

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

**“ESTUDOS DA BIOSÍNTESE DAS PIRANOCUMARINAS
XANTILETINA E SESELINA EM LARANJA PÊRA (*Citrus sinensis*
(L.) Osbeck) E LIMÃO CRAVO (*Citrus limonia* Osbeck)”**

Jéssica Cristina Amaral*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRA EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

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

***Bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
Abril de 2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

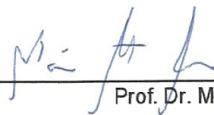
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

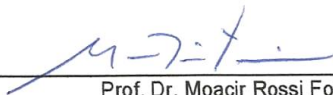
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Cristina Amaral, realizada em 06/04/2017:



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



Prof. Dr. Márcio Santos Soares
UFV



Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eliane Maria de Oliveira Amaral e Wellington Rocha Amaral, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para minha formação profissional e pessoal. Obrigada pelo incentivo a ir sempre além do possível e por me encorajarem quando tive medo de prosseguir.

Aos meus irmãos Welington Rocha Amaral Júnior (in memoriam) e Gabriel Henrique Amaral, por servirem de inspiração para a concretização de mais uma etapa da minha vida.

À toda minha família, por tanto carinho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento as minhas forças e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada. Vem dEle tudo o que sou, o que tenho e o que espero. Se cheguei até aqui foi porque Ele me sustentou!

Aos meus pais Eliane M. de Oliveira Amaral e Wellington Rocha Amaral, que independentemente de estarem perto ou longe, intercederam por mim, me deram força, coragem e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui e ser o que sou. Vocês são meus exemplos e meu alicerce.

Ao meu irmão Gabriel que se mostrou o meu pequeno companheiro para todas as horas, sempre a espera dos meus retornos para casa e sempre me enchendo de carinho. Ao meu anjinho Wellington Rocha Amaral Júnior (in memoriam), que apesar de não estar mais presente aqui comigo é minha inspiração e força para superar os desafios que surgem. Queria você presente aqui para comemorar esta vitória comigo.

Aos meus avós e demais familiares, que sempre torceram por mim, o apoio de vocês foi fundamental.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fátima, por ser fonte de grande inspiração, pela orientação, pelos grandes ensinamentos, por ter confiado em mim desde o início e acreditado que eu seria capaz de desenvolver este trabalho.

Ao CNPQ, pois sem o apoio financeiro não seria possível à realização deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais UFSCar, pela amizade, apoio, troca de experiências e maravilhoso convívio.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pelos ensinamentos, suporte e colaboração.

As minhas amigas e companheiras de república Jeyne, Taíse, ao agregado Daniel e também às amigas de Araraquara: Camila, Laís e Maíra, pelos momentos de descontração, pela amizade, cumplicidade e por fazerem meus dias melhores. Sou grata a vocês por estarem presentes nesta caminhada e pelo apoio prestado enquanto estive longe de casa. Vocês foram fundamentais para tornarem essa trajetória mais leve.

As companheiras de uma árdua jornada, Danielle da Silva e Michelli Massaroli, pelo tempo dedicado em prol dos experimentos, troca de experiências e pelos muitos risos que demos juntas . Sem vocês a conclusão deste trabalho não seria possível.

As grandes amigas: Ana Paula, Gabryella S., Gabriella T, Jéssica G., Ludmila, Lorena, Virgínia, M^a Luiza, Poliana, Sthéfane que mesmo longe, se fizeram presentes em alguns momentos e compartilharam desta conquista.

Aos professores, técnicos, funcionários e às secretárias do PPGQ - UFSCar que tiveram participações fundamentais para que esta conquista fosse possível.

A secretária Renata, pela amizade e por estar sempre disposta a auxiliar e orientar nas burocracias necessárias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de desenvolver o Mestrado Acadêmico.

Ao Departamento de Biotecnologia Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, em especial a Prof. Dra. Ana Maria, Prof. Dra. Adriana Lopes e a Dra. Edieidia por todo apoio e paciência durante a realização dos experimentos in vitro.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética da UFSCar, em especial o Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, a Dra. Luciana Vizotto e a doutoranda Thayana Alves, por todo o auxílio, suporte e ensinamentos em todas as análises de RMN realizadas.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira em Cordeirópolis – SP, em especial ao Prof. Dr. Sérgio e a Prof. Dra. Valdenice, por sempre me receberem cordialmente e auxiliarem no que foi preciso para a finalização deste trabalho.

Aos meus professores da graduação na Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba, pela contribuição na minha formação e pelos ensinamentos, que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Enfim agradeço a todos que durante esta caminhada estiveram presentes e tiveram paciência comigo, pois muita das vezes este percurso é estressante, porém muito gratificante no final.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas, do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

LISTA DE ABREVIATURAS

Ache = Acetil Colinesterase

ACN = Acetonitrila

ATMA = *Automatic Tuning and Matching*

b1 = banda 1

b2 = banda 2

CM = Controle do Meio

CCDA = Coluna de Camada Delgada Analítica

Che = Colinesterase

CHR = Corismato

CIM = Concentração Inibitória Mínima

COSY = *Correlations Spectroscopy*

CTAB = Brometo de N-Cetil-N,N,N-Trimetil-Amônio

CVC = Clorose Variegada dos Citros

DMAPP = Difosfato de Dimetilalila

DMSO = Dimetil Sulfóxido

DNA = *Desoxirribonucleic Acid*

dNTPs = Deoxinucleosídeos trifosfato

DXP = 1-Deoxixilose-5-Fosfato

E4P = D-Eritrose-4-Fosfato

EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ES = *Electrospray Ionization*

EST = *Express Sequence Tags*

GA-3P = D-Gliceraldeído-3-Fosfato

HMBC = *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HMBPP = 1-Hidroxi-2-Metil-2-Butenil-4-Difosfato

HMG-CoA = 3-Hidroxi-3-Metil Glutaril-CoenzimaA

HMG-CoA = 1-Hidroxi-2-Metil-2-Butenil-4-Difosfato

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*

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

HPLC-DAD = *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector*

HPLC-UV = *High Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet*
HSQC = *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
IPP = Difosfato de Isopentila
LC Lim = Limão Cravo Limeira
LCC = Limão Cravo Caule
LCF = Limão Cravo Folha
LCR = Limão Cravo Raiz
LCR marc = Limão Cravo marcada
LCR nmar = Limão Cravo não marcada
LP IAC = Laranja Pêra Instituto Agrônomo de Campinas
LPC = Laranja Pêra Caule
LPF = Laranja Pêra Folha
LPR = Laranja Pêra Raiz
LPR marc = Laranja Pêra marcada
LPR nmarc = Laranja Pêra não marcada
 m/z = Relação Massa Carga
ME = Mercapto Etanol
ME-2,4cPP = 2-C-Metil-D-Eritritol-2,4-ciclo-Difosfato
MeOH = Metanol
MeOH - d4 = Metanol Deuterado
MEP = 2-C-Metil-D-Eritritol-4-Fosfato
MVA = Mevalonato
NCCLS = *National Comitee for Clinical Laboratory Standarts*
ORF = *Open Reading Frame*
PT = Prenil Transferase
PcPT = Prenil Transferase de *Pastinaca sativa*
PCR = *Polymerase Chain Reaction*
PD = Doença de Pierce
PEP = Fosfoenol Piruvato
ppm = Partes por milhão
 R_i = *Retention factor*
RMN = Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^{13}C = Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ^1H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RPLC = *Reversed Phase Liquid Chromatography*

rpm = Rotação por Minuto

SM = Solução Mãe

SPE = *Solid Phase Extraction*

TAE = Tris Acetato de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

TE = Tampão de extração

UPLC – Qtof = *Ultra Performance Liquid Chromatography - Quadrupole Time of Fly*

UV/Vis = Ultravioleta/Visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1.1. Composição do Meio MS basal MURASHIGE; SKOOG, 1962.....	24
TABELA 3.3.1. Gradiente para análise do perfil químico em folha, caule e raiz de <i>C. sinensis</i> e <i>C.limonia</i>	26
TABELA 3.5.3.1. Protocolo para análise de PCR dos genótipos de citros.	29
TABELA 3.5.3. 2. Programa de temperatura para <i>primers</i> genômicos de citros.	29
TABELA 3.5.3.3. Programa de temperatura para primers EST de citros.	30
TABELA 3.6.1.1. Metodologia para o trapeamento de piranocumarinas em <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> utilizando HPLC-SPE-UV-NMR.	34
TABELA 3.6.1.2. Tempo de trapeamento da xantiletina e seselina proveniente dos extratos marcados e não marcados de laranja Pêra e limão Cravo em cartucho SPE.	35
TABELA 3.6.2.1. Metodologia para análise das raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> utilizando UPLC-QToF.	36
TABELA 4.3.1. Dados da quantificação de piranocumarinas em laranja Pêra.....	52
TABELA 4.3.2. Dados da quantificação de piranocumarinas em limão Cravo.	52
TABELA 4.4.1. Quantificação do DNA de laranja Pêra e de limão Cravo.	56
TABELA 4.5.2.1. Dados de RMN de ¹ H da xantiletina em comparação aos dados da literatura (KHAN, 1985) ⁴⁷	67
TABELA 4.5.2.2. Dados do experimento de COSY para a substância xantiletina. ...	68
TABELA 4.5.2.3. Dados do experimento de HSQC para a substância xantiletina. ...	69
TABELA 4.5.2.4. Abundância de ¹³ C da xantiletina, isolada da raiz do limão Cravo após a incorporação de glicose - 1 - [¹³ C].	70
TABELA 4.5.2.5. Abundância de ¹³ C da xantiletina, isolada da raiz da laranja Pêra após a incorporação de glicose - 1 - [¹³ C].	74
TABELA 4.5.3.1. Dados de RMN de ¹ H da banda 2 (seselina) em comparação aos dados da literatura (AHMAD, 1984) ⁸³	83
TABELA 4.5.3.2. Dados do experimento de COSY para a substância seselina.	84
TABELA 4.5.3.3. Dados do experimento de HSQC para a substância seselina.	86
TABELA 4.5.3.4. Abundância de ¹³ C da seselina, isolada da raiz do limão Cravo após a incorporação de glicose - 1 - [¹³ C].	90

TABELA 4.5.3.5. Abundância de ^{13}C da seselina, isolada da raiz do laranja Pêra após a incorporação de glicose - 1 - [^{13}C].....	94
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.3.1. Histórico de surtos das principais doenças de citros no Brasil.....	5
FIGURA 1.4.1.1. Biossíntese das cumarinas umbeliferona e escopoletina, adaptado de VIALART et al., 2012 ³⁶	11
FIGURA 1.4.2.1. Prenilação de umbeliferona pela enzima PcPT de <i>P. crispum</i> , adaptado de KARAMAT et al., 2014 ⁴⁴	14
FIGURA 1.4.2.2. Proposta biogenética para piranocumarinas.....	15
FIGURA 1.5.1. Configuração esquemática de LC-NMR e esquema dos diferentes tipos de acoplamento com a resolução dos seus respectivos espectros. Adaptado de https://www.bruker.com/products/mr/nmr/hyphenation/lc-nmr/overview.html e de ⁵⁶ .	16
FIGURA 1.6.1. Efeito da marcação simples e dupla no espectro de RMN de ¹³ C, adaptado de MACEDO JUNIOR, F.C., 2007. ⁶⁴	20
FIGURA 3.2.1. Esquema da metodologia de extração para obtenção de extratos das plântulas cultivadas <i>in vitro</i>	25
FIGURA 3.5.4.1. Etapas do processo de extração de DNA das raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> e análise de PCR.....	31
FIGURA 3.7.3.1. Esquema do método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por micro diluição em microplaca de 96 orifícios para a bactéria <i>X. fastidiosa</i>	39
FIGURA 3.7.4.1. Esquema do método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por micro diluição em microplaca de 96 orifícios para a bactéria <i>X. citri</i>	41
FIGURA 4.1.1. Cultivo <i>in vitro</i> em meio MS basal sólido. i) <i>C. sinensis</i> ii) <i>C. limonia</i>	43
FIGURA 4.2.1. Análise do perfil químico das partes vegetais de laranja Pêra. i) LPF - folha de laranja Pêra ii) LPC - caule de laranja Pêra iii) LPR - raiz de laranja Pêra. .	46
FIGURA 4.2.2. Análise do perfil químico das partes vegetais de limão Cravo. i) LCF - folha de limão Cravo ii) LCC - caule de limão Cravo iii) LCR - raiz de limão Cravo. .	47

FIGURA 4.2.3 Proposta biogenética para piranocumarinas. A prenilação em C-6 levando a formação da piranocumarina linear – xantiletina e em C-8 à piranocumarina angular - seselina.	48
FIGURA 4.2.4. Perfil químico das raízes dos genótipos LPR 144 – laranja Pêra e LCR 214 – limão Cravo, comparados ao padrão xantiletina + seselina. i) raiz de limão Cravo LCR 214 ii) raiz de laranja Pera LPR144 iii) amostra padrão – xantiletina + seselina iv) perfil UV da xantiletina em LCR 214, LPR 144 e amostra padrão.....	49
FIGURA 4.3.1. Curva de calibração para quantificação de piranocumarinas totais em raízes de laranja Pêra (<i>C. sinensis</i>) e limão Cravo (<i>C. limonia</i>).	51
FIGURA 4.3.2. Gráfico representando a concentração de piranocumarinas em raízes de citros. i) % de piranocumarinas em laranja Pêra e limão Cravo, para comparação da produção entre espécies. ii) concentração em µg/mL em laranja Pêra para comparação entre genótipos. iii) concentração em µg/mL em limão Cravo para comparação entre genótipos.	53
FIGURA 4.4.1. Revelação da placa de eletroforese do produto de análise de PCR de raízes de laranja Pera e de limão Cravo. i) Primer 209 est dos genótipos de ambas as espécies frente aos padrões de laranja Pera - LP IAC e de limão Cravo - LC Lim. ii) Primer 89 est dos genótipos de ambas as espécies frente aos padrões de laranja Pera - LP IAC e de limão Cravo - LC Lim. *Código bran = branco.	57
FIGURA 4.5.1.1. Biossíntese do difosfato isopentila (IPP) através das vias do mevalonato (MVA) e 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato - triose/piruvato (MEP).....	59
FIGURA 4.5.1.2. Cromatogramas da reprodução do método e do trapeamento das bandas 1 e 2, referentes a xantiletina e seselina respectivamente, para as amostras de raiz de limão Cravo - LCR, controle e com marcação através da incorporação de glicose-1-[¹³ C].	60
FIGURA 4.5.1.3. Cromatogramas da reprodução do método e do trapeamento das bandas 1 e 2, referentes a xantiletina e seselina respectivamente, para as amostras de raiz de laranja Pêra – LPR, controle e com marcação através da incorporação de glicose-1-[¹³ C].	61

FIGURA 4.5.2.1. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de limão Cravo proveniente do experimento controle - LCR não marcada.	63
FIGURA 4.5.2.2. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de limão Cravo proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LCR marcada.	64
FIGURA 4.5.2.3. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento controle - LPR não marcada.	65
FIGURA 4.5.2.4. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LPR marcada.	66
FIGURA 4.5.2.5. Experimento de COSY (600 MHz, MeOD) da banda 1 - xantiletina.	67
FIGURA 4.5.2.6. Correlações observadas no COSY para a xantiletina.	68
FIGURA 4.5.2.7. Correlações observadas no HSQC da xantiletina.	68
FIGURA 4.5.2.8. Experimento de HSQC (600 MHz, MeOD) da banda 1 - xantiletina.	69
FIGURA 4.5.2.9. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da banda 1 – xantiletina: da amostra da raiz de limão Cravo proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C – LCR marcada em vermelho e de limão Cravo controle – LCR controle em azul. Estrutura da xantiletina – em azul a marcação proveniente do caminho do Chiquimato e em vermelho a marcação proveniente do caminho do MEP.	71
FIGURA 4.5.2.10. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de limão Cravo do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C – LCR marcada.	72
FIGURA 4.5.2.11. Espectros de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de limão Cravo do experimento controle, com abundância isotópica natural – LCR controle.	73

FIGURA 4.5.2.12. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da banda 1 – xantiletina: da amostra da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C – LPR marcada em vermelho e de limão Cravo controle – LPR controle em azul. Estrutura da xantiletina – em azul a marcação proveniente do caminho do Chiquimato e em vermelho a marcação proveniente do caminho do MEP.	75
FIGURA 4.5.2.13. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de laranja Pêra do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C – LPR marcada.	76
FIGURA 4.5.2.14. Espectros de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de laranja Pêra do experimento controle, com abundância isotópica natural – LPR controle.....	77
FIGURA 4.5.3.1. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de limão Cravo proveniente do experimento controle - LCR não marcada.	79
FIGURA 4.5.3.2. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de limão Cravo proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LCR marcada.	80
FIGURA 4.5.3.3. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento controle - LPR não marcada.	81
FIGURA 4.5.3.4. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LPR marcada.	82
FIGURA 4.5.3.5. Experimento de COSY (600 MHz, MeOD) da banda 2 - seselina..	83
FIGURA 4.5.3.6. Correlações observadas no COSY para a seselina.....	84
FIGURA 4.5.3.7. Experimento de HSQC (600 MHz, MeOD) da banda 2 - seselina.	85
FIGURA 4.5.3.8. Correlações observadas no HSQC da seselina.....	85

FIGURA 4.5.3. 9. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da banda 2 – seselina: da amostra da raiz de limão Cravo proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C – LCR marcada em vermelho e de limão Cravo controle – LCR controle em azul. Estrutura da seselina – em azul a marcação proveniente do caminho do Chiquimato e em vermelho a marcação proveniente do caminho do MEP.	87
FIGURA 4.5.3.10. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de limão Cravo do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C – LCR marcada.....	88
FIGURA 4.5.3.11. Espectros de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de limão Cravo do experimento controle, com abundância isotópica natural – LPR controle.....	89
FIGURA 4.5.3.12. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da banda 2 – seselina: da amostra da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C – LCR marcada em vermelho e de limão Cravo controle – LCR controle em azul. Estrutura da seselina – em azul a marcação proveniente do caminho do Chiquimato e em vermelho a marcação proveniente do caminho do MEP.	91
FIGURA 4.5.3.13. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de laranja Pêra do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C – LPR marcada.	92
FIGURA 4.5.3.14. Espectros de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de laranja Pêra do experimento controle, com abundância isotópica natural – LPR controle.....	93
FIGURA 4.5.4. 1. Produtos da glicólise e suas marcações, a partir da glicose-1- ^{13}C	96
FIGURA 4.5.4.2. Biossíntese da L-fenilalanina, através do caminho do Chiquimato. Adaptado de DEWICK, P.M., 2002 ³⁷	98

FIGURA 4.5.4.3. Biossíntese das piranocumarinas angular: xantiletina e linear seselina, através do caminho do Chiquimato e incorporação da unidade de IPP proveniente do caminho do MEP. Adaptado de DEWICK, P.M., 2002 ³⁷ .	99
FIGURA 4.6.1. Cromatograma <i>full scan</i> ES ⁺ BPI, dos extratos das raízes de citros analisados em UPLC-QToF em modo positivo de ionização. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.	101
FIGURA 4.6.2. Espectro de massas MS em modo positivo de b1 - referente a xantiletina, com íon molecular de <i>m/z</i> 229,0887 dos extratos das raízes de citros. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.	102
FIGURA 4.6.3. Espectro de massas MS/MS extraído do íon <i>m/z</i> 229,0877 referente à b1 – xantiletina, em modo positivo, dos extratos das raízes de citros. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.	103
FIGURA 4.6.4. Espectro de massas MS em modo positivo de b2 - referente a seselina, com íon molecular de <i>m/z</i> 229,0877 dos extratos das raízes de citros. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.	104
FIGURA 4.6.5. Espectro de massas MS/MS extraído do íon <i>m/z</i> 229,0877 referente à b2 – seselina, em modo positivo, dos extratos das raízes de citros. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.	105
FIGURA 4.6.6. Proposta de fragmentação para a xantiletina no modo positivo.	106
Figura 4.6.7. Proposta de fragmentação para a seselina no modo positivo.	106
FIGURA 4.7.1. Leitura visual do teste de micro diluição com resazurina i) delineamento do ensaio ii) resultado do ensaio da xantiletina frente à <i>X. fastidiosa</i> cepa 9a5c, após a incubação.	108

FIGURA 4.8.1. Leitura visual do teste de micro diluição com resazurina, após a incubação. Delineamento experimental e resultado do ensaio i) da xantiletina frente à *X. citri* i) da seselina frente à *X. citri* iii) da xantiletina + seselina 1:1 frente à *X. citri*.....110

RESUMO

“ESTUDOS DA BIOSSÍNTESE DE PIRANOCUMARINAS EM LARANJA PÊRA (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) E LIMÃO CRAVO (*Citrus limonia* Osbeck)” O presente trabalho descreve o estudo da biossíntese de piranocumarinas em *Citrus sinensis* e *Citrus limonia*. As cumarinas, como outros fenilpropanóides, têm origem biossintética no ácido *p*-hidróxi cinâmico e sua grande diversidade estrutural é devido principalmente a incorporação de unidades prenila no anel benzênico. A fim de obter respostas sobre a reação de prenilação, foram feitos experimentos de marcação isotópica, visando confirmar a biossíntese de piranocumarinas. Para comprovar se a unidade de difosfato de isopentila (IPP) utilizada na prenilação da umbeliferona em C-6 e C-8, levando às piranocumarinas linear e angular respectivamente, é proveniente da via do mevalonato (MEV), via 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), ou via mista; a biossíntese da porção terpênica da xantiletina e seselina foi investigada através da incorporação de glicose-1-[¹³C] em *C. sinensis* e *C. limonia*. Para a confirmação da rota biossintética, o padrão de enriquecimento foi determinado a partir da comparação dos espectros de RMN de ¹³C quantitativo da xantiletina e seselina isoladas da raiz de *C. sinensis* e *C. limonia* cultivadas em meio MS basal com 100% de glicose e de um segundo experimento com 75% de glicose-1-[¹³C]. Os resultados demonstraram que a porção isoprênica deriva exclusivamente da via MEP, pois apenas os carbonos C-1 e C-5 da unidade de IPP, tanto para a xantiletina de *C. sinensis* e *C. limonia*, quanto para a seselina de *C. limonia* foram enriquecidos. Através da análise do perfil químico das partes vegetais, observou-se a presença das piranocumarinas somente na raiz de ambas espécies, indicando que a biossíntese das mesmas ocorre nas raízes de citros. Também foi realizada a quantificação de piranocumarinas nas raízes, para determinação de um genótipo que apresentasse maior produção dessa classe de compostos. Ao realizar a quantificação de piranocumarinas em 12 genótipos de *C. sinensis* e de *C. limonia* cultivadas *in vitro* em meio MS basal, observou-se que há uma diminuição significativa na produção destas substâncias entre os genótipos de cada uma das espécies avaliadas e que a concentração destes compostos em *C. limonia* é 158,35% maior que em *C. sinensis*.

Palavras chave: Biossíntese, Piranocumarinas, Xantiletina, Seselina e Citrus.

ABSTRACT

“BIOSYNTHESIS STUDIES OF PYRANOCUMARINS XANTHYLETIN AND SESELIN IN ORANGE PÊRA (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) AND LEMON CRAVO (*Citrus limonia* Osbeck)” The present work describes the study of biosynthesis of pyranocoumarins in *Citrus sinensis* and *Citrus limonia*. Coumarins, like other phenylpropanoids, have biosynthetic origin in *p*-hydroxy cinnamic acid and their great structural diversity is mainly due to the incorporation of prenyl units in the benzene ring. To obtain answers on the prenylation reaction, isotopic labeling experiments were performed to confirm the biosynthesis of pyranocoumarins. To verify if the isopentyl diphosphate (IPP) unit used in the prenylation of umbelliferone in C-6 and C-8, leading to the linear and angular pyranocoumarins respectively, comes from the mevalonate (MEV) pathway via 2-C-methyl-D-erythritol- 4-phosphate (MEP), or mixed route; the biosynthesis of the terpene portion of xanthyletin and seselin was investigated by the incorporation of glucose-1 [¹³C] into *C. sinensis* and *C. limonia*. For the confirmation of the biosynthetic route, the enrichment pattern was determined by comparing the quantitative ¹³C NMR spectra of xanthyletin and seselin isolated from the *C. sinensis* and *C. limonia* root cultured in MS basal medium with 100% glucose and of a second experiment with 75% glucose-1 [¹³C]. The results showed that the isoprene portion derives exclusively from the MEP pathway, because only the C-1 and C-5 carbons of the IPP unit, for both *C. sinensis* and *C. limonia* xanthyletin and *C. limonia* seselin were enriched. By analyzing the chemical profile of the plant parts, the presence of the pyranocoumarins was observed only in the roots of both species, indicating that the biosynthesis of the same occurs in the citrus roots. It was also carried out the quantification of pyranocoumarins in roots, to determine a genotype that presented higher production of this class of compounds. In the quantification of pyranocoumarins in the 12 genotypes of *C. sinensis* and *C. limonia* grown *in vitro* in MS basal medium, it was observed that there is a significant decrease in the production of these substances among the genotypes of each of the evaluated species and that the concentration of these compounds in *C. limonia* is 158,35% higher than in *C. sinensis*.

Key words: Biosynthesis, Pyranocoumarins, Xanthyletin, Seselin and Citrus.

SUMÁRIO

1. Introdução	2
1.1. Origem e Taxonomia do <i>Citrus</i>	2
1.2. A citricultura no Brasil e no mundo.....	3
1.3. Doenças que acometem as culturas de citros.....	4
1.3.1. Clorose Variegada dos Citros	6
1.3.2. O cancro cítrico.....	8
1.4. Quimiosistemática da família Rutaceae	9
1.4.1. Cumarinas.....	10
1.4.2. Pirano e Furanocumarinas e a biossíntese.....	12
1.5. HPLC-SPE-UV-NMR.....	15
1.6. RMN e a Biossíntese	18
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Obtenção das plântulas de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	24
3.2. Obtenção dos Extratos.....	25
3.3. Análise do perfil químico de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	25
3.4. Quantificação de piranocumarinas totais nas raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	26
3.5. Análise de PCR dos genótipos de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	27
3.5.1. Extração de DNA	27
3.5.2. Quantificação do DNA e verificação da qualidade do DNA	28
3.5.3. Análise da reação em cadeia da polimerase – PCR.....	28
3.5.4. Análise dos produtos da PCR por eletroforese.....	30
3.5.5. Preparo das soluções para análise de PCR dos genótipos de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	31
3.6. Experimento de marcação isotópica para análise da raiz de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	32
3.6.1. Análise das raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> para estudo da biossíntese via HPLC-SPE-UV-NMR.....	33
3.6.2. Análise das raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> via UPLC-QToF	35

3.7. Avaliação da atividade biológica das substâncias xantiletina e seselina frente às bactérias fitopatogênicas <i>Xylella fastidiosa</i> e <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> ...	36
3.7.1. Isolamento da xantiletina	36
3.7.2. Isolamento seselina	37
3.7.3. Ensaio antimicrobiano com as substâncias xantiletina e seselina, frente à bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	38
3.7.4. Ensaio antimicrobiano com as substâncias xantiletina e seselina, frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	40
4. Resultados e Discussões	43
4.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	43
4.2. Análise do perfil químico de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	44
4.3. Quantificação de piranocumarinas totais nas raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	50
4.4. Análise de PCR dos genótipos de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	55
4.5. Avaliação da marcação isotópica de piranocumarinas da raiz de laranja Pêra (<i>C. sinensis</i>) e de limão Cravo (<i>C. limonia</i>).	58
4.5.1 Análise das raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> para estudo da biossíntese via HPLC-SPE-UV-NMR	58
4.5.2. Biossíntese da xantiletina em raiz <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	62
4.5.3. Biossíntese da seselina em raiz de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	78
4.5.4. Justificativa das marcações e entendendo a biossíntese das piranocumarinas em <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i>	96
4.6. Análise das raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> via UPLC-QToF	100
4.7. Avaliação da atividade biológica das substâncias xantiletina e seselina frente à bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	107
4.8. Avaliação da atividade biológica das substâncias xantiletina e seselina frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	109
5. Conclusões.....	113
6. Referências Bibliográficas.....	116
7. Apêndice.....	123

Introdução

1. Introdução

1.1. Origem e Taxonomia do *Citrus*

As plantas cítricas são originárias das regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático e ilhas adjacentes. O comércio entre as nações e as guerras ajudaram a expandir o cultivo dos citros, de modo que, na Idade Média, a laranja foi levada pelos árabes para a Europa. Em seguida nos anos de 1500, através das expedições de Cristovão Colombo, mudas de frutas cítricas foram trazidas para o continente americano¹. Introduzida no Brasil provavelmente na Bahia logo no início da colonização, a laranja encontrou no país melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem. Em 1540 já havia relatos de laranjas espalhadas pelo nosso litoral² expandindo-se por todo o território nacional.

O gênero *Citrus* pertence a ordem Rutales, atualmente denominada Sapindales e a família Rutaceae que possui 158 gêneros com mais de 1900 espécies³. Este gênero é o representante mais importante da família Rutaceae e foi classificado por SWINGLE em 1943 *apud*⁴, como sendo pertencente a subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrinae. Em estudos realizados por TANAKA 1977, *apud*⁴, foram definidas 162 espécies como representante do *Citrus* e estudos quimiotaxonômicos indicaram que este gênero compreende apenas quatro espécies selvagens alopátricas conhecidas. Duas espécies tropicais: *C. halimi* B.C Stone (Península Malaia e Borneo) e *C. grandis* Osbeck [= *C. maxima* (Burm.) Merr.] (Toranja, do sudeste da Ásia) e duas subtropicais: *C. medica* L. (cidra) e *C. reticulata* Blanco (tangerina, mandarim). Os demais representantes desse grupo são tidos como híbridos naturais⁴.

Atualmente, a maioria das espécies de *Citrus* tem sido considerada como resultado de hibridização natural. A espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck que representa as laranjas doces, predomina na maioria dos países citrícolas. Sua origem é proposta por SWINGLE & REECE, 1967 *apud*⁴, como sendo proveniente do cruzamento de *C. grandis* x *C. reticulata*. Os dados citoplasmáticos sugerem a contribuição materna de *C. grandis* na formação de *C. sinensis*. Já a espécie *Citrus limonia* Osbeck possui três tipos de cruzamentos propostos entre *C. medica* x *C. lima* x espécie não idetificada, *C. medica* x lima e *C. medica* x limão rugoso⁴.

1.2. A citricultura no Brasil e no mundo

Os mais importantes países produtores de frutas cítricas são o Brasil, responsável por cerca de 24% da produção mundial, China também com 24% seguida pelos Estados Unidos com 11%. O Brasil aparece em primeiro novamente, como sendo um dos maiores produtores de laranja no mundo (29%), seguido pelos Estados Unidos (11%), Índia e China com cerca de 8% cada⁵.

O Brasil, desde a década de 80, é detentor do título de um dos maiores produtores mundial de citros. O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% do que produz e consegue incríveis 85% de participação no mercado mundial⁶. Estimativas apresentadas pela Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR) realizada pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), a safra 2015/2016 foi finalizada em 300.650.000 caixas de 40,8 quilos em todo o cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro. Desse total 261.586.000 caixas foram destinadas ao processamento para produção de suco, sendo, portanto, 39.064.000 caixas pertencentes ao mercado interno de frutas *in natura*. Os dados apontam uma média de volume de vendas na faixa de 1,0 milhão de toneladas (300 milhões de caixas de 40,8 quilos de laranja) nos últimos 10 anos⁷. Estima-se que a safra 2016/2017 será 18,3% menor em relação à safra 2015/2016. Embora o número de árvores produtivas seja 0,8% maior se comparado ao período anterior, o número de frutos por árvore apresenta uma diminuição de 13,7%. Dessa forma, segundo é apresentado pela instituição, espera-se uma queda na produção de caixas por hectare de 14,8%⁷.

A cultura dos citros atualmente encontra-se disseminada em todo território nacional, e com grande importância econômica e social para vários estados como São Paulo que é maior produtor nacional, responsável por 74% da produção, seguido pela Bahia com 5,66%, Minas Gerais 5,09%, Sergipe 3,56%, Rio de Janeiro 3,46%, dentre outros. As maiores plantações são de laranja Pêra (*Citrus sinensis*), tangerina (*C. reticulata*), toranja (*C. paradisi*) e o limão Cravo (*C. limonia*). E as menores plantações são de lima (*C. aurantifolia*) e cidra (*C. medica*)².

A maioria das laranjas e tangerinas de melhores qualidade são obtidas de enxertos das mesmas sobre o limão Cravo o qual é conhecido também pelos nomes de Rosa, Selvagem, Vinagre, Vermelho, Limpa-tacho e Bugre. O limão Cravo segundo SWINGLE em 1948 *apud*⁴, é um híbrido natural de limão (*C. limon*) e uma

tangerina (*C. reticulata*), originário na região de Canton no sul da China. O emprego deste como porta-enxerto, recebe um grande incentivo pois apresenta algumas vantagens tais como resistência ao vírus da tristeza dos citros, à seca e ao frio, facilidade de obtenção de sementes, precocidade no início de produção, compatibilidade com todas as cultivares copas e aumento da produtividade, além de obter-se mudas praticamente idênticas à planta-mãe e uniformidade destas, uma vez que os porta-enxertos são poliembriônicos⁴.

Sendo assim, o limão Cravo é o principal porta-enxerto sobre o qual a citricultura brasileira foi constituída, estando presente na maioria dos enxertos plantas cítricas. Outros porta-enxertos como tangerina Cleópatra, Sunki e o *trifoliata* também são utilizados, permitindo a obtenção de frutos de boa qualidade e maturação mais tardia, resistência ao ataque de patógenos e resistência da planta a estresses bióticos e abióticos, resultando em aumento significativo na produção, trazendo grandes benefícios aos produtores⁸.

A laranja Pêra é a principal variedade de citros do país, pois seus frutos apresentam excelente qualidade. O seu cultivo consiste em cerca de 38% em relação ao número total existente para laranjas doces. Essa participação já atingiu índices maiores, superando 50%. A provável explicação para esse menor interesse pela Pêra está na hipótese de que a mesma é uma variedade de laranja que mais apresenta surtos vegetativos, sendo conseqüentemente muito perseguida por cigarrinhas transmissoras da clorose variegada dos citros (CVC). Entretanto, a espécimen de laranja Pêra enxertada sobre o limão cravo ainda é uma das plantas mais utilizada na citricultura brasileira nos últimos anos⁴.

1.3. Doenças que acometem as culturas de citros

Os citros estão sujeitos a problemas sanitários através do ataque de diversos patógenos acarretando uma série de doenças, sendo estes considerados como fatores limitantes para o cultivo⁴. Além de perdas na produção, tais fatores causam diminuição da qualidade do fruto e até destruição de pomares inteiros. A doença que acomete a cultura é definida como um distúrbio fisiológico, resultado de uma irritação contínua causada por agentes bióticos ou abióticos. Dentre estes destaca-se os agentes bióticos, que podem ser fungos e bactérias, além dos vírus, viroides e nematoides⁹.

As plantas cítricas podem ser atacadas por insetos que são vetores de uma série de doenças danosas a cultura de citros, tais como ácaros, cochonilhas, coleobrocas (besouros que perfuram tronco e ramos), pulgões, moscas-das-frutas, lagartas, cochonilhas, formigas e cigarrinhas⁹. Estes são vetores de doenças comuns a citricultura, causadas por:

- Vírus: tristeza dos citros, morte súbita dos citros, leprose dos citros, sorose e xiloprose
- Fungos: verrugose, gomose, melanose, rubelose, mancha preta e podridão de *Alternaria alternata*.
- Bactérias: cancro cítrico, clorose variegada dos citros (CVC) e huanglongbing (HLB).

A Figura 1.3.1. mostra uma linha do tempo, constando as principais doenças que atacam a cultura com informações sobre os primeiros casos no Brasil, os danos, os vetores e patógenos causais. Acredita-se que numerosas doenças têm atacado as plantas cítricas já na sua região de origem e que a sua ocorrência generalizada é a consequência humana das viagens internacionais e do comércio. Muitas das doenças têm sido qualificadas como devastadoras. Isso não é exagero, considerando que algumas delas quase causaram a destruição da indústria cítrica, em alguma parte do mundo, em um momento ou outro².

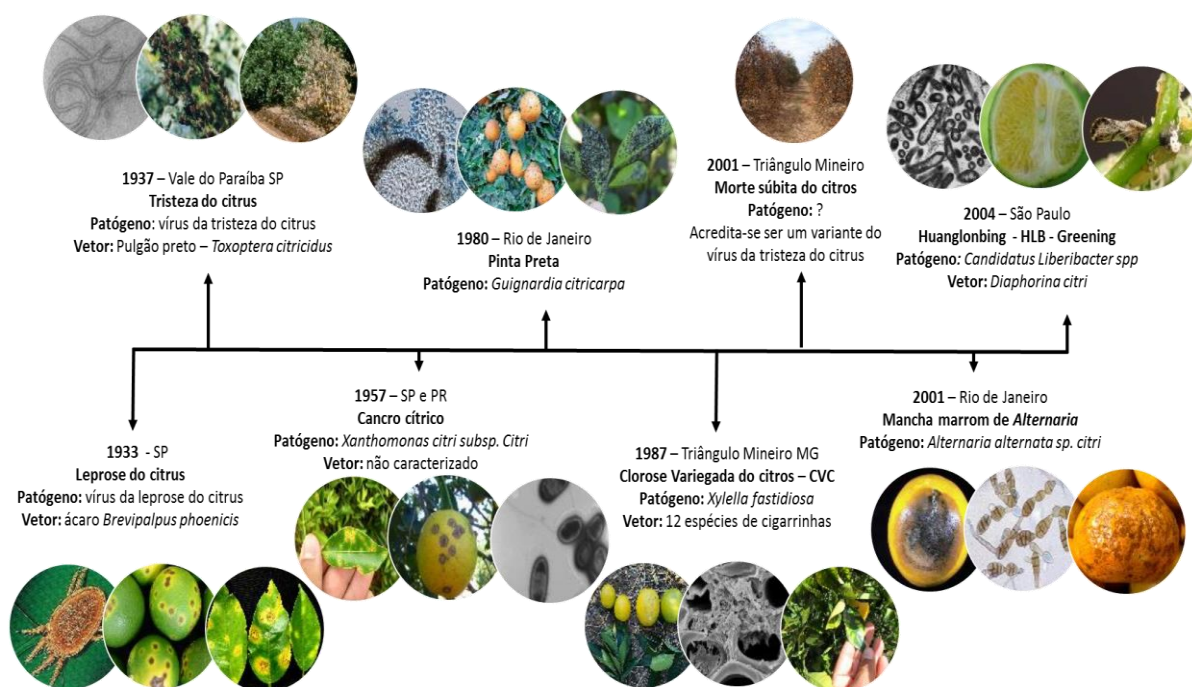


FIGURA 1.3.1. Histórico de surtos das principais doenças de citros no Brasil.

Para o controle fitossanitário de doenças que atacam a citricultura, o uso de pesticidas contribui para o aumento da produtividade agrícola, mas também tem sido responsável por efeitos adversos sobre o meio ambiente e a saúde humana¹⁰. Atualmente, com o avanço da agricultura de base agroecológica, novas medidas para o controle de pragas e doenças vêm apresentando destaque, tal como a busca de plantas e porta enxertos que possuam resistência e sejam, portanto, menos suscetíveis ao ataque de patógenos⁴. Além disso, faz-se necessário avaliar o perfil químico de plantas doentes x plantas saudáveis e detectar possíveis metabólitos que sejam responsivos à infecção. Esse conhecimento aliado à estudos biossintéticos, metabolômicos, proteômicos e à engenharia genética, possibilita realizar o melhoramento genético, a obtenção de plantas mais resistentes frente às doenças que acometem a cultura¹⁰.

1.3.1. Clorose Variegada dos Citros

A Clorose Variegada do Citros (CVC) ou Amarelinho como é popularmente chamada, já foi considerada uma das mais sérias doenças, causadora de prejuízos na citricultura brasileira. A doença foi nomeada por causa da aparência clorótica da árvore, assemelhando-se a uma deficiência do zinco¹¹. Foi identificada pela primeira vez no ano de 1987 em pomares do norte e nordeste de São Paulo e também no triângulo mineiro⁴. A CVC, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é uma doença bacteriana transmitida por enxertos e cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae. Há pouca informação sobre cultivares de laranja doce tolerantes a CVC (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)¹².

A bactéria coloniza os vasos do xilema e interrompe o transporte de água e nutrientes do sistema radicular para o dossel levando a uma notável redução da taxa de transpiração e fotossíntese em folhas devido a alterações fisiológicas. A diminuição da assimilação de CO₂, da condutância estomática, da transpiração e do fluxo de seiva também já foi observado. Tais sintomas da CVC estão diretamente relacionados ao estresse hídrico, que é o mecanismo mais aceito de patogenicidade causado pela obstrução do xilema por agregados bacterianos, gomas e tiloses¹². Os sintomas em laranja doce incluem manchas amarela nas folhas, com lesões distintas na superfície adaxial da folha. Em folhas mais velhas, essas lesões se estendem através da folha para formar bolhas gomosas semelhantes às lesões na superfície

abaxial¹³. Em árvores severamente afetadas, os entrenós são marcadamente encurtados, e as folhas são anormalmente pequenas. Além disso, os frutos são severamente prejudicados, permanecendo pequenos e duros na época da colheita^{12,13}.

Quanto à suscetibilidade ao CVC, todos os cultivares de laranjeira doce avaliadas até o momento foram susceptíveis em maior ou menor extensão. Por outro lado, plantas de outras espécies cítricas e outros gêneros relacionados, como *Fortunella* spp. e *Poncirus trifoliata*, não apresentaram sintomas ou não apresentaram a presença bacteriana em condições naturais. Existem algumas diferenças entre cultivares de laranjeira doce em termos de expressão de sintomas. As laranjas Valência, Pêra e Barão são consideradas as variedades mais suscetíveis, enquanto as laranjas Rubi, Westin e Ovale mostraram-se menos sintomáticas⁴.

Vários estudos têm tentado elucidar as alterações químicas causadas por CVC. A concentração de metabólitos secundários pode diferir em árvores doentes, como mostrado em alguns estudos. Foi relatado por RIBEIRO et al., 2008, que a concentração do flavonoide hesperidina, aumenta nas células de mesófilos foliares de árvores afetadas e de uma piranocumarina linear nas raízes de *C. limonia*¹⁴. Outros metabólitos secundários também sugerem infecção por CVC, como as fitoalexinas e fitoanticipinas que são substâncias antimicrobianas que se acumulam após a infecção por patógenos. Estudos de microscopia eletrônica de varredura em folhas com sintomas de CVC realizado por SOARES et al., 2015, mostraram oclusão de vasos por biofilme e observou-se um material cristalizado. Os tecidos de *C. sinensis*, *C. limonia* e o enxerto de *C. limonia* x *C. sinensis*, foram analisados via espectrometria de massas por imagem (MALDI-MSI) para confirmar a presença de hesperidina no local da infecção. As imagens construídas a partir de dados de MS/MS com um íon de fragmento diagnóstico específico (m/z 483) mostraram intensidades iônicas mais elevadas para este em plantas infectadas do que em amostras saudáveis, principalmente nas regiões dos vasos vasculares. Isso sugere que a hesperidina desempenha um papel na interação planta-patógeno, provavelmente como uma fitoanticipina¹⁵.

A *X. fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa limitada ao xilema de uma ampla variedade de plantas perenes e é responsável por perdas significativas na cultura de citros. As perdas econômicas para a citricultura paulista já foram estimada

em US\$ 286 - 322 milhões por ano¹⁶. Por muitos anos a CVC causou danos nas principais regiões produtoras de laranja do Brasil, localizadas no Estado de São Paulo. No entanto, a adoção em larga escala de medidas realizadas pelos citricultores, como o plantio de mudas sadias, eliminação de plantas doentes entre outras melhorias, levou à queda na incidência de plantas doentes de 38% em 2012, para 7% em 2015 e 3% em 2016¹⁷. A bactéria foi isolada pela primeira vez a partir de videiras afetadas pela doença de Pierce (PD) na Califórnia e foi identificada pela primeira vez como agente causal do CVC em 1991¹⁸. Até meados de 2013, culturas puras da *X. fastidiosa* foram obtidas a partir de mais de 20 espécies de árvores frutíferas, ornamentais e florestais nos EUA¹⁸.

A ação da bactéria *X. fastidiosa* consiste na obstrução vascular direta por compostos de alto peso molecular e/ou como um composto químico perturbando o metabolismo foliar, causando necrose marginal da folha¹⁹. A bactéria é capaz de crescer formando um biofilme, e isso é um fator importante para a sua patogenicidade¹⁹.

1.3.2. O cancro cítrico

O cancro cítrico é causado por *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* (*X. citri*), que é a doença bacteriana mais adversa e extensa que afeta as culturas de citros. A mais antiga constatação da doença foi feita em 1933 em folhas herbarizadas de *C. medica* L. coletadas na Índia entre 1827 e 1831. A doença é originária da Ásia, ocorrendo de forma endêmica em todos os países produtores. No Brasil, sua primeira constatação deu-se no município paulista de Presidente Prudente em 1957⁴.

Os sintomas típicos da doença são manchas e lesões necróticas em frutos, caules e folhas. A desfolhagem, a deterioração do galho e a queda precoce do fruto são os principais danos da doença, diminuindo a qualidade e a produtividade dos frutos²⁰. É uma doença devastadora de pomares, economicamente representativa e acomete várias espécies cítricas, tais como a lima, a laranja, o limão, o pomelo, etc²¹. Atualmente a doença é reconhecida por pelo menos 4 tipos distintos: o câncer asiático cancrose A, cancrose B, cancrose da lima mexicana e de *Citrus* bacteriose). Entre estes tipos, o câncer asiático (cancrose A) é o mais destrutivo para os principais cultivares de plantas cítricas²¹.

Além da erradicação de plantas contaminadas, muitas substâncias químicas são utilizadas e novos produtos estão sendo desenvolvidos continuamente para evitar a doença. Os produtos contendo cobre oferecem alguma proteção juntamente com antibióticos de campo, especialmente a estreptomicina, sendo estes utilizados como agentes preventivos em cultivos alimentares²¹. As aplicações curativas de pesticidas baseados em produtos químicos reduzem a proliferação bacteriana ou a propagação da bactéria, no entanto, atualmente não há cura para casos da doença que já progrediu. Além disso, o uso de agroquímicos para a prevenção do cancro cítrico embora possam reduzir as perdas causadas pela doença, são de alto custo e seu uso prolongado pode levar à resistência a patógenos, à poluição do solo e tem efeitos nocivos para a saúde humana^{21,22}. Assim, tais medidas não podem ser usadas permanentemente, necessitando da utilização de novas abordagens, como o desenvolvimento de antibióticos não nocivos ao homem e ao meio ambiente e que sejam eficazes, impedindo o cancro cítrico generalizado²². Além disso outras medidas, tais como o uso de técnicas biológicas e a engenharia genética, que vem se tornando uma estratégia importante e promissora na proteção das culturas contra insetos-praga e agentes patogênicos.

As chuvas e o vento durante todo o período de crescimento das hastes e frutos são os principais fatores ecológicos que agravam a infecção causada pela *X. citri*. Após a dispersão, a bactéria cresce epifiticamente sobre a superfície foliar formando uma estrutura de biofilme para obter condições ambientais mais favoráveis para o crescimento e sobrevivência antes de entrar nos tecidos²⁰. A formação de biofilmes tem sido correlacionada com a virulência de *X. citri* e desenvolvimento de cancro cítrico. Além disso, a interferência na formação de biofilmes tem sido associada à resistência ao cancro nas plantas cítricas²⁰.

1.4. Quimiosistemática da família Rutaceae

A quimiosistemática inclui a química como parte da história natural da planta com referência à sua relação com outras similares e sua interação com seu ambiente, tanto vivo como não vivo, fundindo-se a fitoquímica²³. Avanços em instrumentação analítica, em particular a cromatografia, seguida de métodos de detecção eletrônicos, aceleraram esses estudos, culminando no perfil metabólico. A enorme variedade de constituintes químicos isolados de plantas combinadas com os

dados morfológicos e citológicos assumem o seu lugar como parte da história natural geral do organismo em seu ambiente²³.

Desde os dias pioneiros da química que envolve metabolismo secundário de plantas, a família Rutaceae têm recebido muita atenção. Esta família é relativamente bem estudada e bem conhecida por sua alta diversidade de metabólitos secundários. A quimiosistemática desta família foi revisada por SILVA et al., 1988, sugerindo uma taxonomia mais natural e uma interpretação evolutiva da família; mostrando que a mesma se baseia principalmente em alcaloides derivados do ácido antranílico, cumarinas, lignanas, flavonoides e limonoides²⁴. O gênero *Citrus* é o representante comercial mais importante da família Rutaceae e seu perfil químico é caracterizado pela presença de cumarinas, limonoides, flavonoides e demonstra escassez em quantidade e diversidade de alcaloides derivados do ácido antranílico¹⁴.

