

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química

ESTUDO DA VARIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE
Citrus sinensis **SOBRE** *Citrus limonia* **APÓS A**
INOCULAÇÃO DA BACTÉRIA *Xylella fastidiosa*

MÁRCIO SANTOS SOARES

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

Orientadora: Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

***Bolsista CNPq**

São Carlos – SP

2011

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

S676ev

Soares, Márcio Santos.

Estudo da variação do perfil químico de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia* após a inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa* / Márcio Santos Soares. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

355 p.

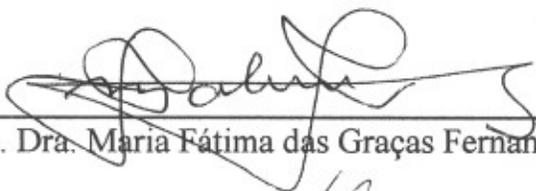
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Produtos naturais. 2. Fitoalexina. 3. Perfil químico. 4. Cumarinas. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Título.

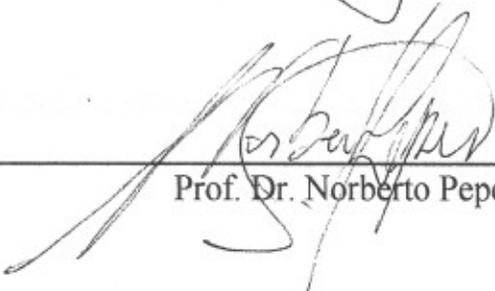
CDD: 547.3 (20^a)

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 **Marcio Santos Soares**, realizada em 22 de junho de 2011:*



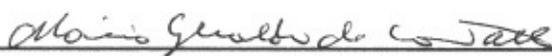
Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



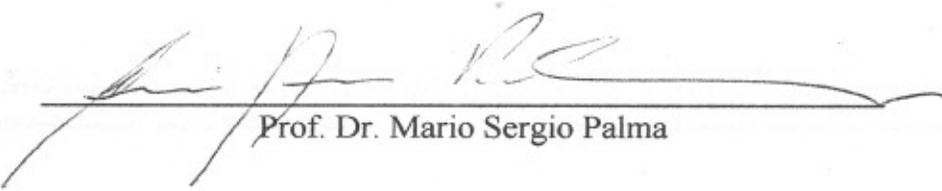
Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes



Prof. Dr. João Batista Fernandes



Prof. Dr. Mario Geraldo de Carvalho



Prof. Dr. Mario Sergio Palma

“I see trees of green, red roses too
I see them bloom for me and you
And I think to myself, what a wonderful world

I see skies so blue and clouds of white
The bright blessed day, the dark sacred night
And I think to myself, what a wonderful world

The colors of the rainbow, so pretty in the sky
Are also on the faces of people going by
I see friends shaking hands, saying, "how do you do?"
They're really saying, "I love you"

I hear babies cry, I watch them grow
They'll learn much more, than I'll never know
And I think to myself, what a wonderful world

Yes, I think to myself, what a wonderful world”

Louis Armstrong

Dedico este trabalho,

Aos meus Pais Sebastião e Gorete pelo eterno apoio, incentivo, amor e carinho depositados em mim e por serem duas gigantes pessoas em caráter, garra, luta e ensinamentos.

A minha querida esposa Fernanda, pelo seu carinho, companheirismo, amizade, constante apoio em todas as decisões tomadas por mim e acima de tudo pelo seu grande amor por mim.

Aos meus irmãos Lúcio, Cássio, Lucas e Fernanda, sempre me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Agradecimentos

Agradeço ao nosso bondoso e querido Deus por me dar saúde e paz, fé e esperança todos os dias de minha vida e por cuidar sempre de mim e da minha família, em todos os momentos, até naqueles mais difíceis.

À minha orientadora a Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela orientação, pela paciência, grande amizade, pela atenção, pelos ensinamentos e por acreditar que eu seria capaz de desenvolver este trabalho.

Aos Professores do Laboratório de Produtos Naturais, Dr. João Batista Fernandes, Dr. Paulo Cezar Vieira e Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos meus pais por sempre me incentivarem, me amarem e me mostrarem o caminho do bem.

Aos meus irmãos Lúcio, Cássio, Lucas e Fernanda pela força e fraternidade.

À minha esposa Fernanda, pelo amor, carinho e compreensão depositados em mim.

Aos meus sogros Graça e José Chaves, minhas cunhadas Renata e Racchel, meu cunhado Valdivino e ao meu sobrinho Gabriel pela força, torcida e incentivo.

A todos amigos, do Laboratório de Produtos Naturais PN-UFSCar, sem exceção, e em especial aos grandes amigos Sebastian, Thiago, Karine, Douglas e Moacir Forim, Alan, Patrícia Verardi, Patrícia Braga, Djalma, Patrícia Marinho, Andrey, Uir e Waldir e por todo apoio carinho, amizade e companheirismo e por muitas vezes, pararem seus trabalhos para me ajudar.

Aos grandes amigos Caio e Juliana por todos os excelentes momentos vividos em São Carlos e Brasil afora, pelas horas de conversas e pela amizade e confiança nesses anos de UFSCar. Aos amigos Rodolfo, Patrícia e Danilo pela amizade e “papos” cabeça nessa jornada.

A Elisângela e à Katyuscya grandes amigas, que além dos bons conselhos e companheirismo me ensinaram muito sobre a quimiometria e à High Resolution; um muito obrigado de coração.

Aos meninos da República Pai D'Égua, Titi, Azeite, Lucas e Paulo pela estadia e pelas descontrações.

À MSc. Taicia Pacheco Fill pela realização dos experimentos de LC-MS e pela amizade.

À Dra Cristina Daolio pela amizade e pela realização dos experimentos de LC-NMR na Alemanha.

Ao Professor Dr. Edenir pelos ensinamentos e análises quimiométricas.

À Dra. Alessandra Alves de Sousa, juntamente com todo o pessoal do Centro de Citricultura Apta Citros IAC- Cordeirópolis pelos ensinamentos transmitidos no manuseio e na avaliação da *X. fastidiosa*, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às secretárias do PPG-Q Ariane, Cristina e Luciani pela amizade e pela força dada a mim.

Aos professores e funcionários do DQ/UFSCar em especial à Luciana, Paulo e Valdir pela eterna paciência e pela amizade.

A todos os colegas da Analítica, físico-química e inorgânica pelas confraternizações e pela amizade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos novos amigos e colegas de trabalho da Universidade Federal de Viçosa-Campus Rio Paranaíba, em especial à Lili, Pedro Good God, Marcus, Rejane, Jaqueline, Luciano e Vânia; que tenhamos pelo menos mais 30 anos de excelente convivência.

Ao Professor Luciano Baião e a Professora Tânia Valquíria, diretores da UFV-CRP por me apoiarem nessa reta final de conclusão de curso.

À minha egressa UFV, que gentilmente cedeu tempo e disposição para que eu pudesse finalizar mais um sonho profissional e pessoal.

E à todos que, de alguma forma, colaboraram no desenvolvimento desse trabalho.

