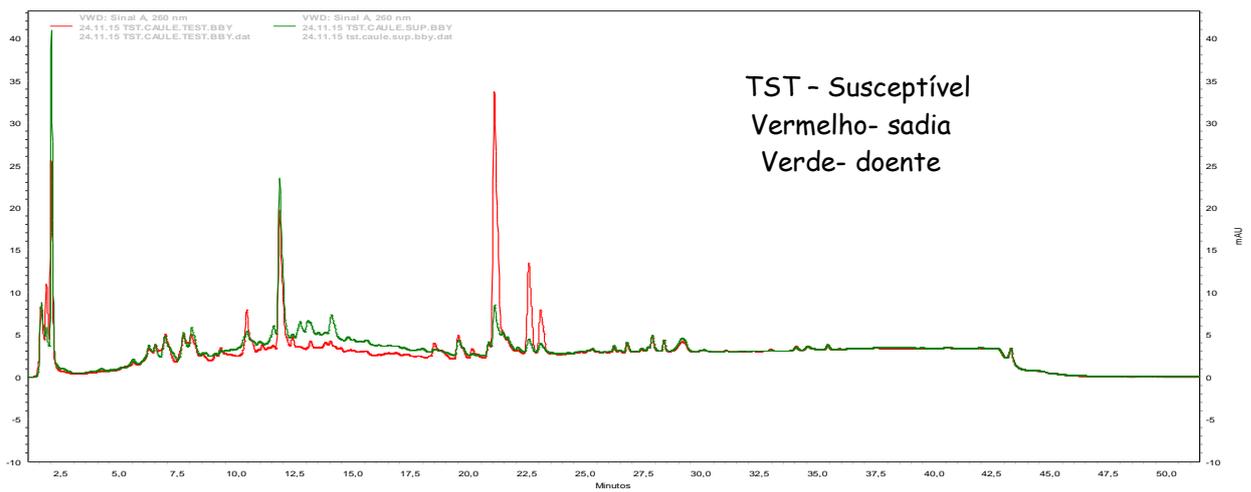


Espectro de RMN do controle extrato do micélio de CM na fração etanólica.

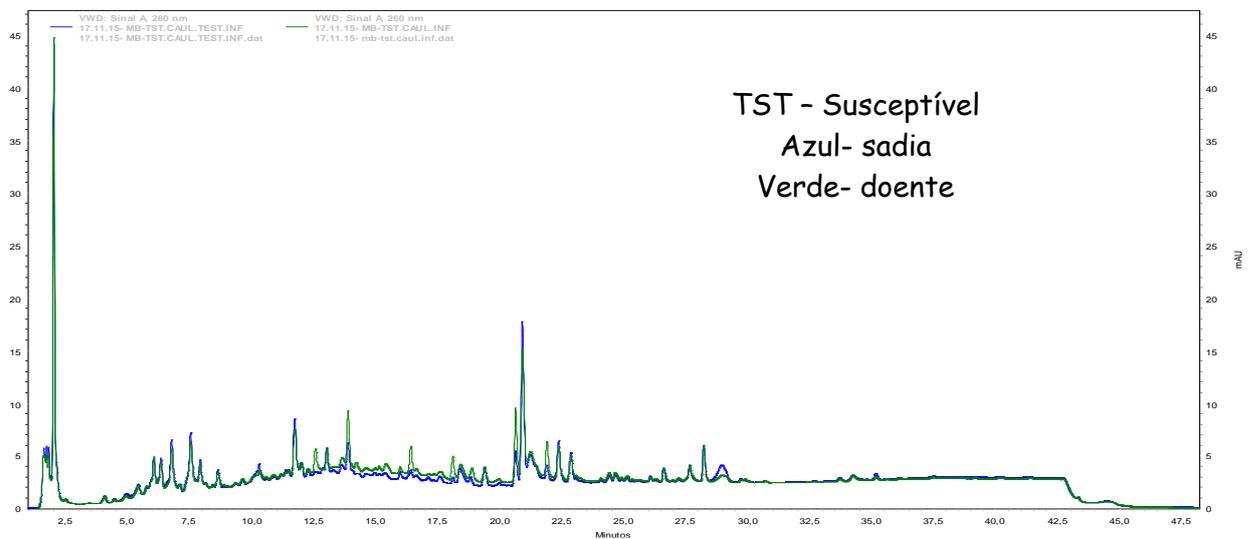


Espectro de RMN do extrato do micélio de CM na fração etanólica.