1.4.1. Cumarinas

As cumarinas são compostos importantes que contribuem para a adaptação das plantas aos estresses bióticos ou abióticos. São uma classe de metabólitos secundários que estão distribuídas por todas as espécies de *Citrus*²⁵. Essas substâncias já foram relatadas na literatura apresentando atividade anti-inflamatória, efeito analgésico²⁶, atividade fungicida²⁷, potencial efeito inibidor da colinesterase (ChE)²⁸ e da enzima acetilcolinesterase (AChE), sendo consideradas um importante alvo para o tratamento da doença de Alzheimer²⁹. As cumarinas naturais, encontradas nos citrinos, possuem uma gama de atividades anticarcinogênicas³⁰, efeitos neuroprotetores³¹ e se apresentam como fitoalexinas associadas à resistência dos citros aos patógenos *Penicillium digitatum* e *Phytophthora citrophthora*^{32,33}.

As cumarinas são compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico, constituídas por anéis de benzeno e α -pirona fundidos. São derivadas da via dos fenilpropanoides/chiquimato em plantas e pertencem à categoria de benzo- α -pirona, enquanto os flavonoides pertencem à benzo- γ -pirona. São relatados quatro subtipos de cumarinas, que incluem cumarinas simples (hidroxiladas, alcoxiladas, alquiladas e suas formas glicosídicas), furanocumarinas (anel cumarina ligado a anel furano),

piranocumarina (anel cumarina ligado a anel pirona) e pirona substituídas (substituição no anel de pirona em C-3 ou C-4)³⁴.

Entre as cumarinas, a umbeliferona ocupa uma posição central na biossíntese de outros esqueletos desta classe. Estudos indicam que umbeliferona se forma a partir da 2'-hidroxilação do ácido *p*-cumárico, via uma etapa bioquímica desconhecida obtendo-se o ácido 2',4'-di-hidroxicinâmico, o qual se lactoniza espontaneamente. Com base em uma publicação recente de um gene que codifica uma 2-oxoglutarato-dependente dioxigenase de *Arabidopsis thaliana*, a qual exibiu atividade a feruloil-CoA 6'-hidroxilase, VIALART et al., 2012 combinaram uma abordagem de bioinformática com um rastreamento de biblioteca de cDNA e identificaram um gene ortólogo ORF (Genbank, JF799117) em *Ruta graveolens* L. (Rutaceae)^{35,36}. Esta ORF mostrou 59% de identidade dos aminoácidos com feruloil-CoA 6'-hidroxilase, e foi funcionalmente expressa em *Escherichia coli*, convertendo feruloil-CoA em escopoletina e *p*-coumaroil-CoA em umbeliferona com atividade equivalente (Figura 1.4.1.1).

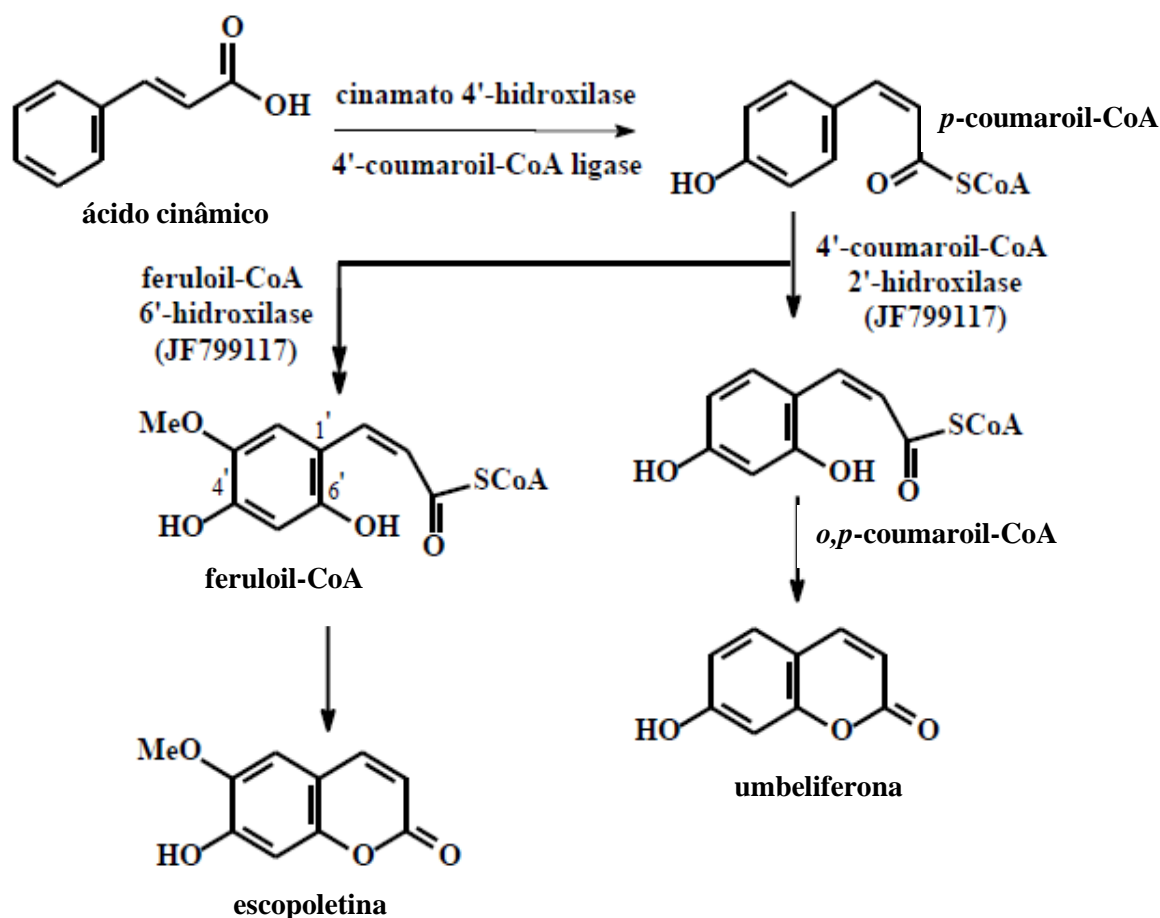


FIGURA 1.4.1.1. Biossíntese das cumarinas umbeliferona e escopoletina, adaptado de VIALART et al., 2012³⁶.

Essa bi-funcionalidade do gene, foi confirmada por expressão transiente de JF799117 em *Nicotiana benthamiana*, a qual produziu plantas com folhas contendo altos níveis de umbeliferona e escopoletina em comparação com plantas controle, as quais continham apenas traços desses compostos³⁶. Portanto, JF799117 codifica uma 4'-coumaroil-CoA 2'-hidroxilase em *R. graveolens*, o que representou um passo não caracterizado anteriormente na biossíntese de umbeliferona em plantas³⁶.

1.4.2. Pirano e Furanocumarinas e a biossíntese

A grande diversidade estrutural das cumarinas é devido principalmente a incorporação de unidades prenila. A prenilação da umbeliferona em C-6 leva a formação de Pirano e Furanocumarinas lineares e em C-8 à formação de Pirano e Furano cumarinas angulares³⁷, que constituem uma classe de compostos fenólicos secundários e são um sub-grupo de mais de 1500 cumarinas naturais, essencialmente encontradas em quatro famílias de plantas superiores: Apiaceae, Rutaceae, Fabaceae e Moraceae^{35,36}.

As reações de prenilação são mediadas por preniltransferases. Estas enzimas além de catalisarem a condensação de unidades isoprênicas, também catalisam a adição de grupamentos isoprênicos sobre esqueletos carbônicos, como o que ocorre na formação das pirano e furanocumarinas, ao ser incorporado ao esqueleto cumarínico uma unidade prenila³⁷. Essas reações possuem como precursor o difosfato de isopentila (IPP), que em plantas, é sintetizado através de duas vias diferentes: a do mevalonato (MVA) e da triose-piruvato (MEP)³⁷.

Há dois tipos de furanocumarinas derivadas de duas vias biossintéticas paralelas: linear (derivadas de psoraleno) e angular (derivadas de angelicina). A literatura possui dados que permitem sugerir que estas duas vias surgiram como o resultado da coevolução geral entre plantas e insetos³⁸. Entre esses dados a interação entre a larva da borboleta *Depressaria pastinacella* e a planta *Pastinaca sativa* (Apiaceae) mostra que, embora furanocumarinas lineares sejam mais tóxicas do que as angulares, derivados desta última exibem um efeito sinérgico sobre as primeiras, tornando a mistura mais difícil para o inseto se desintoxicar³⁸. A hipótese é de que furanocumarinas angulares apareceram mais tarde do que as lineares durante a evolução das plantas, ou seja, somente após o inseto desenvolver

mecanismos para se desintoxicar das estruturas lineares. Esta hipótese é consistente com a observação de que furanocumarinas angulares são sempre encontradas concomitantemente com estruturas lineares no reino vegetal, enquanto que tipos lineares podem ocorrer isoladamente^{39,35}.

Durante os últimos anos, muitas enzimas envolvidas na biossíntese das furanocumarinas têm sido descritas ao nível molecular, incluindo duas P450 (psoraleno sintase e angelicina sintase)^{40,41} bergaptol O-metiltransferase⁴², e uma dioxigenase Fe/oxoglutarato-dependente de 4'-coumaroil CoA (C2'H) que produz umbeliferona, o precursor de cumarinas³⁶, a qual foi citada no item anterior (Figura 1.4.1.1). No entanto, a enzima envolvida no passo principal da biossíntese das furanocumarinas permanecia desconhecida, ou seja, aquela que catalisa a prenilação de umbeliferona levando a demetilsuberosina ou ostenol. Este passo enzimático é importante por duas razões. Em primeiro lugar, a via da umbeliferona a furanocumarinas é restrita a um pequeno número de plantas superiores, sugerindo uma distribuição limitada de preniltransferase (PT). Em segundo lugar, a prenilação de umbelliferone em C-6 ou C-8 é necessário para levar às furanocumarinas lineares ou angulares^{43,44}, através dos intermediários chaves demetilsuberosina ou ostenol, respectivamente.

O isolamento e a identificação de uma preniltransferase foram feitos na década de 1970⁴³, no entanto, até recentemente, o gene responsável pela prenilação de umbeliferona não foi identificado. KARAMAT 2014 e colaboradores recentemente identificaram uma PT ligada a membrana (*PcPT*) na salsa (*Petroselinum crispum*) e caracterizaram as propriedades do gene que codifica a sua produção⁴⁴. Para isolar o primeiro gene envolvido na síntese de PT de cumarinas, os autores desenvolveram primers degenerados baseando-se nos aminoácidos conservados em outras PTs aromáticas. Usando estes primers, uma estratégia baseada em PCR foi utilizada para clonar uma PT cDNA das folhas de *P. crispum*, a qual foi nomeado *PcPT* (Genbank número de acesso AB825956). A expressão do gene da *PcPT* foi encontrada em toda a planta de *P. crispum*, e foi aumentada por irradiação UV, com um concomitante aumento na produção de furanocumarinas. A localização sub-celular do gene *PcPT* foi demonstrada estar nos plastídios. A caracterização funcional do gene da *PcPT* em um sistema de expressão transiente com *Nicotiana benthamiana* mostrou que *PcPT* apresenta: (i) atividade de prenilação para umbelliferona com forte especificidade para o difosfato de dimetilalila (DMAPP)

como um doador de prenila, (ii) a atividade dominante na prenilação de umbeliferona em C-6 levando a demetilsuberosina, e (iii) menor atividade em C-8 de umbeliferona levando a ostenol⁴⁴ (Figura 1.4.2.1).

A proteína PcPT de *P. crispum* foi encontrada nos plastídios da planta, onde é utilizado DMAPP derivado de 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato, ou seja, o caminho MEP. Estes dados são consistentes com os experimentos com deoxi-D-xilulose marcada com deutério em *Apium graveolens*, os quais mostraram que DMAPP envolvido na biossíntese de furanocumarina era derivado do caminho MEP⁴⁵.

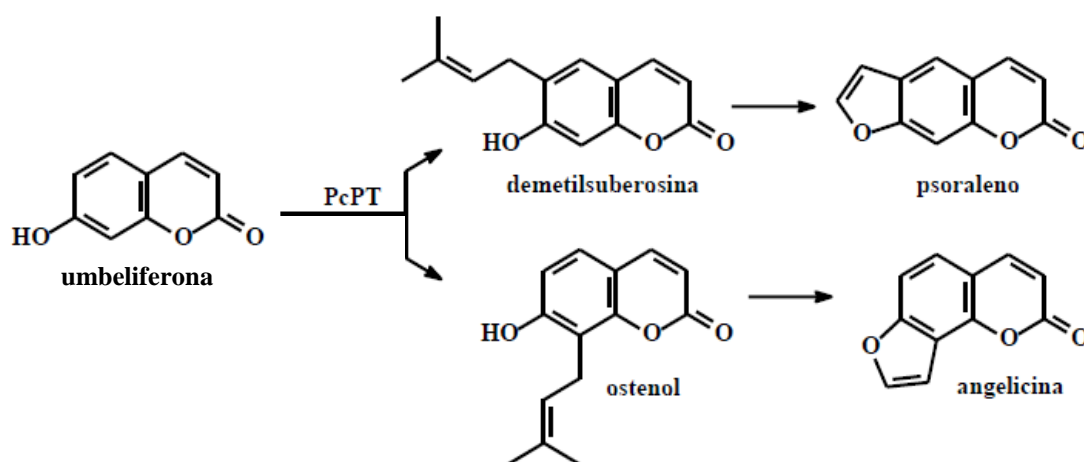


FIGURA 1.4.2.1. Prenilação de umbeliferona pela enzima PcPT de *P. crispum*, adaptado de KARAMAT et al., 2014⁴⁴.

As piranocumarinas, como a xantiletina e seselina, são descritas principalmente em Rutaceae e Apiaceae e são consideradas os principais metabólitos de *Petroselinum crispum* e *Ammi visnaga*⁴⁶. Além disso, as cumarinas preniladas foram isoladas de várias plantas, em particular, de espécies de Rutaceae⁴⁶ e estão largamente distribuídas em todas as espécies do gênero *Citrus*. As piranocumarinas também existem como lineares e angulares (Figura 1.4.2.2), assim como as furanocumarinas. As piranocumarinas possuem um importante papel no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos⁴⁷, apresentam-se como inibidoras do fungo simbiótico das formigas⁴⁸ além de possuir atividade antinociceptiva⁴⁹ e anti-HIV^{50,51}.

A biossíntese de piranocumarinas ainda não foi investigada ao nível da formação do anel pirano³⁵. PARK et al., 2010, apenas clonaram e caracterizaram as enzimas fenilalanina amônia-liase e cinamato 4-hidroxilase envolvidas na formação da umbeliferona para biossíntese de piranocumarinas em *Angelica gigas*

(Apiaceae)⁵². Entretanto, enzimas que catalizam a formação das piranocumarinas xantiletina e seselina a partir da umbeliferona ainda não foram isoladas e caracterizadas. Outro fato relevante que justifica o desenvolvimento do presente trabalho é que até o momento, além de não ter as enzimas envolvidas na formação do anel pirano caracterizadas, a origem da unidade de IPP para as piranocumarinas angulares e lineares em nenhuma espécie de planta ou micro-organismo foi determinada.

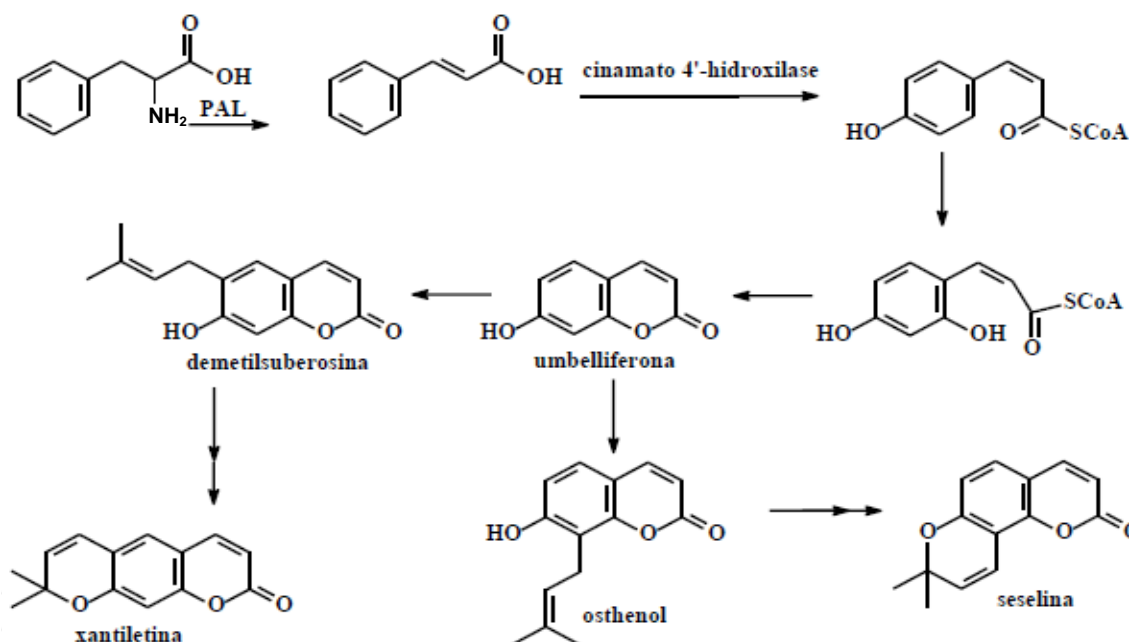


FIGURA 1.4.2.2. Proposta biogênica para piranocumarinas.

1.5. HPLC-SPE-UV-NMR

Durante as últimas décadas, uma atenção considerável tem sido voltada para o desenvolvimento de separações à base de HPLC combinado ao equipamento de RMN. A ressonância magnética nuclear é uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas, uma vez que este é capaz de fornecer grande quantidade de informação estrutural de uma molécula, por ser uma técnica não destrutiva. A hifenização de HPLC com espectroscopia de RMN provou ser uma poderosa ferramenta analítica que pode ser usada na elucidação de compostos de misturas complexas, possibilitando a determinação estrutural de novos produtos naturais diretamente a partir de extratos brutos, diminuindo grandemente a necessidade de isolar e purificar compostos individuais^{53,54}. Com a hifenação, o

manuseamento da amostra é minimizado. Isto significa que após a injeção da mistura, os compostos separados são transferidos para o RMN sem acesso de ar ou luz e sem qualquer manipulação manual da amostra.

A primeira experiência de HPLC-RMN foi publicada por WATANABLE e NIKI em 1978, apresentando resultados com pausa de fluxo acoplado a um sistema de RMN de 60 MHz. O primeiro experimento de fluxo contínuo foi publicado por BAYER et al., em 1979 usando um espectrômetro de RMN de 90 MHz. É uma técnica utilizada em muitos campos diferentes. A maioria das publicações está em aplicações farmacêuticas, produtos naturais, metabolismo e descoberta de novos fármacos, produtos de degradação e caracterização de impurezas são de interesse principal⁵⁵.

Utiliza-se normalmente duas técnicas diferentes de interfaceamento entre HPLC e RMN: o modo de “fluxo contínuo” (do inglês “on flow”) e o modo de “fluxo interrompido” (do inglês “stoped flow”)⁵⁶. Os modos de hifenação e as configurações de interfaceamento de HPLC – NMR podem ser visualizados abaixo na FIGURA 1.5.1.

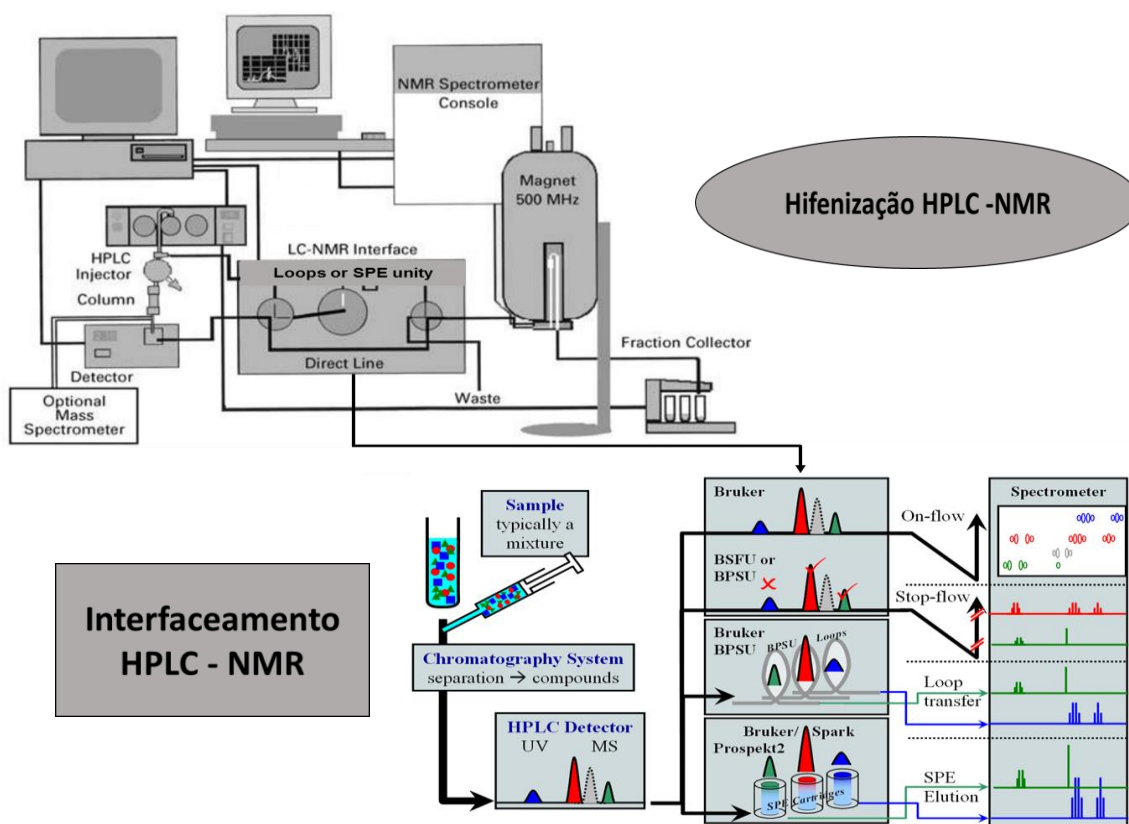


FIGURA 1.5.1. Configuração esquemática de LC-NMR e esquema dos diferentes tipos de acoplamento com a resolução dos seus respectivos espectros. Adaptado de <https://www.bruker.com/products/mr/nmr/hyphenation/lc-nmr/overview.html> e de⁵⁶.

No primeiro modo, o de “fluxo contínuo”, a amostra é transferida para a sonda de RMN durante a separação cromatográfica (continuamente, enquanto a separação cromatográfica está em andamento) e o espectro é então adquirido. No segundo modo, de “fluxo interrompido”, tanto a HPLC como a RMN são iniciadas em conjunto. No entanto, o RMN não adquire os dados imediatamente. Assim que o sinal de interesse for detectado pelo detector de HPLC, o fluxo é parado e a RMN será iniciada para adquirir dados. Neste caso podem ser realizados experimentos unidimensionais e bidimensionais com supressão de solventes. Após a conclusão dos experimentos de RMN do primeiro pico detectado o fluxo é retomado automaticamente até a detecção do próximo pico de interesse. Quando a próxima banda de interesse adentra a sonda de RMN, a corrida cromatográfica é pausada novamente para a aquisição dos espectros de interesse referente a outra banda⁵⁵.

A principal desvantagem do modo “fluxo contínuo” é o pequeno tempo de análise disponível, sendo permitida a aquisição de espectros de RMN com poucos scans, somente de ^1H . Já no modo “fluxo interrompido”, como a corrida cromatográfica é interrompida, a banda cromatográfica pode permanecer dentro da sonda de RMN por tempo indeterminado, sendo possível obter espectros com maior número de pulsos e também experimentos bidimensionais. A desvantagem dessa técnica é que, como a corrida cromatográfica é interrompida, pode haver alargamento das demais bandas da amostra, dificultando a análises dos compostos posteriores⁵⁷.

Para solucionar os problemas citados acima, têm-se desenvolvido o acoplamento envolvendo o HPLC, com a técnica “loop storage” e também a extração em fase sólida (SPE, do inglês “Solid Phase Extraction”), onde nestes arranjos as diferentes bandas cromatográficas são “trapeadas” ou “aprisionadas”, para análise posterior. Na técnica denominada “loop storage” (armazenamento em loop) os compostos de interesse são aprisionados em “loops” separadamente durante a corrida, onde somente após o final da separação cromatográfica é que são transferidas para o RMN. Dessa maneira elimina-se o problema de alargamento de bandas. Esta experiência permite o fracionamento de picos individuais através da coleta em loops. A coleta pode ser realizada automaticamente e funcionaria similarmente detecção em fluxo interrompido. Sempre que o detector de HPLC detectar um pico, uma fração será recolhida dentro de um determinado ciclo, porém a corrida não é pausada⁵⁵.

Um procedimento mais moderno é a técnica de SPE (extração em fase sólida), onde as bandas são aprisionadas em cartuchos de SPE. Esta técnica surgiu em 1999 e sua principal vantagem consiste na melhora da sensibilidade ao permitir que o isolado seja concentrado através da realização de várias corridas cromatográficas consecutivas. Isto fornece material suficiente para experimentos mais exigentes ou a detecção de compostos com baixa concentração na amostra. O cartucho de SPE absorve o pico desejado e depois da amostra ser seca com N₂ gasoso o conteúdo é finalmente eluído do cartucho para a sonda de RMN. A outra vantagem é a minimização de custos, visto que somente as bandas trapeadas nos cartuchos SPE é que são eluídas com solventes deuterados, sendo assim o sistema do HPLC pode funcionar com solventes normais e somente no ato da transferência dos analitos trapeados dos cartuchos para o magneto é que se utiliza solventes deuterados^{53,58}.

1.6. RMN e a Biossíntese

O estudo para a determinação de rotas biossintéticas de metabólitos secundários está associado ao fato de que quando uma substância com alguma atividade biológica e de interesse farmacológico é isolada, muitas vezes é necessário otimizar a produção desses metabólitos. Para tanto é importante conhecer as enzimas envolvidas na biossíntese, além de conhecer seu mecanismo de ação, seus ativadores e inibidores. Os estudos de marcação isotópica são de grande importância, uma vez que permitem a determinação da via operante, além de predizerem as principais organelas ou compartimentos envolvidos na biossíntese dos metabólitos considerados⁵⁹.

A via do Chiquimato existe em plantas, algas, fungos e bactérias. É composto por sete reações enzimáticas que combinam os intermediários fosfoenolpiruvato (PEP) e D-eritrose 4-fosfato (E4P) para formar o corismato (CHR). Um papel essencial da via do Chiquimato para o metabolismo celular é o fornecimento de precursores para a biossíntese de aminoácidos aromáticos, incluindo fenilalanina, tirosina e triptofano. Nas plantas, esta via é também a fonte de material para a produção de metabólitos secundários da classe dos alcaloides, flavonoides e cumarinas⁶⁰.

Inicialmente o ácido mevalônico era conhecido como o único precursor responsável pela biossíntese universal que levava à formação das unidades de

IPP⁶¹ e posteriormente foi verificado que outra via também estava envolvida na formação de unidades terpênicas, denominada de via alternativa (via independente do mevalonato) ou via 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (triose/piruvato)⁶². O primeiro estudo que mostrou a atuação das duas rotas MVA e MEP foi realizado com os sesquiterpenos das flores da camomila, *Matricaria recutita* (Asteraceae)⁶¹. As principais vias isoprênicas em plantas, são do mevalonato (MVA) e da triose-piruvato/2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) e estão compartimentalizadas no citosol e plastídio, respetivamente. A via do mevalonato de citoplasma (MVA) começa com a condensação de três unidades de acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) conduzindo à IPP. Os isoprenoides plastídicos são derivados de IPP que são sintetizados pela via 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). Esta via envolve a formação de vários passos reacionais até a formação de 2-C-metil-D-eritritol que é convertido em uma mistura de IPP e dimetilalil difosfato (DMAPP)⁶³.

A investigação da biossíntese que leva à formação das unidades de IPP é feita através de incorporação de 1-¹³C-D-glicose. Dependendo da via de metabolização envolvida, a marcação dos carbonos das unidades isoprênicas será diferenciada. Para a confirmação da via é necessário observar o padrão de enriquecimento por experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C quantitativa, a fim de verificar quais carbonos estão enriquecidos.

As primeiras aplicações de experimentos de marcação isotópica, consistiam na incorporação de substratos enriquecidos com elementos radioativos, os radioisótopos. Neste contexto, o uso de isótopos estáveis, aliado à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, consistindo em um método rápido e não destrutivo, surgiu como uma ferramenta poderosa para elucidação de mecanismos bioquímicos⁶⁴. Posteriormente no final dos anos 60, para verificar o destino de precursores enriquecidos passou a ser utilizado o ¹³C não radioativo, que era monitorado a partir dos aumentos nas intensidades dos sinais de ¹³C-H satélites no espectro de RMN de ¹H. Este método, entretanto, não fornece informações de carbonos não ligados diretamente a hidrogênios e também não é muito sensível, sendo assim, foi rapidamente superado pela espectroscopia de RMN de ¹³C. Infelizmente, sob o ponto de vista da determinação estrutural, a distribuição isotópica do carbono na natureza é de apenas 1,1% em ¹³C (número quântico de spin, I = 1/2) conferindo à RMN deste núcleo uma falta de sensibilidade intrínseca⁶⁴. A grande maioria dos átomos de carbono (98,9%) é constituída pelo isótopo magneticamente

inerte, o ^{12}C ($I = 0$). A baixa abundância natural do ^{13}C ofereceu, portanto, a oportunidade de enriquecimentos, possibilitando os estudos biossintéticos através da marcação isotópica. No caso do ^{13}C , um enriquecimento de cerca de apenas 1% significa duplicar a intensidade do sinal correspondente⁶⁴.

Um dos métodos de marcação com ^{13}C mais empregados consiste na utilização de precursores enriquecidos em apenas uma posição (marcação simples) ou na utilização de precursores marcados em duas posições (marcação dupla). A técnica de marcação dupla com ^{13}C apresenta maior sensibilidade, uma vez que pequenos satélites de ^{13}C - ^{13}C acoplados podem ser detectados com mais precisão que os correspondentes enriquecimentos a partir de precursores com marcação simples. O mapeamento da incorporação destes precursores em metabólitos é então determinado pela comparação do espectro de RMN de ^{13}C do metabólito marcado com o espectro do composto não marcado como mostrado na Figura 1.6.1 para experimentos com marcação simples e com marcação dupla⁶⁴.

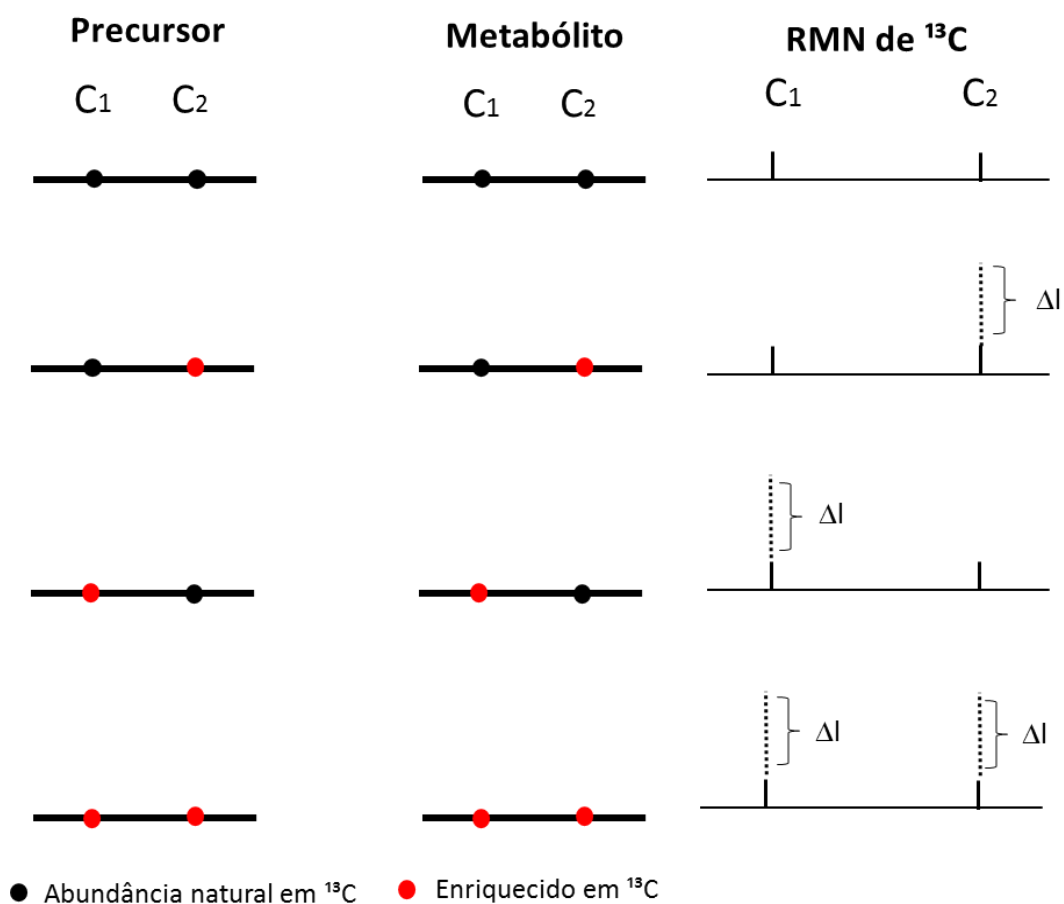


FIGURA 1.6.1. Efeito da marcação simples e dupla no espectro de RMN de ^{13}C , adaptado de MACEDO JUNIOR, F.C., 2007.⁶⁴

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudo da reação de prenilação através de experimentos de marcação isotópica, visando confirmar a biossíntese e entender a formação de xantiletina e seselina em *Citrus sinensis* e *Citrus limonia*, pois nada ainda é conhecido sobre os caminhos que levam as piranocumarinas.

2.2. Objetivos Específicos

- Preparar mudas de *C. sinensis* e *C. limonia* *in vitro*.
- Analisar o perfil químico da folhas, caules e raízes das plântulas cultivadas *in vitro* afim de verificar a presença das piranocumarinas, xantiletina e seselina.
- Desenvolver um método de quantificação para xantiletina e seselina.
- Avaliar os genótipos de *C. sinensis* e *C. limonia*, para detecção de mutações em genes específicos.
- Realizar experimentos de marcação isotópica com glicose marcada ^{13}C , em raízes de *C. sinensis* e *C. limonia*, afim de determinar qual a origem biossintética da unidade isoprênica que leva aos intermediários demetilsuberosina e ostenol, e posteriormente aos produtos finais da biossíntese: xantiletina e seselina.
- Avaliar a atividade antibacteriana das substâncias seselina e xantiletina, frente as bactérias fitopatogências *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri* spp. *citri* causadoras das doenças Clorose Variegada do Citros (CVC) e Cancro Cítrico, respectivamente.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção das plântulas de *C. sinensis* e *C. limonia*

As sementes de laranja Pêra (*C. sinensis*) e de limão Cravo (*C. limonia*) foram cedidas pelo Centro de Citricultura do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizado no município de Cordeirópolis-SP. Foram obtidas 250g de sementes de *C. sinensis* tratadas, provenientes do lote de matrizes da Fazenda Itapuá, coletadas em 12 de maio de 2014 e 220 g de sementes *C. limonia* tratadas com , provenientes do lote de matrizes RG-83, coletadas em 04 de julho de 2014.

A inoculação *in vitro* das sementes de ambas as espécies foi realizada no laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). As sementes de *C. sinensis* e *C. limonia* foram submetidas a assepsia com solução de Captan (Orthocide® 500) e Tiofanato-metilico (Cercobin® 700WP) a 1% e mantidas sob agitação à 90 rpm por 30 min. Posteriormente foram imersas em 100 mL de hipoclorito de cálcio (0,5%) por 15 min sob agitação e lavadas com água destilada estéril (3 vezes). Após esses procedimentos as sementes foram inoculadas em meio MS basal semissólido suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 2,5 g/L de Phytigel®, de acordo com o protocolo de MURASHIGE; SKOOG, 1962⁶⁵ (Tabela 3.1.1).

TABELA 3.1.1. Composição do Meio MS basal MURASHIGE; SKOOG, 1962.

Constituintes do Meio MS basal			
Constituintes	Quantidade (mg/L)	Constituintes	Quantidade (mg/L)
KNO ₃	1900,0	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
NH ₄ NO ₃	1650,0	CoCl ₂ .2H ₂ O	0,025
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	Na ₂ EDTDA	37,3
KH ₂ PO ₄	170,0	MiInositol	100,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Tiamina HCl	0,10
KI	0,83	Ácido nicotínico	0,50
H ₂ BO ₃	6,20	Glicina	2,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	Piridoxina HCl	0,50
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	Sucrose	30000,0

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de cultura a 25 ± 2 °C, com 55-60% de umidade relativa e controle de foto período com 16h de luz e 8h em ausência de luz, para a germinação.

3.2. Obtenção dos Extratos

As plântulas de *C. sinensis* e *C. limonia* foram retiradas do meio MS basal e separadas em raiz, caule e folha. Em seguida, as partes vegetais foram maceradas com auxílio de almofariz de pistilo e armazenadas em erlenmeyers de 500 mL para extração com 250 mL de metanol grau HPLC - Sigma-Aldrich®, durante 24h. O sobrenadante foi então filtrado em papel de filtro comum e por fim, os extratos foram concentrados à vácuo em evaporador rotativo BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C, e armazenados à temperatura ambiente em recipientes apropriados, para análises posteriores em HPLC - DAD, HPLC - DAD - SPE - NMR e UPLC - qTof (Figura 3.2.1).



FIGURA 3.2.1. Esquema da metodologia de extração para obtenção de extratos das plântulas cultivadas *in vitro*.

3.3. Análise do perfil químico de *C. sinensis* e *C. limonia*

Para confirmar a produção das piranocumarinas: xantiletina e seselina, foram selecionadas 24 plântulas de *C. sinensis* e 24 plântulas de *C. limonia*, com 2 meses de desenvolvimento após a germinação, para a análise do perfil químico da raiz, do caule e da folha. As plântulas selecionadas foram submetidas a extração conforme descrito no item 3.2. As amostras foram então diluídas em ACN:H₂O 1:1 para uma concentração de 3 mg/mL.

Após realizado o preparo de amostras, foi feito a análise do perfil químico em HPLC utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, acoplado a bombas de modelo LC-6AD, com controlador de sistema CBM-20A,

degaseificador DGU-20A, detectores de arranjo de diodos UV/VIS SPD-M20A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF e software Class VP; com coluna analítica Phenomenex®, Gemini C18 (150 x 4,6 mm, partícula de 5µm). A separação foi realizada em gradiente com fluxo de 1 mL/min no modo reverso de eluição usando H₂O:ACN como fase móvel (Tabela 3.3.1), onde a linha A é referente a H₂O e a linha B à ACN. O acompanhamento cromatográfico foi feito com detector de UV nos comprimentos de onda de 210 e 254 nm.

TABELA 3.3.1. Gradiente para análise do perfil químico em folha, caule e raiz de *C. sinensis* e *C.limonia*.

Tempo (min)	% A	% B
0,0	97,0	3,0
10,0	80,0	20,0
30,0	25,0	75,0
37,0	0,0	100,0
43,0	0,0	100,0
45,0	97,0	3,0
60,0	97,0	3,0

3.4. Quantificação de piranocumarinas totais nas raízes de *C. sinensis* e *C. limonia*

O método utilizado na quantificação foi a cromatografia líquida com padronização externa, que consistiu na construção de curva analítica para os padrões alvo: xantiletina e seselina. Foram preparadas soluções estoque, diluindo-se 1 mg do padrão (xantiletina + seselina) em 1,0 mL de MeOH (grau HPLC) e a partir desta, foram preparadas as soluções padrão à 2,0; 10,0; 30,0; 50,0; 70,0 e 90,0 µg/mL para construção da curva analítica. Foram analisados 12 genótipos de *C. sinensis* e 12 genótipos de *C. limonia*. As amostras foram preparadas a uma concentração de 3 mg/mL e as piranocumarinas presentes foram quantificadas por HPLC utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, acoplado a bombas de modelo LC-6AD, com controlador de sistema CBM-20A, degaseificador DGU-20A, detectores de arranjo de diodos UV/VIS SPD-M20A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF e software Class VP; com coluna analítica Phenomenex®,

Gemini C18 (150 x 4,6 mm, partícula de 5µm). A eluição cromatográfica foi realizada com fluxo de 1 mL/min em modo reverso, utilizando H₂O:ACN como fase móvel (Tabela 3.3.1), onde a linha A é referente a H₂O e a linha B à ACN. O acompanhamento cromatográfico foi feito com detector de UV em comprimento de onda de 210 nm.

3.5. Análise de PCR dos genótipos de *C. sinensis* e *C. limonia*

A fim de identificar possíveis diferenças genéticas entre os genótipos de cada uma das espécies de citros, foram realizadas análises de PCR com diversos *primers* escolhidos aleatoriamente. Todos os procedimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônômico (IAC) em Cordeirópolis - SP.

3.5.1. Extração de DNA

A extração de DNA das folhas dos 12 genótipos de *C. sinensis*, 12 genótipos de *C. limonia* e dos padrões de *C. sinensis* (LP IAC) e de *C. limonia* (LC LIM), foram feitas segundo o protocolo de MURRAY e THOMPSON 1980⁶⁶. As folhas foram primeiramente lavadas com água destilada e trituradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz de pistilo, até obter um pó bem fino. Em seguida foram armazenadas em eppendorffs® de 1,5 mL e adicionou-se 700 µL de tampão de extração (TE) de brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil-amônio CTAB/Sarcosil. O material vegetal obtido foi incubado em banho maria à 60°C, durante 20 min. Após deixar esfriar à temperatura ambiente, foi adicionado 700 µL uma mistura de cloforómio : álcool isoamílico (24:1) agitando por 80 vezes e centrifugou-se à 12000 rpm por 10 min em micro centrífuga refrigerada Eppendorff® - modelo 5415R (máx. 13200rpm e temperatura de 0°C - 40 °C). Em seguida 550µL do sobrenadante obtido foi transferido para outro eppendorff® e adicionou-se 55µL de CTAB 10%. Todas as etapas de extração com cloforómio : álcool isoamílico (24:1) foram realizadas novamente e 450 µL do sobrenadante obtido, foi transferido para um novo eppendorff® seguido da adição de 450µL de solução tampão de precipitação CTAB 10% e repouso por 60 min. Após uma nova centrifugação à 11000 rpm por 10 min, o

sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado dissolvido em 400 µL de TE alto sal em banho-maria à 65°C.

Para precipitar o DNA, foi adicionado 800 µL de etanol absoluto gelado e prosseguiu-se com o procedimento de extração centrifugando a solução por 10 min à 12000 rpm e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 700 µL de etanol 70%, realizando uma nova centrifugação à 12000 rpm com temperatura de 4°C por 7 min. O sobrenadante foi removido e ao precipitado adicionou-se 400 µL de etanol 100%, submetendo o material obtido a uma centrifugação por 5 min à 12000 rpm e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi removido e o DNA seco em estufa de circulação à 37°C por 1h. O pellet foi finalmente dissolvido em 80 µL de H₂O ultrapura Milli-Q® + RNase e mantido por 1h em freezer à -20°C para posterior quantificação do DNA.

3.5.2. Quantificação do DNA e verificação da qualidade do DNA

Após a extração do DNA foi feita a quantificação utilizando o espectrômetro NanoDrop® 8000 Thermo Scientific, onde 2 µL de amostra de DNA são inseridos nos poços de leitura. Após realizada a quantificação de DNA proveniente dos diferentes genótipos de *C. sinensis*, *C. limonia* e dos padrões utilizados na análise, os mesmos foram diluídos/concentrados para obtenção de uma concentração final de 40 ng/µL de DNA. As amostras foram diluídas/concentradas para prosseguir com análise da reação em cadeia da polimerase – PCR a fim de obter cópias de uma parte do material genético em quantidade e qualidade suficientes que permitam detectar e analisar a sequência alvo do estudo.

3.5.3. Análise da reação em cadeia da polimerase – PCR

Para a análise de PCR, a preparação da mistura conhecida como Master Mix, que contém todas as substâncias necessárias para a síntese de novas cópias de DNA, foi realizada em eppendorffs®, conforme o protocolo descrito na tabela 3.5.3.1, obtendo um volume final de solução de 15 µL. Foram utilizados 7 primers forward e reverse, sendo 3 primers genômicos: 12, 14, 170 e 4 primers EST: 11,14, 89 e 209.

TABELA 3.5.3.1. Protocolo para análise de PCR dos genótipos de citros.

Reagentes	V (µL) para cada amostra
H ₂ O	q.s.p. 15,0
Tampão	1,5
DNTP	1,2
Primer Foward	0,3
Primer Reverse	0,3
Taq Polimerase	0,3
DNA _[40ng/µl] extraído da amostra	3,0

Após o preparo da reação de PCR, as amostras foram submetidas a etapa de amplificação do DNA, através de programas de temperatura para os primers genômicos (Tabela 3.5.3.2) e os *primers* EST (Tabela 3.5.3.3), que permitiram a execução de todos os ciclos da reação utilizando o termociclador com gradiente - Applied Biosystems modelo Veriti – 96 Well Thermal Cyclers, 0,2 mL. O programa de temperatura foi ajustado para uma etapa inicial única de desnaturação. Em seguida foi programado ciclos para realização de três etapas fundamentais para análise da PCR, KARY MULLIS; 1983.

- 1) Etapa de anelamento: habilita os *primers* a anelar a fita simples desnaturada.
- 2) Etapa de extensão: a Taq polimerase age para estender o molde.
- 3) Etapa de desnaturação: A desnaturação da molécula de DNA formado serve como molde para o próximo ciclo.

TABELA 3.5.3. 2. Programa de temperatura para *primers* genômicos de citros.

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Nº de ciclos
94,0	60,0	
94,0	30,0	
55,0	30,0	32
72,0	30,0	
72,0	60,0	
10,0	∞	-

TABELA 3.5.3.3. Programa de temperatura para primers EST de citros.

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Nº de Ciclos
95,0	60,0	-
94,0	30,0	
65,0	30,0 com touchdown	30
72,0	30,0	
94,0	30,0	
56,0	30,0	3
72,0	30,0	
72,0	420,0	-

3.5.4. Análise dos produtos da PCR por eletroforese

A análise dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese em placa de gel de agarose 3% com fluoróforo SYBR® Orange, com dimensões de 25 cm de comprimento x 17 cm de largura x 0,5 cm de altura. O gel de agarose a 3% com SYBR® Orange foi preparado com a adição de 6,375 g de agarose a 220 mL de tampão de tris-acetato-EDTA (TAE) em erlenmeyer de 500mL. Para dissolução total, a solução foi levada ao micro-ondas por 1 min e após a mesma esfriar a temperatura ambiente, foram adicionados 22 µL de SYBR® Orange. O gel foi vertido na placa e após a solidificação retirou-se os pentes da mesma para a formação dos poços para aplicação das amostras. A placa foi submersa em uma cuba de eletroforese contendo tampão TAE, acoplada a uma fonte da Hoefer de produção máxima de 600 V; 750 mA, 150 W. Em seguida 2 µL de amostra/padrão DNA ladder azul + 3 µL de tampão de carregamento + 5 µL de SYBR® Orange foram aplicados nos poços da placa e a eluição de eletroforese em gel de agarose foi feita à 100 V por aproximadamente 60 min. A placa posteriormente foi revelada em módulo de transiluminação UV em um sistema de foto documentação para géis de eletroforese da CARESTEAM, modelo Gel Logic 212Pro, com Câmera CCD com sensor de 1.4 milhões de pixels, ponto focal 1.2, lentes com ampliação motorizada de 6 vezes. As imagens foram capturadas e editadas com auxílio do *software* Molecular Imaging.

A figura 3.5.4.1 mostra os detalhes do procedimento da análise de PCR dos genótipos de citros desde a etapa de extração até a obtenção das imagens dos produtos da PCR.