Abreviaturas e Símbolos

δ = deslocamento químico

ACN = acetonitrila

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

CDCN = acetonitrila deuterada

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPMG- Carr-Purcell-Meibbom-Gil sequence

CVC = Clorose Variegada do Citros

d = dubleto

D₂O = Água deuterada

DAD = *Diode Arrange Detector*

dd = duplo dubleto

EM = Espectrometria de massas

ESI = *Electrospray Ionization*

GC-MS = *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

HCA = *Hierarchical Clusters Analysis*

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-NMR = *High Performance Liquid Chromatography coupled to Nuclear Magnetic Resonance*

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

HR-MAS = *High Resolution Magic Angle Spinning*

i-PropOH = isopropanol

J = constante de acoplamento

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

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de Quantificação

m = multiplete

m/z = relação massa/carga

MALDI = *Matrix Absorption Laser Desorption Ionization*

MEOH = metanol

MHz = Megahertz

MS = *Mass Spectrometry*

PCA = *Principal Components Analysis*

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

ppm = partes por milhão

RMN = Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s = singlete

SPE = *Solid-Phase Extraction*

SRM = *Selected Reaction Monitoring*

THF = tetraidrofurano

TIC = *Total Ion Chromatogram*

TMSP-d₄-3-trimetil-2,2,3,3-d₄-propionato de sódio

TOF = Time of Fly

TSPA-d₄- Ácido 2,2,3,3-d₄-3-trimetilsililpropiónico

t_R = tempo de retenção

UV = *Ultraviolet Detector*

μg/g = microgramas por grama

μm = micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Reagentes necessários para o preparado do tampão de extração de DNA genômico total (planta + bactéria) com sarcosyl.....	44
Tabela 4.2. Proporção entre padrões e reagentes necessários para o preparo do “mix” utilizado juntamente com o DNA genômico total na análise de PCR.....	44
Tabela 4.3. Reagentes utilizados no preparo do gel de agarose.....	45
Tabela 5.1. Tabela de variância para a análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de todas as partes vegetais dos citros estudados.....	74
Tabela 5.2. Precisão (CV%) e exatidão (%) determinadas para a curva de calibração externa do padrão xantiletina.....	118
Tabela 5.3. Precisão (CV%) e exatidão (%) determinadas para a curva de calibração externa do padrão seselina.....	118
Tabela 5.4. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação da cumarina xantiletina.....	121
Tabela 5.5. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação da cumarina seselina.....	122
Tabela 5.6. Valores de exatidão para o teste cego da xantiletina.....	122
Tabela 5.7. Valores de exatidão para o teste cego da seselina.....	122
Tabela 5.8. Concentração de xantiletina nas raízes de <i>citrus</i>	124
Tabela 5.9. Concentração de seselina nas raízes de <i>citrus</i>	124
Tabela 5.10. Parâmetros utilizados no LC-MS\MS.....	128
Tabela 5.11. Valores percentuais de precisão e exatidão, do método de quantificação da cumarina xantiletina.....	135
Tabela 5.12. Valores percentuais de precisão e exatidão, do método de quantificação da cumarina seselina.....	136
Tabela 5.13. Recuperação/eficiência de extração dos metabólitos quantificados	

nas folhas e caules de <i>citrus</i>	137
Tabela 5.14. Concentração da cumarina xantiletina nas matrizes de folhas e caules dos citros estudados.....	138
Tabela 5.15. Concentração da cumarina seselina nas matrizes de folhas e caules dos citros estudados.....	139
Tabela 5.16. Precisão (CV%) e exatidão (%) determinadas para a curva de calibração externa do padrão hesperidina.....	152
Tabela 5.17. Precisão (CV%) e exatidão (%) determinadas para a curva de calibração externa do padrão rutina.....	152
Tabela 5.18. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação do flavonóide hesperidina.....	155
Tabela 5.19. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação do flavonóide rutina.....	156
Tabela 5.20. Concentração (mg/Kg de planta seca) de hesperidina e rutina nas partes superiores das matrizes dos citros estudados.....	157
Tabela 5.21. Extratos das raízes dos citros estudados contendo as cumarinas xantoarnol, diidrosuberenol e decursinol com suas respectivas áreas.....	172
Tabela 5.22. Extratos das raízes dos citros estudados contendo ulopterol com suas respectivas áreas.....	182
Tabela 5.23. Extratos das raízes dos citros estudados contendo as cumarinas ostol e suberosina com suas respectivas áreas.....	188
Tabela 5.24. Extratos das raízes dos citros estudados contendo a cumarina suberenol com suas respectivas áreas.....	190
Tabela 5.25. Extratos das raízes de <i>citrus</i> contendo a cumarina citrubutina com suas respectivas áreas.....	193
Tabela 5.27. Extratos das raízes dos citros estudados contendo a cumarina nordentatina com suas respectivas áreas.....	200
Tabela 5.28. Extratos das raízes dos citros estudados contendo a cumarina	

clausarina com suas respectivas áreas.....	197
Tabela 5.29. Extratos das raízes dos citros estudados contendo o limonóide limonina diosfenol com suas respectivas áreas.....	207
Tabela 5.30. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da cumarina citropteno em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).....	215
Tabela 5.31. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da cumarina bergapteno em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).....	220
Tabela 5.32. Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do flavonóide tangeretina (banda 7, ou 10) em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).....	239
Tabela 5.33. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do flavonóide 5 (ou 7)-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).....	241
Tabela 5.34. Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) para os derivados do ácido cinâmico identificados via LC-NMR nos citros estudados (as constantes J estão em Hz).....	276
Tabela 5.35. Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do flavonóide 3',4',3,5,6,7-hexametoxiflavona em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz). As constantes J estão em Hz.....	278
Tabela 5.36. Deslocamentos químicos (δ ppm) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do flavonóide 7- β ,D-glicosil-3',4',5'-triidroxi-5-metoxiflavanona. em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz) do flavonóide hesperetina glicosilada.....	286

Tabela 5.37. Deslocamentos químicos (δ ppm) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do flavonóide sinensetina em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).....	290
Tabela 6.1. Variação do perfil químico dos citros estudados: dados dos cromatogramas de íon selecionado.....	296

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Espécime de laranja pêra enxertada sobre o limão cravo.....	2
Figura 1.2. Estruturas dos flavonóides isolados de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar.....	8
Figura 1.3. Estruturas dos limonóides, triterpeno e alcalóide isolados de citros pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar.....	8
Figura 1.4. Estruturas das cumarinas isoladas de citros pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar.....	9
Figura 1.5. Alguns estágios de folhas, frutos e plantas com sintomas de CVC (Fonte: http://www.lbi.ic.unicamp.br/xylella_cvc-strain/home/mmachado.html).....	11
Figura 1.6. Colônias de bactéria <i>X. fastidiosa</i> , causadora da CVC em citros (Fonte: http://revistapesquisa.fapesp.br/arq/r/pt/915/art3707img2.jpg , © Elliot W. Kitajma/USP).....	15
Figura 1.7. Esquema dos componentes de um Espectrômetro de Massas.....	19
Figura 1.8. Representação esquemática de uma interface do tipo APCI no sistema EM.....	21
Figura 1.9. Esquema de um analisador de massas do tipo quadrupolar.....	23
Figura 1.10. Sequência de pulsos CPMG.....	28
Figura 1.11. Esquema do sistema de HPLC-UV-SPE-NMR. (Fonte: Souza 2009, © Gezimar Donizetti de Souza/UFSCar).....	30
Figura 5.1. Gel de agarose dos produtos amplificados por PCR do DNA extraído das folhas de citros após a inoculação da bactéria <i>X. fastidiosa</i> : 1 até 70 plantas; N= controle negativo (água); M= marcadores.....	60
Figura 5.2. Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), em comparação com aqueles obtidos para os caules inferiores da laranja	

pêra (CLP) e limão cravo (CLC). Experimentos realizados em triplicatas e estes espectros referem-se àquele denominado como a. Espectro com supressão do sinal da água (D ₂ O, 400 Mz).....	64
Figura 5.3. Espectros de RMN-HR de ¹ H das amostras dos caules inferiores dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, CIEC, caule inferior com sintoma CIECS, caule inferior sem sintoma CIESS) em comparação com aqueles obtidos para os mesmos órgãos das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC), com supressão do sinal da água ((D ₂ O, 400 Mz).....	67
Figura 5.4. Espectro de RMN HR-MAS de ¹ H da amostra do caule inferior do limão cravo (CLCa) separado daqueles das demais matrizes, com supressão do sinal da água ((D ₂ O, 400 Mz).....	68
Figura 5.5. Espectros comparativos de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras dos caules superiores dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, CSEC, caule superior com sintoma CSECS, caule superior sem sintoma CSESS) em comparação com aqueles obtidos para a laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC), com supressão do sinal da água (D ₂ O, 400 Mz).....	70
Figura 5.6. Espectros comparativos de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS) em comparação com aqueles obtidos para os caules das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC), com supressão do sinal da água ((D ₂ O, 400 Mz).....	71
Figura 5.7. Gráfico de linhas correspondentes aos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma, RECS, raízes sem sintoma, RESS), em comparação com aqueles obtidos para os caules inferiores das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). Os blocos em cinza mostram as regiões do espectro excluídas na análise de quimiometria. (D ₂ O,	

