

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

**“ASPECTOS QUÍMICOS ENVOLVIDOS NAS INTERAÇÕES  
DE *Citrus* COM FITOPATÓGENOS”**

**Rodrigo Facchini Magnani\***

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

**Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**

**\* bolsista CNPq**

**São Carlos - SP  
2007**

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

M196aq

Magnani, Rodrigo Facchini.

Aspectos químicos envolvidos nas interações de *Citrus* com fitopatógenos / Rodrigo Facchini Magnani. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

145 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

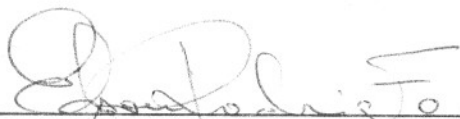
1. Microrganismos fitopatogênicos. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Interação planta-microrganismos. 4. Espectrometria de massas. 5. Cítricos. 6. Cromatografia líquida. I. Título.

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

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

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Rodrigo Facchini Magnani** realizado em 10 de agosto de 2007:*



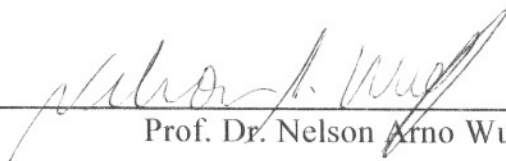
---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



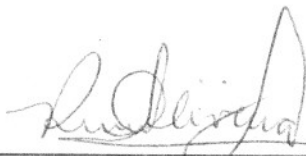
---

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes



---

Prof. Dr. Nelson Arno Wulff



---

Profa. Dra. Regina Vincenzi de Oliveira



---

Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira

*Aos meus pais que sempre me apoiaram e me  
incentivaram em todos os momentos.*

DEDICO

*“Organismos não se adaptam simplesmente a condições autônomas, previamente existentes; eles criam, destroem, modificam e transformam internamente aspectos do mundo exterior por suas próprias atividades vitais. Nem organismo, nem ambiente é um sistema fechado; cada um é aberto para o outro.”*

Richard C. Lewontin et al., 1984

*Morre lentamente...*

*"Morre lentamente, quem não troca de idéias, não troca de discurso, evita as próprias contradições.*

*Morre lentamente, quem vira escravo do hábito, repetindo todos os dias o mesmo trajeto e as mesmas compras no supermercado. Quem não troca de marca, não arrisca vestir uma cor nova, não dá papo para quem não conhece.*

*Morre lentamente, quem faz da TV o seu gurú e seu parceiro diário. (Como pode 14 polegadas ocupar tanto espaço em uma vida?).*

*Morre lentamente, quem evita uma paixão, quem prefere o "preto no branco" e os "pingos nos is" a um turbilhão de emoções indomáveis, justamente as que resgatam brilho nos olhos, sorrisos e soluços, coração aos tropeços, sentimentos.*

*Morre lentamente, quem não vira a mesa quando está infeliz no trabalho, no casamento, na família, nas amizades, quem não arrisca o certo pelo incerto atrás de um sonho, quem não se permite, uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos.*

*Morre lentamente, quem não viaja, quem não lê, quem não ouve música, quem não vê o sol nascer ou se pôr, quem não acha graça de si mesmo.*

*Morre lentamente, quem destrói seu amor próprio, quem não se deixa ajudar. Morre lentamente, quem passa os dias queixando-se da má sorte ou da chuva incessante, desistindo de um projeto antes de iniciá-lo, não perguntando sobre um assunto que desconhece e não respondendo quando lhe indagam o que sabe.*

*Evitemos a morte em suaves prestações, lembrando sempre que estar vivo exige um esforço bem maior do que simplesmente respirar!"*

*Pablo Neruda*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**;

Ao **Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho - UFSCar, São Carlos** - pela amizade, orientação, ensinamentos e constantes incentivos;

Ao **Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati – ESALQ/USP** - pela colaboração e disponibilização do seu laboratório para o aprendizado dos ensaios biológicos;

Ao pesquisador **Dr. Nelson Arno Wulff – FUNDECITRUS, Araraquara** – pelas amostras de plantas, análises e discussões sobre microrganismos fitopatogênicos de citros;

Ao doutorando **MSc. Leonardo Toffano** do laboratório de Fitopatologia da **ESALQ/USP** pela realização dos ensaios biológicos com o microrganismo *Guignardia citricarpa*.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais - UFSCar: **Prof. Dr. João Batista Fernandes, Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva** e ao **Prof. Dr. Paulo César Vieira**, pela amizade e ensinamentos na graduação e pós-graduação;

Aos demais professores do Departamento de Química da UFSCar;

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais – UFSCar e em especial aos alunos do Laboratório de Espectrometria de Massas – UFSCar;

Aos “companheiros” **Gezimar Donizetti de Souza** e **Joel Alvim Junior** pela grande amizade e cumplicidade em várias decisões profissionais;

As pesquisadoras **Dr. Adélia Cristina Pessoa Araújo** e **Dr. Danusa Leal Telles** e aos grandes amigos que fiz durante os sete meses em que trabalhei no Laboratório de Resíduo de Agortóxicos e Bebidas Alcoólicas do Instituto de Tecnologia de Pernambuco – LabTox – ITEP;

Gostaria de agradecer especialmente ao pesquisador **José Raimundo Filho**, a Secretária **Vera Lúcia Andrade e Silva** e ao Técnico **Manoel Vieira Silva** do LabTox por ter tido a oportunidade de conhecê-los e terem despertado em mim o respeito pela cultura nordestina e pela inteligência natural que o nordestino possui;

Aos amigos do laboratório de bioequivalência e equivalência farmacêutica da Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco – UNIFAG – USF. Em especial aos pesquisadores **Dr. Fábio Alessandro Proença Barros** (Cebolinha) e **Dr. Eduardo César Meurer** pela amizade e o grande aprendizado sobre espectrometria de massas;

Aos amigos dos Laboratórios de Síntese Orgânica, de RMN, de Inorgânica e aos demais laboratórios do Departamento de Química da UFSCar pelas contribuições na execução deste trabalho e amizade;

A todos os amigos da turma de 96, e do Departamento de Química;

Ao corpo técnico do Departamento de Química - UFSCar: **Ademir, Sr. Antônio** (*in memoriam*), **Doraí, Luciana, Paulo e Valdir**;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química;

Aos meus pais **Vanderley** e **Rosa Maria**, à minha irmã **Patrícia** e aos meus avós **Zaira, José** (*in memoriam*), **Irma e Alcides** pelos constantes incentivos, apoio e compreensão que me permitem buscar as realizações dos meus sonhos;

A minha família por todo o apoio;

A **Daniela**, minha companheira, pelo carinho e compreensão que foram fundamentais em todos esses anos de convivência;



Por fim, ao bom e velho *Blues*.

## SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	Metabólitos Secundários de Espécies do Gênero <i>Citrus</i> (RUTACEAE)	1
1.2	Interações Entre Plantas e Microrganismos	4
1.3	Processos de Reconhecimento na Resistência de Plantas à Doenças	7
1.4	Possibilidades de indução de defesas: Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)	11
1.5	Fitoalexinas	14
1.6	Algumas Patogenias de <i>Citrus</i>	16
1.6.1	Pinta Preta	16
1.6.2	Cancro Cítrico	17
1.6.3	Mancha Marrom de Alternária	18
1.6.4	Morte Súbita dos Citros	19
1.6.5	Clorose Variegada dos Citros ou Amarelinho	20
1.6.6	Greening	21
2	Objetivos	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	Procedimento Experimental	27
3.1	Materiais	27
3.2	Equipamentos Utilizados	28
3.3	Metodologias de Análise dos Metabólitos Secundários Presentes Em <i>Citrus</i> Através de HPLC/UV-MS	31
3.3.1	Coletas dos Materiais Botânicos	31
3.3.2	Metodologia de Análise dos Compostos Polares Presentes Nas Folhas do Enxerto	31
3.3.2.1	Extração e Pré-purificação dos Compostos Polares Presentes nas Folhas do Enxerto	31
3.3.2.2	Condições Cromatográficas Utilizadas Durante a Análise dos Compostos Polares Presentes no Extrato de Folhas de <i>Citrus</i>	32
3.3.3	Metodologia de Análise dos Compostos de Polaridade Intermediária Presentes Nas Folhas do Enxerto	33
3.3.3.1	Extração e Pré-purificação dos Compostos de Polaridade Intermediária Presentes nas Folhas do Enxerto	33
3.3.3.2	Condições Cromatográficas Utilizadas Durante A Análise dos Compostos de Polaridade Intermediária Presentes no Extrato de Folhas de <i>Citrus</i>	34
3.3.4	Aplicação da Metodologia de Análise dos Compostos Polares Presentes em <i>Citrus</i> em Plantas Com Sintomas da Doença Morte Súbita dos Citros (MSC)	36
3.3.4.1	Coletas dos Materiais Botânicos de Plantas Sadias e Com Sintomas de MSC	36
3.3.4.2	Extração, Pré-purificação e Condições Cromatográficas Utilizadas na Análise dos Compostos Polares Presentes nas Cascas do Tronco do Enxerto	37

3.3.4.3	Novas Condições Desenvolvidas Para a Análise dos Compostos Polares Presentes nas Cascas do Tronco do Enxerto	37
3.4	Isolamento e Identificação dos Metabólitos Secundários de <i>Alternaria alternata</i>	39
3.4.1	Obtenção do Microrganismo Isolado <i>Alternaria alternata</i>	36
3.4.2	Cultivo de <i>A. alternata</i> em milho	39
3.4.3	Extração dos Metabólitos Secundários de <i>A. alternata</i>	40
3.4.4	Isolamento dos Metabólitos Secundários de <i>A. alternata</i>	41
3.4.5	Desenvolvimento da Análise Via HPLC-UV Para a Construção da Curva de Produção do Alternariol e Alternariol Monometil Éter	44
3.4.5.1	Cultivo de <i>A. alternata</i> em Milho Visando a Produção dos Metabólitos Secundários	44
3.4.5.2	Condições Cromatográficas (HPLC-UV)	44
3.4.5.3	Construção das Curvas de Calibração de AME e AOH	45
3.4.5.4	Extração e Pré-Purificação dos Metabólitos Secundários de <i>A. alternata</i> Visando a Construção da Curva de Produção de AME e AOH	45
3.4.6	Quantificação de Alternariol e Alternariol Monometil Éter No Flavedo e No Albedo de Tangerinas ( <i>Citrus reticulata</i> ) Com Sintomas de Mancha Marrom de <i>Alternaria</i>	46
3.4.6.1	Material Vegetal	46
3.4.6.2	Solução de Padrões e Curvas Analíticas	47
3.4.6.3	Extração e Preparo de Amostra	47
3.4.6.4	Otimização dos Parâmetros Utilizados No LC-MS/MS	48
3.4.6.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	49
3.4.6.6	Especificidade, Linearidade e Precisão	50
3.4.6.7	Recuperação	50
3.5	Aplicação das Metodologias de TLC, PCR, HPLC-DAD e HPLC-MS/MS Na Avaliação da Diferença de Metabolismo Encontrada Em Plantas Com Sintomas de Greening	51
3.5.1	Coletas dos Materiais Botânicos	52
3.5.2	Extração dos Compostos Polares Presentes nas Folhas do Enxerto Com Sintomas de Greening	52
3.5.3	Condições Utilizadas Durante as Análises dos Extratos de Plantas com Sintomas de Greening por TLC	53
3.5.4	Condições Utilizadas Durante as Análises dos Extratos de Plantas com Sintomas de Greening por HPLC-DAD	53
3.5.5	Condições Utilizadas Durante as Análises dos Extratos de Plantas com Sintomas de Greening por HPLC-MS/MS	54
3.6	Realização dos Ensaio de Inibição de <i>Guignardia citricarpa</i> , <i>in vitro</i> , Pelo Método de Germinação de Esporos Em Placa de Poliestireno	57
3.6.1	Compostos Utilizados No Ensaio de Inibição de <i>Guignardia citricarpa</i> , <i>in vitro</i>	59
4	Resultados e Discussões	63
4.1	Resultados Obtidos Para a Metodologia de Análise Por HPLC/UV/MS dos Metabólitos Secundários Presentes em <i>Citrus</i>	63
4.1.1	Extração e Pré-purificação dos Compostos Polares Presentes nas Folhas do Enxerto	63

4.1.2	Resultados Obtidos Durante a Extração e Pré-purificação dos Compostos de Polaridade Intermediária Presentes nas Folhas de Citros	66
4.1.3	Resultados Obtidos Durante as Análises dos Compostos Polares Presentes nas Cascas do Tronco do Enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonea</i>	71
4.1.3.1	Resultados das Novas Condições Desenvolvidas Para a Análise dos Compostos Polares Presentes nas Cascas do Tronco do Enxerto	74
4.2	Resultados Obtidos do Isolamento e Identificação dos Metabólitos Secundários de <i>A. alternata</i>	77
4.2.1	Determinação Estrutural da Micotoxina Alternariol Monometil Éter	78
4.2.2	Determinação Estrutural da Micotoxina Alternariol	84
4.2.3	Determinação Estrutural da Molécula Ácido Tenuazônio	91
4.3	Construção da Curva de Produção das Micotoxinas AOH e AME Pelo Microrganismo <i>Alternaria alternata</i> Cultivado em Milho	97
4.3.1	Resultados Obtidos Para a Metodologia de Extração e Análise das Micotoxinas AOH e AME de <i>A. alternata</i> por HPLC-UV	97
4.3.2	Resultados Obtidos Na Construção das Curvas de Calibração dos Metabólitos Secundários de <i>A. alternata</i> por HPLC-UV	98
4.3.3	Curvas de Produção dos Metabólitos Secundários de <i>A. alternata</i> por HPLC-UV	99
4.4	Quantificação de Alternariol e Alternariol Monometil Éter No Flavedo e No Albedo de Tangerinas ( <i>Citrus reticulata</i> ) Com Sintomas de Mancha Marrom de Alternaria	102
4.4.1	Desenvolvimento do Método e Especificidade	102
4.4.2	Sensibilidade, Linearidade, Precisão e Exatidão do Método	106
4.5	Aplicação das Metodologias de TLC, PCR, HPLC-DAD e HPLC-MS/MS Na Avaliação da Diferença de Metabolismo Encontrada Em Plantas Com Sintomas de Greening	113
4.6	Resultados Obtidos Durante A Realização dos Ensaios de Inibição de <i>Guignardia citricarpa</i> , <i>in vitro</i> , Pelo Método de Germinação de Esporos Em Placa de Poliestireno	126
5	Considerações Finais	131
6	Referências Bibliográficas	135

## PRINCIPAIS ABREVIACÕES

AS	-	Ácido Salicílico
AME	-	Alternariol Monometil Éter
AOH	-	Alternariol
BA	-	Ácido Benzoico
BDA	-	Batata Dextrose Ágar
CVC	-	Clorose Variegada dos Citros
DAD	-	Diodo Array Detector
DP	-	Desvio Padrão
DPR	-	Desvio Padrão Relativo
ES	-	<i>Electrospray</i>
HBL	-	Huanglongbing
HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	-	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
L/h	-	Litros por Hora
MMA	-	Mancha Marrom de Alternaria
MSC	-	Morte Súbita dos Citros
MS/MS	-	Espectrometria de Massas seqüencial
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
n.d.	-	Não Detectado
NOE	-	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
ODS	-	Octadecilsilano
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
PR	-	Proteínas Relacionadas à Patogênese
R	-	Gene de Resistência
RF	-	Fator de Retenção
RMN <sup>13</sup> C	-	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
RMN <sup>1</sup> H	-	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – 1
rpm	-	Rotações por Minuto
SAR	-	Resistência Sistêmica Adquirida
SPE	-	Extração em Fase Sólida
S/R	-	Relação Sinal Ruído
SRM	-	Selected Reaction Monitoring
TLC	-	Cromatografia em Camada Delgada
TMV	-	Vírus do Mosaico do Fumo
u.m.a.	-	Unidades de Massa Atômica
UV	-	Ultra Violeta

## PRINCIPAIS SÍMBOLOS

$h$	-	Altura
Å	-	Ângstron
cm	-	Centímetro
$r^2$	-	Coefficiente de Determinação
$j$	-	Constante de Acoplamento
Da	-	Daltons
$\delta$	-	Deslocamento Químico em Partes Por Milhão
$d$	-	Diâmetro
$d$	-	Dubleto
eV	-	Eletrovoltz
°C	-	Grau Celsius
$[M-H]^-$	-	Ion Pseudo-Molecular Desprotonado
$[M+H]^+$	-	Ion Pseudo-Molecular Protonado
Kg	-	Kilograma
MHz	-	Megahertz
$\mu\text{m}$	-	Micrômetro
mg	-	Miligramas
mm	-	Milímetro
$s$	-	Singleto
$t$	-	Tripleto
V	-	Voltz

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Eluição gradiente utilizada durante a análise dos extratos polares das folhas de citros.	30
Tabela 2	Eluição gradiente utilizada durante a análise dos extratos de polaridade intermediária das folhas de citros.	32
Tabela 3	Eluição gradiente utilizada durante as análises de plantas com sintomas de MSC.	35
Tabela 4	Rampa cromatográfica utilizada durante as análises de plantas com sintomas de Greening.	50
Tabela 5	Eluição gradiente utilizada durante as análises de plantas com sintomas de greening.	52
Tabela 6	Compostos que foram utilizados no ensaio de inibição dos apressórios de <i>G. citricarpa</i> .	56
Tabela 7	Amostras que foram analisadas pelo experimento de SRM.	70
Tabela 8	Dados de RMN utilizados para a determinação estrutural do ácido tenuazônio.	88
Tabela 9	Representação das médias das áreas obtidas e estimativa das concentrações das micotoxinas avaliadas durante os dias de cultivo.	96
Tabela 10	Resultados referentes a linearidade, limites de quantificação e detecção propostos para o método (os valores estão representados como a média $\pm$ DPR, n = 3).	105
Tabela 11	Experimento de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) utilizando o flavedo como matriz.	106
Tabela 12	Experimento de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) utilizando o albedo como matriz.	106
Tabela 13	Valores obtidos para o experimento de recuperação utilizando tanto flavedo quanto o albedo como matrizes. (n = 5).	107
Tabela 14	Aplicação do método validado nas análises de tangerinas com e sem sintomas de mancha marrom de alternaria (n = 3).	108
Tabela 15	Resultados obtidos através das técnicas, TLC, PCR, HPLC-UV e HPLC-MS/MS para plantas sadias e com sintomas de greening.	118
Tabela 16	Resultados obtidos durante o Ensaio 1 a de germinação dos esporos de <i>G. citricarpa</i> .	124
Tabela 17	Resultados obtidos durante o Ensaio 1 b de germinação dos esporos de <i>G. citricarpa</i> .	124
Tabela 18	Resultados obtidos durante o ensaio 2 a de germinação dos esporos de <i>G. citricarpa</i> .	126
Tabela 19	Resultados obtidos durante o ensaio 2 a de germinação dos esporos de <i>G. citricarpa</i> .	126

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas moleculares de metabólitos encontrados em espécies de <i>Citrus</i> .	03
Figura 2	Microrganismos capazes de causar doenças em plantas e comparação das suas dimensões com uma célula vegetal típica (adaptado de AGRIOS, 1997).	06
Figura 3	Representação diagramática da interação do fitopatógeno <i>Nectria haematococca</i> e células de ervilha <i>Pisum sativum</i> . Referência à capacidade de patógenos promoverem a detoxificação de fitoalexinas produzidas pelo hospedeiro (adaptado de VANETTEN et al, 1989).	08
Figura 4	Estruturas moleculares de substâncias com propriedades ativadoras de SAR.	13
Figura 5	Estruturas moleculares das fitoalexinas a- xantiletina, b- seselina, c- umbeliferona e d- scoparona.	15
Figura 6	Frutos com sintomas de pinta preta.	16
Figura 7	Folha e frutos com sintomas de cancro.	17
Figura 8	Fruto e folhas de tangerina com sintomas de mancha marrom de alternaria.	18
Figura 9	orta enxerto e planta com sintomas de mancha morte súbita dos citros.	19
Figura 10	Folha e frutos com sintomas de amarelinho.	20
Figura 11	Folhas frutos e ramos com sintomas de greening. Psílideo <i>Diaphorina citri</i> , vetor da doença nas Américas.	21
Figura 12	Estruturas moleculares do Ácido Gentísico (AG) e da Orbicularina.	23
Figura 13	Extração e pré-purificação dos compostos polares.	32
Figura 14	Extração e pré-purificação dos compostos de polaridade intermediária.	34
Figura 15	Região da copa onde foi realizada enxertia de <i>C. sinensis</i> (laranja pêra) sobre <i>C. limonea</i> (limão cravo) apresentando sintoma de MSC no cavalo do enxerto.	36
Figura 16	Extração e pré-purificação dos metabólitos secundários de <i>A. alternata</i> .	46
Figura 17	Extração e pré-purificação das micotoxinas AOH e AME de <i>A. alternata</i> .	48
Figura 18	Estrutura molecular do Ácido 2-O- $\beta$ -4C1-glucopiranosídeo (Orbicularina).	52
Figura 19	Extração dos compostos presentes em folhas da enxertia de <i>C. sienensis</i> sobre <i>C. limonea</i> com sintomas de Greening.	53
Figura 20	Desenvolvimento do ensaio de inibição de <i>G. citricarpa</i> , <i>in vitro</i> , pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno.	58
Figura 21	Estruturas moleculares dos compostos utilizados no ensaio 1 de inibição dos apressórios de <i>G. citricarpa</i> .	61
Figura 22	Estruturas moleculares dos compostos utilizados no ensaio 2 de inibição dos apressórios de <i>G. citricarpa</i> .	62



Figura 23	Espectro obtido do experimento de íons fragmento de $[M-H]^- = 609$ com energia de colisão de 13 eV.	65
Figura 24	Propostas de fragmentação para a rutina e hesperidina.	65
Figura 25	Espectro obtido do experimento de íons fragmento de $[M-H]^+ = 403$ (40 eV), $[M-H]^+ = 373$ (45 eV) e $[M-H]^+ = 373$ (25 eV).	69
Figura 26	Propostas de fragmentação para a nobiletina, tangeretina e aurentina.	70
Figura 27	Cromatogramas obtidos da análise da casca da copa ( <i>C. sinensis</i> ) e da casca do cavalo ( <i>C. limonea</i> ) de uma planta com sintomas de MSC.	71
Figura 28	Espectro de íons fragmento de $[M-H]^- = 593$ do extrato da copa ( <i>C. sinensis</i> ) do enxerto de uma planta com sintomas aparentes de MSC.	73
Figura 29	Perfil das áreas obtidas através dos experimentos de SRM (transição de quantificação 593 > 353) das amostras de laranjeiras saudáveis, saudáveis coletadas ao lado de plantas doentes e plantas doentes.	76
Figura 30	Estrutura química do Alternariol ( <b>AOH</b> ), Alternariol monometil éter ( <b>AME</b> ) e Ácido tenuazônio.	77
Figura 31	Correlações de NOESY para o Alternariol monometil éter.	78
Figura 32	Experimento de RMN $^1H$ do Alternariol Monometil Éter.	79
Figura 33	Ampliação do espectro de RMN $^1H$ do Alternariol Monometil Éter na região de 4,0 – 2,5 ppm.	80
Figura 34	Ampliação do espectro de RMN $^1H$ do Alternariol Monometil Éter na região de 7,4 – 6,0 ppm.	81
Figura 35	Experimento de RMN NOESY do Alternariol Monometil Éter.	82
Figura 36	Espectro de massas $ES^-$ de íons fragmento com 40 eV do Alternariol Monometil Éter.	83
Figura 37	Experimento de RMN $^1H$ do Alternariol.	85
Figura 38	Ampliação do espectro de RMN $^1H$ do Alternariol na região de 7,2 – 6,3 ppm.	86
Figura 39	Ampliação do espectro de RMN $^1H$ do Alternariol na região de 3,8 – 0,8 ppm.	87
Figura 40	Experimento de HSQC do Alternariol.	88
Figura 41	Espectro de massas FS do Alternariol.	89
Figura 42	Espectro de massas de íons fragmento com 30 eV do Alternariol.	90
Figura 43	Estrutura molecular do ácido tenuazônio.	92
Figura 44	Experimento de RMN $^1H$ do Ácido Tenuazônio.	93
Figura 45	Experimento de RMN $^1H$ do Ácido Tenuazônio.	94
Figura 46	Experimento de RMN $^{13}C$ do Ácido Tenuazônio.	95
Figura 47	Experimento de espectrometria de massas <i>full scan electrospray</i> no modo positivo e no modo negativo do Ácido Tenuazônio.	100
Figura 48	Curva de produção do metabólito <b>AME</b> .	100
Figura 49	Curva de produção do metabólito <b>AOH</b> .	100

Figura 50	Espectro de íons fragmento (segunda geração) obtido por CID-MS/MS; <b>A)</b> alternariol (25 eV); <b>B)</b> alternariol monometil éter (35 eV). Os íons marcados representam as transições escolhidas para o experimento de SRM (● → ○).	104
Figura 51	Propostas de fragmentação dos alternarióis; A) Perda do grupo metila (15 Da) na forma de radical; B) Perda de uma molécula de CO (28 Da); C) Formação dos íons fragmento <i>m/z</i> 215 e <i>m/z</i> 213 para o alternariol. Esta fragmentação aparentemente não é observada para o alternariol monometil éter.	105
Figura 52	Cromatogramas dos experimentos de SRM obtidos durante a quantificação no flavedo por HPLC-MS/MS: <b>A)</b> e <b>B)</b> Ausentes de micotoxinas (branco); <b>C)</b> e <b>D)</b> Concentrações próximas ao limite de quantificação; <b>E)</b> e <b>F)</b> Maior concentração da curva analítica. Os números <b>1</b> e <b>2</b> referem-se ao alternariol e alternariol monometil éter respectivamente.	107
Figura 53	Experimento com extratos do albedo dos frutos de <i>C.sinensis</i> (laranja pêra) em placa de TLC revelada em lâmpada de UV a 360 nm.	114
Figura 54	Experimento de PCR.	115
Figura 55	Espectro de íons fragmento da molécula ácido gentísico.	118
Figura 56	Espectro de íons fragmento da molécula ácido salicílico.	118
Figura 57	Propostas de fragmentação e transições monitoradas no experimento de SRM para as moléculas ácido gentísico, orbicularina, ácido salicílico e ácido salicílico glicosilado (ácido β-O-D glucosilsalicílico).	119
Figura 58	Cromatogramas obtidos durante os experimentos de SRM de plantas com sintomas de greening e de plantas saudáveis.	120
Figura 59	Gráficos de barras apresentando o perfil de áreas encontradas através do experimento de LC-MS/MS quando a molécula orbicularina estava sendo monitorada.	124
Figura 60	Gráfico dos ensaios de inibição de <i>G. citricarpa</i> relativo ao Ensaio 1a.	128
Figura 61	Gráfico dos ensaios de inibição de <i>G. citricarpa</i> relativo ao Ensaio 1b.	128
Figura 62	Gráfico dos ensaios de inibição de <i>G. citricarpa</i> relativo ao Ensaio 2a.	130
Figura 63	Gráfico dos ensaios de inibição de <i>G. citricarpa</i> relativo ao Ensaio 2b.	130

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Extratos obtidos de <i>A. alternata</i> cultivada em milho.	40
Fluxograma 2	Isolamento dos metabólitos secundários de <i>A. alternata</i> .	42
Fluxograma 2.1	Continuação do <b>Fluxograma 2</b> para o isolamento dos metabólitos secundários de <i>A. alternata</i> .	43

## LISTA DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1	Cromatograma obtido durante o desenvolvimento do método para os compostos polares utilizando a coluna Shimadzu CLC-phenil (333 nm).	64
Cromatograma 2	Cromatograma obtido anteriormente durante o desenvolvimento do método para os compostos de polaridade intermediária utilizando a coluna Shimadzu CLC-phenil (333 nm).	67
Cromatograma 3	Experimento de <i>Full Scan</i> dos compostos de polaridade intermediária presentes nas amostras de folhas de <i>Citrus</i> .	68
Cromatograma 4	Cromatograma de íons totais (TIC) obtido durante a análise de HPLC-UV-MS da copa ( <i>C. sinensis</i> ) de uma planta com aparentes de MSC.	73
Cromatograma 5	Cromatograma de SRM obtido do extrato da copa de uma planta com sintomas de MSC.	75
Cromatograma 6	Cromatograma obtido da análise do extrato realizado com 30 dias de cultivo.	98
Cromatograma 7	Cromatograma obtido de uma planta sadia.	116
Cromatograma 8	Cromatograma obtido de uma planta com sintoma de greening.	116

## Resumo

“ASPECTOS QUÍMICOS ENVOLVIDOS NAS INTERAÇÕES DE *Citrus* COM FITOPATÓGENOS” – Este trabalho descreve o desenvolvimento de metodologias de análise para metabólitos polares e de polaridade intermediária presentes em laranjeiras provenientes da enxertia de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonea* usando HPLC-DAD-MS/MS. Através deste método, foram detectados flavonóides glicosilados e polimetoxilados. O método também foi aplicado na análise de plantas com sintomas da doença *Morte Súbita dos Citros* (MSC). Neste mesmo contexto foram analisadas plantas saudáveis e com sintomas da doença *Greening* com o objetivo de monitorar moléculas derivadas do ácido benzóico como o ácido gentísico, orbicularina, ácido salicílico e ácido salicílico glicosilado (ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico). Um outro estudo realizado neste trabalho tratou do isolamento e identificação das micotoxinas alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME), além do ácido tenuazônio, produzidas *in vitro* pelo microrganismo fitopatogênico de citros *Alternaria alternata*. A produção destas micotoxinas foi monitorada através de HPLC-DAD ao longo de trinta dias de cultivo do microrganismo com a finalidade de construir uma curva de produção destas moléculas. Validou-se também um método usando HPLC-MS/MS para quantificar as micotoxinas AOH e AME nas cascas de tangerina (albedo e flavedo) com sintomas de mancha marrom de alternaria (MMA), onde encontrou-se  $17.4 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$  de AOH e  $3.5 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$  de AME no flavedo de tangerina. Por fim, foram realizados ensaios de inibição do fungo fitopatogênico de citros *Guignardia citricarpa*, causador da doença pinta preta, através do método de germinação de esporos em placa de poliestireno. As substâncias que apresentaram praticamente 100% de inibição foram dois derivados do ácido benzóico, o ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico e o ácido 3,4-dimetoxibenzóico, e os flavonóides glicosilados naringina e rutina. Essas quatro substâncias, na concentração de  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ , foram capazes de inibir por completo a germinação dos esporos de *G. citricarpa*.

## Abstract

“CHEMICAL ASPECTS RELATED TO THE INTERACTION BETWEEN *Citrus* PLANTS AND PHYTOPATOGENIC FUNGI” – This present thesis describes the development of analytical methodologies involving the HPLC-PDA-MS/MS coupling to verify the production of both polar and non-polar metabolites in orange trees produced by grafting *Citrus sinensis* onto *Citrus limonea*. By the use of such kind of method, it was possible to verify the production of both polymethoxy and glycosyl flavonoids. This method was then applied to plants with symptoms of two different diseases, Citrus Sudden Death (MSC) and Greening. Regarding this last disease, the methodologies were focused on detection of some analogous of benzoic acid like gentisic acid, orbicularin, salicylic acid and glycosyl salicylic acid. Another part of this work was focused on isolation and characterization of Alternariol (AOL) and Alternariol Monomethyl Ether (AME), mycotoxins produced in vitro by a phytopathogenic strain of *Alternaria alternata* and the molecule tenuazoic acid. These mycotoxins were also monitored using HPLC-DAD for 30 days in an attempt to find out a possible profile of their production. In addition, an analytical method involving HPLC-MS/MS was developed, validated and applied to quantify the amounts of AOL and AME in different parts of tangerines (i.e., on flavedo and on albedo tissues) with and without symptoms of Alternaria Brown Spot disease. The levels of such substances were about  $17.4 \pm 1.0$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  of AOL and  $3.5 \pm 0.2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  of AME on flavedo. Some inhibition tests against *Guinardia citricarpa*, related to Black Spot disease, were also done with some isolated compounds. Five of these compounds showed to have 100% of inhibition in this test at concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : benzoic acid, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid, 3,4-dimethoxybenzoic acid, and the glycosyl flavonoids naringin and rutin.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 – Metabólitos Secundários de Espécies do Gênero *Citrus* (RUTACEAE)

A ordem Rutales é constituída pelas famílias Rutaceae, Cneoraceae, Simaroubaceae (elevado à família Surianaceae e Kirkiaceae), Meliaceae e Burseraceae (ENGLER, 1931). A família Rutaceae constitui o maior grupo dentro da ordem Rutales e caracteriza-se por uma grande diversidade de metabólitos secundários não comuns nas demais famílias da ordem, representados por alcalóides derivados do ácido antranílico, cumarinas e limonóides (WATERMAN, 1983). Alguns gêneros desta família são cultivados no Brasil, entre eles *Clausena*, *Citrus* e *Murraya*.

Os flavonóides, contidos na casca de limão, vêm sendo estudados desde 1936, quando Szent-Gyorgy extraiu a “citrina”, uma mistura de flavonóides de limão, que é considerada como vitamina. Desde então, vários estudos estão sendo conduzidos a respeito dos flavonóides. Os flavonóides da casca de limão são caracterizados pela presença de quatro grupos de flavonóides: flavonas-O-glicosiladas, flavonas-C-glicosiladas, flavonols e flavanonas. O primeiro grupo é muito comum em frutos, onde são encontrados na casca de limão luteolina-7-rutinosideo e diosmetina-7-rutinosideo (diosmina). Flavonóides-C-glicosilados são largamente distribuídos em plantas superiores. Foram encontradas quatro flavonas-di-C-glicosilados em casca de limão: 6,8-di-C-glucosil-luteonina; 6,8-di-C-glucosil-apigenina; 6,8-di-C-glucosil-chrisoeriol; 6,8-di-C-glucosil-diosmetina. O grupo flavonol contido na casca de limão é caracterizado pela presença de rutina (quercetina-3-O-rutinosideo) (**Figura 1a**) e três compostos polimetoxilados: 3,5,7,4'-tetrahidroxi-6,8,3'-trimetoxi-flavona (limocitrol) (**Figura 1b**); 3,5,7,4'-tetrahidroxi-,8,3'-dimetoxi-flavona (limocitrina); 3,5,7,3'-tetrahidroxi-6,8,4'-trimetoxi-flavona (isolimocitrol). Flavonas polimetoxiladas estão presentes especialmente no gênero *Citrus* e estão localizadas no flavedo. O próximo grupo é o das flavanonas. Esses compostos têm muita importância para o gênero *Citrus*, por causa do seu uso em quimiotaxonômia e, também, devido à sua relação com o paladar. Os

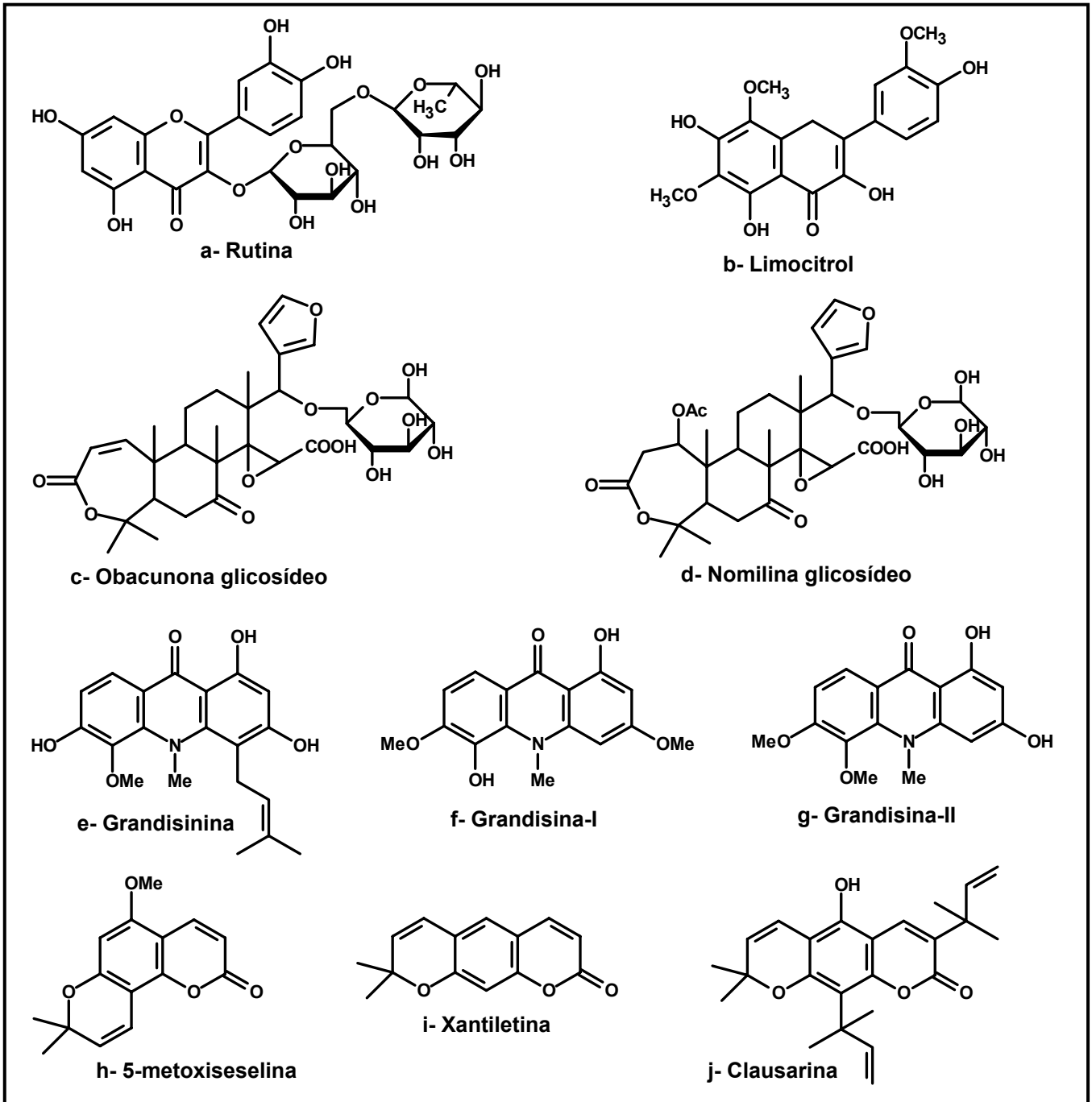
compostos presentes na casca de limão constituem três glicosídeos: hesperitina-7-rutinosídeo (hesperidina), naringenina-7-rutinosídeo e eriodictiol-7-rutinosídeo (eriocitrina). Vários outros grupos de polifenóis estão também presentes na casca de limão. Alguns deles estão relatados como ácidos fenólicos e fenilpropanóides (cumarinas e glicosídeos fenilpropanóicos) (BALDI *et. al.*, 1995).

Limonóides também representam um grupo de substâncias quimicamente relacionadas, como *nortriterpenóides* encontrados em Rutaceae e Meliaceae. Trinta e seis limonóides não glicosilados e 17 limonóides glicosilados foram isolados de *Citrus* e de seus híbridos, como obacunona glicosídeo (**Figura 1c**) e nomilina glicosídeo (**Figura 1d**), isolados da casca de *Citrus tangerina* (Tanaka) Tseng da Índia. Limonóides não glicosilados e seus glicosídeos têm sido relatados como anticarcinogênicos em animais de laboratório e ativos contra insetos (TIAN & DING, 2000).

Outras duas classes de substâncias relacionadas na espécie *Citrus* são os alcalóides acridônicos e as cumarinas. WU *et. al.* (1983) reportaram os alcalóides grandisinina (**Figura 1e**), grandisina-I (**Figura 1f**) e grandisina-II (**Figura 1g**) e as cumarinas 5-metoxiseselina (**Figura 1h**), xantiletina (**Figura 1i**), xantoxiletina e clausarina (**Figura 1j**) presentes nos frutos de *Citrus grandis* Osb. F. *hakunikuyu* Hayata, planta utilizada na medicina popular japonesa como expectorante, no tratamento de edemas e dores abdominais.

Como descrito acima, o gênero *Citrus* tem em suas várias espécies uma diversidade muito grande de substâncias em sua composição química.

Várias também são as doenças que esse gênero possui sendo provocadas por microrganismos. Muitas das classes dos metabólitos secundários produzidos por *Citrus*, além de terem outras funções, também atuam na defesa destas plantas contra os invasores que tentam infectar seus hospedeiros. Outras moléculas são produzidas especificamente para este propósito. E dessa forma se inicia uma verdadeira batalha travada pela sobrevivência entre o patógeno (microrganismo) e o hospedeiro (*Citrus*).



**Figura 1.** Estruturas moleculares de metabólitos encontrados em espécies de *Citrus*.



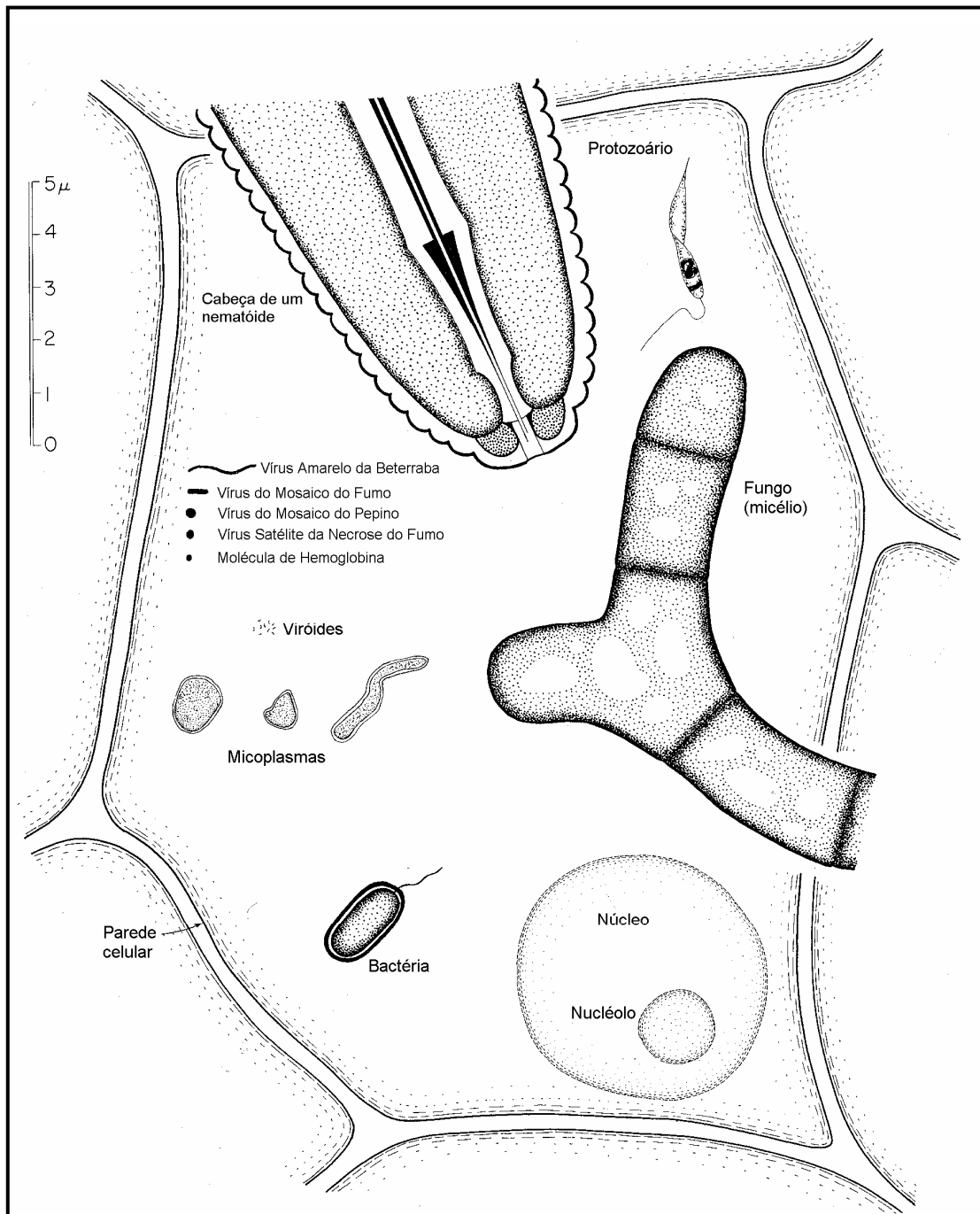
## 1.2 - Interações Entre Plantas e Microrganismos

Os microrganismos exibem diferentes tipos de associações ou interações com as plantas, onde algumas podem ser observadas até mesmo a níveis macroscópicos. Algumas das associações são neutras, outras são benéficas, outras, ainda, são prejudiciais. Nas associações que se baseiam no neutralismo, os dois organismos se desenvolvem sem qualquer efeito recíproco, pois são dotados de exigências de crescimento completamente diferentes (PELCZAR, *et al.*, 1981; AGRIOS, 1997).

O mutualismo é um exemplo de uma relação simbiótica, na qual cada organismo recebe benefícios da associação. O modo pelo qual se manifesta esse benefício é variado. Um tipo de mutualismo envolve a troca de nutrientes entre duas espécies, como por exemplo, a interação de certas algas com fungos, formando os líquens. O fungo obtém substâncias de valor nutricional, tais como a glicose e álcoois poliídricos das algas, enquanto estas se beneficiam pelas propriedades das paredes celulares do fungo associado, capazes de reter água. O fenômeno do comensalismo se refere a uma relação entre organismos, na qual um dos componentes recebe benefícios, permanecendo o outro sem ser afetado (PELCZAR, *et al.*, 1981).

Por outro lado, as associações antagonistas ocorrem quando um organismo atinge de modo adverso o ambiente do outro. Tais organismos antagonistas podem apresentar grande importância prática, já que eles produzem com freqüência antibióticos ou outras substâncias inibidoras que afetam os processos normais de crescimento ou de sobrevivência de outros organismos. A segunda relação negativa entre duas populações se manifesta quando ambas são adversamente afetadas com respeito à sobrevivência ao crescimento, onde o espaço e os nutrientes são limitados, e é denominada de competição. O parasitismo é definido como uma relação entre organismos na qual um vive sobre ou dentro do outro (de uma espécie diferente) e às custas desse organismo hospedeiro, sendo este último prejudicado no processo. A quarta relação negativa é a predação caracterizada quando ocorre a morte e a ingestão de um organismo de uma espécie por outros (PELCZAR, *et al.*, 1981; AGRIOS, 1988).

Milhares de microrganismos se encontram em associações com as plantas (**Figura 2**). As três maiores categorias de organismos causadores de doenças nas plantas são os fungos, os procariontes (bactéria, micoplasma) e os vírus. Os nematóides também causam várias doenças em plantas. Existem também doenças de plantas causadas por parasitas de plantas superiores e protozoários (JACKSON & TAYLOR, 1996; AGRIOS, 1988).



**Figura 2.** Microrganismos capazes de causar doenças em plantas e comparação das suas dimensões com uma célula vegetal típica (adaptado de AGRIOS, 1997).

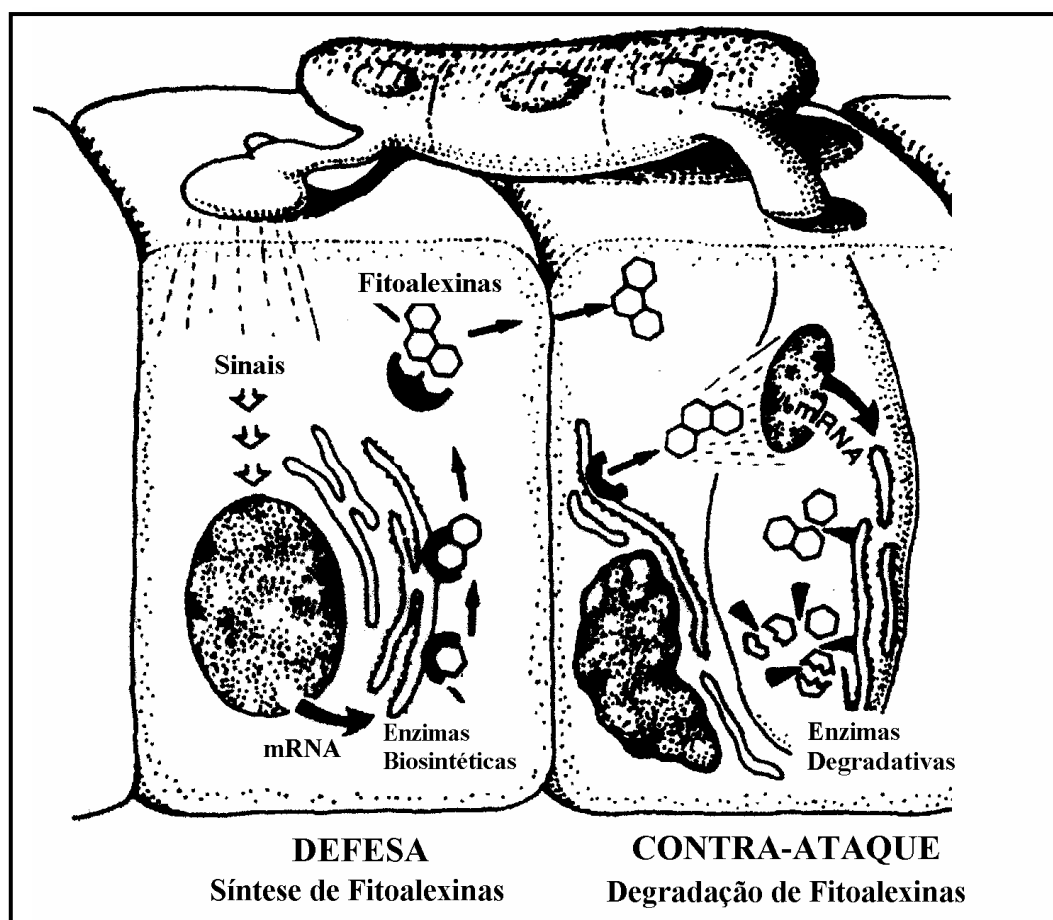
### 1.3 - Processos de Reconhecimento na Resistência de Plantas à Doenças

O reconhecimento sobre as bases genética e bioquímica da resistência de plantas aumentou consideravelmente desde a virada do século XX, quando melhoristas de plantas primeiramente reconheceram que a resistência era, freqüentemente, controlada por genes mendelianos. A demonstração de que as plantas têm centros de origem geográfica e que co-evoluíram com seus patógenos foi uma descoberta fundamental para os melhoristas, levando ao uso de híbridos interespecíficos entre culturas e seus parentes selvagens, como fonte de germoplasma resistente. Até 1992, no entanto, nenhum gene de resistência (R) havia sido clonado e caracterizado no nível molecular. Desde então, diversos genes R de diferentes espécies têm sido clonados (CAI *et al.*, 1997; DE WIT, 1995; JOHAL & BRIGGS, 1992; JONES *et al.*, 1996; LEONARDS-SCHIPPERS *et al.*, 1992; MILLIGAN *et al.*, 1998).