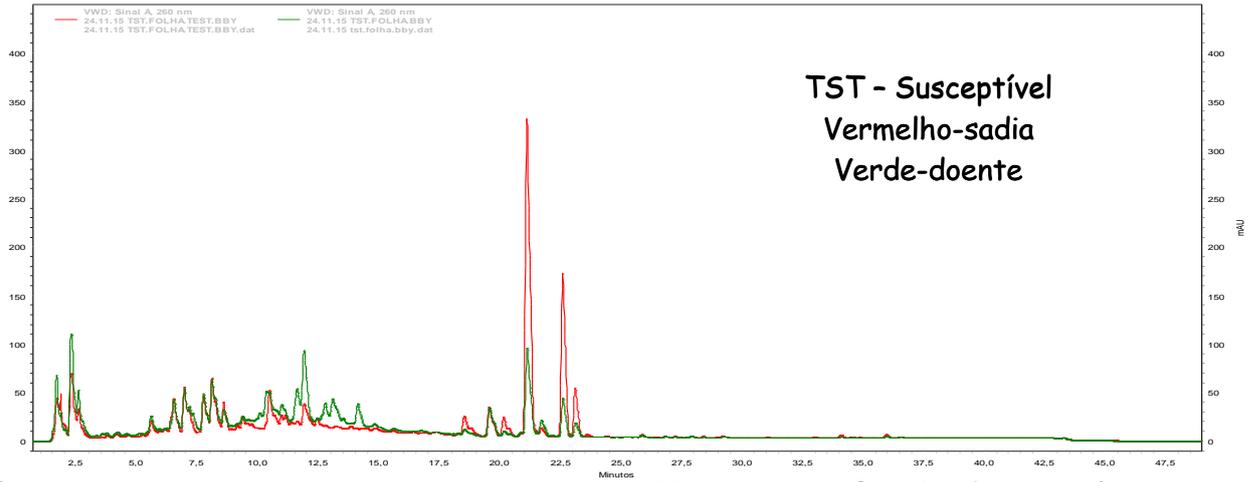
### Anexo 02 – Interação plântulas versus patógeno



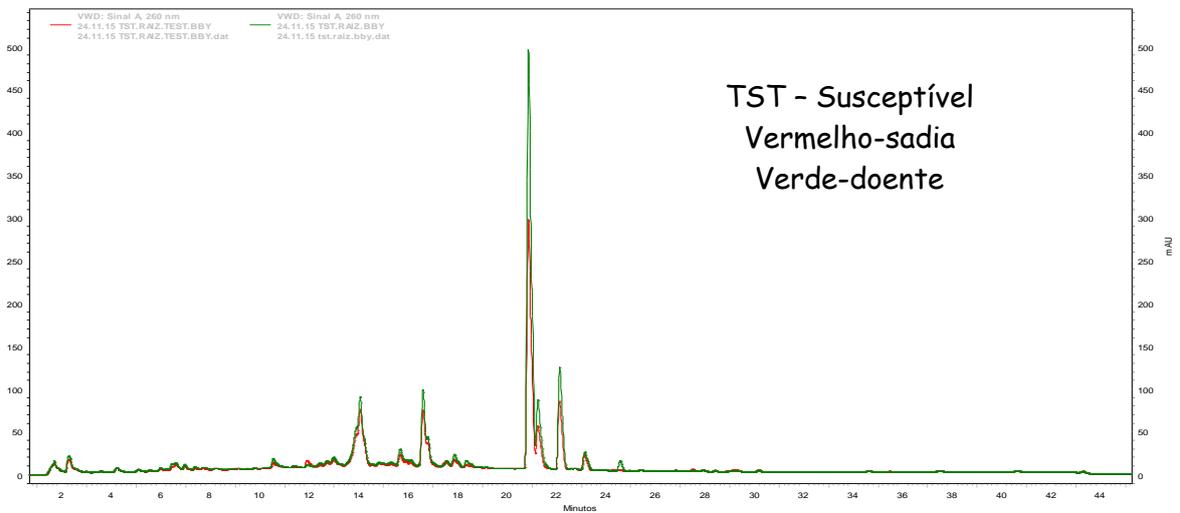
Cromatograma de plotagem comparativa varredura em 260 nm, em HPLC- UV do caule superior de plântulas de TST.