400 Mz).....	73
Figura 5.8. Gráfico da variância versus os números de PCs, para a análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de todas as partes vegetais dos citros estudados.....	75
Figura 5.9. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de todas as partes vegetais dos citros estudados. As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	76
Figura 5.10. Dendograma obtido na análise por HCA com os dados de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), das folhas dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS), das folhas do limão cravo (FLC) e da laranja pêra (FLP), dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz. (similaridade de 0,25%).....	77
Figura 5.11. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	79
Figura 5.12. Dendograma obtido na análise por HCA com os dados de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). (similaridade de 0,38%).....	80

Figura 5.13. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H, região de δ 1,0 a 3,0, das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	81
Figura 5.14. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H, região de δ 3,0 a 5,5, das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	82
Figura 5.15. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H, região de δ 6,5 a 8,0, das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	83
Figura 5.16. Dendograma obtido na análise por HCA com os dados de RMN HR-MAS de ¹ H, região de δ 6,5 a 8,0, das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). (similaridade de 0,48%).....	83
Figura 5.17. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIE e CSE respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a	

cada matriz.....	84
Figura 5.18. Ampliação do gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados.....	85
Figura 5.19. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSE respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	86
Figura 5.20. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 3,0 a 5,5, das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	87
Figura 5.21. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 6,8 a 8,0, das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	88
Figura 5.22. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos	

os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras das raízes dos citros estudados (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, RE; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	89
Figura 5.23. Dendograma obtido na análise por HCA com os dados de RMN HR-MAS de ^1H das amostras das raízes dos citros estudados (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, RE; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC). (similaridade de 0,25%).....	90
Figura 5.24. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das amostras das raízes dos citros estudados (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	91
Figura 5.25. Gráfico de <i>loadings</i> (PC2) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das matrizes das raízes dos citros estudados.....	92
Figura 5.26. Gráfico de linhas dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das matrizes das raízes dos citros estudados, destacando em amarelo as variáveis descritas por valores negativos de PC2 responsáveis pela diferenciação das raízes de laranja pêra.....	92
Figura 5.27. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 3,0 a 5,5, das amostras das raízes dos citros estudadas (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC).....	93
Figura 5.28. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H (região aromática) das	

amostras das raízes dos citros estudadas (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, RE; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC).....	94
Figura 5.29. Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP), ($\lambda = 260$ nm).....	96
Figura 5.30. Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos dos caules inferiores dos caules inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior sem inocular a bactéria, CIEC; caule inferior com sintoma, CIECS; caule inferior sem sintoma, CIESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC), ($\lambda = 260$ nm).....	97
Figura 5.31. Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos dos caules superiores dos citros estudados (amostra padrão do caule superior sem inocular a bactéria, CSEC; caule superior com sintoma, CSECS; caule superior sem sintoma, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC), ($\lambda = 260$ nm).....	98
Figura 5.32. Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos das raízes dos citros estudados (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC). ($\lambda = 260$ nm).....	99
Figura 5.33. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cromatogramas das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), das folhas dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma	

FESS), das folhas do limão cravo (FLC) e da laranja pêra (FLP), dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz, ($\lambda = 260$ nm).....	102
Figura 5.34. Ampliação do gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm), contendo todas as matrizes das partes vegetais dos citros estudados.....	103
Figura 5.35. Dendograma dos dados cromatográficos ($\lambda = 260$ nm), das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), das folhas dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS), das folhas do limão cravo (FLC) e da laranja pêra (FLP), dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz, (similaridade de 0,20%).....	104
Figura 5.36. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm), das amostras das folhas dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS), das folhas do limão cravo (FLC) e da laranja pêra (FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.....	105
Figura 5.37. Ampliação do gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm) das amostras das folhas dos citros estudados.....	106
Figura 5.38. Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm) das amostras das folhas dos citros estudados.....	107
Figura 5.39. Gráfico de linhas dos cromatogramas das amostras das folhas dos citros estudados, destacando em amarelo as variáveis responsáveis pela	

diferenciação das matrizes.....	107
Figura 5.40. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cromatogramas das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIE e CSE respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC), ($\lambda = 260$ nm).....	108
Figura 5.41. Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos cromatogramas das amostras das raízes dos enxertos (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS), das raízes da laranja pêra (RLP) e do limão cravo (RLC), ($\lambda = 260$ nm).....	110
Figura 5.42. Gráfico de <i>loadings</i> (PC1 x PC2) dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm), das matrizes das raízes dos citros estudados.....	110
Figura 5.43. Gráfico linhas dos cromatogramas das matrizes das raízes dos citros estudados, destacando em amarelo as variáveis responsáveis pela diferenciação das matrizes.....	111
Figura 5.44. Estruturas moleculares das cumarinas preniladas xantiletina (1) e seselina (2).....	113
Figura 5.45. a) Cromatograma do extrato das raízes do enxerto Cs-Cl com sintomas de CVC; b) ampliação do cromatograma mostrando a separação entre as cumarinas; c) e d) espectros de UV da xantiletina e seselina respectivamente; e) e f) curvas de pureza de banda cromatográfica entre 190 e 600 nm para as cumarinas xantiletina e seselina respectivamente.....	114
Figura 5.46. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da cumarina xantiletina em raízes do enxerto Cs-Cl.....	119
Figura 5.47. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da cumarina seselina em raízes do enxerto Cs-Cl.....	120

Figura 5.48. Concentração das cumarinas xantiletina e seselina nas raízes dos citros estudados. Matrizes de raízes de: laranja pêra (RLP), limão cravo (RLC), enxerto de Cs-Cl sem inoculação da bactéria (REC), enxerto de Cs-Cl onde a bactéria foi inoculada, mas não apresentaram sintomas (RESS) e enxerto de Cs-Cl com sintomas de CVC (RECS).....	125
Figura 5.49. Espectro de massas (<i>full scan</i>) para a cumarina xantiletina no modo positivo de ionização AP+.....	129
Figura 5.50. Espectro de íons produtos para a cumarina xantiletina no modo positivo de ionização AP+, energia de colisão de 25 eV, mostrando a transição mais estável m/z 229→ 213.....	129
Figura 5.51. Espectro de massas (<i>full scan</i>) para a cumarina xantiletina no modo positivo de ionização AP+.....	130
Figura 5.52. Espectro de íons produtos para a cumarina seselina no modo positivo de ionização AP+, energia de colisão de 25 eV, mostrando a transição mais estável m/z 229→ 175.....	130
Figura 5.53. Proposta de fragmentação para a xantiletina no modo positivo AP+.....	131
Figura 5.54. Proposta de fragmentação para a seselina no modo positivo AP+.....	131
Figura 5.55. Cromatograma de SRM para as concentrações 0,01 (a) e 10 ug/mL (b) da cumarina xantiletina.....	132
Figura 5.56. Cromatograma de SRM para as concentrações 0,01 (a) e 10 ug/mL (b) da cumarina seselina.....	133
Figura 5.57. Curva de calibração por padronização externa para o método de quantificação da cumarina xantiletina nas folhas e caules dos citros estudados	134
Figura 5.58. Curva de calibração por padronização externa para o método de quantificação da cumarina seselina nas folhas e caules dos citros estudados....	134
Figura 5.59. Concentração das cumarinas xantiletina e seselina nas folhas	