A gama de fitopatógenos que infectam plantas é enorme e cada um tem o seu próprio modo de patogenicidade. Apesar do grande potencial de patógenos, a resistência (falta de suscetibilidade) é a regra e a susceptibilidade é a exceção. Por que um patógeno é capaz de causar doença em uma planta, e não em outra (fenômeno conhecido como resistência de planta não-hospedeira), permanece como uma importante questão a ser respondida em patologia de plantas.

Durante as interações planta-patógeno, os contactos iniciais servem como um ponto de partida identificável, a partir do qual uma cascata de eventos começa a acontecer do lado do patógeno e do lado da planta. Sinais são trocados, novos genes expressos, novas proteínas sintetizadas, e modificações estruturais e bioquímicas são elaboradas. Estes fenômenos podem ser bem exemplificados através do mecanismo de defesa da planta de ervilha *Pisum sativum* através da produção da fitoalexina pisatina, como resposta a infecção do fungo *Nectria haematococca* e, ainda, através do contra-ataque desse microrganismo frente à degradação da pisatina pela

enzima pisatina demetilase, tornando a fitoalexina não tóxica a ele (**Figura 3**) (PASCHOLATI *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Representação diagramática da interação do fitopatógeno *Nectria haematococca* e células de ervilha *Pisum sativum*. Referência à capacidade de patógenos promoverem a detoxificação de fitoalexinas produzidas pelo hospedeiro (adaptado de VANETTEN *et al.*, 1989).

Esse potencial químico-enzimático que os microrganismos possuem pode ser utilizado para se estudar as possíveis biotransformações que um determinado microrganismo pode realizar frente a um composto utilizado como substrato. Vários trabalhos desse gênero vêm sendo realizados, como biotransformações de diterpenos labdanos na tentativa de se obter compostos análogos da forskolina, que possui dentre outras atividades a de inibir a metástase de células cancerosas (GARCIA-GRANADOS *et al.*, 1995; GARCIA-GRANADOS *et al.*, 1997).

De uma outra forma, é possível utilizar essas reações para se estudar um determinado patossistema visando à elucidação dos mecanismos de patogenicidade, bem como toda a relação planta microrganismo. Esse tipo de estudo pode ser realizado efetuando-se biotransformações com compostos e fungos isolados da mesma planta e de regiões distintas como raízes, sistema vascular, caule, folhas, frutos, cascas, etc.

Uma diferença chave entre plantas resistentes e suscetíveis está no tempo de reconhecimento do patógeno invasor e na rápida e efetiva ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Uma planta resistente é capaz de rapidamente desencadear uma ampla variedade de respostas de defesa que detêm a colonização pelo patógeno. Em contraste, a planta suscetível exibe respostas muito mais débeis e lentas, que não conseguem restringir o crescimento ou disseminação do patógeno. Como resultado, uma planta suscetível sofre sérios danos ou é, até mesmo, morta pela infecção do patógeno. A ativação de respostas de defesa nas plantas é iniciada pelo reconhecimento, por parte do hospedeiro, de sinais (moléculas) codificados pelo patógeno chamados de eliciadores (ex.: proteínas microbianas, pequenos peptídeos, oligossacarídeos, etc.). A interação de eliciadores do patógeno com receptores do hospedeiro (muitos dos quais podem ser codificados por genes R), provavelmente, ativa uma cascata de sinais de transdução que pode envolver fosforilação, fluxo de íons, espécies de oxigênio ativo, e outros eventos sinalizadores. A seguir, a ativação transcricional e/ou pós-transcricional de fatores de transcrição, eventualmente, leva à indução de genes de defesa da planta. Além de eliciar respostas primárias de defesa, sinais do patógeno podem ser amplificados através da geração de sinais secundários da planta, tais como moléculas de ácido salicílico (DURNER *et al.*, 1997). Tanto eliciadores primários do patógeno, como sinais secundários endógenos, podem ativar uma série de genes de defesa na planta, cujos produtos incluem glutathione-S-transferase (GST), peroxidases, proteínas da parede celular, inibidores de proteinase, enzimas hidrolíticas (quinases e  $\beta$ -1,3-glucanases), outras proteínas relacionadas à protogenese (proteínas-RP) e enzimas que biossintetizam fitoalexinas, tais como fenilalanina amônia-liase (PAL), e chalcona sintase (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). As proteínas-RP são proteínas abundantes codificadas pelo hospedeiro e

induzidas pelos patógenos. Muitas delas possuem atividade antimicrobiana '*in vitro*' ou quando são superexpressas em plantas transgênicas (JACH *et al.*, 1995).

Em um nível macroscópico, respostas de defesa induzidas são freqüentemente manifestadas, em parte, como uma resposta de hipersensibilidade, a qual se caracteriza por lesões necróticas como resultado de morte celular do hospedeiro localizada no sítio de infecção (GOODMAN & NOVACKY, 1994). A ocorrência da morte de células de plantas durante a resposta de hipersensibilidade pode desempenhar um papel na prevenção do crescimento e disseminação do patógeno para os tecidos sadios (DANGL *et al.*, 1996; GREENBERG, 1996). A base bioquímica e molecular da desintegração e conseqüente morte celular é complexa e ainda pouco caracterizada.

## **1.4 - Possibilidades de indução de defesas: Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)**

Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) foi descrita pela primeira vez por CHESTER, 1933, o qual revisou 201 estudos que tratavam sobre a questão da imunidade fisiológica adquirida em plantas e levantou a hipótese de que as plantas teriam um sistema imunológico similar ao dos mamíferos. ROSS, 1961 foi o primeiro a caracterizar em detalhes a ocorrência de SAR. Ele estudou esse fenômeno em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) que exibem lesões locais quando infectadas pelo vírus do mosaico do fumo (TMV). ROSS, 1961 demonstrou que as lesões locais que ocorrem após a inoculação desafiante com TMV foram restringidas por inoculação prévia com o mesmo vírus. Essa restrição não foi somente efetiva contra TMV, mas também contra outros patógenos, incluindo vírus, bactérias e fungos.

Desde os experimentos de ROSS, 1961, o conhecimento dos eventos bioquímicos que levam ao estabelecimento de SAR não progrediu substancialmente até que WHITE, 1979 demonstrou que o ácido salicílico (AS) e certos derivados do ácido benzóico (BA) podiam induzir SAR. Em 1982, descobriu-se que a acumulação de um grupo de proteínas extracelulares denominadas proteínas relacionadas à patogênese (PR) era correlacionada com a ocorrência de SAR (VAN LOON & ANTONIW, 1982).

O conhecimento sobre os mecanismos que governam SAR ainda é bastante incipiente, apesar do formidável progresso proporcionado pela adoção de técnicas modernas de biologia molecular, genética e bioquímica. De acordo com diversos trabalhos, três etapas importantes no mecanismo de ativação de SAR podem ser identificadas: iniciação, transmissão de sinais e expressão gênica (MORAES, 1998).

A cascata de eventos que levam até SAR é iniciada após a formação de lesões necróticas, tanto em interações incompatíveis como em interações compatíveis (KUC, 1982). O mecanismo de iniciação de SAR, a partir de plantas que sobrevivem à infecção por microrganismos virulentos (interações compatíveis), é ainda pouco conhecido. Esse conhecimento poderá ser alcançado através da monitoração, por parte das plantas, do balanço de



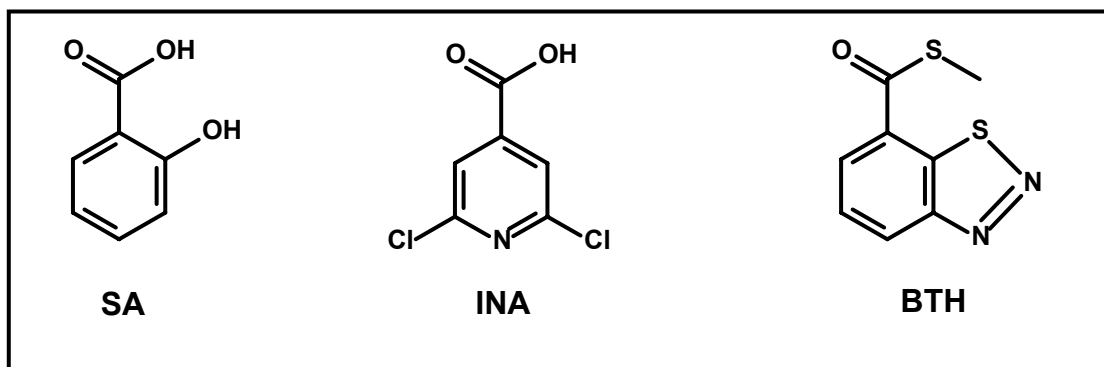
metabólicos e de níveis energéticos, sendo que desvios de um padrão normal poderiam significar a presença de parasitas (DELANEY, 1997). Esse modelo parece plausível, uma vez que o balanço de determinados metabólitos e níveis energéticos das plantas são normalmente desviados para o consumo de patógenos.

Uma das questões mais importantes, que tem desafiado a pesquisa em SAR, é como os tecidos da planta distantes do local da infecção, adquirem maior resistência. Ao contrário dos animais, as plantas não possuem um sistema circulatório para transportar grandes quantidades de compostos de defesa contra patógenos. As plantas utilizam moléculas transmissoras de sinais, as quais, mesmo em concentrações baixas, podem ativar mecanismos de resistência em células não diretamente invadidas por patógenos. A fim de ser um sinal em SAR, uma molécula deve ser sintetizada pela planta; aumentar a concentração sistematicamente após o ataque de patógenos; mover-se através da planta; induzir fitoalexinas e proteínas relacionadas à defesa; e aumentar a resistência contra patógenos. Diversas moléculas têm sido postuladas como sinais potenciais para ativar SAR, desde que ROSS (1961) levantou, pela primeira vez, a hipótese sobre a existência desta, porém nenhuma recebeu maior atenção que o ácido salicílico (SA) (**Figura 4**), um produto do metabolismo dos fenilpropanóides.

Para ser considerado um ativador SAR, um produto químico deve possuir três características: primeiro, o composto ou seus metabólitos não devem exibir atividade direta; segundo, ele deve induzir resistência contra o mesmo espectro de patógenos que SAR ativada biologicamente; e terceiro, ele deve induzir a expressão dos mesmos genes marcadores, conforme SAR ativada por patógenos (KESSMANN *et. al.*, 1994).

Até o momento o SA é a única substância derivada de plantas que foi demonstrada ser um indutor de SAR. Posteriormente, um análogo funcional de SA, ácido 2,6 dicloroisonicolínico (INA) (**Figura 4**) foi o primeiro composto sintético a ativar SAR. Entretanto tanto SA como INA são fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas e, portanto, não possuem potencial para ser usados comercialmente como protetores de plantas. Recentemente, outro análogo de SA, benzotiazole (BTH), benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-ácido carbotiotico S-metil éster (**Figura 4**), foi demonstrado ser um potente ativador

de SAR e possibilita a proteção em condições de campo contra um amplo espectro de doenças em diversas espécies de plantas [MORAES, 1998; GORLACH *et. al.*, 1996; MAUCH-MANI & MÉTRAUX, 1998]. O BTH é até o momento o único indutor de SAR liberado para o uso comercial (MORAES, 1998).



**Figura 4.** Estruturas moleculares de substâncias com propriedades ativadoras de SAR.

## 1.5 - Fitoalexinas

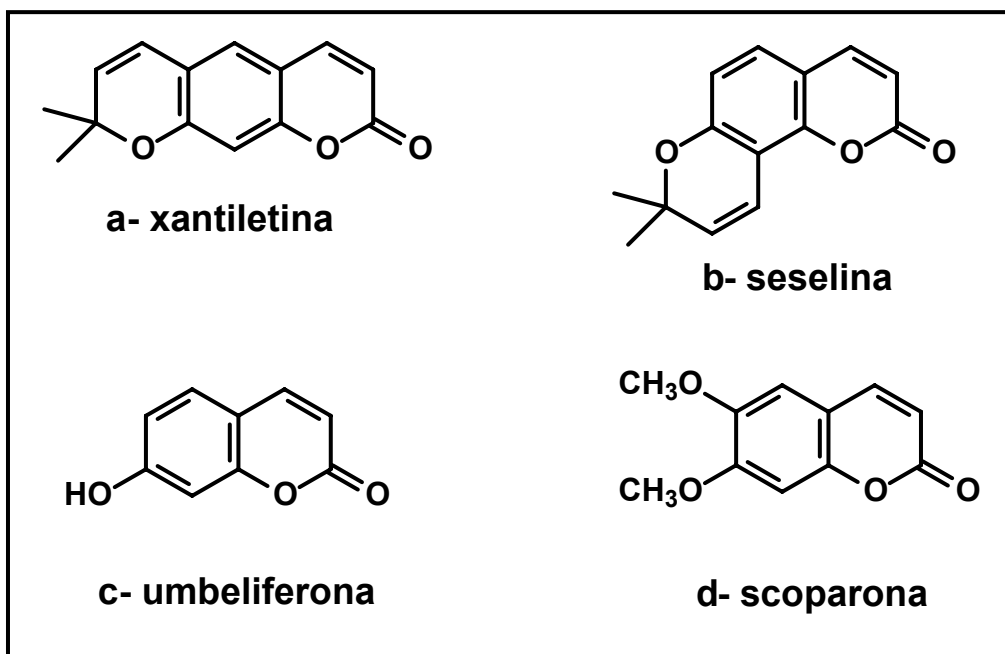
Fitoalexinas são substâncias tóxicas produzidas em quantidades apreciáveis, por plantas, como resultado de estímulos provocados por vários tipos de microrganismos fitopatogênicos através de perturbações químicas e mecânicas (AGRIOS, 1988).

Desde que Muller e Börger propuseram hipóteses a respeito das fitoalexinas (MULLER & BÖRGER, 1940) elas continuaram a fascinar fitopatologistas no que diz respeito a determinar as bases envolvidas na resistência de plantas. A maioria dos trabalhos iniciais envolvendo fitoalexinas reportava sobre substâncias antimicrobianas produzidas *de novo* pela planta quando inoculadas por fungos (BAILEY & MANSFIELD, 1982). Desde aquele tempo, maior atenção foi dada aos processos de eliciação das fitoalexinas e a natureza dos eliciadores. Técnicas de biologia molecular também foram desenvolvidas, visando estabelecer o papel que as fitoalexinas representam para a resistência de plantas.

Nas últimas décadas tem crescido o interesse pelo estudo das fitoalexinas. Este estudo é realizado, na maioria das vezes, utilizando-se células e tecidos de plantas cultivados *in vitro*. Uma grande variedade de eliciadores têm sido reportada na literatura, entre microrganismos (SEITZ, 1979; HARBORNE, 1995; WEITING, 1996; ZOOK, 1998) e substâncias químicas tais como cerebrosidas (KOGA, 1998), quitina (LIU, 1995; SERADGE, 1995), ácidos orgânicos (SHARAN, 1998; LIU, 1995), etc. Dentre as fitoalexinas induzidas nesses trabalhos, encontram-se representantes fenólicos (SEITZ, 1979; LIU, 1995), flavonóides (WEITING, 1996; SERADGE, 1995), alcalóides (SEITZ, 1979; ZOOK, 1998), cumarinas (SHARAN, 1998), etc.

O acúmulo de compostos antifúngicos, mais especificamente nos tecidos de citros, tem sido reportado em vários experimentos. Cumarinas como a xantiletina (KHAN, 1985) (**Figura 5a**) e seselina (VERNENGI, 1987) (**Figura 5b**), foram acumuladas no tronco e nas raízes de citros quando estes foram infectados com *Phytophthora* spp. ISMAIL *et al.* 1978, constataram um incremento na síntese da umbeliferona (7-hidroxycumarina) (**Figura 5c**) quando grapefruit estava infectada por microrganismos. Afek e Sztejnberg (AFEK &

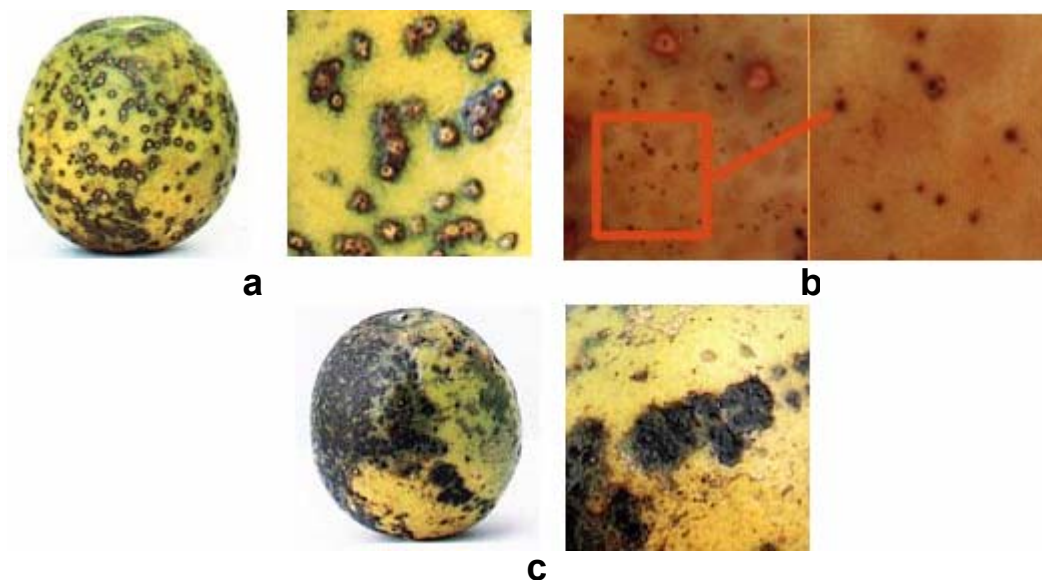
SZTEJNBERG, 1988) isolaram a cumarina scoparona (6,7-dimetoxicumarina) (**Figura 5d**) da copa de citros quando seguido da inoculação de *P. citrophthora*. O acúmulo dessa fitoalexina foi induzido no fruto, folhas, e ramos de *Satsuma mandarin* através da infecção com *Diaporthe citri* (Faw.). Scoparona foi isolada também da casca dos frutos de citros quando estes estavam infectados com *Guignardia citricarpa* Kiely, fitopatógeno causador da doença pinta-preta dos citros (DE LANGE, 1976) e, ainda, das cascas quando estas foram irradiadas com radiação gama (RIOV, 1971). Este composto não foi encontrado em cascas de frutos quando não eram irradiados e nem em frutos não infectados com *G. citricarpa*. Bem-Yehoshua *et al.* (BEM-YEHOSHUA, 1987 E 1988) isolou várias substâncias antifúngicas de frutas de pomelo, algumas delas eram derivados de cumarinas. Bem-Yehoshua *et al.* (BEM-YEHOSHUA, 1991) também detectou scoparona em várias frutas de citros seguido de iluminação UV. Entretanto, BAUDOIN & ECKERT (1985) não encontraram acumulação significativa de compostos antifúngicos em tecidos feridos de limão inoculados com *Geotrichum candidum* Link ex Pers.



**Figura 5.** Estruturas moleculares das fitoalexinas a- xantiletina, b- seselina, c- umbeliferona e d- scoparona.

## 1.6 - Algumas Patogenias de *Citrus*

### 1.6.1 - Pinta Preta



**Figura 6:** Frutos com sintomas de pinta preta: **a** – mancha preta, **b** – mancha sardenta, **c** – mancha virulenta (Fonte: Fundecitrus).

“Pinta Preta” é uma doença que afeta plantas cítricas em vários países da África (Moçambique, Zimbábue, África do Sul), Ásia (China, Coréia, Hong-Kong, Filipinas, Taiwan, Japão), Oceânia (Austrália) e América do Sul (Argentina, Peru, Uruguai e Brasil) (KIELY, 1949; KOTZÉ, 1981; GARRÁN, 1996). Dentre estes países, as maiores perdas têm sido registradas na África do Sul, Japão, Argentina e, principalmente no Brasil.

A pinta preta dos citros é uma doença causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, que afeta todas as variedades de laranjas doces, limões verdadeiros, tangerinas e híbridos e é disseminada por meio de mudas, restos de material vegetal, água da chuva e vento. O principal sintoma são lesões nos frutos, que causam a sua depreciação no mercado pela perda do interesse na comercialização desse fruto *in natura*. Ainda, as lesões impedem a exportação dos frutos, tanto pela aparência quanto pela possibilidade de contaminação das plantações dos países importadores onde a doença pinta preta não ocorre.

Três são os tipos de manchas produzidas durante o desenvolvimento da doença: “mancha preta” ou “mancha dura”, “mancha sardenta” e “mancha virulenta”. Esses sintomas são bem definidos e ocorrem em diferentes estágios, dependendo do avanço, da estação do ano e da maturidade dos frutos (BRODRICK & RABIE, 1970).

A doença não provoca alterações de sabor no fruto, que pode ser comercializado para a indústria de suco. Porém, em ataques severos, a pinta preta causa a queda acentuada dos frutos.

### 1.6.2 - Cancro Cítrico



**Figura 7:** Folha e frutos com sintomas de cancro cítrico (Fonte: Fundecitrus).

A bactéria causadora do cancro cítrico *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi introduzida no Brasil em 1952, na região de Presidente Prudente (SP). Algumas das conseqüências da doença são queda das folhas e dos frutos e diminuição na produção.

O cancro cítrico ataca todas as variedades de citros, mas algumas delas são mais resistentes à doença. As lesões que provoca podem ter variações nas suas características, podendo ser confundidas com outras doenças e pragas.

O primeiro sintoma visível é o aparecimento de pequenas lesões salientes, que surgem nos dois lados das folhas, sem deformá-las. As lesões aparecem na cor amarela e logo se tornam marrons. Nos frutos a doença se manifesta pelo surgimento de pequenas manchas amarelas que aos poucos vão crescendo e tornando-se marrons. As manchas são salientes, parecidas

com verrugas, de cor marrom no centro. Nos ramos as lesões também são salientes, na forma de crostas de cor parda (FUNDECITRUS, 2007).

### 1.6.3 - Mancha Marrom de Alternária



**Figura 8:** Fruto e folhas de tangerina com sintomas de mancha marrom de alternaria (Fonte: Fundecitrus).

A mancha marrom de alternaria é causada por um fungo (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*), que ataca os tecidos da planta, principalmente os mais jovens. É só no tecido morto de folhas e ramos que o fungo sobrevive e se reproduz, até mesmo em folhas em decomposição no solo. No fruto, isso não acontece.

A diferença entre este fungo que ocorre nas tangerinas e os da mesma espécie que atacam as folhas de limão “Cravo” e limão rugoso é a produção de uma toxina, que é específica, de acordo com a variedade das plantas afetadas.

A doença se caracteriza por manchas necróticas (tecido morto) de cor marrom-escuro rodeadas de um halo amarelo, nas folhas, ramos e frutos. As conseqüências mais graves e que causam prejuízos aos produtores são a queda de folhas e frutos, além da seca dos ramos. Em pomares do Estado de São Paulo, observou-se a presença de um líquido de consistência viscosa sobre as lesões, o que ainda não foi descrito nos casos observados em outros países (FUNDECITRUS, 2007).

#### 1.6.4 - Morte Súbita dos Citros



**Figura 9:** Porta enxerto e planta com sintomas de mancha morte súbita dos citros (Fonte: Fundecitrus).

A morte súbita dos citros (MSC) foi identificada pela primeira vez em 2001, no município de Comendador Gomes (MG). Pesquisadores observaram que as folhas perdiam o brilho e as plantas morriam em poucas semanas. Por esse motivo, foi batizada de morte súbita.

A MSC se espalhou por outros municípios e chegou à região norte de São Paulo. Só foi identificada em variedades enxertadas sobre limão 'Cravo'. Pesquisas mostram que os vasos do floema, que levam os produtos gerados na fotossíntese para toda a planta, inclusive a raiz, ficam bloqueados. Sem alimento, a árvore morre.

A disseminação da MSC e a forma de distribuição nos talhões afetados, além de outros fatores, indicam semelhanças com a tristeza dos citros. Suspeita-se que a doença seja causada por um vírus, provavelmente transmitido pelo pulgão preto, *Toxoptera citricarpa*, o mesmo vetor da tristeza dos citros, doença que atacou a citricultura na década de 40.

Os sintomas mais característicos da MSC são: amarelecimento da parte interna da casca do porta-enxerto, ausência de radículas e perda de brilho das folhas. Outros sintomas podem ou não ocorrer, como seca de ponteiros, desfolha, falta de brotações e morte repentina da planta com os frutos ainda aderidos (FUNDECITRUS, 2007).



### 1.6.5 - Clorose Variegada dos Citros ou Amarelinho



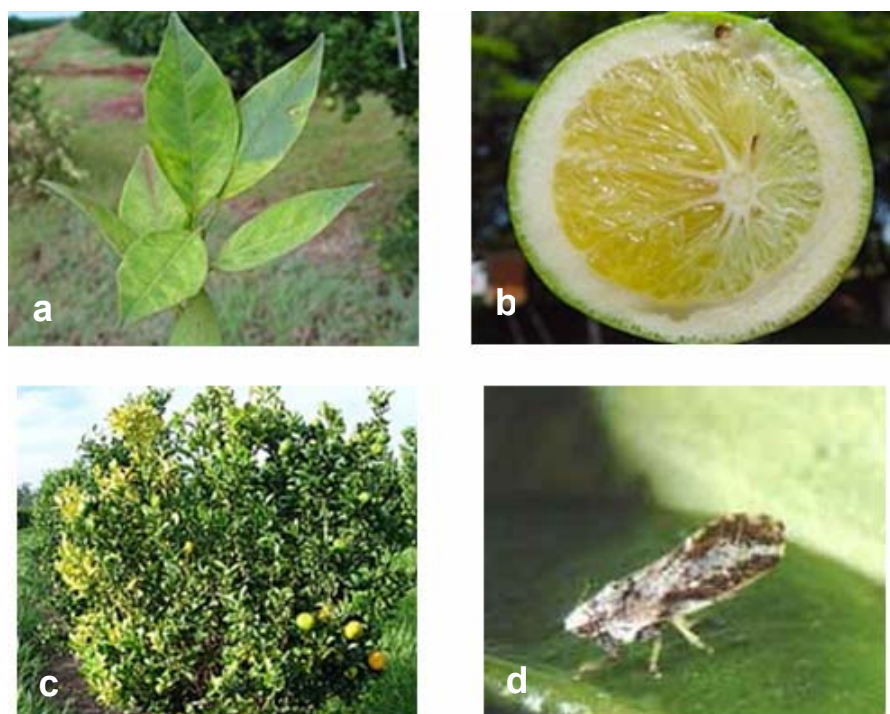
**Figura10:** Folha e frutos com sintomas de amarelinho (Fonte: Fundecitrus).

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) ou Amarelinho foi identificada oficialmente no Brasil em 1987 em pomares do Triângulo Mineiro e do Norte e Noroeste do Estado de São Paulo. Embora essas sejam as regiões mais afetadas até hoje, ela já está presente em quase todas as áreas citrícolas do país.

A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* que, restrita ao xilema da planta, provoca o entupimento dos vasos. A produção do pomar afetado pela doença cai rapidamente, seus frutos vão ficando duros e amadurecem precocemente. A bactéria é transmitida e disseminada nos pomares por insetos vetores.

Os primeiros sintomas são vistos nas folhas, passam posteriormente para os frutos e acabam afetando toda a planta. Quanto mais nova a planta, maior a chance de ser infectada. Uma folha com sintomas de CVC mostra na face superior pontuações circulares de cor amarela. Na face inferior, apresenta lesões de cor palha, às vezes necrosadas. Com o agravamento da doença, os frutos ficam queimados pelo sol, com tamanho reduzido, endurecidos e com maturação precoce. Nesse estágio, são imprestáveis para o comércio (FUNDECITRUS, 2007).

### 1.6.6 - Greening



**Figura 11:** a – folha, b - fruto e c – ramos com sintomas de greening. d: psilídeo *Diaphorina citri*, vetor da doença nas Américas (Fonte: Fundecitrus).

O “greening”, também chamado de “huanglongbing” (HLB), é uma doença de difícil controle, provavelmente originária da China, e hoje afetando seriamente a produção de citros na Ásia e na África. A primeira observação do “greening” nos pomares brasileiros foi em março de 2004. Um grupo de pesquisadores brasileiros e franceses iniciou os estudos para a identificação da doença (FUNDECITRUS, 2007).

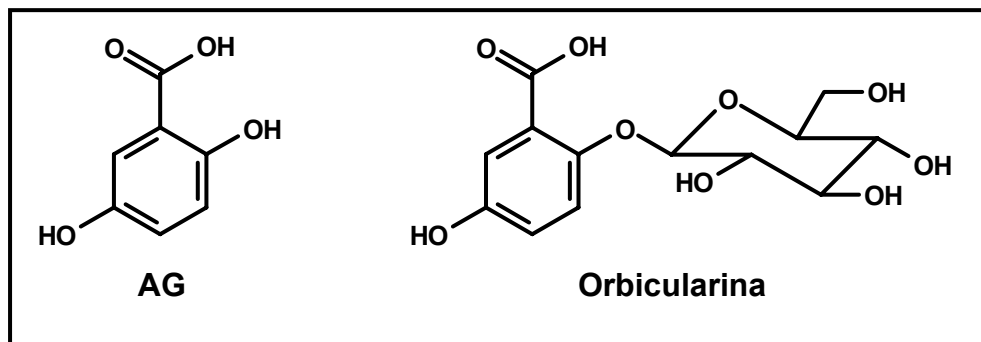
O agente causal da doença é uma bactéria pleomórfica, gram-negativa e limitada ao floema. Antes da constatação no Brasil, existiam duas formas de bactérias causadoras do “greening”: *Candidatus liberibacter africanus*, associada à forma africana da doença, sensível a temperaturas elevadas, sendo seu ótimo entre 20 e 25 °C, e *Candidatus liberibacter asiaticus*, associada à forma asiática, tolerante a temperaturas mais elevadas (25 a 32 °C). Essas bactérias afetam o floema, impedem o fluxo normal da seiva, provocam a redução do tamanho e deformação dos frutos e definhamento da

árvore. A distribuição das bactérias na planta é bastante irregular (ROSSETTI, 2001). A transmissão das formas africana e asiática ocorre por vetores, que são duas espécies de psilídeos: *Trioza erytreae*, que ocorre na África; e *Diaphorina citri*, que é encontrada na Ásia, África e também nas Américas.

O “greening” diagnosticado em São Paulo é atribuído majoritariamente a uma nova bactéria, denominada *Candidatus liberibacter americanus*, embora a ocorrência de *Candidatus liberibacter asiaticus* também tenha sido detectada (TEIXEIRA et. al., 2005 a,b).

No Estado de São Paulo acredita-se que a doença seja transmitida pelo psilídeo *D. citri*, comum nos pomares brasileiros e na planta ornamental conhecida como falsa murta (*Murraya paniculata*). A bactéria *Candidatus liberibacter americanus* também foi detectada nesta Rutaceae ornamental (LOPES et al., 2005). Não existe nenhuma variedade de copa ou porta-enxerto de citros resistente a doença (FUNDECITRUS, 2007).

Nas décadas de 60 e 70, a Cromatografia em Camada Delgada (TLC) foi empregada com sucesso na indexação e diagnose do “greening” em plantas cítricas (SCHWARZ, 1968; VAN VUUREN & da GRAÇA, 1977), devido à ocorrência de um composto fenólico glicosilado, identificado como um éster de glicose do ácido gentísico nas plantas doentes (FELDMAN & HANKS, 1969). A forma aglicona do marcador, o ácido gentísico (AG) (**Figura 12**), é um composto fenólico encontrado em diversas plantas, cuja quantidade aumenta consideravelmente nos tecidos cítricos afetados pelo “greening” (VAN LELYVELD et al., 1988; HOOKER et al., 1993). Entretanto, a quantidade deste composto não está correlacionada à tolerância ou suscetibilidade ao “greening” (VAN LELYVELD et al., 1988). EL-MOUSALLAMY et al. (2000) também identificaram um derivado glicosilado de ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzóico 2-O-<sup>4</sup>C<sub>1</sub>-glicopiranoose, também chamado de Orbicularina) (**Figura 12**) em *Cotoneaster orbicularis*, enquanto KOVÁCS et al. (2004) encontraram o derivado glicosilado do ácido gentísico em vinho branco. Por sua vez, SCHWARZ & VAN VUUREN (1970) observaram estreita correlação na presença do marcador fenólico como indexador de HBL em laranjas doces, mandarinas e tangelos. Entretanto, pouca correlação em limões e grapefruits.



**Figura 12.** Estruturas moleculares do Ácido Gentísico (AG) e da Orbicularina.

VAN VUUREN & da GRAÇA (1977) compararam variações na forma de extração, concentração do extrato aquoso e separação cromatográfica e determinaram que a extração sem concentração, com posterior resolução em butanol saturado com água, representa a forma mais reprodutível e eficaz para ser empregada como método de diagnóstico para o “greening”, detectando inclusive plantas assintomáticas como positivas para “greening”. MELLO et al. (1974) observaram a ocorrência de um marcador fluorescente de mesmo Rf, identificado como o marcador do “greening”, em plantas doentes de etiologia desconhecida e em plantas com Tristeza no Brasil. HOOKER et al. (1993) detectaram AG em citros infectadas com CTV, embora em concentração estatisticamente menor que em plantas com “greening”. FELDMANN & HANKS (1969) identificaram o ácido gentísico glicosilado também em plantas com “stubborn”, “dieback” e “stem pitting” (CTV), embora a natureza do agente causal destas doenças possa ser questionada devido ao desconhecimento do patógeno quando da realização do estudo. Por sua vez, SCHWARZ não constatou a ocorrência do marcador violeta-fluorescente em plantas com TRISTEZA (SCHWARZ, 1968). A diagnose do greening através da PCR vem sendo efetuada rotineiramente no laboratório de Diagnose de Doenças e Pragas do Fundecitus. A comparação destes resultados com a diagnose experimental do greening via TLC vem apresentando resultados promissores (WULFF, N.A., comunicação pessoal).

Vários estudos reportam que compostos fenólicos presentes em espécies vegetais, exibem papel importante na resistência de plantas a pragas

e doenças. Quanto maior for o teor desses compostos, melhor é a resistência (LEGE et al., 1995; FERNÁNDEZ et al., 1996). Também se deve mencionar que glicosídeos de ácido gentísico foram identificados como derivados de ácido salicílico, um composto conhecido por ser sintetizado em diversas plantas durante as respostas de defesa (EL-MOUSALLAMY et al., 2000). Ademais, o estudo da distribuição do ácido gentísico e da forma glicosilada fornece subsídios para aumentar a compreensão da relação patógeno-hospedeiro nesta interação. LELYVELD & VAN VUUREN (1988a) mostraram que a atividade da enzima peroxidase é maior em plantas saudáveis quando comparadas com plantas afetadas pelo “greening”. O ácido gentísico, que é encontrado em maiores quantidades em plantas doentes, é um inibidor da atividade desta enzima (LELYVELD & VAN VUUREN, 1988b).

Estudando a distribuição deste marcador fenólico (ácido gentísico e o ácido gentísico glicosilado) em plantas cítricas infectadas pelo “greening” pretende-se diagnosticar a ocorrência de plantas com “greening” através de TLC. O desenvolvimento de ferramentas de diagnose mais rápidas, eficazes e de baixo custo, pode facilitar estudos de distribuição espacial da doença, transmissão do agente causal e diagnose para fins de erradicação. Entretanto, diversos estudos são necessários.

A disponibilidade de ferramentas analíticas de alta sensibilidade e precisão pode ser empregada para validar os resultados obtidos através de TLC, bem como permitir a caracterização do marcador. Embora o fenol glicosilado marcador tenha sido quimicamente caracterizado (FELDMAN & HANKS, 1969), é necessário confirmar sua natureza neste estudo através de técnicas modernas como o HPLC (EL-MOUSSALAMY et al., 2000), visando identificar de forma inequívoca todas as plantas com “greening”.

## **2 – Objetivos**

### **2.1 - Objetivo Geral**

Nas áreas de biologia e química de microrganismos, principalmente de produtos naturais, os trabalhos visando entender e manipular as interações de plantas com sua microbiota associada vem adquirindo cada vez mais atenção e importância. Neste contexto as fitopatogenias são responsáveis por grandes prejuízos anuais na agricultura, principalmente no que se remete a comercialização de *Citrus*, uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas e conseqüentemente acometido por diversas doenças em seus laranjais. Dessa forma, fazem-se necessários estudos que tragam uma melhor compreensão das interações envolvidas entre as plantas da espécie *Citrus* com os seus respectivos fitopatógenos. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho é o de desenvolver ferramentas analíticas que nos possibilite estudar as patogenias de *Citrus* tanto do ponto de vista da planta quando do microrganismo, proporcionando assim, diagnósticos mais precisos e a busca de inibidores mais eficazes no combate ao desenvolvimento dessas doenças.

### **2.2 - Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos dos trabalhos descritos nessa tese, que forneceram os casos exemplares aplicados nas discussões gerais, para se entender o objetivo exposto acima (2.1), foram os seguintes:

**2.2.1** - Coletar materiais vegetais de *Citrus* em suas várias partes (casca dos frutos, folhas, ramos e casca do tronco) e estudar a composição química das mesmas;

**2.2.2** - Desenvolver métodos analíticos via HPLC-UV-MS e HPLC-MS/MS como ferramentas para o estudo do perfil químico dos materiais vegetais de *Citrus* sadios e com sintomas de doenças;

- 2.2.3** - Analisar os metabólitos secundários envolvidos na interação entre espécies de *Citrus* frente a fungos fitopatogênicos;
- 2.2.4** - Isolar e identificar os metabólitos secundários provenientes dos microrganismos fitopatogênicos de *Citrus* quando desenvolvidos em meios de cultivo artificial.
- 2.2.5** – Quantificar os metabólitos secundários (micotoxinas) dos microrganismos fitopatogênicos quando desenvolvidos em seus hospedeiros (*Citrus*) para avaliar o acúmulo destas moléculas na planta.

### **3 - Procedimento Experimental**

#### **3.1 – Materiais**

##### **a) Suporte para cromatografia:**

- Sílica gel 230-400 mesh (Sílica Flash), para cromatografia em coluna;
- Sílica gel 70-230 mesh (Sílica comum), para cromatografia em coluna;
- Sílica 60 H Mesh para cromatografia em coluna;
- Sílica gel 60 PF<sub>254</sub>, para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

##### **b) Eluentes para cromatografia:**

- Foram utilizados solventes comerciais, destilados no DQ-UFSCar;
- Foram utilizados solventes PA da Merck, Synth, Vetex, Reagen e outros;
- Solventes de grau cromatográfico Merck, Aldrich;
- Solventes grau HPLC JT Baker

##### **c) Solventes utilizados para a obtenção dos espectros de RMN:**

- Solventes deuterados da Merck e Aldrich 98-99,9 %

##### **d) Substâncias utilizadas para o isolamento e cultivo dos microrganismos:**

- Álcool 70%
- Hipoclorito de sódio 11%
- Dextrose – Mallinckrodt
- Agar bacteriológico – DIFCO, Henrifarma
- Batata inglesa
- Milho de canjica loki®



**e) Papel de filtro:**

- JProLab, JP40 Quantitativo  $\varnothing = 12.5$  cm
- INLAB tipo 10, porosidade 3,0  $\mu\text{m}$

**f) Cartucho de extração em fase sólida:**

- Supelco LC-18/3 mL
- Aminopropil SPE cartridge Varian, 3 mL / 500 mg

**g) Colunas Cromatográficas:**

- Shimadzu CLC-phenil (25 cm x 4.6 mm)
- Alltech, Inertisil 250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Deerfield, IL)

## **3.2. Equipamentos Utilizados**

**a) Espectrômetro de massas:**

- MICROMASS Quattro LC
- Waters Quattro Premier™ T-Wave™

**b) HPLC:**

- Waters Alliance 2795
- HPLC-DAD Shimadzu: controladora SCL-10Avp, bombas LC-10AD e LC-10ADvp, autoinjeter SIL-10ADvp, detector SPD-M10Avp PDA e degaseificador DGU-14A.

**c) Espectrômetro de RMN:**

- Brüker ARX – 200
- Brüker DRX – 400

**d) Evaporadores Rotativos:**

- Evaporador Rotativo TECNAL (TE 120)
- Rotavapor Büchi 461 – water bath (EL 131)

**e) Estufa de secagem e esterilização:**

- FANEN – 315 SE

**f) Balança analítica:**

- Mettler P163

**g) Câmara de fluxo laminar:**

- Veco VL FS – 12M

**h) Estufa incubadora:**

- FANEM 347 CD

**i) Autoclave vertical:**

- Phoenix AV 75

**j) Banho de ultra-som:**

- Branson 1510, Danbury, CT)

**k) Turvo Vap:**

- TurboVap II, Zymark

**I) Moinho de facas:**

- TECNAL Turratec®

### **3.3 - Metodologias de Análise dos Metabólitos Secundários Presentes Em *Citrus* Através de HPLC/UV-MS**

Esse tópico relata o desenvolvimento de um método de análise dos compostos presentes no enxerto de citros utilizando a técnica de HPLC/UV-MS. O objetivo de desenvolver estas metodologias visa analisar, com pequenas quantidades de material vegetal, substâncias polares e de polaridade intermediária presentes nas folhas de plantas cítricas.

#### **3.3.1 - Coletas dos Materiais Botânicos**

As folhas de citros, provenientes da enxertia de *Citrus sinensis* e *Citrus limonea*, utilizadas no desenvolvimento desse trabalho foram coletadas em uma plantação de propriedade da Fazenda Jamaica que se encontra localizada na Rodovia Eng. Thales de L. Peixoto Jr. Km 272 Sul (entre Ribeirão Preto e São Carlos). Essa coleta foi realizada no dia 03 de novembro de 2005.

#### **3.3.2 - Metodologia de Análise dos Compostos Polares Presentes Nas Folhas do Enxerto**

##### **3.3.2.1 - Extração e Pré-purificação dos Compostos Polares Presentes nas Folhas do Enxerto**

As folhas de citros depois de coletadas foram lavadas em água corrente para a remoção de alguns resíduos do ambiente. Em seguida, foram colocadas para desidratação em estufa circular com temperatura controlada de 45 °C overnight. O material seco foi moído em moinho de facas (TECNAL Turratec®) até a total pulverização.

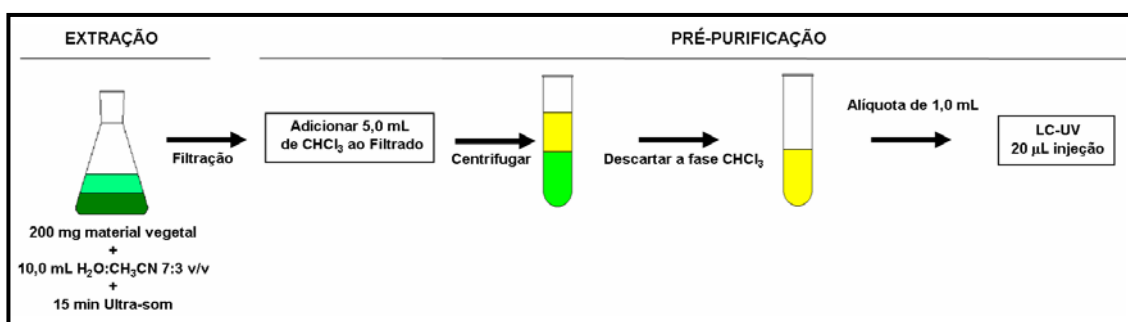
A uma massa de 200 mg das folhas secas e moídas adicionou-se 10,0 mL de H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (7:3 v/v).

Essa suspensão foi submetida a banho de ultra-som por um período de 15 min e filtrada em funil analítico com o auxílio de papel de filtro (INLAB tipo 10, porosidade 3,0  $\mu\text{m}$ ). Ao extrato filtrado adicionou-se 5,0 mL de  $\text{CHCl}_3$ .

A pré-purificação consistiu em centrifugar as duas fases formadas por 5 minutos com o intuito de otimizar a separação. Em seguida, descartou-se a fase orgânica e obteve-se uma alíquota de 1,0 mL da fase aquosa.

Uma alíquota de 20,0  $\mu\text{L}$  dessa solução foi analisada por HPLC-UV.

Todo esse procedimento está ilustrado na **Figura 13** representada abaixo.



**Figura 13.** Extração e pré-purificação dos compostos polares.

### 3.3.2.2 - Condições Cromatográficas Utilizadas Durante a Análise dos Compostos Polares Presentes no Extrato de Folhas de *Citrus*

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um HPLC-DAD Shimadzu equipado com uma controladora SCL-10Avp, bombas LC-10AD e LC-10ADvp, autoinjeter SIL-10ADvp, detector SPD-M10Avp PDA e degaseificador DGU-14A, utilizando coluna Shimadzu CLC-phenil (25 cm x 4.6 mm).

As análises foram realizadas no modo reverso de eluição utilizando  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$  1:1 acidificado com 1% de ácido fórmico como sistema B e  $\text{H}_2\text{O}$  acidificado com 1% de ác. fórmico como sistema A. A eluição foi realizada no modo gradiente de eluição como está representado na **Tabela 1** onde foi aplicado uma vazão de 0,7 mL/min e o volume de injeção foi de 25  $\mu\text{L}$ . A faixa

de monitoramento no DAD foi de 200 – 370 nm, porém todas as análises foram monitoradas a 333 nm.

**Tabela 1.** Eluição gradiente utilizada durante a análise dos extratos polares das folhas de citros.

T (min)	CH <sub>3</sub> CN:MeOH 1:1 1% ác. fórmico (%)	H <sub>2</sub> O 1% ác. fórmico (%)
1	10	90
15	15	85
20	18	82
25	18	82
30	20	80
40	40	60
45	100	0
50	100	0

### **3.3.3 - Metodologia de Análise dos Compostos de Polaridade Intermediária Presentes Nas Folhas do Enxerto**

#### **3.3.3.1 - Extração e Pré-purificação dos Compostos de Polaridade Intermediária Presentes nas Folhas do Enxerto**

As mesmas folhas desidratadas e moídas utilizadas no desenvolvimento de análise dos compostos polares foram utilizadas no desenvolvimento de análise dos compostos de polaridade intermediária.

A uma massa de 200 mg das folhas secas e moídas adicionou-se 10,0 mL de Acetonitrila.

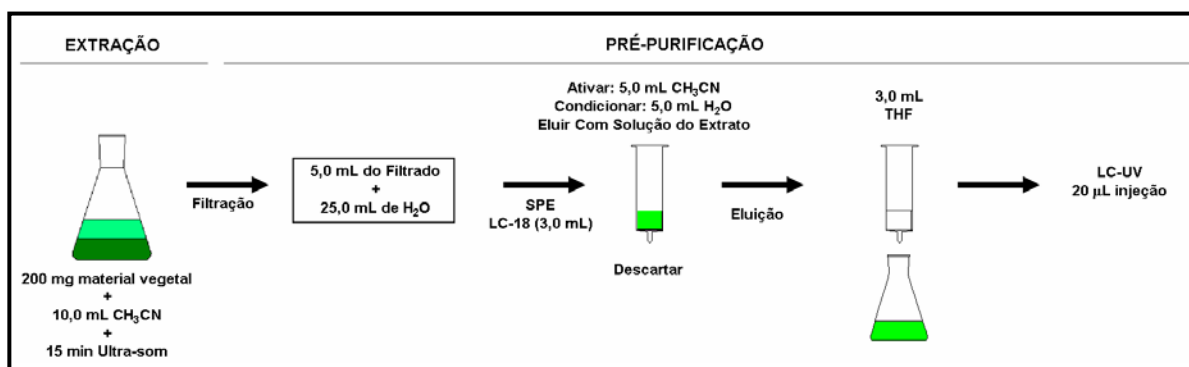
Essa suspensão foi submetida a banho de ultra-som por um período de 15 min e filtrada em funil analítico com o auxílio de papel de filtro (INLAB tipo 10, porosidade 3,0 µm). Do filtrado obtido, uma alíquota de 5,0 mL foi adicionada a 25 mL de água Milli-Q.

A pré-purificação foi realizada ativando-se, previamente, um cartucho de extração em fase sólida (Supelco LC-18/3 mL) com 5,0 mL de acetonitrila e condicionando-o com 5,0 mL de água Milli-Q. Em seguida, no cartucho de EFS

foi aplicada a solução do extrato preparada anteriormente. O eluído obtido foi descartado. As substâncias adsorvidas ao cartucho de SPE foram, então, eluídas com 3,0 mL de THF.

Uma alíquota de 20,0  $\mu\text{L}$  dessa solução foi analisada por HPLC-UV.

Todo esse procedimento está ilustrado na **Figura 14** representada abaixo.



**Figura 14.** Extração e pré-purificação dos compostos de polaridade intermediária.

### 3.3.3.2 - Condições Cromatográficas Utilizadas Durante A Análise dos Compostos de Polaridade Intermediária Presentes no Extrato de Folhas de *Citrus*

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento HPLC-DAD com a mesma configuração descrita anteriormente, para as análises dos compostos polares.