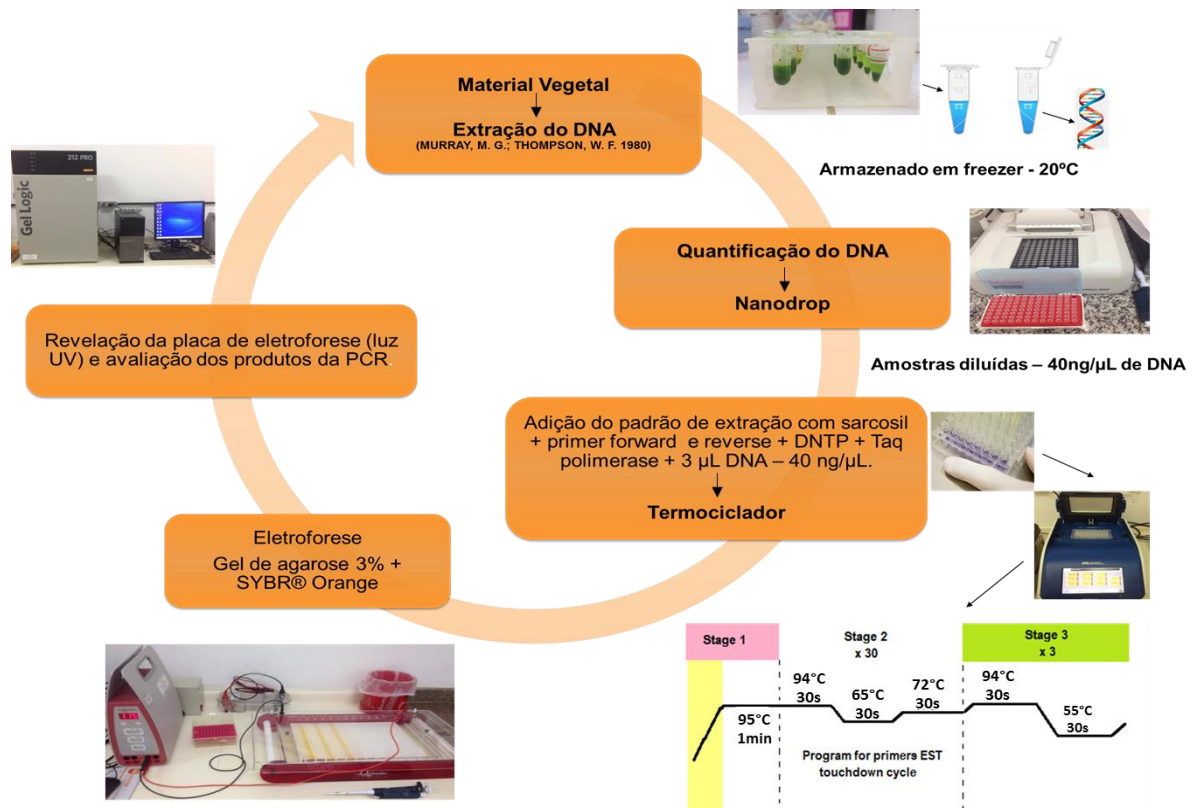


FIGURA 3.5.4.1. Etapas do processo de extração de DNA das raízes de *C. sinensis* e *C. limonia* e análise de PCR.

3.5.5. Preparo das soluções para análise de PCR dos genótipos de *C. sinensis* e *C. limonia*

Tampão de extração CTAB/Sarcosil: Para preparar 100 mL do tampão de extração, utilizou-se 10 mL de Tris – HCl - pH 7,5 à 1 M, 2 mL de EDTA – pH 8,0 à 0,5 M, 14 mL de NaCl, 20 mL CTAB 5%, 20 mL de sarcosil 10%, 1 mL de mercapto-etanol (ME) 140 mM e completou-se o volume do balão com H₂O destilada.

Tris – HCl – pH 7,5 à 1M: Para preparar 250 mL, foram adicionadas 30,27 g de Tris base, completou-se o volume do balão volumétrico com H₂O destilada e o pH foi ajustado para 7,5 com adição de HCl 5 M.

EDTA – pH 8,0 à 0,5 M: Foram utilizadas 46,52 g de EDTA para preparar 250 mL de solução. O volume do balão foi completado com H₂O destilada e o pH ajustado para 8,0 com adição de NaOH 5 M.

NaCl 5 M: 73,05 g de NaCl foram transferidas para balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com H₂O destilada.

CTAB 5%: Para preparar 250 mL, utilizou-se 12,5 g de brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil-amônio (CTAB) e o balão volumétrico completado com H₂O destilada.

Sarcosil 10%: 25 g de sarcosil foram transferidos para balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com H₂O destilada.

CTAB 10%: Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionadas 10 g de CTAB 10%, 14 mL de NaOH 5M e o volume completado com H₂O destilada.

Tampão de precipitação CTAB: Em um balão volumétrico de 100 mL foi adicionado 1 g de CTAB 1%, 5 mL de Tris HCl – pH 7,5 à 1M, 2 mL de EDTA – pH 8,0 à 5M e o volume foi completado com H₂O destilada.

TE alto sal: Para preparar 100 mL foi adicionado a um balão volumétrico 1 mL de Tris HCl – pH 7,5 à 1M, 0,2 mL de EDTA – pH 8,0 à 0,5 M, 20 mL NaCl 5M e o volume completado com H₂O destilada.

SYBR® - Tampão Orange: Foram utilizados 4 g de sacarose, 0,025 mg de Orange G para preparar 10 mL de solução.

Solução tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1x: Em 2,0 L de H₂O destilada foram adicionados 40 mL de TAE 50x.

Padrão DNA Ladder azul: Para o preparo do padrão que auxilia na determinação do número de pares de bases do produto da PCR, são misturados 60 µL de H₂O, 20 µL de azul de bromofenol e 20 µL de DNA Ladder.

3.6. Experimento de marcação isotópica para análise da raiz de *C. sinensis* e *C. limonia*

Para os experimentos de marcação isotópica a fim de determinar a via biossintética de piranocumarinas em citros; as plântulas de *C. sinensis* e *C. limonia* cultivadas como descrito no item 3.1 foram transferidas para o meio MS líquido e pH ajustado para 6.0. Foram transplantadas 50 plântulas de laranja Pêra (*C. sinensis*) e 50 de limão Cravo (*C. limonia*) que eram cultivadas em meio MS basal sólido, em

tubos de ensaio contendo 7 mL de meio MS líquido com 25 % glicose ^{12}C + 75%glicose-1- ^{13}C (experimento de enriquecimento) e 50 plântulas de laranja Pêra e 50 de limão Cravo em tubos de ensaio contendo meio MS líquido 100% glicose ^{12}C (experimento controle). Após inoculação em meio líquido, os tubos de ensaio foram vedados com papel alumínio e um filme plástico de polipropileno (Bellco™), e mantidos em sala de cultura a 25 ± 2 °C, com 55-60% de umidade relativa e controle de foto período de 16 horas de luz. Após 60 dias da inoculação, as plântulas foram retiradas do meio de cultura e os extratos foram obtidos como descrito no item 3.2. Os extratos posteriormente foram submetidos à análises em LC-SPE-UV-NMR e em UPLC-QToF.

3.6.1. Análise das raízes de *C. sinensis* e *C. limonia* para estudo da biossíntese via HPLC-SPE-UV-NMR

As análises cromatográficas via LC-SPE-NMR, foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, do Departamento de Química da UFSCar, utilizando o cromatógrafo da Agilent Technologies modelo 1200 acoplado ao RMN, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Amostrador automático G1329A e detector de ultravioleta G1314B, forno de coluna G1316A. O software utilizado para processamento dos dados foi HyStar v. 3.2 (Bruker BioSpin GmbH). A coluna analítica utilizada foi uma Phenomenex®, Gemini C18 (150 x 4,6 mm, partícula de 5 μm). As bandas de interesse, referentes às piranocumarinas xantiletina e seselina, foram trapeadas em cartucho SPE de polidivinilbenzeno do tipo HySphere C-18 end capped sílica (2 mm i.d., 10 μm) previamente condicionados com ACN. As análises de RMN quantitativo foram feitas em modo *off-line* no equipamento da Bruker Avance III - 14,1 T (600 MHz para RMN ^1H), modelo UltraShield Plus 600, equipado com cryo-sonda TCI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching) e gradiente de campo em z, sonda BBI de 5 mm com ATMA®, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade cryo-fit® e unidade HPLC-SPE acoplada.

Para o preparo das amostras para análise, pesou-se 10 mg de extrato da raiz de laranja Pêra (*C. sinensis*) e de limão Cravo (*C. limonia*) do experiento controle e de enriquecimento, adicionou-se 1,0 mL de MeOH e filtrou-se em filtros de seringa PTFE CHROMAFIL® 0-20/15 MS (0,20 μm poro; \varnothing = 15 mm).

A fim de verificar a reprodutibilidade do método e determinar os tempos para o trapeamento em cartucho SPE das bandas de interesse, foram feitas três injeções de cada amostra dos extratos marcados (experimento de enriquecimento) e não marcados (experimento controle) das duas espécies de citros, utilizando um método gradiente de 62 min conforme representado na Tabela 3.6.1.1. A linha A continha água deionizada, produzida utilizando um equipamento Milli-Q® Plus Total Water System (Millipore Corp., Bedford, MA, EUA) com resistividade de 18,2 mΩ cm e a linha B era composta de ACN:MeOH 1:1. As injeções foram feitas com um fluxo de 0,6 mL/min, volume de injeção de 50 µL utilizando comprimento de onda de 210 nm.

TABELA 3.6.1.1. Metodologia para o trapeamento de piranocumarinas em *C. sinensis* e *C. limonia* utilizando HPLC-SPE-UV-NMR.

Tempo (min)	% A	% B
0,0	97,0	3,0
20,0	71,0	20,0
40,0	25,0	75,0
42,0	0,0	100,0
47,0	0,0	100,0
49,0	97,0	3,0
62,0	97,0	3,0

Após verificar a reprodutibilidade do método e determinar os tempos para trapeamento das bandas de interesse para cada uma das amostras, foram realizadas 15 injeções para o trapeamento da banda 1 - b1, referente à xantiletina dos extratos marcado e controle da raiz de laranja Pêra e limão Cravo e 15 injeções para o trapeamento da banda 2 - b2, referente à seselina dos extratos marcado e controle da raiz de laranja Pêra e limão Cravo, totalizando 30 análises para cada amostra (Tabela 3.6.1.2). Obs: devido a uma limitação física do equipamento, não foi possível realizar o trapeamento simultâneo das duas bandas de interesse, pois as mesmas deveriam estar separadas por um tempo mínimo de 1 min e não foi possível conseguir a separação entre a xantiletina e seselina com esta resolução. Além disso para aproveitar as corridas cromatográficas realizadas, foi feito o trapeamento de outras bandas para estudos posteriores que não estão descritos neste trabalho.

TABELA 3.6.1.2. Tempo de trapeamento da xantiletina e seselina proveniente dos extratos marcados e não marcados de laranja Pêra e limão Cravo em cartucho SPE.

Amostra	t (min) de trapeamento - b1	t (min) de trapeamento - b2
LPR controle	25,48 - 26,01	26,22 - 26,70
LPR marcada	25,57 - 25,79	25,98 - 26,36
LCR controle	25,77 - 26,11	25,82 - 26,46
LCR marcada	25,60 - 26,09	26,18 - 26,70

*código amostras = LPR nmarc: laranja Pêra (*C. sinensis*) não marcada, LPR marc: laranja Pêra marcada, LCR nmarc: limão Cravo (*C. limonia*) não marcada, LCR marc: limão Cravo marcada.

Os cartuchos SPE contendo as substâncias de interesse aprisionadas foram posteriormente secos com N₂ por 30 min e eluídos com MeOH-d₄ em vial previamente pesado. Após feito isso determinou-se a massa de cada uma das substâncias isoladas, para que todas teriam seus respectivos espectros comparados, fossem preparadas a uma mesma concentração. Em seguida 120 µL de cada substância marcada (enriquecidas com ¹³C) e não marcadas (não enriquecidas com ¹³C) foram colocados em tubos de RMN para análise de ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC e COSY em RMN 600 Mhz.

3.6.2. Análise das raízes de *C. sinensis* e *C. limonia* via UPLC-QToF

Os extratos da raiz marcados e não marcados de *C. sinensis* e *C. limonia* foram submetidos à análise em UPLC-QToF da Waters Acquity®, modelo XEVO G2-XS, com coluna também da Waters®, modelo Acquity UPLC BEH (2,1 x 100 mm) - C18 de partícula com diâmetro de 1,7 µm.

As linhas foram acidificadas a 0,1% de ácido fórmico, onde A era a linha referente a H₂O, B à ACN e C ao MeOH. Realizou-se as corridas cromatográficas à um fluxo de 0,5 mL/min, com volume de injeção de 5,0 µL. As análises foram feitas com amostras à 1 mg/mL de acordo com a metodologia descrita na Tabela 3.6.2.1, em *full scan* modo positivo em fonte ES, com voltagem do cone à 40 V, alta energia de 20 – 30 V e temperatura da coluna de 40°C. Para os experimentos MS/MS, foi monitorado o íon *m/z* 229,0877 à uma energia de 25V.

TABELA 3.6.2.1. Metodologia para análise das raízes de *C. sinensis* e *C. limonia* utilizando UPLC-QToF.

Tempo (min)	% A	% B	%C
0,0	97,0	1,5	1,5
3,0	80,0	10,0	10,0
14,0	30,0	35,0	35,0
15,0	0,0	50,0	50,0
19,0	0,0	50,0	50,0
22,0	97,0	1,5	1,5
24,0	97,0	1,5	1,5

3.7. Avaliação da atividade biológica das substâncias xantiletina e seselina frente às bactérias fitopatogênicas *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A atividade antibacteriana das piranocumarinas, xantiletina e seselina, foi avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento da *Xylella fastidiosa*; conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). As substâncias ensaiadas foram isoladas no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar e os ensaios biológicos realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca – UNIFRAN.

3.7.1. Isolamento da xantiletina

A xantiletina foi isolada das raízes de Citros coletada em maio de 2016 na Agroterenas de Santa Cruz do Rio Pardo - SP. As raízes foram cortadas e secas em estufa de circulação à 40°C durante 7 dias e trituradas em moinho de facas tipo Willye da marca Tecnal. Em seguida 200g de material seco foi submetido a uma sequência de 3 extrações a frio com o auxílio de um homogeneizador/dispersor, T-10 standard da ULTRA-TURRAX® (IKA) à (10.000 rpm durante 2 minutos) em 500 mL etanol. O sobrenadante foi então filtrado, com auxílio de bomba à vácuo, e submetido à 3 lavagens com 150mL de etanol. Por fim, os extratos foram

concentrados à vácuo em evaporador rotativo BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5° e armazenados à temperatura ambiente em recipientes fechados. O extrato etanólico obtido, foi ressuscendido em 200 mL de MeOH e fracionado através de uma partição líquido/líquido com hexano (3 x 300 mL). Desta foram obtidas as frações hexânica e hidroalcólica. A fração hidroalcólica foi submetida a uma nova extração com acetato de etila (3 x 300 mL) e obteve-se as frações hidroalcólica e de acetato de etila.

A fração acetato de etila foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60 ASTM® (230-400 Mesh), com gradiente de eluição hexano/acetato de etila (95:5, 90:10, 85:15, 80:10, 70:30, 50:50, 30:70, 20:80, 10:90). As frações foram coletadas e monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), sendo reunidas aquelas com os mesmos fatores de retenção (Rf). A xantiletina foi encontrada a nas frações F-332 a F-370. Após a junção dessas frações, foi feito RMN de ¹H no equipamento Bruker DRX - 9,8 T (400 MHz para RMN ¹H), 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, para comprovar a presença da xantiletina pura (Apêndice I).

3.7.2. Isolamento seselina

A seselina foi isolada das raízes de 65 plântulas de *Citrus limonia* cultivadas *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia da UNAERP em Ribeirão Preto – SP. As plântulas foram coletadas em dezembro de 2016 e as raízes das mesmas foram separadas, trituradas com auxílio de almofariz de pistilo e em seguida submetidas a extração com 1L de MeOH por 24h conforme descrito no item 3.2. O extrato metanólico obtido foi então ressuscendido em MeOH e submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 60 ASTM® (230-400 Mesh), com gradiente de eluição hexano/acetato de etila (95:5, 90:10, 85:15, 80:10, 70:30, 50:50, 30:70, 20:80, 10:90). As frações foram coletadas e monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), sendo reunidas aquelas com os mesmos fatores de retenção (Rf). A seselina pura, foi observada nas frações F-120 a F-152. Após a junção dessas frações, foi feito RMN de ¹H no equipamento BrukerDRX - 9,8 T (400

MHz para RMN ^1H), 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, para confirmar se a substância de interesse estava realmente pura (Apêndice II).

3.7.3. Ensaio antimicrobiano com as substâncias xantiletina e seselina, frente à bactéria *Xylella fastidiosa*

Os ensaios foram realizados usando o método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por micro diluição em microplaca de 96 orifícios, metodologia segundo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003), que avalia a menor concentração do composto capaz de inibir ou matar a bactéria. Iniciou-se com um protocolo na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Primeiramente preparou-se uma Solução Mãe (SM) com 2 mg da amostra a ser testada (xantiletina, seselina e estreptomicina como controle positivo) em 125 μL de DMSO. Em seguida pipetou-se 125 μL desta solução e adicionou-se 125 μL do meio PW líquido (PERIWINKLE WILT, DAVIS et al., 1978), obtendo uma solução com uma concentração final de 8.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em uma placa Eliza® com 96 orifícios, foram colocados:

- 100 μL de meio PW em cada orifício onde será feita a micro diluição seriada dos compostos em teste (xantiletina e seselina) e do controle positivo, neste caso a estreptomicina. Como mostra a Figura 3.7.3.1.
- 90 μL de meio PW no primeiro poço onde testará o DMSO como efeito antimicrobiano, e 92 μL , 94 μL , 96 μL e 98 μL nos poços subsequentes e 198 μL de caldo para o controle do DMSO (para verificar se o DMSO está contaminado ou não).
- 200 μL de meio PW no controle do caldo.
- 100 μL de meio PW no controle do inoculo.
- 190 μL de meio PW no controle da solução mãe.

Em seguida pipetou-se 100 μL da SM no primeiro poço da linha da placa onde cada composto está sendo testado e realizou-se uma diluição seriada de 100 μL descartando a última diluição para que todos os poços ficassem com 100 μL novamente.

O inoculo foi preparado em um tubo de 3 mL de meio PW, onde foi feita uma suspensão bacteriana na escala de 0,5 de McFarland. Em seguida transferiu-se 500 µL dessa solução para um tubo contendo 4,5 mL de meio de cultura e desse segundo tubo foram transferidos 2000 µL para um tubo contendo 13 mL do mesmo. Finalmente, 100 µL dessa solução bacteriana é pipetada em cada poço em que os compostos estão sendo testados, nos poços do controle positivo, poços da atividade do DMSO e nos poços do controle de crescimento do inoculo, totalizando 200 µL em cada poço. Para a *Xylella fastidiosa* foi utilizada a cepa 9a5c.

Nos poços da primeira fileira e da última fileira da placa Eliza®, foi pipetado 200 µL de água autoclavada, para evitar que os poços secassem, conforme mostrado na metodologia esquematizada na Figura 3.7.3.1. A placa de Eliza® é então colocada em uma BOD a uma temperatura de 28 ° C por um período de 15 dias.

A análise para verificar se houve ou não crescimento bacteriano nos poços, foi realizada adicionando 30 µL de solução de resazurina (Sigma) 0,02% (m/v). Após adicionar a resazurina, a placa foi revestida com papel alumínio, para não haver fotodegradação da resazurina e levada à BOD por um período de 24 horas e foi então realizada a leitura dos poços.

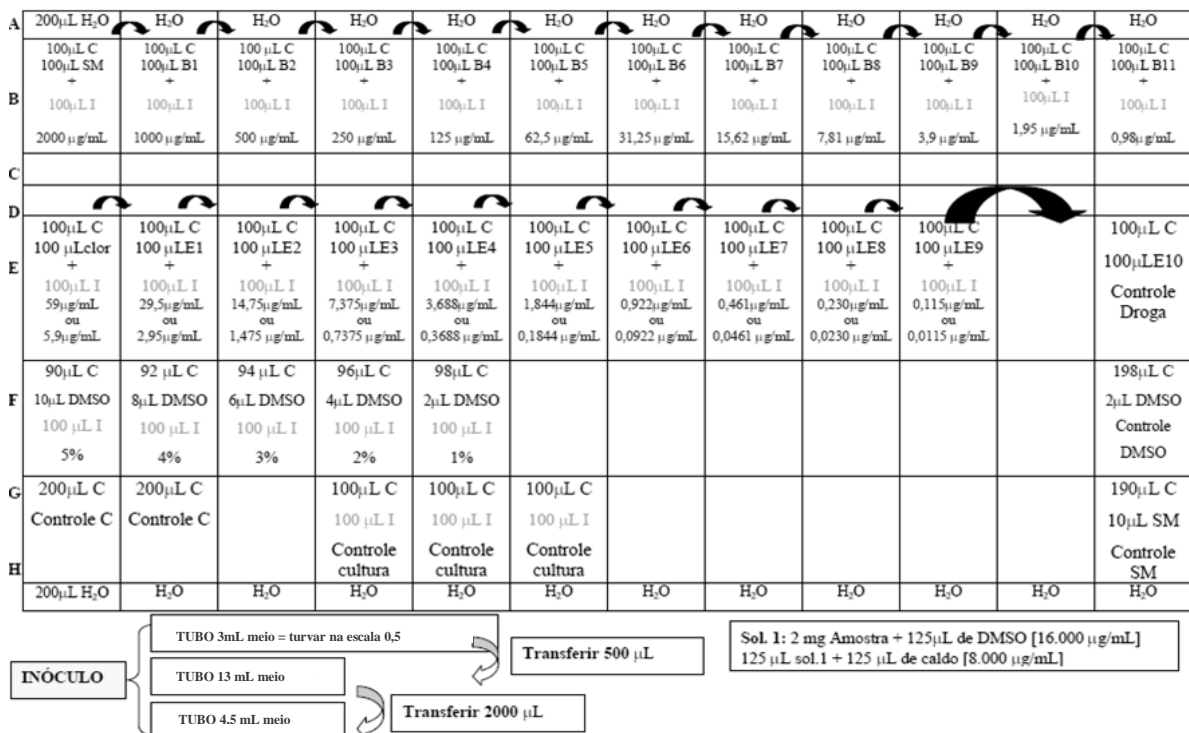


FIGURA 3.7.3.1. Esquema do método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por micro diluição em microplaca de 96 orifícios para a bactéria *X. fastidiosa*.

3.7.4. Ensaio antimicrobiano com as substâncias xantiletina e seseliina, frente à bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Os ensaios foram realizados usando o método de Concentração Inibitória Mínima (CMI) por micro diluição em microplaca de 96 orifícios, afim de avaliar a menor concentração do composto capaz de inibir ou matar a bactéria. A metodologia para determinação do CMI para xantiletina, seseliina e xantiletina + seseliina 1:1 frente à *Xanthomonas citri*, foi semelhante à que foi utilizada para determinação do CMI para a *X. fastidiosa*, porém iniciou-se o protocolo na concentração de 400 µg/mL indo à 0,195 µg/mL e o meio de cultura utilizado para o crescimento da bactéria foi o meio PW líquido (PERIWINKLE WILT, DAVIS et al.,1978).

Primeiramente, preparou-se uma Solução Mãe (SM) com 1 mg da amostra a ser testada, 125 µL de DMSO (para dissolver a amostra) e 500 µL do caldo de crescimento, obtendo uma SM com concentração de 1.600 µg/mL. Posteriormente em uma placa Eliza® com 96 orifícios, foram colocados:

- 50 µL de meio de cultura líquido PW em cada orifício onde foi realizada a micro diluição seriada dos compostos em teste.
- 59 µL de meio PW para o controle positivo, neste caso a estreptomicina.
- 75 µL de meio PW no primeiro poço onde foi testado o DMSO como efeito antimicrobiano, e 76 µL, 77 µL,78 µL e 79 µL nos poços subsequentes.
- 90 µL de meio PW para o controle do DMSO (para verificar se o DMSO está contaminado ou não)
 - 100 µL de meio PW no controle do meio de cultura.
 - 80 µL de meio PW no controle do inoculo.
 - 90 µL de meio PW no controle da solução mãe.

Em seguida pipetou-se 50 µL da SM no primeiro poço da linha da placa onde o composto estava sendo testado. Em seguida faz-se uma diluição seriada de 50 µL, jogando fora a última diluição ficando todos os poços com 50 µL novamente.

Para o controle positivo, pipetou-se 59 µL de solução de estreptomicina (1996 µL caldo + 4 µL estreptomicina) e realizou-se a diluição seriada.

Para o controle do DMSO, pipetou-se 5 µL DMSO no primeiro poço, 4 µL, 3 µL, 2 µL, 1 µL nos poços subsequentes.

Em seguida preparou-se o inoculo em um tubo com 3 mL de solução salina, obtendo dessa maneira, uma suspensão bacteriana na escala de 0,5 de McFarland. Em seguida transferiu-se 500 µL dessa solução para um tubo contendo 4,5 mL de solução salina e desse segundo tubo transferiu-se 2000 µL para outro tubo contendo 10 mL de meio de cultura. Sendo esta última, a solução bacteriana utilizada no ensaio para determinação do CMI.

Foram pipetados 20 µL dessa solução bacteriana em cada poço em que os compostos foram testados, nos poços do controle positivo, poços do controle do DMSO e nos poços do controle de crescimento do inoculo. Posteriormente, completa-se os poços com meio de cultura até finalizar 100 µL.

Finalmente a placa foi colocada numa BOD a uma temperatura de 28 ° C por um período de 72 horas e para a avaliação do crescimento bacteriano nos poços, adicionou-se 30 µL de solução de resazurina (Sigma) 0,02% (m/v). Após adicionar a resazurina, esperou-se um tempo aproximado de 2 horas para fazer a leitura de crescimento. Nos poços onde a coloração passou de azul para rosa, indica que ocorreu inibição ou erradicação da bactéria.

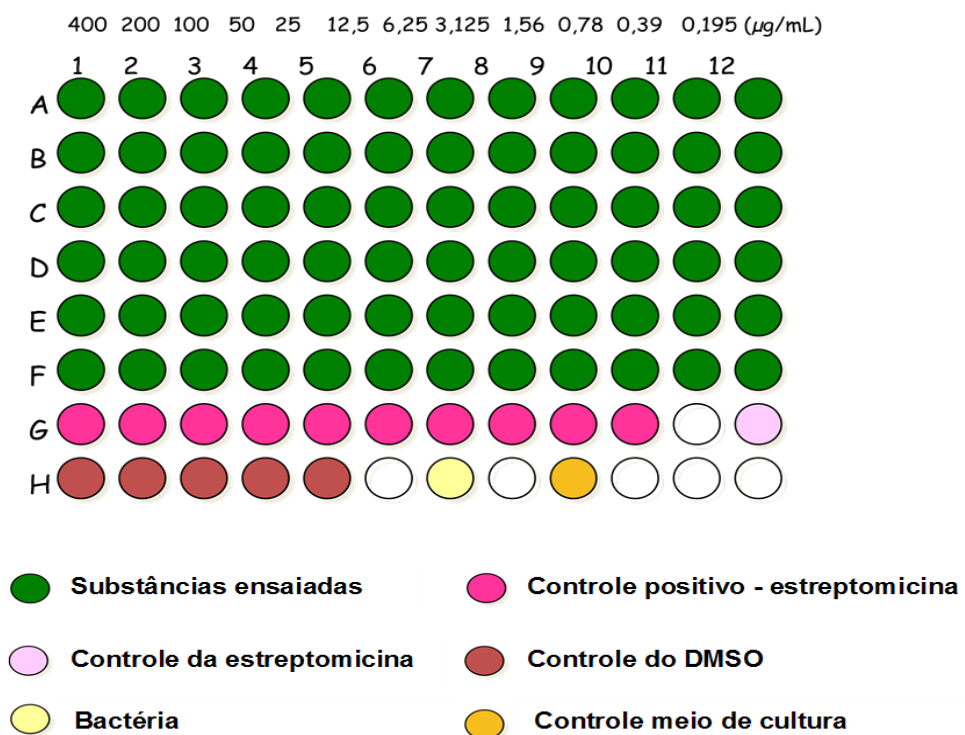


FIGURA 3.7.4.1. Esquema do método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por micro diluição em microplaca de 96 orifícios para a bactéria *X. citri*.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Cultivo *in vitro* de *C. sinensis* e *C. limonia*

A capacidade de culturas de células, tecidos e órgãos de plantas para produzir e acumular muitos, mas nem sempre todos os mesmos compostos químicos da planta na natureza têm sido reconhecidos desde o início da tecnologia *in vitro*. O desenvolvimento da cultura de tecidos *in vitro* abriu o caminho para novas pesquisas que exploram a expressão de produtos secundários *in vitro*. Além de existir uma série de vantagens distintas na produção de um produto secundário de grande interesse comercial, a cultura *in vitro* permite que o isolamento do fitoquímico ocorra de forma mais rápida e eficiente quando comparado com a extração dos mesmos de plantas *in vivo*⁶⁷. Outro fator que desperta grande interesse, é que as culturas celulares podem ser cultivadas em ambiente controlado e em meios de cultura com marcação isotópica, de modo que os produtos secundários acumulados possam ser rastreados metabolicamente⁶⁷, como foi feito neste trabalho.

A germinação das sementes de *C. sinensis* e *C. limonia* em meio MS basal sólido em ambiente controlado, começou a ocorrer 40 dias após a inoculação das mesmas. A metodologia adotada, apresentou-se eficiente para o cultivo de ambas as espécies de citros, apresentando baixa porcentagem de contaminação e alta porcentagem de germinação. A figura 4.1.1 mostra as plântulas de laranja Pêra e limão Cravo após 90 dias de cultivo *in vitro*.

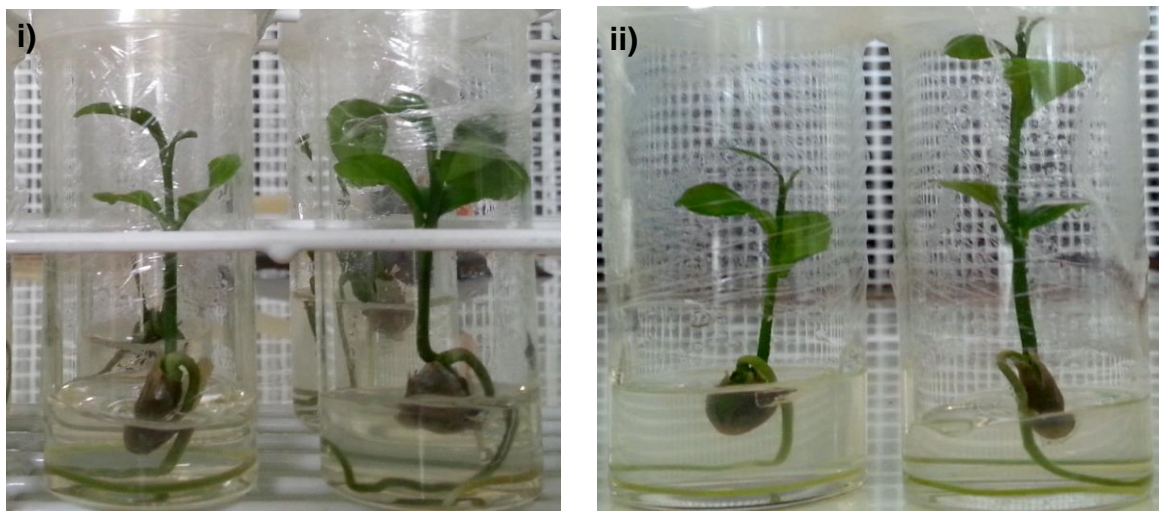


FIGURA 4.1.1. Cultivo *in vitro* em meio MS basal sólido. i) *C. sinensis* ii) *C. limonia*.

4.2. Análise do perfil químico de *C. sinensis* e *C. limonia*

Para avaliar o perfil químico da folha, caule e raiz das plântulas de *C. sinensis* e *C. limonia*, visando verificar se houve a produção de xantiletina e seselina *in vitro*, os quais são produzidos *in vivo* conforme descrito em trabalhos anteriores desenvolvidos no grupo de Produtos Naturais da UFSCar^{68,69}, foi utilizada a técnica HPLC-UV em modo reverso de eluição (RPLC). Optou-se por este método que é o mais usado em cromatografia líquida, devido à variabilidade de aplicações envolvendo pequenas e grandes moléculas de diferentes hidrofobicidades, pois possibilita a separação de misturas de diferentes classes de compostos⁷⁰. Optou-se também pela eluição em gradiente, pois as substâncias presentes na amostra apresentaram ampla faixa de polaridade. Nesses casos, o modo de eluição gradiente que consiste no aumento da força do solvente durante a análise proporcionando bandas cromatográficas muito mais estreitas, foi a melhor opção a ser adotada, pois nenhuma condição isocrática consegue ao mesmo tempo, oferecer boa resolução e pequeno alargamento de bandas^{71,72}.

Para a realização do experimento de incorporação de glicose-1-[¹³C] em meio MS líquido, para o estudo biossintético da xantiletina e seselina houve necessidade de avaliar o perfil químico das plântulas *cultivadas in vitro*, com o objetivo de verificar se as piranocumarinas de interesse estariam sendo realmente produzidas. Isso deve-se ao fato de que o perfil químico das espécies cultivadas *in vitro* pode variar em relação aquele da planta mãe cultivada *in vivo*. Um exemplo disso é a biossíntese da lisina à anabasina, que ocorre nas raízes de *Nicotiana tabacum*, seguida pela conversão de anabasina em nicotina nas folhas. As culturas de tecido *in vitro* de tabaco podem produzir apenas pequenas quantidades de nicotina, pois não produzem o precursor anabasina⁷³.

Na maioria das vezes ensaios com culturas de células de plantas não conseguem produzir os produtos desejados. Um dos principais problemas que levam a isso é falta de conhecimento básico das rotas biossintéticas e dos mecanismos responsáveis pela produção de metabólitos de plantas. Quando a produtividade dos metabólitos desejados é limitada pela falta de precursores particulares, é necessário utilizar um suprimento exógeno de precursores biossintéticos⁷⁴, que não foi o caso para o presente estudo.

Foram analisados a folha, o caule e a raiz dos 24 genótipos das duas espécies em questão. Os genótipos de *C. sinensis* (laranja Pêra) analisados foram: LP 28, LP 29, LP 33, LP 39, LP 40, LP 41, LP 43, LP 45, LP 51, LP 56, LP 100, LP 102, LP 106, LP 107, LP 113, LP 114, LP 126, LP 144, LP 169, LP 170, LP 173 e LP 175 e os de *C. limonia* (limão Cravo) foram: LC 27, LC 31, LC 38, LC 64, LC 65, LC 66, LC 70, LC 72, LC 77, LC 91, LC 98, LC 99, LC 200, LC 202, LC 205, LC 214, LC, 217, LC 223, LC 224, LC 225, LC 227, LC 244, LC 245, LC 246. Os resultados foram obtidos com plantas da mesma idade e cultivadas nas mesmas condições.

Como mostra a Figura 4.2.1 e 4.2.2, os diferentes órgãos das plantas estudadas mostraram diferentes perfis cromatográficos. Realizando uma análise visual dos cromatogramas, ao comparar cada órgão separado, os perfis cromatográficos também apresentaram algumas diferenças entre as duas espécies analisadas (Apêndice III). Porém, foi possível verificar grande similaridade do perfil cromatográfico para todos os genótipos de uma mesma espécie de citros dentro de um mesmo órgão estudado e não foi possível verificar alguma diferença qualitativa entre os genótipos de uma mesma espécie, apenas algumas das bandas cromatográficas diferenciaram-se em intensidades.

Um aspecto importante que foi observado é que as piranocumarinas de interesse, foram identificadas em todos os genótipos analisados somente nas raízes, tanto de laranja Pêra quanto de limão Cravo (Figura 4.2.4 i e ii). As bandas referentes às piranocumarinas, xantiletina e seselina foram identificadas, comparando o tempo de retenção com o padrão injetado de Xantiletina + Seselina e pelo espectro de UV das duas substâncias (Figura 4.2.4 iii e iv).

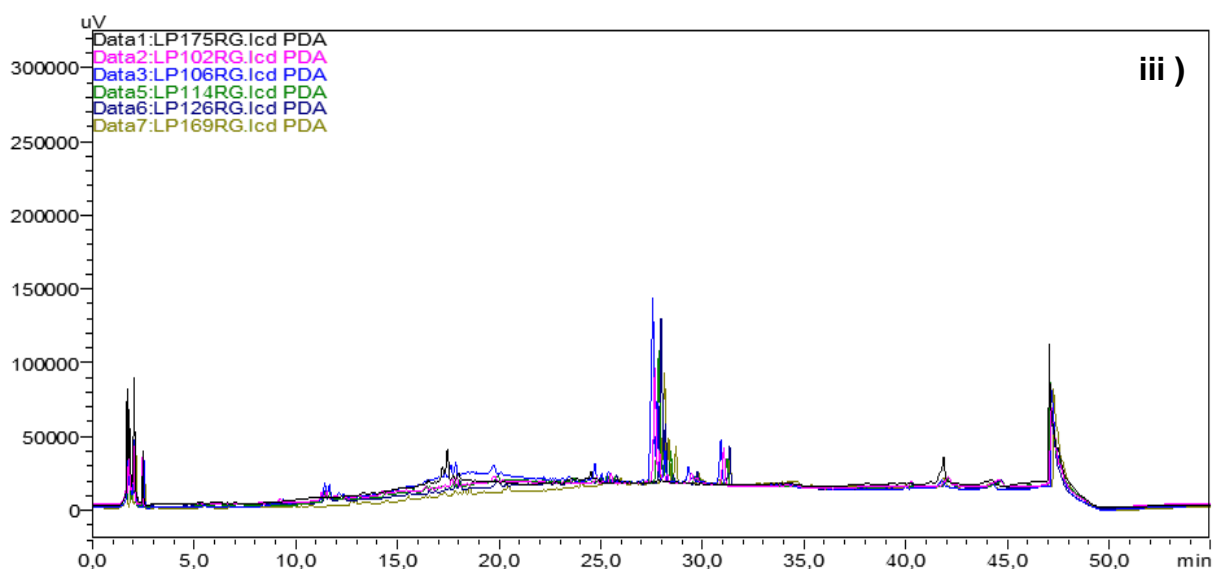
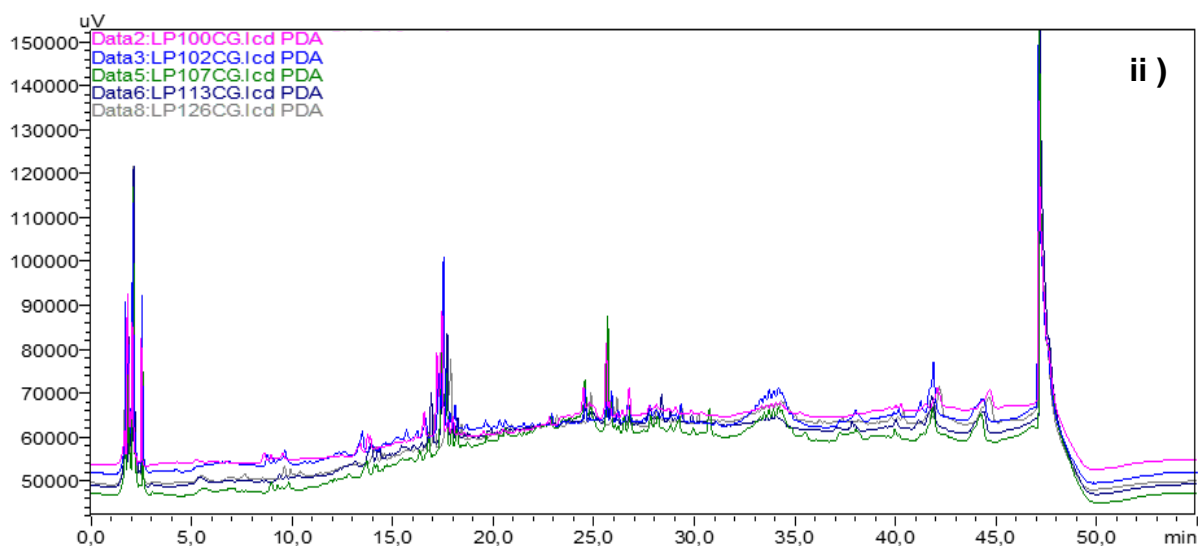
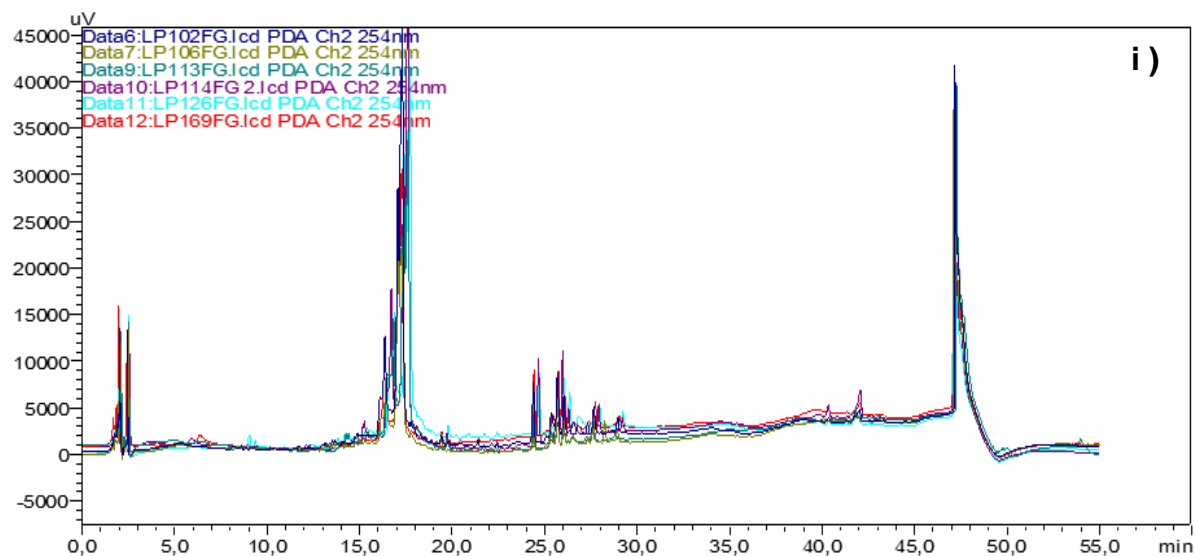


FIGURA 4.2.1. Análise do perfil químico das partes vegetais de laranja Pêra. i) LPF - folha de laranja Pêra ii) LPC - caule de laranja Pêra iii) LPR - raiz de laranja Pêra.

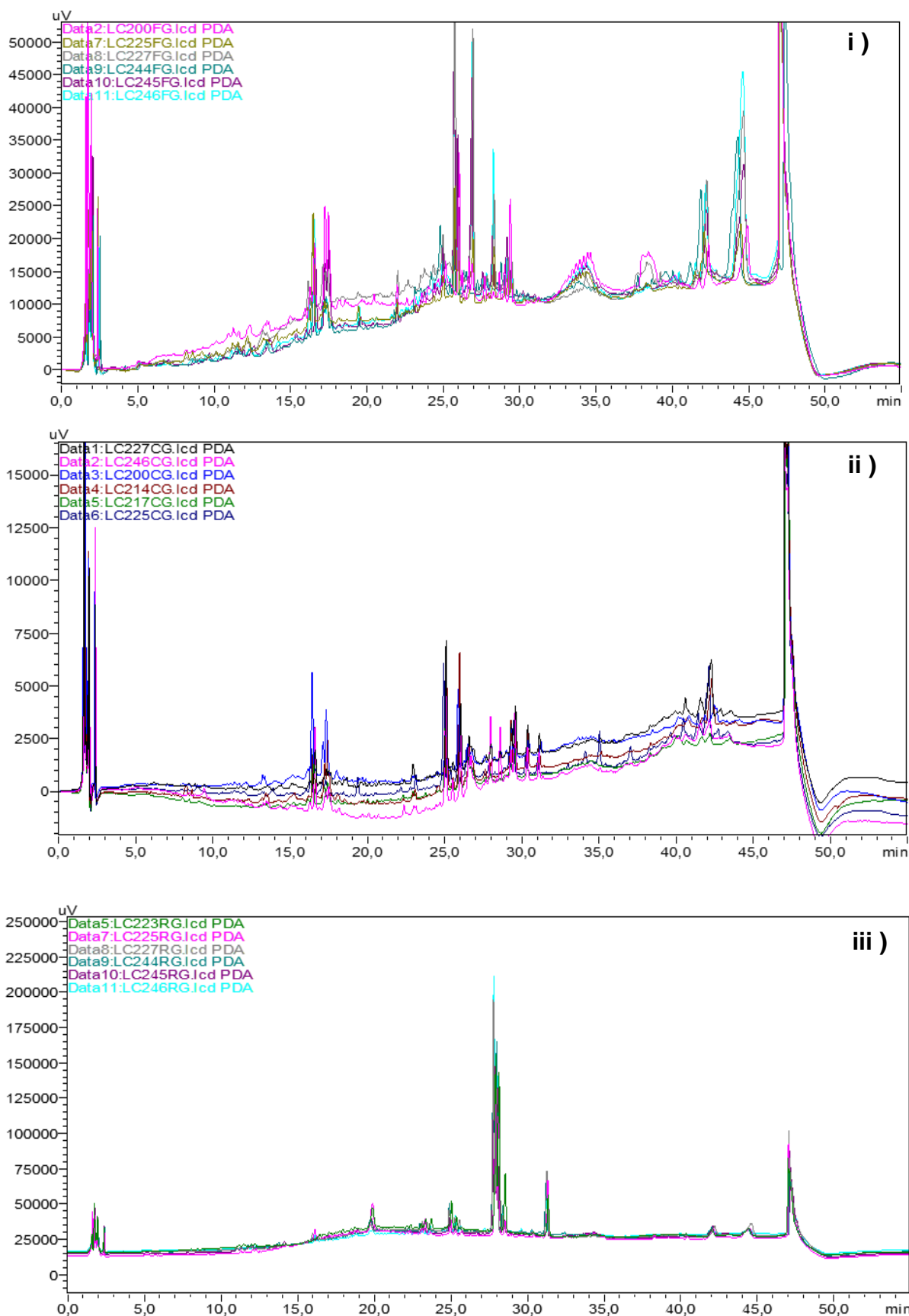


FIGURA 4.2.2. Análise do perfil químico das partes vegetais de limão Cravo. i) LCF - folha de limão Cravo ii) LCC - caule de limão Cravo iii) LCR - raiz de limão Cravo.

Ao analisar o cromatograma da amostra preparada com o padrão de xantiletina + seselina, observa-se que o tempo de retenção para a xantiletina é de aproximadamente 27,5 min e para a seselina de 28 min. As bandas cromatográficas com este tempo de retenção e com espectros de UV característicos referente a xantiletina e seselina foi observado apenas nas raízes das duas espécies de citros (Figura 4.2.4). A piranocumarina linear, xantiletina apresenta bandas de transição no UV em 224 e 235 nm (duas bandas características referente a conjugação do anel α -pirone) e em 347 nm (referente a conjugação do anel benzênico). A piranocumarina angular, seselina apresenta bandas de transição no UV em 250 e 292 nm (duas bandas características referente ao anel α -pirone) e 330 nm (referente ao anel benzênico).

A partir desses resultados, há boas evidências de que a biossíntese das piranocumarinas ocorre nas raízes, pois através da análise do perfil químico das partes vegetais de *C. sinensis* e *C. limonia*, observou-se que somente neste órgão de ambas espécies há a presença das piranocumarinas de interesse. Sendo assim verificou-se a possibilidade de dar sequência ao trabalho e comprovar se a reação de prenilação da umbeliferona em C-6 e C-8 (Figura 4.2.3), para a formação dos precursores de piranocumarina linear: dimetilsuberosina e da angular: ostenol ocorre via MVA denominada de via do ácido mevelônico, via MEP 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato ou via mista, na qual os dois caminhos ocorrem concomitantemente.

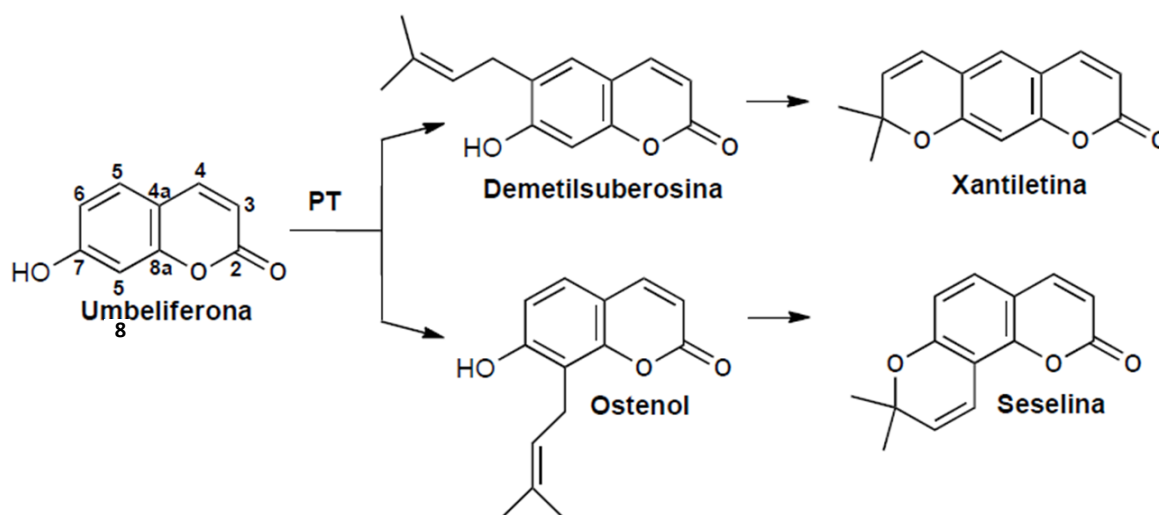


Figura 4.2.3 Proposta biogênica para piranocumarinas. A prenilação em C-6 levando a formação da piranocumarina linear – xantiletina e em C-8 à piranocumarina angular - seselina.