dos citros estudados.....	140
Figura 5.60. Concentração das cumarinas xantiletina e seselina nos caules dos citros estudados.....	140
Figura 5.61. Estruturas moleculares dos flavonóides hesperidina (3) e rutina (4).....	143
Figura 5.62. Cromatograma do padrão hesperidina concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 µm Fase móvel H ₂ O:ACN:Ácido Acético 71:27:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.....	145
Figura 5.63. Cromatograma do padrão naringina concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 µm Fase móvel H ₂ O:ACN:Ácido Acético 71:27:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.....	145
Figura 5.64. Cromatograma da mistura contendo os dois padrões: hesperidina e naringina concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 µm Fase móvel H ₂ O:ACN:Ácido Acético 71:27:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.....	146
Figura 5.65. Cromatograma de uma amostra das folhas de um dos citros estudados. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 µm Fase móvel H ₂ O:ACN:Ácido Acético 71:27:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.....	146
Figura 5.66. Cromatograma da mistura contendo os padrões hesperidina e naringina na concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 5x4,6 mm 10 µm Fase móvel H ₂ O:THF:Acido Acético 77:21:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.....	147
Figura 5.67. Cromatograma da mistura contendo os padrões hesperidina, rutina e naringina na concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 5x4,6 mm 10 µm. Fase móvel H ₂ O:THF:Acido Acético 77:21:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.....	148
Figura 5.68. Cromatograma da mistura contendo os padrões hesperidina, rutina e naringina (100 µg/ml). Condições analíticas: Coluna Gemini C18	

25x4,6 mm 10 μ m. Fase móvel H ₂ O:ACN:THF:Acido Fórmico 78:6:16:0,1 λ =282nm, fluxo 1,0 ml/min.....	149
Figura 5.69. Cromatograma da mistura contendo os padrões hesperidina e rutina (100 e 50 μ g/ml respectivamente).....	150
Figura 5.70. Cromatograma da matriz das folhas do enxerto de <i>C. sinensis</i> / <i>C. limonia</i> com sintomas de CVC.....	150
Figura 5.71. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da hesperidina nas folhas do limão cravo.....	153
Figura 5.72. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da hesperidina nos caules do limão cravo.....	154
Figura 5.73. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da rutina nas folhas do limão cravo.....	154
Figura 5.74. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da rutina nos caules do limão cravo.....	154
Figura 5.75. Concentração dos flavonóides hesperidina e rutina nas matrizes de folhas dos citros estudados.....	158
Figura 5.76. Concentração dos flavonóides hesperidina e rutina nas matrizes de caules dos citros estudados.....	158
Figura 5.77. Espectros de massas obtidos para umbeliferona por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>full scan</i> ; B) íons produto de <i>m/z</i> 163...	163
Figura 5.78. Proposta de fragmentação para a cumarina umbeliferona.....	164
Figura 5.79. Espectros de massas obtidos para metoxiseselina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>full scan</i> ; B) íons produto de <i>m/z</i> 259.	165
Figura 5.80. Proposta de fragmentação para a cumarina metoxiseselina.....	166
Figura 5.81. Espectros de massas obtidos para umbeliferona por APCI no	

modo positivo de análise: A) Espectro <i>full scan</i> ; B) íons produto de m/z 261...	167
Figura 5.82. Proposta de fragmentação para a cumarina tamarina.....	168
Figura 5.83. Cromatogramas HPLC-DAD comparativos dos extratos das raízes dos citros estudados.....	168
Figura 5.84. Ampliação dos cromatogramas HPLC-DAD comparativos dos extratos das raízes dos citros estudados.....	169
Figura 5.85. Cromatograma de íons totais (TIC) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das raízes dos citros estudados, RLP, RLC, REC, RECS e RESS respectivamente.....	170
Figura 5.86. Cromatogramas HPLC-DAD do extrato das raízes de laranja pêra com os respectivos sinais cromatográficos identificados.....	171
Figura 5.87a. Espectros de massas obtidos para a cumarina xantoarnol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>íon selecionado</i> ; B) íons produto de m/z 263.....	173
Figura 5.87b. Proposta de fragmentação para a cumarina xantoarnol.....	174
Figura 5.87c. Espectros de massas obtidos para a cumarina diidrosuberenol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>íon selecionado</i> ; B) íons produto de m/z 263.....	175
Figura 5.87d. Proposta de fragmentação para a cumarina diidrosuberenol.....	176
Figura 5.87e. Espectros de massas obtidos para a cumarina decursinol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>íon selecionado</i> ; B) íons produto de m/z 263.....	177
Figura 5.87f. Proposta de fragmentação para a cumarina decursinol.....	178
Figura 5.87g. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=263$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	179
Figura 5.88a. Espectros de massas obtidos para a cumarina ulopterol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>íon selecionado</i> ; B) íons produto de m/z 279.....	181

Figura 5.88b. Proposta de fragmentação para a cumarina ulopterol.....	181
Figura 5.88c. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=279$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	182
Figura 5.89a. Espectros de massas obtidos para a cumarina ostol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>íon selecionado</i> ; B) íons produto de m/z 245.....	185
Figura 5.89b. Espectros de massas obtidos para a cumarina suberosina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>íon selecionado</i> ; B) íons produto de m/z 245.....	185
Figura 5.89c. Proposta de fragmentação para a cumarina ostol.....	186
Figura 5.89d. Proposta de fragmentação para a cumarina suberosina.....	187
Figura 5.89e. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=245$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	188
Figura 5.90a. Espectros de massas obtidos para a cumarina suberenol por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 261.....	189
Figura 5.90b. Proposta de fragmentação para a cumarina suberenol.....	190
Figura 5.90c. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=261$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	191
Figura 5.91a Espectros de massas obtidos para a cumarina citrubutina por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 243.....	192
Figura 5.91b. Proposta de fragmentação para a cumarina citrubutina.....	192
Figura 5.91c Cromatograma de íons selecionados ($m/z=243$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	193
Figura 5.92a. Espectro de massas obtido para a cumarina nordentatina por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 313.....	194

Figura 5.92b. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=313$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	195
Figura 5.92c. Proposta de fragmentação para a cumarina nordentatina.....	196
Figura 5.93a. Espectros de massas obtidos para cumarina clausarina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>íon selecionado</i> ; B) íons produto de $m/z 381$	198
Figura 5.93b. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=381$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	198
Figura 5.93c. Proposta de fragmentação para a cumarina clausarina.....	199
Figura 5.94a. Espectros de massas obtidos para o limonóide limonina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro <i>íon selecionado</i> ; B) íons produto de $m/z 471$	201
Figura 5.94b. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=471$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das raízes RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	201
Figura 5.94c. Proposta de fragmentação para o limonóide limonina.....	202
Figura 5.94d. Continuação da proposta de fragmentação para o limonóide limonina.....	203
Figura 5.94e. Continuação da proposta de fragmentação para o limonóide limonina.....	204
Figura 5.95a. Espectro de massas obtido para o limonóide limonina diosfenol por APCI no modo positivo de análise: Espectro <i>íon selecionado</i>	206
Figura 5.95b. Espectro de massas obtido para o limonóide limonina diosfenol por APCI no modo positivo de análise: íons produto de $m/z 485$	206
Figura 5.95c. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=485$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	207