As análises também foram realizadas no modo reverso de eluição utilizando  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$  1:1 v/v acidificado com 1% de ácido fórmico como sistema B e  $\text{H}_2\text{O}$  acidificado com 1% de ác. fórmico como sistema A. A eluição foi realizada no modo gradiente como está representado na **Tabela 2** onde foi aplicado uma vazão de 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 25  $\mu\text{L}$ . A faixa de monitoramento no DAD foi de 200 – 370 nm, porém todas as análises foram monitoradas a 333 nm.

**Tabela 2.** Eluição gradiente utilizada durante a análise dos extratos de polaridade intermediária das folhas de citros.

<b>T (min)</b>	<b>CH<sub>3</sub>CN:MeOH 1:1 1% ác. fórmico (%)</b>	<b>H<sub>2</sub>O 1% ác. fórmico (%)</b>
1	50	50
18	50	50
20	100	0
30	100	0



### 3.3.4 - Aplicação da Metodologia de Análise dos Compostos Polares Presentes em *Citrus* em Plantas Com Sintomas da Doença Morte Súbita dos Citros (MSC)

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se nas cascas do tronco do enxerto de *C. sinensis* (laranja pêra) sobre *C. limonea* (limão cravo) a metodologia previamente desenvolvida para analisar os compostos polares presentes nas folhas de citros (Itens 3.3.2 e 3.3.3). O intuito deste experimento foi avaliar a diferença no metabolismo secundário tanto da copa (laranja pêra) quanto do cavalo (limão cravo) de plantas sadias e de plantas doentes. O sintoma que evidencia uma planta doente é a presença de coloração amarelada apenas no cavalo do enxerto, enquanto que na copa não se evidencia qualquer mudança aparente na coloração (Figura 15).



**Figura 15.** Região da copa onde foi realizada enxertia de *C. sinensis* (laranja pêra) sobre *C. limonea* (limão cravo) apresentando sintoma de MSC no cavalo do enxerto.

#### 3.3.4.1 - Coletas dos Materiais Botânicos de Plantas Sadias e Com Sintomas de MSC

Todos os materiais vegetais utilizados nesse trabalho, provenientes da enxertia de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonea*, foram cedidos pelo FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura. As plantas, tanto com sintomas quanto sem sintomas da doença MSC, foram coletadas pelos técnicos do FUNDECITRUS em fazendas da região de Comendador Gomes e

Frutal e as discussões de sintomatologia foram realizadas com o pesquisador Dr. Nelson Arno Wulff.

#### **3.3.4.2 - Extração, Pré-purificação e Condições Cromatográficas Utilizadas na Análise dos Compostos Polares Presentes nas Cascas do Tronco do Enxerto**

Em um primeiro momento, tanto a extração quanto a pré-purificação dos compostos polares presentes nas cascas do tronco do enxerto de citros foram as mesmas realizadas anteriormente descritas no tópico **3.3.2.1 (Página 31)** para as folhas do enxerto. As condições cromatográficas também foram as mesmas realizadas anteriormente para a análise dos compostos polares presentes nas folhas do enxerto, como descritas no tópico **3.3.2.2 (Página 32)**.

Porém, em um segundo momento, houve a necessidade de realizar a adaptação do método anteriormente desenvolvido para uma nova coluna cromatográfica, devido à constatação de que a coluna cromatográfica Shimadzu CLC-phenil (250 mm x 4,6 mm) que estava sendo utilizada havia perdido a sua eficiência.

#### **3.3.4.3 Novas Condições Desenvolvidas Para a Análise dos Compostos Polares Presentes nas Cascas do Tronco do Enxerto**

A extração e a pré-purificação dos compostos polares presentes nas cascas do tronco do enxerto de citros continuaram sendo as mesmas descritas no tópico **3.3.2.1 (Página 31)**.

O equipamento utilizado durante as análises consistiu de um HPLC (Waters Alliance 2795, Manchester, UK) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador duplo quadrupolar (Waters Quattro Premier™ T-Wave™, Manchester, UK). Para a otimização dos parâmetros cromatográficos, bem como as sintonias realizadas no espectrômetro de massas, foi utilizada uma coluna analítica ODS (Alltech, Inertisil 250 x 4,6 mm, 5 µm, Deerfield, IL) onde foram injetados 15 µL do extrato da copa de uma planta com sintomas de

MSC realizado de acordo com o tópico **3.3.2.1 (Página 31)**. Para o ajuste da sintonia utilizou-se uma vazão de 0.9 mL/min da fase móvel isocrática metanol:água 1:1 v/v, ambas acidificadas com 1% de ácido fórmico, onde a entrada da amostra no espectrômetro de massas foi ajustada com o auxílio de um splitter para a proporção de 2:1 (descarte:MS). As amostras foram ionizadas utilizando uma fonte de *electrospray* (ES) operando no modo negativo onde a temperatura do bloco da fonte estava ajustada com a temperatura de 100 °C e a temperatura do probe ajustada em 300 °C. O fluxo do gás de secagem bem como os parâmetros de ionização do capilar, cone e extrator foram ajustados utilizando infusão direta na fonte de ES. Os fluxos de nitrogênio do nebulizador e do gás de desolvatação foram ajustados em 20 e 500 L/h. A voltagem do capilar foi mantida em 3.00 kV durante todo o experimento. Para o monitoramento do composto com íon pseudo-molecular  $[M-H]^- = 593$  nos extratos foram realizados experimentos de SRM (selected reaction monitoring), onde a transição  $593 \rightarrow 353$  foi a que apresentou maior sensibilidade mantendo a voltagem do cone em 60 V e a energia de colisão em 35 eV. Ainda, para o monitoramento do composto em questão a transição  $593 \rightarrow 473$  também foi monitorada com a função de transição de confirmação, onde esta apresentou maior sensibilidade mantendo a voltagem do cone em 60 V e a energia de colisão em 30 eV. Os parâmetro de dwell-time e inter-scan delay também foram otimizados visando obter maior sensibilidade para o analito. Os valores que implicaram em melhor sensibilidade foram registrados através dos valores 0.1 e 0.01, respectivamente. A pressão do gás de colisão (argônio) foi mantida em  $3.76 \cdot 10^{-3}$  mbar durante todos os experimentos.

Durante o monitoramento do íon pseudo-molecular  $[M-H]^- = 593$  utilizou-se eluição no modo gradiente com um tempo de análise de 16 min (**Tabela 3**). Todos os outros parâmetros utilizados foram os mesmo aplicados no desenvolvimento descrito acima.

**Tabela 3.** Eluição gradiente utilizada durante as análises de plantas com sintomas de MSC.

T (min)	MeOH 1% ác. fórmico (%)	H <sub>2</sub> O 1% ác. fórmico (%)
0.00	30	70
10.0	75	25
11.0	100	0
16.0	100	0

### **3.4 - Isolamento e Identificação dos Metabólitos Secundários de *Alternaria alternata***

#### **3.4.1 - Obtenção do Microrganismo Isolado *Alternaria alternata***

O fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* f. sp. *citri* isolado dos frutos de tangerina contendo sintomas da doença mancha marrom de alternaria nos foi cedido pelo Dr. Eduardo Feichtenberger, pesquisador da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba APTA Regional/SAA. Esta linhagem se mantinha cultivada em placa de Petri contendo meio sólido BDA – “batata, dextrose e ágar”.

#### **3.4.2 - Cultivo de *A. alternata* em milho**

O fungo *A. alternata* foi cultivado em milho de canjica com umidade de 50% v/m. O milho de canjica da marca loki<sup>®</sup> foi dividido em 31 Erlenmeyers de 500 mL de modo a conter 100g de milho em cada frasco somando um total de 3,1 Kg de meio de cultivo. Em seguida adicionou-se 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada (50 % de umidade). Outros 3 Erlenmeyers foram preparados da mesma maneira para servirem de testemunha (branco).

Os frascos contendo o meio foram esterilizados em autoclave por 20 minutos sob temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm. Em seguida, em capela de fluxo laminar, com o auxílio de uma lâmina e alça de platina,

pequenas quantidades da cultura de *A. alternata* foram retiradas da placa de Petri e inoculadas aos meios anteriormente preparados.

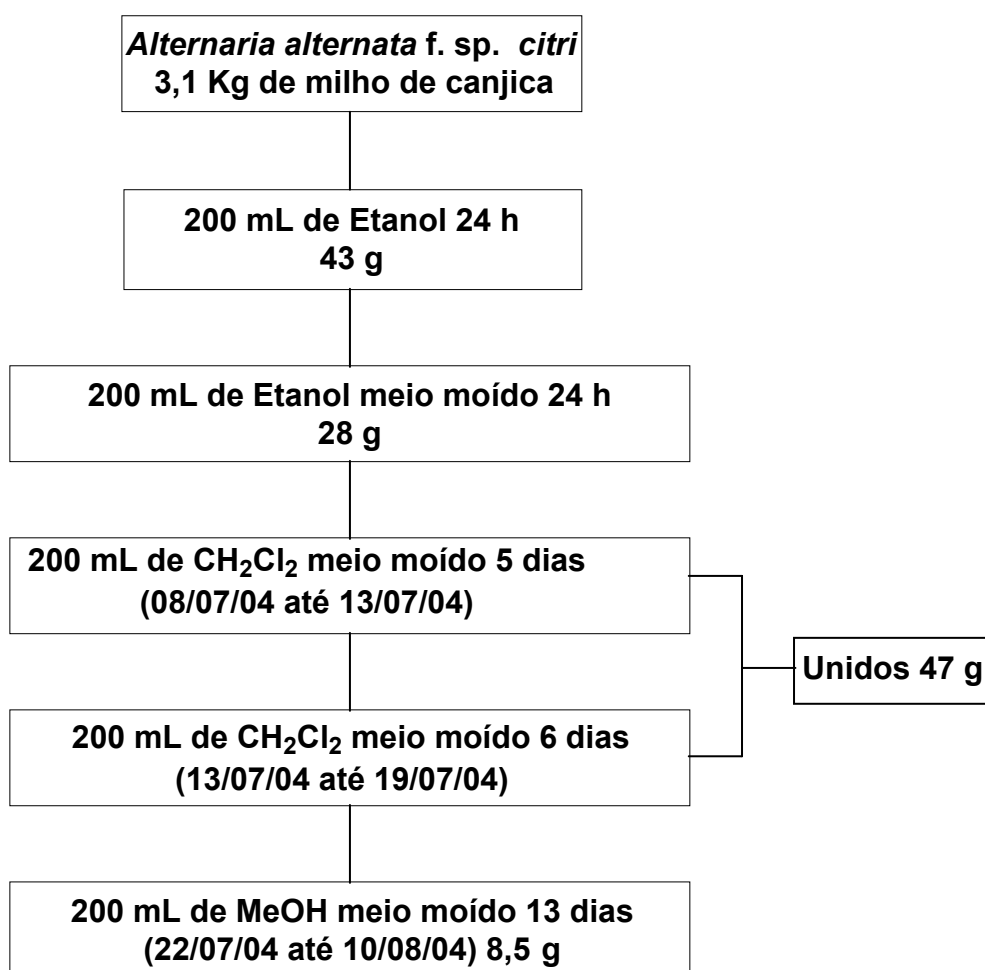
O fungo foi mantido em cultivo por um período de 30 dias a 25°C.

### 3.4.3 - Extração dos Metabólitos Secundários de *A. alternata*

Os extratos dos metabólitos secundários de *A. alternata* cultivado em milho foram obtidos utilizando EtOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH. Os extratos foram realizados tanto do meio sólido intacto (grãos de milho inteiros) quanto do meio sólido moído em moinho (TECNAL Turratec®).

O **Fluxograma 1** a seguir apresenta os extratos obtidos tanto para o branco quanto para o meio cultivado, bem como o tempo de extração:

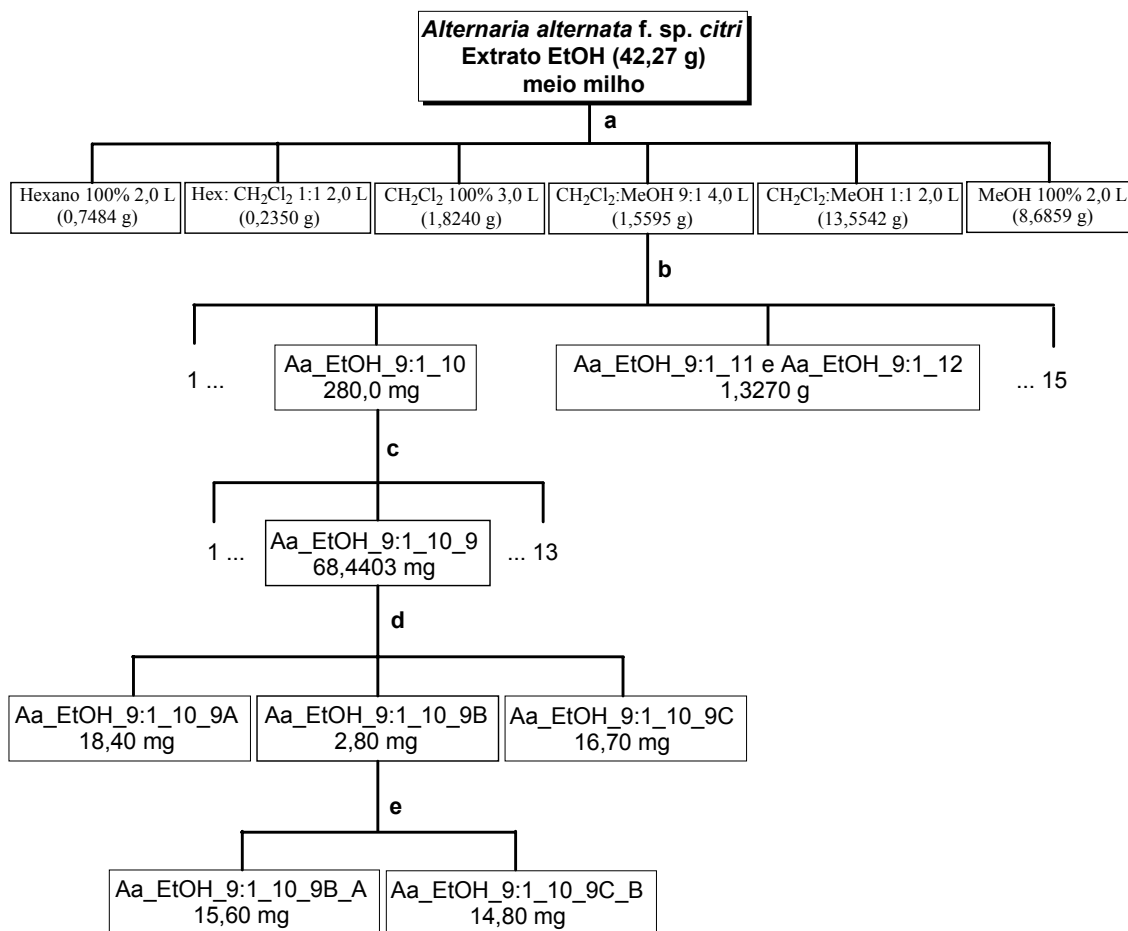
**Fluxograma 1.** Extratos obtidos de *A. alternata* cultivada em milho.



#### **3.4.4 - Isolamento dos Metabólitos Secundários de *A. alternata***

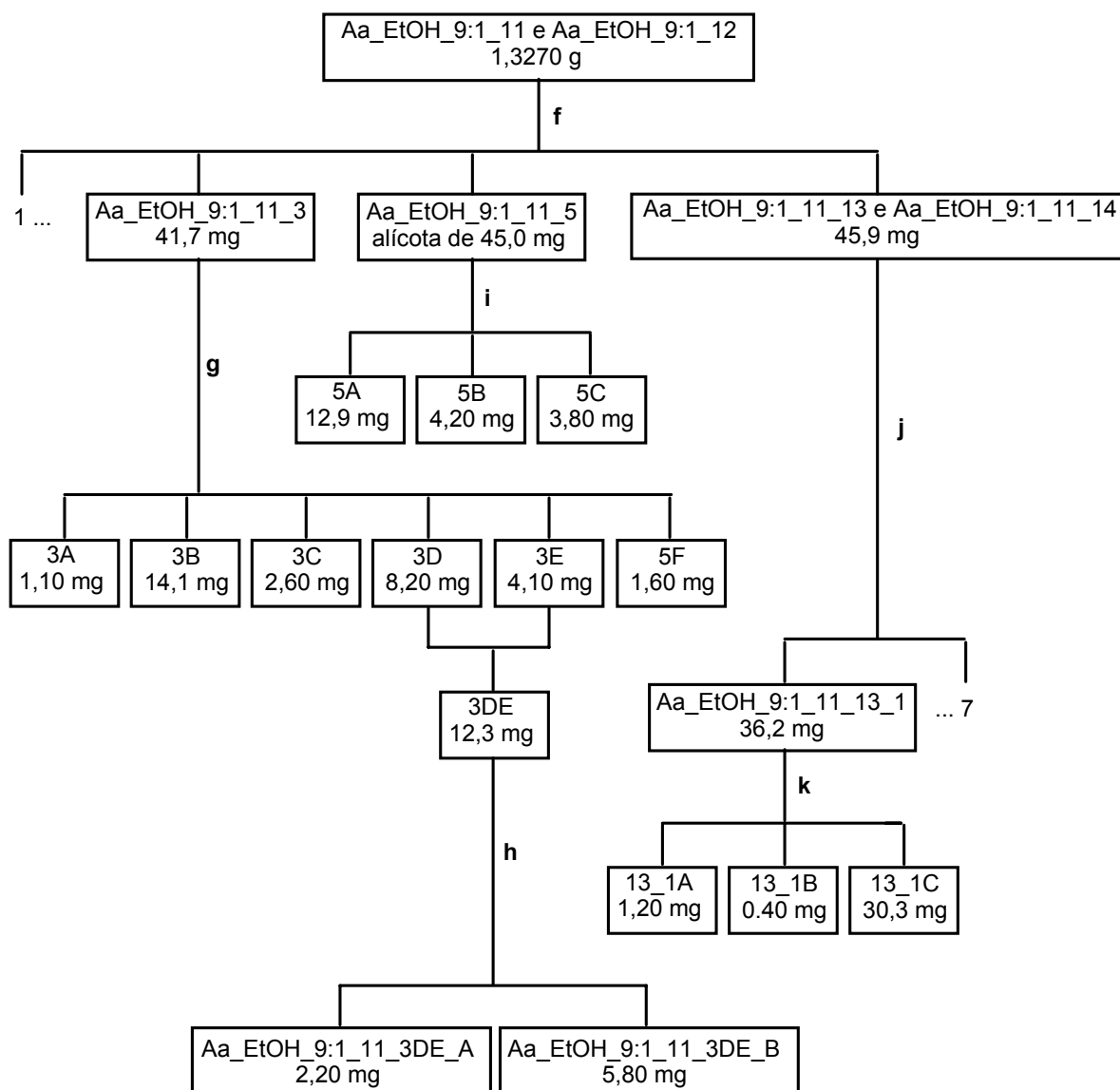
Iniciou-se o isolamento dos metabólitos secundários de *A. alternata* cultivado em milho em grande escala. O primeiro extrato a ser fracionado foi o extrato EtOH do meio intacto (sem moer) como ilustrado no **Fluxograma 2** à seguir.

**Fluxograma 2.** Isolamento dos metabólitos secundários de *A. alternata*.



- a:** Coluna cromatográfica de dimensões h x d = 32,0 x 5,5 cm empacotada com 269,4 g de sílica comum
- b:** Coluna cromatográfica de dimensões h x d = 43,5 x 5,0 cm empacotada com 191,0 g de sílica Flash. Eluição gradiente utilizando proporções de Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH, em seguida misturas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH e por final MeOH.
- c:** Coluna cromatográfica de dimensões h x d = 38,0 x 3,4 cm empacotada com 62,8 g de sílica Flash. Eluição gradiente utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, proporções de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH e por final MeOH.
- d:** Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões h x d = 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluição utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 93:7.
- e:** Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões h x d = 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluição utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 93:7.

**Fluxograma 2.1.** Continuação do **Fluxograma 2** para o isolamento dos metabólitos secundários de *A. alternata*.



**f:** Coluna cromatográfica de dimensões h x d = 40,0 x 3,0 cm empacotada com 76,7 g de sílica Flash. Eluição gradiente utilizando proporções de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH e por final MeOH.

**g:** Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões h x d = 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluição utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 94:6.

**h:** Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões h x d = 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluição utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 94:6.

**i:** Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões h x d = 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluição utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 93:7.

**j:** Coluna cromatográfica de dimensões h x d = 72,0 x 2,40 cm empacotada com Sephadex LH 20. Eluição isocrática utilizando MeOH.

**K:** Cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões h x d = 20,0 x 20,0 cm com camada de 1 mm de sílica. Eluição utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 90:10.



### **3.4.5 - Desenvolvimento da Análise Via HPLC-UV Para a Construção da Curva de Produção do Alternariol e Alternariol Monometil Éter**

Neste tópico está relatado o desenvolvimento de análise via HPLC-UV para a construção da curva de produção das micotoxinas alternariol (**AOH**) e alternariol monometil éter (**AME**). Essas micotoxinas foram detectadas nos extratos de *A. alternata* cultivado em milho, como relatado anteriormente.

#### **3.4.5.1 - Cultivo de *A. alternata* em Milho Visando a Produção dos Metabólitos Secundários**

O fungo *A. alternata* foi cultivado em milho de canjica com umidade de 50% v/m, como descrito no tópico **3.4.2 (Página 39)** Algumas modificações foram efetuadas com o intuito de reduzir a quantidade do meio de cultivo e otimizar a extração dos metabólitos a serem analisados. Num total de 30 erlenmeyers de 100 mL foram adicionados 20 g de milho de canjica moída em cada frasco.

#### **3.4.5.2 - Condições Cromatográficas (HPLC-UV)**

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um HPLC-UV Shimadzu equipado com uma controladora SCL-10Avp, bombas LC-10AD e LC-10ADvp, autoinjeter SIL-10ADvp, detector SPD-M10Avp PDA e degaseificador DGU-14A. utilizando coluna PHENOMENEX PHENOSPHERE ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm, 80 Å). As análises foram realizadas no modo reverso de eluição, utilizando CH<sub>3</sub>CN:MeOH 1:1 v/v acidificado com 1% de ác. fórmico como sistema B e H<sub>2</sub>O acidificado com 1% de ác. fórmico como sistema A. A eluição foi realizada no modo isocrático com 70% de B por 20 minutos. Todas as análises foram monitoradas a 340 nm.

### 3.4.5.3 - Construção das Curvas de Calibração de AME e AOH

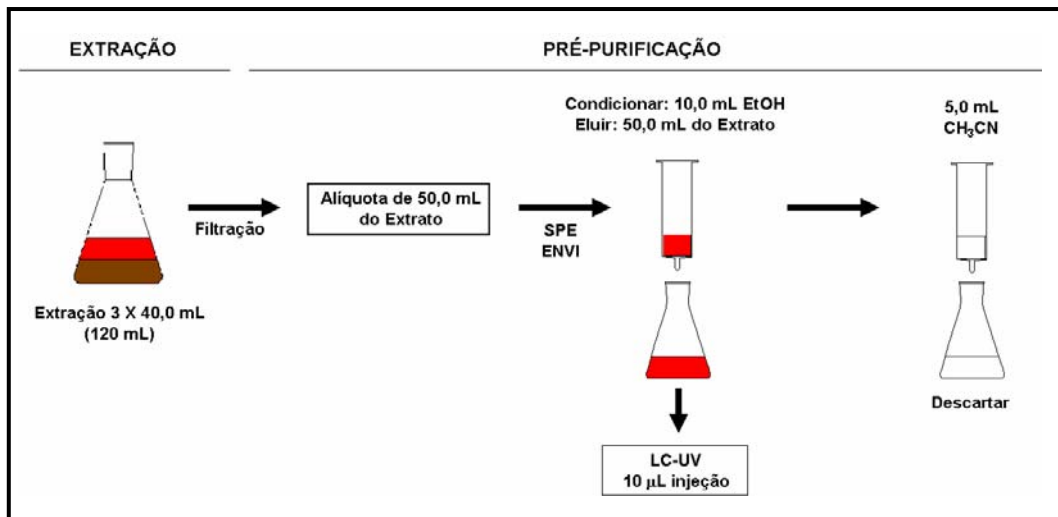
Para a realização das curvas de produção das duas micotoxinas encontradas em *A. alternata* construiu-se curvas de calibração externa em MeOH para cada uma delas. Para tanto, utilizou-se concentrações de 2 a 1000 µg/mL para o composto **AME** e concentrações de 10 a 5200µg/mL para o composto **AOH**.

### 3.4.5.4 - Extração e Pré-Purificação dos Metabólitos Secundários de *A. alternata* Visando a Construção da Curva de Produção de AME e AOH

Na segunda etapa deste trabalho, as micotoxinas **AME e AOH** foram utilizadas como padrões para o monitoramento da produção das mesmas durante o metabolismo de *A. alternata* ao longo de 30 dias. Para o desenvolvimento dessa etapa realizou-se o cultivo do microrganismo em escala reduzida utilizando 30 frascos de Erlenmeyer de 100 mL contendo 20 g de milho tipo canjica (Ioki®) com 50 % de umidade (m/v) cada. Entre os intervalos de 5 dias foram realizadas extrações dos metabólitos secundários de *A. alternata*. Essas extrações foram realizadas em triplicata (três frascos do meio de cultivo) adicionando-se 40 mL de EtOH em cada frasco e filtrando a suspensão em funil de Büchner com papel de filtro (INLAB tipo 10, porosidade 3,0 µm). Esse procedimento foi repetido por três vezes para cada frasco obtendo-se um volume total de 120 mL.

A pré-purificação foi realizada condicionando, previamente, um cartucho de extração em fase sólida (Supelco LC-18/3 mL) com 10 mL de EtOH. Em seguida, o cartucho de SPE foi eluído com 50,0 mL da solução do extrato realizado anteriormente. O eluído obtido foi analisado via HPLC injetando-se 10 µL. As substâncias interferentes retidas no cartucho de SPE foram, então, eluídas com 5,0 mL de CH<sub>3</sub>CN e descartadas.

Todo esse procedimento está ilustrado na **Figura 16** representada abaixo.



**Figura 16.** Extração e pré-purificação dos metabólitos secundários de *A. alternata*.

### 3.4.6 – Quantificação de Alternariol e Alternariol Monometil Éter No Flavedo e No Albedo de Tangerinas (*Citrus reticulata*) Com Sintomas de Mancha Marrom de Alternaria

Todos os dados referentes a este item estão apresentados no trabalho publicado de MAGNANI et. al. 2007.

#### 3.4.6.1 – Material Vegetal

As tangerinas utilizadas neste experimento (*Citrus reticulata*), com e sem sintomas da doença mancha marrom de alternaria, foram coletadas na cidade de Aguaí localizada no centro do estado de São Paulo no mês de abril de 2004. Frutos saudáveis também foram coletados em um supermercado na cidade do Recife, capital do estado de Pernambuco, região onde a doença aqui estudada ainda não foi encontrada. As tangerinas utilizadas durante este experimento foram manualmente descascadas com o auxílio de uma faca de forma a separar o albedo do flavedo. Esses dois materiais foram desidratados em estufa sob temperatura de 45 °C durante três dias e em seguida esse material foi moído em moinho de facas (TECNAL Turrtec®) até a forma de pó.

### 3.4.6.2 – Solução de Padrões e Curvas Analíticas

Foram preparadas em metanol (JT Baker, grau HPLC, Ecatepec, Mexico) soluções estoque para o **AOH** e para o **AME** na concentração de 100 µg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 ng/mL (ppt) através da diluição da solução estoque. Alíquotas de 1 mL das soluções de trabalho foram adicionadas a 9 mL de acetonitrila (JT Baker, grau HPLC, Ecatepec, Mexico) onde estas soluções foram adicionadas a 200 mg do flavedo desidratado e moído. Em seguida foi realizado o procedimento descrito no item **3.4.6.3**. O mesmo procedimento foi realizado para o albedo.

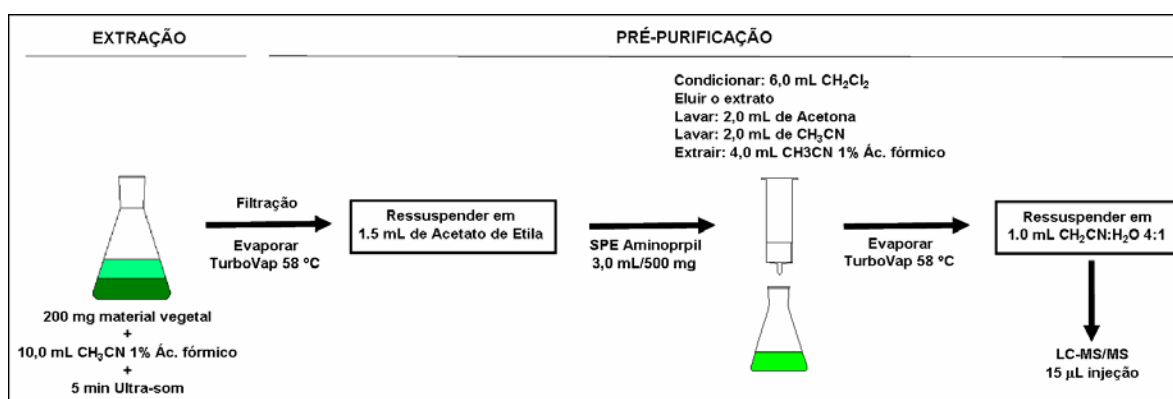
As curvas de calibração foram obtidas em replicatas de seis. O intervalo dinâmico utilizado foi de 0,5 a 20 µg/kg em todas as análises. As curvas de calibração foram obtidas usando um fator de peso de 1/X plotando a concentração (µg/kg) no eixo x e a área obtida pela integração da banda produzida pelo experimento de SRM no eixo y.

### 3.4.6.3 – Extração e Preparo de Amostra

O procedimento utilizado para a extração e preparo de amostra foi realizado como uma adaptação do trabalho de LAU *et. al.*, 2003. Tanto o flavedo quanto o albedo (200 mg) foram extraídos com 10 mL de acetonitrila (JT Baker, grau HPLC, Ecatepec, Mexico) contendo 1% de ácido acético (JT Baker, Ecatepec, Mexico). Esta suspensão foi mantida em banho de ultra-som (Branson 1510, Danbury, CT) durante 5 min e em seguida filtrada. Tanto o papel de filtro (JProlab, JP40 Quantitativo Ø = 12.5 cm, São José dos Pinhais, Brasil) quanto o funil analítico utilizados no procedimento de filtração foram em seguida lavados três vezes com 2 mL do mesmo solvente de extração. Logo após, o solvente foi evaporado sob fluxo contínuo de nitrogênio (TurboVap II, Zymark, Hessen, Germany) com temperatura controlada de 58 °C e o resíduo foi reconstituído com 1.5 mL de acetato de etila (JT Baker, HPLC grade, Ecatepec, Mexico).

O preparo da amostra constituiu de clean-up aplicando o extrato reconstituído em acetato de etila em cartucho de SPE contendo fase estacionária aminopropil (Varian, 3 mL/500 mg, Palo Alto, Ca) previamente condicionado com 6 mL de diclorometano (JT Baker, grau HPLC, Ecatepec, Mexico). Em seguida, o cartucho foi lavado com 2 mL de acetona (JT Baker, grau HPLC, Ecatepec, Mexico) e com 2 mL de acetonitrila. Para a eluição dos alternarióis foram utilizados 4 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético. Em seguida esta fração foi concentrada sob fluxo de nitrogênio e reconstituída em 1 mL de acetonitrila : água 4:1. Todos os solventes utilizados tanto na extração quanto no preparo da amostra foram de grau HPLC.

Todo este procedimento está ilustrado na **Figura 17**.



**Figura 17.** Extração e pré-purificação das micotoxinas AOH e AME de *A. alternata*.

#### 3.4.6.4 – Otimização dos Parâmetros Utilizados No LC-MS/MS

O equipamento utilizado durante as análises consistiu de um HPLC (Waters Alliance 2795, Manchester, UK) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador duplo quadrupolar (Waters Quattro Premier™ T-Wave™, Manchester, UK). Para a otimização dos parâmetros cromatográficos bem como as sintonias realizadas no espectrômetro de massas foi utilizada uma coluna analítica ODS (Alltech, Inertisil 250 x 4,6 mm, 5 µm, Deerfield, IL) onde foram injetados 15 µL das soluções de **AOH** e **AME** nas concentrações de 100 ng/mL. Para isso, utilizou-se uma vazão de 0.95 mL/min da fase móvel

isocrática metanol:água 4:1 onde a entrada da amostra no espectrômetro de massas foi ajustada com o auxílio de um splitter para a proporção de 2:1 (descarte:MS). As amostras foram ionizadas utilizando uma fonte de *electrospray* (ES) operando no modo negativo onde a temperatura do bloco da fonte estava ajustada com a temperatura de 100 °C e a temperatura do probe ajustada em 300 °C. O fluxo do gás de secagem bem como os parâmetros de ionização do capilar, cone e extrator foram ajustados utilizando infusão direta na fonte de ES. Os fluxos de nitrogênio do nebulizador e do gás de desolvatação foram ajustados em 20 e 500 L/h. A voltagem do capilar foi mantida em 3.0 kV durante todo o experimento. Para os experimentos de SRM (selected reaction monitoring) foram selecionadas duas transições para cada analito: Para o **AOH** foi selecionada a transição 257 → 213 para ser utilizada como transição de quantificação e a transição 257 → 215 para ser utilizada como transição de confirmação, mantendo o cone a 25 V e a energia de colisão em 25 eV; para o **AME** foi selecionada a transição 271 → 256 para ser utilizada como transição de quantificação e a transição 271 → 228 para ser utilizada como transição de confirmação, mantendo o cone a 35 V e a energia de colisão em 30 eV. O parâmetro de dwell-time também foram otimizados visando obter maior sensibilidade para os analitos. Dessa forma, variou-se o dwell-time de 0.1 até 0.8 s (com acréscimo de 0.1 por análise) e o inter-scan delay de 0.005 até 0.05 s (com acréscimo de 0.005 por análise). Os valores que implicaram em melhor sensibilidade foram registrados através dos valores 0.3 e 0.01 respectivamente. A pressão do gás de colisão (argônio) foi mantido em  $5.70 \cdot 10^{-3}$  durante todos os experimentos.

#### **3.4.6.5 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação**

Os limites de detecção (LD) foram definidos de acordo com a menor concentração dos analitos que apresentaram em suas análises uma relação sinal-ruído (S/R) igual a três. Os limites de quantificação (LQ) foram definidos como a menor concentração em que a relação-ruído fosse igual a dez. Estes dois parâmetros em questão foram considerados adequados desde que a área

da banda cromatográfica pudesse ser medida com precisão e exatidão aceitáveis.

#### **3.4.6.6 – Especificidade, Linearidade e Precisão**

A especificidade das análises foi atingida devido à utilização das transições específicas de cada composto utilizando o experimento SRM. A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação das curvas analíticas ( $r^2$ ). E a precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo calculado durante as análises tanto intra-dia quanto inter-dia.

#### **3.4.6.7 – Recuperação**

A exatidão do método foi determinada utilizando as recuperações. Para tanto, o cálculo da recuperação foi realizado comparando os pontos da curva de calibração em matriz com os mesmos pontos da curva de calibração em metanol.

### **3.5 - Aplicação das Metodologias de TLC, PCR, HPLC-DAD e HPLC-MS/MS Na Avaliação da Diferença de Metabolismo Encontrada Em Plantas Com Sintomas de Greening**

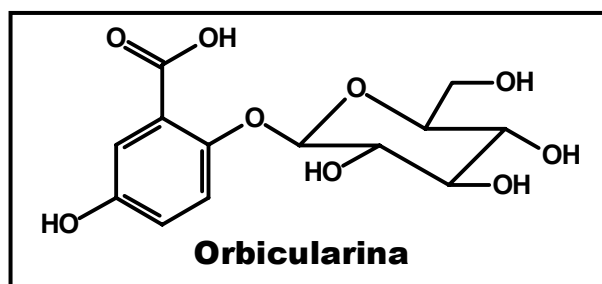
Nessa etapa do trabalho, realizaram-se as análises por HPLC-DAD e HPLC-MS/MS das amostras analisadas anteriormente pelos pesquisadores do FUNDECITRUS utilizando TLC e PCR para a constatação da doença Greening em citros.

Nas décadas de 60 e 70, a TLC foi empregada com sucesso na indexação e diagnose do Greening em plantas cítricas, devido à ocorrência de um composto fenólico glicosilado, identificado como um glicosídeo do ácido gentísico chamado orbicularina (**Figura 18**) nas plantas doentes (SCHWARZ, 1968; VAN VUUREN, 1977; FELDMAN, 1969). Essa constatação, até hoje, é avaliada com o surgimento de uma mancha azulada com Rf 0,3 quando extratos aquosos das folhas do enxerto são analisados com fase móvel n-Butanol saturado com água em TLC contendo sílica como fase estacionária e revelada em lâmpada de UV no comprimento de onda de 360 nm.

O diagnóstico da doença apenas por TLC é bastante subjetivo, uma vez que esse método analítico é pouco sensível e a concentração de Orbicularina nas plantas doentes é bastante baixa.

Dessa forma, a análise de plantas de citros para diagnose de Greening por métodos analíticos mais sensíveis se torna necessário. Assim, esse tópico relata o desenvolvimento das metodologias de análise dos compostos presentes no enxerto de citros com sintoma da doença Greening utilizando HPLC-DAD e HPLC-MS/MS.





**Figura 18.** Estrutura molecular do Ácido 2-O- $\beta$ -4C1-glucopiranosídeo (Orbicularina).

### 3.5.1 - Coletas dos Materiais Botânicos

Todos os materiais vegetais utilizados nesse trabalho, provenientes da enxertia de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonea*, foram cedidos pelo FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura. As plantas, tanto com sintomas quanto sem sintomas da doença Greening, foram coletadas pelos técnicos do FUNDECITRUS em fazendas da região de Araraquara e certificadas pelo pesquisador Dr. Nelson Arno Wulff.

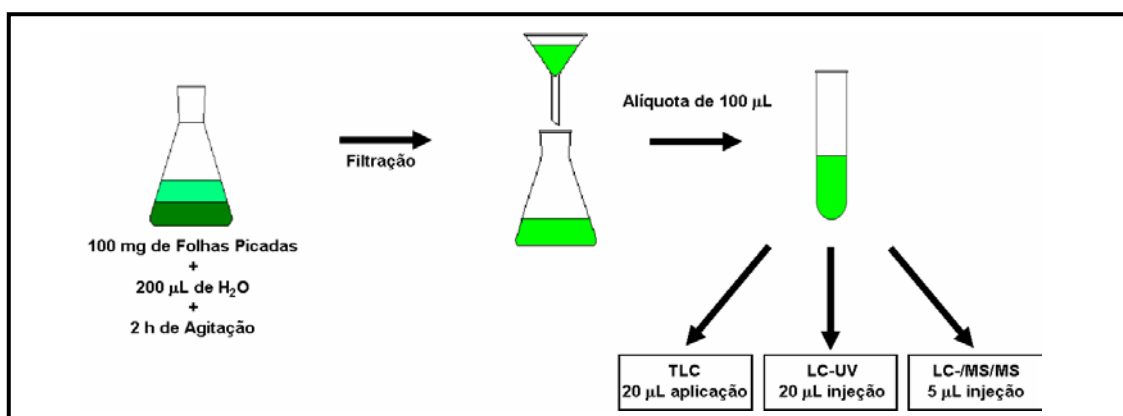
### 3.5.2 - Extração dos Compostos Polares Presentes nas Folhas do Enxerto Com Sintomas de Greening

A uma massa de 100 mg das folhas frescas e trituradas adicionou-se 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

Essa suspensão foi mantida sob agitação por um período de 2 horas e filtrada em funil analítico com o auxílio de papel de filtro (INLAB tipo 10, porosidade 3,0  $\mu$ m).

Dos 100  $\mu$ L de extrato aquoso obtido, alíquotas de 20  $\mu$ L foram analisadas por TLC, HPLC-DAD e através de HPLC-MS/MS.

Todo esse procedimento está ilustrado na **Figura 19** representada abaixo.



**Figura 19.** Extração dos compostos presentes em folhas da enxertia de *C. sienensis* sobre *C. limonea* com sintomas de Greening.

### 3.5.3 - Condições Utilizadas Durante as Análises dos Extratos de Plantas com Sintomas de Greening por TLC

As análises utilizando placas de TLC foram realizadas no Departamento Científico do Fundecitrus. Estas análises foram realizadas aplicando-se 20 µL do extrato de plantas com sintomas de greening em placas comerciais de TLC. Em seguida o extrato aplicado era eluído com uma solução de água saturada com n-butanol. Esta placa era em seguida mantida na capela até que todo o resíduo do eluente fosse evaporado. Logo após, a placa era revelada sob lâmpada de UV com comprimento de onda de 360 nm.

### 3.5.4 - Condições Utilizadas Durante as Análises dos Extratos de Plantas com Sintomas de Greening por HPLC-DAD

Para o ajuste das condições utilizadas nas análises efetuadas através do equipamento HPLC-DAD foram utilizados extratos de plantas com sintomas de greening. Estes extratos foram realizados de acordo com o procedimento descrito anteriormente no tópico **3.5.2 (Página 52)**.

O equipamento utilizado durante as análises consistiu de um HPLC-UV Shimadzu equipado com uma controladora SCL-10Avp, bombas LC-10AD e

LC-10ADvp, autoinjeter SIL-10ADvp, detector SPD-M10Avp DAD e degaseificador DGU-14A utilizando coluna PHENOMENEX PHENOSPHERE ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm, 80 Å). As análises foram realizadas no modo reverso de eluição utilizando MeOH acidificado com 1% de ác. fórmico como sistema B e H<sub>2</sub>O acidificado com 1% de ác. fórmico como sistema A. A eluição foi realizada no modo gradiente iniciando-se a análise com 13% da fase B até atingir 40% em 40 minutos, em seguida aumentou-se a proporção da fase B até 100% até 45 minutos, onde esta proporção foi mantida isocriticamente até 50 minutos. Os dados referentes à rampa cromatográfica estão ilustrados na **Tabela 4**. A vazão da fase móvel foi mantida em 0,7 mL/min e o volume de injeção de todas as amostras foi de 20 µL. O detector de varredura de diodos foi ajustado para monitorar o intervalo de comprimento de ondas de 220 até 370 nm, porém, os cromatogramas de todas as amostras foram monitorados em um comprimento de onda selecionado de 330 nm.

**Tabela 4.** Condições cromatográficas por eluição gradiente utilizada durante as análises de plantas com sintomas de Greening.

T (min)	MeOH 1% ác.fórmico (%)	H <sub>2</sub> O 1% ác. fórmico (%)
0.0	13	87
40	40	60
45	100	0
50	100	0

### 3.5.5 - Condições Utilizadas Durante as Análises dos Extratos de Plantas com Sintomas de Greening por HPLC-MS/MS

O equipamento utilizado durante as análises consistiu de um HPLC (Waters Alliance 2795, Manchester, UK) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador duplo quadrupolar (Waters Quattro Premier<sup>TM</sup> T-Wave<sup>TM</sup>, Manchester, UK). Para a otimização dos parâmetros cromatográficos bem como as sintonias realizadas no espectrômetro de massas foi utilizada uma coluna analítica ODS (Alltech, Inertisil 250 x 4.6 mm, 5 µm, Deerfield, IL)

onde foram injetados 15  $\mu$ L das soluções de ácido gentísico (**AG**) e ácido salicílico (**AS**), ambos nas concentrações de 100 ng/mL. Tanto o **AG** quanto o **AS** foram diluídos até a concentração de 100 ng/mL a partir de soluções estoque de 100  $\mu$ g/mL preparadas em metanol grau HPLC. Para o ajuste da sintonia utilizou-se uma vazão de 0.9 mL/min da fase móvel isocrática metanol:água 5:95 v/v, ambas acidificadas com 1% de ácido fórmico, onde a entrada da amostra no espectrômetro de massas foi ajustada com o auxílio de um divisor de vazão para a proporção de 2:1 (descarte:MS). As amostras foram ionizadas utilizando uma fonte de *electrospray* (ES) operando no modo negativo onde a temperatura do bloco da fonte estava ajustada com a temperatura de 100 °C e a temperatura do probe ajustada em 320 °C. O fluxo do gás de secagem bem como os parâmetros de ionização do capilar, cone e extrator foram ajustados utilizando infusão direta na fonte de ES. Os fluxos de nitrogênio do nebulizador e do gás de desolvatação foram ajustados em 50 e 600 L/h. A voltagem do capilar foi mantida em 3.15 kV durante todo o experimento. Para o monitoramento do **AG** nos extratos foram realizados experimentos de SRM (selected reaction monitoring), onde a transição 153  $\rightarrow$  109 foi a que apresentou maior sensibilidade mantendo a voltagem do cone em 30 V e a energia de colisão em 15 eV. Ainda, para o monitoramento do **AS** a transição 137  $\rightarrow$  93 foi a que apresentou maior sensibilidade mantendo a voltagem do cone em 25 V e a energia de colisão em 15 eV. Os parâmetro de dwell-time e inter-scan delay também foram otimizados visando obter maior sensibilidade para os analitos. Os valores que implicaram em melhor sensibilidade para os dois analitos foram registrados através dos valores 0.1 e 0.01 respectivamente. A pressão do gás de colisão (argônio) foi mantida em  $3.60 \cdot 10^{-3}$  mbar durante todos os experimentos.

Ainda, com a intenção de monitorar os glicosídeos do **AG** (orbicularina) e do **AS** (ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico) nos extratos de plantas com sintomas de greening algumas análises foram realizadas na tentativa de ajustar a sintonia do equipamento para a detecção destes compostos. Porém estes ajustes não foram realizados utilizando padrões destas substâncias, mas sim utilizando o próprio extrato de uma planta com sintomas da doença greening. Para realizar as sintonias necessárias foram utilizadas, como parâmetro inicial,

as mesmas condições anteriormente ajustadas para os padrões **AG** e **AS**. Dessa forma, foram somadas as massas encontradas para as moléculas desprotonadas **AG** ( $[M-H]^- = 153$ ) e **AS** ( $[M-H]^- = 137$ ) a massa que representasse como substituinte uma molécula de glicose (162 u.m.a.). Ou seja, para a orbicularina monitorou-se o íon  $[M-H-H+glicose]^- = 315$  e para o ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico monitorou-se o íon  $[M-H-H+glicose]^- = 299$ .

Assim, para o monitoramento da orbicularina nos extratos foram realizados experimentos de SRM, onde a transição 315  $\rightarrow$  153 foi selecionada para ser utilizada como transição de quantificação e a transição 315  $\rightarrow$  109 para ser utilizada como transição de confirmação, ambas mantendo-se o cone em 50 V e a energia de colisão em 30 eV. E para o monitoramento do ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico foram selecionadas as transições 299  $\rightarrow$  137 mantendo-se o cone em 30 V e a energia de colisão em 15 eV para ser utilizada como transição de quantificação, e a transição 299  $\rightarrow$  93 para ser utilizada como transição de confirmação mantendo-se o cone em 30 V e a energia de colisão em 35 eV.

Durante as análises das moléculas **AG** e **AS** e supostamente das moléculas orbicularina e ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico utilizou-se eluição no modo gradiente com um tempo de análise de 25 min (**Tabela 5**). Todos os outros parâmetros utilizados foram os mesmo aplicados no desenvolvimento descrito acima.

**Tabela 5.** Eluição gradiente utilizada durante as análises de plantas com sintomas de greening.

T (min)	MeOH 1% ác.fórmico (%)	H <sub>2</sub> O 1% ác. fórmico (%)
0.0	5	95
15	100	0
25	100	0

### 3.6 - Realização dos Ensaio de Inibição de *Guignardia citricarpa*, *in vitro*, Pelo Método de Germinação de Esporos Em Placa de Poliestireno

Para a obtenção dos esporos de *G. citricarpa*, o fungo foi crescido sobre folhas (cortadas com um vazador metálico com 2 cm de diâmetro) de *Citrus*, os quais foram autoclavados em água destilada por 20 minutos e colocados em placa de Petri (h X  $\phi$  = 12 X 90 mm) com meio agar-água (1,5%), sendo 5 fragmentos por placa. Em pontos próximos ao fragmento de folha, foram colocados discos de micélio (colônias com 20 dias de crescimento em BDA) (**Figura 20 – a**). Ao final de 14 dias observou-se, com a ajuda de Lupa, a presença de uma matriz gelatinosa no ostíolo do picnídio (**Figura 20 – b**). Essa matriz gelatinosa foi coletada, sob Lupa (aumento de 200 x), com auxílio de um alfinete entomológico, sendo em seguida, essa massa utilizada para o preparo das suspensões de conídios ( $1 \times 10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>) (**Figura 20 – c**), quantificados em câmara de Neubauer. Os picnidiósporos foram obtidos de uma massa gelatinosa presente no ostíolo dos picnídios, de acordo com MCONIE, 1964 & 1967 & BLANCO, 1999. A viabilidade dos picnidiósporos foi observada em lâminas de poliestireno, em microscópio ótico (aumento de 400 x) e confirmada a partir da germinação dos mesmos, em H<sub>2</sub>O (destilada esterilizada), após 12 h de inoculação em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperíodo intercalando 12 h de luz e 12 h de escuro.