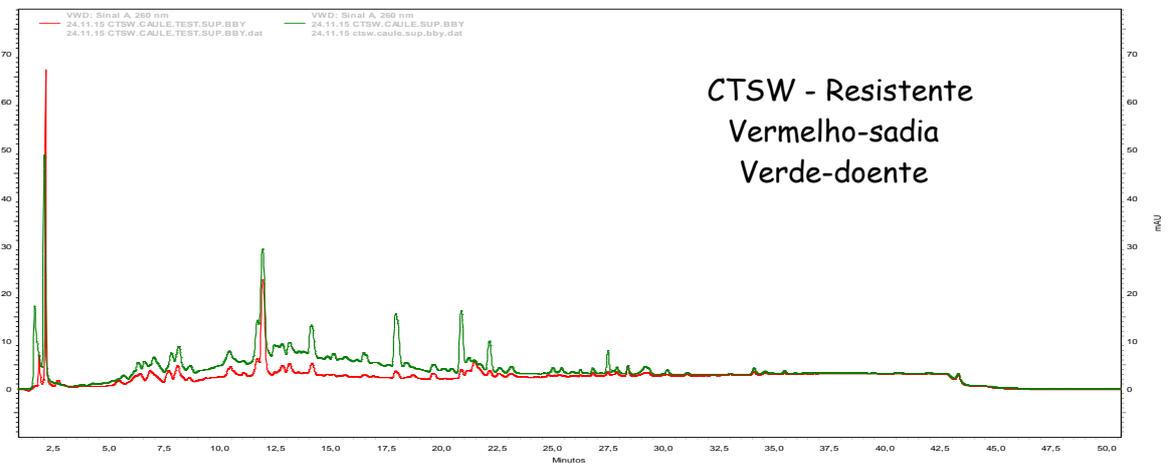
Cromatograma de plotagem comparativa varredura em 260 nm, em HPLC- UV do caule inferior de plântulas de TST.



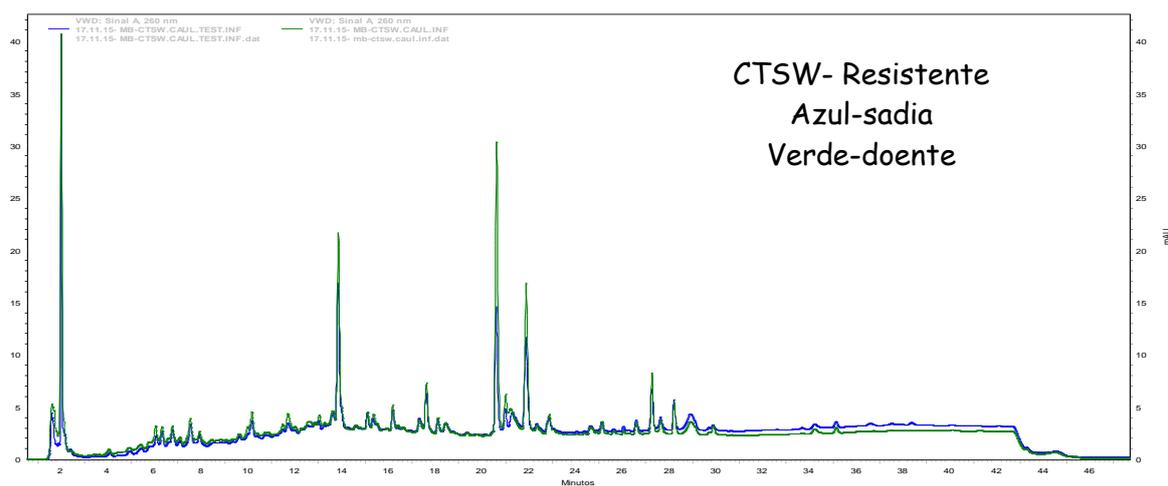
Cromatograma de plotagem comparativa varredura em 260 nm, em HPLC- UV da folha de plântulas de TST.