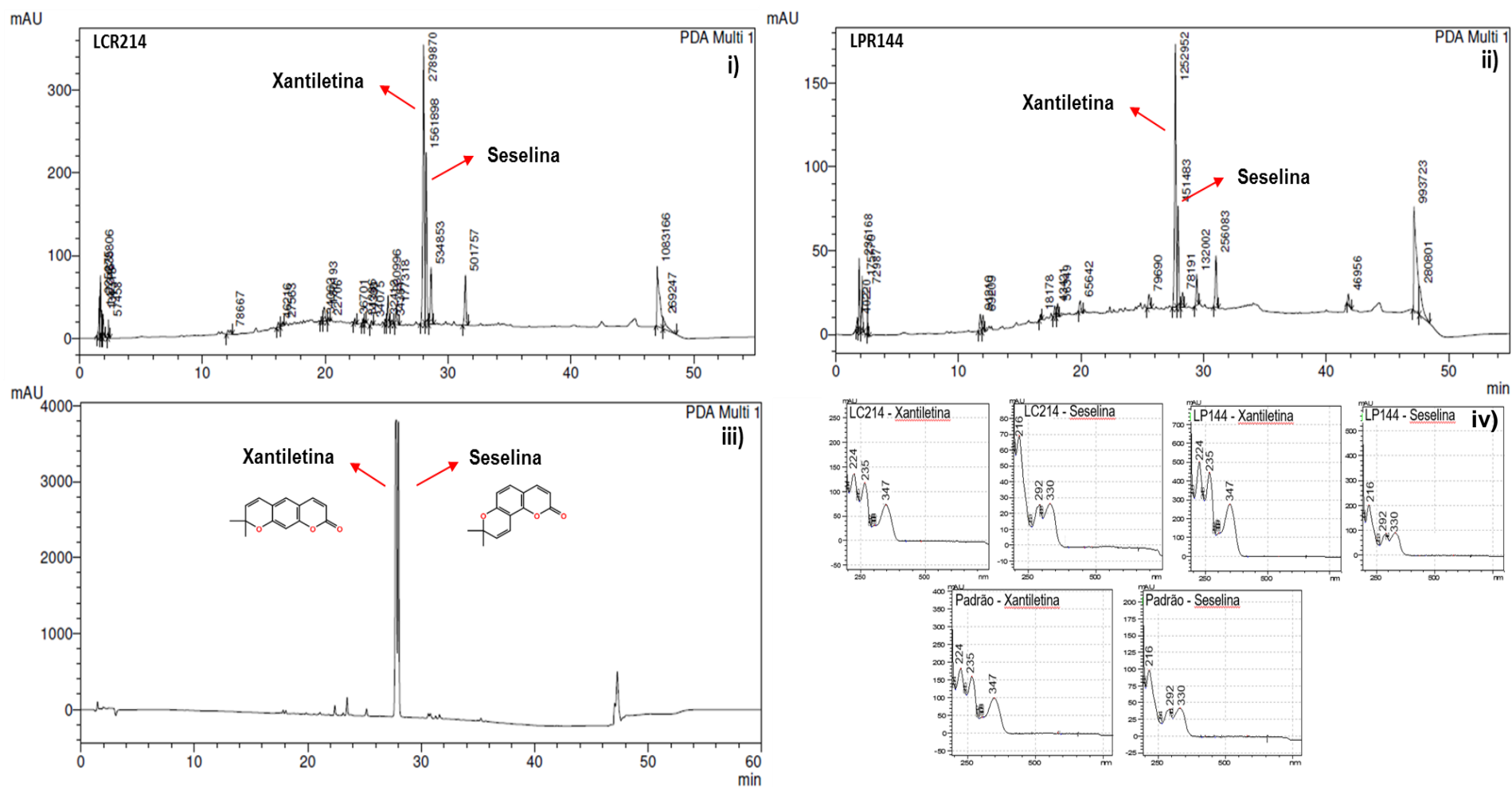


FIGURA 4.2.4. Perfil químico das raízes dos genótipos LPR 144 – laranja Pêra e LCR 214 – limão Cravo, comparados ao padrão xantiletina + seselina. i) raiz de limão Cravo LCR 214 ii) raiz de laranja Pera LPR144 iii) amostra padrão – xantiletina + seselina iv) perfil UV da xantiletina em LCR 214, LPR 144 e amostra padrão.

4.3. Quantificação de piranocumarinas totais nas raízes de *C. sinensis* e *C. limonia*

A quantificação de piranocumarinas totais nas raízes foi realizada com o intuito de verificar o número de plântulas necessárias para conseguir isolar as piranocumarinas em quantidade suficiente para realizar o estudo de biossíntese das mesmas. Além disso a quantificação auxiliou na seleção de linhas celulares de elevada produção dos metabólitos de interesse, a fim fornecer um genótipo de *C. sinensis* e *C. limonia* para reprodução, que sejam possivelmente mais resistentes e conseqüentemente apresentem maior interesse comercial. A função das piranocumarinas nas plantas, devido à relação estrutural com furanocumarinas, e devido a evidências constatadas em trabalhos anteriores^{69,75}, pode assumir um papel como fitoantecipinas.

A quantificação foi feita por HPLC – DAD utilizando a metodologia descrita na seção 3.4. Selecionou-se 12 genótipos de laranja Pêra (*C. sinensis*): LP 100, LP 102, LP 106, LP 107, LP 113, LP 114, LP 126, LP 144, LP 169, LP 170, LP 173 e LP 175 e 12 genótipos de limão Cravo (*C. limonia*): LC 202, LC 202, LC 205, LC 214, LC 217, LC 223, LC 224, LC 225, LC 227, LC 244, LC 245, LC 246. Em seguida, injetou-se o padrão contendo xantiletina + seselina em triplicata nas concentrações de 0,0; 10,0; 30,0; 50,0; 70,0 e 90,0 µg/mL para construção da curva de calibração (Figura 4.3.1). A regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas das bandas cromatográficas e a concentração dos padrões.

Através da curva de calibração determinou-se a concentração de seselina + xantiletina nas raízes dos genótipos de laranja Pêra e limão Cravo em relação a área do pico. Nas Tabelas 4.3.1 e 4.3.2, constam os dados referentes à média das áreas dos picos correspondentes as piranocumarinas, obtidas para a determinação da concentração em µg/mL e em % de piranocumarinas para cada um dos genótipos das duas espécies analisadas. A Figura 4.2.3. mostra os cromatogramas dos genótipos de cada espécie que apresentaram maior produção das piranocumarinas e da amostra padrão. A partir da análise dos cromatogramas obtidos, foi possível observar que alguns genótipos apresentam uma maior produção dessa classe de compostos.

Dentre as plantas avaliadas o genótipo de laranja Pêra LP 144 e de limão Cravo LC 214 apresentaram as piranocumarinas como substâncias majoritárias, produzindo 21,49 e 55,52 µg/mL respectivamente, enquanto os genótipos de menor produção LP 107 e LC 217 possuem 6,80 e 14,72 µg/mL destas substâncias nas raízes. Observa-se, portanto, uma diminuição significativa na produção de piranocumarinas entre os genótipos das duas espécies, sendo a produção 216,03% menor em LP 107 frente a LP 144 e 277,17% menor em LC 217 frente a LC 214 (Figura 4.3.2). Sendo assim os genótipos LP 144 e LC 214 foram selecionados como linhagens de alta produção para propagação.

Foi possível verificar também, uma diferença na produção de piranocumarinas entre as duas espécies avaliadas. Em limão Cravo (*C. limonia*) a produção destes compostos é 158,35% maior que em laranja Pêra (*C. sinensis*) (Figura 4.3.1). Os dados (Tabela 4.3.1 e 4.3.2) foram comparados por um teste t pareado para múltiplas amostras. T_{tab} a 95%, 11 g.L = 2,20 e T_{calc} = 4,29, portanto pode inferir que há diferença significativa na produção piranocoumarinas entre as duas espécies; limão Cravo - LC (*C. limonia*) e laranja Pêra - LP (*C. sinensis*).

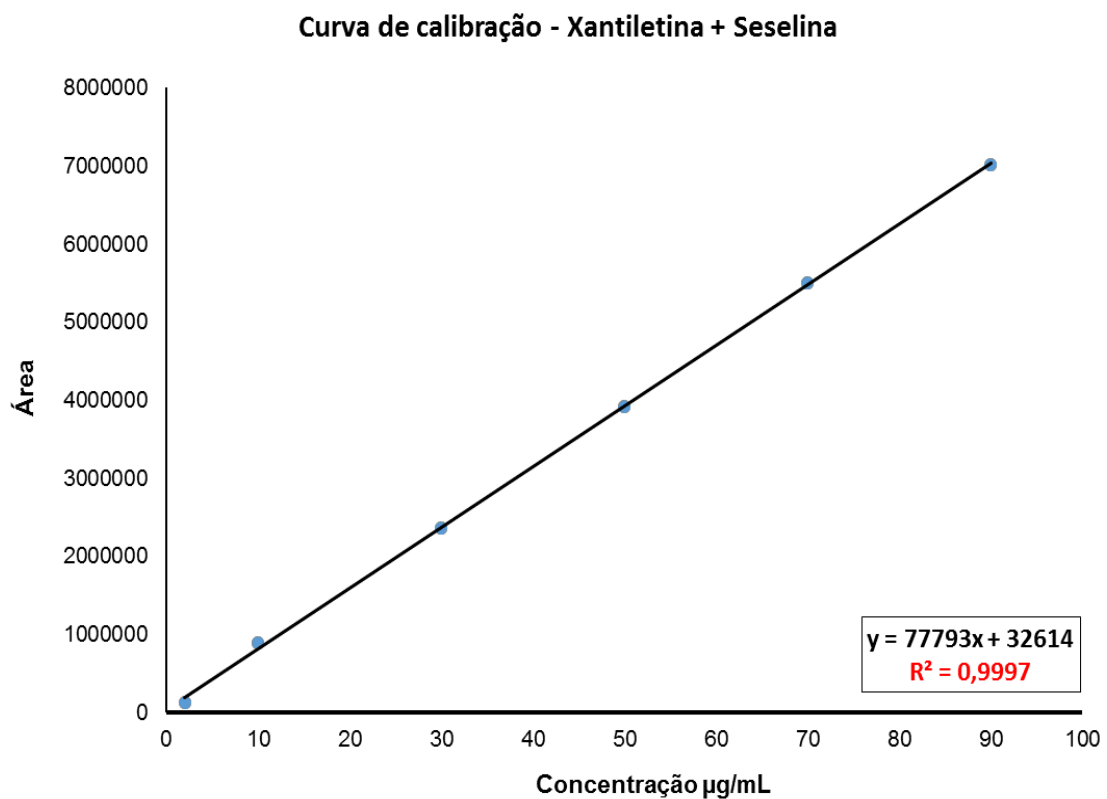


FIGURA 4.3.1. Curva de calibração para quantificação de piranocumarinas totais em raízes de laranja Pêra (*C. sinensis*) e limão Cravo (*C. limonia*).

TABELA 4.3.1. Dados da quantificação de piranocumarinas em laranja Pêra.

Genótipos	Média das Áreas	Concentração (µg/mL)	Concentração (%)
LP 100	662230	8,09	0,27
LP 102	842016	10,40	0,35
LP 106	1594051	20,07	0,67
LP 107	561861	6,80	0,23
LP 113	1384922	17,38	0,58
LP 114	947901	11,77	0,39
LP 126	1229254	15,38	0,51
LP 144	1704435	21,49	0,72
LP 169	947018	11,75	0,39
LP 170	608523	7,40	0,25
LP 173	1179674	14,75	0,49
LP 175	909109	11,27	0,38
Média	1047583	13,05	0,43

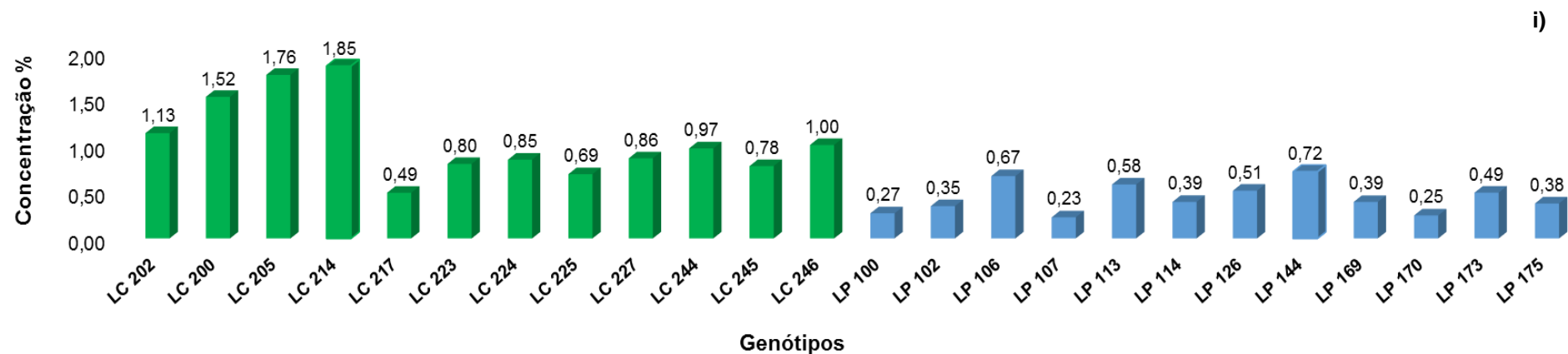
* Sigla LP – laranja Pêra (*C. sinensis*)

TABELA 4.3.2. Dados da quantificação de piranocumarinas em limão Cravo.

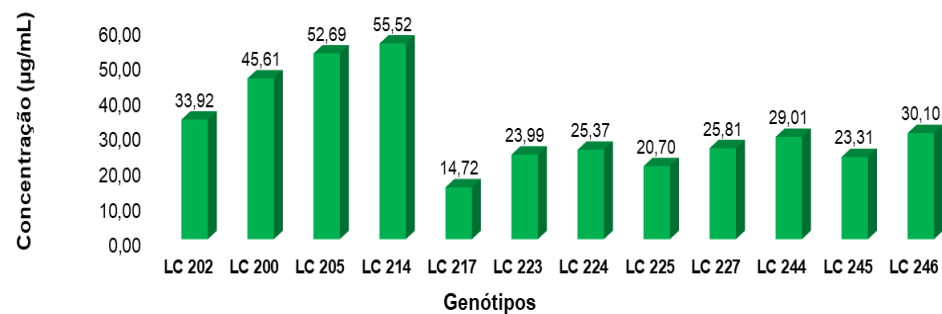
Genótipos	Média das Áreas	Concentração (µg/mL)	Concentração (%)
LC 202	2671493	33,92	1,13
LC 200	3580427	45,61	1,52
LC 205	4131862	52,69	1,76
LC 214	4351768	55,52	1,85
LC 217	1177410	14,72	0,49
LC 223	1898793	23,99	0,80
LC 224	2006285	25,37	0,85
LC 225	1643278	20,70	0,69
LC 227	2040539	25,81	0,86
LC 244	2289249	29,01	0,97
LC 245	1846073	23,31	0,78
LC 246	2374076	30,10	1,00
Média	2512471	31,73	1,06

* Sigla LC – limão Cravo (*C. limonia*)

% de piranocumarinas em diferentes genótipos de laranja Pera e limão Cravo



Quantificação de piranocumarinas em limão Cravo



Quantificação de piranocumarinas em laranja Pêra

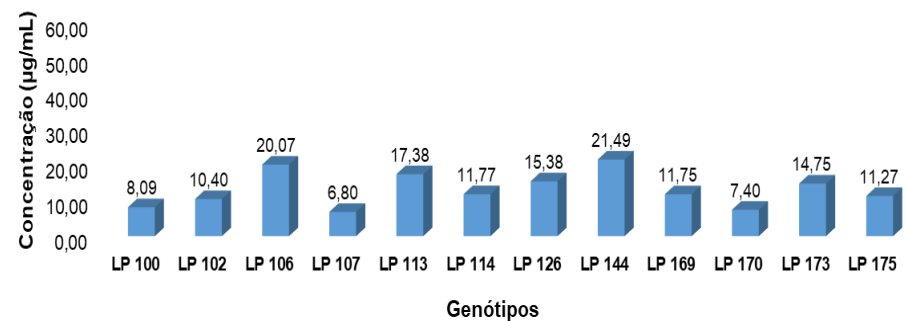


FIGURA 4.3.2. Gráfico representando a concentração de piranocumarinas em raízes de citros. i) % de piranocumarinas em laranja Pêra e limão Cravo, para comparação da produção entre espécies. ii) concentração em µg/mL em laranja Pêra para comparação entre genótipos. iii) concentração em µg/mL em limão Cravo para comparação entre genótipos.

Os mecanismos bioquímicos de defesa contra os fitopatógenos são amplos, altamente dinâmicos, e são mediados por defesas diretas e indiretas. Um desses mecanismos consiste na produção de substâncias defensivas de modo constitutivo ou em resposta ao dano da planta, afetando assim a alimentação, crescimento e sobrevivência de patógenos. Para combater o ataque de fitopatógenos, as plantas produzem estruturas morfológicas especializadas ou metabólitos secundários que têm efeitos tóxicos, repelentes e/ou antinutricionais sobre os patógenos⁷⁶. A resistência induzida pode ser explorada como uma ferramenta importante para o manejo de pragas para minimizar as quantidades de inseticidas usados para controle. Além da escolha de um genótipo de maior produção das substâncias que atuam como fitoantecipinas, a indução da produção das mesmas pode também ser manipulada geneticamente, auxiliando na defesa contra o ataque de pragas. A resistência induzida pode ser explorada para o desenvolvimento de cultivares e atua como um dos componentes do manejo integrado de pragas para a produção sustentável de culturas. Compreender a natureza da expressão gênica dos traços defensivos da planta gera uma enorme contribuição na concepção de plantas cultivadas com melhor proteção contra os herbívoros⁷⁶.

Acredita-se que as piranocumarinas atuem como fitoantecipinas presentes nas raízes de citros, auxiliando no mecanismo de defesa contra o ataque de algumas das principais doenças de citros. Devido a isso realizou-se ensaios biológicos como demonstrado na seção 4.7, frente à algumas bactérias causadoras de doenças que atacam a cultura de citros, comprometendo o desenvolvimento da planta e a saúde do fruto, acarretando perdas significativas na produção.

No trabalho desenvolvido por BELLETE, 2013⁷⁵, observou-se que planta de citros aumenta a produtividade de xantiletina e outras cumarinas, em resposta à presença da bactéria *Candidatus Liberibacter* somente nos extratos das raízes. Tal fato sugere que a defesa da planta frente à bactéria causadora do greening, parece estar nas raízes, inibindo o caminho do ácido cinâmico que leva aos flavonoides nos demais órgãos, para ativar aquele que conduz às cumarinas. A ativação do caminho que leva às cumarinas sugere estas terem a função de sinalização na defesa contra a bactéria.

SOARES, 2011⁶⁹, ao avaliar as respostas de plantas assintomáticas enxertadas com a bactéria *Xylella fastidiosa* em seu interior, verificou que nas raízes

de citros, entre 12 cumarinas detectadas há aumento na concentração de 10 delas e pequena diminuição em apenas duas. A seselina foi uma das cumarinas que mostrou diminuição na concentração, sugerindo uma reação da planta inibindo a biossíntese de derivados angulares em favor das demais que são preniladas em C-6 (lineares).

Tais constatações, surgem como justificativa para a alternativa de obtenção de uma maior produção desses metabólitos de interesse, que provavelmente agem como fitoantecipinas e ou fitoalexinas. Atualmente, para conseguir estimular a produção de substâncias desejáveis no cultivo *in vitro*, os esforços têm sido focados na obtenção de células cultivadas através da otimização das condições de cultura, emprego de alimentação precursora, métodos de transformação, técnicas de imobilização e seleção de linhagens de alta produção para propagação (2), como foi realizado no presente trabalho.

VARGAS et. al., 2013, verificaram que vários genótipos de importância econômica desenvolvidos no Estado do Paraná possuíam tolerância satisfatória ao cancro cítrico - CVC, causado pela bactéria patogênica *Xanthomonas citri*. Foram avaliados 25 genótipos de laranja Pêra e sua suscetibilidade ao CVC, e determinou-se um genótipo que apresentou menor incidência de doença tanto em campo quanto em casa de vegetação⁷⁷. Portanto, como perspectivas futuras, pretende-se realizar testes de resistência de cultivares de citros a alguns patógenos que atacam a cultura, avaliando esses genótipos em condições de campo e em casa de vegetação. O intuito seria verificar se realmente há uma correlação significativa entre os dados de campo, casa de vegetação e *in vitro* com relação a produção de piranocumarinas e associá-las à resistência das espécies frente à algumas doenças cítricas, principalmente o greening - HLB e ao CVC. Além da seleção de um genótipo, pretende-se futuramente realizar transformações genéticas após conhecer os genes e as enzimas envolvidas na biossíntese de piranocumarinas.

4.4. Análise de PCR dos genótipos de *C. sinensis* e *C. limonia*

Para investigar sobre a diferença significativa na produção dos metabólitos de interesse, realizou-se a análise de PCR com os 12 genótipos de laranja Pêra e 12 de limão Cravo, nos quais já havia sido feito a quantificação de piranocumarinas. As impressões digitais de DNA tornaram-se um instrumento imensamente importante para a identificação de genótipos em espécies de plantas

silvestres e seus parentes cultivados⁷⁸. O uso de genótipos resistentes é a melhor forma de controlar doenças que atacam as culturas. Os genótipos podem ser rastreados quanto à resistência ao patógeno e o germoplasma encontrado com resistência adequada, pode ser incorporado em programas de melhoramento ou usado diretamente em plantações comerciais⁷⁸.

Após a determinação do gene do *Citrus* em 2014⁷⁹, a determinação da diferença entre genótipos e a identificação de genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos específicos tornou-se mais fácil. A análise da variação genômica é uma parte essencial da genética vegetal e dos programas de melhoramento das culturas. Os polimorfismos de DNA podem estar diretamente relacionados às diferenças genotípicas, indicar relações entre indivíduos em populações além identificar qualquer fragmento de DNA referente ao gene de resistência⁸⁰. Para isso, selecionou-se 7 primers aleatórios de citros para verificar se havia alguma diferença genética entre os genótipos; através da análise de PCR (metodologia descrita na seção 3.5 e esquematizada na figura 3.5.4.1)

A quantificação do DNA está demonstrada na Tabela 4.4.1. Os dados mostram que os genótipos de laranja Pera LP 102, 106, 107, 170 e 175, e os de limão Cravo LC 200, 202, 205, 214, 217, 223, 224, 225, 244 e 246 apresentaram baixa concentração de DNA frente aos padrões LP IAC e LC LIM. Porém, mesmo em baixas concentrações, o DNA apresentou boa qualidade a partir das análises no NanoDrop®. Os genótipos LP 100, LP 113, LP 114, LP 126, LP 144, LP 169, LP 173, LC 227 e LC 245 por razões desconhecidas, tiveram o DNA degradado.

TABELA 4.4.1. Quantificação do DNA de laranja Pêra e de limão Cravo.

Genótipos	Concentração de DNA (ng/μL)	Genótipos	Concentração de DNA (ng/μL)
LP IAC	715,30	LC 205	8,23
LP 102	45,64	LC 214	4,10
LP 106	7,37	LC 217	1,83
LP 107	4,89	LC 223	2,04
LP 170	39,19	LC 224	18,42
LP 175	2,54	LC 225	5,24
LC Lim	540,30	LC 244	19,79
LC 200	93,98	LC 246	3,28
LC 202	44,81	-	-

A partir dos resultados das análises observou-se que para 6 primers selecionados: 11 est, 14 est, 209 est, 12 gen, 19 gen e 170 gen, não houve diferença entre os genótipos analisados de laranja Pera, limão Cravo e a amostra padrão, conforme mostra a Figura 4.4.1 i), para o primer 209 EST. Somente um primer selecionado, o 89 EST, mostrou diferença no padrão de bandas, referentes ao produto da análise de PCR, em relação a amostra padrão, para os genótipos LP 175 e LC 217 (Figura 4.4.1 ii). Através dos resultados obtidos não é possível tirar muitas conclusões, mas vale ressaltar que um dos genótipos que apresentou diferença no padrão de bandas na análise de PCR para o primer 89 est, o genótipo 217 de limão Cravo - LC 217, destacado em vermelho na figura a seguir, é o genótipo de menor produção de piranocumarinas para esta espécie. Isto sugere que há alguma diferença genética para este genótipo que apresentou uma produção de somente 0,49% de piranocumarinas na raiz.

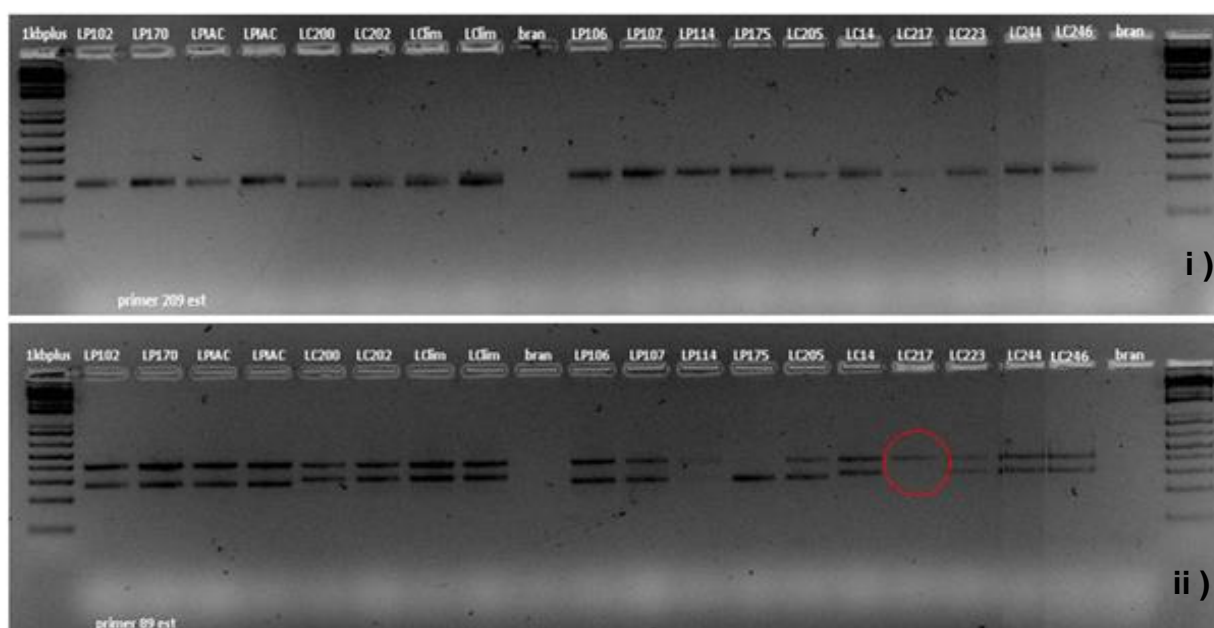


FIGURA 4.4.1. Revelação da placa de eletroforese do produto de análise de PCR de raízes de laranja Pera e de limão Cravo. i) Primer 209 est dos genótipos de ambas as espécies frente aos padrões de laranja Pera - LP IAC e de limão Cravo - LC Lim. ii) Primer 89 est dos genótipos de ambas as espécies frente aos padrões de laranja Pera - LP IAC e de limão Cravo - LC Lim. *Código bran = branco.

Frente a estes resultados, tem-se como perspectivas futuras realizar novas análises com novos primers, para detectar diferenças genéticas que possam trazer respostas que contribuam para novas investigações. Além disso, pretende-se

realizar estudos *in silico* a fim de identificar genes específicos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas.

4.5. Avaliação da marcação isotópica de piranocumarinas da raiz de laranja Pêra (*C. sinensis*) e de limão Cravo (*C. limonia*)

4.5.1 Análise das raízes de *C. sinensis* e *C. limonia* para estudo da biossíntese via HPLC-SPE-UV-NMR

Para comprovar se a reação de prenilação da umbeliferona em C-6 e - C8 (Figura 4.2.3), que leva aos precursores de piranocumarina linear: demetilsuberosina e angular: ostenol, ocorre via MEV (via do mevalonato) ou via MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato - triose/piruvato), a biossíntese da porção terpênica da xantiletina e seselina foi investigada através da incorporação de glicose-1-[¹³C] na raiz de *C. sinensis* e *C. limonia*. Os estudos de marcação isotópica são de grande importância, uma vez que permitem a determinação da via operante. Dependendo da via de metabolização envolvida, a marcação dos carbonos das unidades isoprênicas será diferenciada. Portanto, para a confirmação da rota biossintética, foram realizados experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C quantitativo, a fim de definir quais carbonos da unidade terpênica aparecem enriquecidos. Duas vias biossintéticas para formação de unidades de isopreno coexistem em plantas: a via de mevalonato (MVA) conhecida como citoplasmática e a via bacteriana 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) mais recentemente descoberta, localizada exclusivamente em plastídios⁸¹.

A Figura 4.5.1.1. mostra que a via do mevalonato (MVA) inicia-se com a condensação de três unidades de acetil-CoA indo a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) e continua por redução em mevalonato (MVA), seguida por dois passos sucessivos de fosforilação e um passo de descarboxilação/eliminação que conduz ao difosfato de isopentenila (IPP). Já as unidades isoprenoides derivadas de IPP que é sintetizado pela via MEP, tem a reação inicial envolvendo a condensação de hidroxietil - tiamina derivada de piruvato com o C-1 do D-gliceraldeído-3-fosfato (GA-3P) para produzir 1-deoxixilose-5-fosfato (DXP). No segundo passo, um rearranjo intramolecular e redução de DXP produz 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). Após conversão de MEP em 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-2,4cPP) em três

passos enzimáticos, uma redução leva a formação de 1-hidroxi-2-metil-2-butenil 4-difosfato (HMBPP), que é finalmente convertido em uma mistura de IPP e dimetilalil difosfato (DMAPP)⁶³. Se após a incorporação do precursor marcado a marcação for observada nos carbonos C-2, C-4 e C-5 da unidade terpênica, a biossíntese ocorre via MEV e se for observada em C-1 e C-5 ocorre via MEP. Ambas as vias podem também ocorrer concomitantemente apresentando todos os carbonos enriquecidos, exceto C-3⁸².

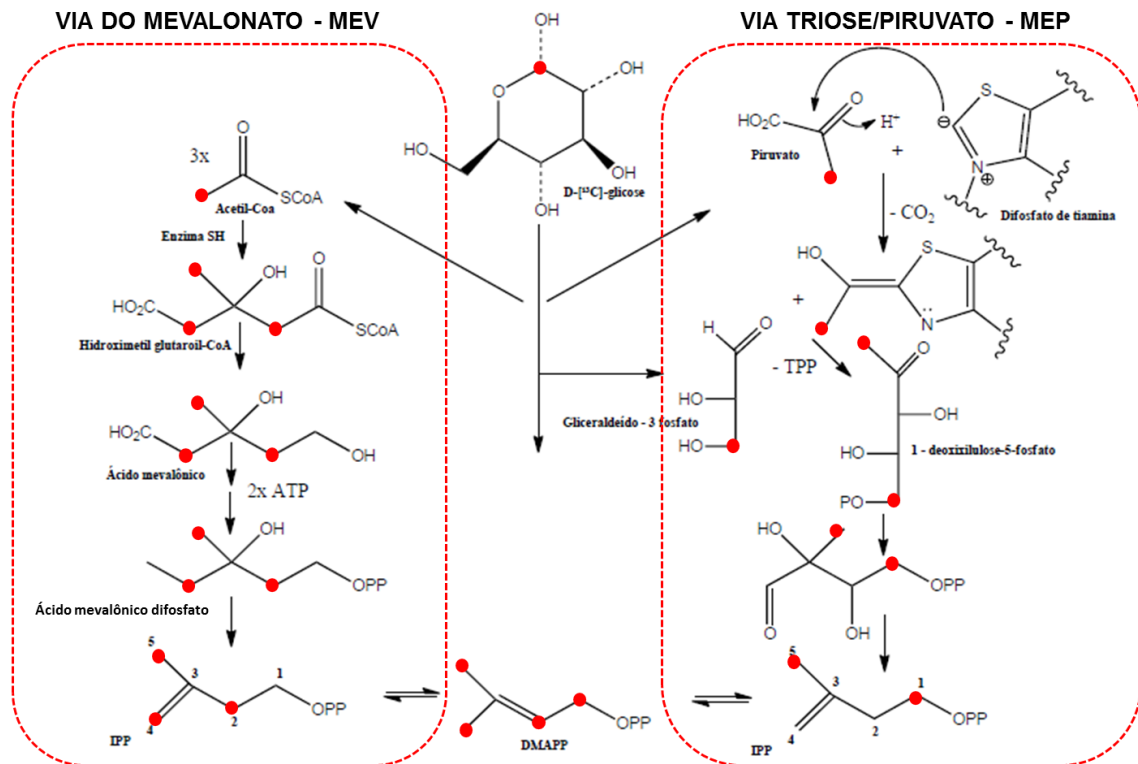


FIGURA 4.5.1.1. Biossíntese do difosfato isopentila (IPP) através das vias do mevalonato (MVA) e 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato - triose/piruvato (MEP).

Para isolar xantiletina e seselina das raízes de *Citrus sinensis* e *Citrus limonia* com abundância isotópica natural (experimento controle) e das raízes de *Citrus sinensis* e *Citrus limonia* cultivadas em meio de cultura enriquecido com ¹³C após a incorporação de glicose-1-[¹³C] (experimento de enriquecimento), as amostras de laranja Pêra e limão Cravo não marcadas/experimento controle e marcadas, foram injetadas em HPLC - UV - SPE - NMR, para verificar a reprodutibilidade do método (descrito na seção 3.6.1). Em seguida as substâncias desejadas foram trapeadas em cartuchos SPE como mostrado nos cromatogramas da Figura 4.5.1.2 para limão Cravo e na figura 4.5.1.3, onde a banda 1 é referente a xantiletina e a banda 2 a seselina.

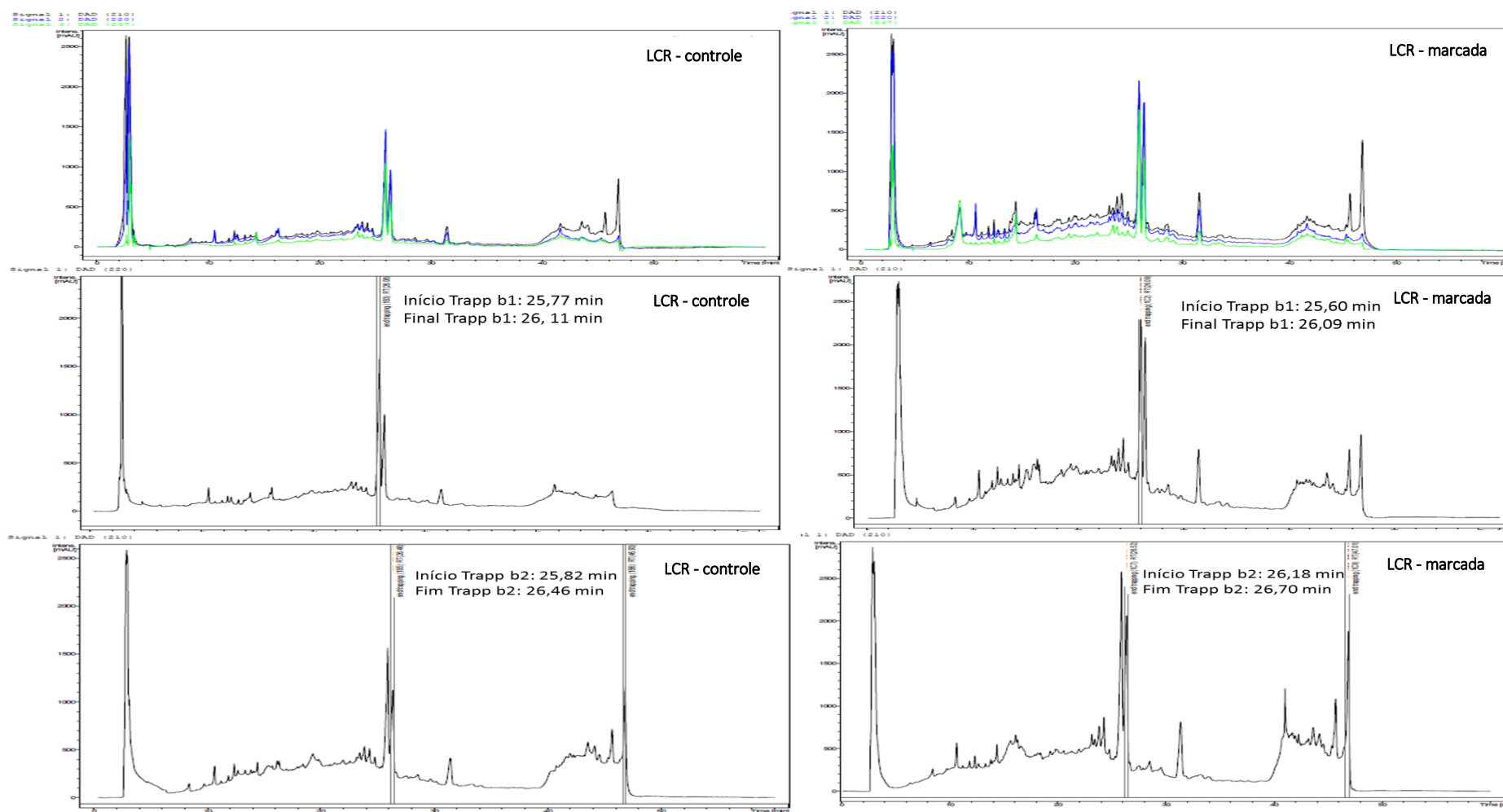


FIGURA 4.5.1.2. Cromatogramas da reprodução do método e do trapeamento das bandas 1 e 2, referentes a xantiletina e seselina respectivamente, para as amostras de raiz de limão Cravo - LCR, controle e com marcação através da incorporação de glicose-1-^[13C].

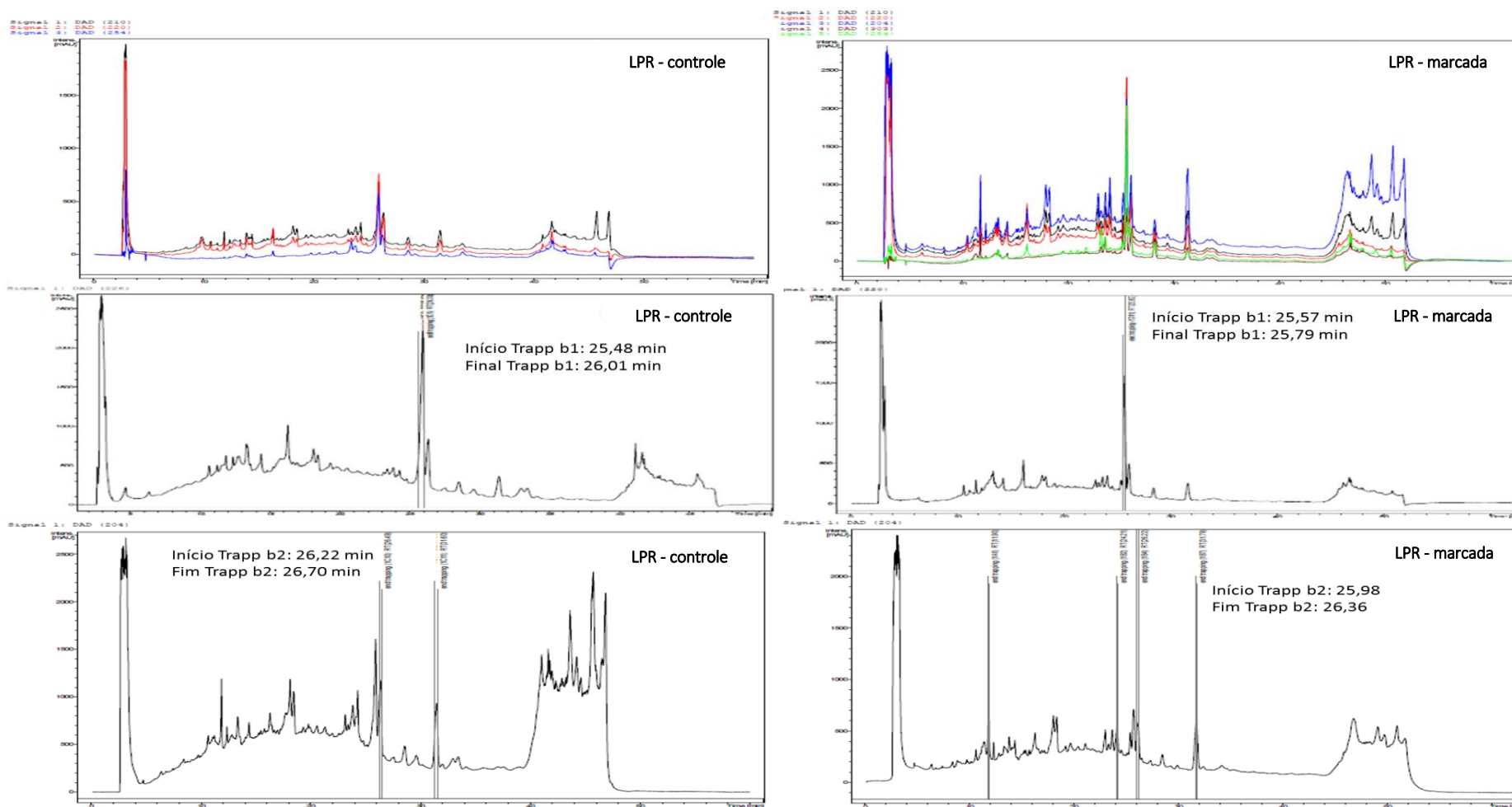


FIGURA 4.5.1.3. Cromatogramas da reprodução do método e do trapeamento das bandas 1 e 2, referentes a xantiletina e seselina respectivamente, para as amostras de raiz de laranja Pêra – LPR, controle e com marcação através da incorporação de glicose-1-^[13C].

Após realizado o trapeamento, o padrão de marcação isotópica, foi então determinado por RMN ^{13}C quantitativo, tanto para a xantiletina como para a seselina isoladas da raiz *C. sinensis* e *C. limonia* cultivadas em meio MS basal - com abundância isotópica natural (experimento controle) e com marcação após a incorporação de glicose-1- ^{13}C (experimento de enriquecimento).

4.5.2. Biossíntese da xantiletina em raiz *C. sinensis* e *C. limonia*

Os espectros de RMN de ^1H da banda 1, isolada de amostras de limão Cravo controle, mostrada na Figura 4.5.2.1, de limão Cravo na qual foi realizado experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C Figura 4.5.2.2, de laranja Pêra controle Figura 4.5.2.3 e de laranja Pêra com marcação Figura 4.5.2.4, comprovam a pureza das substâncias isoladas de cada uma das amostras e possibilitou a identificação da substância xantiletina.

O espectro de RMN ^1H apresentou sinais que caracterizam a classe estrutural das cumarinas. Os dubletos com sinais em δ_{H} 7,83 (1H, d) e 6,22 (1H, d), cuja constante de acoplamento entre eles é de 9,5 Hz, foram associados respectivamente aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico, sendo estes hidrogênios pertencentes a uma ligação dupla que está conjugada com a carboxila da lactona. O deslocamento químico em δ_{H} 7,83 para o H-4 indica a ausência de oxigenação na posição C-5 da molécula. Foi possível verificar a presença de mais dois dubletos com em δ_{H} 6,45 (1H, d) e 5,80 (1H, d) com $J = 9,9$ Hz e um singlete em δ_{H} 1,46 integrando para 6 hidrogênios (equivalente a duas metilas ligadas a C sp^3), indicando dessa maneira a presença do anel pirano. Ao dubleto mais desblindado em δ_{H} 6,44 foi atribuído ao hidrogênio H-4', e o outro ao H-3'.

Observa-se ainda a presença de dois singletos em δ_{H} 7,26 e 6,68 referente aos hidrogênios H-5 e H-8, os quais tem como vizinhos carbonos totalmente substituídos, indicando que o anel pirano é linear, estando ligado às posições C-6 e C-7 do anel aromático do esqueleto cumarínico. O espectro de RMN ^1H da xantiletina que possui fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ apresentou 7 sinais sendo que o sinal δ_{H} 1,46 é equivalente a seis hidrogênios referentes as duas metilas 6' e 5', totalizando os 12 hidrogênios da molécula. A Tabela 4.5.2.1 mostra os dados de ^1H para a xantiletina, comparado aos dados encontrados na literatura⁴⁷.

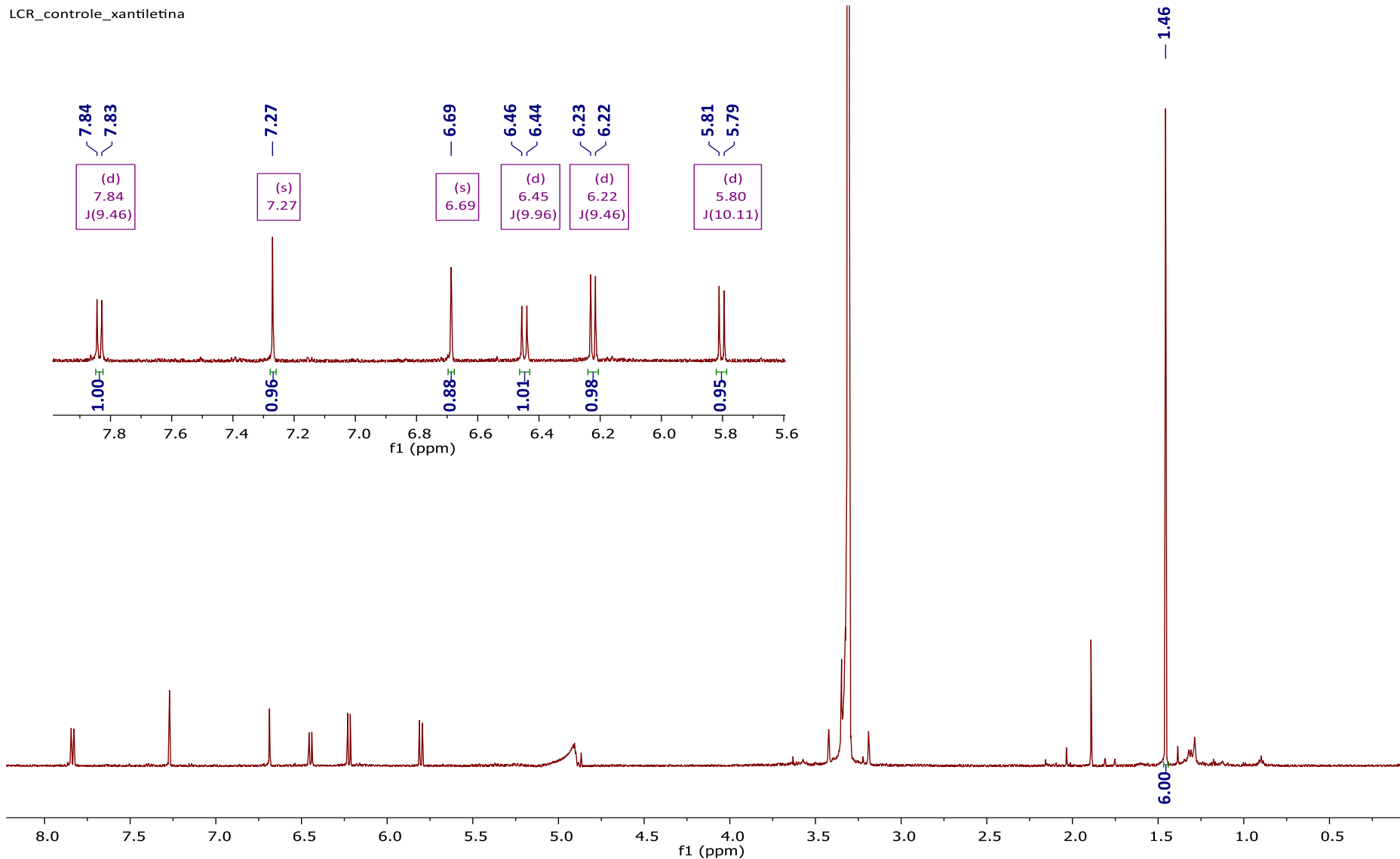


FIGURA 4.5.2.1. Espectro de RMN de ¹H (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de limão Cravo proveniente do experimento controle - LCR não marcada.