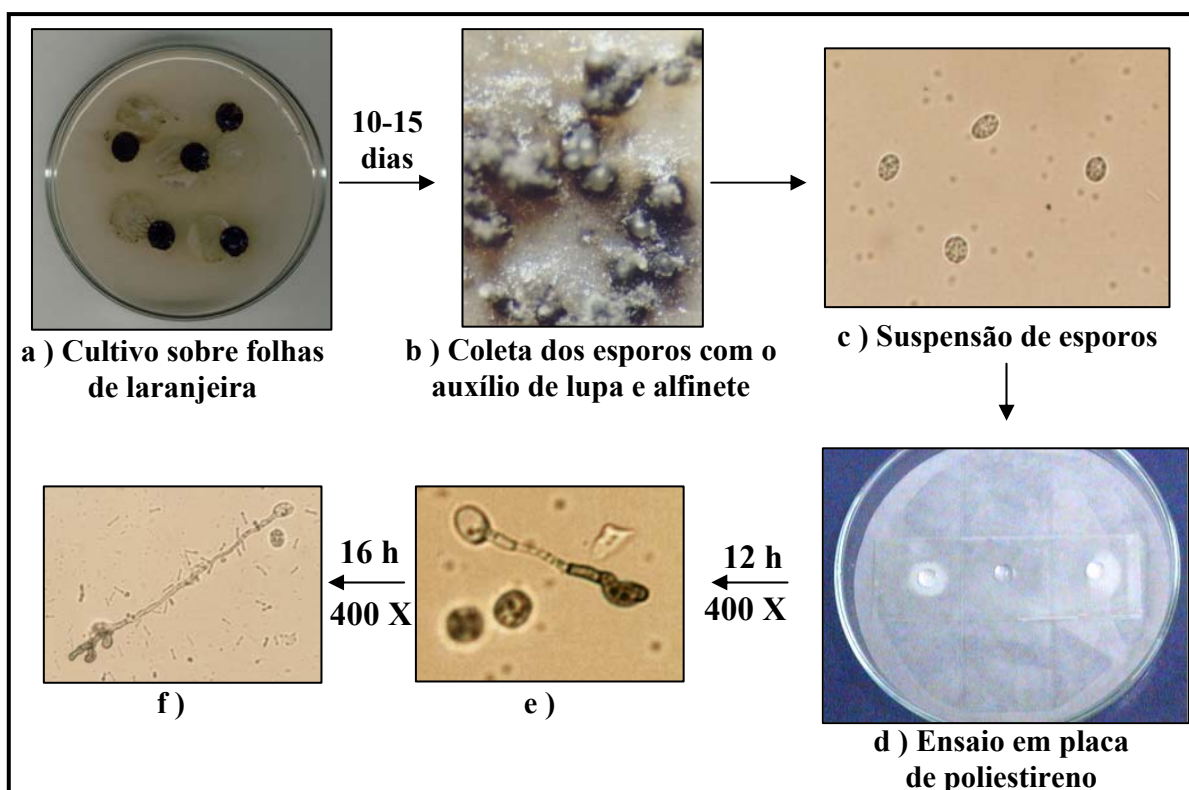
Para a produção das lâminas de poliestireno, obteve-se uma solução de poliestireno, através da dissolução de uma placa de petri de poliestireno (h X  $\phi$  =12 X 90 mm) moída em 100,0 mL de acetato de amila. Em seguida, mergulhou-se um número desejado de lâminas de vidro nessa solução de poliestireno e deixou-se secar por um período de 6 horas em capela, obtendo-se, assim, um filme de poliestireno nas lâminas de vidro. A lâmina de vidro coberta pelo filme de poliestireno teve a função de mimetizar a superfície hidrofóbica das folhas de *Citrus*.

Montou-se o experimento de forma a tomar uma placa de petri de vidro (h X  $\phi$  =12 X 90 mm), forrando-se o seu fundo com papel de filtro circular e adicionando-se uma lâmina de vidro sem o filme de poliestireno sobre este

papel de filtro. Sobre esta lâmina, sobrepôs-se, em forma de cruz, uma outra lâmina de vidro contendo o filme de poliestireno, umedecendo, em seguida, o papel de filtro com água destilada (**Figura 20 – d**) (LEITE & NICHOLSON, 1992).

O experimento foi conduzido adicionando-se 40 µL da suspensão de esporos mais 40 µL da solução do composto a ser testado sobre a lâmina de vidro coberta com o filme de poliestireno. As placas de Petri contendo o experimento foram seladas com plástico transparente e incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 26 °C e luz fluorescente constante por 12 h.

Com o auxílio de um microscópio ótico foi possível observar a germinação dos conídios, nos períodos de 12, 18 e 24 horas do início do experimento. Foram considerados como germinados os conídios com tubos germinativos maiores do que o comprimento do próprio picnidiósporo (**Figura 20 – e, f**) (GLIENKE, 1995). Se não houvesse germinação dos conídios, dentro do período de 24 horas, o composto testado poderia ser considerado como um agente fungitóxico.



**Figura 20.** Desenvolvimento do ensaio de inibição de *G. citricarpa*, *in vitro*, pelo método de germinação de esporos em placa de poliestireno.

### **3.6.1 - Compostos Utilizados No Ensaio de Inibição de *Guignardia citricarpa*, *in vitro***

Os compostos que foram testados frente à inibição dos apressórios de *G. citricarpa*, bem como a concentração utilizada de cada um deles, estão representados na **Tabela 6** e **Figuras 21** e **22**. As substâncias ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico, ácido 3,4-dimetoxibenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido salicílico, ácido gentísico, flavona, naringina, rutina e hesperidina utilizadas no ENSAIO 1 foram todas obtidas comercialmente. Já as substâncias xantiletina, seselina, suberosina, crenulatina, tamatina, limonianina e 5-Hidroxinoracrinicina utilizadas no ENSAIO 2 foram obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do porta-enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, realizado no Laboratório de Produtos Naturais do DQ-UFSCar onde este experimento está descrito com detalhes no capítulo 1 da tese do pesquisador Alan Bezerra Ribeiro (RIBEIRO, 2006). A substância alternariol monometil éter foi obtida como metabólito secundário do microrganismo fitopatogênico *Alternaria alternata* e o ácido clorogênico foi obtido de plantas de *Coffea arábica*, estas duas substâncias foram isoladas e identificadas no Laboratório de Espectrometria de Massas e no Laboratório de Microbiologia Micromolecular do DQ-UFSCar.

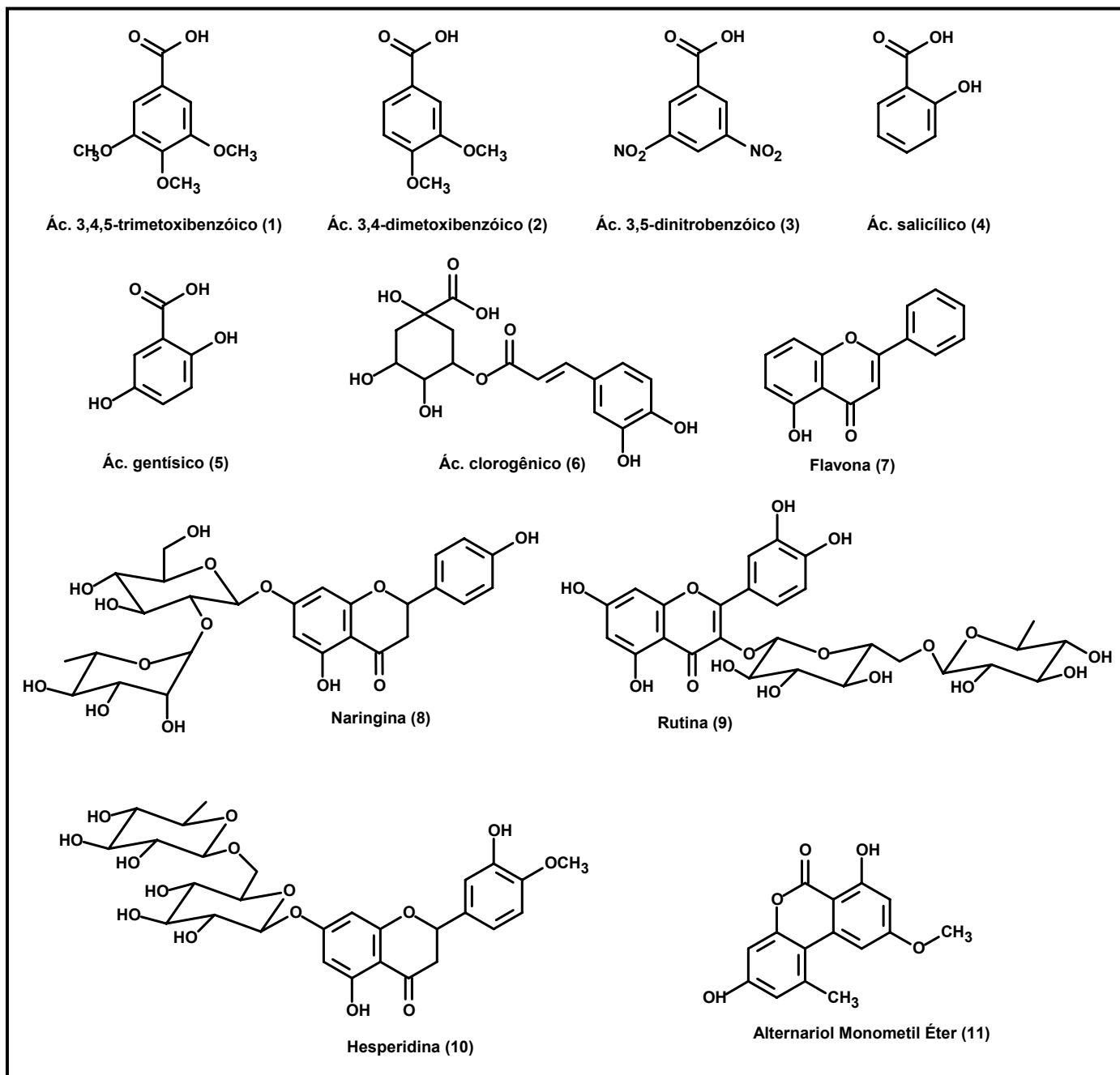
Todos os compostos foram diluídos em 1 mL de H<sub>2</sub>O (tubos eppendorf de 1 mL) e mantidos em banho maria sob a temperatura controlada de 45 °C por um período de 20 minutos, até a total solubilização.

Ainda, com o intuito de testar outros solventes para à solubilização das substâncias empregadas nesse ensaio biológico, foram testados o solvente DMSO (dimetilsulfóxido) e a mistura de DMSO:H<sub>2</sub>O 1:1.

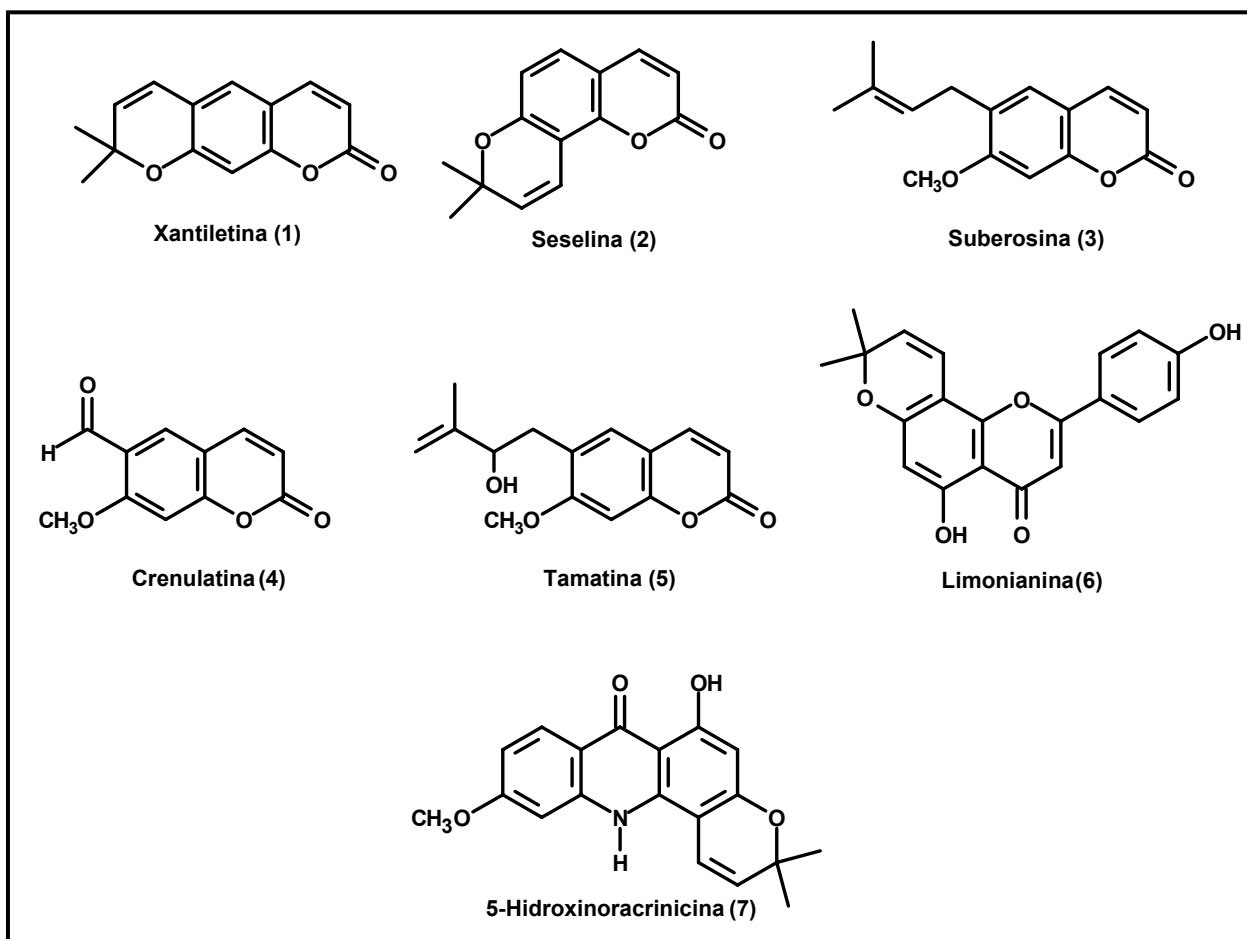


**Tabela 6.** Compostos que foram utilizados no ensaio de inibição dos apressórios de *G. citricarpa*.

<b>ENSAIO 1</b>			
<b>Substância</b>	<b>Fonte</b>	<b>Concentração</b>	<b>Estrutura Molecular (Figura 10)</b>
Ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico	Sigma	500 µg/mL	1
Ácido 3,4-dimetoxibenzóico	Sigma	500 µg/mL	2
Ácido 3,5-dinitrobenzóico	Sigma	500 µg/mL	3
Ácido Salicílico	Synth	500 µg/mL	4
Ácido Gentísico	Sigma	500 µg/mL	5
Ácido Clorogênico	Sigma	500 µg/mL	6
Flavona	Sigma	500 µg/mL	7
Naringina	Sigma	500 µg/mL	8
Rutina	Sigma	500 µg/mL	9
Hesperidina	Sigma	500 µg/mL	10
Alternariol Monometil Éter	Isolado de <i>Alternaria alternata</i> no laboratório	500 µg/mL	11
Água		40,0 µL	12
<b>ENSAIO 2</b>			
<b>Substância</b>	<b>Fonte</b>	<b>Concentração</b>	<b>Estrutura Molecular (Figura 11)</b>
Xantiletina	Isolado do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .	2000 µg/mL	1
Seselina	Isolado do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .	500 µg/mL	2
Suberosina	Isolado do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .	500 µg/mL	3
Crenulatina	Isolado do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .	500 µg/mL	4
Tamatina	Isolado do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .	500 µg/mL	5
Limonianina	Isolado do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .	500 µg/mL	6
5-Hidroxinoracrinicina	Isolado do porta-enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .	500 µg/mL	7
Água		40,0 µL	8



**Figura 21.** Estruturas moleculares dos compostos utilizados no ensaio 1 de inibição dos apressórios de *G. citricarpa*.



**Figura 22.** Estruturas moleculares dos compostos utilizados no ensaio 2 de inibição dos apressórios de *G. citricarpa*.

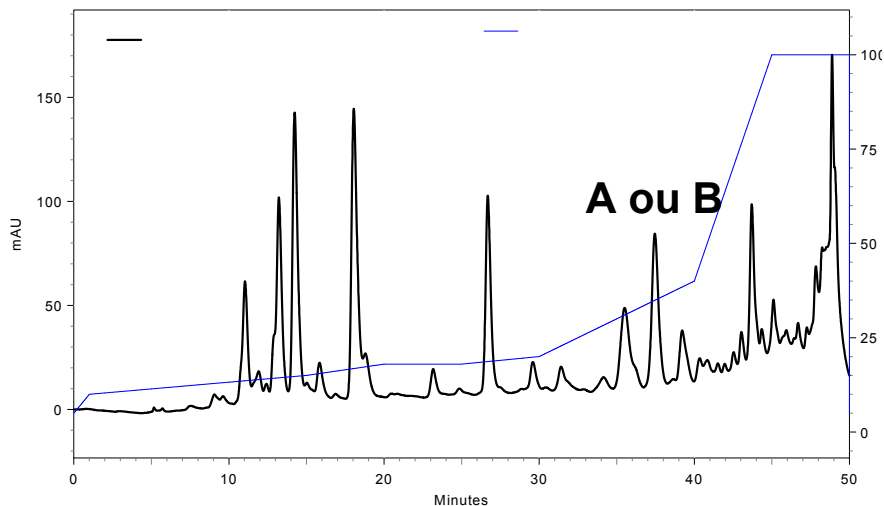
## 4 - Resultados e Discussões

### 4.1 - Resultados Obtidos Para a Metodologia de Análise Por HPLC/UV/MS dos Metabólitos Secundários Presentes em *Citrus*

#### 4.1.1 - Extração e Pré-purificação dos Compostos Polares Presentes nas Folhas do Enxerto

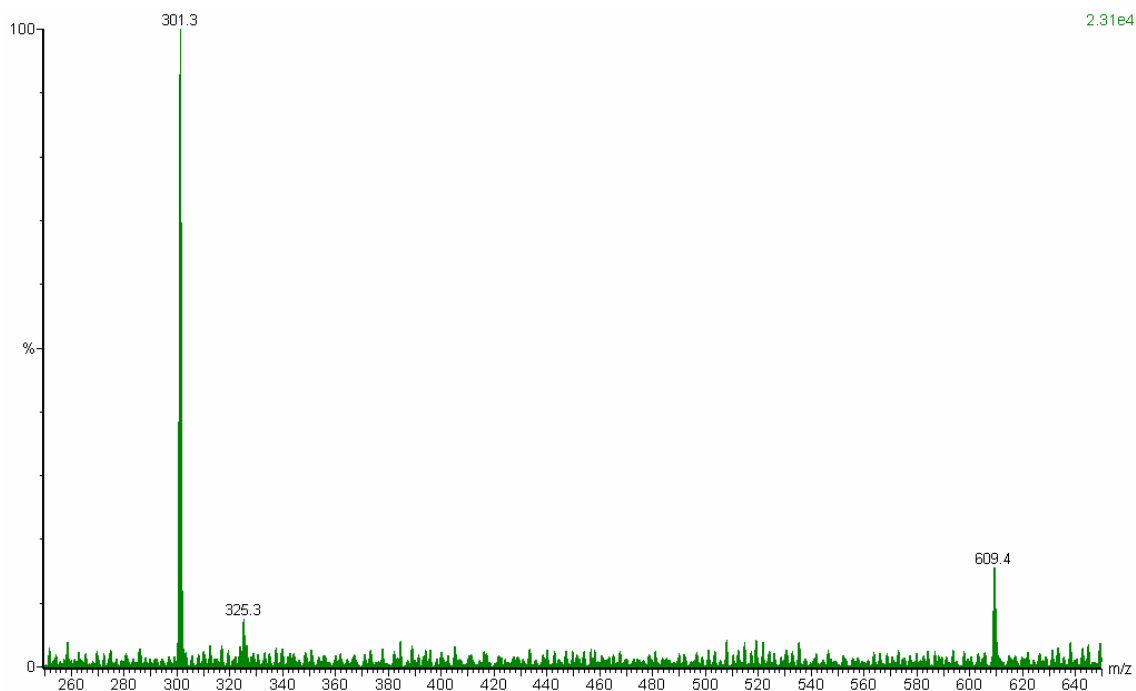
Durante o desenvolvimento das condições de extração dos compostos polares presentes nas folhas de citros, diferentes solventes e proporções de solventes foram testadas. Os melhores resultados foram obtidos utilizando os solventes H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>CN na proporção de 7:3. Cartuchos de SPE contendo ODS como fase estacionária foram também testados. Dessa forma, os melhores resultados foram obtidos utilizando tanto extração com solvente quanto extração em fase sólida no clean-up das amostras.

Para obter bons resultados de separação e detecção dos compostos polares, a otimização das etapas envolvendo a análise desses compostos no HPLC-UV-MS foram cruciais. Assim, a definição da melhor fase móvel a ser usada durante este estudo envolveu diferentes composições de solventes orgânicos e aditivos. Os solventes orgânicos compunham metanol, acetonitrila, e tetrahidrofurano. Os aditivos testados compunham ácido fórmico, ácido acético. Os melhores resultados foram alcançados utilizando metanol:acetonitrila (1:1) como fase B e H<sub>2</sub>O como fase A, ambas acidificadas como 1% de ácido fórmico como aditivo. A melhor separação entre os compostos foi atingida utilizando a análise cromatográfica no modo gradiente de eluição (**Cromatograma 1**).

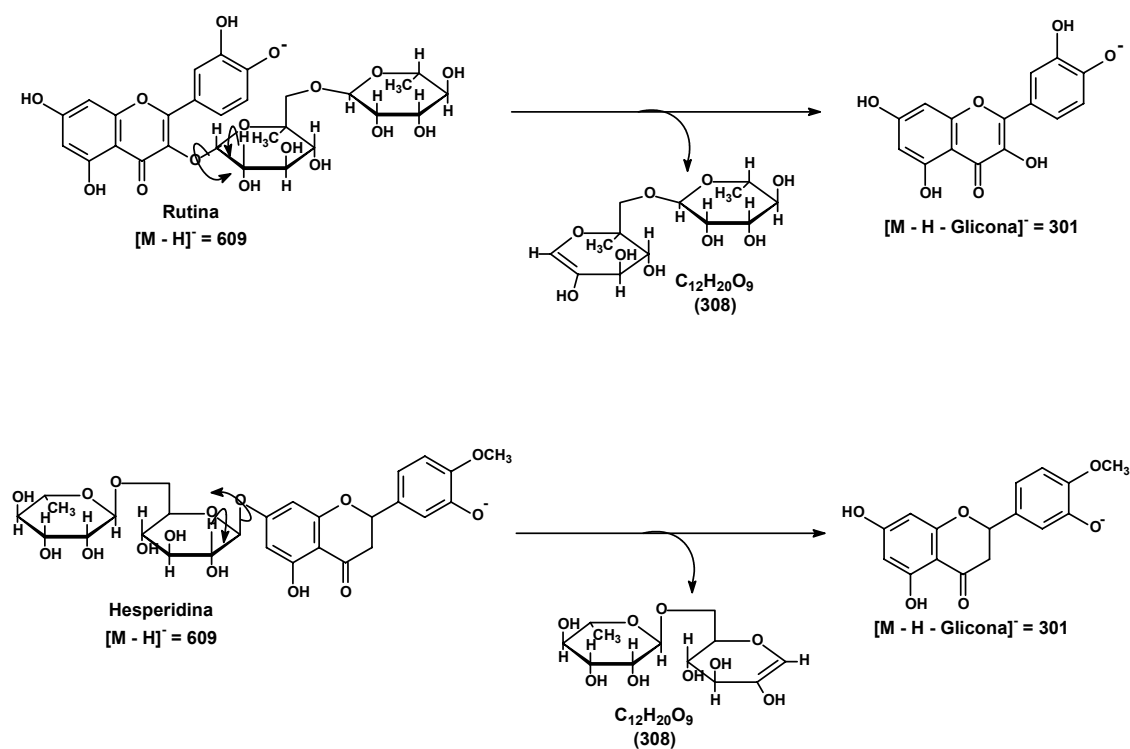


**Cromatograma 1.** Cromatograma obtido durante o desenvolvimento do método para os compostos polares utilizando a coluna Shimadzu CLC-phenil (333 nm).

No extrato dos compostos polares pode-se constatar, até o momento, a presença de flavonóides glicosilados, onde através do experimento por HPLC-UV-MS adquirido no modo *Full Scan* negativo, no tempo de retenção de 37,5 min, observou-se a presença de uma substância que deu origem a um íon pseudo-molecular desprotonado  $[M - H]^- = 609$  (**Figura 23 e 24**). Onde, no experimento de íons fragmento de  $m/z = 609$  constatou-se a perda de 308 u.m.a (glicona) com o surgimento de um fragmento de  $m/z 301$  (aglicona), sugerindo a perda de uma glicose e de uma raminose (**Figura 23 e 24**). Nesse caso não foi observado a perda de apenas uma unidade de açúcar (glicose ou raminose) nem Retro Diels Alder na aglicona. Através destes resultados pode-se propor duas possibilidades estruturais, o surgimento da Rutina ou da Hesperidina, ambas com massa molecular de 610 Da, substâncias estas já descritas anteriormente no gênero *Citrus* (HE et. al., 1997).



**Figura 23.** Espectro obtido do experimento de íons fragmento de  $[M-H]^- = 609$  com energia de colisão de 13 eV.

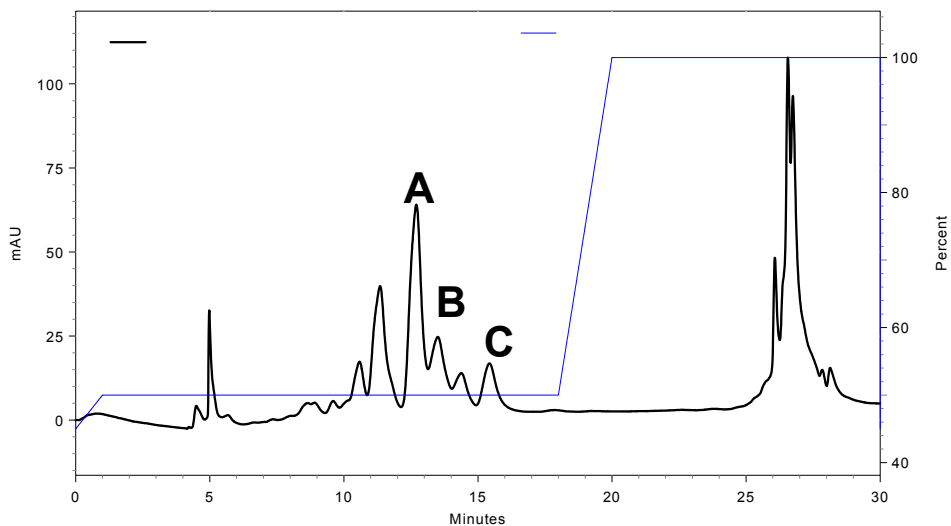


**Figura 24.** Propostas de fragmentação para a rutina e hesperidina.

#### **4.1.2 - Resultados Obtidos Durante a Extração e Pré-purificação dos Compostos de Polaridade Intermediária Presentes nas Folhas de Citros**

Da mesma forma que para os compostos polares, para a extração dos compostos de polaridade intermediária presentes nas folhas de citros, diferentes solventes e proporções de solventes foram testados. Os melhores resultados foram obtidos utilizando apenas o solvente CH<sub>3</sub>CN para a extração. Cartuchos de SPE contendo ODS como fase estacionária também foram testados. E, da mesma forma que observado anteriormente para os compostos polares, os melhores resultados foram obtidos utilizando tanto extração com solvente quanto extração em fase sólida no clean-up das amostras.

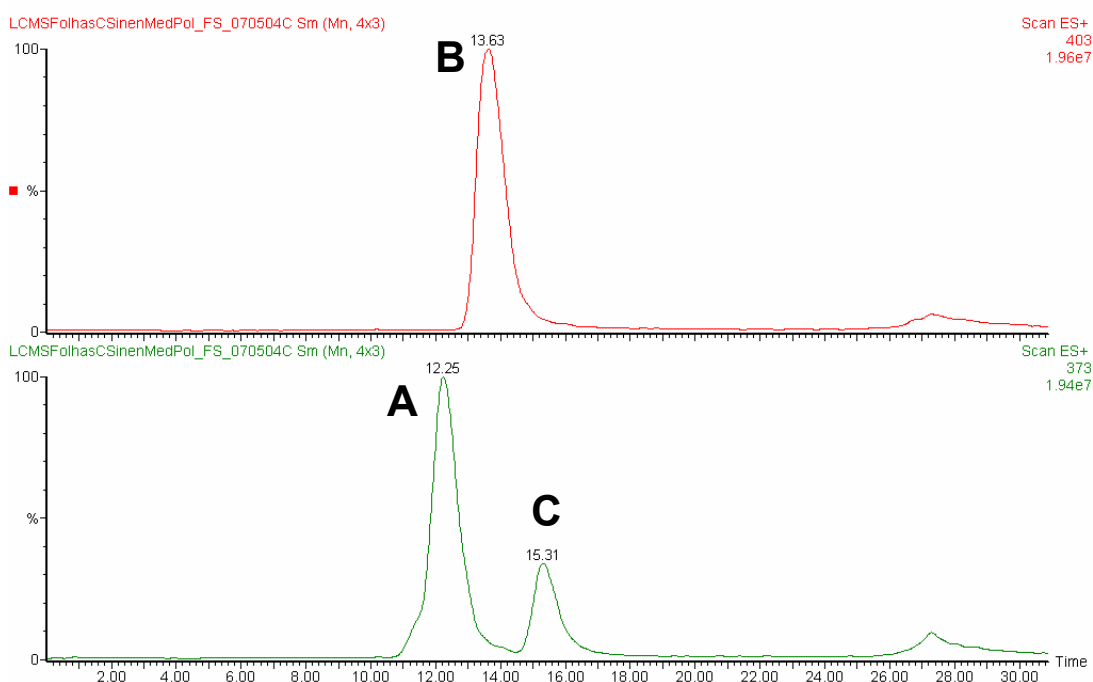
A definição da melhor fase móvel a ser usada durante este estudo envolveu diferentes composições de solventes e aditivos. Os solventes orgânicos compunham metanol, acetonitrila, e tetrahidrofurano. Os aditivos testados compunham ácido fórmico, ácido acético. Os melhores resultados foram alcançados utilizando metanol:acetonitrila (1:1 v/v) como fase B e H<sub>2</sub>O como fase A, ambas acidificadas como 1% de ácido fórmico. A melhor separação entre os compostos foi atingida utilizando análise cromatográfica no modo gradiente de eluição (**Cromatograma 2**).



**Cromatograma 2.** Cromatograma obtido anteriormente durante o desenvolvimento do método para os compostos de polaridade intermediária utilizando a coluna Shimadzu CLC-phenil (333 nm).

Através das análises dos compostos de polaridade intermediária por HPLC-UV-MS, pode-se constatar a presença de flavonóides polimetoxilados. Durante o experimento de *Full Scan* no modo positivo observou-se a substância que deu origem ao íon pseudo-molecular protonado  $[M + H]^+ = 403$  e com tempo de retenção de 13,63 min (**Cromatograma 3-B**).



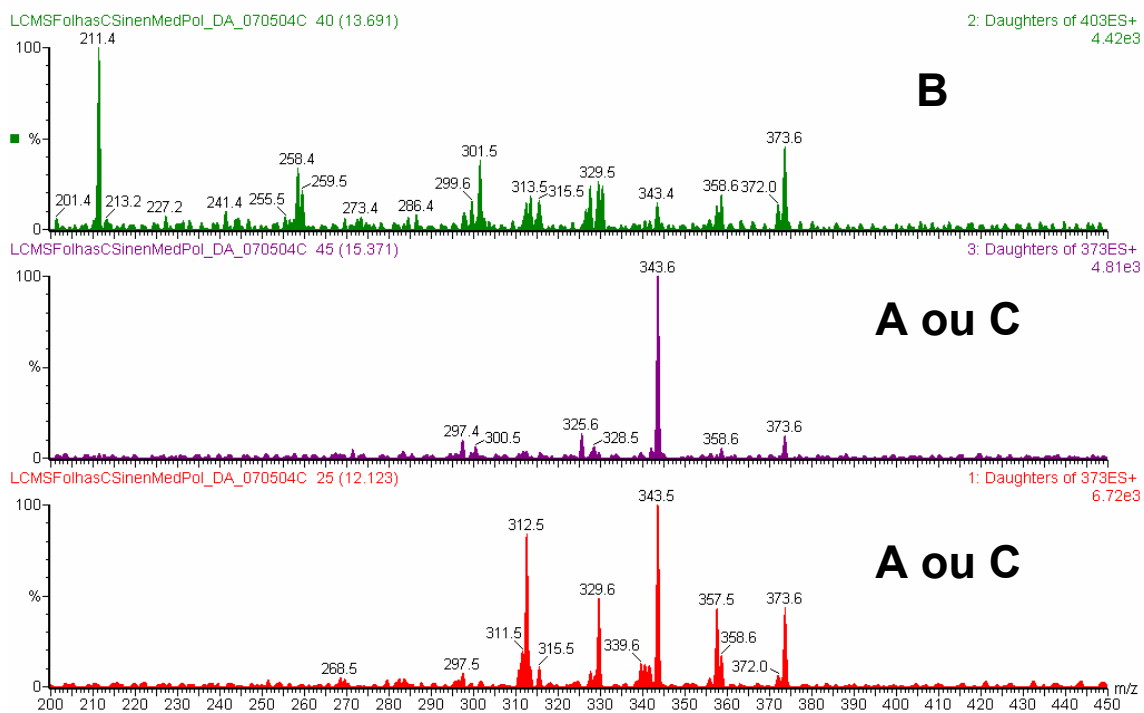


**Cromatograma 3.** Experimento de *Full Scan* dos compostos de polaridade intermediária presentes nas amostras de folhas de *Citrus*.

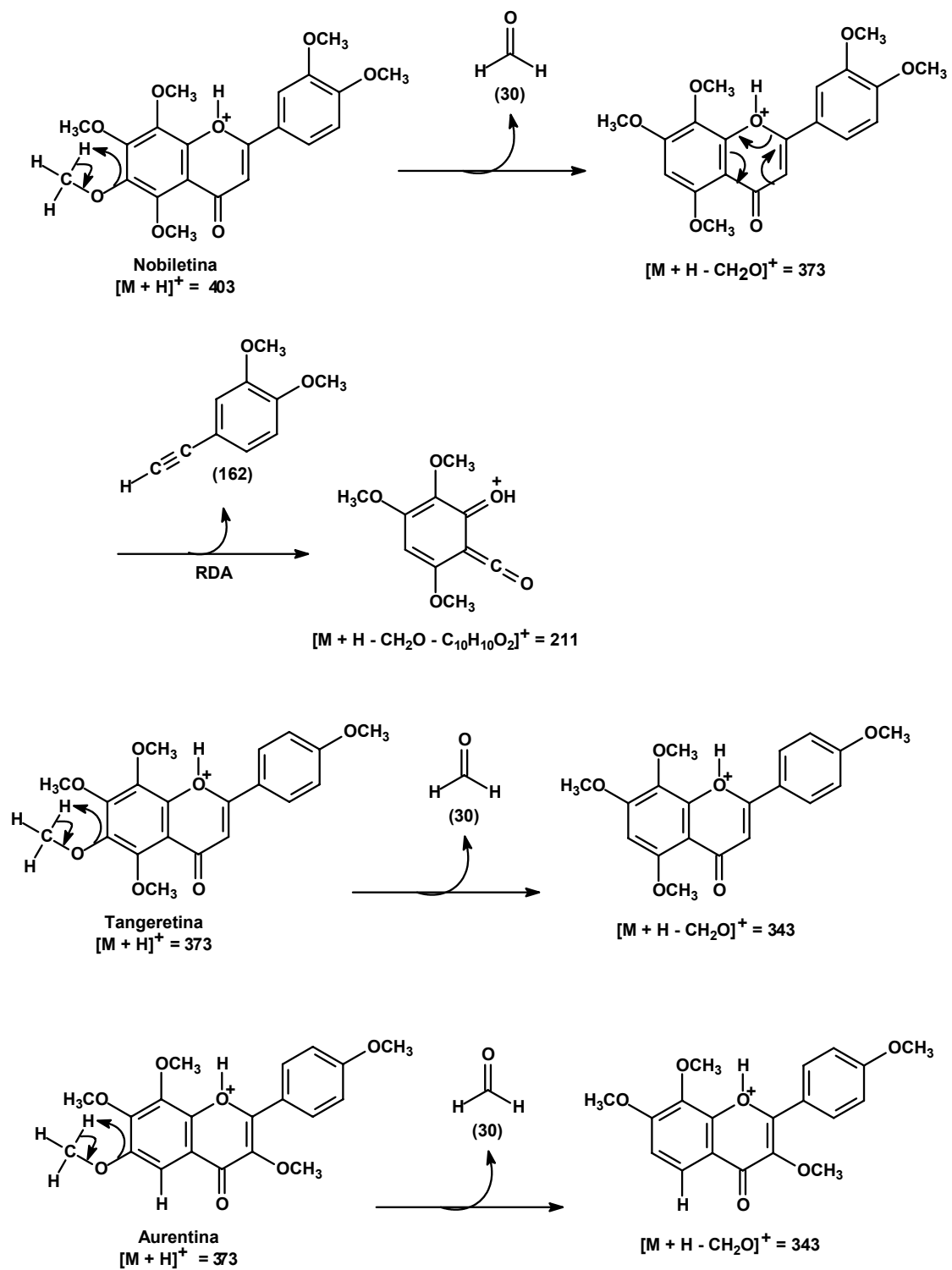
Procedendo o experimento de íons fragmento de 403, constatou-se a perda de 30 u.m.a de acordo com a perda de uma molécula de formaldeído ( $[M + H - CH_2O]^+ = 373$ ) e em seguida a perda de 162 u.m.a através de uma Retro Diels Alder ( $[M + H - CH_2O - C_{10}H_{10}O_2]^+ = 211$ ) (**Figura 25 – B e Figura 26**) sugerindo assim que a molécula em questão se tratava da substância nobiletina (B), já descrita anteriormente como metabólito secundário de *C. aurantium* (HE *et. al.*, 1997).

Da mesma forma, observou-se no espectro de *Full Scan* o íon  $m/z$  373, porém, em dois tempos de retenção diferentes, 12,25 e 15,31 min (**Cromatograma 3- A e C**), sugerindo a possibilidade da existência de dois isômeros constitucionais no extrato. No experimento de íon fragmento ambos os compostos perderam uma molécula de formaldeído com 30 u.m.a. com o surgimento do fragmento  $m/z$  343 ( $[M + H - CH_2O]^+$ ) (**Figura 25 – A e C e Figura 26**), sugerindo a possibilidade da presença das substâncias tangeretina

e aurentina, também anteriormente relatadas em *C. aurantium* (HE *et. al.*, 1997).



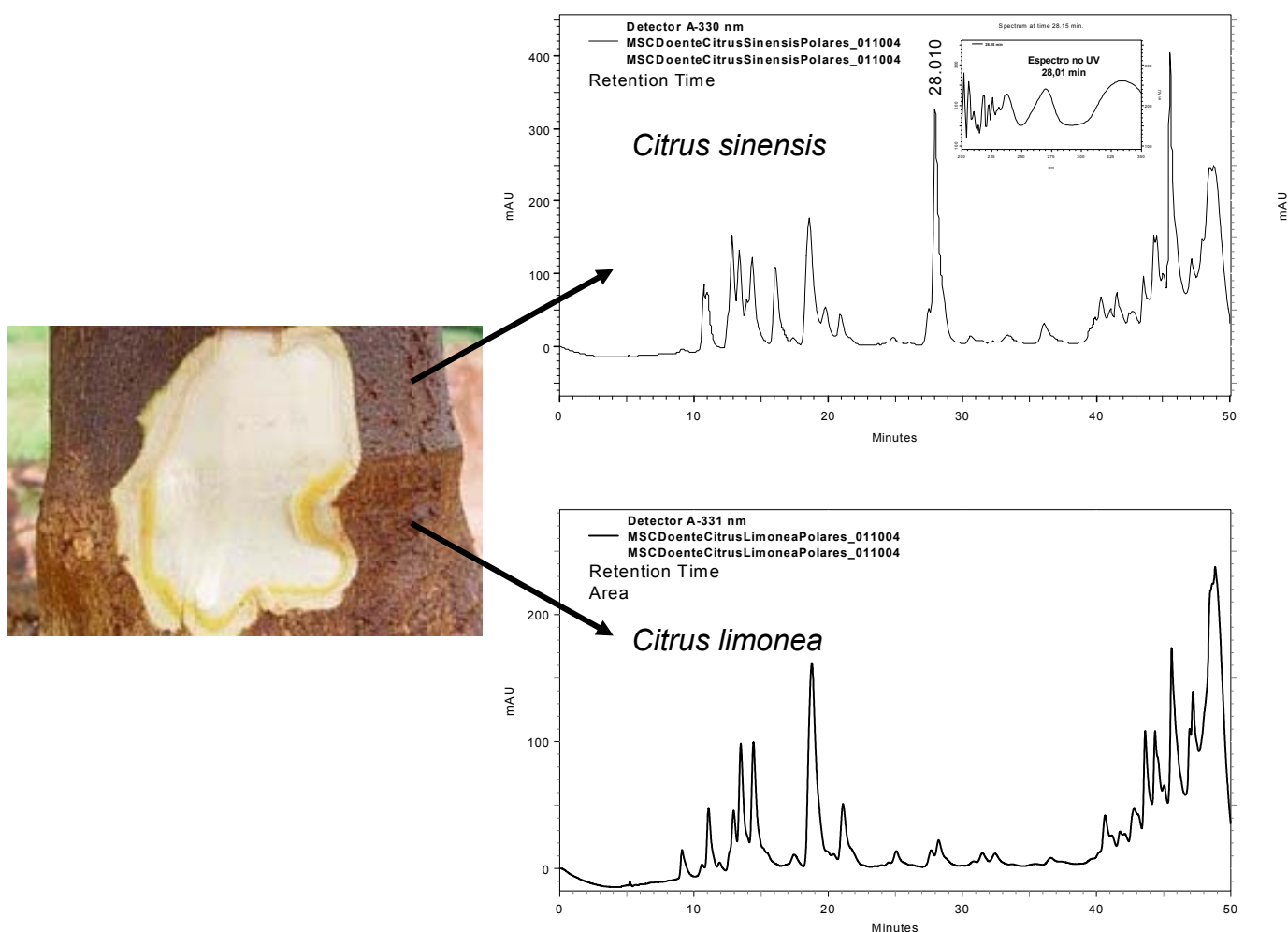
**Figura 25.** Espectro obtido do experimento de íons fragmento de  $[M-H]^+ = 403$  (40 eV),  $[M-H]^+ = 373$  (45 eV) e  $[M-H]^+ = 373$  (25 eV).



**Figura 26.** Propostas de fragmentação para a nobiletina, tangeretina e aurentina.

### 4.1.3 - Resultados Obtidos Durante as Análises dos Compostos Polares Presentes nas Cascas do Tronco do Enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonea*

Através das análises de HPLC-UV-MS dos extratos polares, tanto da copa quanto do cavalo, de uma planta que apresentava os sintomas aparentes de MSC foi possível observar uma diferença nítida na composição química das duas partes do enxerto. Quando a copa (*C. sinensis*) foi analisada, observou-se a presença de uma molécula no tempo de retenção de 28.0 minutos que não estava presente na análise do cavalo (*C. limonea*) (**Figura 27**). O perfil cromatográfico entre plantas saudáveis e doentes foram bastante similares.

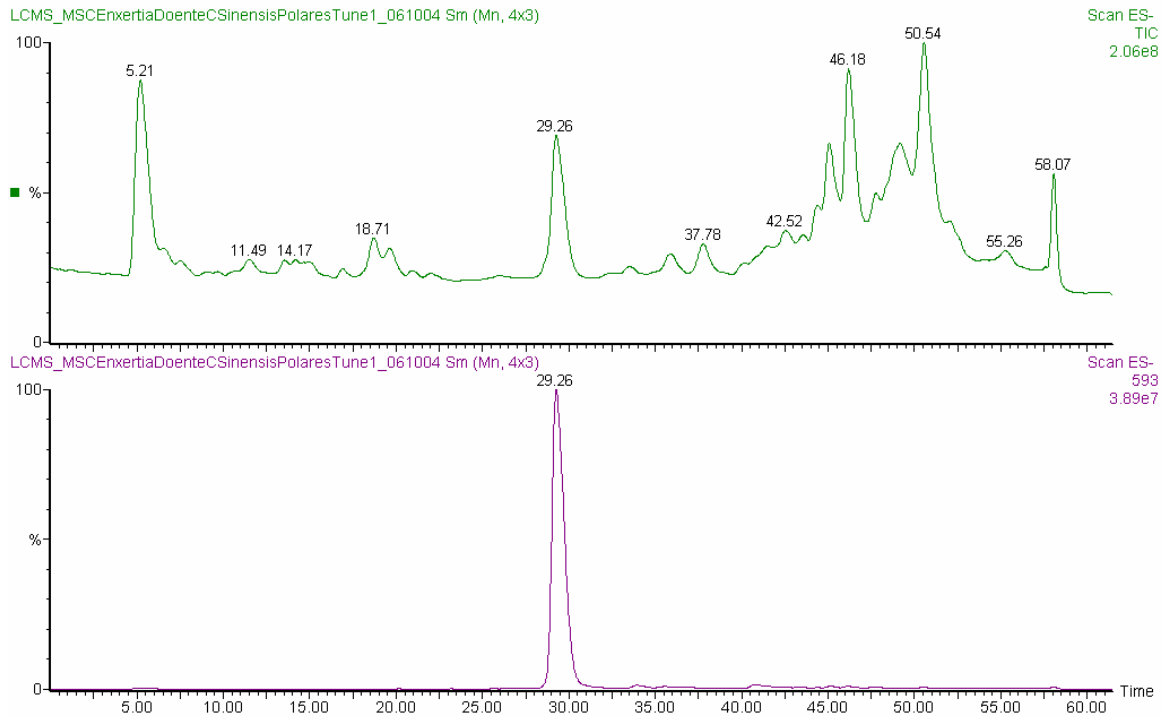


**Figura 27.** Cromatogramas obtidos da análise da casca da copa (*C. sinensis*) e da casca do cavalo (*C. limonea*) de uma planta com sintomas de MSC.

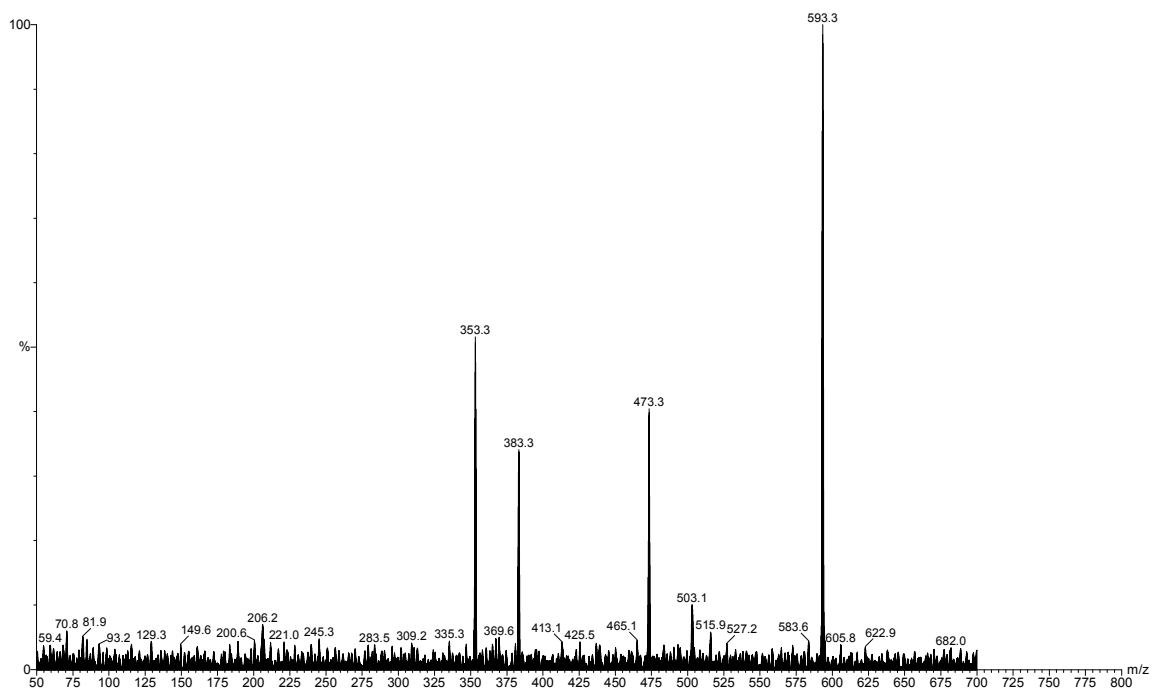
O curioso foi que a banda em 28.0 minutos que evidenciou a diferença no metabolismo das duas partes do enxerto não correspondeu ao cavalo, que apresenta diferença na coloração do tecido quando doente, e sim na copa, onde não se nota qualquer mudança aparente na coloração. Era esperado que o acúmulo ou a produção de alguma substância, ou substâncias, com grupos cromóforos seria a responsável pela mudança na coloração do cavalo. Mas, pelo menos nos extratos polares, o resultado apontou para uma molécula que evidencia a diferença no metabolismo do enxerto na copa da planta.

Outros testes também foram realizados aplicando a metodologia desenvolvida para os compostos de polaridade intermediária (**3.3.3, Página 32**) no cavalo e na copa do enxerto. Mas nenhum resultado satisfatório foi encontrado que indicasse a diferença de metabolismo entre os dois tecidos analisados, demonstrando que, pelo menos nesta polaridade, não há diferenças no metabolismo da planta.

Quando realizada análise para o extrato da copa por HPLC-UV-MS, *Full Scan* no modo negativo, foi possível detectar que a molécula em questão apresentava o íon pseudo-molecular desprotonado  $[M-H]^- = 593$  (**Cromatograma 4**). Os experimentos de íons fragmento desta molécula apresentavam os íons  $m/z$  473,  $m/z$  383 e  $m/z$  353 (**Figura 28**). Mas, por enquanto, não foi possível determinar a estrutura molecular do composto detectado.