Cromatograma de plotagem comparativa varredura em 260 nm, em HPLC- UV da raiz de plântulas de TST.

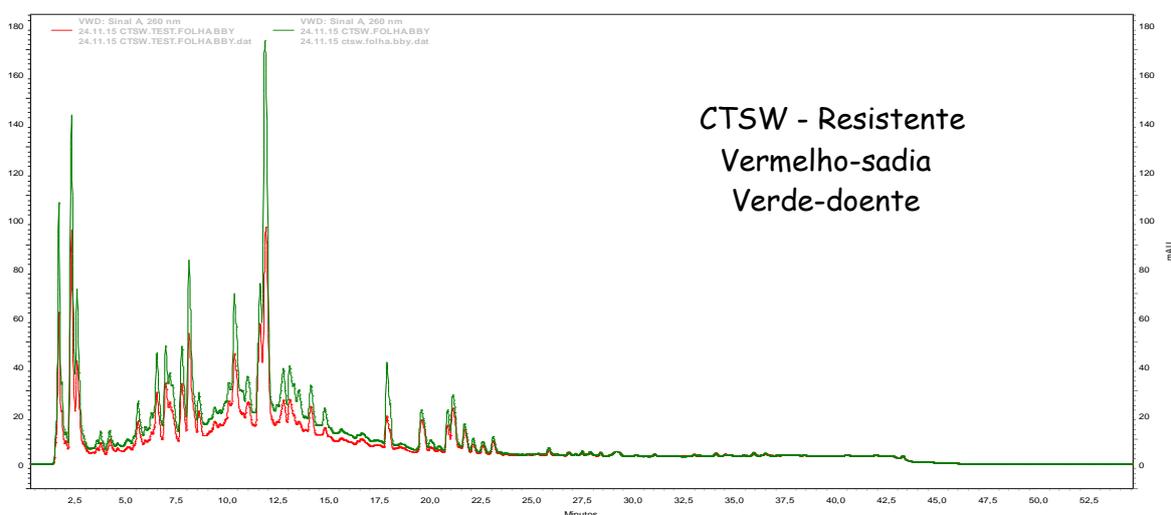


Cromatograma de plotagem comparativa varredura em 260 nm, em HPLC- UV do caule superior de plântulas de CTSW.