Figura 5.95d. Proposta de fragmentação para o limonóide limonina diosfenol.....	208
Figura 5.96. Cromatogramas HPLC-DAD comparativos dos extratos das folhas dos citros estudados.....	209
Figura 5.97. Ampliação dos cromatogramas HPLC-DAD comparativos dos extratos das folhas dos citros estudados.....	209
Figura 5.98. Cromatogramas de íons totais (TIC) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.....	210
Figura 5.99. Cromatogramas HPLC-DAD comparativos do extrato das folhas do limão cravo com os respectivos sinais cromatográficos identificados.....	211
Figura 5.100. Projeção do Cromatograma de LC-NMR das folhas do limão cravo obtido via software Micronal Origin.....	212
Figura 5.101. Cromatograma de HPLC-NMR das folhas do limão cravo especificando as bandas cromatográficas “trapeadas” em cartucho de SPE para posterior análise.....	213
Figura 5.102. Estrutura da cumarina citropteno.....	215
Figura 5.103. Espectro de massas obtido para a cumarina citropteno por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 207.....	216
Figura 5.104. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da cumarina citropteno.....	216
Figura 5.105. Proposta de fragmentação da cumarina citropteno.....	217
Figura 5.106a. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=207$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.....	218
Figura 5.107. Possíveis estruturas das furanocumarinas pertencentes ao sinal cromatográfico 2.....	219
Figura 5.108. Espectro de massas obtido para a cumarina bergapteno por	

APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 217.....	221
Figura 5.109. Proposta de fragmentação da cumarina bergapteno.....	221
Figura 5.110. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da cumarina bergapteno.....	222
Figura 5.111. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=217$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.....	223
Figura 5.112. Estrutura dos flavonóides sinensetina, 5-demetoxinobiletina e tangeretina.....	224
Figura 5.113. Espectros de massas obtidos para a banda cromatográfica 3 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 373 e 343.....	225
Figura 5.114. Espectros de massas obtidos para a banda cromatográfica 4 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 373 e 343.....	225
Figura 5.115. Espectros de massas obtidos para banda cromatográfica 7 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 373 e 343.....	226
Figura 5.116. Proposta de formação do íon $m/z = 291$ referente à banda cromatográfica 7.....	226
Figura 5.117. Propostas de formação dos íons m/z 343, 133, 135, 183 e 211 referentes à banda cromatográfica 7.....	228
Figura 5.118a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 7 ou 10, flavonóide tangeretina.....	230
Figura 5.118b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 7 ou 10, flavonóide tangeretina.....	230
Figura 5.118c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 7 ou 10, flavonóide tangeretina.....	230
Figura 5.119. Propostas de formação do íon $m/z= 358$ referentes às bandas cromatográficas 3 e 7.....	233
Figura 5.120. Proposta de formação dos íons $m/z= 357, 329, 327$ e 312	

referentes à banda cromatográfica 4.....	233
Figura 5.121. Propostas de formação dos íons produtos $m/z=181, 165, 163$ e 153 referentes às bandas cromatográficas 3 e 4.....	234
Figura 5.122. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=373$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.....	237
Figura 5.123. Fórmulas estruturais dos flavonóides 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona, 6-hidroxi-3',4',5,7,8-pentametoxiflavona e 7-hidroxi-3',4',5,6,8-pentametoxiflavona.....	238
Figura 5.124. Espectro de massas obtido para a banda cromatográfica 5 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de $m/z 389$	239
Figura 5.125. Proposta de fragmentação do flavonóide 5-hidroxi-3', 4',6,7,8-pentametoxiflavona.....	239
Figura 5.126. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) do flavonóide 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona.....	242
Figura 5.127. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) do flavonóide 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona.....	242
Figura 5.128. Espectro de massas obtido para a banda cromatográfica 8 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de $m/z 389$	244
Figura 5.129. Proposta de fragmentação do flavonóide 6-hidroxi-3', 4',5,7,8-pentametoxiflavona.....	245
Figura 5.130. Espectros de massas obtidos para a banda cromatográfica 6 por APCI no modo positivo de análise: íons produtos de (a) $m/z 403$ e (b) 373	246
Figura 5.131. Proposta de fragmentação do flavonóide nobiletina.....	247
Figura 5.132. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=403$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.....	249
Figura 5.133a. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=207$) APCI no	

modo positivo de ionização dos extratos dos seguintes caules inferiores: CLP, CLC, CIEC, CIESS e CIECS, respectivamente.....	252
Figura 5.133b. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=207$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos dos seguintes caules superiores: CLP, CLC, CSEC, CSESS e CSECS, respectivamente.....	252
Figura 5.133c. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=207$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	253
Figura 5.134a. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=217$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos dos seguintes caules inferiores: CLP, CLC, CIEC, CIESS e CIECS, respectivamente.....	254
Figura 5.134b. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=217$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos dos seguintes caules superiores: CLP, CLC, CEC, CESS e CECS, respectivamente.....	255
Figura 5.134c. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=217$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.....	255
Figura 5.135. Cromatograma de HPLC-NMR das folhas de limão cravo especificando as bandas cromatográficas “trapeadas” em cartucho de SPE.....	257
Figura 5.136. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 1.....	259
Figura 5.137. Provável rota biogenética para formação referente à banda cromatográfica 1.....	259
Figura 5.138a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 1.....	260
Figura 5.138b. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 1.....	260
Figura 5.138c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 1.....	261

Figura 5.139. Prováveis estruturas das substâncias referentes à banda cromatográfica 2.....	262
Figura 5.140a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) dos compostos referentes à banda cromatográfica 2.....	262
Figura 5.140b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) dos compostos referentes à banda cromatográfica 2.....	263
Figura 5.140c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) dos compostos referentes à banda cromatográfica 2.....	263
Figura 5.141. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 3.....	264
Figura 5.142. Provável rota biogenética para formação do composto ácido 3-(2,3,4-trihidroxi-1,5-lactona)-4-metoxi cinâmico, especificando as constantes de acoplamento da conformação cadeira adotada pela molécula.....	265
Figura 5.143a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 3.....	265
Figura 5.143b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 3.....	266
Figura 5.143c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 3.....	266
Figura 5.144. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 4.....	267
Figura 5.145. Fórmula estrutural da cumarina butansina B.....	268
Figura 5.146. Fórmulas estruturais das cumarinas butansina C e murrangatina.....	268
Figura 5.147a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 4.....	269
Figura 5.147b. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 4.....	269
Figura 5.147c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz)	

do composto referente à banda cromatográfica 4.....	270
Figura 5.148. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 5.....	271
Figura 5.149a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 5.....	271
Figura 5.149b. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 5.....	272
Figura 5.149c. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 5.....	272
Figura 5.150. Prováveis estruturas das substâncias referentes à banda cromatográfica 6.....	273
Figura 5.151a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) dos compostos referentes à banda cromatográfica 6.....	274
Figura 5.151b. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 6.....	274
Figura 5.151c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 6.....	275
Figura 5.152. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 9.....	278
Figura 5.153a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 9.....	279
Figura 5.153b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 9.....	279
Figura 5.153 c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 9.....	280
Figura 5.154. Cromatograma de LC-NMR dos caules superiores do enxerto com sintomas de CVC, especificando as bandas cromatográficas “trapeadas” em cartucho de SPE.....	281