**Cromatograma 4.** Cromatograma de íons totais (TIC) obtido durante a análise de HPLC-UV-MS da copa (*C. sinensis*) de uma planta com aparentes de MSC.



**Figura 28.** Espectro de íons fragmento de  $[M-H]^- = 593$  do extrato da copa (*C. sinensis*) do enxerto de uma planta com sintomas aparentes de MSC.

#### 4.1.3.1 - Resultados das Novas Condições Desenvolvidas Para a Análise dos Compostos Polares Presentes nas Cascas do Tronco do Enxerto

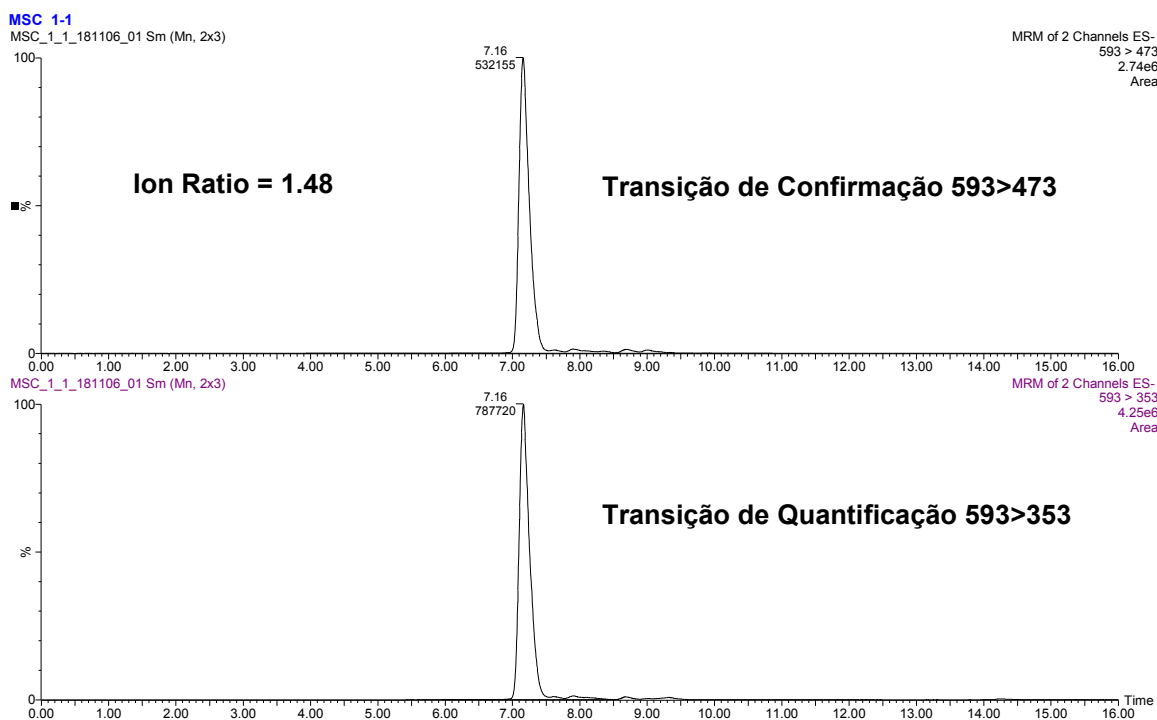
As novas condições desenvolvidas para a análise dos compostos polares presentes nas cascas do tronco do enxerto foram utilizadas durante os experimentos de SRM.

Os íons fragmento de  $[M-H]^- = 593$ ,  $m/z$  473 e  $m/z$  353 que foram obtidos nos experimentos anteriores foram também utilizados nos experimentos de SRM. Uma série de amostras de plantas com sintomas de MSC e de plantas saudáveis foram analisadas com o intuito de monitorar a molécula com o íon pseudo-molecular  $[M-H]^- = 593$  no tronco do enxerto (copa e cavalo) e nas folhas destas plantas. A **Tabela 7** a seguir ilustra as amostras que foram analisadas.

**Tabela 7.** Amostras analisadas pelo experimento de SRM.

Coleta e Diagnóstico (Fundecitrus)	Material Vegetal	Nº de Amostras
Plantas saudáveis	Folhas	10
	Casca do tronco: Copa ( <i>C. sinensis</i> )	10
	Casca do tronco: Cavalo ( <i>C. limonea</i> )	10
Plantas doentes	Folhas	10
	Casca do tronco: Copa ( <i>C. sinensis</i> )	10
	Casca do tronco: Cavalo ( <i>C. limonea</i> )	10
Plantas assintomáticas coletadas ao lado de plantas doentes	Folhas	11
	Casca do tronco: Copa ( <i>C. sinensis</i> )	11
	Casca do tronco: Cavalo ( <i>C. limonea</i> )	11

O cromatograma de SRM a seguir (**Cromatograma 5**) representa o experimento realizado com uma amostra do extrato da copa de uma planta com sintomas de MSC. A molécula monitorada apresentou tempo de retenção em 7.16 min onde tanto a transição de quantificação (593 > 353) quanto a transição de confirmação (593 > 473) foram detectadas nos experimentos. Durante os experimentos de SRM um outro artifício, chamado de Ion Ratio, foi utilizado para comprovar a presença do analito nos extratos. Este artifício se refere a relação existente entre a área da banda da transição de quantificação e da área da banda da transição de confirmação (Área da Transição de Quantificação/Área da Transição de Confirmação). No experimento realizado com todas as amostras o Ion Ratio obtido foi de 1.48.

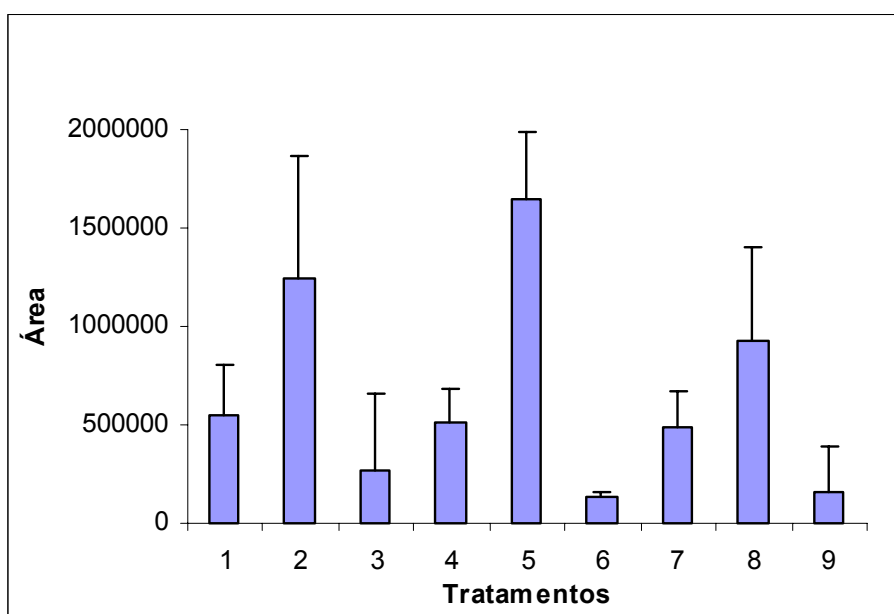


**Cromatograma 5.** Cromatograma de SRM obtido do extrato da copa de uma planta com sintomas de MSC.

Um perfil do resultado da análise das amostras descritas na **Tabela 7** está apresentado no gráfico de barras na **Figura 29**.



De uma maneira geral, pode-se observar que para todas as plantas coletadas, sadias, assintomáticas coletadas ao lado de plantas doentes, a molécula que foi monitorada estava presente apresentando maior quantidade na copa da planta. Além disso, a molécula monitorada estava presente em todas as partes da planta que foram analisadas. As amostras de folhas apresentaram praticamente metade da quantidade presente na copa e no cavalo detectou-se praticamente 10% da quantidade presente na copa. A planta doente foi a que apresentou a menor quantidade do analito na copa, quando comparado com a copa das outras plantas analisadas, mas não foi possível observar qualquer relação do analito em questão com a doença morte súbita dos citros. A estrutura molecular da molécula analisada ainda não foi elucidada.

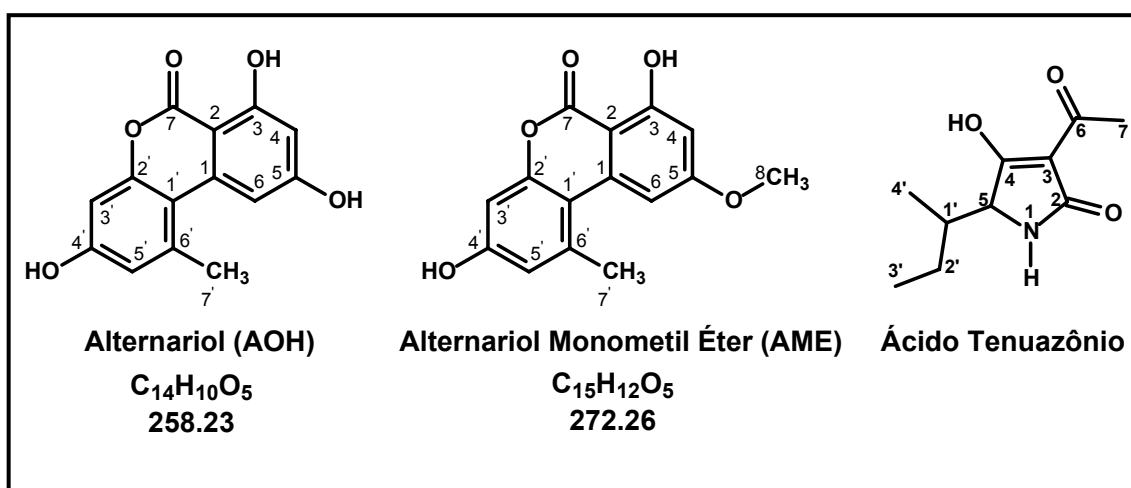


1 – Folhas sadias	4 – Folhas sadias/Lado das doentes	7 – Folhas doentes
2 – Copa sadia	5 – Copa sadia/Lado das doentes	8 – Copa doente
3 – Cavalo sadio	6 – Cavalo sadio/Lado dos doentes	9 – Cavalo doente

**Figura 29.** Perfil das áreas obtidas através dos experimentos de SRM (transição de quantificação 593 > 353) das amostras de laranjeiras sadias, sadias coletadas ao lado de plantas doentes e plantas doentes.

## 4.2 - Resultados Obtidos do Isolamento e Identificação dos Metabólitos Secundários de *A. alternata*

Como resultado do isolamento dos metabólitos secundários de *A. alternata* cultivada em milho obteve-se a fração intitulada de A.a.-EtOH-9:1-11-3B com quantidade de massa de 14,1 mg. Através dos dados de RMN-<sup>1</sup>H, NOESY e espectrometria de massas, pode-se chegar a conclusão de que se tratava de uma micotoxina, uma dibenzo- $\alpha$ -pirona, chamada de Alternariol monometil éter (**AME**) (**Figura 30**). Outra substância, também identificada através dos dados de RMN e Espectrometria de Massas, proveniente da fração A.a.-EtOH-9:1-11-3DE-B com quantidade de massa de 5,8 mg foi o Alternariol (**AOH**) (**Figura 30**). Ambas são micotoxinas de grande periculosidade, principalmente em alimentos, uma vez que mostraram ter atividades carcinogênicas para o homem no que diz respeito ao câncer de esôfago (DONG *et. al.*, 1987). Além das duas micotoxinas uma outra molécula foi identificada como Ácido tenuazônio a partir da fração A.a.-EtOH-9:1-13-1C com quantidade de massa de 30,3 mg (**Figura 30**).



**Figura 30.** Estrutura química do Alternariol (**AOH**), Alternariol monometil éter (**AME**) e Ácido tenuazônio.

#### 4.2.1 - Determinação Estrutural da Micotoxina Alternariol Monometil Éter

No espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 32 e 34), foram observados dois dubletos em  $\delta$  6.57 (1 H, *d*, *J* = 2.21Hz) e  $\delta$  7.30 (1 H, *d*, *J* = 2.14Hz), respectivos aos acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos H-4 e H-6. Outro par de dubletos foi observado, um em  $\delta$  6.63 (1 H, *d*, *J* = 2.73Hz) e  $\delta$  6.71 (1 H, *d*, *J* = 2.62Hz), relativos aos acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos H-3' e H-5'. Um singlete em  $\delta$  2.78 foi atribuído a metila 7' (Figura 33) e outro singlete observado em  $\delta$  3.93 foi atribuído a metoxila 8 (Figura 33). No experimento de NOESY (Figura 31 e Figura 35), foi possível observar o efeito de NOE no H-6 ( $\delta$  7.30) e H-4 ( $\delta$  6.57), quando a metoxila 8 ( $\delta$  3.93) foi irradiada confirmando a sua localização no C-5. Observou-se, ainda, efeito de NOE nos H-6 ( $\delta$  7.30) e H-5' ( $\delta$  6.71), quando a metila 7' ( $\delta$  2.78) foi irradiada confirmando a sua localização no C-6'.

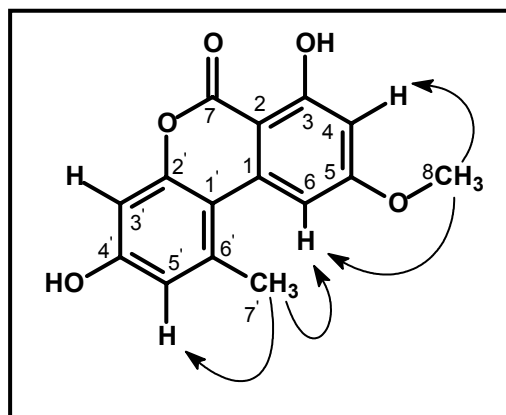
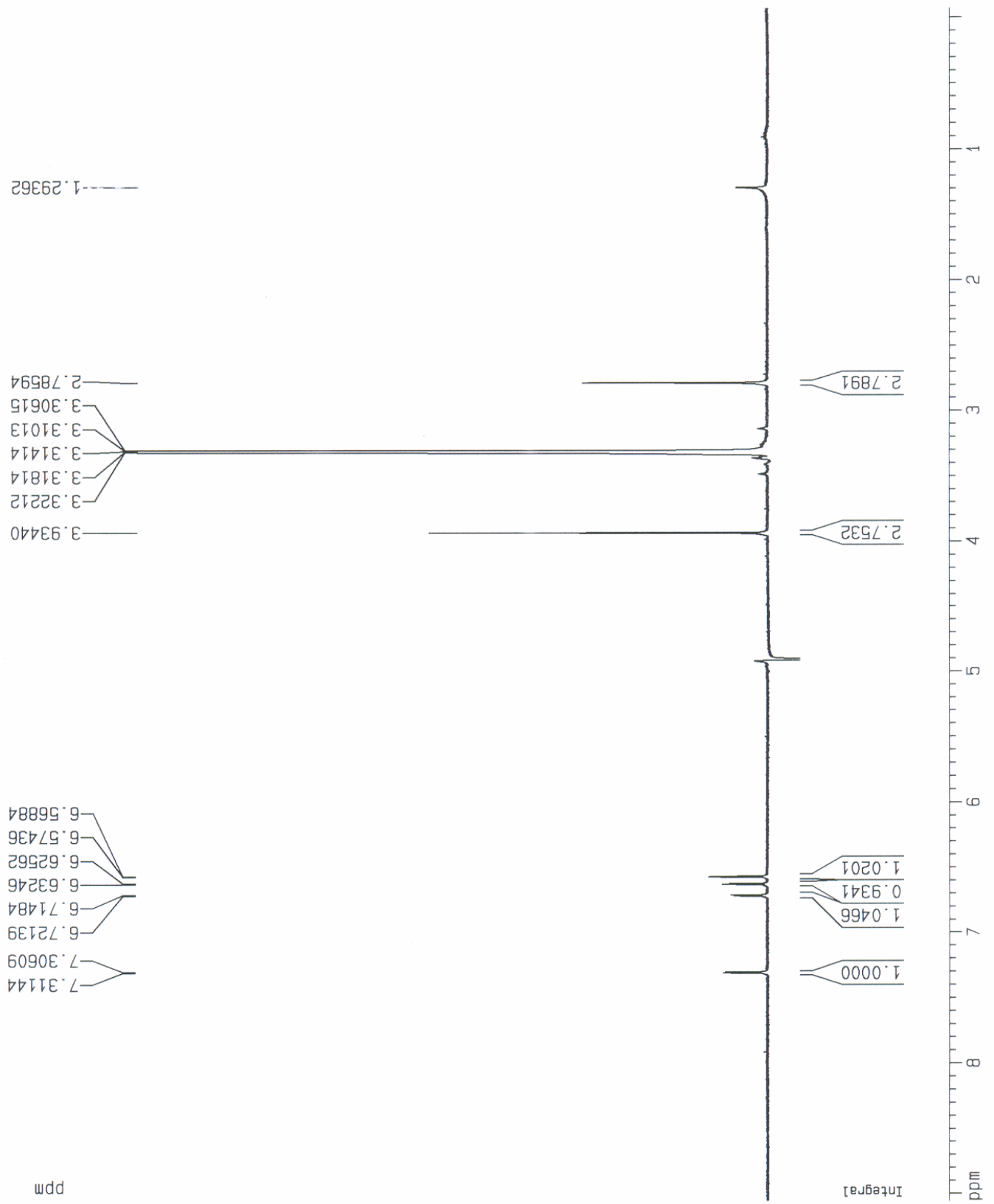
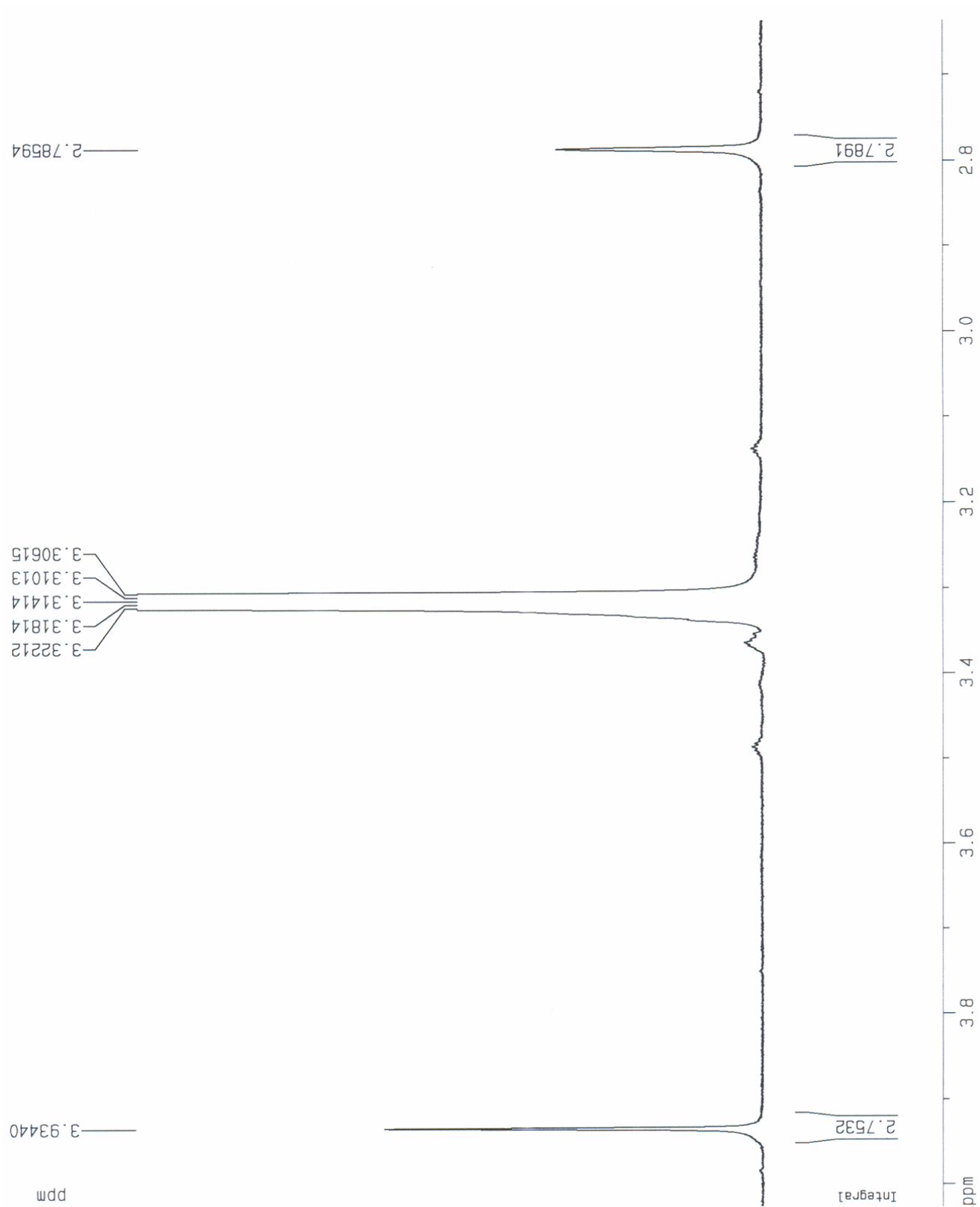


Figura 31. Correlações de NOESY para o Alternariol monometil éter.

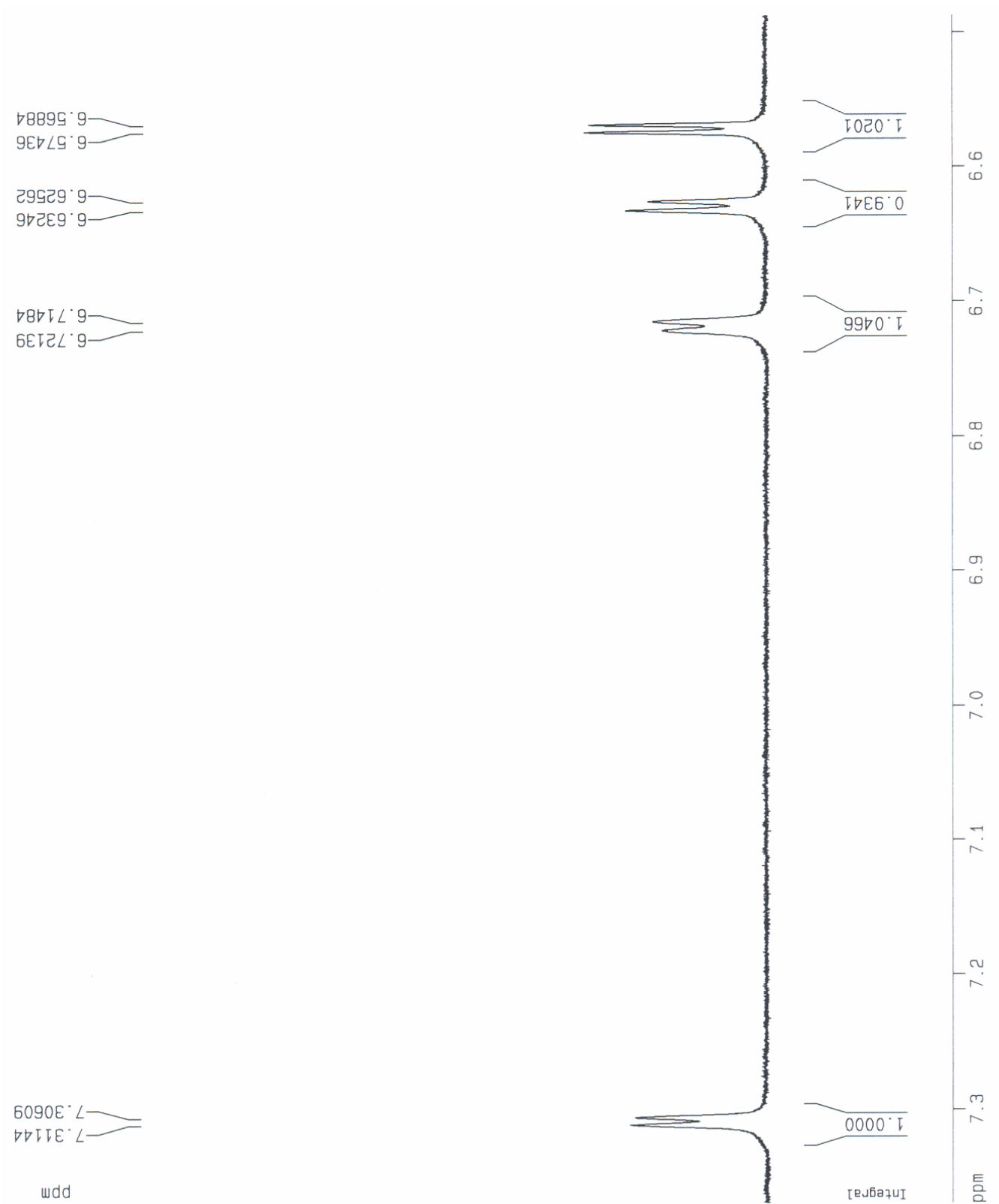
A massa molecular do alternariol monometil éter de 272 u.m.a. pode ser confirmada através do experimento de espectrometria de massas de íons fragmento *electrospray* no modo negativo (Figura 36) onde obtivemos uma massa molecular de 271 *m/z*.



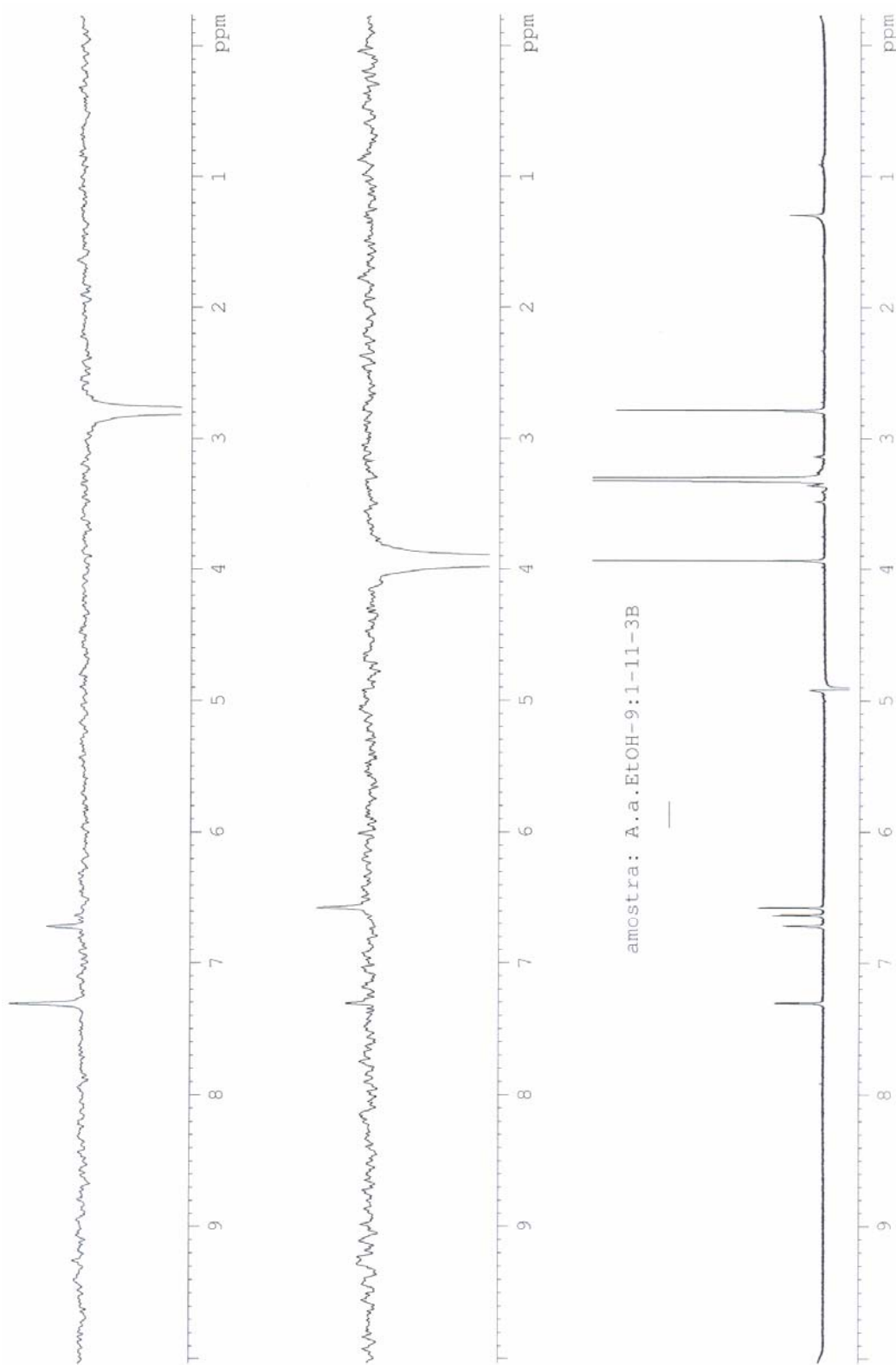
**Figura 32.** Experimento de RMN  $^1\text{H}$  do Alternariol Monometil Éter.



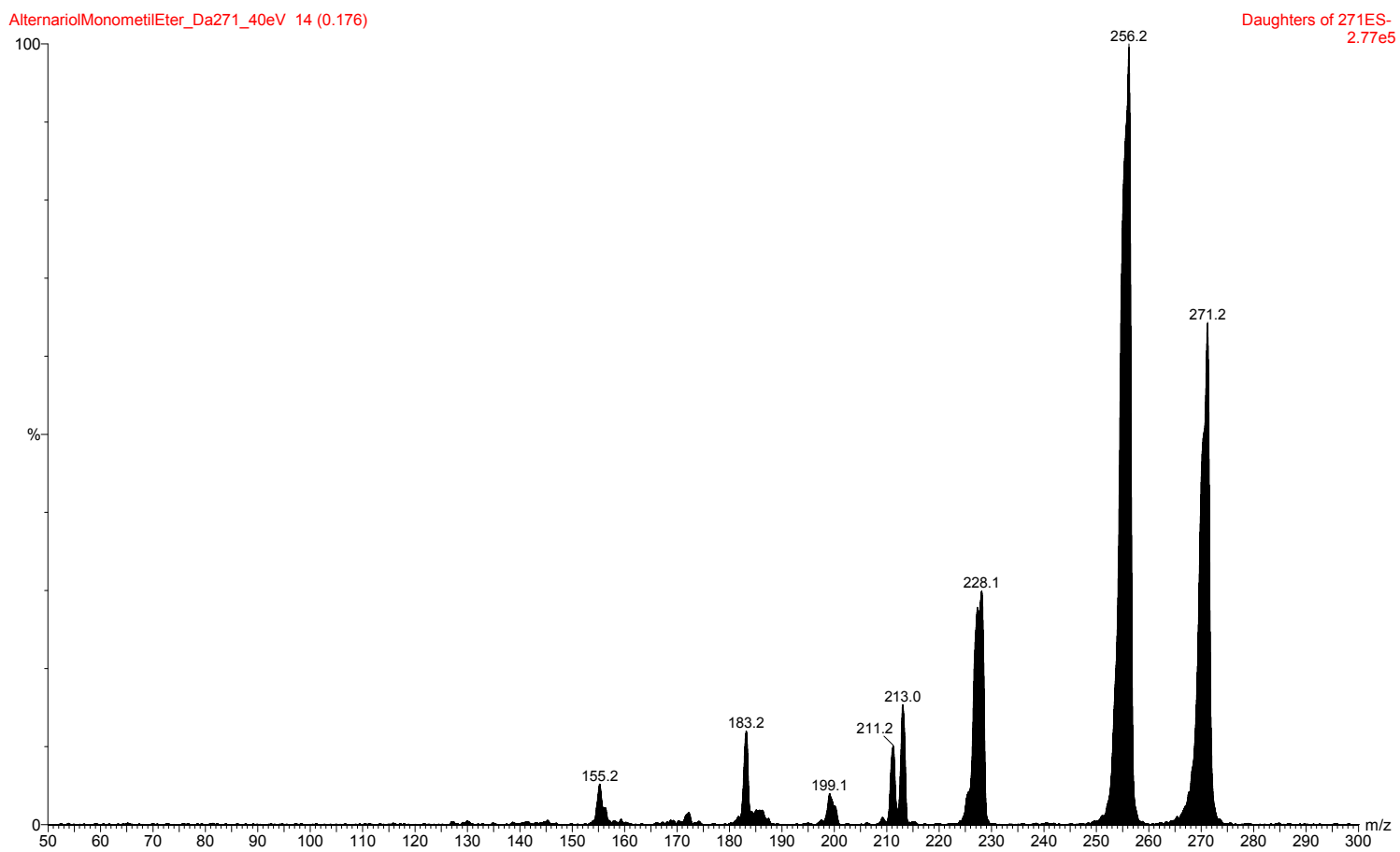
**Figura 33.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Alternariol Monometil Éter na região de 4,0 – 2,5 ppm.



**Figura 34.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Alternariol Monometil Éter na região de 7,4 – 6,0 ppm.



**Figura 35.** Experimento de RMN NOESY do Alternariol Monometil Éter.



**Figura 36.** Espectro de massas  $ES^-$  de íons fragmento com 40 eV do Alternariol Monometil Éter.



## 4.2.2 - Determinação Estrutural da Micotoxina Alternariol

No espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 37, 38 e 39**), foram observados dois dubletos em  $\delta$  6.35 (1 H, *d*, *J* = 2.08Hz) e  $\delta$  7.24 (1 H, *d*, *J* = 2.05Hz), respectivos aos acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos H-4 e H-6. Os demais sinais observados são referentes a impurezas que se referem a substância **AME**, identificada anteriormente.

A estrutura química da micotoxina alternariol pode ser confirmada através das correlações observadas no experimento de HSQC (**Figura 40**), onde houve a correlação dos hidrogênios da metila 7' com o carbono em 37,0 ppm. Foi possível, ainda, relatar os acoplamentos dos quatro dubletos aromáticos, H-4 ( $\delta$  6,35), H-6 ( $\delta$  7,24), H-3' ( $\delta$  6,59) e H-5' ( $\delta$  6,69), com os seus respectivos carbonos aromáticos em 113, 116, 114 e 129 ppm.

A massa molecular do alternariol de 258 u.m.a. pode ser confirmada através do experimento de *Full scan* utilizando ionização *electrospray* no modo negativo, onde relatou-se o íon pseudo molecular de  $[M-H]^- = 257$  (**Figura 41**), e, ainda, através do experimento de íons fragmento (**Figura 42**).

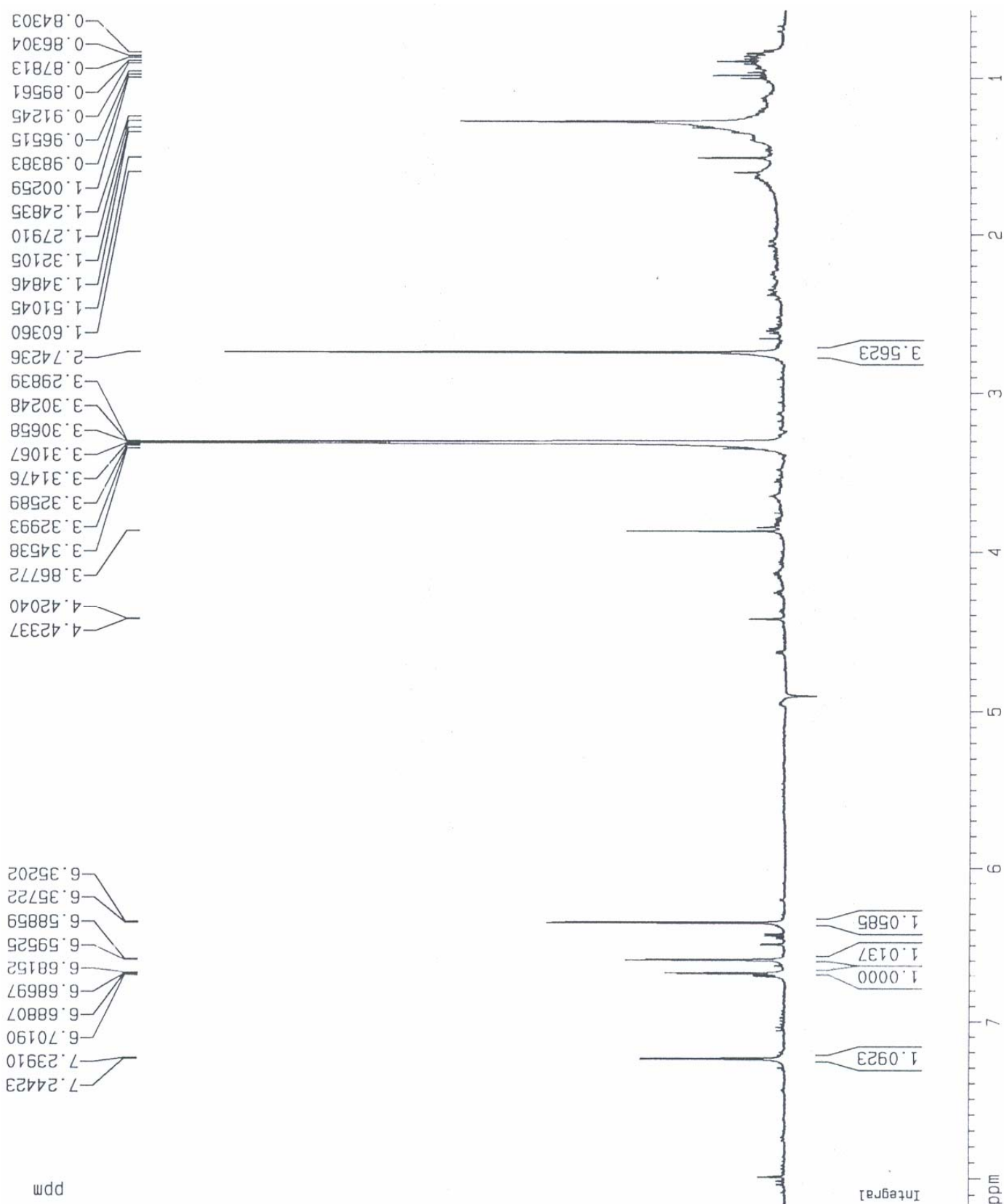
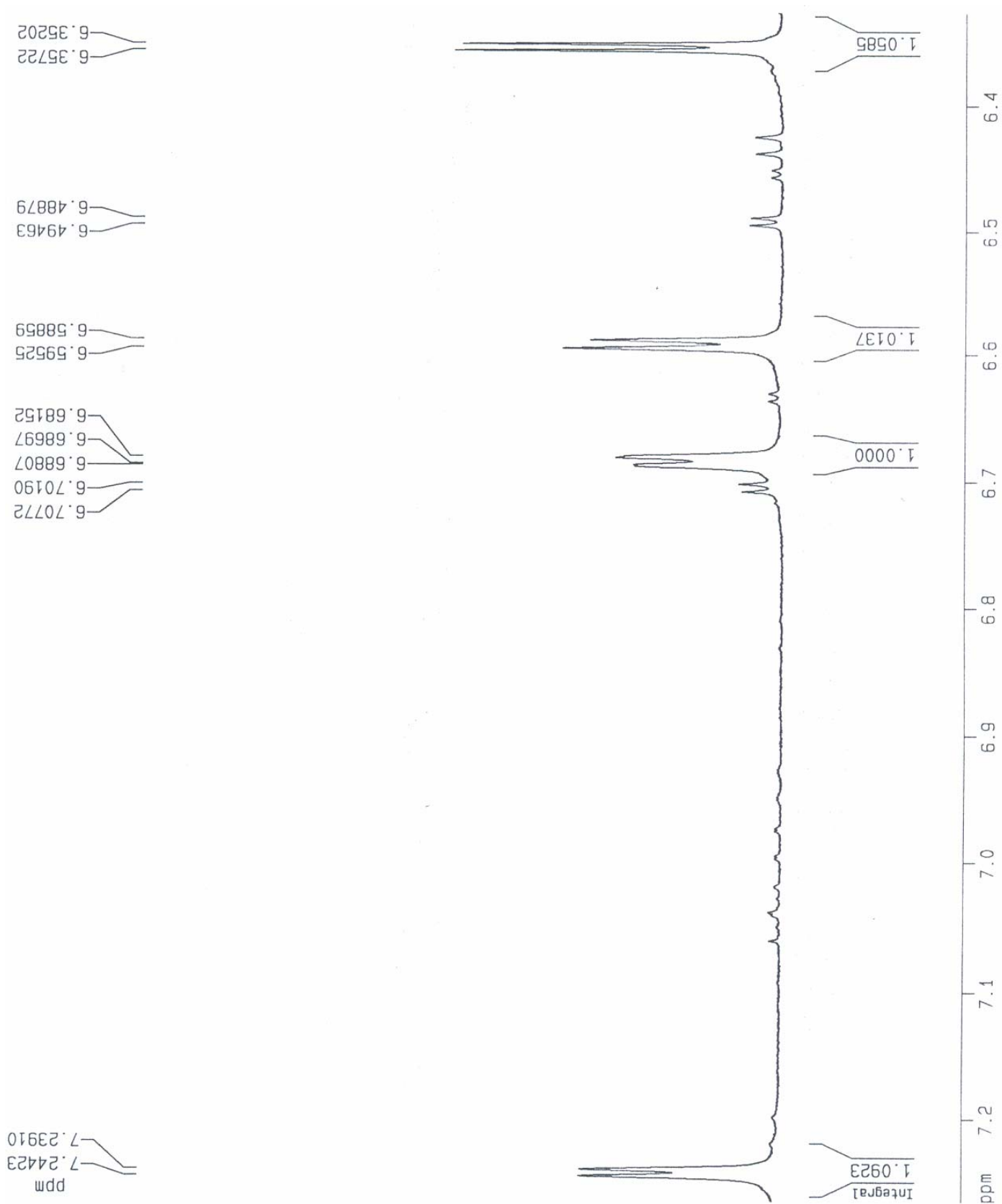
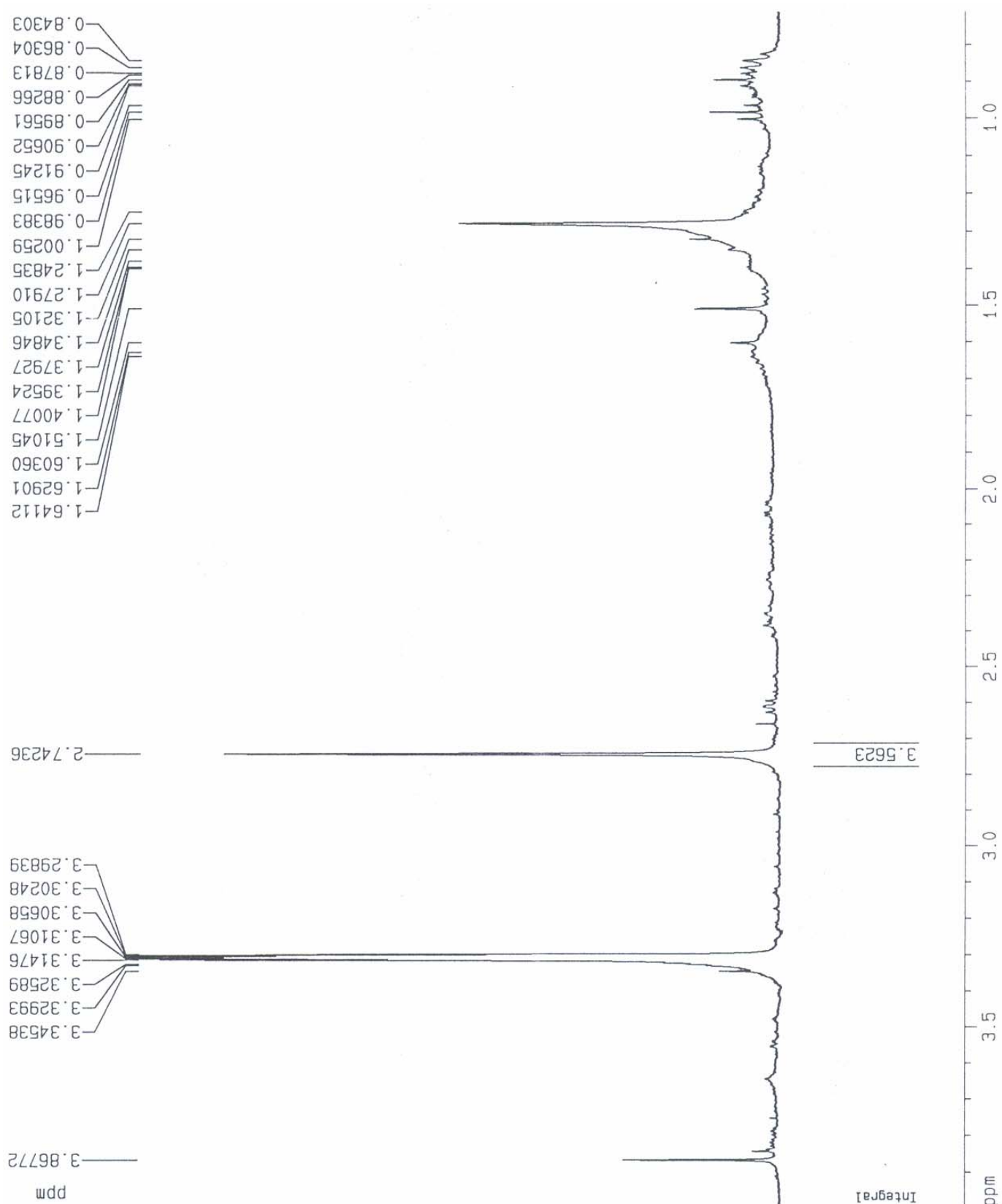


Figura 37. Experimento de RMN  $^1\text{H}$  do Alternariol.



**Figura 38.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Alternariol na região de 7,2 – 6,3 ppm.



**Figura 39.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Alternariol na região de 3,8 – 0,8 ppm.

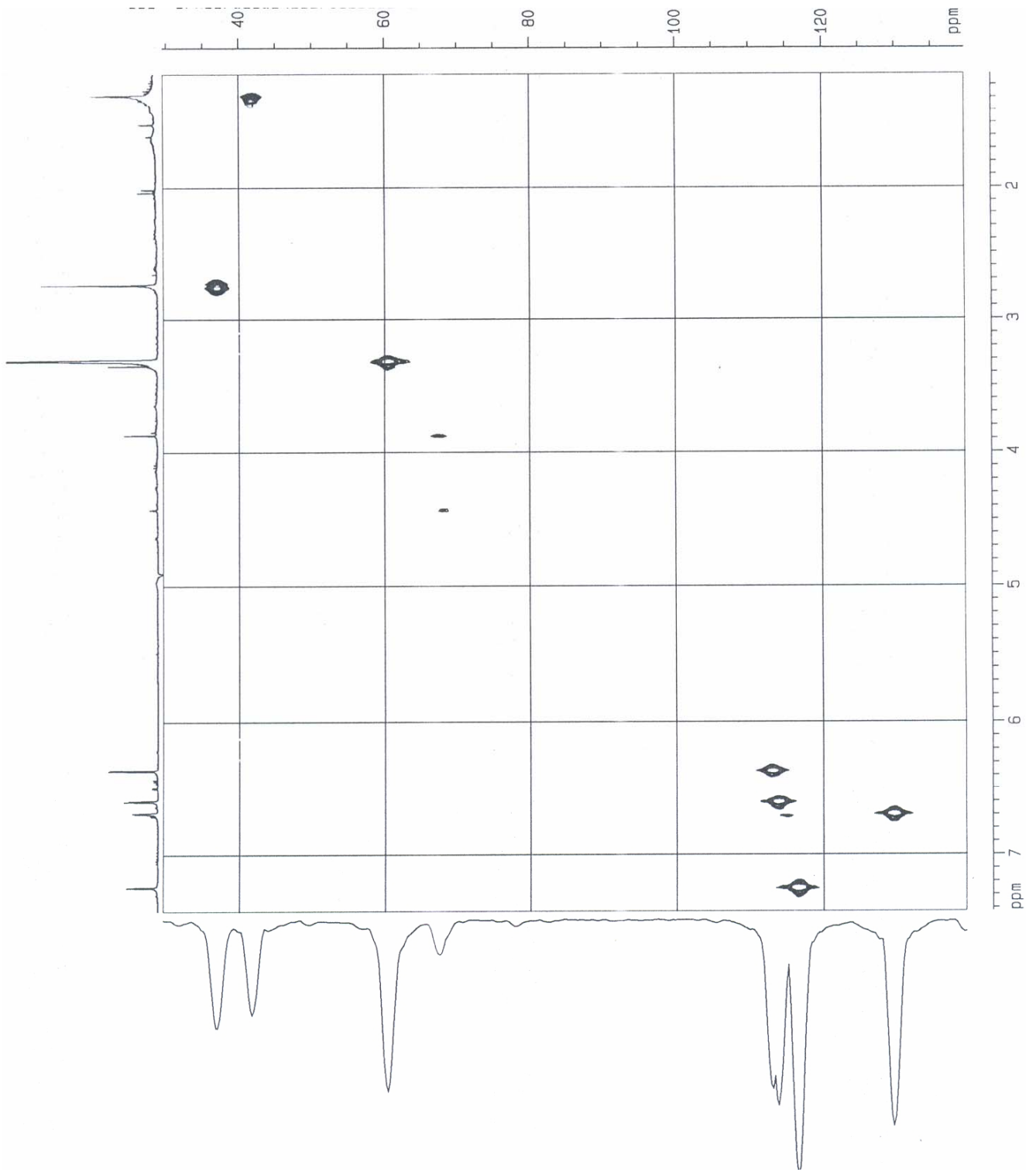
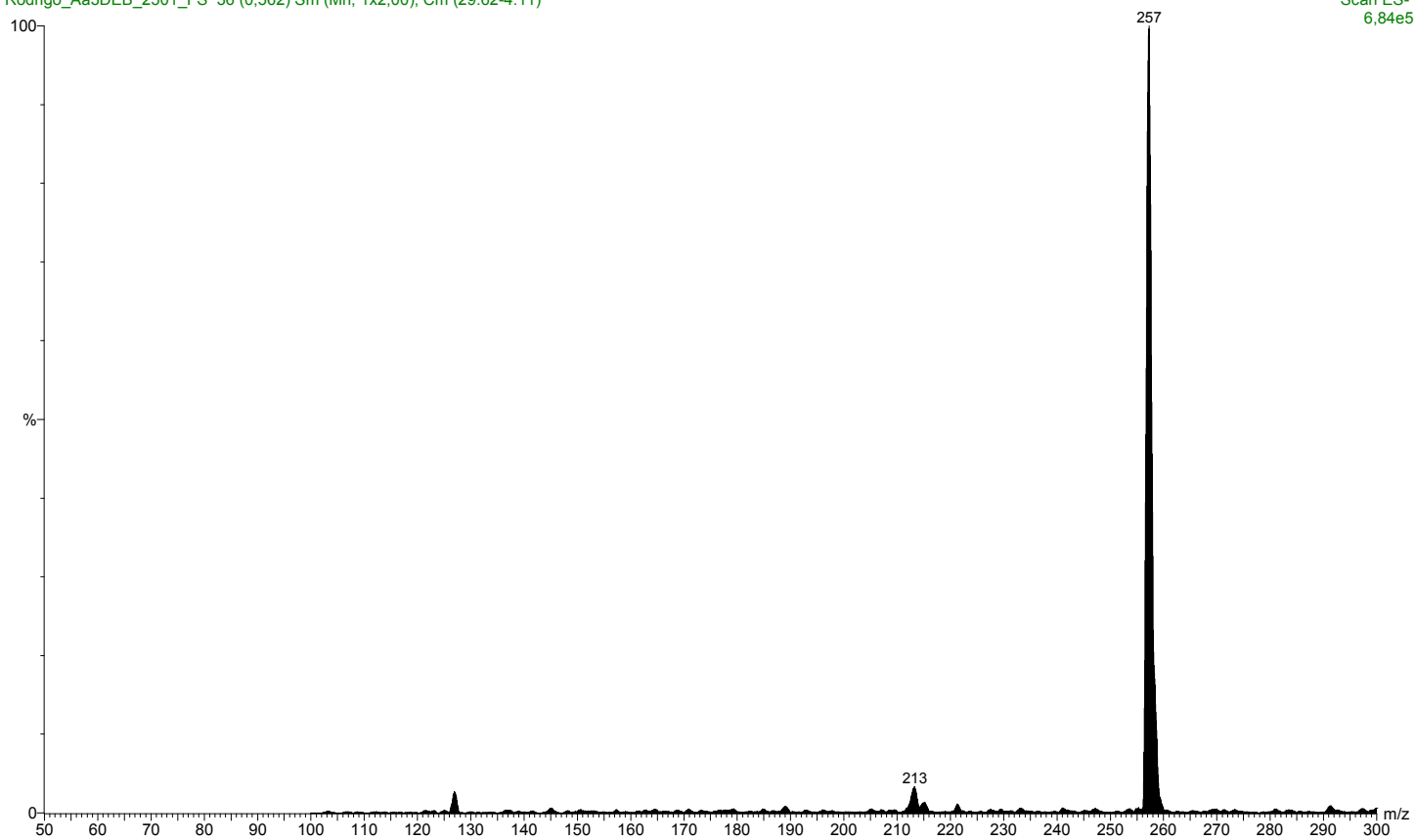


Figura 40. Experimento de HSQC do Alternariol.