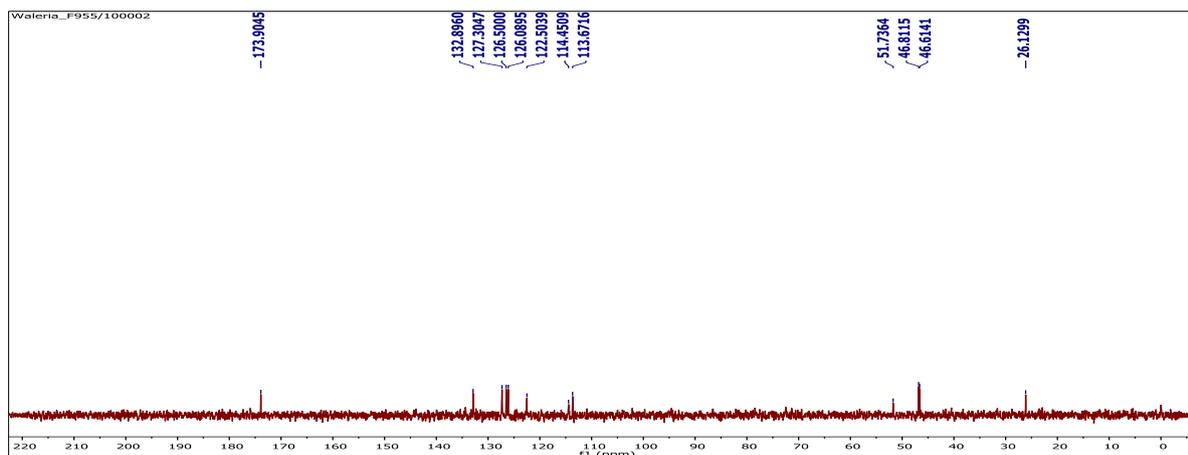
Cromatograma de plotagem comparativa varredura em 260 nm, em HPLC- UV do caule inferior de plântulas de CTSW.

30

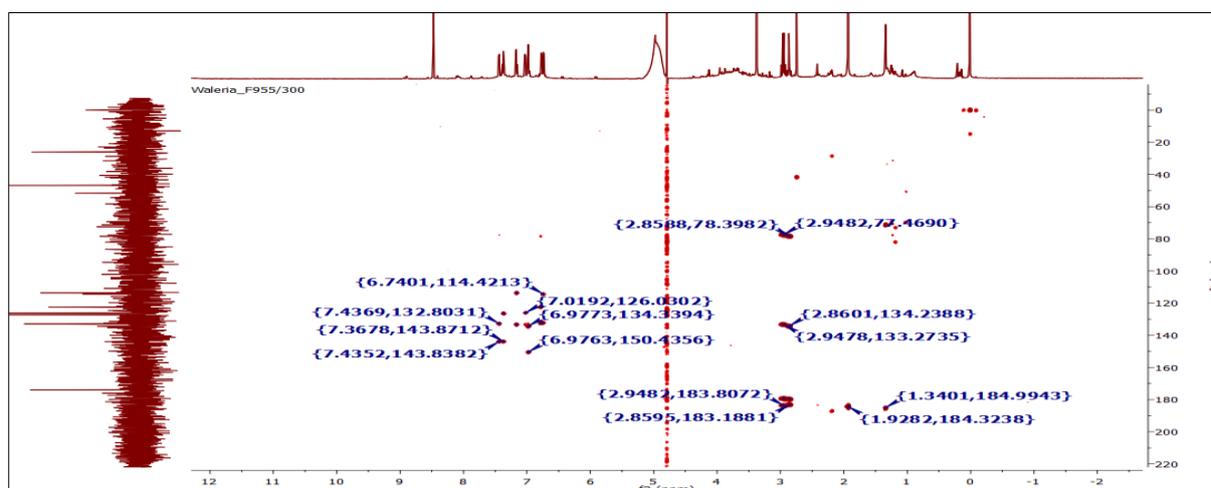


Cromatograma de plotagem comparativa varredura em 260 nm, em HPLC- UV da folha de plântulas de CTSW.

**ANEXO 03** – Espectros de RMN da substância isoladas do oomiceto *Phytophthora nicotianae* no meio de cultivo cenoura e milho (CM) na fração acetato de etila.