Figura 5.155. Prováveis estruturas das substâncias referentes às bandas cromatográficas 1, 2, 3, 4, 7 e 8, da análise via LC-NMR dos caules superiores do enxerto com sintomas de CVC.	283
Figura 5.156. Provável estrutural para a banda cromatográfica 5.....	284
Figura 5.157a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica flavonóide glicosilado derivado da hesperetina.....	287
Figura 5.157b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica flavonóide glicosilado derivado da hesperetina.....	287
Figura 5.157c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica flavonóide glicosilado derivado da hesperetina.....	288
Figura 5.159. Fórmula estrutural pertencente à banda cromatográfica 6.....	289
Figura 5.160a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 6, flavonóide sinensetina.....	290
Figura 5.160b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 6, flavonóide sinensetina.....	291
Figura 5.160c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 6, flavonóide sinensetina.....	291

RESUMO

ESTUDO DA VARIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE *Citrus sinensis* SOBRE *Citrus Limonia* APÓS A INOCULAÇÃO DA BACTÉRIA *Xylella fastidiosa*. O presente trabalho descreve o estudo da variação do perfil químico de citros após a inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa*, responsável pela Clorose Variegada do Citros (CVC) que é uma das mais sérias doenças causadoras de prejuízos na citricultura brasileira. Para isso, inoculou-se a *X. fastidiosa* em enxertos de *C. sinensis* sobre *C. limonia* e avaliou-se através de ferramentas quimiométricas e de desenvolvimento de métodos analíticos como HPLC-DAD, LC-MS/MS, LC-UV-SPE-NMR e HR-MAS a variação quantitativa de alguns metabólitos secundários, como cumarinas e flavonóides identificados tanto nos enxertos quanto nas matrizes *C. sinensis* e *C. limonia*. As ferramentas quimiométricas PCA e HCA aplicadas aos dados obtidos nos estudos de HPLC-DAD e HR-MAS permitiram discriminar as plantas contaminadas com a bactéria das espécies sadias, assim como os respectivos indivíduos. Ao analisar a variação do perfil químico dos citros estudados através da HPLC-SPE-UV-NMR foi possível detectar a presença de uma nova classe de metabólitos secundários derivados do ácido *p*-metoxicinâmico contendo anéis diidropirano e diidrofurano oxidados. Do mesmo modo, ao analisar os compostos de média polaridade, através da técnica de LC-MS/MS foi possível identificar, até o presente momento, nas raízes e folhas algumas cumarinas não citadas na literatura para nenhuma das duas espécies que constituem o enxerto, como diidrosuberenol, 2',3'-diidrosuberosina, citrubutina, o limonóide limonina diosfenol e o flavonóide 3-hidroxi-3',4',5,7,8-pentametoxiflavona. Finalmente, observou-se que a cumarina bergapteno está presente em quantidade razoável apenas nas folhas do limão cravo, o qual é tolerante à *X. fastidiosa*, e quando o enxerto apresenta os sintomas da CVC há uma pequena produção desta em suas folhas, indicando ser esta uma fitoantecipina.

ABSTRACT

STUDY OF THE VARIATION IN THE CHEMICAL PROFILE INDUCED IN *Citrus sinensis* GRAFTED ONTO *C. limonia* BY INOCULATION WITH *Xylella fastidiosa*. The present work describes the study of variation in the chemical profile of citrus after inoculation of *Xylella fastidiosa*, in charge of the Citrus Variegated Chlorosis is one of the most serious diseases that cause damage in Brazilian citrus. The bacterium *X. fastidiosa* was inoculated in *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* and was evaluated using chemometric tools and development of analytical methods such as HPLC-DAD, LC-MS/MS, LC-UV-SPE-NMR and HR-MAS quantitative variation of some secondary metabolites such as coumarins and flavonoids identified both in grafts and in the matrix *C. sinensis* and *C. limonia*. The chemometric methods PCA and HCA applied to the data obtained in studies by HPLC-DAD and HR-MAS allowed to discriminate plants contaminated with the bacteria of the species healthy, as well as the respective individuals. By analyzing the change in the chemical profile of citrus studied by HPLC-UV-SPE-NMR it was possible to detect the presence of a new class of secondary metabolites derived from *p*-hydroxy-cinnamic acid containing oxidized dihydropyran and dihydrofuran rings. Similarly, when analyzing the compounds of medium polarity by LC-MS/MS technique was identified, until now, in the roots and leaves several coumarins not cited in the literature for any of the species that constitute the graft, as dihydrosuberenol, 2', 3'-dihydrosuberosin, citrubutin the limonoid diosfenol limonin and flavonoid 3-hydroxy-3', 4', 5,7,8-pentamethoxyflavone. Finally, was observed that coumarin bergapten is present in reasonable quantities only in the leaves of Rangpur lime, which is tolerant to *X. fastidiosa*, and when the graft presents with symptoms of citrus variegated chlorosis is a small production of this in their leaves, indicating that this is a phytoanticipin.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 A Citricultura Brasileira.....	1
1.2 A Família Rutaceae.....	3
1.3 Enxertia.....	4
1.4 Estudos fitoquímicos de <i>Citrus limonia</i> e Enxerto de <i>Citrus sinensis</i> sobre <i>Citrus limonia</i>	6
1.4.1. Clorose Variegada dos Citros (CVC).....	10
1.4.2. A bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	12
1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC).....	15
1.6 Espectrometria de Massas (EM ou MS).....	18
1.6.1 Ionização Química à Pressão Atmosférica – APCI.....	20
1.6.1.1 Analisadores de Massa.....	21
1.6.1.2 Analisadores de Massas Quadrupolares.....	22
1.6.2 Espectrometria de Massas Tandem.....	23
1.7 Quimiometria.....	24
1.7.1 Principal Components Analysis (PCA).....	26
1.7.2 Hierarchical Clusters Analysis (HCA).....	26
1.8 High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS).....	27
1.9 HPLC-UV-SPE-NMR.....	28
2. Relevância do Trabalho.....	31
3. Materiais e Métodos.....	33
3.1 Material Botânico.....	33
3.2 Inoculação da Bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	33
3.2.1. Avaliação da população bacteriana nos citros após inoculação da bactéria <i>X. fastidiosa</i>	33
3.3 Ressonância Magnética Nuclear.....	34
3.3.1 Medidas de HR-MAS em <i>Citrus</i> aliadas á ferramentas quimiométricas.....	34

3.4 Cromatografia.....	34
3.4.1 Análise da variação do perfil químico de <i>Citrus</i> via HPLC aliada á ferramentas quimiométricas.....	35
3.4.2 Análise dos extratos de <i>Citrus</i> utilizando a técnica HPLC-UV-SPE-NMR.....	35
3.4.3 Análise da variação do perfil químico de <i>Citrus</i> via HPLC-MS/MS (ou CLAE-EM/EM).....	36
3.4.4 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas raízes de <i>Citrus</i>	37
3.4.5 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas folhas e caules de <i>Citrus</i>	37
3.4.6 Quantificação dos flavonóides hesperidina e rutina nas folhas e caules de <i>Citrus</i>	38
3.5 Demais equipamentos, solventes e reagentes utilizados.....	38
4. Procedimento Experimental.....	41
4.1 Inoculação da Bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	41
4.1.1 Avaliação da população bacteriana nos citros após inoculação da bactéria <i>X. fastidiosa</i>	42
4.2. Ressonância Magnética Nuclear.....	45
4.2.1 Medidas de HR-MAS em <i>Citrus</i> aliadas á ferramentas quimiométricas.....	45
4.3. Cromatografia.....	46
4.3.1 Análise da variação do perfil químico de <i>Citrus</i> via HPLC aliada á ferramentas quimiométricas.....	46
4.3.2 Análise dos extratos de <i>Citrus</i> utilizando a técnica HPLC-UV-SPE-NMR.....	47
4.3.3 Análise da variação do perfil químico de <i>Citrus</i> via HPLC-MS/MS (ou CLAE-EM/EM).....	47
4.3.4 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas raízes de <i>Citrus</i>	48