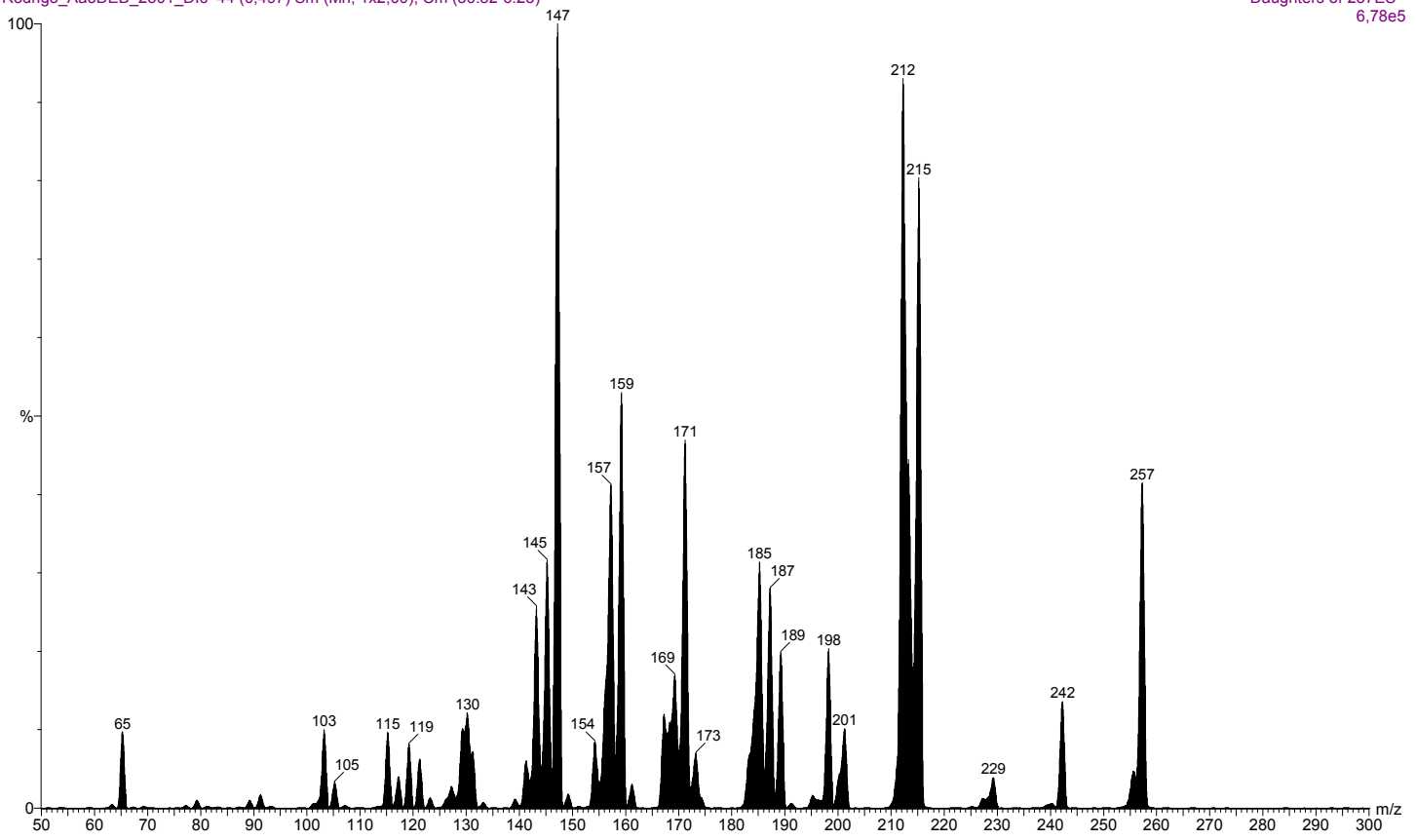
Rodrigo\_Aa3DEB\_2501\_FS 36 (0.562) Sm (Mn, 1x2,00); Cm (29:62-4:11)



**Figura 41.** Espectro de massas FS do Alternariol.

Rodrigo\_Aa3DEB\_2501\_Dlc 44 (0,497) Sm (Mn, 1x2,00); Cm (36:82-6:23)

Daughters of 257ES-  
6,78e5



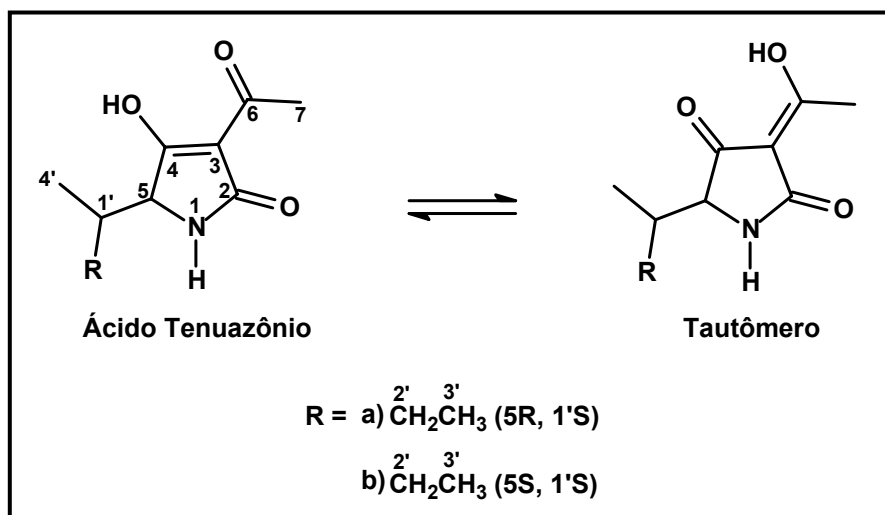
**Figura 42.** Espectro de massas de íons fragmento com 30 eV do Alternariol.

### 4.2.3 - Determinação Estrutural da Molécula Ácido Tenuazônio

Através dos experimentos de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 44** e **45**), RMN-<sup>13</sup>C (**Figura 46**), espectrometria de massas (**Figura 47**) e dos dados da literatura (GALLARDO et. al., 2004) foi possível identificar a molécula ácido tenuazônico (**Figura 43**). No espectro de hidrogênio foram observados dois singletos, um deles na forma de um singlete largo devido ao efeito tautomérico em  $\delta$  3.60 referente ao H-5 e outro em  $\delta$  2.35 referente à metila CH<sub>3</sub>-7. Dois multipletos foram observados, o primeiro multiplete em  $\delta$  1.8 – 1.95 referente ao H-1' ligado ao carbono assimétrico e o outro multiplete em  $\delta$  1.28 – 1.40 referente ao CH<sub>2</sub>-2'. Observou-se, também, a ocorrência de um tripleto em  $\delta$  0.88 (3 H, *t*, *J* = 7.4Hz) para a metila CH<sub>3</sub>-3' e um dubleto em  $\delta$  1,0 (3 H, *d*, *J* = 6.98Hz) para a metila CH<sub>3</sub>-4'. Os dados de RMN-<sup>13</sup>C bem como os dados da literatura que auxiliaram na identificação do ácido tenuazônio estão apresentados na **Tabela 8**.

A massa molecular do ácido tenuazônio de 197 u.m.a. pode ser confirmada através do experimento de espectrometria de massas *full scan electrospray* no modo positivo (**Figura 47**) onde obtivemos uma massa do íon pseudo-molecular [M+H]<sup>+</sup> = 198.4, além de um aduto de acetonitrila [M+ACN+H]<sup>+</sup> = 239.4. O experimento *full scan electrospray* no modo negativo (**Figura 47**) apresentou íon pseudo-molecular [M+H]<sup>-</sup> = 196.4, o que também confirmou a massa molecular do ácido tenuazônio de 197 u.m.a.

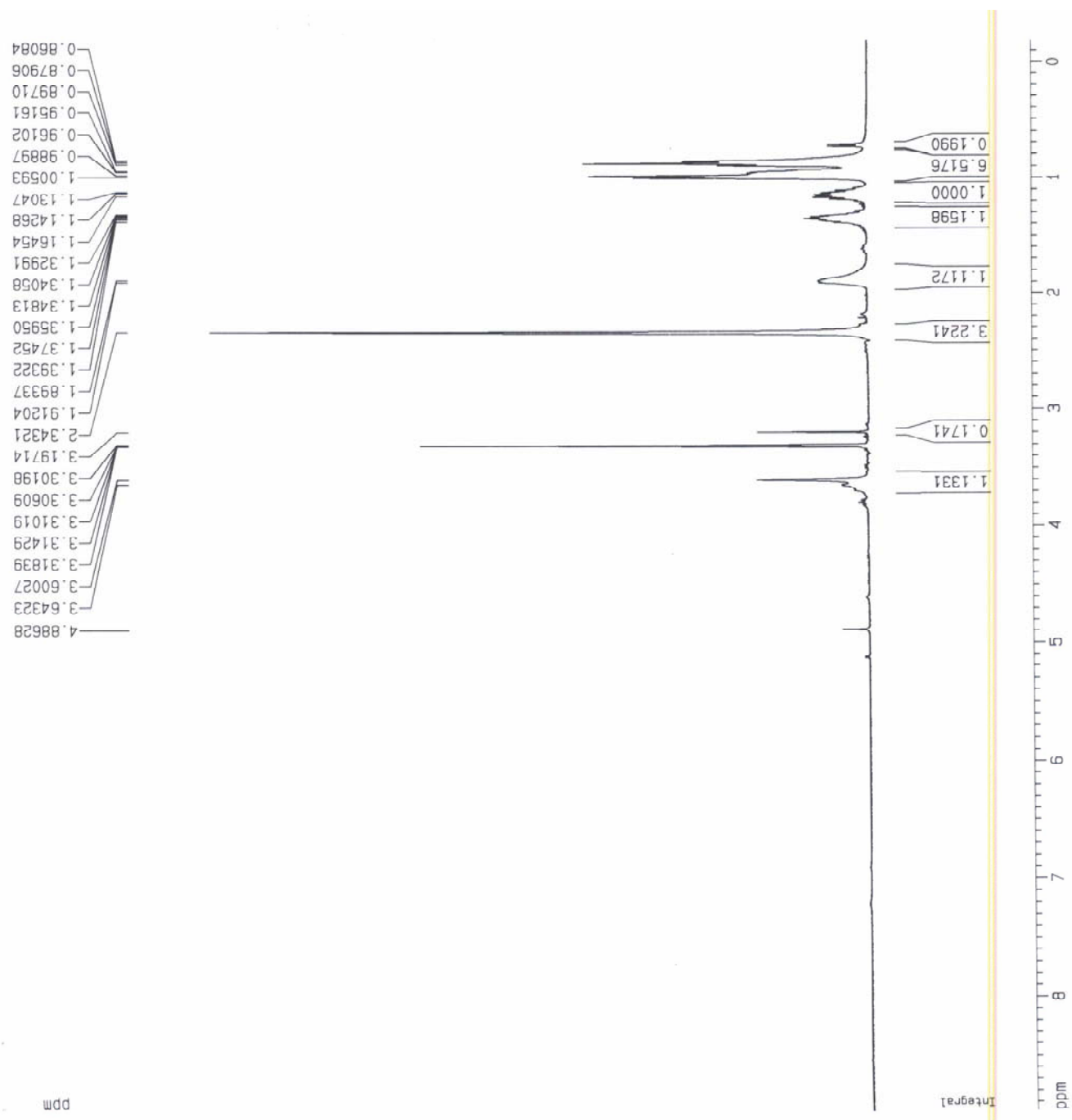




**Figura 43.** Estrutura molecular do ácido tenuazônio.

**Tabela 8.** Dados de RMN utilizados para a determinação estrutural do ácido tenuazônio.

Posição	Ac. Tenuazônio GALLARDO et. al, 2004				Ac. Tenuazônio <i>A. alternata</i>			
	Multi	<sup>a</sup> δ <sup>1</sup> H	<sup>b</sup> δ <sup>1</sup> H	<sup>a</sup> δ <sup>13</sup> C	<sup>b</sup> δ <sup>13</sup> C	Mult	δ <sup>1</sup> H	<sup>a</sup> δ <sup>13</sup> C
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	176,1	175.8	-	-	179.0
3	-	-	-	104.0	104.0	-	-	104.0
4	-	-	-	199.9	198.7	-	-	198.9
5	<i>d</i>	3.91 ( <i>J</i> 2.9)	3.84 ( <i>J</i> 3.3)	66.3	67.4	<i>s</i> largo	3.60	67.03
6	-	-	-	187.8	187.8	-	-	195.1
7	<i>s</i>	2.41	2.42	20.4	20.7	<i>s</i>	2.35	24.3
1'	<i>m</i>	1.92	1.90	38.0	38.4	<i>m</i>	1.8-1.95	38.3
2'	<i>m</i>	1.28	1.19-1.43	27.6	24.8	<i>m</i>	1.28-1.40	27.1
3'	<sup>a</sup> <i>t/d</i> <sup>b</sup>	0.96 ( <i>J</i> 7.3)	0.99 ( <i>J</i> 7.3)	12.1	12.2	<i>t</i>	0.88 ( <i>J</i> 7.4)	12.5
4'	<sup>a</sup> <i>d/t</i> <sup>b</sup>	0.76 ( <i>J</i> 6.6)	0.90 ( <i>J</i> 7.3)	13.3	15.9	<i>d</i>	1.0 ( <i>J</i> 6.98)	16.7



**Figura 44.** Experimento de RMN  $^1\text{H}$  do Ácido Tenuazônio.

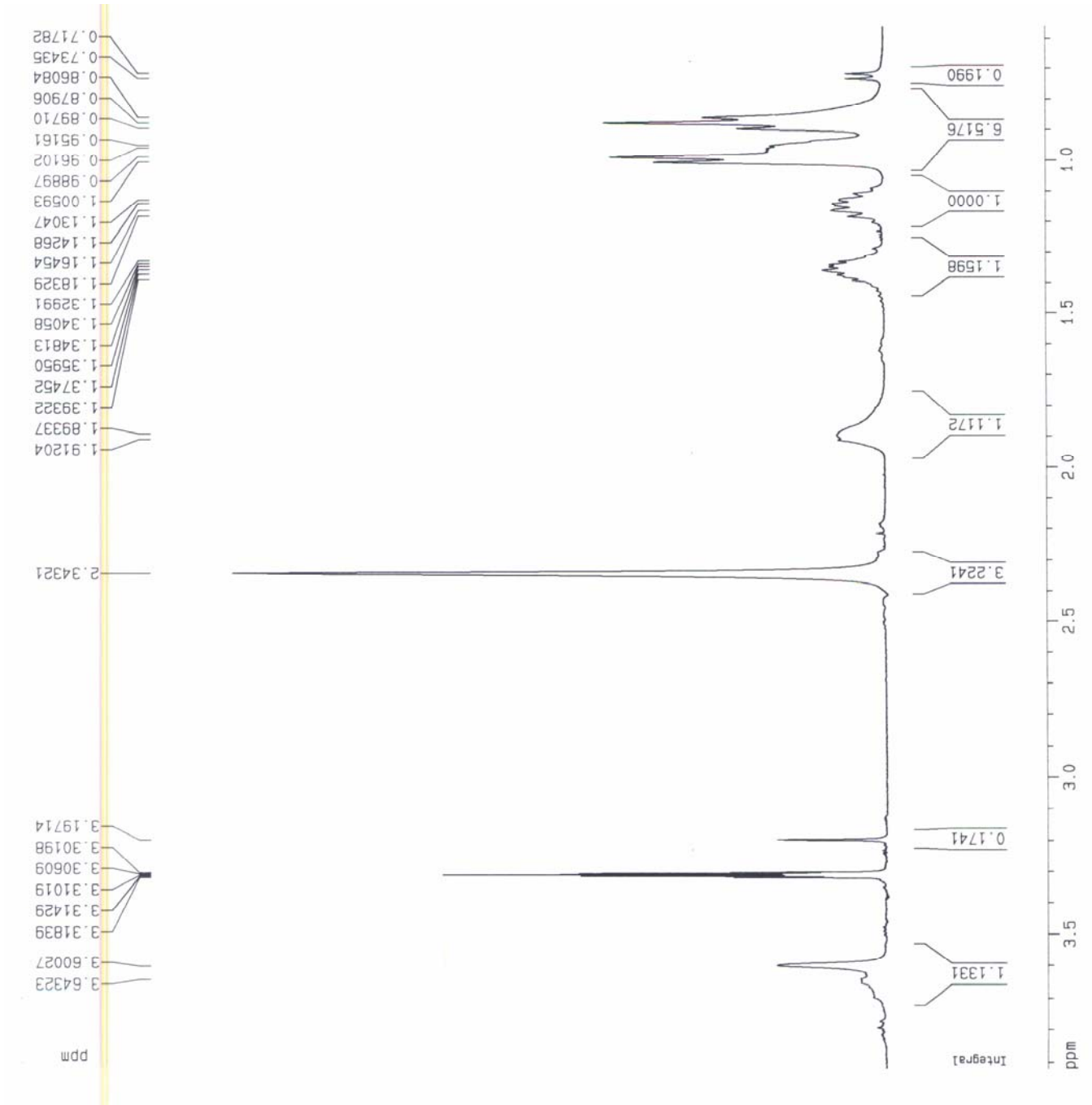
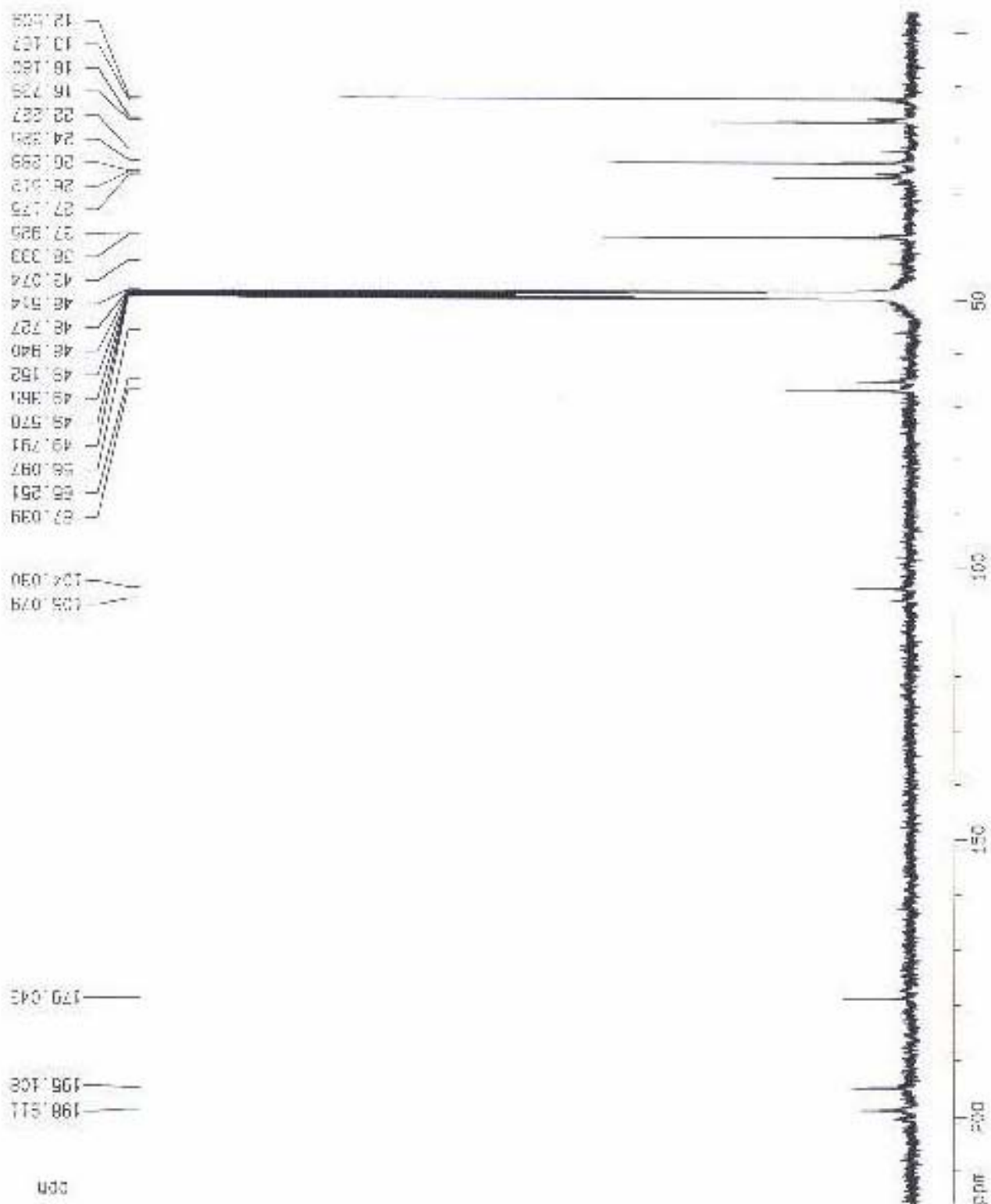
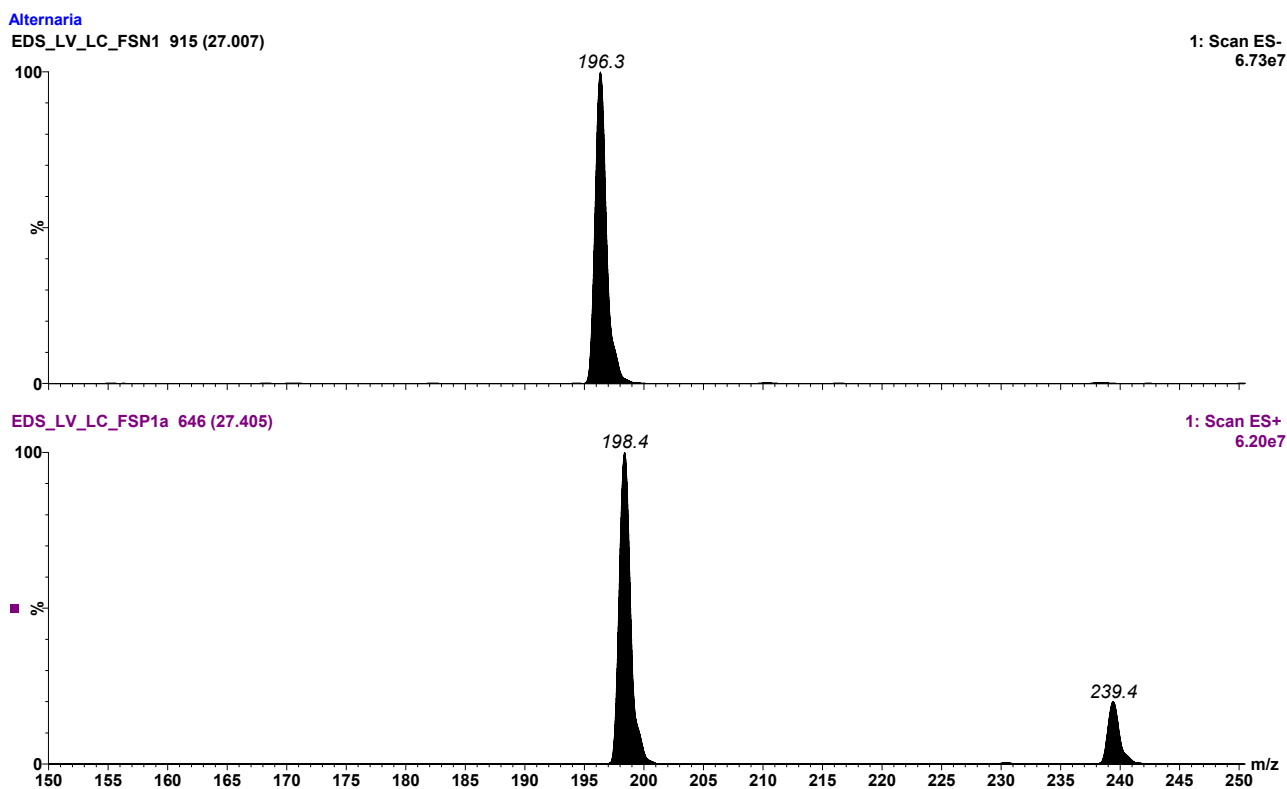


Figura 45. Experimento de RMN <sup>1</sup>H do Ácido Tenuazônio.



**Figura 46.** Experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  do Ácido Tenuazônio.

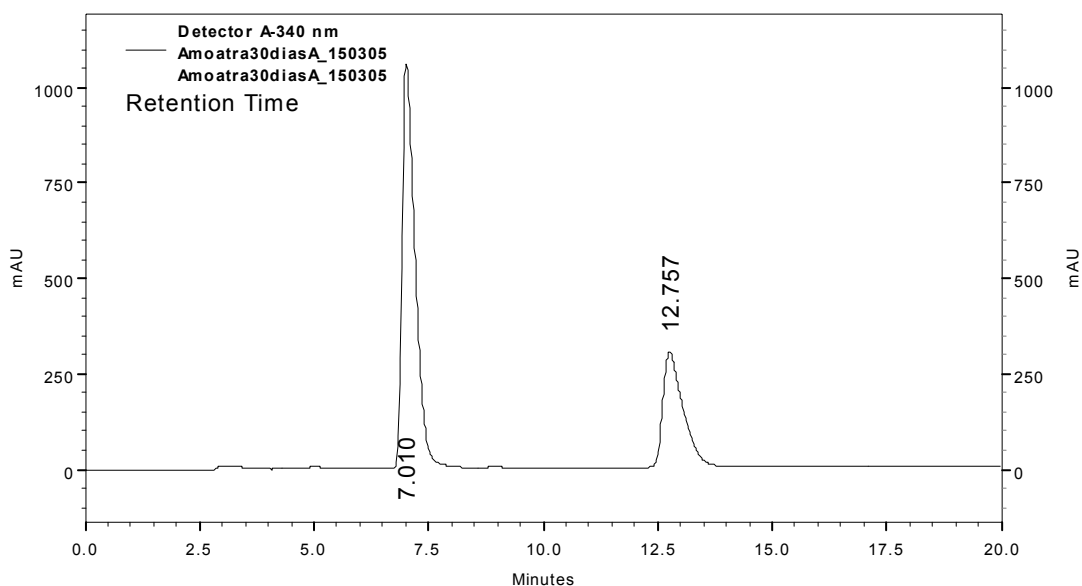


**Figura 47.** Experimento de espectrometria de massas *full scan electrospray* no modo positivo e no modo negativo do Ácido Tenuazônio.

### **4.3 – Construção da Curva de Produção das Micotoxinas AOH e AME Pelo Microrganismo *Alternaria alternata* Cultivado em Milho**

#### **4.3.1 - Resultados Obtidos Para a Metodologia de Extração e Análise das Micotoxinas AOH e AME de *A. alternata* por HPLC-UV**

Na segunda etapa deste trabalho, as duas micotoxinas, **AOH** e **AME**, purificadas e identificadas anteriormente, foram utilizadas na construção das curvas de calibração para serem utilizadas na estimativa da produção destas moléculas ao longo de 30 dias de cultivo de *A. alternaria in vitro*. Utilizando as condições cromatográficas descritas no tópico **3.4.5.2 (Página 44)** foi possível obter uma boa extração e uma boa resolução cromatográfica para as micotoxinas provenientes do metabolismo de *A. alternata* cultivado em milho. O cromatograma representado no **Cromatograma 6** apresenta duas bandas intensas, uma em 12,7 min., referente ao composto **AME**, e outra em 7,01 min., relativa ao composto **AOH**, presentes no extrato realizado com 30 dias de cultivo. O tempo de retenção desses metabólitos foi confirmado com a injeção das soluções dos padrões dos mesmos.



**Cromatograma 6.** Cromatograma obtido da análise do extrato realizado com 30 dias de cultivo.

#### 4.3.2 - Resultados Obtidos Na Construção das Curvas de Calibração dos Metabólitos Secundários de *A. alternata* por HPLC-UV

Utilizando as mesmas condições cromatográficas aplicadas para a análise dos extratos (3.4.5.2, **Página 44**), foram construídas curvas de calibração, para os metabólitos isolados e identificados, em função da área das bandas cromatográficas relativas às suas concentrações. Para o metabólito **AME** foram utilizadas às seguintes concentrações: 1000, 500, 250, 125, 60, 30; 16; 8; 4 e 2  $\mu\text{g/mL}$ . Foi obtido, para essa curva de calibração um coeficiente de linearidade de 0,998. Para o segundo metabólito **AOH** foram utilizadas às seguintes concentrações: 5000, 2500, 1250, 625, 320, 160, 80, 40, 20 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Para essa curva de calibração obteve-se um coeficiente de linearidade de 0,999.

### 4.3.3 - Curvas de Produção dos Metabólitos Secundários de *A. alternata* por HPLC-UV

A partir da construção das curvas de calibração e constatação da linearidade das mesmas, foi possível realizar as estimativas da quantidade dos dois metabólitos em questão. Essas quantificações foram realizadas injetando-se 10,0  $\mu$ L de cada extração, realizadas em triplicata para cada intervalo de 5 à 30 dias, e substituindo os valores relativos às áreas das bandas cromatográficas na variável X das equações das retas obtidas para as curvas de calibração. Foram aplicadas ainda as conversões de unidades convenientes para que as concentrações fossem apresentadas em mg/kg de meio de cultivo. Os valores das médias das áreas e as concentrações dos metabólitos estão representados na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Representação das médias das áreas obtidas e estimativa das concentrações das micotoxinas avaliadas durante os dias de cultivo.

Tempos de Cultivo (dias)	AME		AOH	
	Áreas (340 nm)	Concentrações (mg/kg)	Áreas (340 nm)	Concentrações (mg/kg)
5	1511472	324	1929453	516
10	2518829	546	2250067	666
15	3170917	708	4915089	1908
20	3480925	750	9742287	4152
30	6840678	1500	14137266	6198

Após a obtenção das concentrações das substâncias avaliadas ao longo do tempo, foi possível obter o perfil das curvas de produção dos metabólitos de *A. alternata* durante esses períodos. Plotando os dados de concentração das substâncias com os seus respectivos dias de cultivo foram obtidas as curvas de produção dos metabólitos **AME (Figura 46)** e **AOH (Figura 47)**.



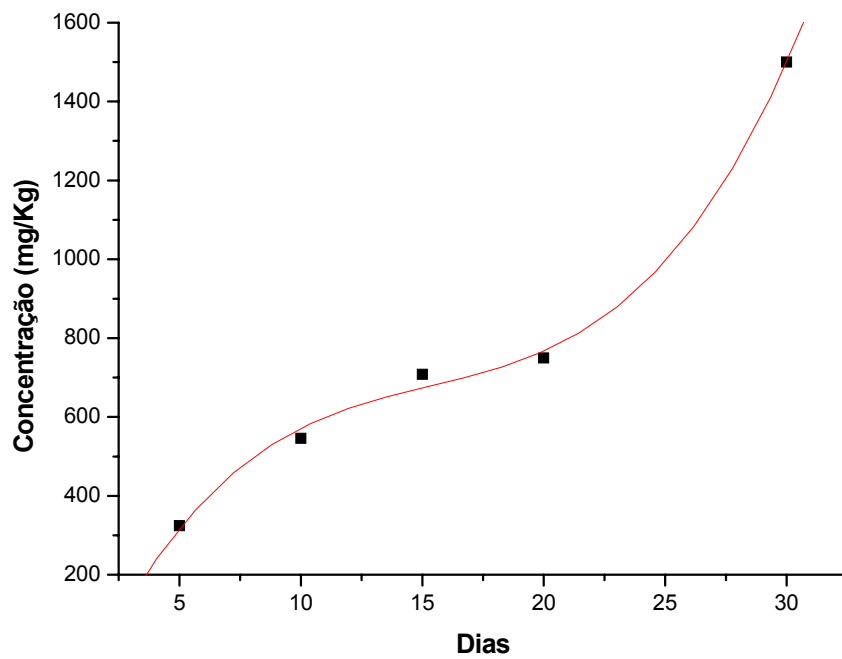


Figura 48. Curva de produção do metabólito **AME**.

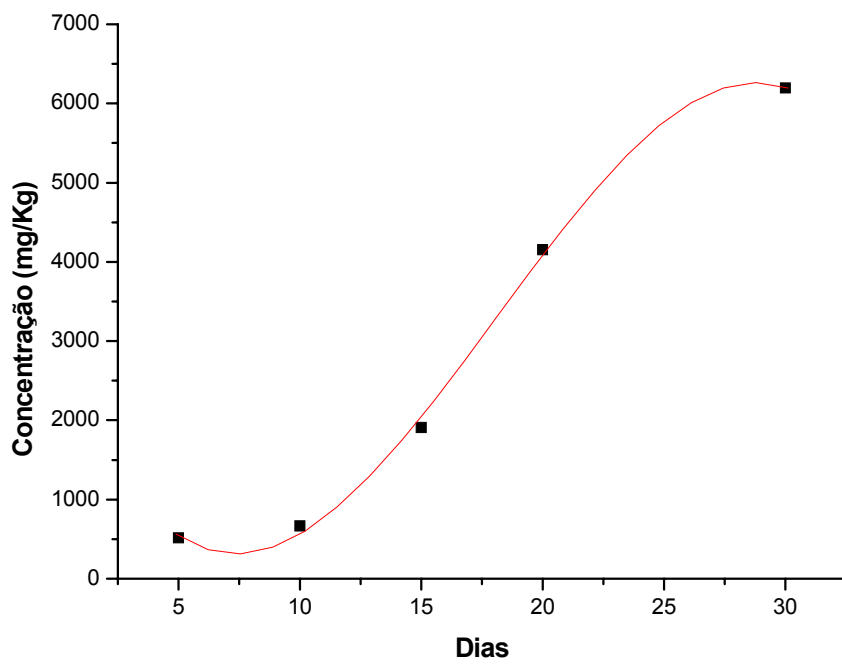


Figura 49. Curva de produção do metabólito **AOH**.

Analisando a curva de produção do metabólito **AME** foi possível observar um acréscimo na produção dessa substância até o 15º dia de cultivo, apresentando, em seguida, uma fase praticamente estacionária até o 20º dia. Um salto na produção foi observado do 20º até o 30º dia atingindo a produção de 1500 mg/kg. Para a curva de produção do metabólito **AOH**, observou-se a fase Lag durante os 10 primeiros dias com acréscimo de apenas 150 mg/kg (de 516 para 666 mg/kg), a partir do 10º dia observou-se a fase Log na produção do metabólito até atingir uma suposta fase estacionária no 30º dia com um máximo de produção de 6198 mg/kg. Praticamente 4 vezes superior a produção de **AME**. Confrontando os dados das duas curvas entre os períodos do 10º dia até o 20º dia pode-se observar que a produção do metabólito **AME** foi lenta, praticamente estacionária, enquanto o metabólito, **AOH**, foi produzido rapidamente, representando a fase Log do metabolismo. Esses fatos indicam a possibilidade de disputas pelos mesmos precursores durante o metabolismo do microrganismo ou pelas mesmas enzimas durante o processo de síntese dos metabólitos durante esse período.

## 4.4 - Quantificação de Alternariol e Alternariol Monometil Éter No Flavedo e No Albedo de Tangerinas (*Citrus reticulata*) Com Sintomas de Mancha Marrom de Alternaria

Todos os dados referentes a este item estão apresentados no trabalho publicado de MAGNANI et. al. 2007.

### 4.4.1 – Desenvolvimento do Método e Especificidade

Durante o estabelecimento das condições analíticas diferentes solventes foram testados para a etapa de extração dos analitos, assim como cartuchos de SPE contendo ODS como fase estacionária para a etapa de pré-tratamento das amostras. Dessa forma, os melhores resultados foram obtidos utilizando tanto extração com solvente quanto extração em fase sólida para clean-up das amostras.

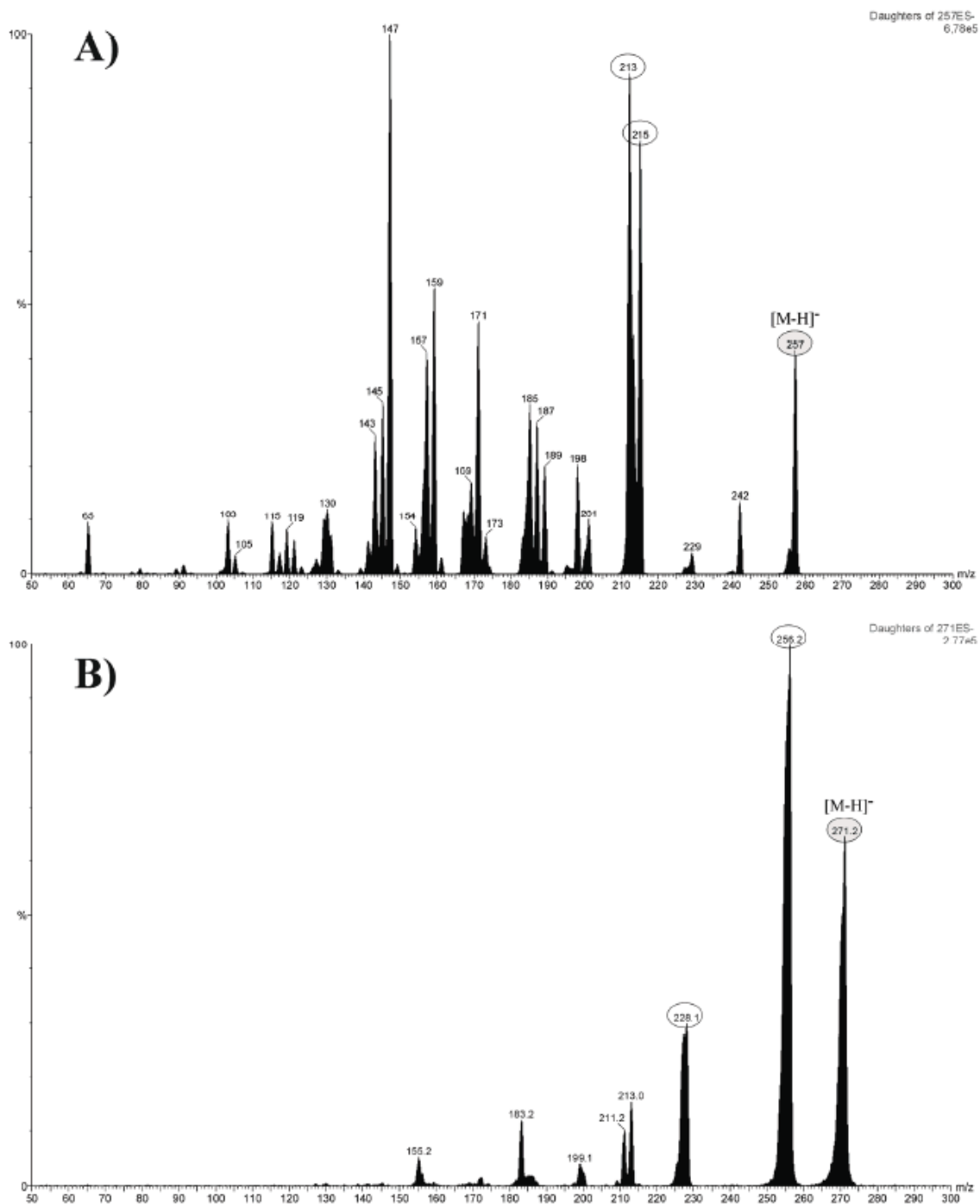
Para obter bons resultados de separação e detecção dos alternariois, a otimização das etapas envolvendo a análise desses compostos no HPLC-MS/MS foram importantes. Assim, a definição da fase móvel a ser usada durante este estudo envolveu diferentes composições de solventes orgânicos e aditivos. Os aditivos testados compunham de ácido fórmico, acetato de amônio e formato de amônio. Os melhores resultados foram alcançados utilizando metanol : água (4:1) sem a adição de qualquer aditivo. Esta fase móvel promoveu uma excelente separação entre **AOH** e **AME** além de promover boa ionização na fonte de ES.

As transições definidas para o experimento de SRM foram baseadas na estabilidade dos íons fragmentos obtidos durante os experimentos de CID-MS/MS e também baseados nos interferentes que compunham a matriz (albedo e flavedo). O espectro dos íons fragmento dos compostos **AOH** e **AME** apresentam as moléculas desprotonadas ( $[M-H]^-$ ) como  $m/z$  257 e  $m/z$  271, respectivamente. Devido à ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila ligado no C-3 e o grupo

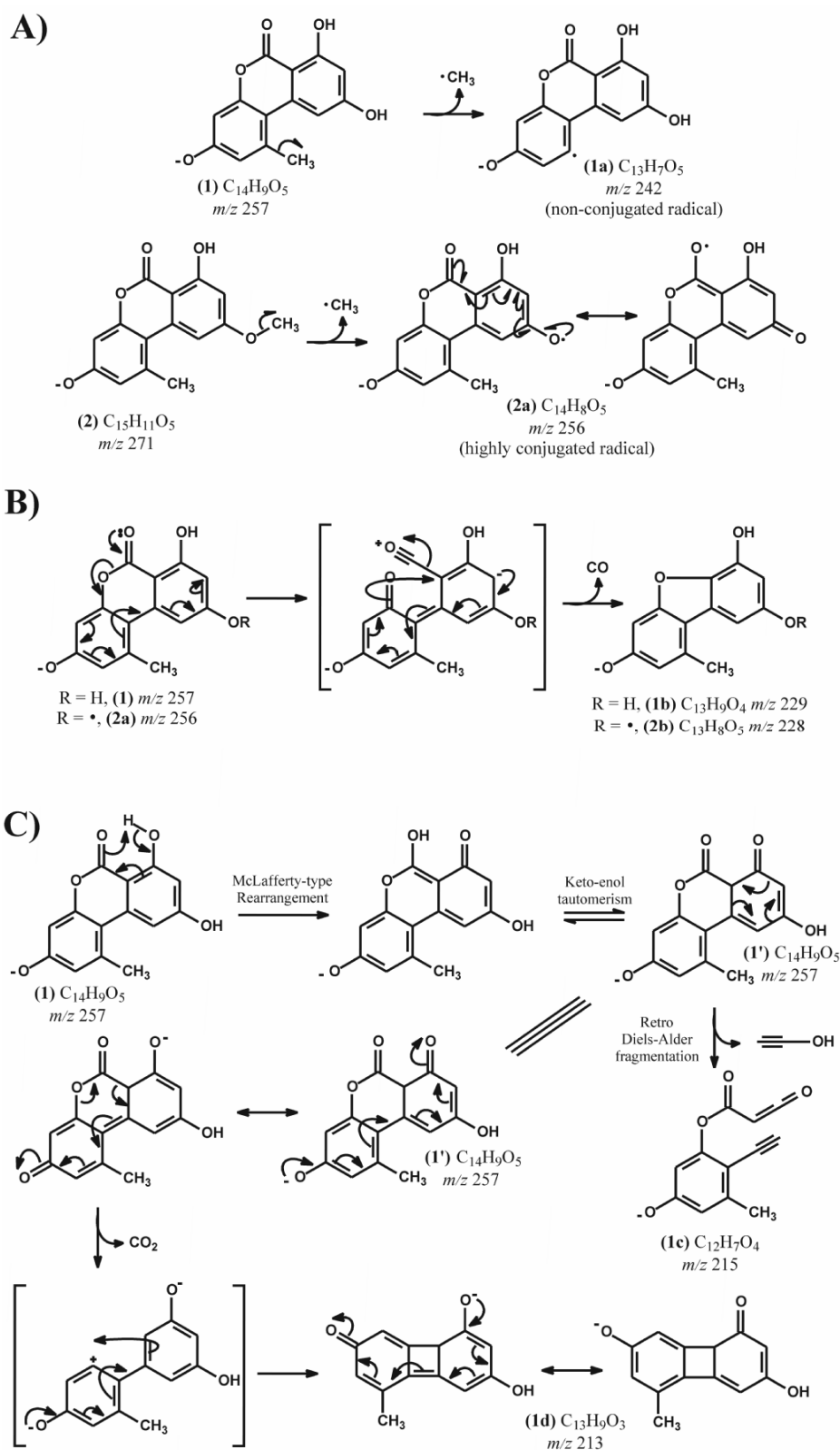
carboxila da lactona, o composto **AOH** possui dois sítios possíveis de desprotonação localizados nas hidroxilas ligadas ao C-5 e ao C-4', enquanto que o **AME** possui apenas um grupo hidroxila no C-4'. Dessa maneira, a fragmentação tanto do **AOH** quanto do **AME** sugerem a ionização no grupo hidroxila ligado ao C-4'.

A análise do espectro apresentado na **Figura 50** revelou tanto para o **AOH** quanto para o **AME** a perda da metila na forma de um radical livre (15 Da). A principal diferença se revelou na intensidade dos sinais obtidos quando se referiam à perda deste radical:  $m/z$  242 (**Figura 51 1a**) apresentou uma baixa intensidade no espectro do **AOH** (**Figura 50 A**) enquanto que  $m/z$  256 (**Figura 51 2a**) apresentou uma alta intensidade no espectro de **AME** (**Figura 50 B**). De acordo com a proposta de fragmentação (**Figura 51**), isto ocorre porque  $m/z$  256 (**Figura 51 2a**) é um produto da clivagem homolítica da ligação carbono-oxigênio no grupo metoxila do **AME**, gerando um radical livre não conjugado.

Outra fragmentação observada para ambos compostos foi a perda de CO molecular (28 Da). Esta perda pode ocorrer através da abertura do anel lactônico seguido da formação de um anel de cinco membros com a remoção do CO (**Figura 51**). Outra vez, esta fragmentação é mais favorável para o **AME** do que para o **AOH**, gerando  $m/z$  228 (**Figura 51 2b**) com maior intensidade do que  $m/z$  229 (**Figura 51 1b**) (**Figura 50 2A e 2B**). Porém, o mecanismo de fragmentação que levou aos fragmentos  $m/z$  215 (**Figura 51 1c**) e  $m/z$  213 (**Figura 51 1d**) para o composto **AOH** não são os mesmos que ocorreram para o composto **AME**. A formação destes fragmentos sugerem um rearranjo do tipo McLafferty na carboxila para **AOH** seguido de um tautomerismo ceto-enólico formando o íon  $1'$ . Assim, uma Retro Diels-Alder no anel A levaria ao íon  $m/z$  215 (11C, [M-H-42]<sup>-</sup>) ou a uma descarboxilação em  $1'$  levaria ao íon  $m/z$  213 (**Figura 51 1d**, [M-H-44]<sup>-</sup>).



**Figura 50.** Espectro de íons fragmento (segunda geração) obtido por CID-MS/MS; **A)** alternariol (25 eV); **B)** alternariol monometil éter (35 eV). Os íons marcados representam as transições escolhidas para o experimento de SRM (● → ○).