LCR_marcada_xantiletina

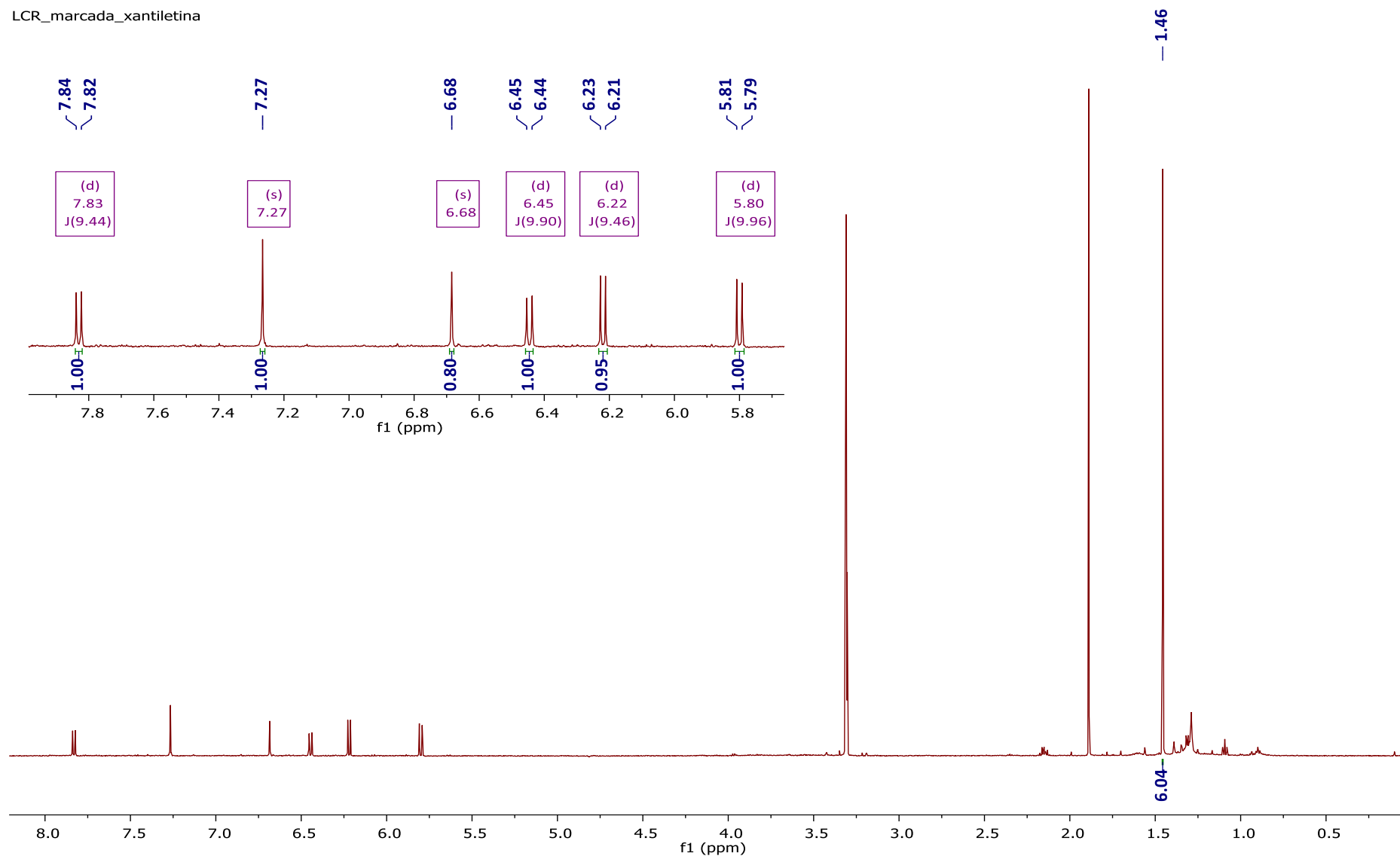


FIGURA 4.5.2.2. Espectro de RMN de ¹H (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de limão Cravo proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1-[¹³C] - LCR marcada.

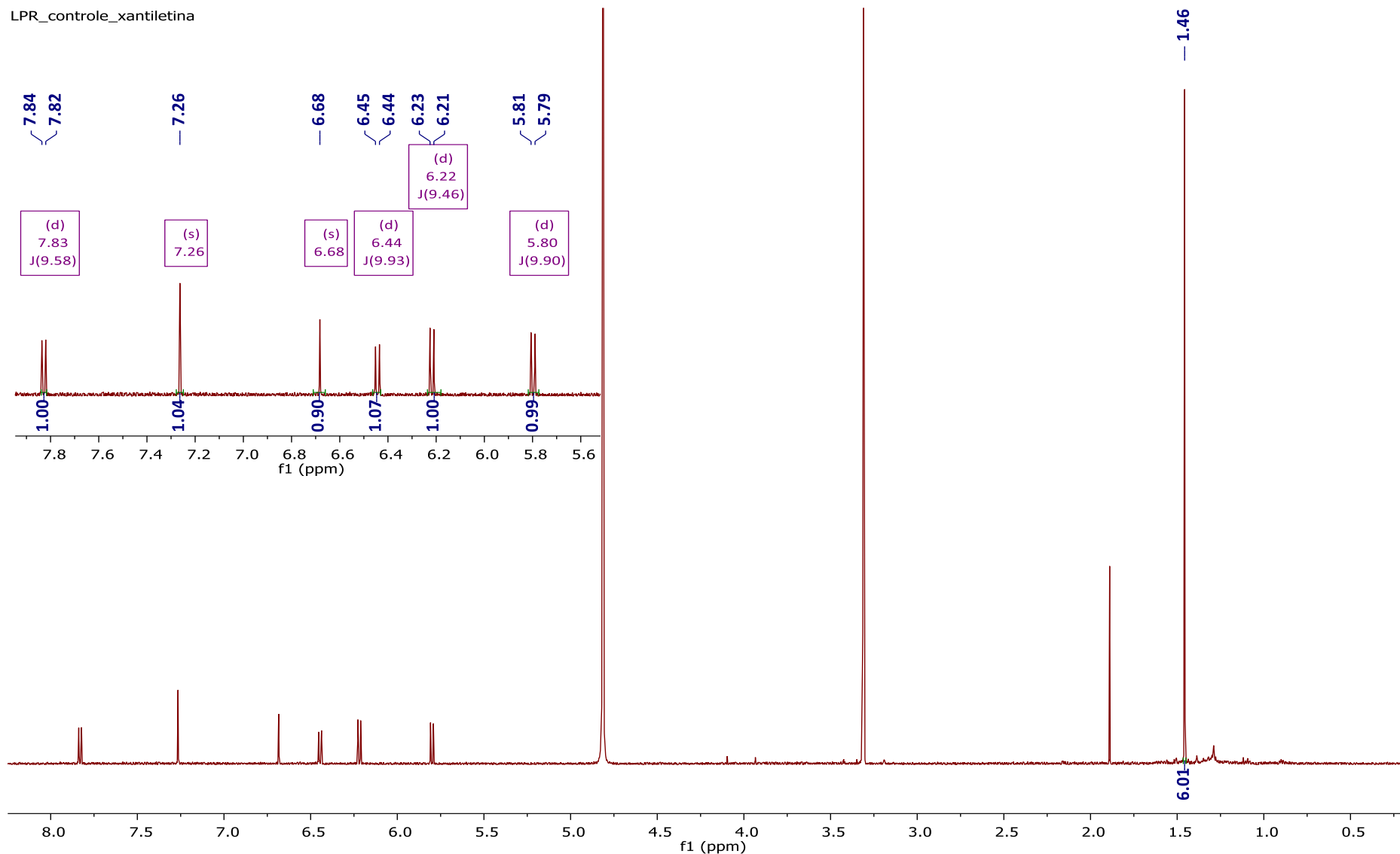


FIGURA 4.5.2.3. Espectro de RMN de ¹H (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento controle - LPR não marcada.

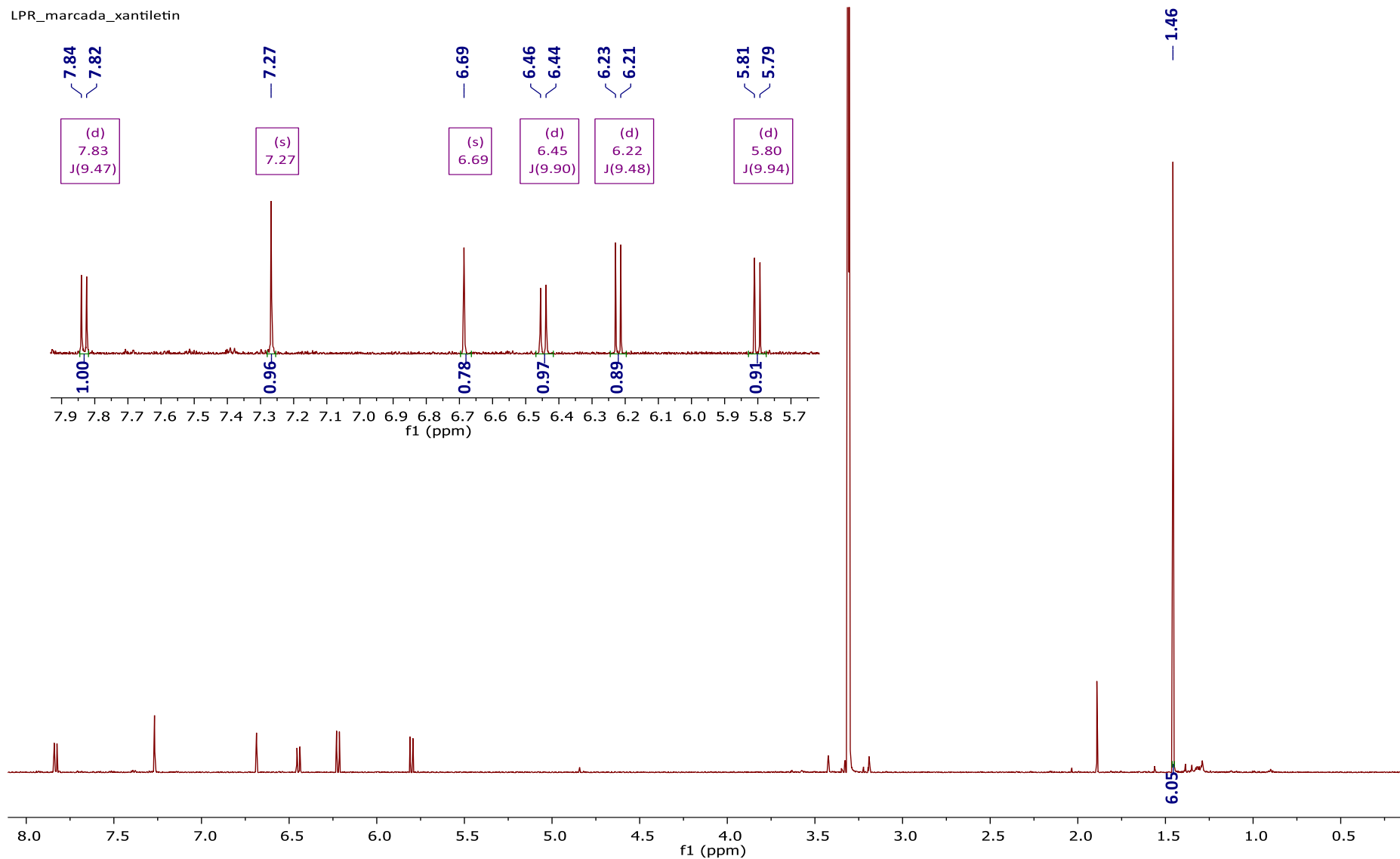


FIGURA 4.5.2.4. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LPR marcada.

TABELA 4.5.2.1. Dados de RMN de ^1H da xantiletina em comparação aos dados da literatura (KHAN, 1985)⁴⁷.

Nº H	δ ^1H b1 (LCR controle)	δ ^1H b1 (LCR marc)	δ ^1H b1 (LPR controle)	δ ^1H b1 (LPR marc)	δ ^1H xantiletina CDCl_3 (literatura)
3	6,22 (d)	6,22 (d)	6,22 (d)	6,22 (d)	6,21 (d)
4	7,84 (d)	7,83 (d)	7,83 (d)	7,83 (d)	7,57 (d)
5	7,27 (s)	7,26 (s)	7,26 (s)	7,27 (s)	7,04 (d)
8	6,69 (s)	6,68 (s)	6,68 (s)	6,69 (s)	6,71 (s)
3'	5,80 (d)	5,80 (d)	5,80 (d)	5,80 (d)	5,68 (s)
4'	6,45 (d)	6,45 (d)	6,45 (d)	6,44 (d)	6,33 (d)
5'	1,46 (s)	1,45 (s)	1,46 (s)	1,46 (s)	1,47 (s)
6'	1,46 (s)	1,45 (s)	1,46 (s)	1,46 (s)	1,47 (s)

Para auxiliar na determinação dos deslocamentos químicos de ^1H para a xantiletina, foi realizado o experimento bidimensional, Correlation Spectroscopy - COSY, que é usado para identificar spins que são acoplados um ao outro. Analisando o espectro (Figura 4.5.2.5) foi possível atribuir para cada hidrogênio da molécula seus hidrogênios vizinhos e seus respectivos δ_{H} .

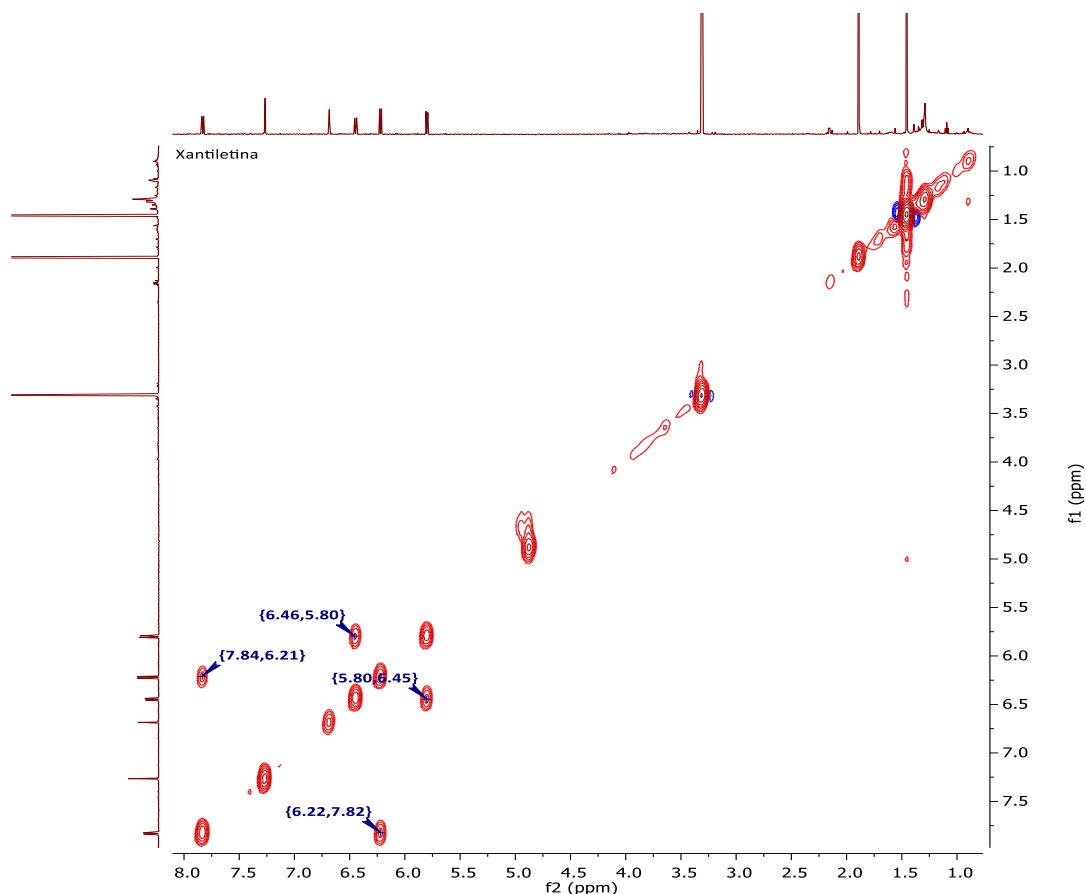


FIGURA 4.5.2.5. Experimento de COSY (600 MHz, MeOD) da banda 1 - xantiletina.

A Tabela 4.5.2.2 mostra os dados obtidos pelo experimento de COSY, e a figura 4.5.2.6 representa as correlações observadas para este experimento.

TABELA 4.5.2.2. Dados do experimento de COSY para a substância xantiletina.

F1		F2	
¹ H	δ	¹ H	δ
3	6,22 (d)	3 e 4	6,22 d - 7,83 (d)
4	7,83 (d)	3 e 4	6,22 d - 7,83 (d)
5	7,26 (s)	5	7,26 (s)
6	6,68 (s)	8	6,68 (s)
3'	5,80 (d)	3' e 4'	5,80 d - 6,45 (d)
4'	6,45 (d)	3' e 4'	5,80 d - 6,45 (d)
5' e 6'	1,45 (s)	5' e 6'	1,45 (s)

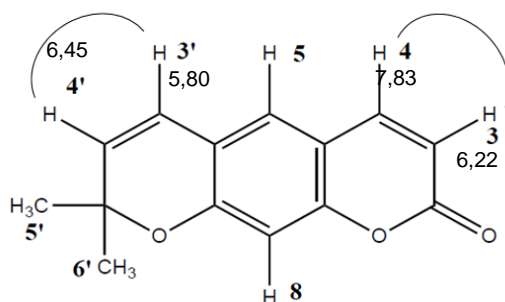


FIGURA 4.5.2.6. Correlações observadas no COSY para a xantiletina.

Também foi realizado o experimento bidimensional, heteronuclear single quantum correlation – HSQC, que fornece correlação entre o carbono e seus prótons diretamente ligados. A Figura 4.5.2.7 mostra as correlações observadas no experimento de HSQC e realizando a análise do espectro (FIGURA 4.5.2.8) foi possível atribuir para cada hidrogênio da molécula, o carbono ao qual este está diretamente ligado e o seu $\delta^{13}\text{C}$.

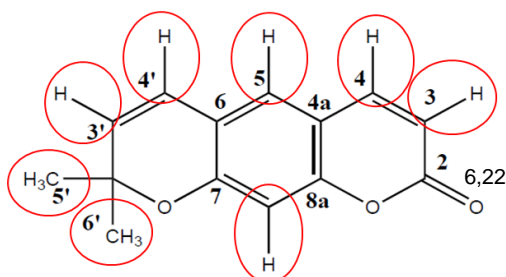


FIGURA 4.5.2.7. Correlações observadas no HSQC da xantiletina.

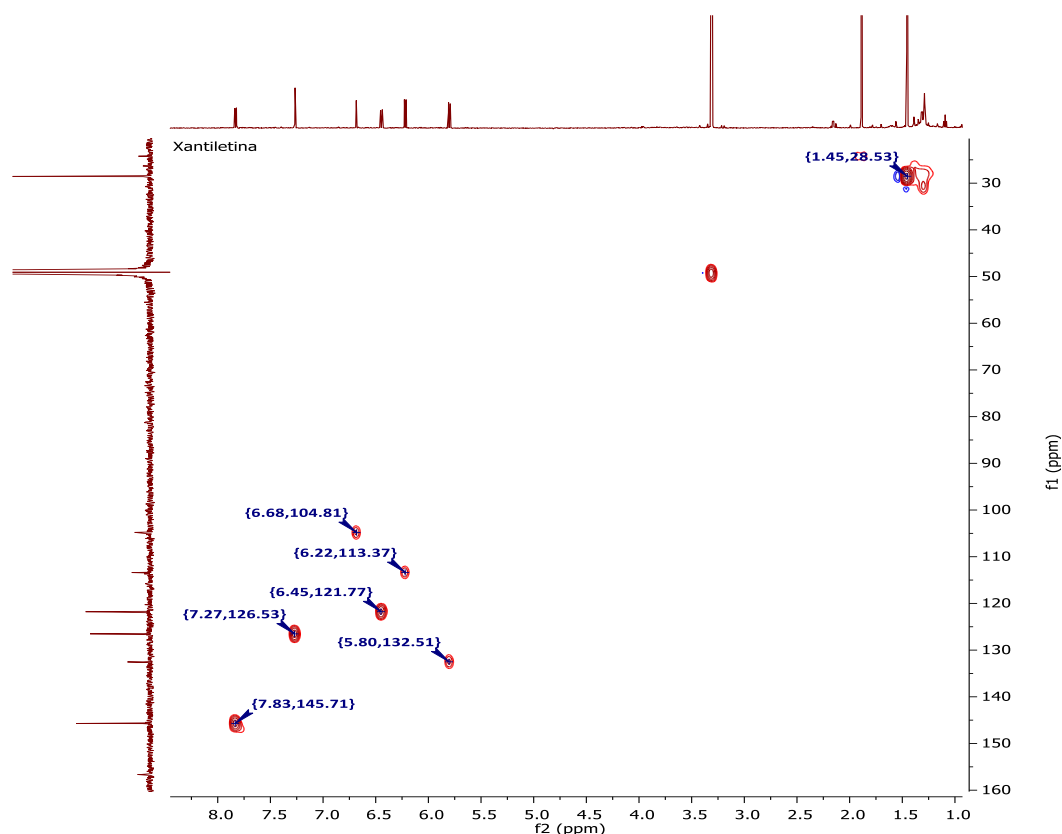


FIGURA 4.5.2.8. Experimento de HSQC (600 MHz, MeOD) da banda 1 - xantiletina.

Os dados referentes ao experimento de HSQC estão representados na tabela abaixo, que mostra as correlações entre ^1H - ^{13}C e os valores de $\delta_{^1\text{H}}$ e $\delta_{^{13}\text{C}}$. A partir da análise dos dados de HSQC para a substância xantiletina foi possível observar correlações para os carbonos C-3 (δ 113,4), C-4 (δ 145,7), C-5 (δ 126,5), C-6 (δ 104,8), C-3' (δ 132,5), C-4' (δ 121,8) e C-5' e 6' (δ 28,6). O experimento detectou todas as correlações ^1H - ^{13}C possíveis.

TABELA 4.5.2.3. Dados do experimento de HSQC para a substância xantiletina.

F 1		F 2	
^{13}C	δ	^1H	δ
3	113,4	3	6,22 (d)
4	145,7	4	7,83 (d)
5	126,5	5	7,26 (s)
6	104,8	8	6,68 (s)
3'	132,5	3'	5,80 (d)
4'	121,8	4'	6,45 (d)
5' e 6'	28,6	5' e 6'	1,45 (s)

A Figura 4.5.2.9 mostra a comparação dos espectros de ^{13}C da banda 1, referente a xantiletina isolada da amostra da raiz de limão Cravo marcada através da incorporação de glicose-1- ^{13}C em vermelho e da amostra controle, com abundância isotópica natural em azul. O espectro da substância marcada (Figura 4.5.2.10) foi comparado àquele da substância não marcada (Figura 4.5.2.11), sendo que ambos foram obtidos nas mesmas condições experimentais, com todos os parâmetros ajustados de forma idêntica. A determinação da abundância de ^{13}C foi realizada através da integral dos sinais referentes a substância marcada/enriquecida e da substância não marcada/não enriquecida usando a seguinte fórmula $\Delta^{13}\text{C} = 1,1\% \times (\text{integral enriquecido} / \text{integral controle})$.

A Tabela 4.5.2.4 mostra o aumento relativo dos sinais de ^{13}C nos carbonos C-4, C-5, C-8a, C-4' e C-5'. As marcações em C-8a, C-4 e C-5, referente aos carbonos que compõem o anel aromático e o anel lactônico do esqueleto cumarínico é proveniente do caminho do Chiquimato (Figura 4.5.2.9). As marcações observadas em C-4' e C-5' são provenientes da incorporação de uma unidade de IPP (difosfato de isopentila). Estes resultados demonstraram que a porção isoprênica da xantiletina isolada do limão Cravo, deriva exclusivamente da via MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato - triose/piruvato), pois apenas os carbonos C-1 e C-5 da unidade de IPP foram enriquecidos, onde o C-1 do IPP é referente ao C-4' da xantiletina (δ 121,8) e C-5 referente ao C-5' da xantiletina (δ 28,6).

TABELA 4.5.2.4. Abundância de ^{13}C da xantiletina, isolada da raiz do limão Cravo após a incorporação de glicose-1- ^{13}C .

^{13}C	δ	LCR marc Integral	LCR controle Integral	$\Delta^{13}\text{C}$
3	113,4	1,00	1,06	1,04
4	145,7	4,50	1,01	4,90
5	126,5	3,57	1,07	3,67
8	104,8	0,73	0,99	1,10
8a	156,6	0,98	0,26	4,15
a3'	132,5	1,00	1,00	1,10
4'	121,8	3,85	1,02	4,15
5' e 6'	28,6	6,64	2,09	3,49

$\Delta^{13}\text{C} = 1,1\% \times (\text{enriquecido}/\text{controle})$ representa o aumento na intensidade relativa (aumentos significativos para carbonos enriquecidos estão em negrito). ^a Usado como referência.

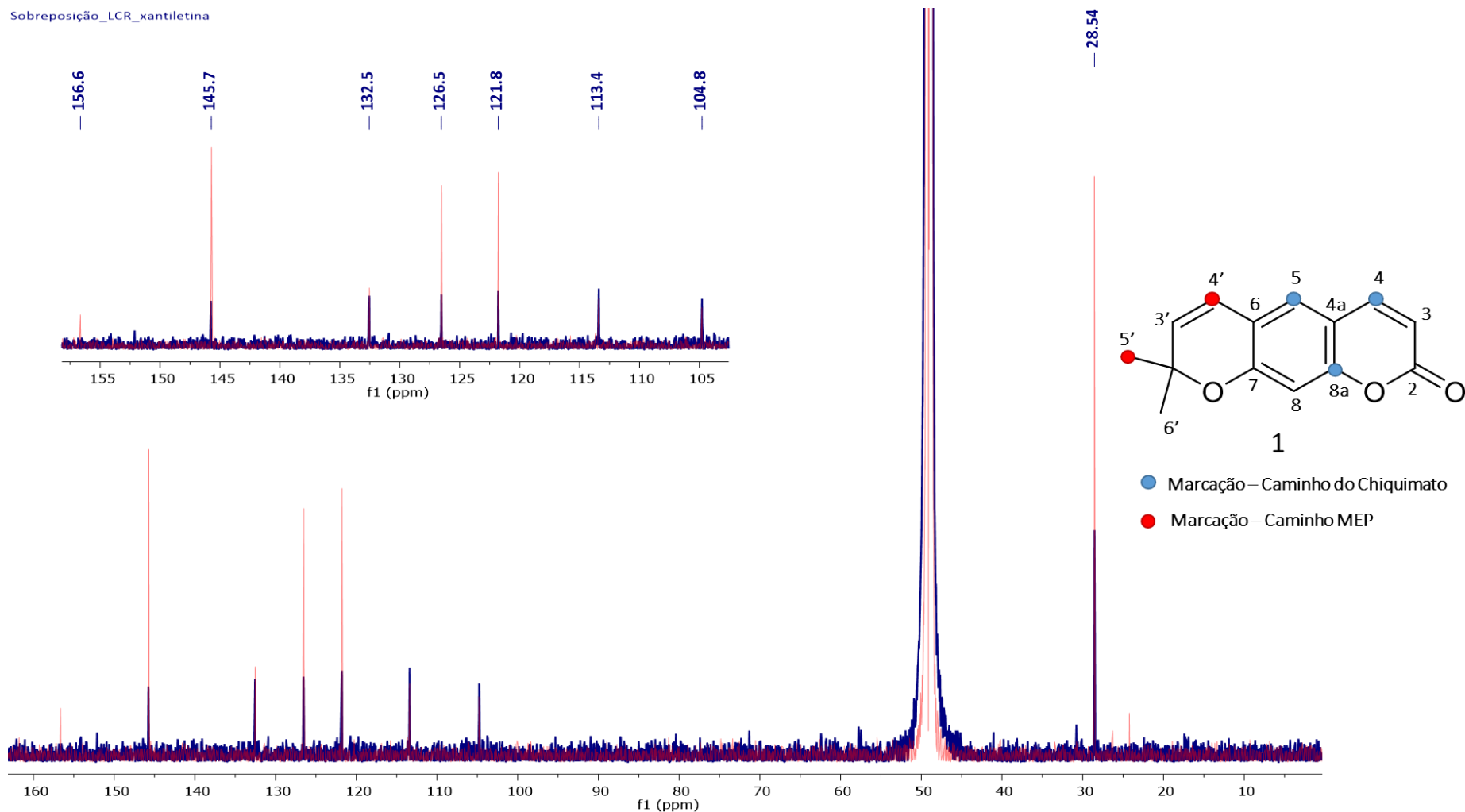


FIGURA 4.5.2.9. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da banda 1 - xantiletina: da amostra da raiz de limão Cravo proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LCR marcada em vermelho e de limão Cravo controle - LCR controle em azul. Estrutura da xantiletina - em azul a marcação proveniente do caminho do Chiquimato e em vermelho a marcação proveniente do caminho do MEP.

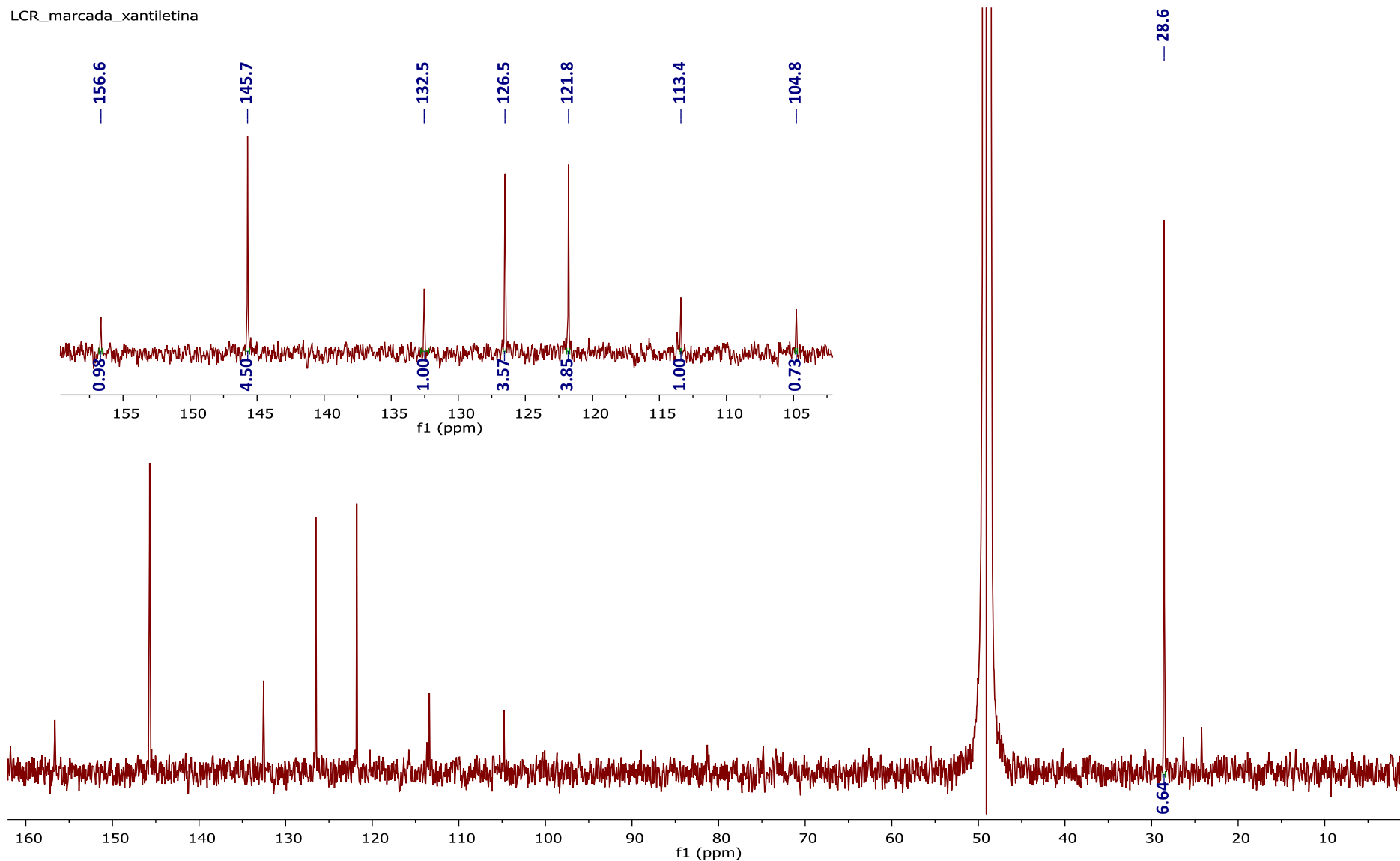


FIGURA 4.5.2.10. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de limão Cravo do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LCR marcada.

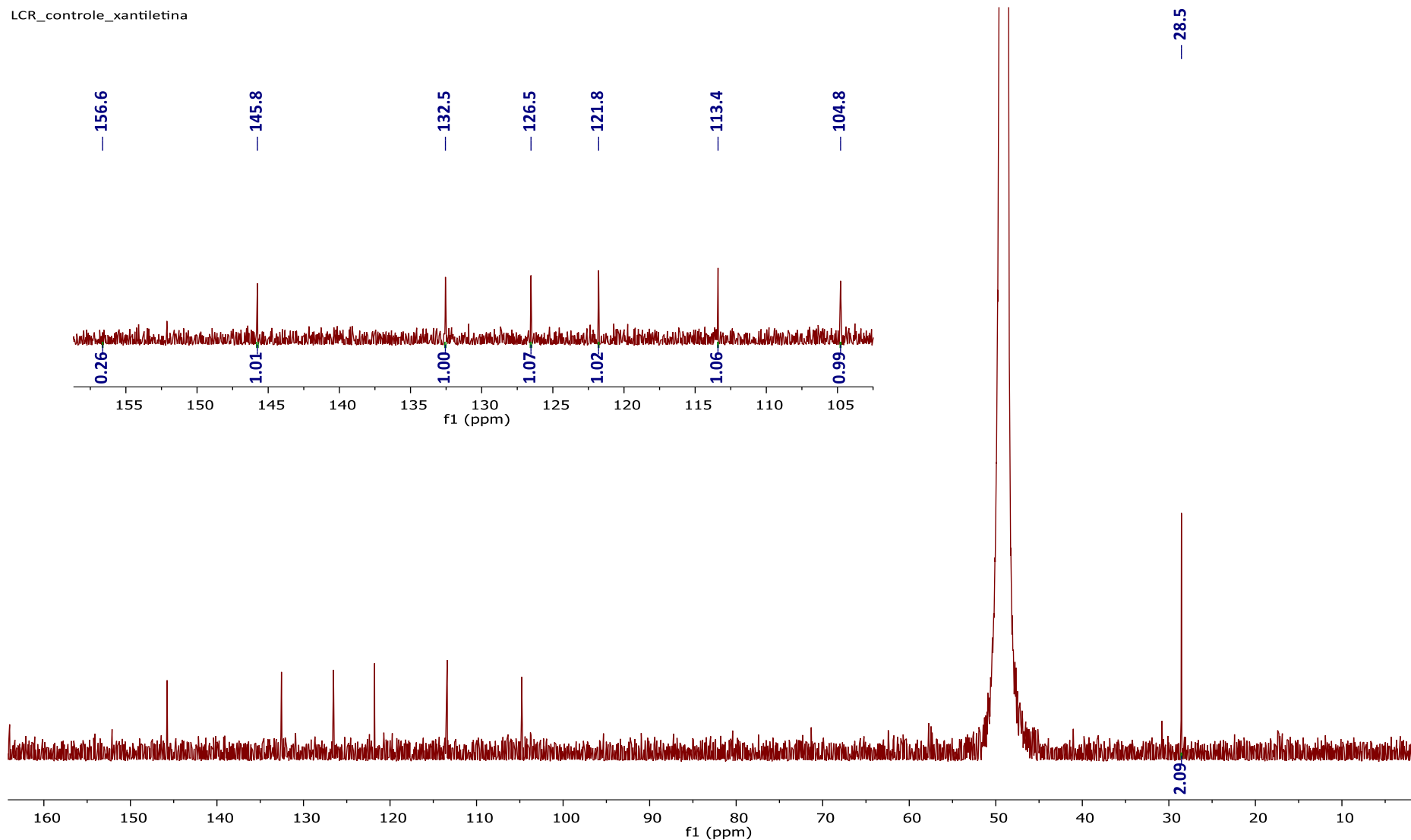


FIGURA 4.5.2.11. Espectros de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de limão Cravo do experimento controle, com abundância isotópica natural - LCR controle.

A Figura 4.5.2.12 mostra a comparação dos espectros de ^{13}C da banda 1, referente a xantiletina isolada da amostra da raiz de laranja Pêra marcada através da incorporação de glicose-1- ^{13}C em vermelho e da amostra controle, com abundância isotópica natural em azul. O espectro da substância marcada (Figura 4.5.2.13) foi comparado àquele da substância não marcada (Figura 4.5.2.14). A determinação da abundância de ^{13}C foi realizada conforme descrito anteriormente para a xantiletina isolada do limão Cravo.

A Tabela 4.5.2.5 mostra o aumento relativo dos sinais de ^{13}C nos carbonos C-4, C-5, C-8^a, C-4' e C-5'. As marcações em C-4 e C-5 e C8a, são referentes aos carbonos que compõem o anel aromático e o anel lactônico do esqueleto cumarínico, proveniente do caminho do Chiquimato (Figura 4.5.2.12). As marcações observadas em C-4' e C-5' são provenientes da incorporação de uma unidade de IPP (difosfato de isopentila). Estes resultados demonstraram que a porção isoprênica da xantiletina isolada da laranja Pêra, assim como para o limão Cravo, deriva exclusivamente da via MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato-triose/piruvato), pois apenas os carbonos C-1 e C-5 da unidade de IPP foram enriquecidos, onde o C-1 do IPP corresponde ao C-4' da xantiletina (δ 121,0) e C-5 ao C-5' da xantiletina (δ 28,00). Se o IPP fosse proveniente da via do MVA, o enriquecimento seria detectado nos carbonos C-3', C-5' e C-4', e se fosse via mista nos carbonos C-3', C4', C-5' e C-6'.

TABELA 4.5.2.5. Abundância de ^{13}C da xantiletina, isolada da raiz de laranja Pêra após a incorporação de glicose-1- ^{13}C .

^{13}C	δ	LPR marc Integral	LPR controle Integral	Δ ^{13}C
3	113,4	1,03	0,99	1,14
4	145,7	4,07	1,04	4,30
5	126,5	3,49	1,01	3,80
8	104,8	1,00	1,00	1,10
8a	156,6	0,63	0,16	4,33
^a 3'	132,5	1,00	1,00	1,10
4'	121,8	3,68	1,02	3,97
5' e 6'	28,6	7,48	2,00	4,11

$\Delta^{13}\text{C} = 1,1\% \times (\text{enriquecido}/\text{controle})$ representa o aumento na intensidade relativa (aumentos significativos para carbonos enriquecidos estão em negrito). ^a Usado como referência.

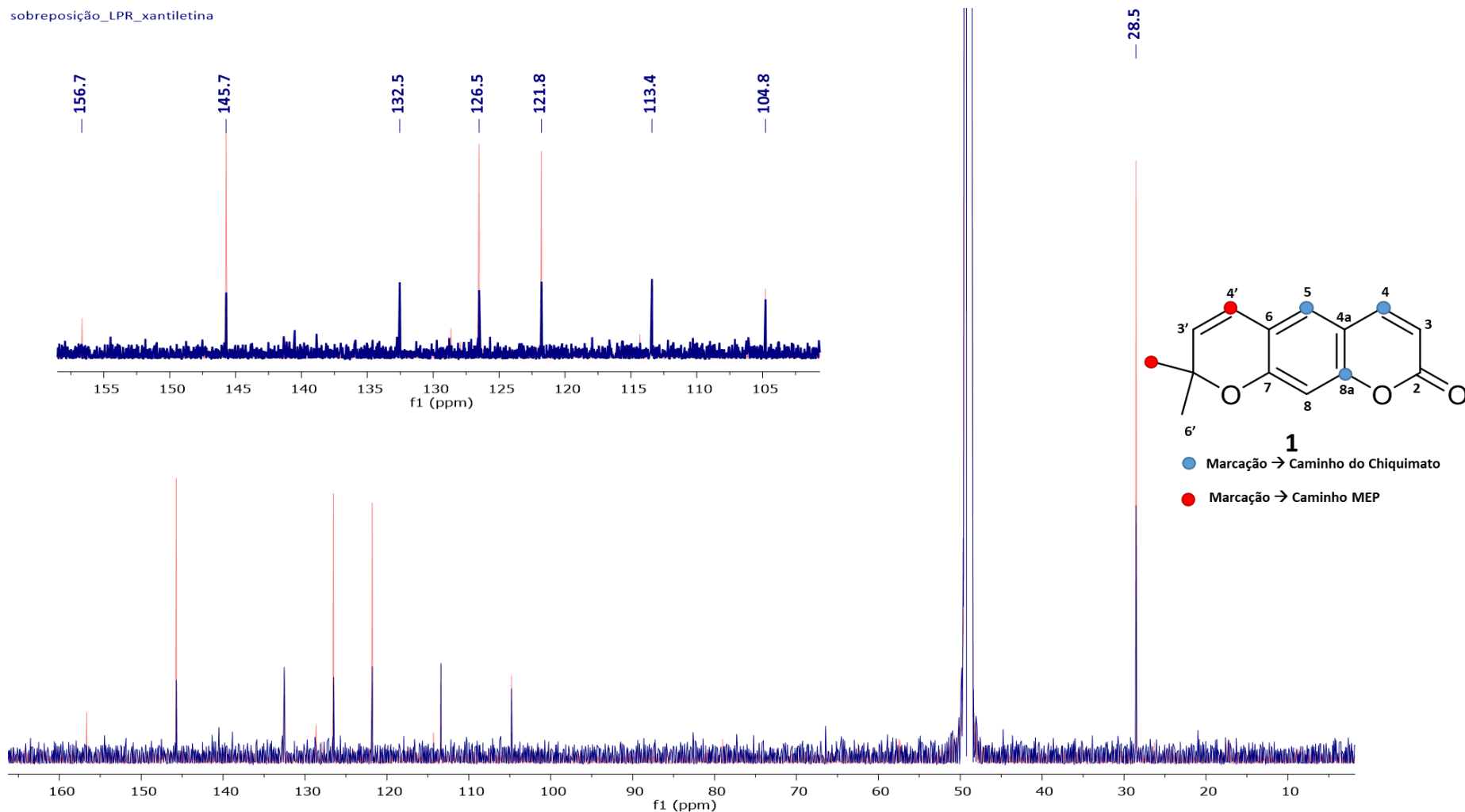


FIGURA 4.5.2.12. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da banda 1 - xantiletina: da amostra da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LPR marcada em vermelho e de laranja Pêra controle - LPR controle em azul. Estrutura da xantiletina - em azul a marcação proveniente do caminho do Chiquimato e em vermelho a marcação proveniente do caminho do MEP.

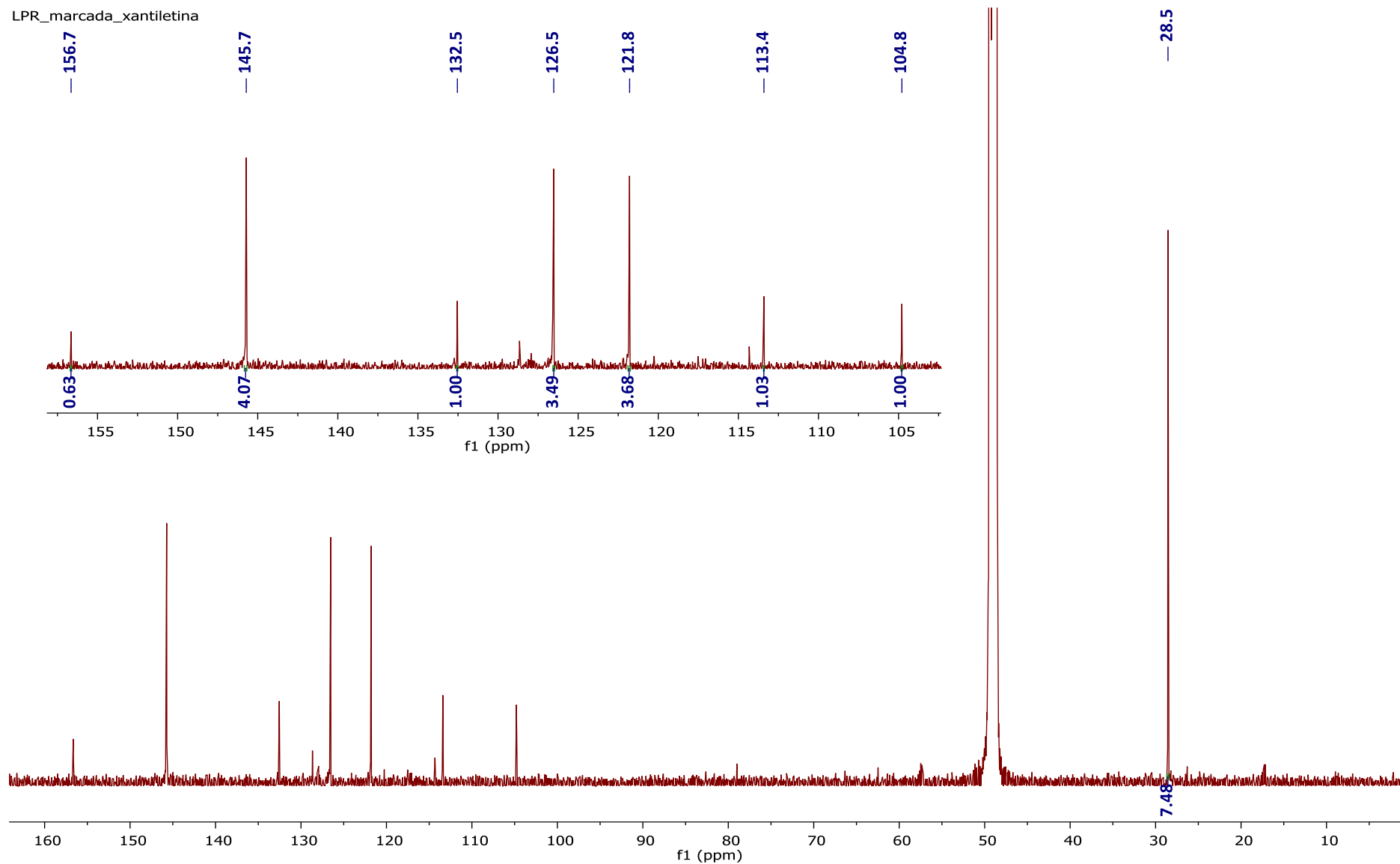


FIGURA 4.5.2.13. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de laranja Pêra do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LPR marcada.