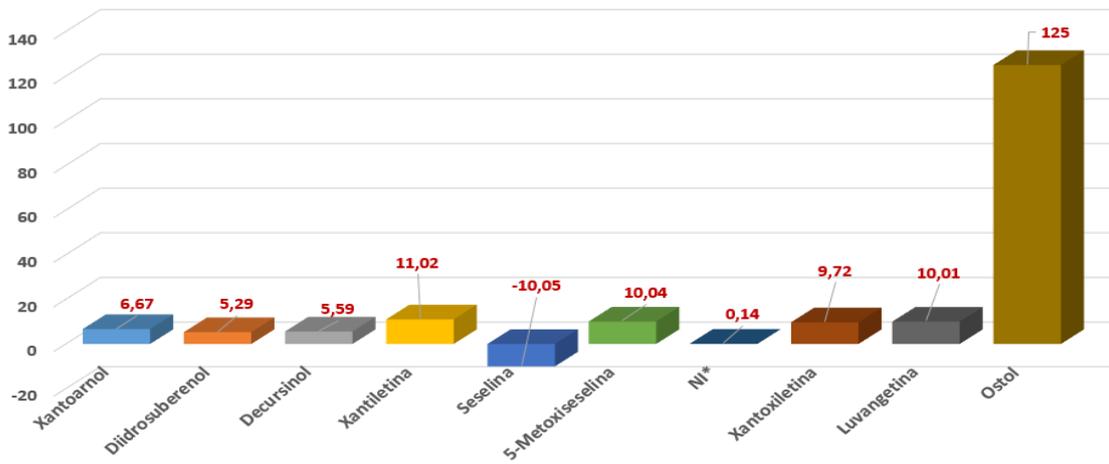
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto isolado do pico 03 da fração de acetato de etila no meio de cultivo CM. (Antrona,  $m/z = 341$ ).



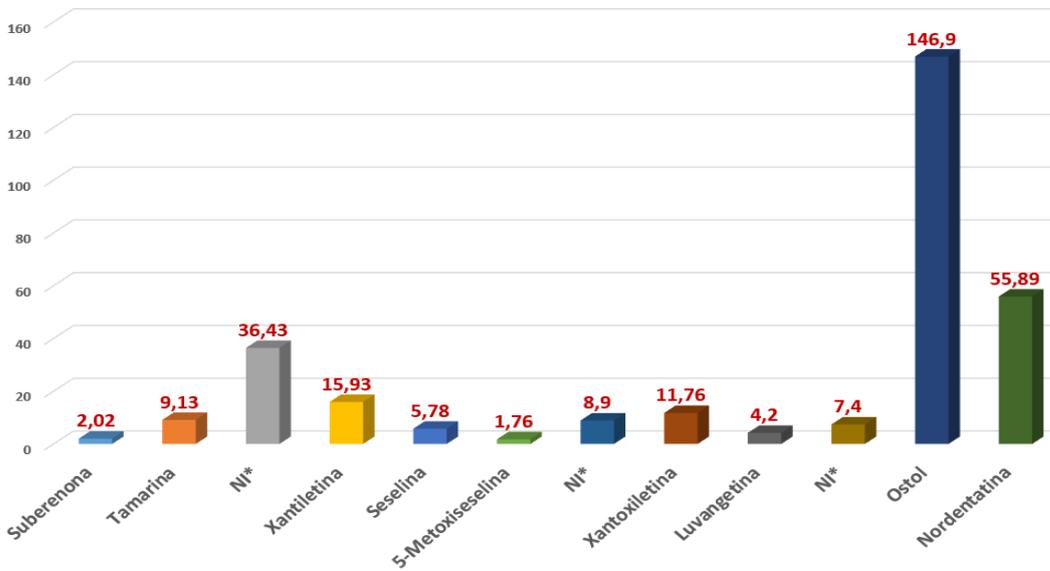
Mapa de contorno HMBC ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz) do composto do pico 03 da fração acetato de etila no meio de cultivo CM. (Antrona,  $m/z = 341$ , ESI, modo positivo).

**ANEXO 04** – Histogramas comparativos dos órgãos infectados das plântulas de TST e CTSW quando inoculados com o oomiceto *Phytophthora nicotianae* após as análises por UHPLC.

VARIAÇÃO NA RAIZ SADA X DOENTE CTSW



VARIAÇÃO NA RAIZ SADA X DOENTE DE TST



VARIAÇÃO NAS FOLHAS SADIAS X DOENTES DE CTSW