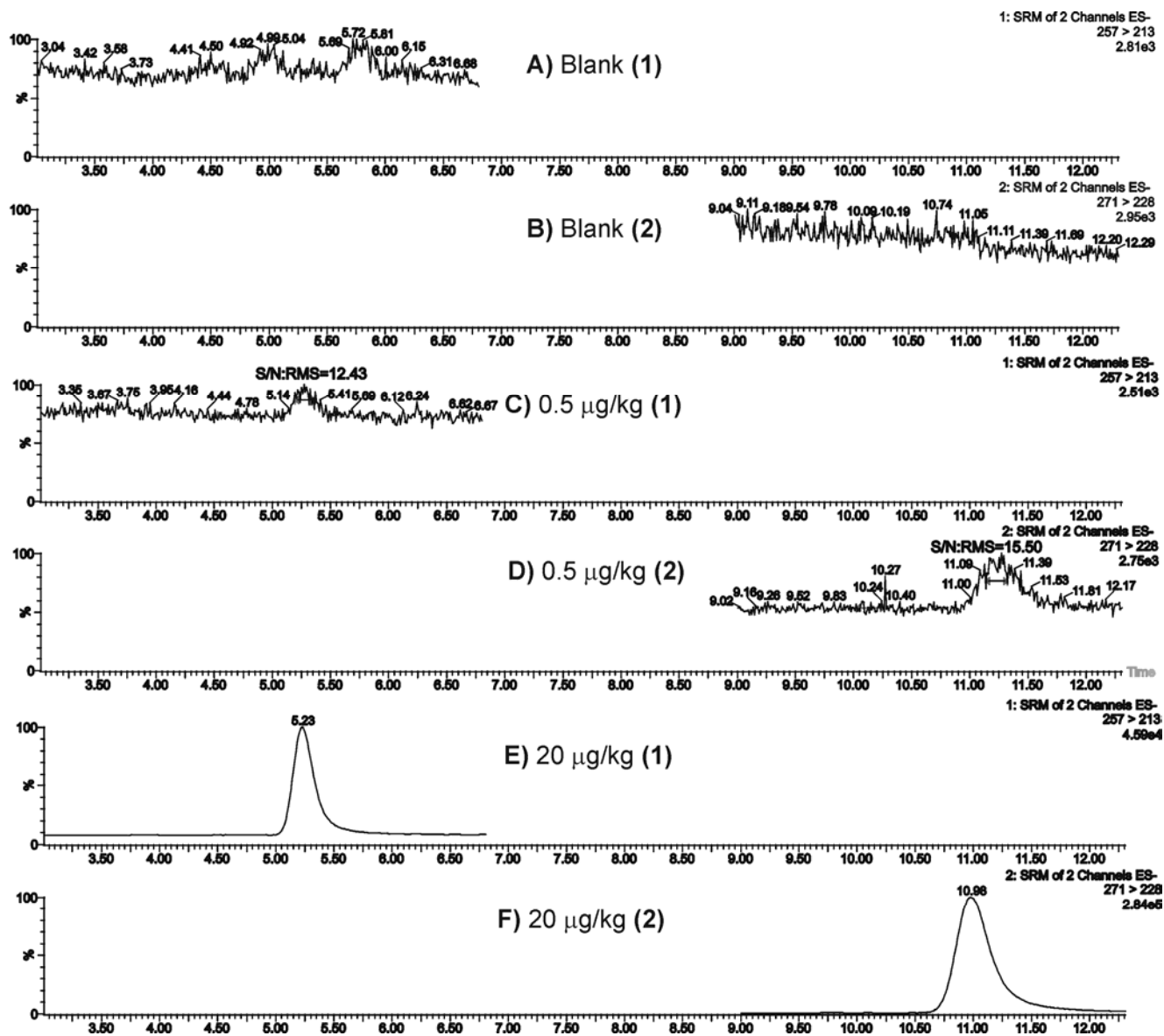
**Figura 51.** Propostas de fragmentação dos alternarióis; A) Perda do grupo metila (15 Da) na forma de radical; B) Perda de uma molécula de CO (28 Da); C) Formação dos íons fragmento  $m/z$  215 e  $m/z$  213 para o alternariol. Esta fragmentação aparentemente não é observada para o alternariol monometil éter.

Dessa forma, as propostas de fragmentação serviram de critério para a escolha das transições iônicas para o desenvolvimento e aplicação do método utilizado para a quantificação do **AOH** e **AME** em cascas de tangerinas. Estas transições demonstraram ser de excelente especificidade para o método, e uma evidência disto são os cromatogramas obtidos através do experimento de SRM para as matrizes albedo e flavedo de tangerinas (**Figura 52**). Outras transições foram também testadas, porém estas não foram escolhidas por demonstrarem não serem seletivas ou de baixa sensibilidade durante os experimentos.

Além da escolha das transições mais seletivas, outros parâmetros como o dwell-time e inter-scan delay foram também otimizados para a obtenção de uma excelente relação sinal-ruído (S/R). O dwell-time representa o tempo de análise gasto durante uma determinada transição no experimento de SRM. E o inter-scan delay representa um determinado parâmetro aplicado ao quadrupolo do espectrômetro de massas que define o tempo em que um scan termina e o próximo começa (KORYTÁR et. al., 2005). Durante as otimizações do método, nenhum incremento na relação S/R foi observada para **AOH** e **AME** quando os valores do dwell-time e o inter-scan foram avaliados acima de 0,3 e 0,01, respectivamente.

#### **4.4.2 - Sensibilidade, Linearidade, Precisão e Exatidão do Método**

Durante a otimização destes parâmetros foi possível atingir limites realmente muito baixos. Os limites de quantificação ficaram estabelecidos abaixo de 0.5 µg/kg e os limites de detecção ficaram estabelecidos abaixo de 0.13 µg/kg para ambos os alternários (**Figura 52 e Tabela 10**). Estes valores expressaram a habilidade deste método de detectar e quantificar os alternários em cascas de tangerina ao nível de ppt. Este nível de sensibilidade demonstra que este método representa uma boa ferramenta para ser utilizada no controle de qualidade destas micotoxinas em alimentos.



**Figura 52.** Cromatogramas dos experimentos de SRM obtidos durante a quantificação no flavedo por HPLC-MS/MS: **A)** e **B)** Ausentes de micotoxinas (branco); **C)** e **D)** Concentrações próximas ao limite de quantificação; **E)** e **F)** Maior concentração da curva analítica. Os números **1** e **2** referem-se ao alternariol e alternariol monometil éter respectivamente.



**Tabela 10.** Resultados referentes a linearidade, limites de quantificação e detecção propostos para o método (os valores estão representados como a média  $\pm$  DPR, n = 3).

Micotoxina	Limites de quantificação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Limites de detecção ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Slope (a)	Intercept (b)	Coefficiente de determinação ( $r^2$ )
Flavado					
Alternariol	0.40 $\pm$ 4.0	0.12 $\pm$ 12.6	243.97 $\pm$ 4.9	7.27 $\pm$ 20.9	0.998 $\pm$ 0.0
Alternariol monometil éter	0.32 $\pm$ 7.4	0.10 $\pm$ 11.0	2938.63 $\pm$ 1.6	681.50 $\pm$ 13.7	0.997 $\pm$ 0.2
Albedo					
Alternariol	0.42 $\pm$ 5.7	0.13 $\pm$ 14.1	266.71 $\pm$ 1.4	-6.54 $\pm$ 14.6	0.998 $\pm$ 0.0
Alternariol monometil éter	0.41 $\pm$ 6.6	0.12 $\pm$ 11.0	3032.83 $\pm$ 0.8	678.53 $\pm$ 9.6	0.998 $\pm$ 0.0

As curvas de calibração para **AOH** e **AME** foram realizadas fortificando o branco com as micotoxinas. Eram considerados brancos as amostras de albedo e de flavado previamente analisadas e comprovada a total ausência das micotoxinas em questão. O método apresentou uma excelente linearidade para o intervalo dinâmico da curva de calibração de 0.5 – 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . A linearidade da curva de calibração foi expressa através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) onde foi obtido um valor acima de 0.997 para todas as curvas. Um sumário do experimento de linearidade do método está apresentado na **Tabela 10**.

A precisão foi avaliada através de cinco determinações para cada concentração durante o experimento de intra-dia (repetibilidade) e através de quatro determinações para o experimento de inter-dia (precisão intermediária). Para este último, replicatas de quatro amostras para cada ponto foram realizadas durante três dias não consecutivos com um intervalo de uma semana entre cada dia. Como apresentado na **Tabela 11** e **12**, o desvio padrão relativo (DPR) dos experimentos de intra e inter dias para **AOH** e **AME** ficou abaixo de 7% no flavado e abaixo de 14.5% para o albedo, respectivamente. Os desvios relativos estão apresentados também nas **Tabela 11** e **12**. Estes dados ilustram a diferença entre os valores obtidos e os valores esperados, e neste caso todos foram abaixo de 11% para o flavado e 14.5% para o albedo. Considerando análises quantitativas de micotoxinas em alimentos, valores tanto de desvio

padrão relativo quanto de desvio relativo são aceitáveis até o limite de 20% (GILBERT et. al., 2002). Dessa forma, estes dados demonstraram que este método é bastante preciso e reprodutivo.

**Tabela 11.** Experimento de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) utilizando o flavedo como matriz.

Composto	Concentração esperada ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Intra-dia (n = 5)			Inter-dia (n = 12)		
		Concentração dosada (média $\pm$ DP) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR (%)	Erro relativo* (%)	Concentração dosada (média $\pm$ DP) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR (%)	Desvio relativo* (%)
Alternariol	0.5	0.52 $\pm$ 0.02	3.8	4.4	0.51 $\pm$ 0.02	3.9	2.3
	1.0	1.06 $\pm$ 0.07	6.6	6.0	1.06 $\pm$ 0.06	5.7	5.9
	2.5	2.23 $\pm$ 0.12	5.4	-10.8	2.23 $\pm$ 0.11	4.9	-10.9
	5.0	5.13 $\pm$ 0.23	4.5	2.7	5.17 $\pm$ 0.22	4.3	3.4
	10.0	9.99 $\pm$ 0.29	2.9	-0.1	10.34 $\pm$ 0.57	5.5	3.5
	20.0	20.07 $\pm$ 0.45	2.2	0.4	19.93 $\pm$ 0.43	2.2	-0.3
Alternariol monometil éter	0.5	0.55 $\pm$ 0.01	1.8	9.8	0.55 $\pm$ 0.02	3.6	10.2
	1.0	1.00 $\pm$ 0.02	2.0	-0.4	0.99 $\pm$ 0.02	2.0	-0.8
	2.5	2.29 $\pm$ 0.02	0.9	-8.4	2.23 $\pm$ 0.04	1.8	-10.7
	5.0	5.05 $\pm$ 0.04	0.8	1.0	4.99 $\pm$ 0.11	2.2	-0.2
	10.0	9.96 $\pm$ 0.15	1.5	-0.4	9.93 $\pm$ 0.14	1.4	-0.7
	20.0	20.20 $\pm$ 0.09	0.5	1.0	20.33 $\pm$ 0.29	1.4	1.3

\*Obtido diretamente do software Masslynx.

**Tabela 12.** Experimento de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) utilizando o albedo como matriz.

Composto	Concentração esperada ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Intra- dia (n = 5)			Inter-dia (n = 12)		
		Concentração dosada (média $\pm$ DP) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR (%)	Erro relativ o* (%)	Concentração dosada (média $\pm$ DP) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	DPR (%)	Desvio relativo* (%)
Alternariol	0.5	0.50 $\pm$ 0.03	6.0	0.1	0.47 $\pm$ 0.06	12.8	-0.9
	1.0	0.98 $\pm$ 0.13	13.3	-2.2	0.99 $\pm$ 0.06	6.1	-0.4
	2.5	2.46 $\pm$ 0.08	3.3	-1.6	2.41 $\pm$ 0.21	8.7	-4.2
	5.0	5.52 $\pm$ 0.05	0.9	10.3	5.72 $\pm$ 0.07	1.2	14.4
	10.0	9.25 $\pm$ 0.66	7.1	-7.5	9.61 $\pm$ 0.88	9.2	-0.6
	20.0	20.31 $\pm$ 1.17	5.8	1.5	19.69 $\pm$ 2.17	11.0	-3.4
Alternariol monometil éter	0.5	0.47 $\pm$ 0.02	4.3	-5.7	0.50 $\pm$ 0.07	14.0	-0.5
	1.0	0.99 $\pm$ 0.07	7.1	-0.1	0.97 $\pm$ 0.13	13.4	-2.4
	2.5	2.41 $\pm$ 0.24	10.0	-3.4	2.30 $\pm$ 0.21	9.1	-7.8
	5.0	5.72 $\pm$ 0.08	1.4	14.5	5.44 $\pm$ 0.22	4.0	8.9
	10.0	9.61 $\pm$ 0.71	7.4	-3.9	9.78 $\pm$ 1.27	13.0	-2.2
	20.0	19.69 $\pm$ 2.32	11.8	-1.5	19.65 $\pm$ 1.92	9.8	-1.7

\*Obtido diretamente do software Masslynx.

A exatidão foi obtida de acordo com a medida da recuperação e estes dados estão apresentados na **Tabela 13**. Estes dados indicaram que a recuperação foi a mesma para as duas micotoxinas nas duas matrizes de tangerina (albedo e flavedo). Entretanto, os valores nominais da recuperação também demonstraram que o procedimento de extração ou de clean-up não foram completamente eficientes uma vez que as recuperações ficaram em torno de 40%. Porém, este valor demonstrou concordância com o que foi reportado por LAU et. al., 2003, uma vez que os autores apresentaram dados de recuperação de 36% para a micotoxina **AOH** e 20% para a micotoxina **AME** em sucos de laranja, utilizando extração e purificação semelhantes as que foram aplicadas para as cascas de tangerina. Estes dados sugerem a ocorrência de um considerável efeito de matriz durante a extração e clean-up, ou durante o processo de ionização na fonte de ES (efeito de supressão iônica). Aparentemente, este efeito ocorreu tanto no suco de laranja quanto nas cascas de tangerina. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado no processo de extração de **AOH** e **AME** em outros sucos de frutas, como o de maçã, no qual a recuperação foi avaliada em 90% sob as mesmas condições mencionadas acima (LAU et. al., 2003 & GILBERT et. al., 2002).

**Tabela 13.** Valores obtidos para o experimento de recuperação utilizando tanto flavedo quanto o albedo como matrizes. (n = 5).

Concentração esperada ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Recuperação (% da média $\pm$ DPR)			
	Flavedo		Albedo	
	Alternariol	Alternariol monometil éter	Alternariol	Alternariol monometil éter
0.50	43.75 $\pm$ 7.5	38.26 $\pm$ 13.1	44.71 $\pm$ 12.2	35.11 $\pm$ 6.9
1.00	42.22 $\pm$ 7.3	38.05 $\pm$ 6.8	45.17 $\pm$ 8.9	40.80 $\pm$ 12.7
2.50	40.00 $\pm$ 5.0	39.00 $\pm$ 6.2	41.70 $\pm$ 14.2	38.21 $\pm$ 11.4
5.00	39.38 $\pm$ 7.6	43.86 $\pm$ 5.1	41.30 $\pm$ 6.9	40.95 $\pm$ 6.4
10.00	39.23 $\pm$ 9.5	42.84 $\pm$ 13.2	41.86 $\pm$ 6.6	35.94 $\pm$ 10.7
20.00	41.34 $\pm$ 5.6	39.97 $\pm$ 7.2	42.01 $\pm$ 5.8	36.55 $\pm$ 9.0
Todas recuperações avaliadas (média $\pm$ DP)	40.99 $\pm$ 1.6	40.33 $\pm$ 3.6	42.79 $\pm$ 3.4	37.93 $\pm$ 2.5

Dessa forma, este método foi aplicado na quantificação de **AOH** e **AME** no albedo e flavedo de tangerinas com e sem sintomas da doença mancha marrom de alternaria. E através destas análises pode-se chegar à evidência de que a micotoxina **AOH** está presente nos frutos de tangerinas com uma quantidade cinco vezes maior ( $17.4 \pm 1.0 \mu\text{g/kg}$ ) do que a micotoxina **AME** ( $3.5 \pm 0.2 \mu\text{g/kg}$ ). Além disso, ambas toxinas foram detectadas em todas as amostras de flavedo obtidas de frutos com sintomas de mancha marrom de alternaria. Por outro lado, nem **AOH** e nem **AME** foram detectados nas amostras de albedo, e nem mesmo do albedo obtido dos frutos sem qualquer sintoma da doença (**Tabela 14**). Estes dados indicam que estas toxinas não são acumuladas dentro dos frutos de tangerinas, sugerindo, assim, que o flavedo pode estar atuando como uma barreira à penetração do fungo. Estes dados aparentemente vão de encontro com as observações de AGRIOS, 1997, que relatou através de lesões promovidas pela mancha marrom de alternaria na superfície de frutos de citros a extensão da infecção até o interior do fruto. Através dos resultados obtidos neste trabalho, é possível sugerir que a infecção não está diretamente relacionada com a produção de algumas micotoxinas dentro dos frutos de tangerinas.

**Tabela 14.** Aplicação do método validado nas análises de tangerinas com e sem sintomas de mancha marrom de alternaria (n = 3).

Amostras (n = 3)	Fonte (Lugar – Cidade/Estado)	Quantidade de micotoxina (média ± DP) em (µg/kg)			
		Flavedo		Albedo	
		Alternariol	Alternariol monometil éter	Alternariol	Alternariol monometil éter
Saudável 1	Fazenda – Aguai/SP	$2.5 \pm 0.3$	≤ LD	n.d.	n.d.
Saudável 2	Fazenda – Aguai/SP	$3.7 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.1$	n.d.	n.d.
Saudável 3 <sup>§</sup>	Supermercado local – Recife/PE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Saudável 4 <sup>§</sup>	Supermercado local – Recife/PE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Com sintomas 1	Fazenda – Aguai/SP	$17.4 \pm 1.0$	$3.5 \pm 0.2$	n.d.	n.d.
Com sintomas 2	Fazenda – Aguai/SP	$13.3 \pm 0.9$	$2.5 \pm 0.2$	n.d.	n.d.
Com sintomas 3	Fazenda – Aguai/SP	$14.1 \pm 0.9$	$2.9 \pm 0.2$	n.d.	n.d.
Com sintomas 4	Fazenda – Aguai/SP	$13.1 \pm 0.9$	$2.5 \pm 0.3$	n.d.	n.d.

<sup>§</sup>Adquirido na cidade do Recife (Nordeste do Brasil), uma região em que a doença mancha marrom de alternaria ainda não foi reportada; n.d.: não detectado.

Ainda, alguns autores têm atribuído ao albedo propriedades antimicrobianas devido ao fato de estes tecidos possuírem altas concentrações de alguns flavonóides além de outros compostos fenólicos (AGRIOS, 1997 & MOKBEL *et. al.*, 2006). Além disso, alguns destes compostos podem ser encontrados no flavedo também, porém nenhuma atividade antimicrobiana foi atribuída a este tecido ainda (AGRIOS, 1997). Entretanto, a presença deste tipo de compostos no albedo pode estar atuando na inibição da proliferação do microrganismo, evitando assim a produção de **AOH** e **AME** dentro dos frutos de tangerina.

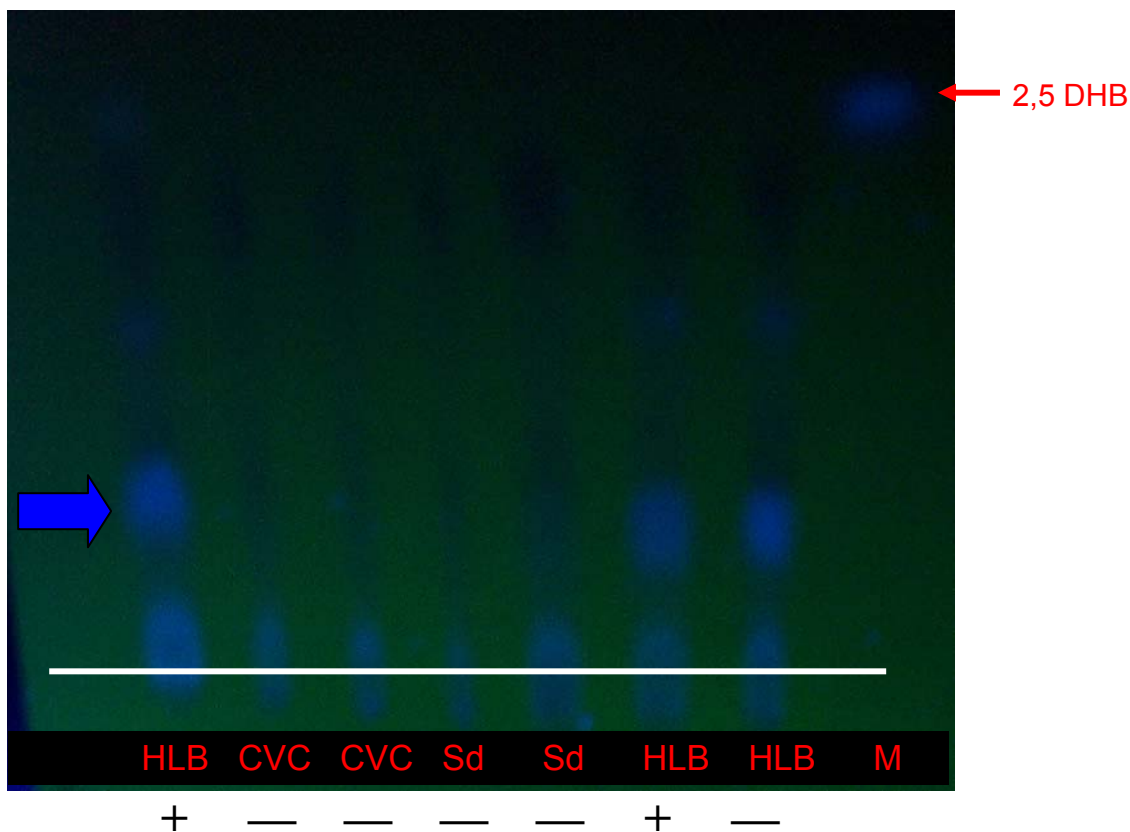
Os níveis de contaminação obtidos neste método (**Tabela 14**) foram menores do que os previamente reportados por LOGRIECO *et. al.*, 2003 durante as análises de tangerinas com sintomas de “alternaria black rots”, uma doença inespecífica, geralmente encontrada em plantas de citros. Estes autores relataram a detecção de 0.92 mg/kg de **AOH** e 0.17 mg/Kg de **AME**, sugestionando uma elevada produção destas toxinas *in situ* quando comparada com espécies de *Alternaria* responsáveis por causar mancha marrom de alternaria.

Foram também detectadas pequenas quantidades dos alternariois no flavedo dos frutos saudáveis, porém apenas nos frutos provenientes de plantas originárias do estado de São Paulo. Nas amostras coletadas na cidade do Recife-PE, região nordeste do país em que a doença mancha marrom de alternaria não foi ainda relatada, tanto **AME** quanto **AOH** não foram detectados. Ainda, quatro diferentes sucos de tangerina, todos vendidos na maioria das regiões do Brasil, foram também analisados e nenhum dos dois alternariois foi detectado nestas amostras.

#### **4.5 - Aplicação das Metodologias de TLC, PCR, HPLC-DAD e HPLC-MS/MS Na Avaliação da Diferença de Metabolismo Encontrada Em Plantas Com Sintomas de Greening**

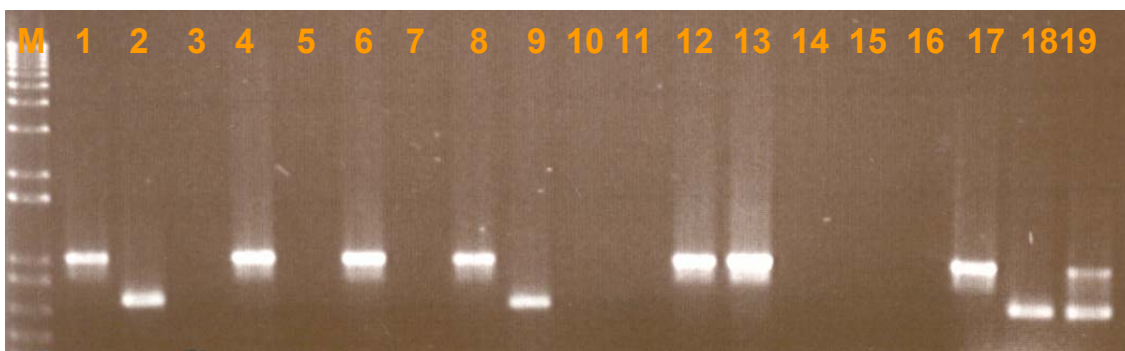
As análises, tanto de TLC quanto de PCR foram realizadas pelos pesquisadores e técnicos do FUNDECITRUS para diagnóstico de greening em plantas cítricas.

Na **Figura 53** está apresentado o resultado do experimento realizado em TLC dos extratos de plantas com sintomas de greening, sintomas de CVC, plantas saudias, bem como do padrão do ácido 2,5 dihidroxibenzóico. Dessa forma, foi possível observar que as plantas com sintomas de greening apresentaram uma mancha bastante intensa logo acima da linha de aplicação dos extratos com  $RF = 0.3$  (indicada com uma seta azul na **Figura 53**). Essa mancha intensa, segundo a literatura (SCHWARZ, 1968; VAN VUUREN, 1977; FELDMAN, 1969) representa a molécula orbicularina, marcador da doença em questão. O Experimento também demonstra que as plantas saudias e as plantas com sintomas de CVC não apresentam a molécula orbicularina.



**Figura 53.** Experimento com extratos do albedo dos frutos de *C.sinensis* (laranja pêra) em placa de TLC revelada em lâmpada de UV a 360 nm; HLB = planta com sintomas de greening, CVC = planta com sintomas de amarelinho, Sd = padrão de planta sadia, M = padrão do ácido 2,5-dihidroxibenzóico; A seta azul indica a mancha referente ao possível marcador (orbicularina) da doença greening (Resultado efetuado no Fundecitrus e cedido pelo pesquisador Dr. Nelson Arno Wulff).

A **Figura 54** ilustra os experimentos realizados com a técnica de PCR dos extratos de plantas sadias e plantas infectadas com as bactérias *Ca. Liberibacter americanus* e *Ca. Liberibacter asiaticus*. Neste experimento fica evidente a existência de uma banda de DNA específica da bactéria *Ca. Liberibacter americanus* (**Figura 54 – 1, 4, 6, 8, 12,13 e 17**) e outra também específica da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* (**Figura 54 – 2, 9 e 18**). Estas bandas de fragmentos de DNA estão ausentes nas plantas sadias (**Figura 54 – 3, 5, 7, 10, 11,14 e 15**).

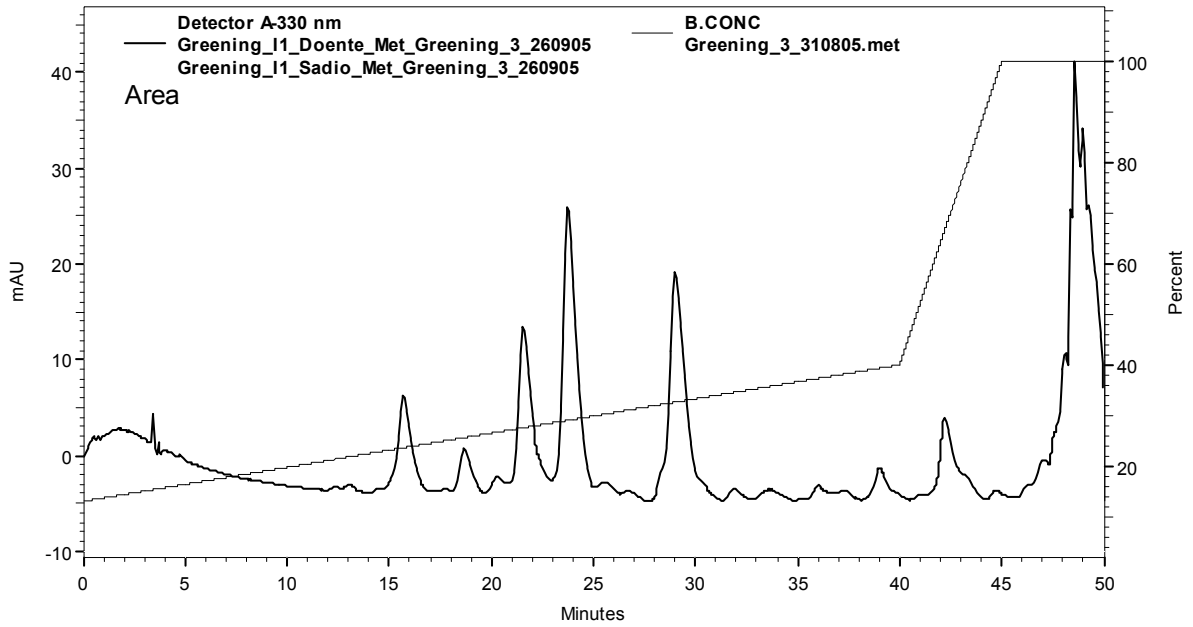


**Figura 54.** Experimento de PCR: M- marcador de peso molecular; 1- *Ca. Liberibacter americanus*; 2- *Ca. Liberibacter asiaticus*; 3- Sadia; 4- *Ca. Liberibacter americanus*; 5- Sadia; 6- *Ca. Liberibacter americanus*; 7- Sadia; 8- *Ca. Liberibacter americanus*; 9- *Ca. Liberibacter asiaticus*; 10- Sadia; 11- Sadia; 12- *Ca. Liberibacter americanus*; 13- *Ca. Liberibacter americanus*; 14- Sadia; 15- Sadia; 16- Controle negativo; 17- Controle *Ca. L. americanus*; 18- Controle *Ca. L. asiaticus*; 19- Controle *Ca. L. americanus*/ Controle *Ca. L. asiaticus* (Resultado efetuado no Fundecitrus e cedido pelo pesquisador Dr. Nelson Arno Wulff).

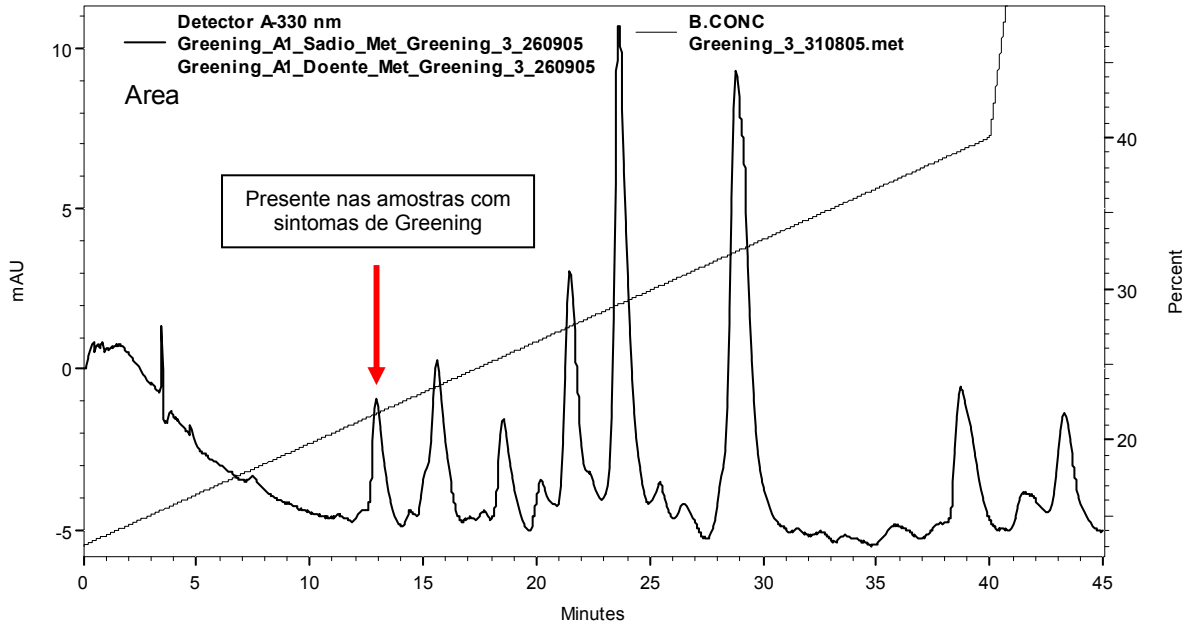
Com relação aos experimentos realizados utilizando a técnica de HPLC-DAD foi possível, também, distinguir metabolicamente as plantas doentes das plantas saudáveis. O cromatograma apresentado na **Cromatograma 7** representa o resultado obtido da análise do extrato de uma planta saudável, enquanto que o cromatograma apresentado na **Cromatograma 8** representa o resultado obtido da análise do extrato de uma planta com sintomas da doença greening. Os dois experimentos foram realizados utilizando as mesmas condições experimentais.

O cromatograma que se refere ao extrato da planta com sintomas de doença (**Cromatograma 8**) apresentou uma banda cromatográfica em 13,00 min, enquanto que o cromatograma obtido do experimento realizado com a planta sadia demonstrou que essa banda era ausente (**Cromatograma 7**), evidenciando uma diferença no metabolismo desses dois organismos.





**Cromatograma 7.** Cromatograma obtido de uma planta sadia.



**Cromatograma 8.** Cromatograma obtido de uma planta com sintoma de greening.

Além das técnicas de TLC, PCR e HPLC-DAD, foram realizadas também análises de LC-MS/MS das amostras de plantas com sintomas de greening e de plantas saudáveis. Para tanto, foram realizados estudos de fragmentação dos padrões comerciais de AS e AG e, ainda, foram realizados experimentos com os extratos das plantas com sintomas de doença, buscando a presença das moléculas orbicularina e ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico. Estes estudos de fragmentação visaram à busca por fragmentos iônicos específicos de cada molécula que pudessem ser utilizados nos experimentos de SRM e, dessa forma, monitorar as moléculas AS, AG, orbicularina e ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico nos extratos de plantas com sintomas de doença e de plantas saudáveis.

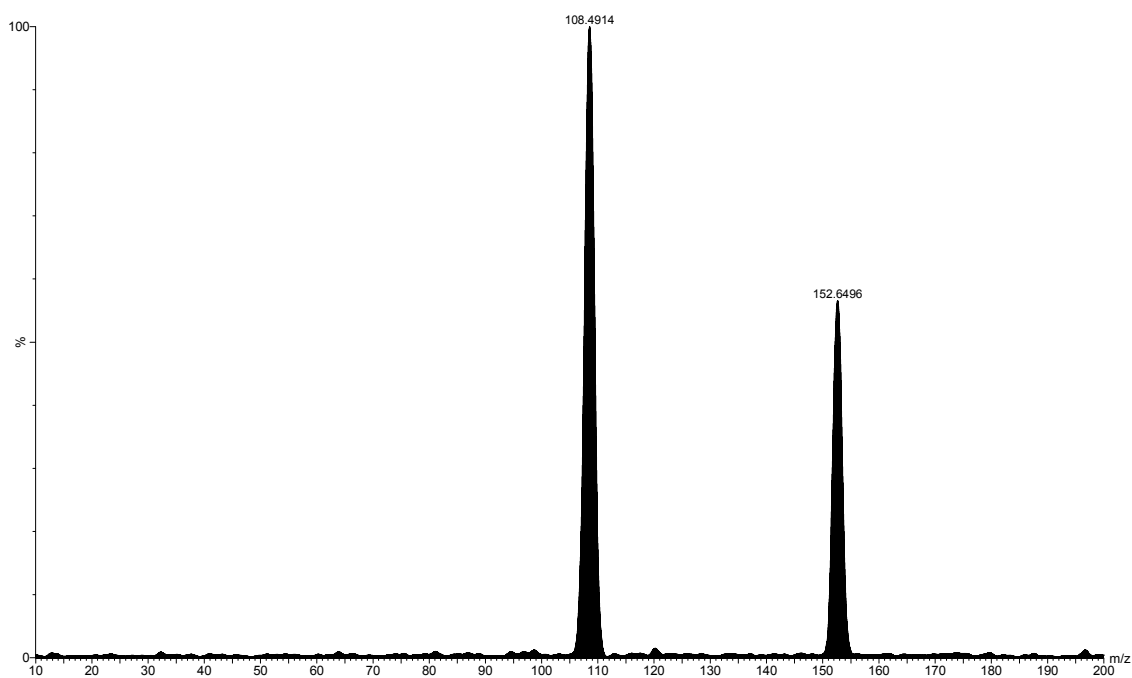
A fragmentação de todas as moléculas foi realizada no modo negativo, onde as moléculas AG e AS apresentaram os íons moleculares  $[M-H]^- = 153$  (**Figura 55 e Figura 54**) e  $[M-H]^- = 137$  (**Figura 55 e Figura 56**), respectivamente. Durante os experimentos de CID-MS/MS para as duas moléculas foram observados descarboxilações como fragmentos iônicos, gerando o íon  $m/z = 109$  para a descarboxilação do AG (**Figura 55 e Figura 57**) e  $m/z = 93$  para a descarboxilação do AS (**Figura 56 e Figura 57**).

Da mesma maneira, as possíveis moléculas orbicularina e ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico apresentaram fragmentações semelhantes. A molécula orbicularina apresentou o íon molecular  $[M-H]^- = 315$  (**Figura 57**) e a molécula ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico apresentou o íon molecular  $[M-H]^- = 299$  (**Figura 57**). Nesse caso ambas as moléculas também apresentaram descarboxilações e a perda de uma unidade de glicose (162 u.m.a.).

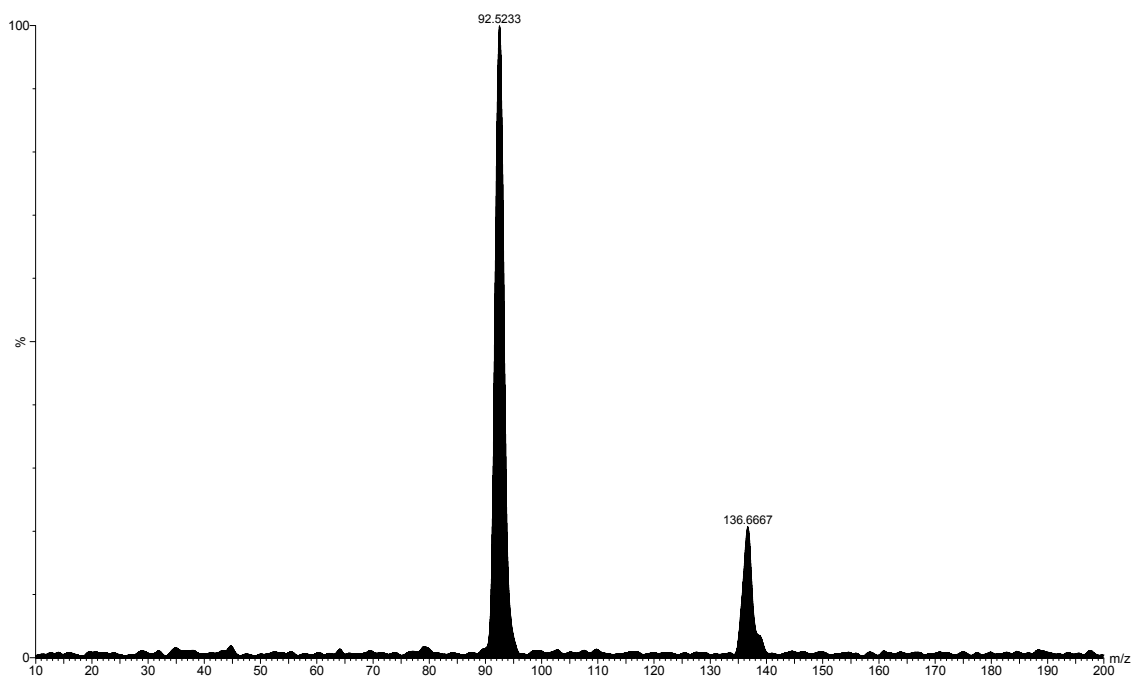
Durante o experimento de CID-MS/MS a molécula orbicularina sofreu a perda de uma unidade de glicose através de uma eliminação 1-2 gerando o fragmento iônico  $m/z = 153$  (**Figura 57**), e logo em seguida apresentou uma descarboxilação gerando o fragmento iônico  $m/z = 109$  (**Figura 57**). Dessa forma foram selecionadas as transições 315>153 e 315>109 para o monitoramento dessa molécula durante os experimentos de SRM nos extratos de plantas.

Da mesma forma, o ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico demonstrou o mesmo tipo de fragmentação, só que gerando os fragmentos iônicos  $m/z = 137$  (**Figura**

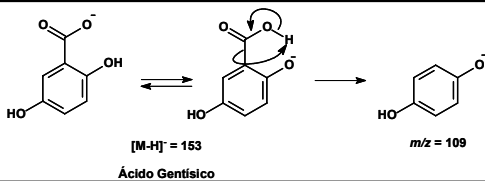
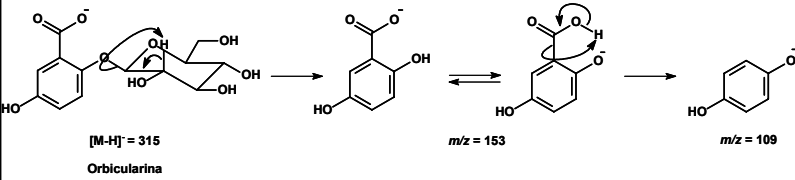
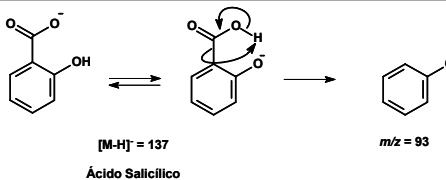
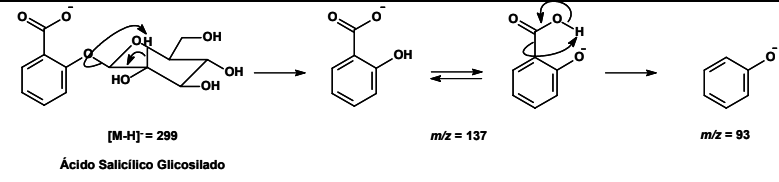
**57)** para a perda de uma unidade de glicose e o fragmento iônico  $m/z = 93$  (**Figura 57**) para a descarboxilação. Assim, as transições  $299 > 137$  e  $299 > 93$  foram selecionadas para o monitoramento dessa molécula durante os experimentos de SRM.



**Figura 55.** Espectro de íons fragmento da molécula ácido gentísico.



**Figura 56.** Espectro de íons fragmento da molécula ácido salicílico.

Propostas de Fragmentação	SRM
 <p>[M-H]<sup>-</sup> = 153 Ácido Gentísico</p> <p>m/z = 109</p>	Transições Monitoradas: 153>109
 <p>[M-H]<sup>-</sup> = 315 Orbicularina</p> <p>m/z = 153</p> <p>m/z = 109</p>	Transições Monitoradas: 315>153 315>109 Ion Ratio = 2.12
 <p>[M-H]<sup>-</sup> = 137 Ácido Salicílico</p> <p>m/z = 93</p>	Transições Monitoradas: 137>93
 <p>[M-H]<sup>-</sup> = 299 Ácido Salicílico Glicosilado</p> <p>m/z = 137</p> <p>m/z = 93</p>	Transições Monitoradas: 299>137 299>93 Ion Ratio = 1.71 e 2.16

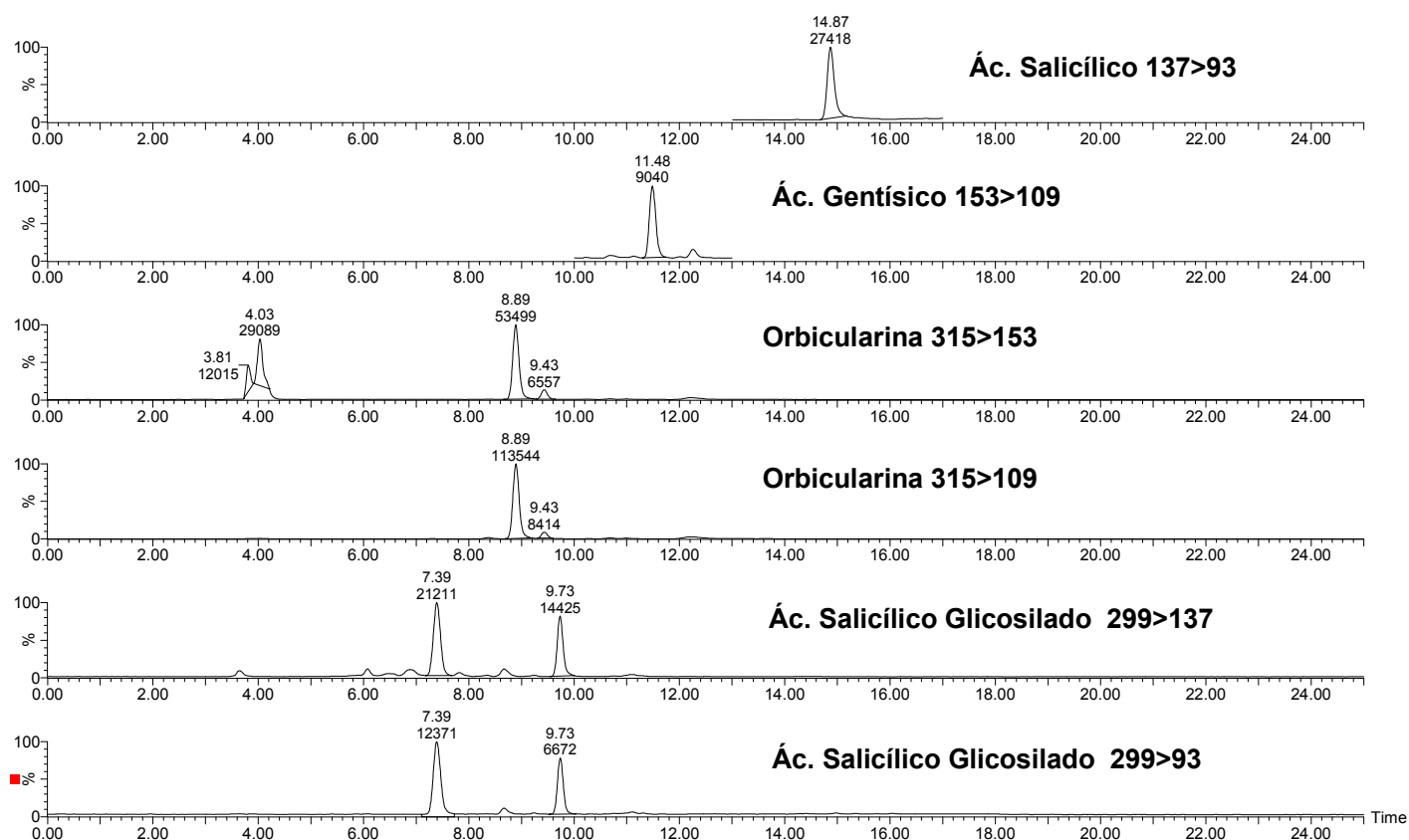
**Figura 57.** Propostas de fragmentação e transições monitoradas no experimento de SRM para as moléculas ácido gentísico, orbicularina, ácido salicílico e ácido salicílico glicosilado (ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico).

Obtidos estes resultados, optou-se por analisar duas coleções de amostras de plantas com sintomas de greening e plantas saudias, através das técnicas TLC, PCR, HPLC-DAD e HPLC-MS/MS, para avaliar a presença de possíveis marcadores da doença em questão e, ainda, qual seria a técnica mais eficiente para diagnosticar esta patologia em plantas cítricas.

Os resultados de todas as análises estão apresentados na **Tabela 15**, onde estão representados com a notação positivo para a presença ou negativo para a ausência do marcador eleito de acordo com a técnica aplicada durante as análises.

Na coluna referente aos resultados do experimento de TLC a notação se refere a presença ou ausência da mancha com  $R_F = 0.3$  que se refere a molécula orbicularina. Na coluna referente ao experimento de PCR a notação se refere à presença ou ausência da banda de DNA específica de *C. L.*

americanus ou da banda de DNA específica de *C. L. asiaticus*. Na coluna referente aos resultados do experimento de HPLC-DAD a notação se refere à presença ou ausência da banda cromatográfica em 13,0 min. E por último, nas colunas referentes ao ácido gentísico (AG), orbicularina (AG-glu), ácido salicílico (AS) e ácido  $\beta$ -O-D glucosilsalicílico (AS-glu) estão apresentadas às áreas encontradas durante os experimentos de SRM (**Figura 58**) das duas coleções de amostras de plantas sadias e com sintomas de greening.



**Figura 58.** Cromatogramas obtidos durante os experimentos de SRM de plantas com sintomas de greening e de plantas sadias.

**Tabela 15.** Resultados obtidos através das técnicas, TLC, PCR, HPLC-UV e HPLC-MS/MS para plantas saudas e com sintomas de greening.

Amostras	TLC	PCR C. L. asiaticus	PCR C. L. americanus	HPLC-DAD 13.00 min	Experimento de SRM (Área)				
					AG 11.48 min 153>109	AG-glu 8.90 min 315>109	AS 14.87 min 137>93	AS-glu 7.40 min 299>137	AS-glu 9.76 min 299>137
<b>Coleção de Amostras 1</b>									
<b>A</b>	+	-	+	+	9040	213544	27418	21211	14425
<b>B</b>	±	-	+	-	3166	78342	21253	22008	4231
<b>C</b>	+	-	+	+	20780	200944	23609	23087	17472
<b>D</b>	-	+	-	-	14859	107352	35442	23923	9110
<b>E</b>	-	+	-	-	23061	122038	35848	16672	9386
<b>F</b>	-	+	-	-	12195	122190	28318	27707	8775
<b>G</b>	-	+	-	-	8706	32442	19341	5278	2237
<b>H</b>	+	-	+	+	12607	240650	33053	42608	30594
<b>I</b>	±	-	+	+	56768	208939	56035	45833	16401
<b>Coleção de Amostras 2</b>									
<b>1923</b>	+	+	-	+	0	145881	53492	25366	24244
<b>2314</b>	+	+	-	+	0	49045	13562	9048	2094
<b>2311</b>	-	+	-	+	0	35364	16279	20029	3086
<b>1965</b>	-	+	-	-	0	82349	32766	22134	6254
<b>2153</b>	-	+	-	+	0	70359	38500	10931	7660
<b>1925</b>	+	-	+	+	0	281588	63487	58364	26868
<b>2310</b>	+	-	+	+	0	161591	51764	39546	20253
<b>1921</b>	-	-	-	-	500	38798	13470	10853	2507
<b>2312</b>	-	-	-	+	0	79896	50070	23646	47013

+ = presença do possível composto químico para diagnose, ou presença da bactéria.