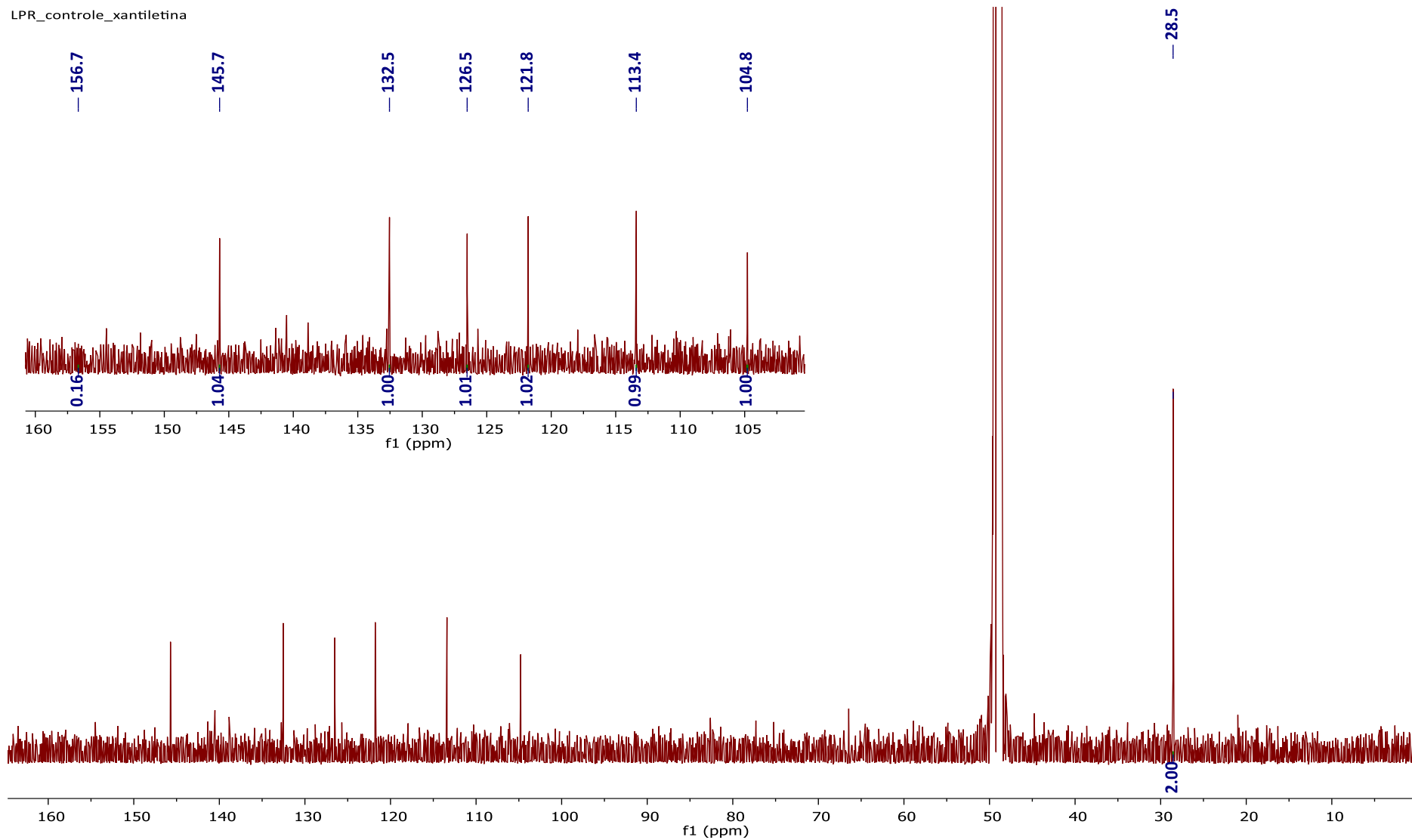


FIGURA 4.5.2.14. Espectros de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da xantiletina isolada da raiz de laranja Pêra do experimento controle, com abundância isotópica natural - LPR controle.

4.5.3. Biossíntese da seselina em raiz de *C. sinensis* e *C. limonia*

Os espectros de RMN de ^1H da banda 2, isolada de amostras de limão Cravo controle, mostrada na Figura 4.5.3.1, de limão Cravo na qual foi realizado experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C Figura 4.5.3.2, de laranja Pêra controle Figura 4.5.3.3 e de laranja Pêra com marcação Figura 4.5.3.4, comprovam a pureza das substâncias isoladas de cada uma das amostras e possibilitou a identificação da substância seselina.

No espectro de RMN ^1H para banda 2 trapeada, foi possível observar 6 dubletos e um singlete com δ 1,47, referentes aos hidrogênios das duas metilas 5' e 6' da seselina. Assim como para a banda 1, a substância da banda 2 apresentou sinais que caracterizam a classe estrutural das cumarinas, com dois dubletos característicos em δ 6,24 e 7,85 referentes aos hidrogênios do anel lactônico H-3 e H-4. Foi possível identificar também os sinais dos hidrogênios referentes ao anel pirano, proveniente da ciclização de uma prenila. Estes consistem em um par de dubletos em δ 5,86 e 6,83, que correspondem a H-3' e H-4', respectivamente.

Verificou-se também a presença de mais dois dubletos em δ 6,76 (d, $J = 8,5$ Hz) e 7,38 (d, $J = 8,4$ Hz) referentes aos hidrogênios H-6 e H-5 respectivamente. Os dubletos com constante de acoplamento de 8,5 Hz é característico de grupos "orto" de anel aromático. Sugere-se dessa maneira que o anel pirano encontra-se dessa vez nas posições C-7 e C-8 do anel aromático do esqueleto da cumarina, levando a uma piranocumarina angular.

O espectro de RMN ^1H da seselina que possui fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ apresentou 7 sinais sendo que o sinal δ_{H} 1,47 é equivalente a seis hidrogênios referentes as duas metilas 6' e 5', totalizando os 12 hidrogênios da molécula. A Tabela 4.5.3.1 mostra os dados de ^1H para a seselina, comparado aos dados encontrados na literatura⁸³.

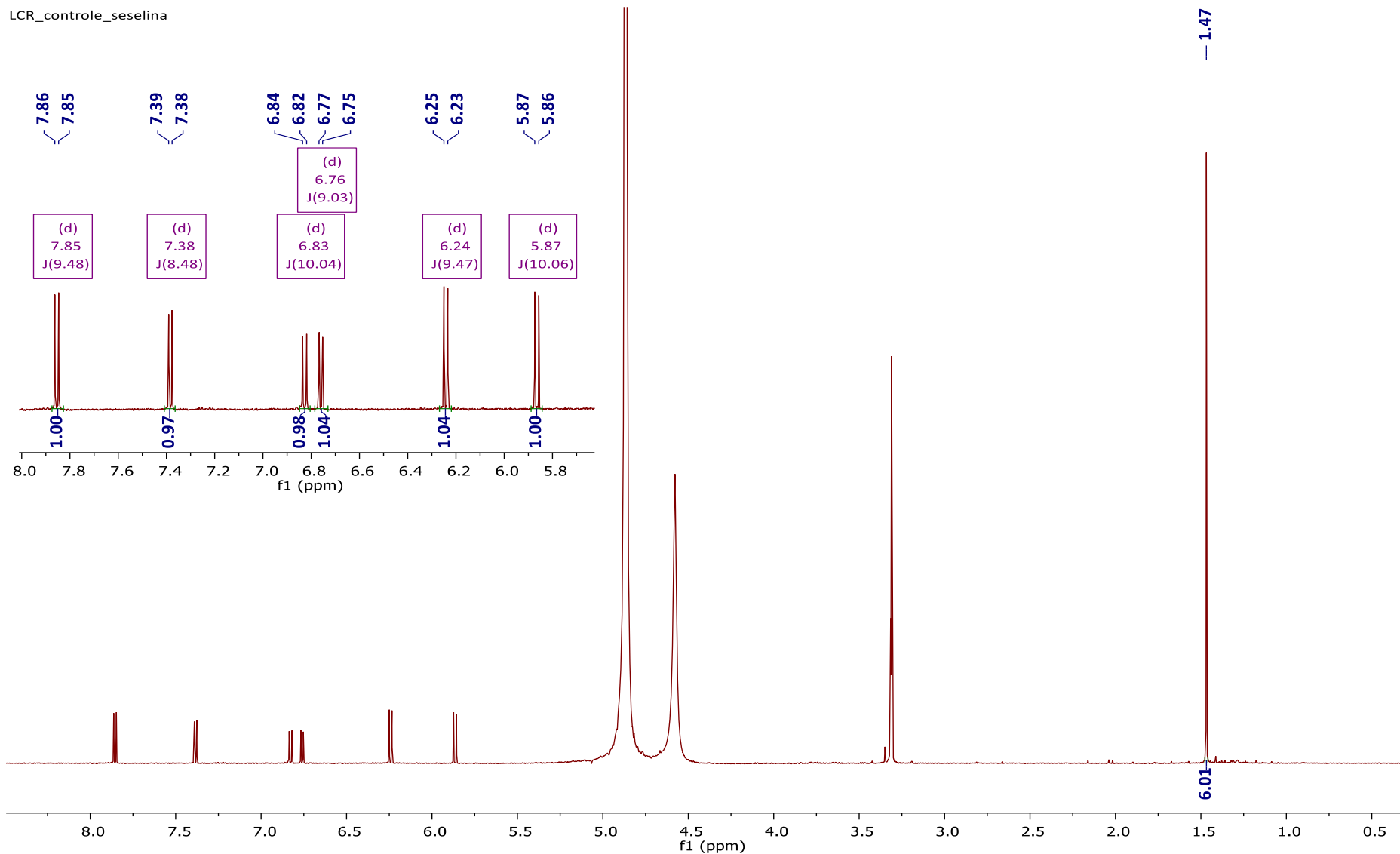


FIGURA 4.5.3.1. Espectro de RMN de ¹H (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de limão Cravo proveniente do experimento controle - LCR não marcada.

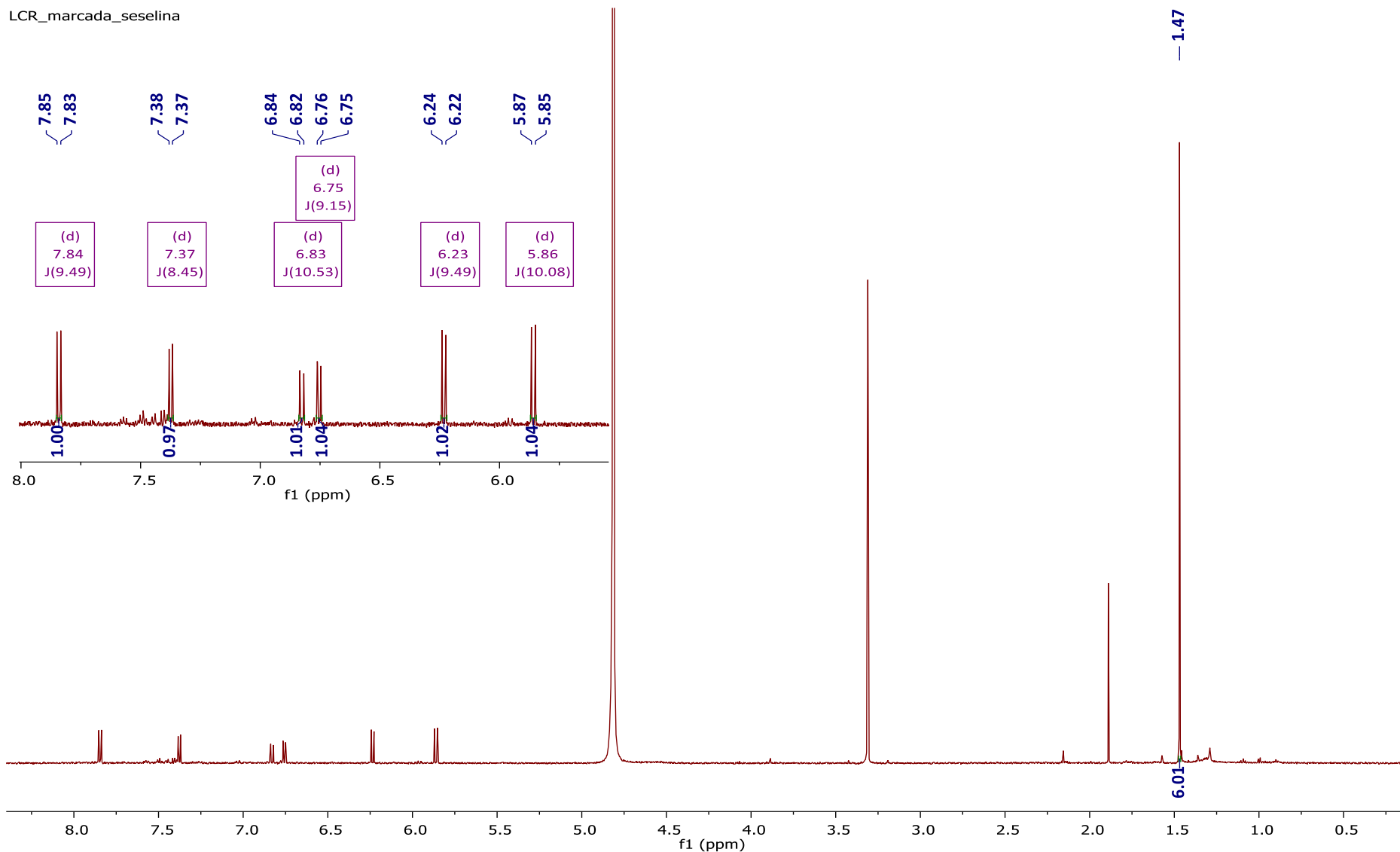


FIGURA 4.5.3.2. Espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de limão Cravo proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LCR marcada.

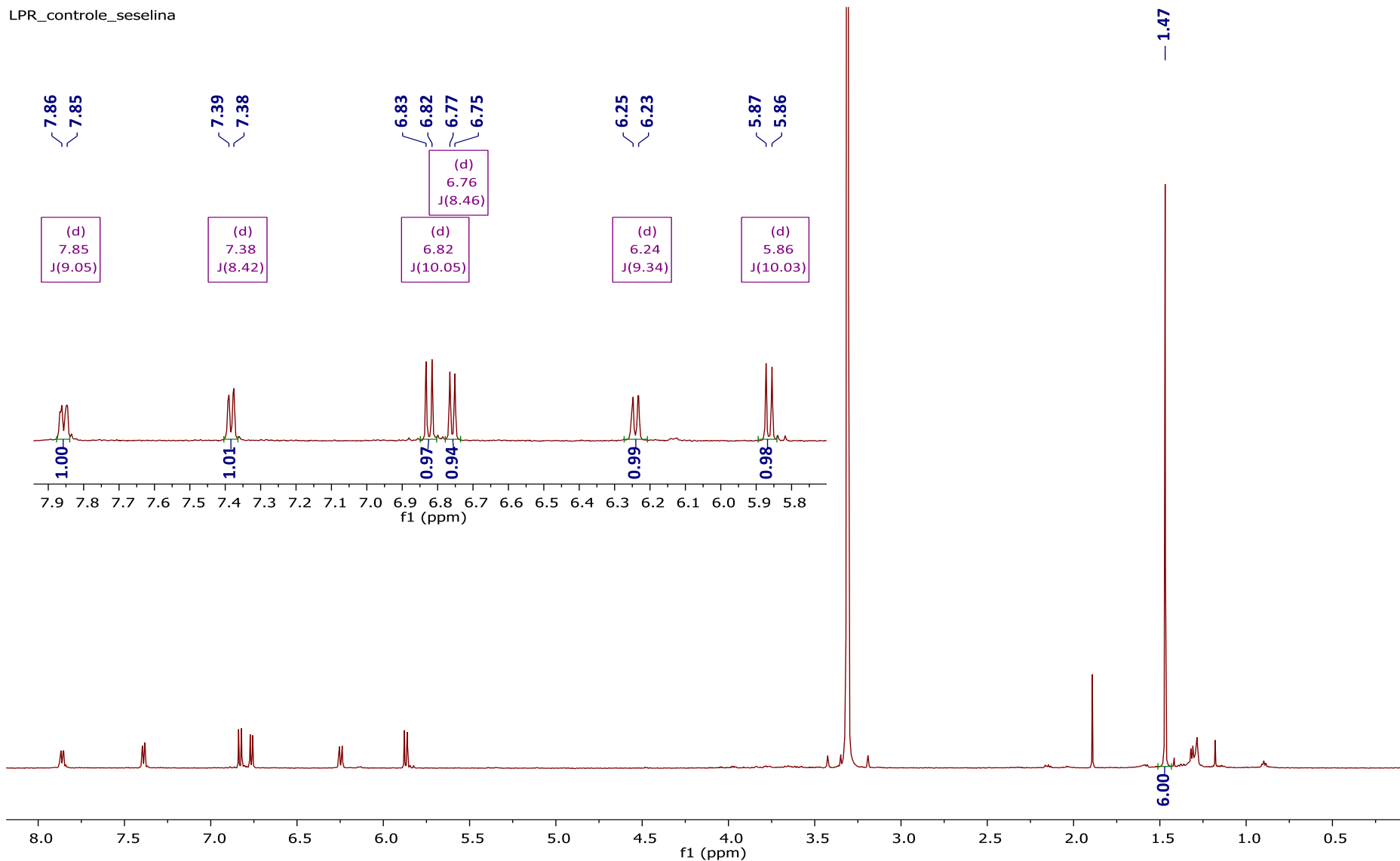


FIGURA 4.5.3.3. Espectro de RMN de ¹H (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento controle - LPR não marcada.

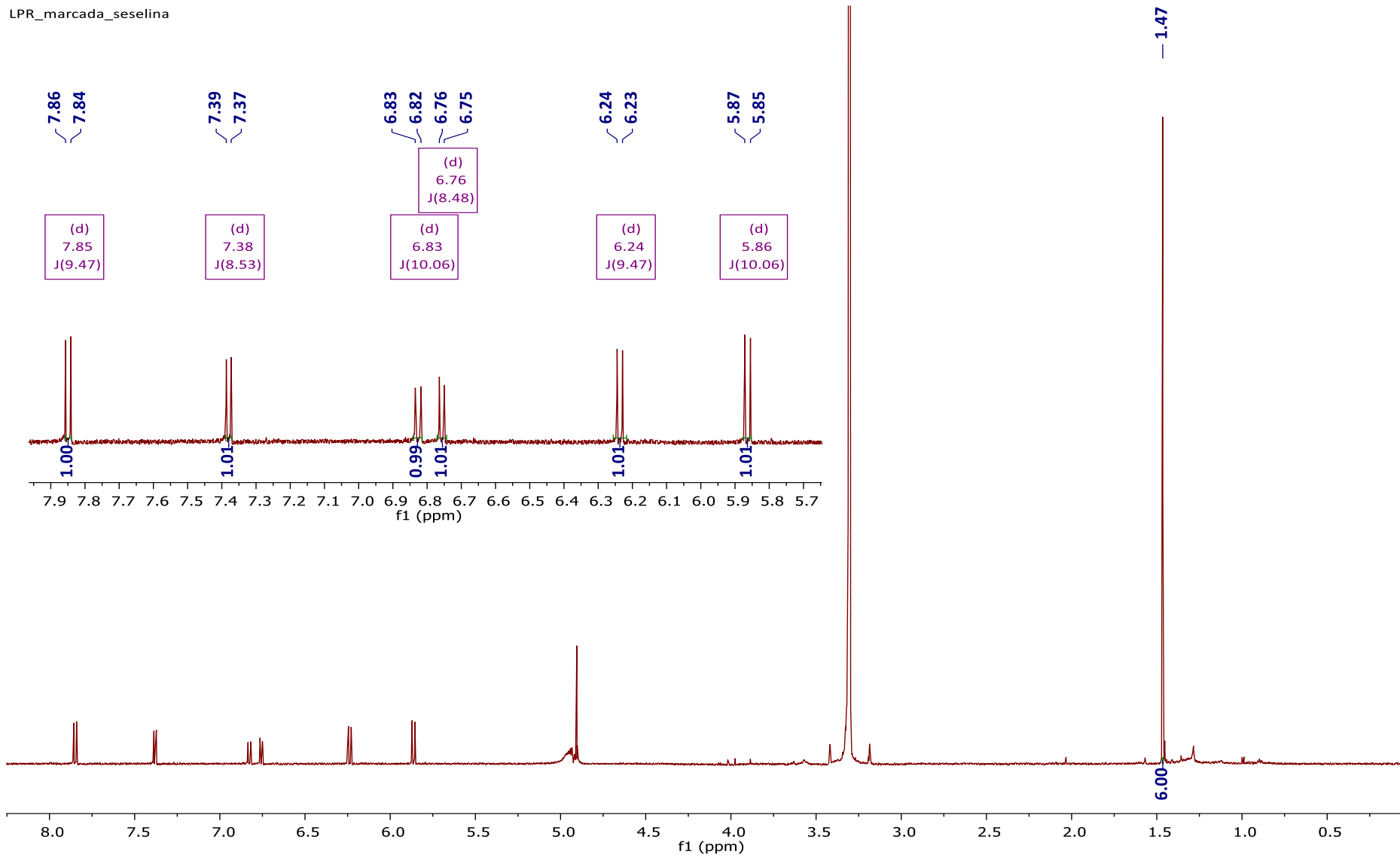


FIGURA 4.5.3.4. Espectro de RMN de ¹H (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de laranja Pêra proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1-[¹³C] - LPR marcada.

TABELA 4.5.3.1. Dados de RMN de ^1H da banda 2 (seselina) em comparação aos dados da literatura (AHMAD, 1984)⁸³.

Nº H	δ ^1H b2 (LCR controle)	δ ^1H b2 (LCR marc)	δ ^1H b2 (LPR controle)	δ ^1H b2 (LPR marc)	δ ^1H xantiletina CDCl ₃ (literatura)
3	6,24 (d)	6,23 (d)	6,24 (d)	6,24 (d)	6,23 (d)
4	7,85 (d)	7,84 (d)	7,85 (d)	7,85 (d)	7,60 (d)
5	7,38 (d)	7,37 (d)	7,38 (d)	7,38 (d)	7,21 (d)
6	6,76 (d)	6,75 (d)	6,76 (d)	6,76 (d)	6,72 (d)
3'	5,87 (d)	5,86 (d)	5,86 (d)	5,86 (d)	5,73 (d)
4'	6,83 (d)	6,83 (d)	6,82 (d)	6,83 (d)	6,89 (d)
5'	1,47 (s)	1,47 (s)	1,47 (s)	1,47 (s)	1,48 (s)
6'	1,47 (s)	1,47 (s)	1,47 (s)	1,47 (s)	1,48 (s)

Para auxiliar na determinação dos deslocamentos químicos de ^1H para a seselina, foi realizado o experimento bidimensional, Correlation Spectroscopy - COSY, Figura 4.5.3.5. Através deste experimento foi possível atribuir para cada hidrogênio da molécula seus hidrogênios vizinhos e seus respectivos δ_{H} .

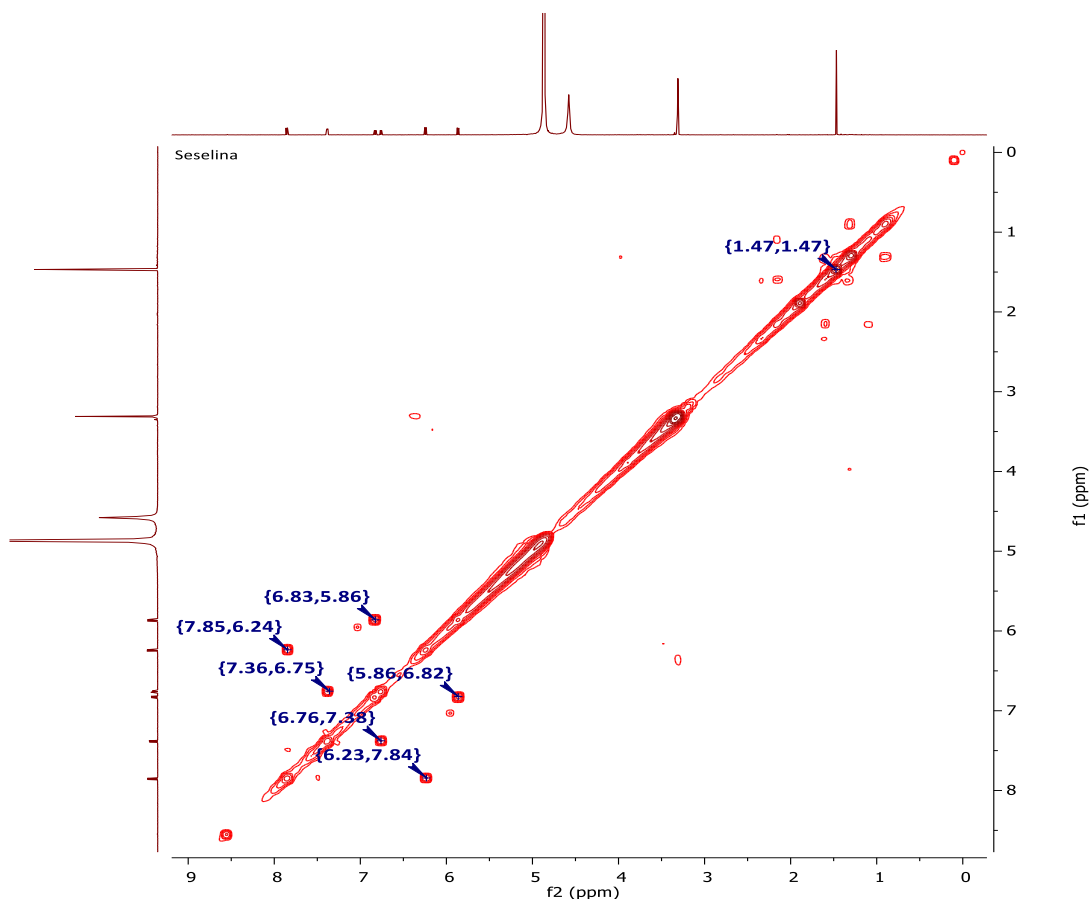


FIGURA 4.5.3.5. Experimento de COSY (600 MHz, MeOD) da banda 2 - seselina.

A Tabela 4.5.3.2 mostra os dados obtidos pelo experimento de COSY, e a Figura 4.5.3.6 representa as correlações entre H-3 e H-4; H-5 e H-6 e H-3' e H-4', observadas para este experimento. O acoplamento entre H-5 e H-6, possibilitou a confirmação de que b2, trata-se realmente da piranocumarina angular (seselina), que é dissubstituída em C-7 e C-8.

TABELA 4.5.3.2. Dados do experimento de COSY para a substância seselina.

F1		F2	
¹ H	δ	¹ H	δ
3	6,24 (d)	3 e 4	6,24 <i>d</i> - 7,85 (d)
4	7,85 (d)	3 e 4	6,24 <i>d</i> - 7,85 (d)
5	7,38 (d)	5 e 6	7,38 <i>d</i> - 6,76 (d)
6	6,76 (d)	5 e 6	7,38 <i>d</i> - 6,76 (d)
3'	5,86 (d)	3' e 4'	5,86 <i>d</i> - 6,83 (d)
4'	6,83 (d)	3' e 4'	5,86 <i>d</i> - 6,83 (d)
5' e 6'	1,47 (s)	5' e 6'	1,47 (s)

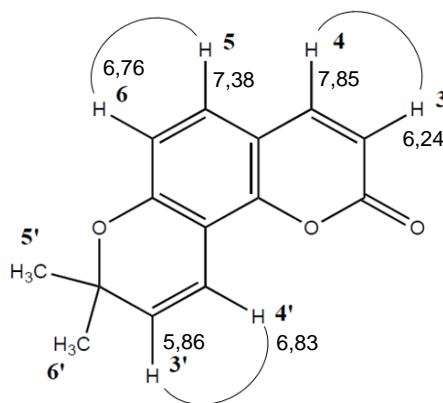


FIGURA 4.5.3.6. Correlações observadas no COSY para a seselina.

Também foi realizado o experimento bidimensional, Heteronuclear Single Quantum Correlation – HSQC, que fornece correlação entre o carbono e seus prótons diretamente ligados. A Figura 4.5.3.8 mostra as correlações observadas no experimento de HSQC e realizando a análise do espectro (FIGURA 4.5.3.7) foi possível atribuir para cada hidrogênio da molécula, o carbono ao qual este está diretamente ligado e o seu $\delta^{13}\text{C}$.

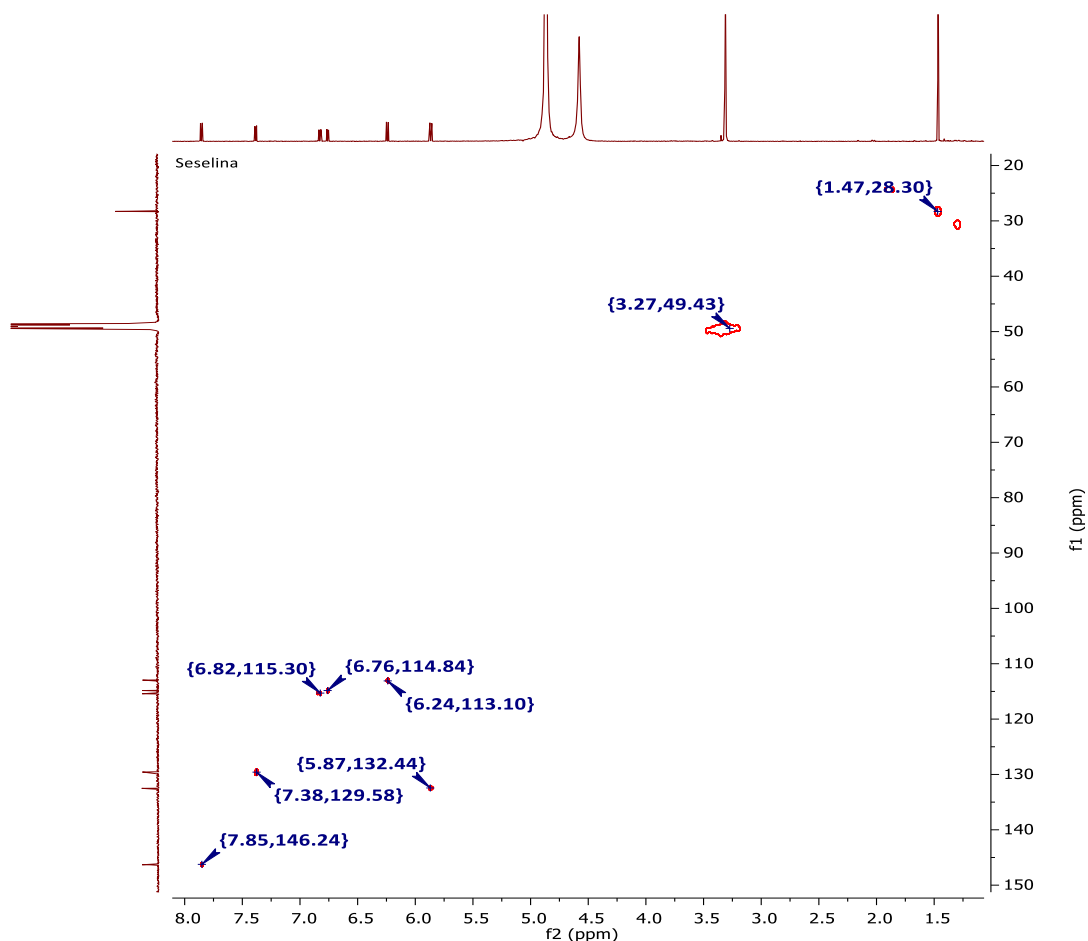


FIGURA 4.5.3.7. Experimento de HSQC (600 MHz, MeOD) da banda 2 - seselina.

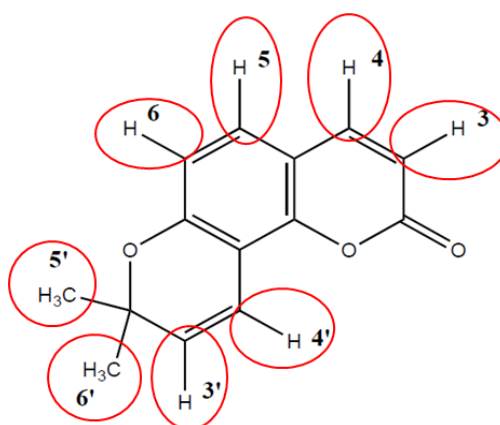


FIGURA 4.5.3.8. Correlações observadas no HSQC da seselina.

Os dados referentes ao experimento de HSQC estão representados na tabela abaixo, que mostra as correlações entre ^1H - ^{13}C e os valores de $\delta_{^1\text{H}}$ e $\delta_{^{13}\text{C}}$. A partir da análise dos dados de HSQC para a substância seselina foi possível observar correlações para os carbonos C-3 (δ 113,0), C-4 (δ 146,2), C-5 (δ 129,5),

C-6 (δ 114,8), C-3' (δ 132,5), C-4' (δ 115,5) e C-5' e 6' (δ 28,3). O experimento detectou todas as correlações ^1H - ^{13}C possíveis.

TABELA 4.5.3.3. Dados do experimento de HSQC para a substância seselina.

F 1		F 2	
^{13}C	δ	^1H	δ
3	113,0	3	6,24 (d)
4	146,2	4	7,85 (d)
5	129,5	5	7,38 (d)
6	114,8	8	6,75 (d)
3'	132,5	3'	5,86 (d)
4'	115,5	4'	6,83 (d)
5' e 6'	28,3	5' e 6'	1,47 (s)

Após feita a determinação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ para a seselina, realizou-se a comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C da substância controle/não marcada com os espectros da substância enriquecida/marcada. A Figura 4.5.3.9 mostra a comparação dos espectros de ^{13}C da banda 2, referente a seselina isolada da amostra da raiz de limão Cravo marcada através da incorporação de glicose-1- $[^{13}\text{C}]$ em vermelho e da amostra controle, com abundância isotópica natural em azul. O espectro da substância marcada (Figura 4.5.3.10) foi comparado àquele da substância não marcada (Figura 4.5.2.11), sendo que ambos foram obtidos nas mesmas condições experimentais, com todos os parâmetros ajustados de forma idêntica.

A determinação da abundância de ^{13}C foi realizada através da integral dos sinais referentes a substância marcada/enriquecida e dos sinais referentes à substância não marcada/não enriquecida conforme já descrito para a xantiletina na seção 4.5.2.

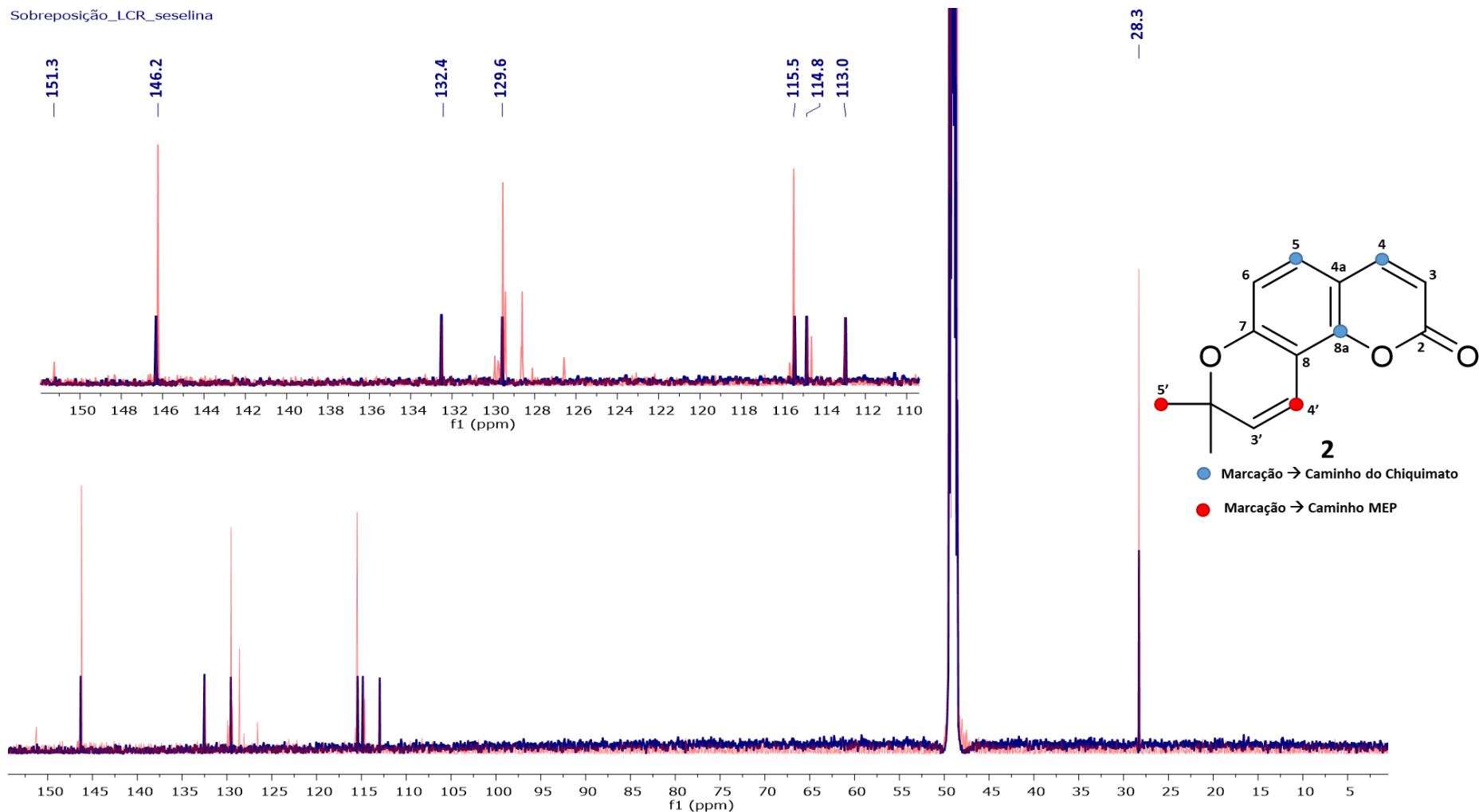


FIGURA 4.5.3.9. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da banda 2 - seselina: da amostra da raiz de limão Cravo proveniente do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LCR marcada em vermelho e de limão Cravo controle - LCR controle em azul. Estrutura da seselina - em azul a marcação proveniente do caminho do Chiquimato e em vermelho a marcação proveniente do caminho do MEP.

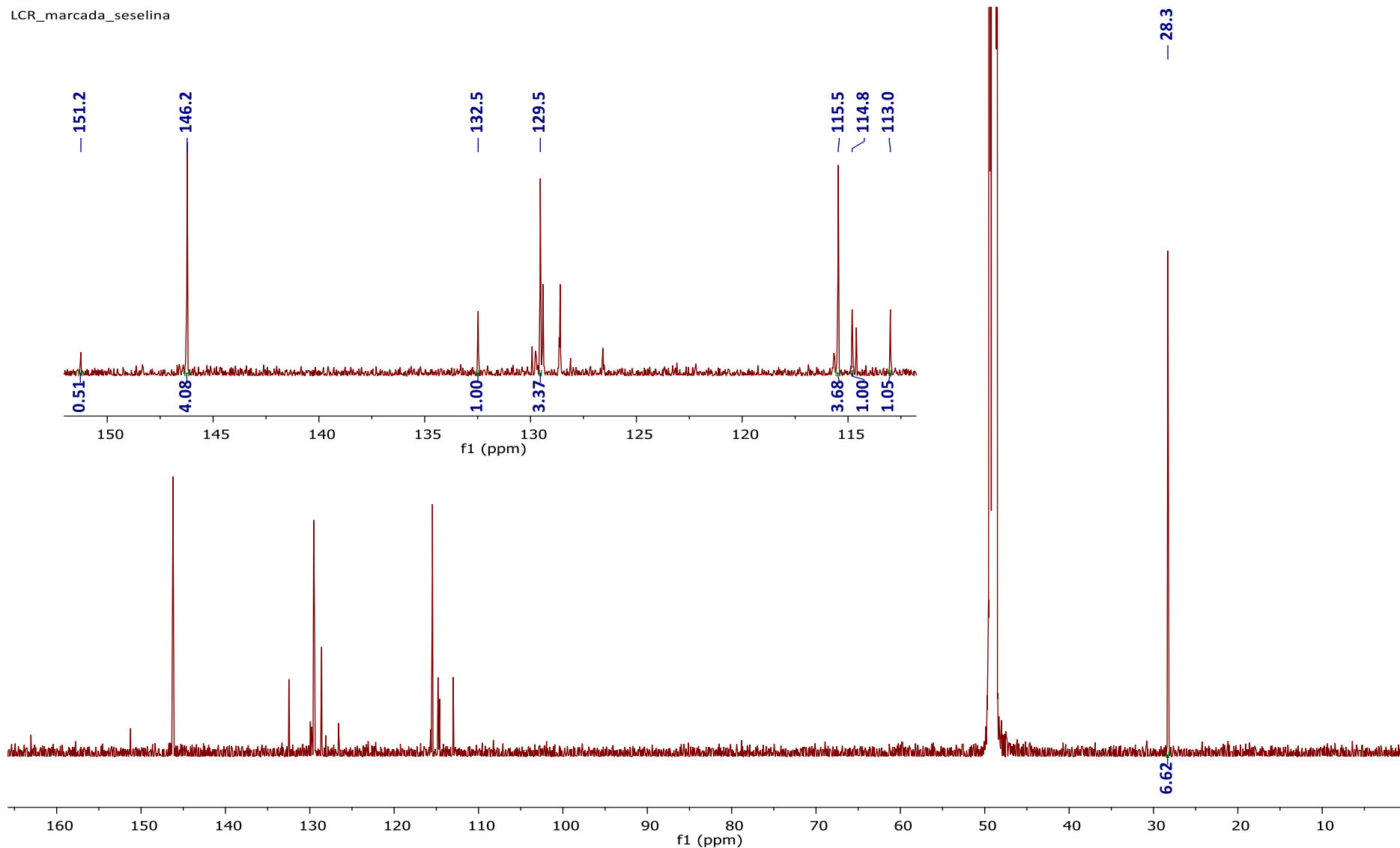


FIGURA 4.5.3.10. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de limão Cravo do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LCR marcada.

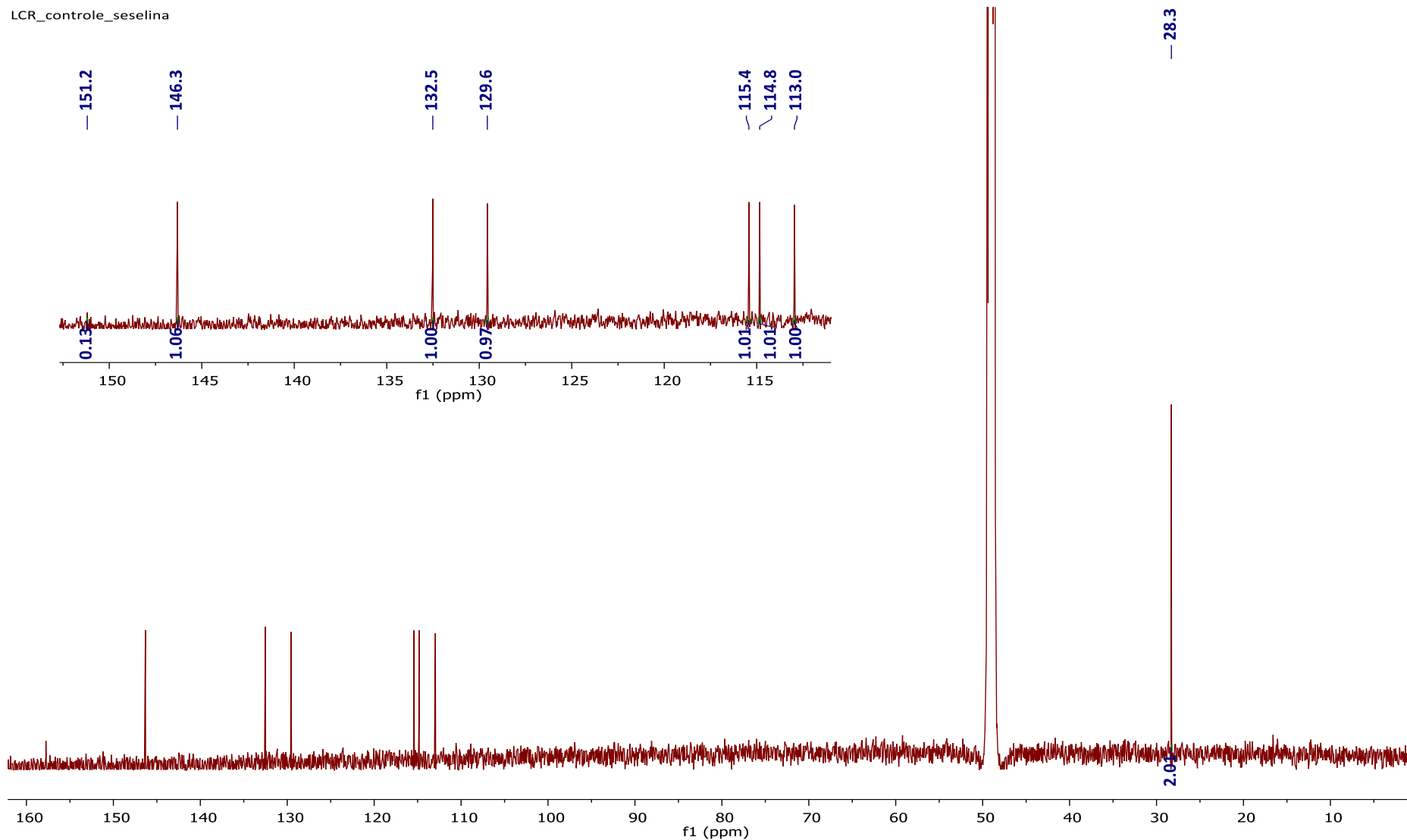


FIGURA 4.5.3.11. Espectros de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de limão Cravo do experimento controle, com abundância isotópica natural - LCR controle.

A Tabela 4.5.3.4 mostra o aumento relativo dos sinais de ^{13}C nos carbonos C-4, C-5, C-8a, C-4' e C-5'. As marcações em C-4, C-5 e C-8a, referente aos carbonos que compõem o anel aromático e o anel lactônico do esqueleto cumarínico é proveniente do caminho do Chiquimato (Figura 4.5.3.9). As marcações observadas em C-4' e C-5' são provenientes da incorporação de uma unidade de IPP (difosfato de isopentenila). Estes resultados demonstraram que a porção isoprênica da piranocumarina angular – seselina, isolada de limão Cravo, assim como a xantiletina isolada da raiz de limão Cravo e de laranja Pêra, deriva exclusivamente da via MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato - triose/piruvato). Chegou-se a essa conclusão pois apenas os carbonos C-1 e C-5 da unidade de IPP foram enriquecidos, onde o C-1 do IPP referente ao C-4' da xantiletina (δ 115,5) e C-5 do IPP, referente ao C-5' da xantiletina (δ 28,3).

TABELA 4.5.3.4. Abundância de ^{13}C da seselina, isolada da raiz do limão Cravo após a incorporação de glicose - 1 - [^{13}C].

^{13}C	δ	LCR marc Integral	LCR controle Integral	$\Delta^{13}\text{C}$
3	113,0	1,05	1,00	1,16
4	146,2	4,08	1,06	4,23
5	129,5	3,37	0,97	3,82
6	114,8	1,00	1,01	1,09
8a	151,2	0,51	0,26	4,32
^a 3'	132,5	1,00	1,00	1,10
4'	115,5	3,68	1,01	4,01
5' e 6'	28,3	6,62	2,09	3,62

$\Delta^{13}\text{C} = 1,1\% \times (\text{enriquecido}/\text{controle})$ representa o aumento na intensidade relativa (aumentos significativos para carbonos enriquecidos estão em negrito). ^a Usado como referência.

A Figura 4.5.3.12 mostra os espectros de ^{13}C da banda 2, referente a seselina isolada da amostra da raiz de laranja Pêra marcada através da incorporação de glicose-1- ^{13}C em vermelho e da amostra controle, com abundância isotópica natural em azul. O espectro da substância marcada (Figura 4.5.3.13) foi comparado àquele da substância não marcada (Figura 4.5.3.14). A determinação da abundância de ^{13}C foi realizada conforme já descrito para a xantiletina na seção 4.5.2.