4.3.4.1 Preparo das amostras.....	48
4.3.4.2 Preparo das soluções padrão, padrão estoque, padrões de análise e amostras controle de qualidade.....	48
4.3.4.3 Figuras de mérito utilizadas na validação do método analítico por HPLC.....	50
4.3.4.4 Limites de Quantificação e detecção.....	51
4.3.5 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas folhas, caules inferiores e caules superiores de <i>Citrus</i>	51
4.3.5.1 Preparo das amostras.....	51
4.3.5.2 Preparo das soluções padrão, padrão estoque, padrões de análise e amostras controle de qualidade.....	52
4.3.5.3 Parâmetros utilizados do método analítico por HPLC-MS/MS.....	53
4.3.5.4 Limites de Quantificação e detecção.....	54
4.3.6. Quantificação dos flavonóides hesperidina e rutina nas folhas e caules de <i>Citrus</i>	54
4.3.6.1 Preparo das soluções padrão, padrão estoque, padrões de análise e amostras controle de qualidade.....	55
4.3.6.2 Figuras de mérito utilizadas na validação do método analítico por HPLC.....	57
5. Resultados e discussões.....	59
5.1 Resultados obtidos após a inoculação da bactéria <i>X. fastidiosa</i> nos enxertos de citros.....	59
5.2. Medidas de HR-MAS CPMG em amostras de Citros.....	62
5.2.2 Análise Exploratória dos dados obtidos através da RMN de ¹ H HR-MAS CPMG de amostras de Citros.....	72
5.2.2.1 Análise Exploratória dos dados obtidos através da RMN de ¹ H HR-MAS das folhas dos citros estudados.....	78
5.2.2.2 Análise Exploratória dos dados obtidos através da	

RMN de ¹ H HR-MAS dos caules dos citros estudados.....	84
5.2.2.3 Análise Exploratória dos dados obtidos através da RMN de ¹ H HR-MAS das raízes dos citros estudados.....	88
5.3 Análises da variação do perfil químico dos citros estudados via HPLC aliada á ferramentas quimiométricas.....	95
5.4 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas raízes dos citros estudados.....	112
5.5 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas folhas e caules dos citros estudados.....	127
5.6 Quantificação dos flavonóides hesperidina e rutina nas folhas e caules dos citros estudados.....	148
5.7 Análise da variação do perfil químico dos citros estudados via HPLC-MS/MS (ou CLAE-EM/EM).....	161
5.7.1 Análise de algumas cumarinas padrões APCI.....	162
5.7.1.1 Proposta de fragmentação da cumarina umbeliferona por APCI no modo positivo de ionização.....	162
5.7.1.2 Proposta de fragmentação da cumarina metoxiseselina por APCI no modo positivo de ionização.....	165
5.7.1.3 Proposta de fragmentação da cumarina tamarina por APCI no modo positivo de ionização.....	167
5.7.2. Análise da variação do perfil químico nas raízes dos citros estudados.....	168
5.7.2.1. Identificação das bandas cromatográficas das raízes dos citros estudados.....	170
5.7.2.1.1 Sinais cromatográficos 1, 2 e 3: xantoarnol, diidrosuberenol e decursinol.....	171
5.7.2.1.2 Sinal Cromatográfico 4: cumarina ulopterol.....	180
5.7.2.1.3 Sinais cromatográficos 5 e 8: cumarinas ostol e suberosina.....	182

5.7.2.1.4 Sinal cromatográfico 6: cumarina suberenol.....	189
5.7.2.1.5 Sinal cromatográfico 7: cumarina citrubutina.....	191
5.7.2.1.6 Sinal cromatográfico 11: cumarina nordentatina.....	193
5.7.2.1.7 Sinal cromatográfico 12: cumarina clausarina.....	197
5.7.2.1.8 Sinal cromatográfico 9: limonóide limonina.....	200
5.7.2.1.9 Sinal cromatográfico 10: limonóide limonina Diosfenol.....	205
5.7.3 Análise da variação do perfil químico nas folhas de Citrus.....	209
5.7.3.1 Identificação dos sinais/bandas cromatográficas nas folhas dos citros estudados.....	211
5.7.3.1.1 Sinal cromatográfico 1: cumarina limetina ou citripteno	214
5.7.3.1.2 Sinal cromatográfico 2: cumarina bergapteno.....	219
5.7.3.1.3 Sinais cromatográficos 3, 4 e 7: flavonóides sinesetina, 5-demetoxinobiletina e tangeretina.....	224
5.7.3.1.4 Sinais cromatográficos 5 e 8: flavonóides 5 (ou 7)-hidroxi-3',4', 6,7,8- pentametoxiflavona e 6-hidroxi- 3',4', 5,7,8- pentametoxiflavona.....	237
5.7.3.1.5 Sinal cromatográfico 6: flavonóide nobiletina.....	246
5.7.4 Análise da variação do perfil químico nos caules inferiores e superiores dos citros estudados.....	250
5.7.5 Análise das cumarinas limetina e bergapteno nas raízes e caules dos citros estudados.....	251
5.8 Análise da variação do perfil químico dos citros estudados via LC-NMR.....	256
5.8.1 Análise da variação do perfil químico nas folhas do limão cravo utilizando a técnica LC-NMR.....	256
5.8.1.1 Sinais cromatográficos 1 a 6: compostos derivados do ácido <i>p</i> -metoxicinânico.....	258

5.8.1.2	Sinais cromatográficos 7,8 e 11: cumarinas citropteno, bergapteno e flavonóide 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona respectivamente.....	277
5.8.1.3	Sinal cromatográfico 9: flavonóide 3',4',3,5,6,7-hexametoxiflavona.....	277
5.8.1.4	Sinal cromatográfico 10: flavonóide 3',5,6,7,8-pentametoxiflavona.....	280
5.8.2	Análise da variação do perfil químico nos caules dos citros estudados utilizando a técnica LC-NMR.....	281
5.8.2.1	Sinais cromatográficos 1, 2, 3, 4, 7 e 8: compostos derivados do ácido p-metoxicinâmico e flavonóides.....	282
5.8.2.2	Sinal cromatográfico 5: flavonóide glicosilado derivado da hesperetina.....	283
5.8.2.3	Sinal cromatográfico 6: flavonóide 3',4',5,6,7-pentametoxiflavona ou sinensetina.....	289
6.	Conclusões.....	293
7.	Referências bibliográficas.....	299

1. Introdução

1.1 A Citricultura Brasileira

As plantas cítricas são originárias das regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático e ilhas adjacentes. No Brasil, os citrinos foram introduzidos pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia, sendo que em 1540 já havia relatos de laranjas espalhadas pelo nosso litoral (RODRIGUES *et al.*, 1991).

O Brasil, desde a década de 80, ainda é detentor do título de maior produtor mundial de citros, apesar de o ano de 2009 ser considerado o pior da década para o mercado de citros e de suco de laranja. Estimativas apresentadas pela Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR) apontam para um volume de vendas na faixa de 1,0 milhão de toneladas (300 milhões de caixas de 40 quilos de laranja), contra 1,291 milhão de toneladas em 2008, e para um faturamento equivalente da ordem de US\$ 1,5 bilhão, uma queda de 25% em igual comparação (<http://www.citrusbr.com>).

O Segundo maior produtor mundial são os Estados Unidos na região da Flórida, sendo responsável pela produção de 136 milhões de caixas laranja (www.deere.com.br/pt_BR/ag/veja_mais/info_mercado/citrus.html).