- = ausência do possível composto químico para diagnose, ou presença da bactéria.

± = dúvida no diagnóstico.

A primeira coleção de amostras era composta por plantas com sintomas de greening, onde esta coleção continha amostras de plantas infectadas com a bactéria *C. L. americanus* e amostras de plantas infectadas com a bactéria *C. L. asiaticus*. A segunda coleção de amostras era composta também por plantas infectadas com as duas bactérias citadas acima, além de duas amostras que compunham plantas aparentemente saudáveis (1921 e 2312).

As análises das amostras realizadas através de TLC algumas vezes gerou dúvida com relação à presença ou ausência da mancha que representa a molécula orbicularina, como observado nas amostras B e I da primeira coleção de amostras. Essa dúvida pode ter ocorrido devido a baixas concentrações de orbicularina na planta doente. Já na segunda coleção de amostras essa dúvida não ocorreu havendo apenas a indicação da ausência ou presença do marcador. Confrontando estes dados de TLC com os resultados das análises das mesmas amostras pela técnica de PCR, da primeira coleção de amostras, observou-se que os resultados obtidos por TLC confirmavam os dados obtidos por PCR quando as plantas estavam infectadas com a bactéria *C. L. americanus*. Já para a segunda coleção de amostras, não foram observados os mesmos resultados para as amostras 1923 e 2314, onde a TLC indicava como positivo e a PCR indicava como negativo para a bactéria *C. L. americanus*. Em todas as análises de PCR da primeira coleção de amostras os resultados que apresentavam como negativo para a bactéria *C. L. asiaticus* apresentavam como positivo para a bactéria *C. L. americanus* e vice-versa, isto devido a presença de bandas de DNA distintos para as duas bactérias. Com exceção das amostras 1923 e 2314 pode-se considerar, através das análises de TLC e PCR, que a orbicularina estava presente apenas nas plantas infectadas com a bactéria *C. L. americanus*, ou as plantas infectadas com a bactéria *C. L. asiaticus* só eram capazes de produzir quantidades de orbicularina inferior a sensibilidade de detecção da técnica TLC para esta molécula.

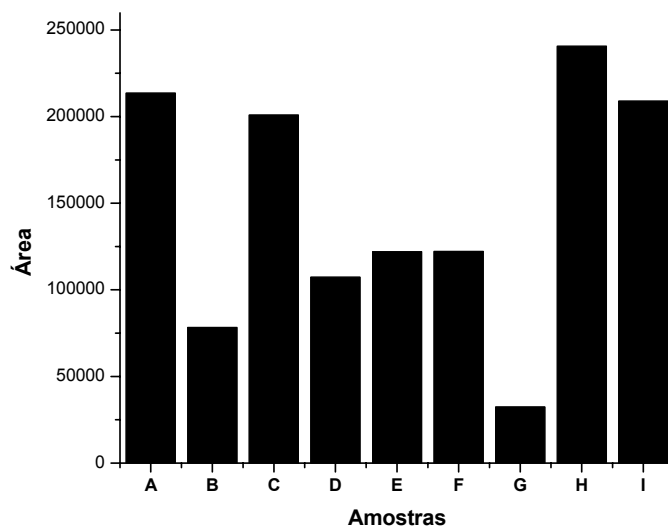
Os experimentos de HPLC-DAD da coleção de amostras 1 (**Tabela 15**) demonstraram boa concordância com os resultados obtidos por TLC. Em todos os casos em que a resposta foi positiva no experimento de TLC durante os experimentos de HPLC-DAD uma banda cromatográfica em 13.00 min também estava presente. Os experimentos de HPLC-DAD foram importantes nos casos

em que o experimento de TLC apresentou dados duvidosos. No caso da amostra B o experimento de HPLC-DAD apontou para um resultado positivo. E no caso da amostra I, que também apresentava um resultado duvidoso no experimento de TLC, o experimento de HPLC-DAD apontou para um resultado negativo. Estes dados foram confirmados quando a molécula orbicularina foi monitorada através dos experimentos de LC-MS/MS.

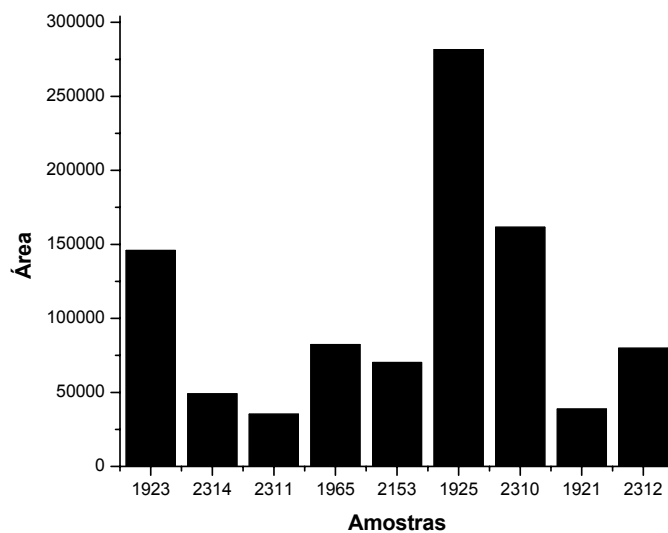
Os experimentos de LC-MS/MS apresentaram bastante concordância com os dados dos outros experimentos descritos anteriormente quando se tratava da detecção da molécula orbicularina (AG-glu). Quando a resposta indicava para positivo utilizando as técnicas de TLC e PCR em plantas infectadas com *C. L. americanus*, o experimento de LC-MS/MS apresentou áreas em torno de 200000 (duzentos mil) quando a molécula orbicularina era monitorada. Já quando a resposta era negativa nas técnicas de TLC e PCR as áreas no experimento de LC-MS/MS se mantiveram abaixo de 122000 (cento e vinte e dois mil). Um perfil deste resultado está apresentado no gráfico de barras na **Figura 59**.



A )



B )



**Figura 59.** Gráficos de barras apresentando o perfil de áreas encontradas através do experimento de LC-MS/MS quando a molécula orbicularina estava sendo monitorada: **A )** Coleção de amostras 1; **B )** Coleção de amostras 2.

Todos esses experimentos levam a crer que a molécula orbicularina é produzida em uma concentração maior, e por isso detectável pela técnica de TLC, quando a planta está infectada com a bactéria *C. L. americanus*, e quando a planta está infectada com a bactéria *C. L. asiaticus* a planta também produz orbicularina, só que em uma concentração menor, onde esta concentração ficaria abaixo dos limites de detecção do TLC e do detector de UV. Uma segunda possibilidade seria a de que a planta já produz orbicularina em seu metabolismo secundário, e quando a planta é infectada pela bactéria *C. L. americanus* a planta é capaz de aumentar a produção desta molécula. Todas as outras moléculas monitoradas no experimento de LC-MS/MS não apresentaram qualquer relação com os outros experimentos realizados.

Dessa forma, a conclusão que se chega é que a técnica de TLC, devido ao baixo custo, ainda deve ser empregada na diagnose de greening como já era feito desde a década de 60, porém deve-se levar em consideração a baixa sensibilidade desta técnica podendo levar a resultados duvidosos como os discutidos aqui. E bem como a técnica de TLC as técnicas HPLC-DAD e LC-MS/MS também podem ser utilizadas para a diagnose de greening quando se desejar uma maior precisão dos resultados. A única ressalva é que estas técnicas apenas serão úteis para a diagnose de greening se a planta estiver infectada com a bactéria *C. L. americanus* e que estas técnicas não são capazes de diagnosticar greening se a planta estiver infectada com a bactéria *C. L. asiaticus*. Para a diagnose de greening quando a planta estiver infectada com a bactéria *C. L. asiaticus* deve ser utilizada a técnica de PCR. Assim, a análise ideal para a diagnose de greening sempre deverá conter uma das técnicas TLC, HPLC-DAD e HPLC-MS/MS aliada a PCR como técnica confirmatória.

#### **4.6 – Resultados Obtidos Durante A Realização dos Ensaio de Inibição de *Guignardia citricarpa*, *in vitro*, Pelo Método de Germinação de Esporos Em Placa de Poliestireno**

A primeira observação referente aos ensaios biológicos com *G. citricarpa* foi com relação ao teste realizado com os solventes DMSO, DMSO:H<sub>2</sub>O 1:1 e H<sub>2</sub>O. Durante os testes foi possível observar que tanto o DMSO quanto a proporção de DMSO:H<sub>2</sub>O 1:1 apresentaram resultados ruins quando adicionados no volume de 40 µL à solução de esporos de *G. citricarpa*. Observou-se que, quando adicionados, esses solventes provocaram deformações nos esporos impedindo a germinação, ou seja, esses solventes por si só já apresentavam atividade fungicida frente ao microrganismo e, dessa maneira, a hipótese de serem utilizados como solventes na solubilização dos compostos a serem testados foi completamente descartada. Por outro lado, quando o ensaio foi realizado com 40 µL de H<sub>2</sub>O, observou-se que os esporos germinaram sem dificuldade e esse foi então o solvente utilizado durante todo o ensaio.

Os compostos que apresentaram baixa solubilidade em H<sub>2</sub>O, como as cumarinas, tiveram esse problema contornado quando adicionados à água e mantidos por 20 minutos em banho maria sob a temperatura de 45 °C, tornando-se, assim, solúveis e possibilitando a realização do ensaio biológico.

Com relação ao ensaio biológico com a solução das substâncias, foi possível observar que todas as substâncias apresentaram o efeito de diminuição na germinação dos esporos de *G. citricarpa*. Apenas a substância suberosina apresentou o efeito de estimular a germinação dos esporos do microrganismo, quando comparado com a solução controle que continha apenas H<sub>2</sub>O (**Tabelas 16 e 17 e Figuras 60 e 61**).

Dos compostos ensaiados quatro apresentaram os resultados mais promissores, os dois derivados do ácido benzóico, o ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico e o ácido 3,4-dimetoxibenzóico, e os flavonóides glicosilados naringina e rutina. Essas quatro substâncias foram capazes de, na concentração de 500 µg/mL, inibirem por completo a germinação dos esporos de *G. citricarpa* (**Tabelas 18 e 19 e Figuras 62e 63**).

Com relação às cumarinas ensaiadas, as que apresentaram bons resultados de inibição da germinação dos esporos foram as cumarinas seselina e angelical. A seselina apresentou média de germinação dos esporos de 1,5 e o angelical de apenas 0,75, de um total de 100 esporos contados para quatro repetições do experimento.

**Tabela 16.** Resultados obtidos durante o Ensaio 1 a de germinação dos esporos de *G. citricarpa*.

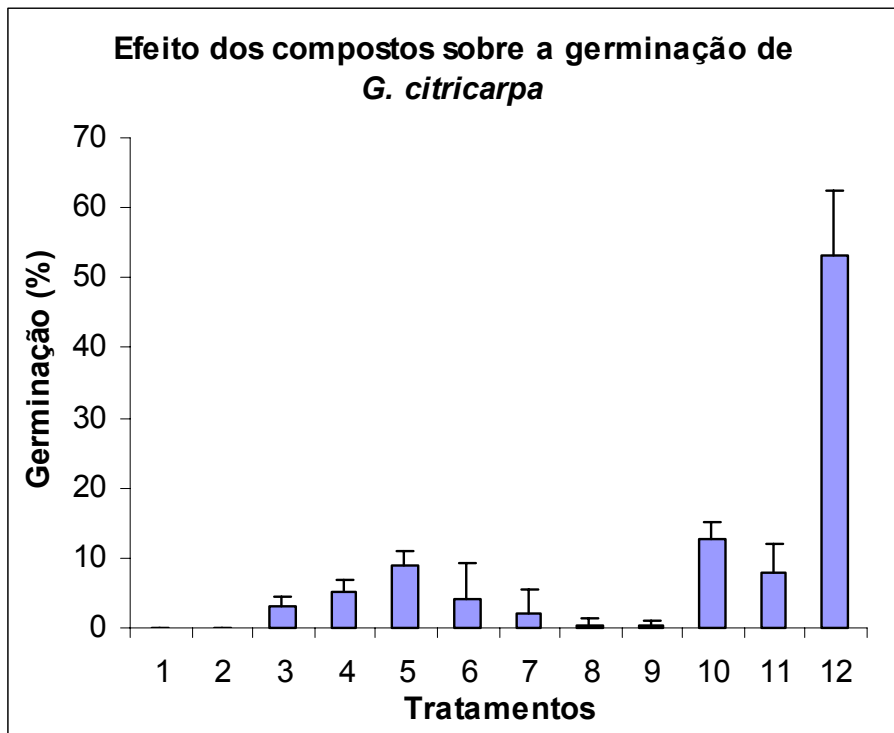
ENSAIO 1a							
		Nº de Esporos Germinados Repetições					
Composto	Concentração	1	2	3	4	Médias	D. P.*
1	500 µg/mL	0	0	0	0	0	0
2	500 µg/mL	0	0	0	0	0	0
3	500 µg/mL	2	3	3	5	3,25	1,258305739
4	500 µg/mL	7	4	3	6	5	1,825741858
5	500 µg/mL	8	7	10	11	9	1,825741858
6	500 µg/mL	0	7	0	10	4,25	5,057996968
7	500 µg/mL	0	7	1	0	2	3,366501646
8	500 µg/mL	0	0	0	2	0,5	1
9	500 µg/mL	0	1	1	0	0,5	0,577350269
10	500 µg/mL	13	10	12	16	12,75	2,5
11	500 µg/mL	6	3	13	9	7,75	4,272001873
12	40 µL	54	43	65	51	53,25	9,10585892

D. P. = Desvio Padrão

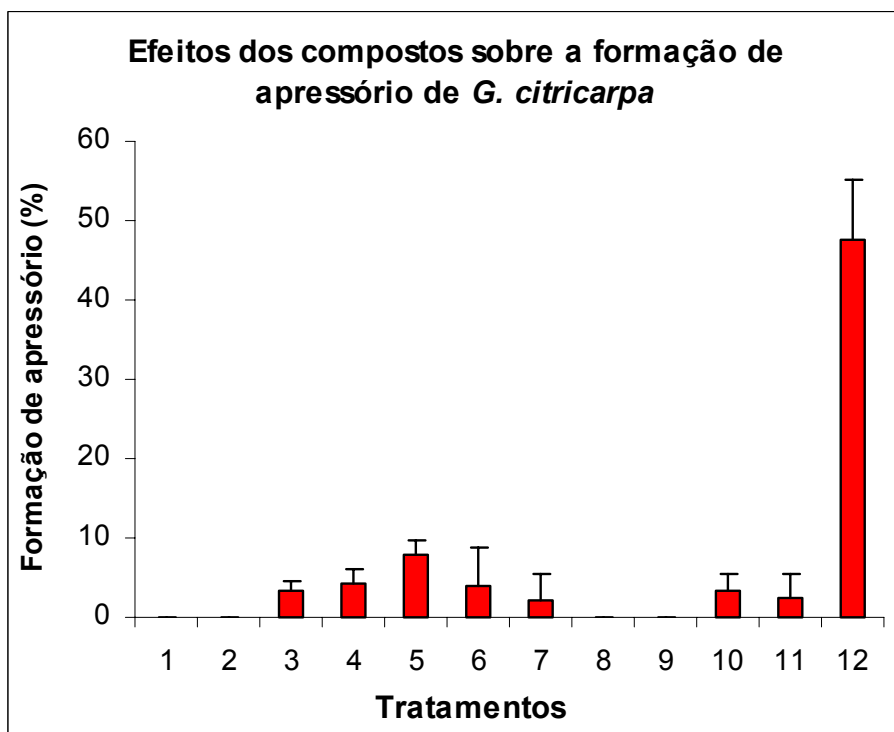
**Tabela 17.** Resultados obtidos durante o Ensaio 1 b de germinação dos esporos de *G. citricarpa*.

ENSAIO 1b							
		Nº de Esporos Germinados Repetições					
Composto	Concentração	1	2	3	4	Médias	D. P.*
1	500 µg/mL	0	0	0	0	0	0
2	500 µg/mL	0	0	0	0	0	0
3	500 µg/mL	2	3	3	5	3,25	1,258305739
4	500 µg/mL	7	3	3	4	4,25	1,892969449
5	500 µg/mL	8	5	8	10	7,75	2,061552813
6	500 µg/mL	0	7	0	9	4	4,69041576
7	500 µg/mL	0	7	1	0	2	3,366501646
8	500 µg/mL	0	0	0	0	0	0
9	500 µg/mL	0	0	0	0	0	0
10	500 µg/mL	5	1	5	2	3,25	2,061552813
11	500 µg/mL	0	0	6	4	2,5	3
12	40 µL	50	37	55	48	47,5	7,593857167

D. P. = Desvio Padrão



**Figura 60.** Gráfico dos ensaios de inibição de *G. citricarpa* relativo ao Ensaio 1a.



**Figura 61.** Gráfico dos ensaios de inibição de *G. citricarpa* relativo ao Ensaio 1b.

**Tabela 18.** Resultados obtidos durante o ensaio 2 a de germinação dos esporos de *G. citricarpa*.

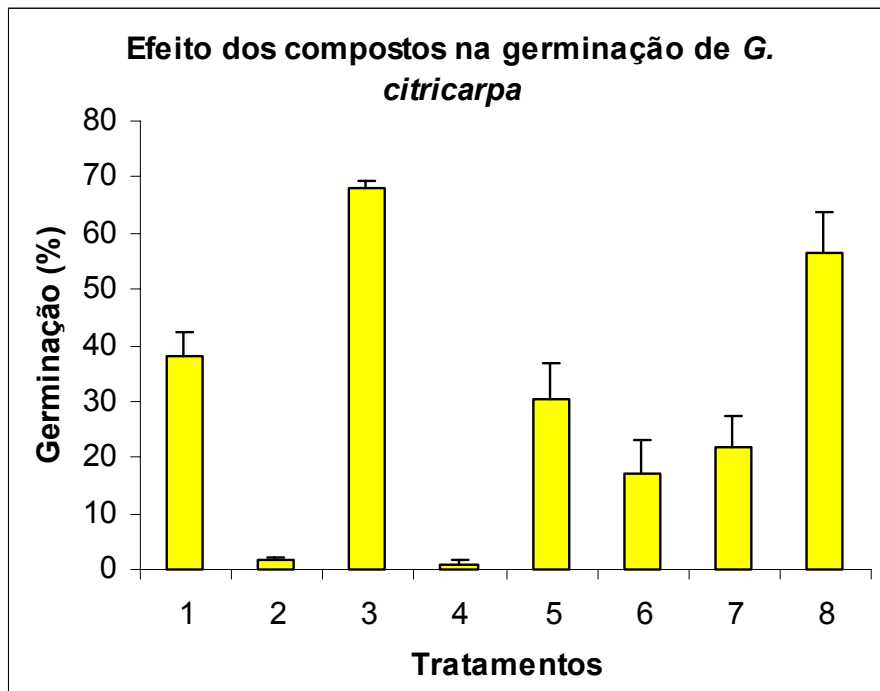
ENSAIO 2a							
		Nº de Esporos Germinados Repetições					
Composto	Concentração	1	2	3	4	Médias	D. P.*
1	500 µg/mL	33	40	44	35	38	4,301162634
2	500 µg/mL	2	1	2	1	1,5	0,5
3	500 µg/mL	68	67	70	67	68	1,224744871
4	500 µg/mL	0	2	0	1	0,75	0,829156198
5	500 µg/mL	36	30	20	35	30,25	6,339361167
6	500 µg/mL	14	19	26	10	17,25	5,973901573
7	500 µg/mL	19	14	29	25	21,75	5,717298313
8	500 µg/mL	47	62	52	65	56,5	7,29725976

\* D. P. = Desvio Padrão

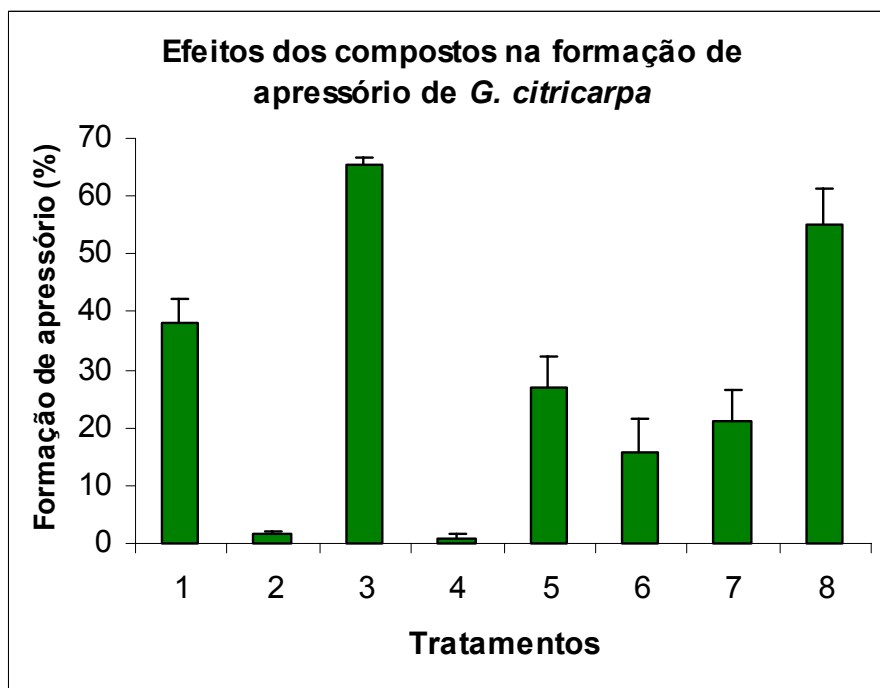
**Tabela 19.** Resultados obtidos durante o ensaio 2 b de germinação dos esporos de *G. citricarpa*.

ENSAIO 2b							
		Nº de Esporos Germinados Repetições					
Composto	Concentração	1	2	3	4	Médias	D. P.*
1	500 µg/mL	33	40	44	35	38	4,301162634
2	500 µg/mL	2	1	2	1	1,5	0,5
3	500 µg/mL	64	65	66	67	65,5	1,118033989
4	500 µg/mL	0	2	0	1	0,75	0,829156198
5	500 µg/mL	34	25	20	29	27	5,14781507
6	500 µg/mL	12	18	24	9	15,75	5,760859311
7	500 µg/mL	17	14	28	25	21	5,700877125
8	40 µL	46	62	52	60	55	6,403124237

\* D. P. = Desvio Padrão



**Figura 62.** Gráfico dos ensaios de inibição de *G. citricarpa* relativo ao Ensaio 2a.



**Figura 63.** Gráfico dos ensaios de inibição de *G. citricarpa* relativo ao Ensaio 2b.

## 5. Considerações Finais

Através da metodologia de análise desenvolvida para a detecção dos compostos polares presentes nas folhas de citros utilizando HPLC-UV-MS, bem como as propostas de fragmentação e as informações obtidas da literatura, a respeito dos metabólitos secundários presentes nas espécies de *Citrus*, foi possível detectar a presença dos flavonóides glicosilados rutina ou hesperidina. Da mesma forma, através da metodologia de análise desenvolvida para a detecção dos compostos de polaridade intermediária nas folhas de citros utilizando HPLC-UV-MS, bem como as propostas de fragmentação e, ainda, através das informações obtidas da literatura a respeito dos metabólitos secundários presentes nas espécies de *Citrus*, foi possível detectar a presença dos flavonóides polimetoxilados nobiletina, tangeretina e aurentina. Os demais compostos presentes nos cromatogramas, tanto na análise dos compostos polares quanto dos compostos de polaridade intermediária, ainda não foram identificados.

As análises comparativas de plantas saudáveis e com sintomas de MSC, utilizando HPLC-UV-MS, demonstraram diferenças nítidas na composição química das duas plantas. O surgimento de uma molécula com tempo de retenção de 28 minutos, tanto no cromatograma obtido no detector de UV no comprimento de onda de 330 nm quanto no detector de massas caracterizou essa diferença no metabolismo da planta doente. Devido a esta diferença aparente partiu-se do princípio de que esta molécula poderia representar um marcador da doença, onde, dessa forma, experimentos de HPLC-MS/MS SRM foram desenvolvidos e realizados a fim de monitorar a molécula em questão nas folhas, casca da copa (*Citrus sinensis*) e casca do cavalo (*Citrus limonea*) em uma coleção de plantas saudáveis, com sintomas da doença e assintomáticas coletadas ao lado de plantas doentes. Dessa forma, pode-se relatar que em todas as plantas e em todas as partes analisadas a molécula em questão estava presente, apresentando, em todos os casos, maior quantidade na copa da planta. As amostras de folhas apresentaram praticamente metade da quantidade presente na copa e no cavalo detectou-se praticamente 10% da quantidade presente na copa. A planta doente foi a que apresentou a menor quantidade do analito na copa, quando comparado com a copa das outras



plantas analisadas, mas não foi possível observar qualquer relação do analito em questão com a doença morte súbita dos citros. A estrutura molecular da molécula analisada ainda não foi elucidada.

Também, no sentido de avaliar diferenças metabólicas entre plantas sadias e doentes as metodologias de TLC, PCR, HPLC-DAD e HPLC-MS/MS foram aplicadas na avaliação da diferença de metabolismo entre plantas com sintomas de greening e plantas sadias. Para isto, as moléculas orbicularina, ácido gentísico, ácido salicílico e ácido salicílico glicosilado foram analisadas. Dessa maneira, a conclusão que se chegou foi que a técnica de TLC, devido ao baixo custo, ainda deve ser empregada na diagnose de greening como já era feito desde a década de 60, porém deve-se levar em consideração a baixa sensibilidade desta técnica podendo levar a resultados duvidosos. E bem como a técnica de TLC as técnicas HPLC-DAD e LC-MS/MS também podem ser utilizadas para a diagnose de greening quando se desejar uma maior precisão dos resultados. A única ressalva é que estas técnicas apenas serão úteis para a diagnose de greening se a planta estiver infectada com a bactéria *C. L. americanus* e que estas técnicas não são capazes de diagnosticar greening se a planta estiver infectada com a bactéria *C. L. asiaticus*. Para a diagnose de greening quando a planta estiver infectada com a bactéria *C. L. asiaticus* deve ser utilizada a técnica de PCR. Assim, a análise ideal para a diagnose de greening sempre deverá conter uma das técnicas TLC, HPLC-DAD e HPLC-MS/MS aliada a PCR como técnica confirmatória.

Estudar a composição química dos microrganismos fitopatogênicos também se faz importante para a compreensão das interações planta-microrganismo. Dessa forma, estudou-se o metabolismo secundário do patógeno de *Citrus Alternaria alternata*, causador da doença mancha marrom de alternaria em tangerinas, quando cultivado em grande quantidade de milho do tipo canjica. A partir da extração, purificação e identificação, através das técnicas de RMN e espectrometria de massas, foi possível obter quantidades razoáveis das micotoxinas AOH e AME, além da molécula Ácido tenuazônio. Tendo essas duas micotoxinas isoladas e identificadas decidiu-se por avaliar o perfil da produção dessas moléculas no metabolismo de *A. alternata* ao longo do período de 30 dias. Para tanto utilizou-se HPLC-DAD como ferramenta.

Confrontando os dados das duas curvas entre os períodos do 10<sup>o</sup> dia até o 20<sup>o</sup> dia pode-se observar que para a micotoxina AME a produção foi bastante restrita, praticamente estacionária, enquanto para a outra micotoxina, AOH, a produção foi bastante acelerada representando a fase Log do metabolismo. Esses fatos indicam a possibilidade de disputas pelos mesmos precursores/nutrientes durante o metabolismo do microrganismo ou pelas mesmas enzimas durante o processo de síntese dos metabólitos durante esse período. Além disso, os resultados observados através da construção das curvas de produção dos dois metabólitos demonstraram um grande acúmulo destes quando o microrganismo foi cultivado em milho, com a produção superior de AOH de praticamente 4 vezes com relação a micotoxina AME.

Ainda, por se tratarem de moléculas cancerígenas ao homem, as micotoxinas AOH e AME foram quantificadas nas cascas de tangerinas (albedo e flavedo). Para tanto, um método de HPLC-MS/MS com experimento SRM foi desenvolvido e validado para quantificar as micotoxinas. Os limites de quantificação ficaram estabelecidos abaixo de 0.5 µg/kg e os limites de detecção ficaram estabelecidos abaixo de 0.13 µg/kg para ambos os alternários. Estes valores expressaram a habilidade do método desenvolvido de detectar e quantificar os alternários em cascas de tangerina ao nível de ppt. Este nível de sensibilidade demonstrou que o método representa uma boa ferramenta para ser utilizada no controle de qualidade destas micotoxinas em alimentos. O método também apresentou bons resultados de linearidade precisão e exatidão. Entretanto os valores obtidos de recuperação demonstraram que o procedimento de extração ou de clean-up não foram completamente eficientes uma vez que as recuperações ficaram em torno de 40%. Porém, este valor demonstrou concordância com o que foi reportado na literatura uma vez que a recuperação reportada foi de 36% para a micotoxina AOH e 20% para a micotoxina AME em sucos de laranja.

Dessa forma, este método foi aplicado na quantificação de AOH e AME no albedo e flavedo de tangerinas com e sem sintomas da doença mancha marrom de alternaria. E, através destas análises, pode-se chegar à evidência de que a micotoxina AOH está presente nos frutos de tangerinas com uma quantidade

cinco vezes maior ( $17,4 \pm 1,0 \mu\text{g/kg}$ ) do que a micotoxina AME ( $3,5 \pm 0,2 \mu\text{g/kg}$ ). Este resultado corrobora com os resultados observados quando o microrganismo foi cultivado em milho, demonstrando que a elevada produção da micotoxina AOH é uma característica intrínseca do fitopatógeno independente se ele se desenvolve em seu hospedeiro natural. Além disso, ambas as toxinas foram detectadas em todas as amostras de flavedo obtidas de frutos com sintomas de mancha marrom de alternaria. Estes dados demonstram que o fato de não terem sido detectadas as micotoxinas AOH e AME no albedo dos frutos confere ao flavedo uma barreira natural contra a penetração do microrganismo e das micotoxinas nas partes internas da planta.

Além dos estudos realizados visando entender as relações químicas existentes entre as plantas de *Citrus* com seus fungos fitopatogênicos, realizou-se, também, ensaios biológicos com algumas moléculas visando a inibição do microrganismo *Guignardia citricarpa*, causador da doença pinta-preta dos citros. Através dos dados obtidos durante o ensaio de inibição de *G. citricarpa*, *in vitro*, pelo método de germinação de esporos em placas de poliestireno, foi possível observar que todas as substâncias apresentaram o efeito de diminuição na germinação dos esporos do microrganismo. Apenas a substância suberosina apresentou o efeito de estimular a germinação dos esporos de *G. citricarpa*, quando comparado com a solução controle que continha apenas  $\text{H}_2\text{O}$ . Dos compostos ensaiados quatro apresentaram os resultados mais promissores, os dois derivados do ácido benzóico, o ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico e o ácido 3,4-dimetoxibenzóico, e os flavonóides glicosilados naringina e rutina. Essas quatro substâncias foram capazes de, na concentração de  $500 \mu\text{g/mL}$ , inibirem por completo a germinação dos esporos de *G. citricarpa*.

## 6. Referências Bibliográficas

- AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Accumulation of Scoparone, A Phytoalexin Associated With Resistance of *Citrus* to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology*. 78,1675-1682, 1988.
- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 4th ed.; Academic Press: San Diego, CA, p 300. 1997.
- BAILEY, J. A.; MANSFIELD, J. W. *Phytoalexins*. Blackie, Glasgow, 1982.
- BALDI, A.; ROSEN, R. T.; FUKUDA, E. K.; HO, C. T. Identification of Nonvolatile Components in Lemon Peel by High-Performance Liquid Chromatography Whith Confirmation by Mass Spectrometry and Diode-Array Detection, *Journal of Chromatography A*. 718, 89, 1995.
- BAUDOIN, A. B. A. M.; ECKERT, J. W. Development of Resistance Against *Geotrichum candidum* in Lemom Pell Injuries, 75, 174 – 179, 1985.
- BEN – YEHOASHUA, S.; SHAPIRO, B.; KIM, J. J.; SHARONI, J.; CARMELI, S.; KASHMAN, Y. Resistance of Citrus Fruit to Pathogens and its Enhancement by Curing. In R Goren, K Mendel, eds, *Proceedings of the 6<sup>th</sup> Internetal Citrus Congress*. Tel Aviv. 1371 – 1379, 1988.
- BEN – YEHOASHUA, S.; SHAPIRO, B.; MORAN, R. Individual Seal-Pachaging Enables the Use of Curing at High Temperatures to Reduce Decay and Heal Injury of Citrus Fruits. *HortScience*. 22, 777-783, 1987.
- BLANCO, de G. C. *Guignardia citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação Com o Hospedeiro. 200p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

- BRODRICK, H. T.; RABIE, C. J. Light and Temperature Effects on Symptom Development and Sporulation of *Guignardia citricarpa* Kiely, on *Citrus sinensis* (Linn) Osbeck. *Phytophylactica*. 2, 157-164, 1970.
- CAI, D.; KLEINE, M.; KIFLE, S.; HARLOFF, H. J.; SANDAL, N. N.; MARCKER, K. A.; KLEIN-LANKHORST, R. M.; SALENTIJN, E. M. J.; LANGE, W. ; STIEKEMA, W. J.; WYSS, U.; GRUNDLER, R. M. W.; JUNG, C. Positional Cloning of a Gene for Nematode Resistance in Sugar Beet. *Science*. 275:832-4, 1997.
- CHESTER, K. S. The Problem of Acquired Physiological Immunity in Plants. *Q. Rev., Biol.* 8:275-324, 1933.
- DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A.; RICHBERG, M. H. Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-microbe Interaction. *Plant cell*. 8(10):1793-807, 1996.
- DELANEY, T. P. Genetic Dissection of Acquired Resistance to Disease. *Plant Physiol.* 113: 5-12, 1997.
- DE LANGE, J. H.; VINCENT, A. P.; DU PLESSIS, L. M.; VAN WYK, P. J. ACKERMAN, L. G. J. Scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) Induced in *Citrus* Peel By Black Spot, *Guignardia citricarpa* Kiely. *Phytophylactic*. 8, 83-84, 1976.
- DE WIT, P. J. G. M. Fungal Avirulence Genes and Plant Resistance Genes: Unraveling the Molecular Basis of Gene-For-Gene Interactions. In: Andrews, J. H. & Tommerup, I. C. (Ed). *Advances in botanical research*. London, Academic Press, p. 147-85, 1995.
- DONG, Z.; LIU, Z.; QIAN, Y. AN, Y. MIAO, J.; ZHEN, Y. *Carcinogenesis*, 8, 989, 1987.

- DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2:266-74, 1997.
- EL-MOUSALLAMY, A. M. D.; HUSSEIN, S. A. M.; MERFORT, I.; NAWWAR, M. A. M. Unusual Phenolic Glycosides from *Cotoneaster orbicularis*. *Phytochemistry*. 53: 699 – 704, 2000.
- ENGLER, A., Die Natürlichen Pflanzenfamilien. 2<sup>a</sup> ed. Leipzig: Engelmann, 187-458, 1931.
- FELDMAN, A. W., HANKS, R. W. The Occurrence of A Gentisic Glucoside In The Bark And Albedo Of Virus-Infected Citrus Trees. *Phytopathology*. 59, 603-606, 1969.
- FERNÁNDEZ, M. A.; GARCÍA, M. D.; SÁENZ, M. T. Antibacterial Activity of the Phenolic Acids Fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. 53: 11 –14, 1996.
- FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura:  
<http://www.fundecitrus.com.br>
- GALLARDO, G. L.; PEÑA, N. I.; CHACANA, P.; TERZOLO, H. R.; CABRERA, G. M. L-Tenuazonic Acid, A New Inhibitor of *paenibacillus larvae*. *Wordmjournal of Microbiology & Biotechnology* .20, 609-612, 2004
- GARCIA-GRANADOS, A.; GUTIÉRREZ, J. J.; MARTÍNEZ, A.; RIVAS, F.; ARIAS, J. M. Biotransformation of Ent -6 alfa - Acetoxy - And Ent - 6 - Ketomanoyl Oxides With *Rhizopus nigricans* And *Curvularia Lunata* Cultures. *Phytochemistry*. 45, 283,1997.
- GARCIA-GRANADOS, A.; LIÑÁS, E.; MATÍNEZ, A.; RIVAS, F.; ARIAS, J. M. Preparation Of Polyoxygenated Ent-13-Epi-Manoyl Oxides By Chemical-Microbiological Semisyntheses. *Phytochemistry*. 38, 1237, 1995.

- GARRÁN, S. M. Citrus Black Spot in the Northeast of Entre Rios: Etiology, Epidemiology and Control, *Proc. Int. Soc. Citriculture*. Vol. 1, 446, 1996.
- GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of Analytical Methods for Determining Mycotoxins in Foodstuffs. *Trends Anal. Chem.* 21, 468-486, 2002.
- GLIENKE, C. Variabilidade Genética do Fungo Endofítico *Guignardia citricarpa* Kiely Detectada por RAPD. 115p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- GOODMAN, A. N.; NOVACKY, A. The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens. A Resistance Phenomenon. St. Paul, *Am. Phytopathol. Soc.* 1994.
- GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BELTER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J., Benzothiadiazole, A Novel Class of Inducers of Systemic Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat. *Plant Cell*. 8:629-643, 1996.
- GREENBERG, J. T. Programmed cell death: A Way of Life for Plants. *Proc. Natl. Acad. Scie USA*. 93: 102094-7, 1996.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Attachment in Spores of a Plant Pathogenic Fungus. *Science*. 239:288-90, 1996.
- HE, X.-G.; LIAN, L.-Z.; LIN, L.-Z.; BERNART, M. W. High-performance Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry in Phytochemical Analysis of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.). *J. Chromatogr. A*. 791, 127, 1997.
- HOOKER, M. E., LEE, R. F., CIVEROLO, E. L., WANG, S. Y. Reliability of Gentisic Acid, A Fluorescent Marker, For Diagnosis of Citrus Greening Disease. *Plant Disease*. 77:174-180, 1993.

ISMAIL M. A.; ROUSELF, R. L.; BROWN, G. E. Wound Healing in *Citrus*. Isolation and Identification of 7-hydroxycoumarin (Umbeliferone) From Greapfruit Flavedo and Its Effects on *Penicillium digitatum* Sacc. *HortScience*. 13, 358, 1978.

JACH, G.; GORNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINSDORF, E.; LEARCH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. Enhanced Quantitative Resistance Against Fungal Disease by Combinatorial Expression of Different Barley Antifungal Proteins in Transgenic Tobacco. *Plant J.* 8(1):97-109, 1995.

JACKSON, A. O.; TAYLOR, C. B. Plant-microbe Interactions: Life and Death at the Interface. *The plant cell*. 8: 1651-1668, 1996.

JOHAL, G. S.; BRIGGS, S. P. Reductase Activity Encoded by the *HM1* Disease Resistance Gene in Maize. *Science*. 2258:985-7, 1992.

JONES, D. A.; BRANDING, P.; DIXON, M.; HAMMOND-KOSACK, K.; HARRISON, K.; HATZIXANTHIS, K.; PARNISKE, M.; PIEDRAS, P.; TORRES, M.; TANG, S.; THOMAS, C.; JONES, J. D. G. Molecular Genetic, and Physiological Analysis of *Cladosporium* Resistance Gene Function in Tomato. In: Stacey, g.; Mulli, B. & Gresshoff, P. M. (Ed.). Biology of Plant-Microbe Interactions. St. Paul, Intern. Soc. Mol. *Plant-Micr. Interact.* 54-63, 1996.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J. Induction of Systemic Acquired Disease Resistance in Plants by Chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:439-459, 1994.

KIELY, T. B., Black Spot of Citrus. *The Agricultural Gazette*. 17, 1949.



KOGA, G.; YAMAUCHI, T.; SHIMURA, M.; OGAWA, N.; OSHUMA, K.; UMEMURA, K.; KIKUCHI, M.; OGASAWARA, N. Cerebrosides A and C, Sphingolipid Elicitors of Hypersensitive Cell Death and Phytoalexin Accumulation in Rice Plants. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(48), 31985-31991, 1998.

KORYTÁR, P.; PARERA, J.; LEONARDS, P. E. G.; DE BOER, J.; BRINKMAN, U. A. T. Quadrupole Mass Spectrometer Operating In The Electron-Capture Negative Ion Mode As Detector For Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1067, 255-264, 2005.

KOTZÉ, J. M., Epidemiology and Control of Citrus Black Spot in South Africa, *Plant Disease*. vol. 65, n. 12, 1981.

KOVACS, Z.; DINYA, Z.; ANTUS, S. LC-ESI-MS Techniques As Efficient Tools For Characterization Of Nonvolatile Phenolic Compounds of A Special Hungarian Wine. *Journal of Chromatographic Science*. 42: 125-129, 2004.

KUC, J. Induced Immunity to Plant Disease, *BioScience*. 32:854-860, 1982.

LAU, B. P-Y.; SCOTT, P. M.; LEWIS, D. A.; KANHERE, S. R.; CLÉROUX, C.; ROSCOE, V. A. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Fruit Juices and Beverages. *J. Chromatogr. A*. 998, 119-131, 2003.

LEGE, K.E.; COTHREN, J.T. & SMITH, C.W. Phenolic Acid and Condensed Tannin Concentrations of Six Cotton Genotypes. *Environmental and Experimental Botany*. 35:241–249, 1995.

LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Mycosporine-Alanine: A Self-Inhibitor of Germination from the Conidial Mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology*. v. 16, p. 76-86, 1992.

- LELYVELD, L.J & VAN VUUREN, S.P. Peroxidase Activity as a Marker in Greening Disease of Citrus For Assessment of Tolerance and Susceptibility. *Journal of Phytopathology*. 121, 357-362, 1988a.
- LELYVELD, L.J & VAN VUUREN, S.P. The Effect of Gentisic Acid on Activity of Peroxidase From *Citrus aurantifolia* Swing. *Journal of Phytopathology*. 121, 363-365, 1988b.
- LEONARDS-SCHIPPERS, C.; GIEFFERS, W.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. The R1 Gene Conferring Race-Specific Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato is Located on Potato Chromosome V. *Mol. Gen. Genet.* 233(1-2):278-83, 1992.
- LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; MUL'É, G.; MORETTI, A.; PERRONE, G. Epidemiology of Toxigenic Fungi and Their Associated Mycotoxins for Some Mediterranean Crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 645-667, 2003.
- MAGNANI, R. F.; DE SOUZA, G. D.; RODRIGUES-FILHO, E. Analysis of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether on Flavedo and Albedo Tissues of Tangerines (*Citrus reticulata*) with Symptoms of Alternaria Brown Spot. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4980-4986, 2007.
- MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX J. P. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack, *Annals of Botany*. 82, 535-540, 1998.
- McONIE, K. C. Germination and Infection of Citrus by Ascospores of *Guignardia citricarpa* in Relation to Control of Black Spot. *Phytopathology*. v. 57, p. 743-746, 1967.
- McONIE, K. C. The latent Occurrence in Citrus and Others Hosts of a *Guignardia easiluy* Confused With *G. citricarpa*, The Citrus Black Spot Pathogens. *Phytopathology*. v. 48, p. 40-43, 1964.

- MELLO, O.F. DE, ROSSETTI, V., DE CONTI, E. Application of the Fluorescence Test to Citrus Affected by Virus and Viruslike Diseases. Proceedings of 6<sup>th</sup> IOCV, 1974.
- MILLIGAN, S. B.; BODEAU, J.; YAGHOUBI, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P.; WILLIANSO, V. M. The Root Knot Nematode Resistance Gene *mi* From Tomato is a Member of the Leucine Zipper, Nucleotide Binding, Leucine-Rich Repeat Family of Plant Genes. *Plant cell*. 10:1307-19. 1998.
- MORAES, M. G. Mecanismos da Resistência Sistêmica Adquirida Em Plantas, *RAPP*, 6:261-284, 1998.
- MOKBEL, M. S.; SUGANUMA, T. Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Methanol Extracts from Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) Fruit Albedo Tissues. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 39-47, 2006.
- MULLER, K. O.; BÖRGER, H., Experimentelle Untersuchungen Über Die *Phytophthora* Resistance Der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land. Forstwirtschaft*, Berlin-Dahlem. 23, 189-231, 1940.
- PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; Leite, B.; SCHWEN-ESTRADA, K. R. F. Mecanismo de Patogenicidade em Fungos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas, RAPP*. V. 6, pp. 1-47, 1998.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. Vol. 1 e 2. São Paulo, Mc Graw-Hill, 1981.
- RIBEIRO, A. B. Fitoquímica do Excerto de *Citrus sinensis* Sobre *C. limonea* e da Espécie *Nycticalanthus speciosus* (RUTACEAE) e Biossíntese de Cumarinas Preniladas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Tese de doutorado, 124 p.
- RIOV, J. 6,7-Dimethoxycoumarin In The Peel of Gamma-Irradiated Grapefruit. *Phytochemistry*. 10, 1923, 1971.

- ROSS, A. F. Systemic Acquires Resistance Induced By Localized Virus Infections In Plants. *Virology*. 14: 340-358, 1961.
- ROSSETI, V. V. Manual Ilustrado de Doenças dos Citros. Piracicaba: FEALQ/FUNDECITRUS. 207p. 2001.
- SCHWARZ, R. E. & VAN VUUREN, S. P. Centrifugal Extraction of Phenolic Markers for Indexing Citrus Greening and Avocado Sun-blotch Diseases. *Phytophylactica*. 2, 65-68, 1970.
- SCHWARZ, R. E.. Indexing of Greening And Exocortis Through Fluorescent Marker Substances. *Proceedings of 4<sup>th</sup> IOCV*. 118-124, 1968.
- SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; MOHR, H. E.; HUBBARD, J. D.- Ergosterol As a Measure of Fungal Growth. *Phytopathology*. 69 (11): 1202, 1979.
- SERADGE, E.; LIU, Q.; BONNESS, S.; LIU, M.; DIXON, R. A.; MABRY, T. J. Enzymes of B-Ring-Deoxi Flavonoid Biosynthesis in Elicited Cell cultures of Old Man Cactus (*Cephalocereus senilis*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 321(2), 397-404, 1995.
- SHARAN, M.; TAGUCHI, G.; GONDA, K.; JOUKE, T.; SHIMOSAKA, M.; HAYASHIDA, N; OKAZAKI. Effects of Methyl Jasmonate and Elicitor on the Activation of Phenylalanina Ammonia-Lyase and the Accumulation of Scopoletin and Scopolin in Tabbaco Cell Cultures. *Plant Science*. 132, 13-19, 1998.
- TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; DE JESUS JUNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; BOVE, J. M. Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR Detection of the “Candidatus liberibacter” Species Associated With the Disease. *Mol. Cell Probes*. 19, 173-179, 2005a.

- TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; COSTA, P. I.; AYRES, A. J.; BOVE, J. M. "Candidatus liberibacter americanus", Associated With Citrus Huanglongbing (Greening Disease) in São Paulo State, Brazil. *Inst. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1857-1862, 2005b.
- TIAN, Q.; DING, X. Screening for Limonoid Glucosides in *Citrus Tangerina (Tanaka) Tseng* by High-Performance Liquid Chromatography-Electrspray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 874, 13, 2000.
- VANETTEN, H. D.; MATTHEWS, D. E.; MATTHEWS, P. S. Phytoalexin Detoxification: Importance for Pathogenicity and Practical Implications. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 143-164, 1989.
- VAN LELYVELD, L. J.; VAN VUUREN, S. P.; VISSER, G. Gentisic Acid Concentration in Healthy and Greening Infected Fruit Albedo and Leaves of Citrus Sspecies and Cultivars. *South African Journal of Plant Soil.* 5, 209-211, 1988.
- VAN LOON, L. C.; ANTONIW, J. F. Comparison of the Effects of Salicylic Acid and Ethephon With Virus-Induced Hypersensitivity and Acquired Resistanse in Tobacco. *Neth. J. Plant Pathol.* 88:237-256, 1982.
- VAN VUUREN, S. P. & DA GRAÇA, J. V. Comparison of Thin Layer Chromatographic Methods for Indexing Citrus Greening Disease. *Phytophylactica*, 9, 91-94, 1977.
- VERNENGI, A.; RAMIANDRASOA, F.; CHUILON, S.; RAVISE, A. Phytoalexines Dês Citrus: Seseline Proprietes Inhibitrices est Modulation de Synthèse. *Fruits.* 42, 103-111, 1971.
- WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. - *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales.* London, Academic Press, 1983.

WHITE, R. F. Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Induces Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Tobacco. *Virology*. 99:410-412, 1979.

WEITING, N.; FAHRENDORF, T.; BALLANCE, M.; LAMB, C. J.; DIXON, R. A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XX. Transcriptional Activation of Phenylpropanoid Pathway Genes in Elicitor-Induced Cell Suspension Cultures. *Plant Molecular Biology*. 30 427-438, 1996.

Wu-H; Calvarano, M.; Di Giacomo, A. . Some Flavanones in the Peel of Ten Citrus Species and Varieties in China. *Essenze-Derivati-Agrumari*. 61, 103-112, 1991.

ZOOK, M. Biosynthesis of Camalexin From Tryptophan Pathway Intermediates in Cell-Suspension Cultures of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 118, 1389-1393, 1998.