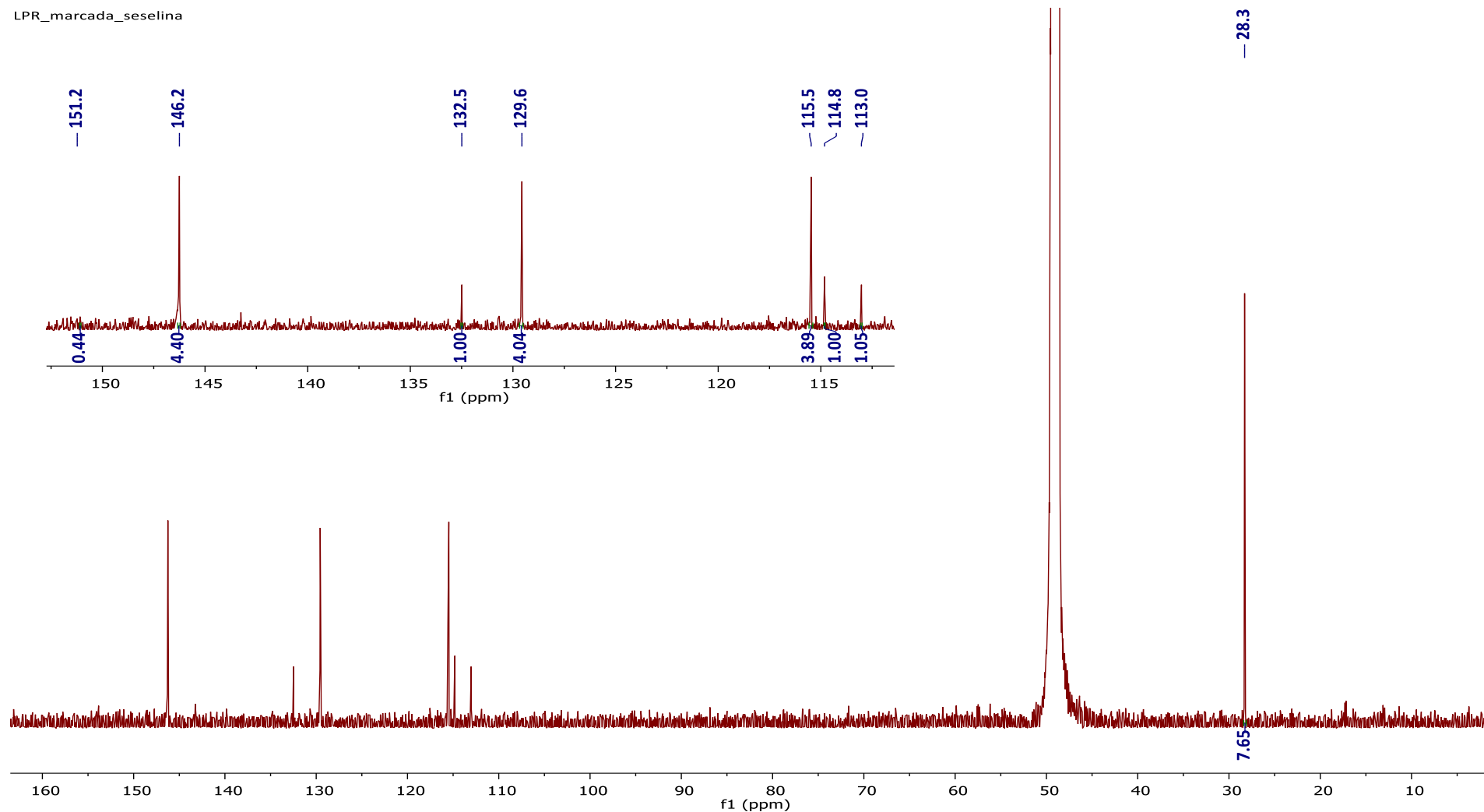


FIGURA 4.5.3.13. Espectro de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de laranja Pêra do experimento de marcação através da incorporação de glicose-1- ^{13}C - LPR marcada.

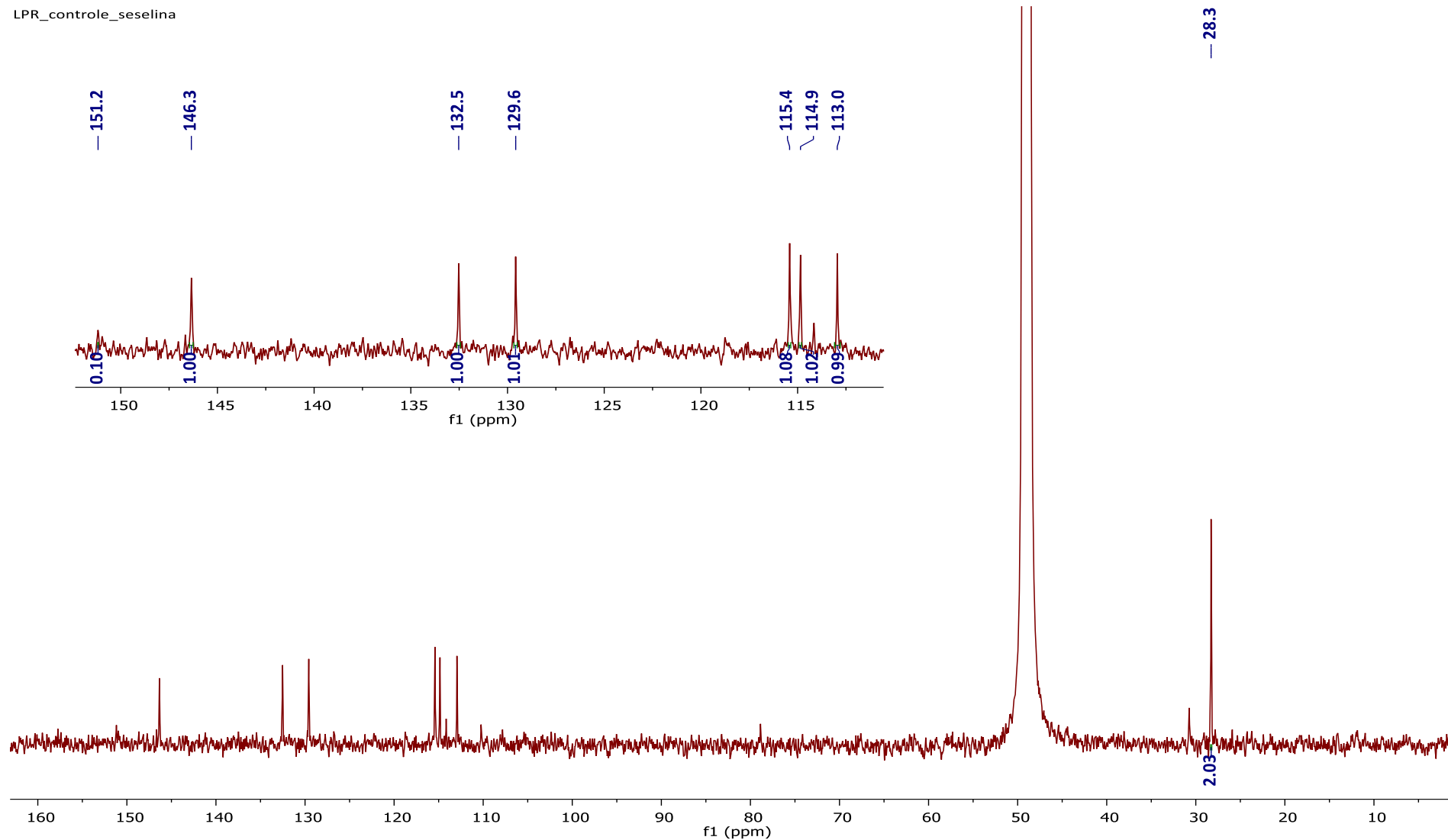


FIGURA 4.5.3.14. Espectros de RMN de ^{13}C (600MHz, MeOD) da seselina isolada da raiz de laranja Pêra do experimento controle, com abundância isotópica natural - LPR controle.

A Tabela 4.5.3.5 mostra o aumento relativo dos sinais de ^{13}C nos carbonos C-4, C-5, C-8^a, C-4' e C-5'. As marcações em C-4 e C-5 e C8a, são referentes aos carbonos que compõem o anel aromático e o anel lactônico do esqueleto cumarínico, proveniente do caminho do Chiquimato (Figura 4.5.3.12). As marcações observadas em C-4' e C-5' são provenientes da incorporação de uma unidade de IPP (difosfato de isopentila). Estes resultados demonstraram que a porção isoprênica da xantiletina isolada da laranja Pêra, assim como para o limão Cravo, deriva exclusivamente da via MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato-triose/piruvato), pois apenas os carbonos C-1 e C-5 da unidade de IPP foram enriquecidos, onde o C-1 do IPP corresponde ao C-4' da xantiletina (δ 115,5) e C-5 ao C-5' da xantiletina (δ 28,3). Se o IPP fosse proveniente da via do MVA, o enriquecimento seria detectado nos carbonos C-3', C-5' e C-4', e se fosse via mista nos carbonos C-3', C4', C-5' e C-6'.

TABELA 4.5.3.5. Abundância de ^{13}C da seselina, isolada da raiz do laranja Pêra após a incorporação de glicose-1- ^{13}C .

^{13}C	δ	LPR marc Integral	LPR controle Integral	$\Delta^{13}\text{C}$
3	113,0	1,05	0,99	1,17
4	146,2	4,40	1,00	4,84
5	129,5	4,04	1,01	4,40
6	114,8	1,00	1,02	1,08
8a	151,2	0,44	0,10	4,84
a3'	132,5	1,00	1,00	1,10
4'	115,5	3,89	1,08	3,96
5' e 6'	28,3	7,65	2,03	4,15

$\Delta^{13}\text{C} = 1,1\% \times (\text{enriquecido}/\text{controle})$ representa o aumento na intensidade relativa (aumentos significativos para carbonos enriquecidos estão em negrito). ^a Usado como referência.

Os resultados do estudo da biossíntese das piranocumarinas linear e angular da raiz de *C. sinensis* e *C. limonia*, demonstraram que a porção isoprênica que compõe o anel pirano de ambas as moléculas, deriva exclusivamente da via triose/piruvato.

As prenilações do anel benzênico da umbeliferona nas posições 6 ou 8 é o passo inicial na biogênese das furano e pirano cumarinas. A biossíntese das

mesmas difere na etapa de ciclização. A biossíntese das furanocumarinas, consiste na ciclização do intermediário prenilado formando um anel de 5 membros enquanto as piranocumarinas em anel de 6 membros. A biossíntese de pirano ou furano depende da orientação do ataque nucleofílico. A prenilação na posição 6 origina furano e pirano cumarinas lineares e na posição 8 leva-se a homólogos angulares³⁷. STANJEK et al., 1999 ao realizarem estudos referentes a biossíntese de furanocumarinas faz a seguinte afirmação: “Por analogia, a cadeia lateral prenil das piranocumarinas deve ser de origem não mevalonídica, uma vez que a biossíntese de pirano e furanocumarinas só se diverge após a reação de prenilação inicial“. Porém nenhuma comprovação existia até o momento confirmando a biossíntese de piranocumarinas⁴⁵. O presente trabalho é inédito, até então, nada era conhecido com certeza, sobre o caminho que leva a essas substâncias.

Os resultados obtidos, referentes a biossíntese das piranocumarinas, está em conformidade com o estudo realizado por STANJEK et al., 1999, no qual mostra que a umbeliferona é prenilada em C-6 (para furanocumarinas lineares) ou na posição C-8 (para furanocumarinas angulares) produzindo demetilsuberosina e ostenol, respectivamente⁴⁵. A unidade de IPP/DMAPP necessária para a prenilação em *Apium graveolens* ocorre pela via não dependente do mevalonato, ou seja, ocorre via MEP e não através da via ácido mevalônico⁴⁵. A unidade prenil de origem não mevalonídica foi efetivamente incorporada, formando porção furano da furanocumarina linear: psoraleno⁴⁵, enquanto que em estudos posteriores realizado por FLOSS e MOTHES, 1966, mostrou incorporação baixa de mevalonato marcado no esqueleto de furanocumarinas⁸⁴.

Outra correlação que é possível de ser realizada é devido ao fato de que uma enzima preniltransferase foi identificada em *Ruta graveolens* por DHILLON e BROWN, 1976 e ELLIS e BROWN em 1974 como uma enzima plastídica, ou seja, que catalisa reações via triose/piruvato^{43,85}. Muitos isoprenóides plastídicos como carotenoides, plastoquinona-9, fitol e o isopreno também são biossintetizados através da via independente do mevalonato em plantas superiores⁴⁵.

4.5.4. Justificativa das marcações e entendendo a biossíntese das piranocumarinas em *C. sinensis* e *C. limonia*

A degradação de carboidratos e açúcares procede através dos caminhos bem caracterizados conhecidos como glicólise e ciclo de Krebs/ácido cítrico/ácido tricarbóxico, que liberam energia dos compostos orgânicos por reações oxidativas. A glicose-1-[¹³C] ao ser incorporada, é degradada no processo anaeróbio conhecido como glicólise produzindo os intermediários necessários para a produção de metabólitos secundários, conhecidos como blocos de construção. Os blocos de construção mais importantes utilizados na biossíntese de metabólitos secundários derivam dos intermediários acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e metileritritol fosfato³⁷. A Figura 4.5.4.1. mostra estes produtos da glicólise e suas marcações a partir da glicose-1-[¹³C]. Estes são utilizados respectivamente nas vias acetato, chiquimato, mevalonato e metileritritol fosfato.

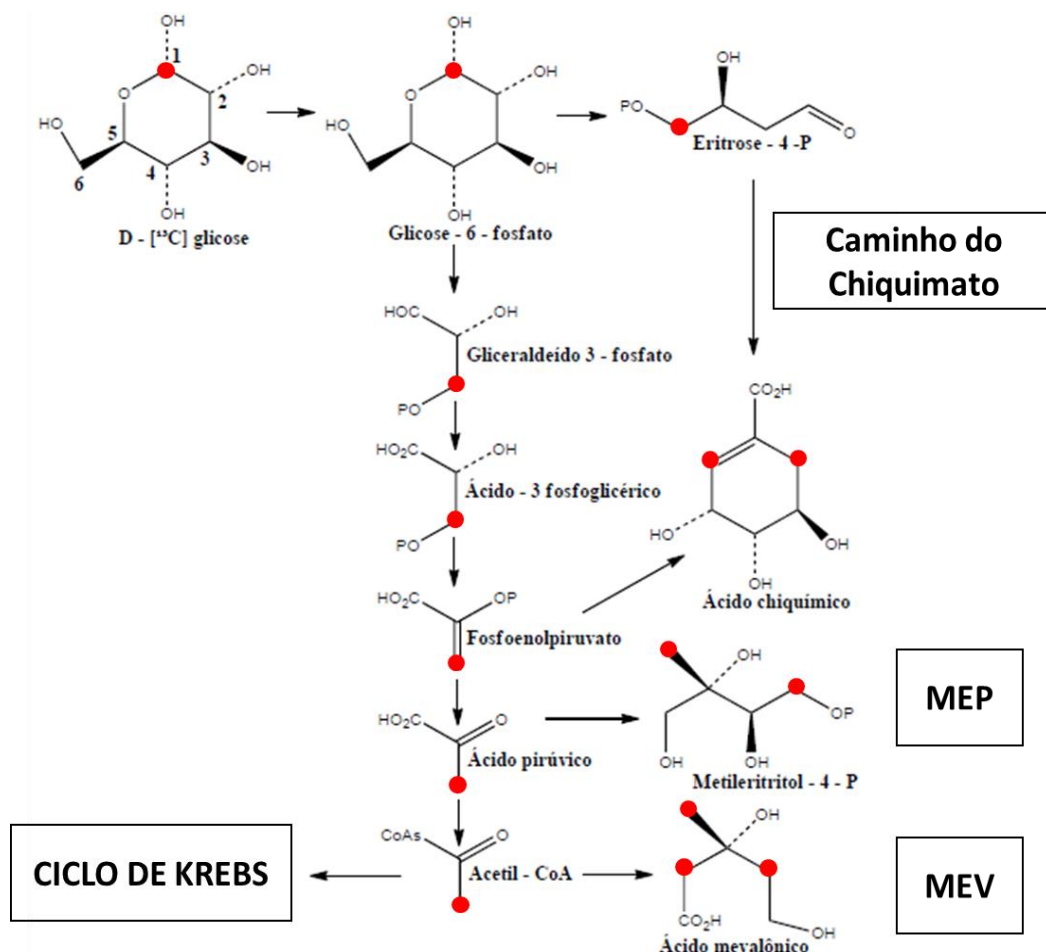


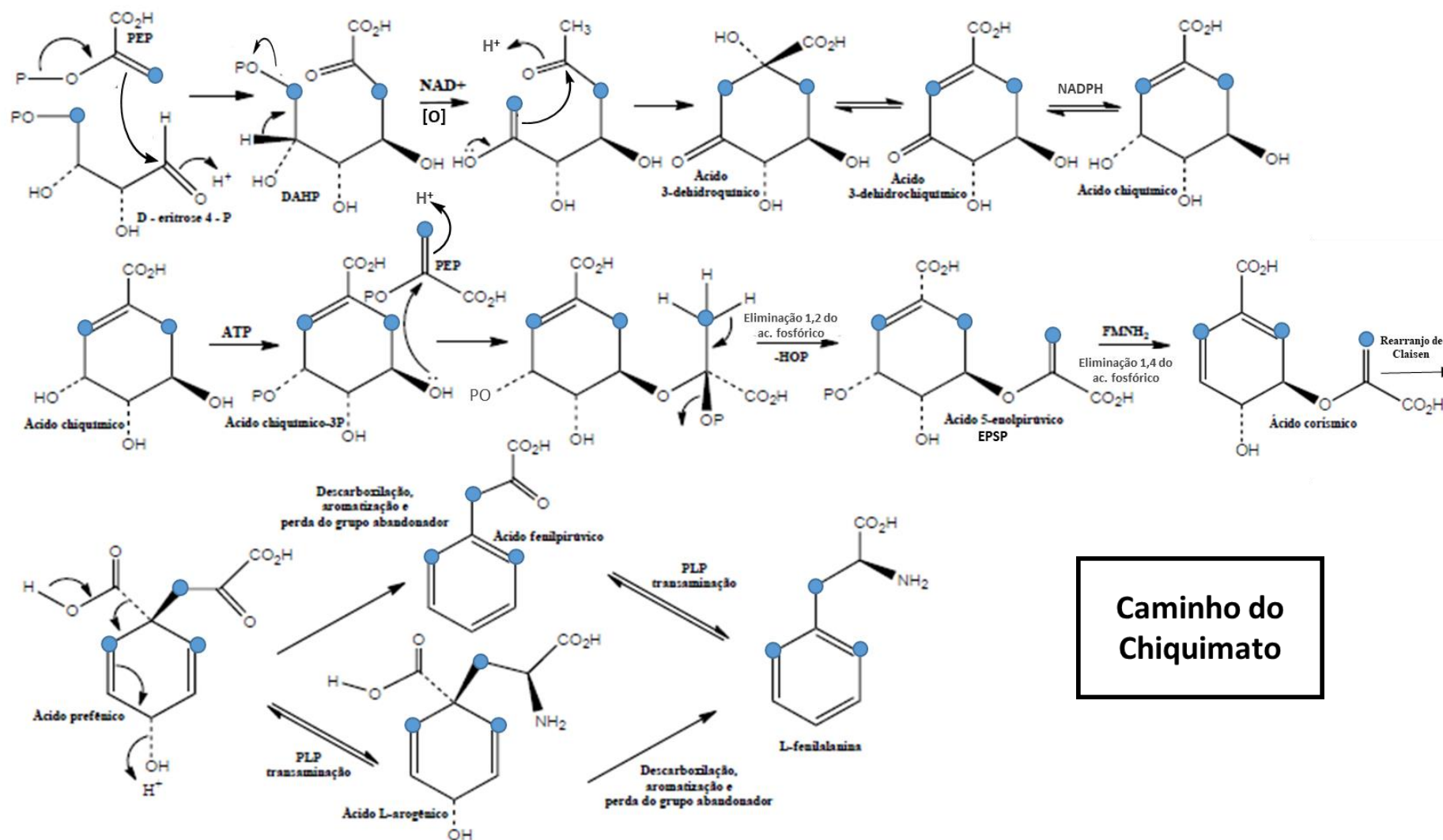
FIGURA 4.5.4.1. Produtos da glicólise e suas marcações, a partir da glicose-1- [¹³C].

O caminho do chiquimato inicia-se pelo acoplamento do fosfoenol piruvato (PEP) proveniente da via glicolítica, com a eritrose-4-fosfato proveniente da via da pentose fosfato, formando o ácido 3-deoxi-D-arabino-heptulosônico 7-fosfato (DAHP). Em seguida ocorre eliminação do ácido fosfórico do DAHP, precedida de uma reação aldólica intramolecular levando ao intermediário ácido 3-dehidroquinico, que a partir de etapas de desidratação e redução leva a formação do ácido chiquímico (Figura 4.5.4.2).

Após a fosforilação do ácido chiquímico, ocorre mais uma incorporação de fosfoenol piruvato (PEP), por reação de adição – eliminação de ácido fosfórico, seguida por mais uma eliminação de ácido fosfórico, através de uma eliminação concertada levando ao produto ácido corísmico mediada pela ação da coenzima mono nucleótido de flavina reduzido (FMNH₂)^{37,63}.

Em sequência ocorre um rearranjo de Claisen, transformando o ácido corísmico em ácido prefênico. A L-fenilalanina, que é precursora de uma ampla variedade de produtos naturais é então formada a partir do ácido prefênico, em dois passos reacionais: uma descarboxilação e transaminação mediada pelo PLP (piridoxal-5'-fosfato), ou vice-versa. Uma eliminação da amônia da cadeia lateral catalisada pela fenilalanina amonialiase gera o ácido trans-cinânico, que ao sofrer uma para hidroxilação forma o ácido p-cumárico (Figura 4.5.4.3)^{37,63}.

A umbeliferona que ocupa posição central na biossíntese de cumarinas, é produzida através de uma *trans* - *cis* isomerização e uma lactonização espontânea do ácido p-cumárico³⁷. A umbeliferona gerada através da incorporação de glicose-1- [¹³C], seguindo os passos da biogênese aparecerá marcada nos carbonos C-4, C-5 e C8a, que está de acordo com os padrões de enriquecimento do esqueleto cumarínico, observados no presente estudo.



Caminho do Chiquimato

FIGURA 4.5.4.2. Biossíntese da L-fenilalanina, através do caminho do Chiquimato. Adaptado de DEWICK, P.M., 2002³⁷.

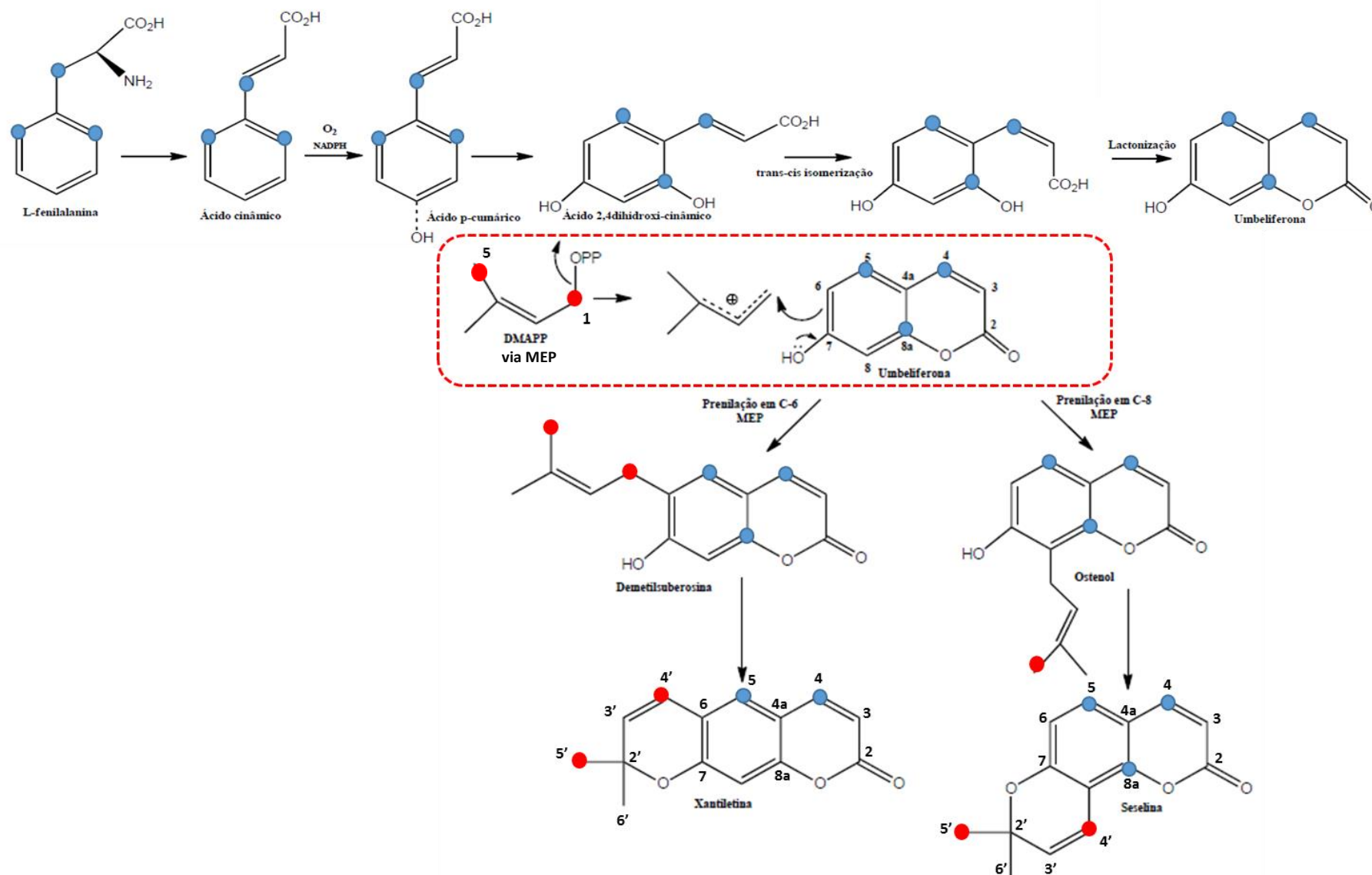


FIGURA 4.5.4.3. Biossíntese das piranocumarinas angular: xantiletina e linear seselina, através do caminho do Chiquimato e incorporação da unidade de IPP proveniente do caminho do MEP. Adaptado de DEWICK, P.M., 2002³⁷.

A grande diversidade estrutural da classe das cumarinas é devido principalmente a incorporação de unidades prenila. A umbeliferona, por vez, é então prenilada nas posições 6 e 8 devido a presença da hidroxila na posição 7, que é um grupo orientador orto. Através da incorporação de glicose-1-[¹³C], a unidade de IPP proveniente do caminho do MEP aparecerá marcada nas posições C-1 e C-5, conforme mostrado anteriormente na Figura 4.5.1.1 e 4.5.4.1. Após incorporada a unidade de IPP via caminho MEP ao esqueleto cumarínico na posição C-6 têm-se a formação da demetilsuberosina que é ciclizada em um anel pirano de 6 membros, catalisada por uma possível enzima citocromo P-450, assim como para furanocumarinas^{40,41}. Após a ciclização têm-se formação do produto final a piranocumarina linear – xantiletina, marcada em C-4' e C-5' (Figura 4.5.4.3). Quando o IPP é incorporado em C-8, têm-se a formação do intermediário ostenol, que também é possivelmente ciclizado pelo mesmo mecanismo, formando a piranocumarina angular – seselina, marcada em C4' e C5'.

Os resultados finais obtidos corroboram com as marcações observadas na biogênese das piranocumarinas, nos quais foram determinadas marcações nas posições C-4, C-5, C-8a, C-4' e C-5' para ambas as moléculas em estudo. O objetivo final do trabalho foi alcançado com êxito, e têm-se como perspectivas futuras identificar as enzimas que atuam nas reações de prenilação e na ciclização, levando a formação do anel pirano.

4.6. Análise das raízes de *C. sinensis* e *C. limonia* via UPLC-QToF

As estruturas dos compostos referentes às bandas 1 e 2 isoladas das amostras da raiz de *C. sinensis* e *C. limonia* marcadas através da incorporação de glicose-1-[¹³C] e do experimento controle, foram confirmadas pelo espectro de massas, obtido por UPLC-QToF de alta resolução. A figura 4.6.1 mostra os cromatogramas em ES⁺ BPI obtidos na análise das 4 amostras. Observa-se em todas as amostras a presença de duas bandas com tempo de retenção em 9,59 min e 9,71 min. As bandas 1 e 2 apresentaram íon molecular [M + H]⁺ com *m/z* de 229,0877 confirmando a fórmula molecular de C₁₄H₁₂O₃ das piranocumarinas propostas, que são isômeros. Sendo assim, através os dados mencionados em comparação com os dados de RMN já discutidos, confirmou-se a estrutura das bandas 1 e 2 como sendo a xantiletina e seselina respectivamente. Os espectros de

massas MS e MS/MS, referentes as duas substâncias de interesse, para todas as amostras estão mostrados nas Figuras 4.6.2, 4.6.3, 4.6.4 e 4.6.5.

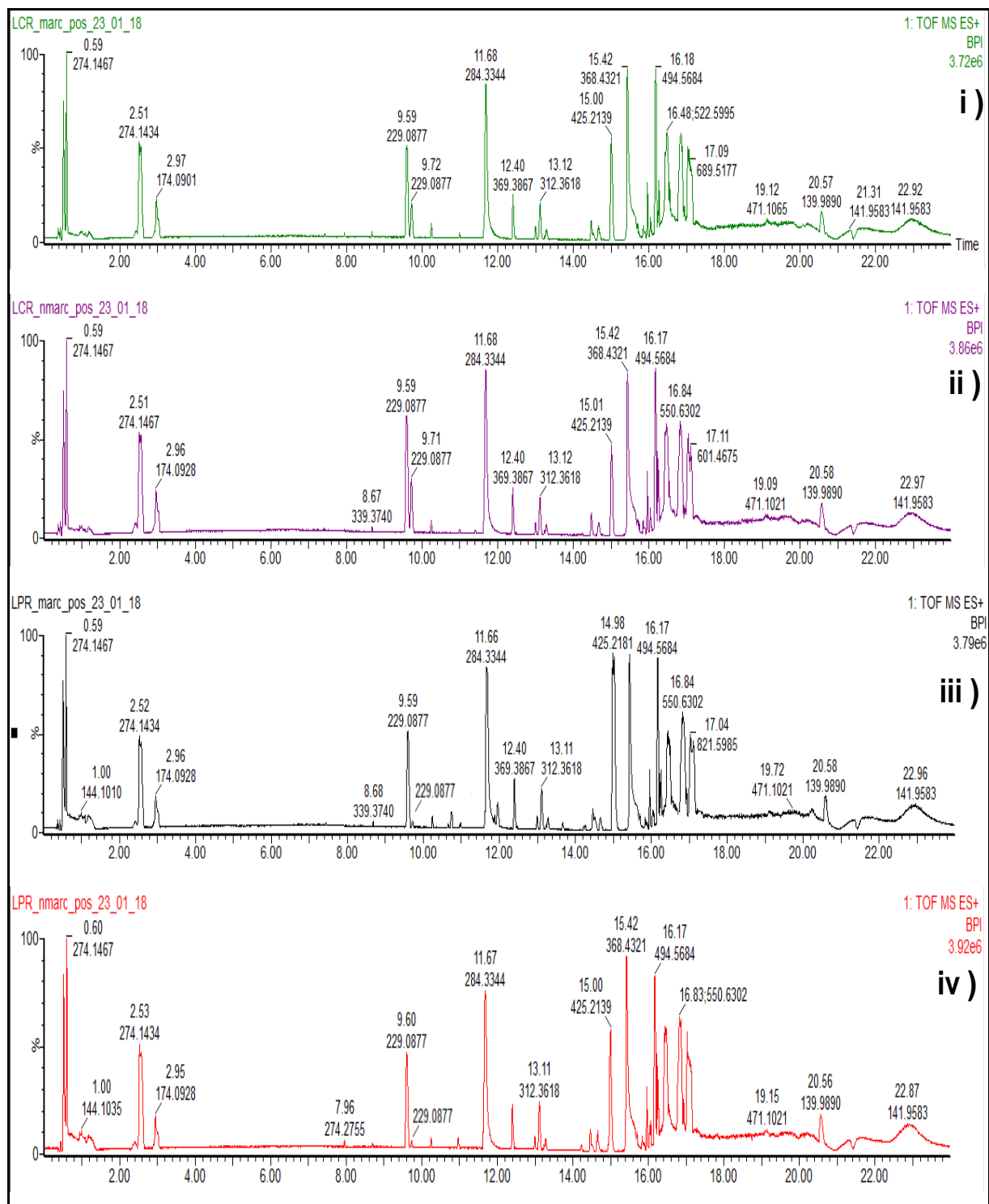


FIGURA 4.6.1. Cromatograma *full scan* ES⁺ BPI, dos extratos das raízes de citros analisados em UPLC-QToF em modo positivo de ionização. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.

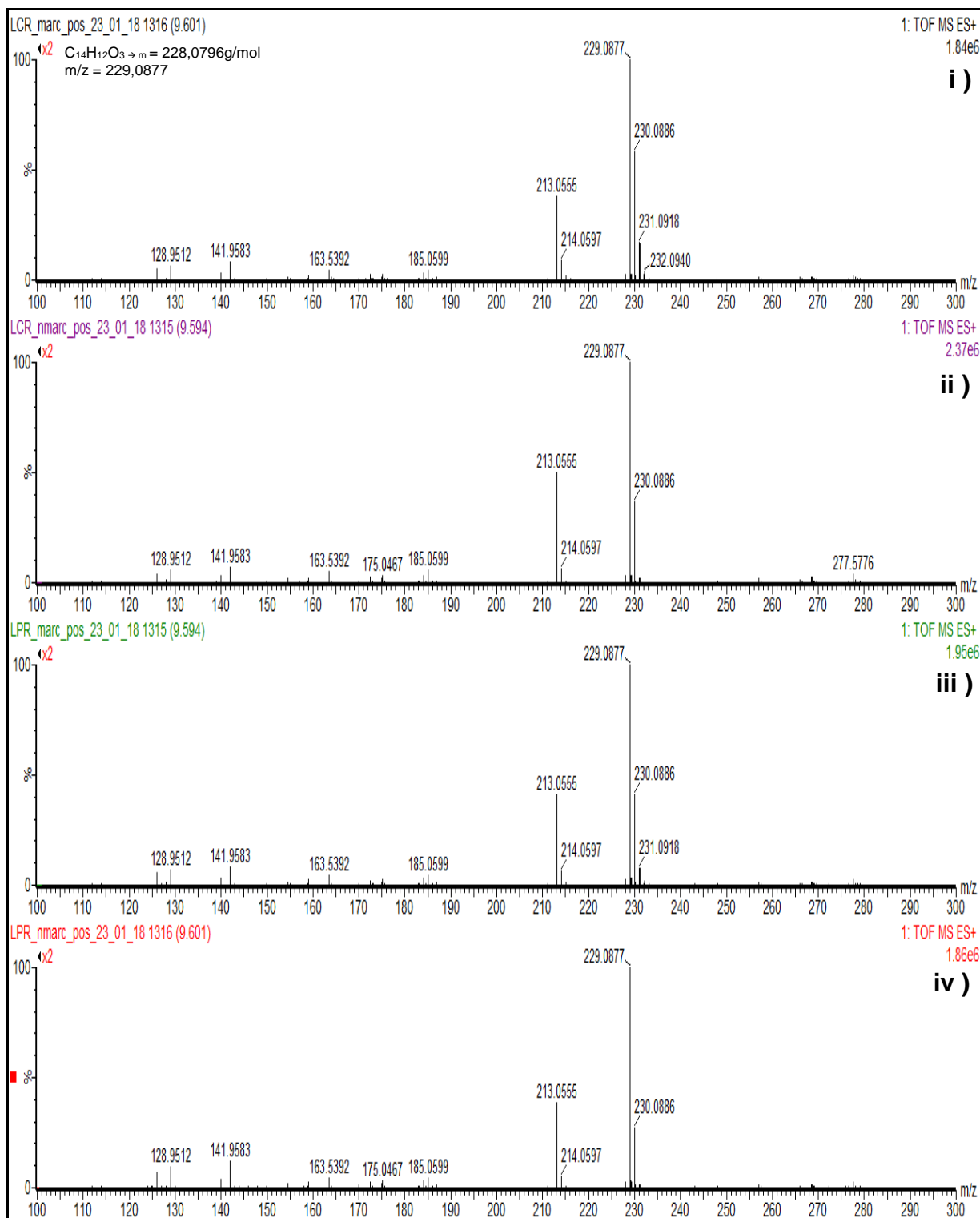


FIGURA 4.6.2. Espectro de massas MS em modo positivo de b1 - referente a xantiletina, com íon molecular de m/z 229,0887 dos extratos das raízes de citros. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.

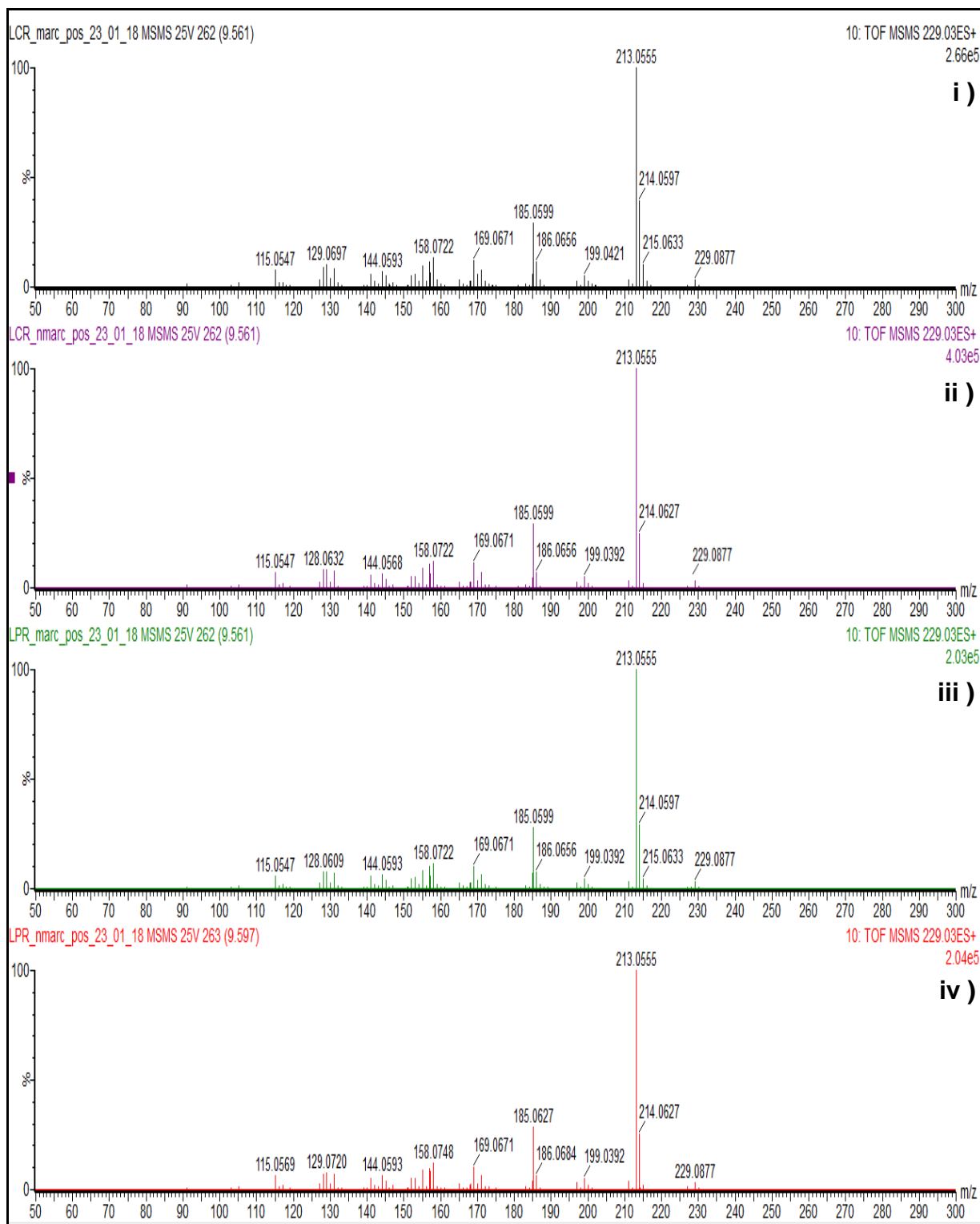


FIGURA 4.6.3. Espectro de massas MS/MS extraído do íon m/z 229,0877 referente à b1 – xantiletina, em modo positivo, dos extratos das raízes de citros. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.

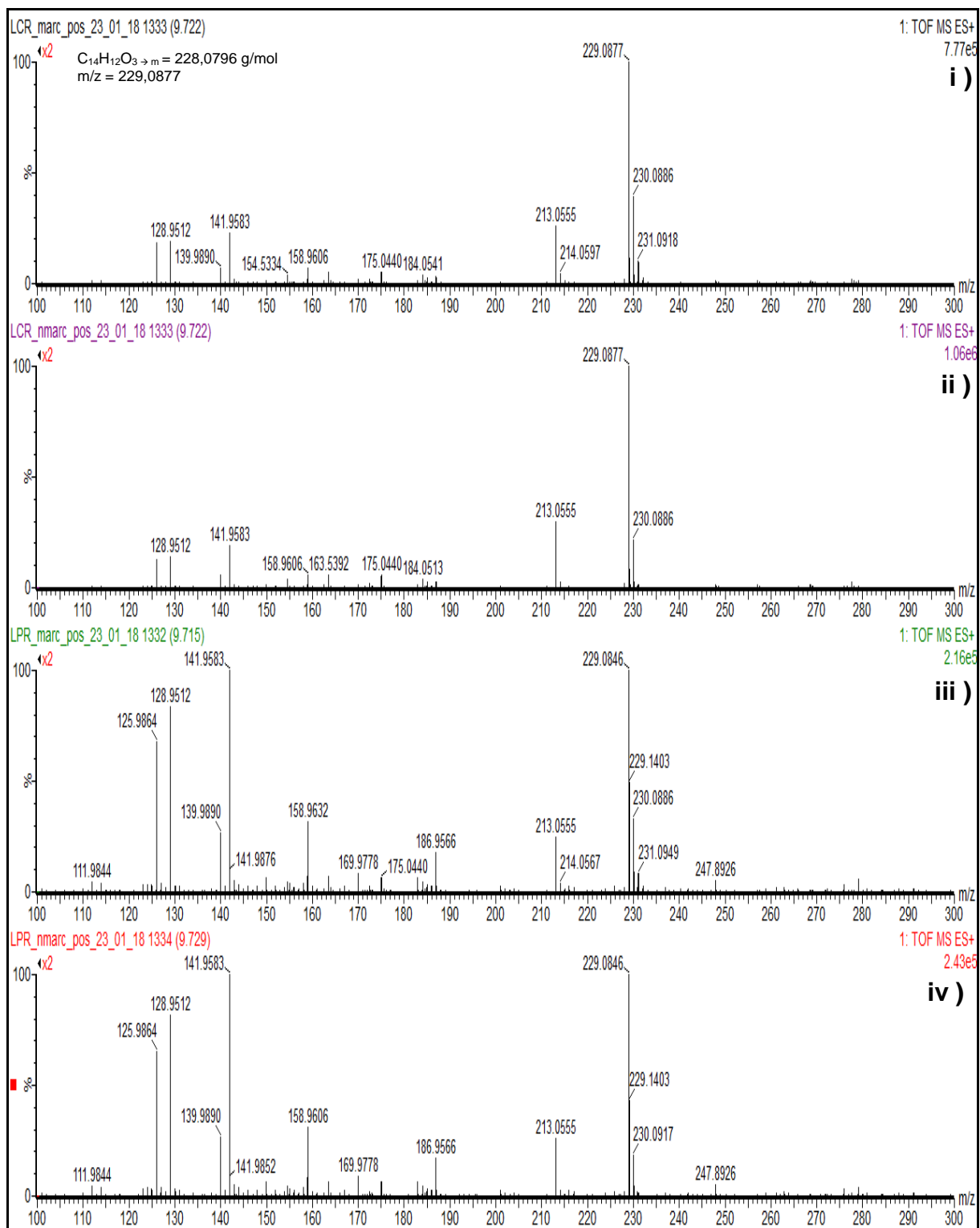


FIGURA 4.6.4. Espectro de massas MS em modo positivo de b2 - referente a seselina, com íon molecular de m/z 229,0877 dos extratos das raízes de citros. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.

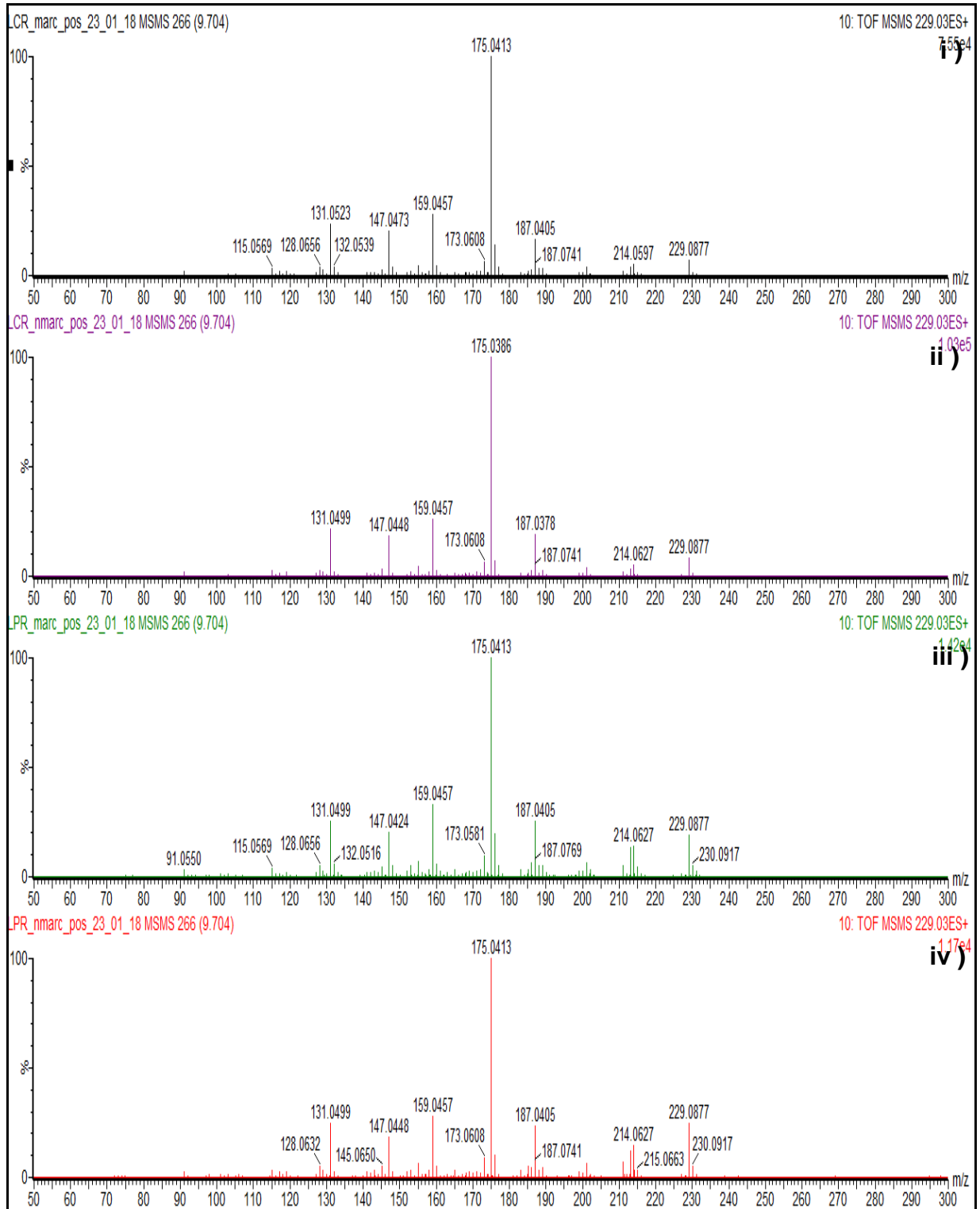


FIGURA 4.6.5. Espectro de massas MS/MS extraído do íon m/z 229,0877 referente à b2 – seselina, em modo positivo, dos extratos das raízes de citros. i) limão Cravo com marcação – LCR marc ii) limão Cravo controle – LCR nmarc iii) laranja Pêra com marcação - LPR marc iv) laranja Pêra controle – LPR nmarc.

A distinção entre as duas piranocumarinas pode ser feita através da análise dos espectros de MS/MS, pois elas possuem perfis de fragmentação distintos. A xantiletina tem como fragmento mais estável o m/z 213,0555 e a seselina o fragmento de m/z 175,0413. A proposta de fragmentações para a transição $229,0877 \rightarrow 213,0555$ para xantiletina é mostrada na Figura 4.6.6. e a transição $229,0877 \rightarrow 175,0413$ para a seselina na figura 4.6.7.

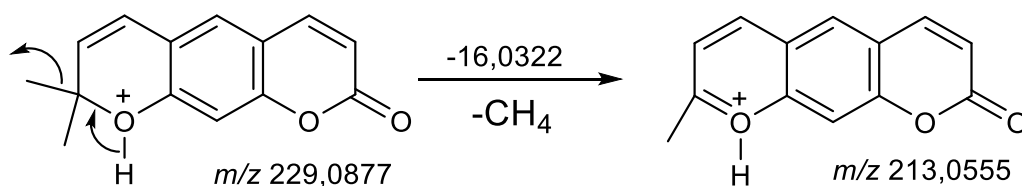


FIGURA 4.6.6. Proposta de fragmentação para a xantiletina no modo positivo.

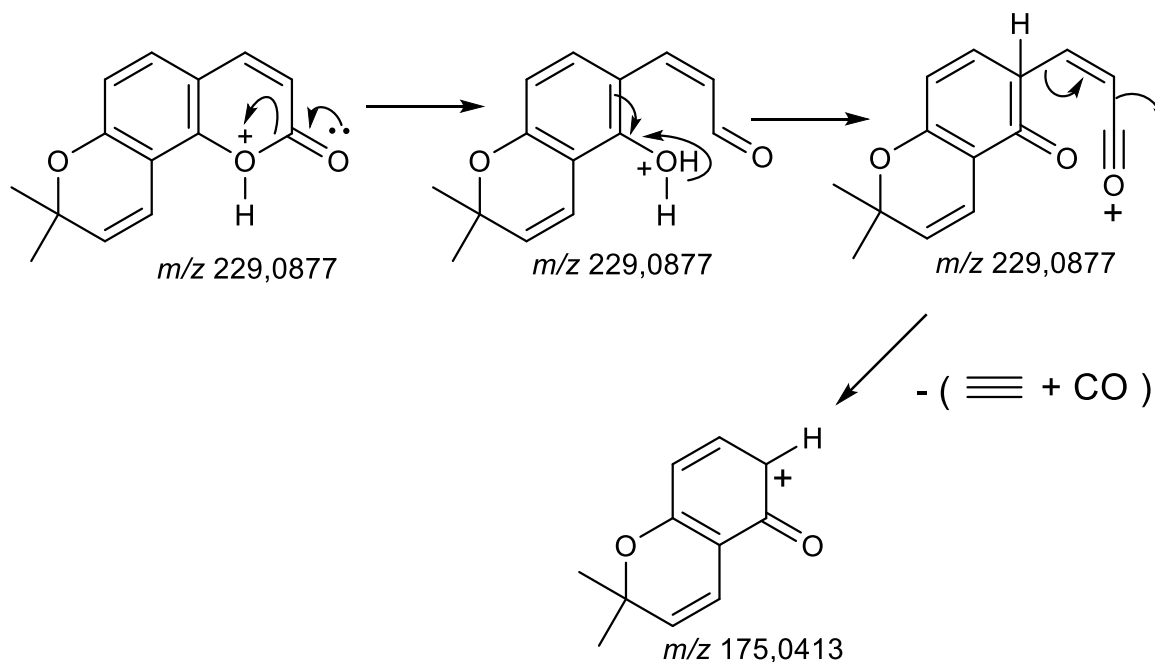


FIGURA 4.6.7. Proposta de fragmentação para a seselina no modo positivo.

O sinal em m/z 113,0555 que indica o fragmento $[M - 16,0322]^+$, é o de maior intensidade observado para a xantiletina, enquanto o mesmo nem é detectado, ou possui intensidade muito baixa para os espectros da seselina em amostras da raiz de laranja Pêra e de limão Cravo. Já o sinal com m/z de 175,0413 que indica o fragmento $[M - 54,0464]^+$ é detectado para a seselina, enquanto que para a xantiletina o mesmo não é observado.

4.7. Avaliação da atividade biológica das substâncias xantiletina e seselina frente à bactéria *Xylella fastidiosa*

A avaliação da atividade dos compostos xantiletina e seselina frente à bactéria *Xylella fastidiosa* causadora do Clorose Variegada dos Citros (CVC) foi feita através da metodologia com resazurina para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O CIM é excelente para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e como uma ferramenta importante de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novas substâncias⁸⁶. Os testes de suscetibilidade realizados em microplacas são métodos fenotípicos rápidos, confiáveis e de simples execução, que vem sendo desenvolvidos com o objetivo de diminuir o tempo de resposta e o custo dos ensaios. A utilização de indicadores, como os sais de resazurina, para detectar viabilidade celular, é uma alternativa para melhor visualização da leitura desses testes em microplacas. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) funciona como substrato cromogênico de enzimas desidrogenases agindo como indicadores de oxirredução, e são reduzidos (pelo ganho de hidrogênio) por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular⁸⁷.

A resazurina facilita verificar a presença de crescimento microbiano, onde a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto a cor rosa fluorescente indica a presença de células viáveis em crescimento. Como é um indicador de óxido-redução a resazurina é um corante azul, fracamente fluorescente na presença de células viáveis, redutível a resorufina que se apresenta na cor rosa fluorescente. Dessa maneira foi possível determinar a menor concentração de cada extrato capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

A Figura 4.7.1. mostra o delineamento do ensaio conforme já esquematizado na Figura 3.7.3.1 e os resultados dos ensaio após a incubação. CC corresponde ao controle do meio de cultura, SM ao controle da solução mãe e DMSO ao controle do DMSO. Em 1 temos o ensaio com a xantiletina (100 µL meio PW + 100 µL xantiletina, diluição seriada + 100 µL inoculo), INOC é referente ao controle do inoculo (100 µL meio PW + 100 µL inoculo) e (+) é o controle positivo realizado com a estreptomicina (100 µL meio PW + 100 µL estreptomicina, diluição seriada +100 µL inoculo). Ao analisar a placa observou se que para o ensaio com a

piranocumarina xantiletina, a partir do poço 9 todos os poços apresentaram coloração rósea, indicando ausência do crescimento microbiano.

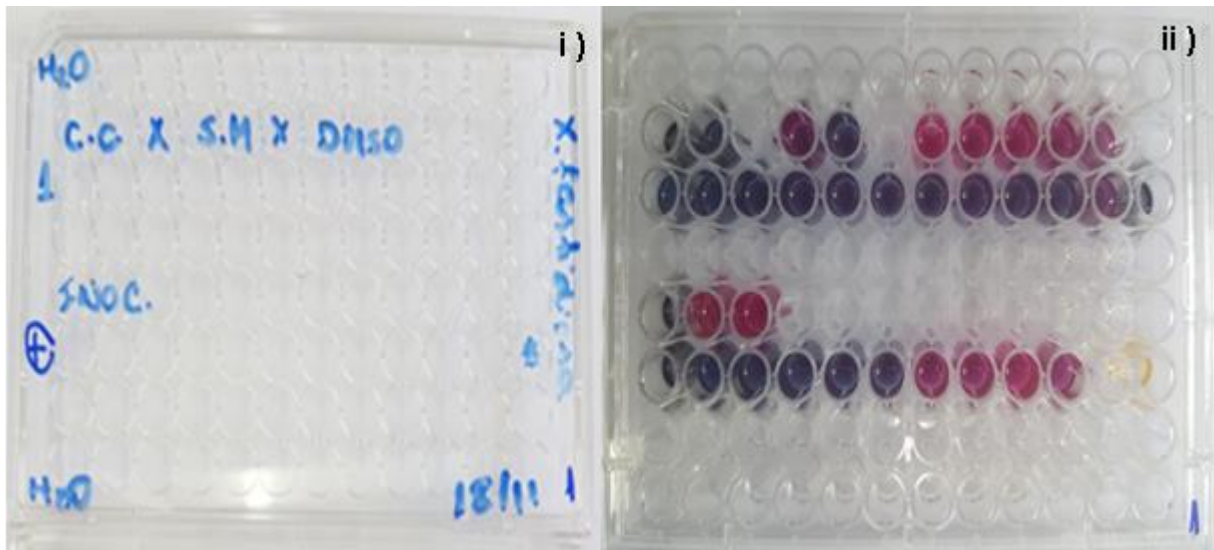


FIGURA 4.7.1. Leitura visual do teste de micro diluição com resazurina i) delineamento do ensaio ii) resultado do ensaio da xantiletina frente à *X. fastidiosa* cepa 9a5c, após a incubação.

Os ensaios contra o agente causal da CVC, *X. fastidiosa*, possibilitou a determinação da CIM. A xantiletina apresentou um CIM de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ ou 34,24 μM , e a estreptomicina (controle +) apresentou CIM de 0,1844 $\mu\text{g/mL}$ ou 0,317 μM . Para o ensaio realizado com a seselina, não foi possível determinar a CIM e futuramente serão realizados novos ensaios para avaliar a atividade desta substância. Estes resultados indicam que a xantiletina possui um grande potencial inibitório, sugerindo que a mesma pode estar diretamente associada ao mecanismo de resistência frente ao CVC.

Em estudos realizado por KUZINA et al., 2009⁸⁸, os antibióticos com a CIM mais baixa para linhagens diferentes de *X. fastidiosa* foram gentamicina (0,5 - 1 $\mu\text{g/mL}$), tetraciclina (1 - 4 $\mu\text{g/mL}$), ampicilina, canamicina e novobiocina (4 - 8 $\mu\text{g/mL}$), cloro-ramfenicol (1 - 8 $\mu\text{g/mL}$) e rifampicina (1 - 8 $\mu\text{g/mL}$). Estes são antibióticos tradicionais que possuem excelente atividade antibactericida, porém não são utilizados na agricultura para tratar plantas com doenças devido o impacto ambiental e econômico que seu uso implica. Também realizaram testes de atividade antimicrobiana com peptídeos e apenas quatro deles, tais como PGQ (8 - 64 $\mu\text{g/mL}$), indolicidina (16 - 64 $\mu\text{g/mL}$), magainina 2 (8 - 62 $\mu\text{g/mL}$) e dermaseptina (8 - 32

µg/mL) mostraram uma potente atividade antimicrobiana para todas as cepas de *X. fastidiosa* estudadas.

Flavonoides, terpenoides, cumarinas, ácidos fenólicos e alcaloides, foram testados frente a cepa de *X. fastidiosa* (9a5c) por RIBEIRO et al., 2008¹⁴. A CIM destes metabólitos variou de 2 à 8 x 10³ µM ou 1000 à 2000 µg/mL. Em outro trabalho desenvolvido por MADDOX et al., 2009⁸⁹, diferentes subgrupos de flavonoides, incluindo flavanona (naringenina), flavan-3-ol (catequina), flavonol aglicona (quercetina), foram testados para atividades anti-*Xylella*. Comparado com ácidos fenólicos os flavonoides apresentaram atividade inibitória melhores contra o crescimento de *X. fastidiosa*, apresentando CIM entre 200 - 400 µM. Catecol e cumarina, que são compostos fenólicos com estruturas simples também foram testados. De todos os compostos fenólicos testados, o catecol possuiu atividade anti-*Xylella* melhor com CIM entre 100 – 200 µM e o representante de cumarinas sem modificações estruturais foi menos eficaz na inibição do crescimento de *X. fastidiosa* com CMI entre 400 - 2000 µM⁸⁹.

Os compostos fenólicos estão presentes numa vasta gama de plantas, algumas das quais são hospedeiras de *X. fastidiosa*. Os cultivares com resistência melhorada a doenças causadas por esta bactéria podem potencialmente ser produzidos aumentando a concentração da substância endógena anti-*Xylella* em vez de introduzir novos compostos antibacterianos⁸⁹. Frente a isso a sobreexpressão genética para produção de xantiletina em citros, mostra-se como alternativa para o combate a doença de CVC; visto que a substância apresentou CIM equivalente ao CIM antimicrobianos tradicionais que não podem ser utilizados na agricultura e apresentou também CIM bem menor que de outras substâncias que são consideradas potencialmente eficientes para atividade anti-*Xylella*.

4.8. Avaliação da atividade biológica das substâncias xantiletina e seselina frente à bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A avaliação da atividade dos compostos xantiletina e seselina frente à bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causadora do cancro cítrico, foi feita através da metodologia com resazurina para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Além de testar cada uma das duas substâncias, também realizou-se o ensaio com a xantiletina + seselina 1:1, para verificar se há algum efeito sinérgico

das substâncias sobre à *X. citri*. A Figura 4.8.1. mostra os resultados com as substâncias ensaiadas para avaliação da atividade antimicrobiana sobre a *X. citri*.

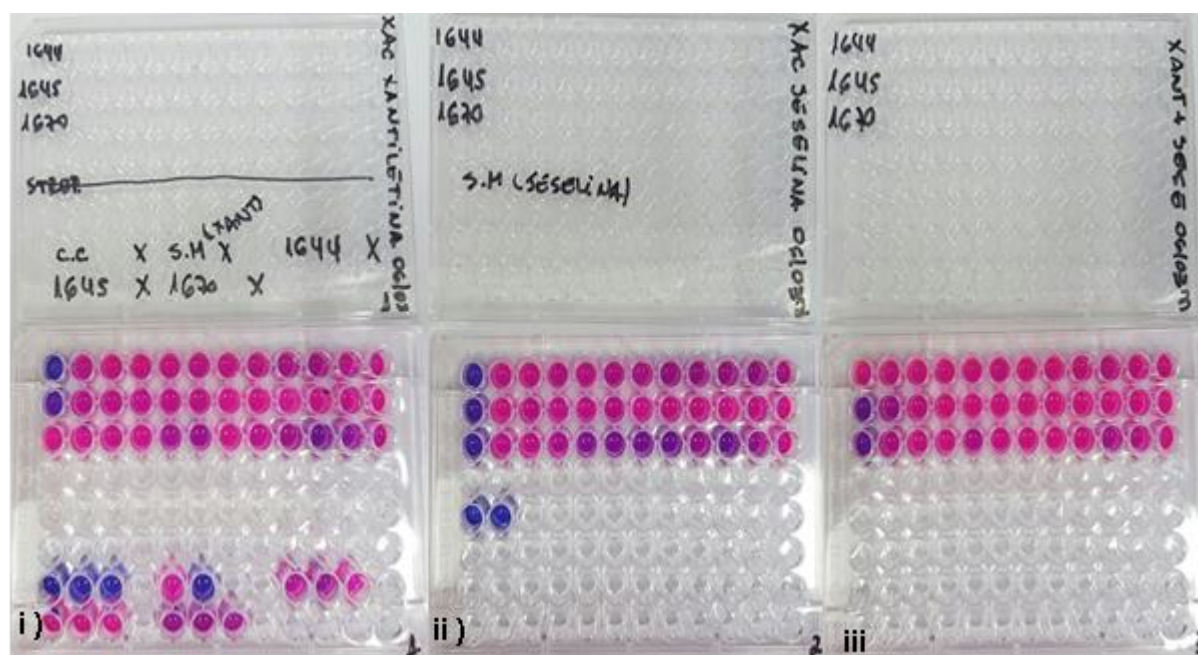


FIGURA 4.8.1. Leitura visual do teste de micro diluição com resazurina, após a incubação. Delineamento experimental e resultado do ensaio i) da xantiletina frente à *X. citri* i) da seselina frente à *X. citri* iii) da xantiletina + seselina 1:1 frente à *X. citri*.

Os ensaios contra o agente causal do cancro cítrico, *X. citri*, possibilitou a determinação da CIM. Tanto a xantiletina, quanto a seselina e xantiletina + seselina 1:1; apresentaram uma CIM de 400,0 µg/mL ou 1750,0 µM. Apesar da CIM destas substâncias frente à *X. citri* ser bem maior que para a CIM determinado para a xantiletina frente à *X. fastidiosa*, verificou-se que os resultados da CMI obtidos nesse estudo refletem um efeito inibitório considerável destas substâncias sobre o crescimento celular do micro-organismo em meio PW. Além disso observou-se que não há nenhum efeito sinérgico destas substâncias frente a atividade anti-*Xanthomonas*, pois a combinação das duas substâncias não aumentou a atividade.

Mesmo obtendo um valor de CIM considerável para as substâncias ensaiadas frente a *X. citri* subsp. *citri*, o resultado não foi satisfatório, visto que outros antibióticos já estudados e avaliados demonstram melhor atividade. Em estudos realizados por SILVA et al., 2013⁹⁰, observou-se que os galatos de alquila inibem o crescimento da bactéria *X. citri* subsp. *citri*. As células foram cultivadas e expostas a diferentes concentrações de ácido gálico e de ésteres alquílicos de ácido

gálico. As CIMs destes compostos foram determinadas dentro da faixa de concentração de 3,9 a 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Dos 16 compostos testados, 14 galatos de alquila foram capazes de inibir o crescimento bacteriano com CIMs na faixa de 15,6 - 62,5 $\mu\text{g/mL}$ ou 32,0 – 340,0 μM) e o ácido gálico não foi considerado ativo exibindo um CIM de 500,0 $\mu\text{g/ml}$ (2.940,0 μM).

Conclusões

5. Conclusões

Através da análise do perfil químico de *C. sinensis* e *C. limonia*, foi possível observar diferenças entre as partes vegetais e entre as espécies de citrus em questão. Além disso a presença das piranocumarinas: xantiletina e seselina, foi detectada apenas nos extratos da raiz de ambas as espécies, indicando que a biossíntese das mesmas provavelmente ocorre na raiz de citros.

Ao realizar a quantificação de piranocumarinas na raiz, verificou-se que há uma diferença significativa na produção desses metabólitos entres os genótipos de uma mesma espécie. Para a laranja Pêra o genótipo de maior produção de piranocumarinas foi LP 144 e para limão Cravo foi o LC 214. Esses dados podem contribuir para a seleção de genótipos com maior produção dessas substâncias, e ser atribuído aos mesmos uma maior resistência. Estudos com seleções de variedades tem sido realizado nos últimos anos com objetivo de escolher material superior para utilização comercial.

Além disso verificou-se também que o limão Cravo - *C. limonia* apresentou maior concentração de piranocumarinas na raiz em comparação a laranja Pêra - *C. sinensis*. A produção destes compostos foi 158,35% maior em *C. limonia*, isso possibilita atribuir sua maior resistência a estresses bióticos e abióticos e ao ataque de alguns fitopatógenos, justificando sua maior utilização como porta-enxerto.

A marcação isotópica e o uso da técnica de RMN de ^{13}C quantitativo tem um papel fundamental nas pesquisas sobre as rotas biossintéticas de metabólitos secundários. Através dos estudos da incorporação de precursores marcados, concluiu-se que a porção isoprênica deriva exclusivamente da via MEP, pois apenas os carbonos C-1 e C-5 da unidade de IPP, tanto para xantiletina em *C. sinensis* e *C. limonia*, quanto para a seselina em *C. limonia*, foram enriquecidos. Estas informações abrem possibilidades de estudos em engenharia genética da biossíntese destes compostos, com possibilidades de indução de resistência em citros frente ao ataque de alguns patógenos causadores de doenças em citros.

Baseado nos valores de CIM determinados neste estudo, a cepa de *X. fastidiosa* é bem mais suscetível à xantiletina que a bactéria de *X. citri*. A xantiletina possui um grande potencial inibitório frente à *Xylella fastidiosa*, apresentando um

CIM de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ ou 34,0 μM . Isso sugere que a mesma pode estar diretamente associada ao mecanismo de resistência de citros ao CVC.

Ao avaliar o potencial inibitório da xantiletina e seselina frente à *Xanthomonas citri*, ambas as substâncias apresentaram uma CIM de 400 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando dessa forma um efeito considerável, porém não satisfatório quando comparado com os antibióticos padrão ou com aquele CIM obtido frente à *X. fastidiosa*. Além disso foi possível inferir que as substâncias não possuem um efeito sinérgico na atividade anti-*Xanthomonas*.

Por fim, conclui-se que os objetivos do projeto foram alcançados com êxito, sendo possível determinar a rota biossintética para piranocumarinas em *C. sinensis* e *C. limonia*. Este será o primeiro relato sobre a via biossintética de piranocumarinas. Até então nada era conhecido sobre o caminho biossintético que leva a formação destas substâncias.

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

1. NEVES, M. F., TROMBIN, V. G., MILAN, P., LOPES, F. F., CRESSONI, F., & KALAKI, R. "O retrato da citricultura brasileira". CitrusBR, 2010.
2. RODRIGUEZ, O., VIÉGAS, F., POMPEU JR., J., AMARO, A.A., SEMPIONATO, O.R. "Citricultura Brasileira", 2ª ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991.
3. EPIFANO, F., FIORITO, S., GENOVESE, S., GRANICA, S., VITALINI, S., & ZIDORN, C. "Phytochemistry of the genus *Skimmia* (Rutaceae)". *Phytochemistry*, **115**: 27, 2015.
4. MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J.; "Citros", Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005.
5. Berk, Z. "Citrus Fruit Processing". Academic Press, 2016.
6. CITRUSBR. Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. "A Indústria Brasileira de suco de laranja". Catálogo Citrus BR. Disponível em: http://www.citrusbr.com/imgs/biblioteca/CITRUS_APEX_PORTUGUES.pdf. Acesso em 08 fev, 2017.
7. CITRUSBR. Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. "Dados de Fechamento de Safra 2015/2016". Disponível em: <http://www.citrusbr.com/safras/>. Acesso em 08 de fev, 2017
8. GILMAR, S., MARINÊS, B., & CUNHA, D. A. L. "Porta-enxertos utilizados na citricultura". *Ciência Rural*, **31**(4): 723, 2001.
9. MATTOS JUNIOR, D. D., NEGRI, J. D., FIGUEIREDO, J. D., & POMPEU JUNIOR, J. "Citros: principais informações e recomendações de cultivo". Campinas, IAC, 2005.
10. CAIRA, S., & FERRANTI, P. "Innovation for sustainable agriculture and food production". Reference Module in Food Science, 2016.
11. LEE, R. F. "Control of Virus Diseases of Citrus". *Control of Plant Virus Diseases*. Elsevier Inc., 2014.
12. FADEL, L., SANCHES, E., FEDERICI, M. T. & COLETTA-FILHO, H. DELLA. "Navelina ISA 315 A cultivar resistant to citrus variegated chlorosis". *Crop Protection*, **64**: 115, 2014.
13. DO BRASIL CARDINALI, M. C., BOAS, P. R. V., MILORI, D. M. B. P., FERREIRA, E. J., E SILVA, M. F., MACHADO, M. A., & BELLETE, B. S. "Infrared spectroscopy: a potential tool in huanglongbing and citrus variegated chlorosis diagnosis". *Talanta*, **91**: 1, 2012.
14. RIBEIRO, A. B., ABDELNUR, P. V., GARCIA, C. F., BELINI, A., SEVERINO, V. G. P., DA SILVA, M. F. D. G., & 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*". *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**(17): 7815, 2009.
15. SOARES, M. S., DA SILVA, D. F., FORIM, M. R., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., SILVA, D. B., & MACHADO, M. A. "Quantification and localization of hesperidin and rutin in *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry". *Phytochemistry*, **115**: 161, 2015.
16. PERONI, L. A., DOS REIS, J. R. R., DELLA COLETTA-FILHO, H., DE SOUZA, A. A., MACHADO, M. A., & STACH-MACHADO, D. R. "Assessment of the diagnostic potential of immunocapture-PCR and immuno-PCR for Citrus Variegated Chlorosis". *Journal of microbiological methods*, **75**(2): 302, 2008.

17. CITRUSBR. Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. "Queda da CVC a doença é considerada praticamente extinta". Disponível em: <http://www.citrusbr.com/ultimas/?id=312385>. Acesso em 22 de fev, 2017.
18. LI, W., TEIXEIRA, D. C., HARTUNG, J. S., HUANG, Q., DUAN, Y., ZHOU, L., & LEVY, L. "Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis". Journal of microbiological methods, **92**(1): 79, 2013.
19. HABERMANN, G., MACHADO, E. C., RODRIGUES, J. D., & MEDINA, C. L. "Gas exchange rates at different vapor pressure deficits and water relations of 'Pera'sweet orange plants with citrus variegated chlorosis (CVC)". Scientia Horticulturae, **98**(3): 233, 2003.
20. FAVARO, M. A., ROESCHLIN, R. A., RIBERO, G. G., MAUMARY, R. L., FERNANDEZ, L. N., LUTZ, A. & GARIGLIO, N. F. "Relationships between copper content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments". Crop Protection, **92**:182, 2017.
21. HA, N. R., LEE, S. C., HYUN, J. W., & YOON, M. Y. "Development of inhibitory ssDNA aptamers for the FtsZ cell division protein from citrus canker phytopathogen". Process Biochemistry, **51**(1): 24, 2016.
22. LI, D. L., XUAN, X. I. A. O., & GUO, W. W. "Production of transgenic anliucheng Sweet Orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with Xa21 gene for potential canker resistance. Journal of Integrative Agriculture, **13**(11); 2370, 2014.
23. REYNOLDS, T. "The evolution of chemosystematics". Phytochemistry **68**: 2887, 2007.
24. SILVA, M. F. D. G. F., GOTTLIEB, O. R., & EHRENDORFER, F. "Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family". Plant Systematics and Evolution, **161**(3): **97**, 1988.
25. STANLEY, W. L., & JURD, L. "Citrus coumarins". Journal of Agricultural and Food Chemistry, **19**(6): 1106, 1971.
26. WITAICENIS, A., SEITO, L. N., DA SILVEIRA CHAGAS, A., DE ALMEIDA, L. D., LUCHINI, A. C., RODRIGUES-ORSI, P., & DI STASI, L. C. (2014). Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. Phytomedicine, **21**(3), 240-246.
27. DE MENEZES, H. D., PEREIRA, A. C., BRANCINI, G. T., DE LEÃO, H. C., JÚNIOR, N. S. M., BACHMANN, L., & BRAGA, G. U. "Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **131**: 74, 2014.
28. DE SOUZA, L. G., RENNÓ, M. N., & FIGUEROA-VILLAR, J. D. "Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review". Chemico-biological interactions, **254**: 11, 2016.
29. ANAND, P., SINGH, B., & SINGH, N. "A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease". Bioorganic & medicinal chemistry, **20**(3): 1175, 2012.
30. PRINCE, M., LI, Y., CHILDERS, A., ITOH, K., YAMAMOTO, M., & KLEINER, H. E. "Comparison of citrus coumarins on carcinogen-detoxifying enzymes in Nrf2 knockout mice". Toxicology letters, **185**(3): 180, 2009.
31. OKUYAMA, S., MINAMI, S., SHIMADA, N., MAKIHATA, N., NAKAJIMA, M., & FURUKAWA, Y. "Anti-inflammatory and neuroprotective effects of auraptene,

- a citrus coumarin, following cerebral global ischemia in mice". *European journal of pharmacology*, **699**(1): 118, 2013.
32. AFEK, U., ORENSTEIN, J., CARMELI, S., RODOV, V., & JOSEPH, M. B. "Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*". *Phytochemistry*, **50**(7): 1129, 1999.
 33. ORTUÑO, A., BOTIA, J. M., FUSTER, M. D., PORRAS, I., GARCÍA-LIDÓN, A., & DEL RÍO, J. A. "Effect of scoparone (6, 7-Dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of tangelo nova, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*". *Journal of agricultural and food chemistry*, **45**(7): 2740, 1997.
 34. KAUR, J., & KAUR, G. "An insight into the role of citrus bioactives in modulation of colon cancer". *Journal of Functional Foods*, **13**: 239, 2015.
 35. BOURGAUD, F., HEHN, A., LARBAT, R., DOERPER, S., GONTIER, E., KELLNER, S., & MATERN, U. "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes". *Phytochemistry Reviews*, **5**(2-3): 293, 2006.
 36. VIALART, G., HEHN, A., OLRÝ, A., ITO, K., KRIEGER, C., LARBAT, R., & BOURGAUD, F. "A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2' H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants". *The Plant Journal*, **70**(3): 460, 2012.
 37. DEWICK, P. M. "Medicinal natural products: a biosynthetic approach". 3rd Edição. John Wiley & Sons, 2002.
 38. BERENBAUM, M. R., NITAO, J. K., & ZANGERL, A. R. "Adaptive significance of furanocoumarin diversity in *Pastinaca sativa* (Apiaceae)". *Journal of Chemical Ecology*, **17**(1): 207, 1991.
 39. LI, W., SCHULER, M. A., & BERENBAUM, M. R. "Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: specificity and substrate encounter rate". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(2): 14593, 2003.
 40. LARBAT, R., KELLNER, S., SPECKER, S., HEHN, A., GONTIER, E., HANS, J., & MATERN, U. "Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis". *Journal of Biological Chemistry*, **282**(1): 542, 2007.
 41. LARBAT, R., HEHN, A., HANS, J., SCHNEIDER, S., JUGDÉ, H., SCHNEIDER, B., & BOURGAUD, F. "Isolation and functional characterization of CYP71AJ4 encoding for the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis". *Journal of Biological Chemistry*, **284**(8): 4776, 2009.
 42. HEHMANN, M., LUKAČIN, R., EKIERT, H., & MATERN, U. "Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L". *European Journal of Biochemistry*, **271**(5): 932, 2004.
 43. DHILLON, D. S., & BROWN, S. A. "Localization, purification, and characterization of dimethylallylpyrophosphate: umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*". *Archives of biochemistry and biophysics*, **177**(1): 74, 1976.
 44. KARAMAT, F., OLRÝ, A., MUNAKATA, R., KOEDUKA, T., SUGIYAMA, A., PARIS, C., & YAZAKI, K. "A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley". *The Plant Journal*, **77**(4): 627, 2014.

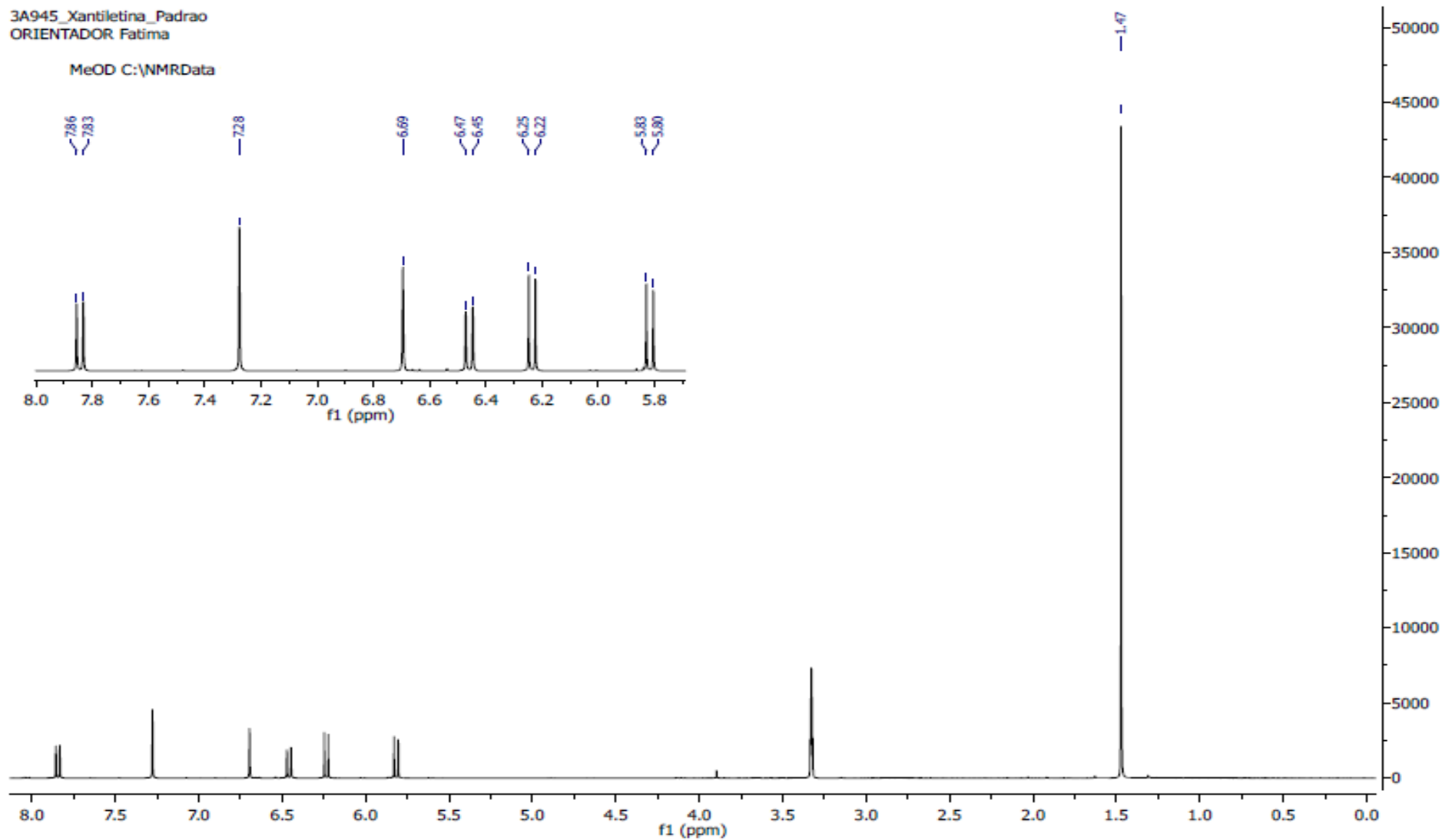
45. STANJEK, V., PIEL, J., & BOLAND, W. "Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae)". *Phytochemistry*, **50**(7): 1141, 1999.
46. MATERN, U., LÜER, P., & KREUSCH, D. "Biosynthesis of coumarins". *Comprehensive natural products chemistry*, **1**: 623, 1999.
47. KHAN, A. J., KUNESCH, G., CHUILON, S., & RAVISÉ, A. "Structure and biological activity of xanthyletin, a new phytoalexin of citrus". *Fruits*, **40**(12): 807, 1985.
48. DE MELO CAZAL, C., DE CÁSSIA DOMINGUES, V., BATALHÃO, J. R., BUENO, O. C., RODRIGUES FILHO, E., DA SILVA, M. F. G. F., & FERNANDES, J. B. "Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography". *Journal of Chromatography A*, **1216**(19): 4307, 2009.
49. LIMA, V., SILVA, C. B., MAFEZOLI, J., BEZERRA, M. M., MORAES, M. O., MOURÃO, G. S., & OLIVEIRA, M. C. F. "Antinociceptive activity of the pyranocoumarin seselin in mice". *Fitoterapia*, **77**(7): 574, 2006.
50. FENG, T., WANG, R. R., CAI, X. H., ZHENG, Y. T., & LUO, X. D. "Anti-human immunodeficiency virus-1 constituents of the bark of *Poncirus trifoliata*". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **58**(7): 971, 2010.
51. HASSAN, M. Z., OSMAN, H., ALI, M. A., & AHSAN, M. J. "Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents". *European Journal of Medicinal Chemistry*, **123**: 236, 2016.
52. PARK, J. H., PARK, N. I., XU, H., & PARK, S. U. "Cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase and pyranocoumarin biosynthesis in *Angelica gigas*". *Journal of natural products*, **73**(8): 1394, 2010.
53. KENNY, O., SMYTH, T. J., HEWAGE, C. M., BRUNTON, N. P., & MCLOUGHLIN, P. "4-Hydroxyphenylacetic acid derivatives of inositol from dandelion (*Taraxacum officinale*) root characterised using LC–SPE–NMR and LC–MS techniques". *Phytochemistry*, **98**: 197, 2014.
54. STAERK, D., KESTING, J. R., SAIRAFIANPOUR, M., WITT, M., ASILI, J., EMAMI, S. A., & JAROSZEWSKI, J. W. "Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC–PDA–MS–SPE–NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*". *Phytochemistry*, **70**(8): 1055, 2009.
55. HILLER, W., SINHA, P., HEHN, M., & PASCH, H. "Online LC-NMR–From an expensive toy to a powerful tool in polymer analysis". *Progress in Polymer Science*, **39**(5): 979, 2014.
56. ALBERT, K. "Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Journal of Chromatography A*, **856**(1): 199, 1999.
57. ALBERT, K. "On-line LC-NMR and related techniques". John Wiley & Sons, 2003.
58. SAKHRELIYA, B. D. & KANSARA, S. "LC-NMR : A powerful tool for analyzing and characterizing complex chemical mixtures without the need of chemical separation". **3**: 115, 2013.
59. KIRBY, J., & KEASLING, J. D. "Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering". *Annual review of plant biology*, **60**: 335, 2009.
60. JIANG, M., & ZHANG, H. "Engineering the shikimate pathway for biosynthesis of molecules with pharmaceutical activities in *E. coli*". *Current opinion in biotechnology*, **42**: 1, 2016.

61. ADAM, K. P., & ZAPP, J. "Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes". *Phytochemistry*, **48**(6): 953, 1998.
62. ROHMER, M., KNANI, M., SIMONIN, P., SUTTER, B., & SAHM, H. "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate". *Biochemical Journal*, **295**(2): 517, 1993.
63. VRANOVÁ, E., COMAN, D., & GRUISSEM, W. "Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network". *Molecular plant*, **5**(2): 318, 2012.
64. MACEDO JÚNIOR, F. C. D. "¹³C Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy in the studies of biosynthetic routes of natural products". *Química Nova*, **30**(1): 116, 2007.
65. MURASHIGE, T., & SKOOG, F. "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiologia plantarum*, **15**(3): 473, 1962.
66. MURRAY, M. G., & THOMPSON, W. F. "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA". *Nucleic acids research*, **8**(19): 4321, 1980.
67. HUSSAIN, M. S., FAREED, S., ANSARI, S., RAHMAN, M. A., AHMAD, I. Z., & SAEED, M. "Current approaches toward production of secondary plant metabolites". *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, **4**(1): 10, 2012.
68. RIBEIRO, A. B.; "Fitoquímica do Enxerto de *Citrus sinensis* sobre *C. limonia* e da espécie *Nycticalanthus speciosus* (Rutaceae) e Biossíntese de Cumarinas Preniladas". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Tese de doutorado, 262 p.
69. SOARES, M. S; "Estudo da variação do perfil químico de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia* após a inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa*". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 211. Tese de doutorado, 355 p.
70. CASS, Q., & CASSIANO, N. "Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações". Elsevier Brasil, 2015.
71. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2010.
72. UKIĆ, Š., ROGOŠIĆ, M., NOVAK, M., ŠIMOVIĆ, E., TIŠLER, V., & BOLANČA, T. "Optimization of IC separation based on isocratic-to-gradient retention modeling in combination with sequential searching or evolutionary algorithm". *Journal of analytical methods in chemistry*, 2013.
73. OHTA, S., & YATAZAWA, M. *Nicotiana tabacum* L.(tobacco): in vitro production of nicotine. *Medicinal and Aromatic Plants II* **7**: 367, 1989.
74. KARUPPUSAMY, S. "A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures". *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**(13): 1222, 2009.
75. BELLETE, B. S. "Estudo da variação do perfil químico de citros com HLB e sadios, buscando informações sobre mecanismo de defesa. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2014. Tese de doutorado, 188 p.
76. WAR, A. R., PAULRAJ, M. G., AHMAD, T., BUHROO, A. A., HUSSAIN, B., IGNACIMUTHU, S., & SHARMA, H. C. "Mechanisms of plant defense against insect herbivores". *Plant signaling & behavior*, **7**(10): 1306, 2012.
77. VARGAS, R. G., GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O., CROCE FILHO, J., CARVALHO, S. A., NOCCHI, P. T. R., & NUNES, W. M. C. "Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na região Noroeste Paranaense, em condições de campo". *Summa Phytopathologica*, **39**: 235, 2013.

78. NYBOM, H., WEISING, K., & ROTTER, B. "DNA fingerprinting in botany: past, present, future". *Investigative genetics*, **5**(1): 1,2014.
79. WU, G. A., PROCHNIK, S., JENKINS, J., SALSE, J., HELLSTEN, U., MURAT, F., & TAKITA, M. A. "Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication". *Nature biotechnology*, **32**(7): 656, 2014.
80. DESCHAMPS, S., LLACA, V., & MAY, G. D. "Genotyping-by-sequencing in plants". *Biology*, **1**(3): 460, 2012.
81. TRITSCH, D., HEMMERLIN, A., BACH, T. J., & ROHMER, M. "Plant isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway: In vivo IPP/DMAPP ratio produced by (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase in tobacco BY-2 cell cultures". *FEBS letters*, **584**(1): 129, 2010.
82. LOPES, A. A., BALDOQUI, D. C., LÓPEZ, S. N., KATO, M. J., BOLZANI, V. D. S., & FURLAN, M. "Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae)". *Phytochemistry*, **68**(15): 2053, 2007.
83. AHMAD, J.; SHAMSUDDIN, K.M.; ZAMAN, A. A pyranocoumarin from *Atlantia Ceylanica*. *Phytochemistry*, **23**(9): 2098, 1984.
84. FLOSS, H. G., & MOTHESE, U. "On the biosynthesis of furocoumarins in *Pimpinella magna*". *Phytochemistry*, **5**(1): 161, 1966.
85. ELLIS, B. E., & BROWN, S. A. "Isolation of dimethylallylpyrophosphate: umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*". *Canadian journal of biochemistry*, **52**(9): 734, 1974.
86. ALVES, E. G., VINHOLIS, A. H. C., CASEMIRO, L. A., FURTADO, N. A. J. C., SILVA, M. L. A., CUNHA, W. R., & MARTINS, C. H. G. "Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras". *Quim. Nova*, **31**(5): 1224, 2008.
87. RIBEIRO, M. O., GOMES, M. D. S., SENNA, S. G., ROSSETTI, M. L. R., & ONSECA, L. D. S. "Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina". *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, **30**: 4, 2004.
88. KUZINA, L. V.; MILLER, T. A.; COOKSEY, D. A. "In vitro activities of antibiotics and antimicrobial peptides against the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*". *Letters in applied microbiology*, **42**(5): 514, 2006.
89. MADDOX, CHRISTINA E.; LAUR, LISA M.; TIAN, LI. "Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*". *Current microbiology*, **60**(1): 53, 2010.
90. SILVA, I. C., REGASINI, L. O., PETRONIO, M. S., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. D. S., BELASQUE, J. & FERREIRA, H. "Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*". *Journal of bacteriology*, **195**(1): 85, 2013.

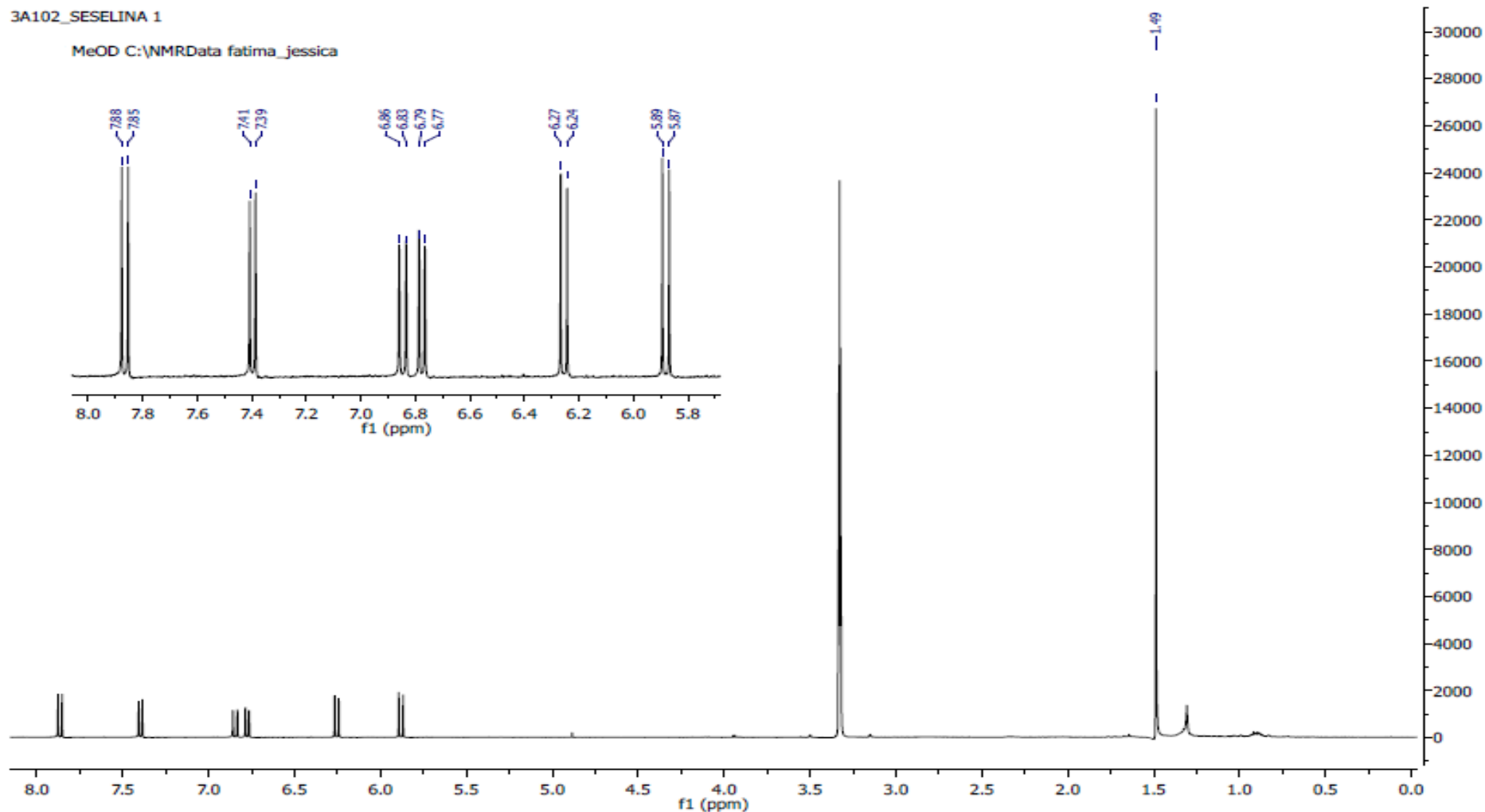
Apêndice

Apêndice I



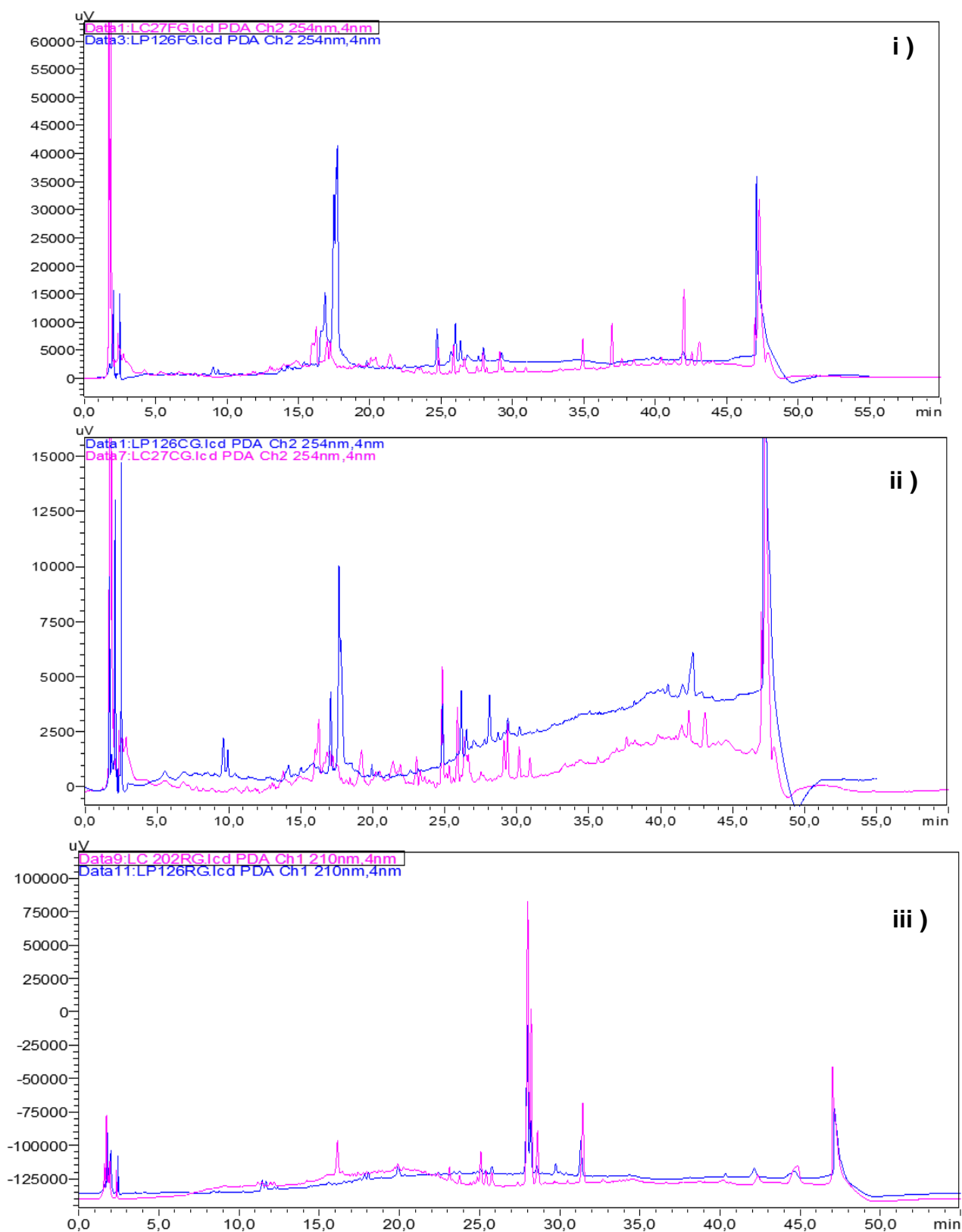
Espectro RMN de ^1H da xantiletina isolada da raiz de citros, para realização dos ensaios biológicos frente à *X. fastidiosa* e *X. citri*.

Apêndice II



Espectro de RMN de ^1H da seselina isolada da raiz de citros, para realização dos ensaios biológicos frente à *X. fastidiosa* e *X. citri*.

Apêndice III



Comparação do perfil químico das partes vegetais de laranja Pêra em azul e limão Cravo em rosa. i) Folha ii) Caule iii) Raiz.