A cultura dos citrinos encontra-se disseminada em todo território nacional, com grande importância econômica e social para vários estados como São Paulo, maior produtor nacional, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, etc. As maiores plantações são de laranja pêra (*Citrus sinensis*), tangerina (*C. reticulata*), toranja (*C. paradisi*) e o limão cravo (*C. limonia*). E as menores plantações são de lima (*C. aurantifolia*), cidra (*C. medica*) e alguns híbridos (MATTOS JUNIOR *et al.*, 2005).

A maioria das laranjas e tangerinas de melhores qualidades é obtida de enxertos das mesmas sobre o limão cravo o qual é conhecido também pelos

nomes de Rosa, Bravo, Vinagre, Vermelho, etc., O emprego deste porta-enxerto recebe um grande incentivo pois apresenta algumas vantagens como a precocidade no início de produção e aumento da produtividade, além de obter-se mudas praticamente idênticas à planta-mãe e uniformidades das mudas, uma vez que os porta-enxertos são poliembriônicos. Sendo assim, o limão cravo é o principal porta-enxerto sobre o qual a citricultura brasileira foi constituída, estando presente em quase 40% das plantas cítricas, mas a pesquisa e a experimentação vêm mostrando que a utilização de outros porta-enxertos como tangerina Cleópatra, Sunki e o trifoliata, permitem também obter frutos de boa qualidade e maturação mais tardia, resultando em benefícios financeiros ao produtor (MATTOS JUNIOR *et al.*, 2005).

A Figura 1.1 mostra um espécimen de laranja pêra enxertada sobre o limão cravo, planta mais utilizada na citricultura brasileira nos últimos anos.

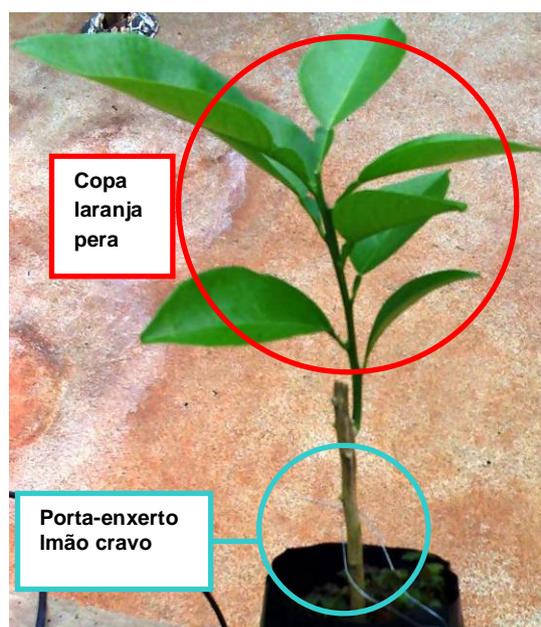


Figura 1.1. Espécime de laranja pêra enxertada sobre o limão cravo.

1.2 A Família Rutaceae

Segundo ENGLER (1931) e WATERMAN (1983), a família Rutaceae é também conhecida como a família do citros devido à grande importância comercial desse gênero. Ela pertence à Ordem Rutales, atualmente denominada Sapindales (STEVENS, 2006), e representa o maior grupo dentro da mesma. Possui 150 gêneros com mais de 900 espécies largamente distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, com aproximadamente 1.600 espécies, com grande ocorrência na Austrália e África. No Brasil, a família está representada por cerca de 30 gêneros e 182 espécies (MELO *et. al.*, 2004).

A quimiosistemática da família Rutaceae foi revisada por SILVA *et al.* (1988) mostrando que a mesma baseia-se principalmente em alcalóides derivados do ácido antranílico, cumarinas, lignanas, flavonóides e limonóides. Estes estudos vêm mostrando que a similaridade na diversificação desses alcalóides entre as subfamílias Rutoideae e Toddalioideae é tão pronunciada que a separação dos dois grupos fica comprometida. Foi principalmente nestas duas subfamílias que se percebeu a necessidade de um novo arranjo taxonômico dos gêneros. Assim, nessa revisão SILVA *et al.* (1998) uniram essas duas subfamílias em uma única, a Rutoideae, e a subdividiram em 17 tribos (SILVA *et al.* 1988).

O gênero *Citrus* é o representante mais importante da família e pertence à subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrinae (MATTOS JUNIOR *et al.*, 2005). Seu perfil químico é caracterizado pela presença de cumarinas, limonóides e flavonóides, mas escasso em quantidade e diversidade de alcalóides do ácido antranílico (GARCIA, 2005).

A origem genética das espécies de citros resulta de hibridização natural, baseando-se nas linhagens maternas somente de *C. sinensis* (L.) Osbeck e *C. limonia* Osbeck.

A espécie *C. sinensis* (L.) Osbeck, a qual é conhecida popularmente como laranja pêra, originou-se provavelmente de cruzamentos de *C. grandis*, conhecido como toranja, com *C. reticulata*, sendo que a contribuição materna vem de *C. grandis* na formação desta espécie, através de sugestões de dados citoplasmáticos. Já a espécie *C. limonia* Osbeck, popularmente chamada de limão cravo, possui três cruzamentos prováveis: *C. medica* x lima x espécie não identificada, *C. medica* x lima e *C. medica* x *C. jambhiri* (limão rugoso). Dados citoplasmáticos para essa espécie colocam-na na linhagem materna das tangerinas, *C. reticulata*, *C. jambhiri* e *C. volkameriana* (limão volkameriano), podendo ter o seu parental materno em qualquer um destes táxons (MATTOS JUNIOR et al, 2005).

1.3 Enxertia

A enxertia é considerada uma técnica de obtenção de novas plantas pelo processo assexuado de multiplicação vegetativa, com a intervenção humana, criando-se uma associação simbiótica entre dois indivíduos, geneticamente diferentes e que devem viver em estreito relacionamento, mutuamente benéfico, para que a nova planta, criada pela enxertia seja produtiva e tenha longevidade. Essa técnica consiste em transplantar uma muda chamada copa, cavaleiro ou enxerto, em outra planta denominada cavalo ou porta-enxerto, provida de raízes. A copa é a planta que se pretende propagar devido ao seu valor comercial. O porta-enxerto geralmente é uma planta proveniente de sementes ou casca, bastante rústica e resistente (CÉSAR, 1996).

O porta-enxerto induz alterações à variedade de copa como mudança na época de maturação, peso dos frutos, coloração da casca e do suco, permanência dos frutos na planta, conservação da fruta após colheita, transpiração das folhas, fertilidade do pólen, capacidade de absorção, tolerância à salinidade e resistência à seca e ao frio (GARCIA, 2005).

As plantas propagam-se por vários tipos de enxertia como: a) enxerto por aproximação ou encostia, onde dois galhos de duas plantas diferentes ambas enraizadas são unidos num certo ponto removendo-se a casca dos mesmos. Assim que o enxerto “pega” corta-se abaixo desse ponto de junção da planta; b) a garfagem ou enxerto de garfo que consiste na implantação de um pedaço de galho da planta a ser multiplicado sobre um porta-enxerto compatível, o qual é mais rústico e está enraizado; c) o enxerto via borbulha que consiste basicamente em usar uma borbulha ou gema a qual é fixada junto ao porta-enxerto, após um corte de parte do mesmo. Para que esse enxerto dê resultado, é fundamental que se ajustem minuciosamente as partes interligadas, com enfaixe do conjunto para que se acelere a fusão (RODRIGUES *et al.*, 1991).

Todas as plantas utilizadas neste trabalho foram obtidas através da técnica de enxertia via borbulha.

O processo de enxertia apresenta várias características, das quais pode-se destacar (CÉSAR, 1996; POMPEU JUNIOR, 1991; FIGUEIREDO *et al.*, 1990, SALIBE, 1987 e CASTLE *et al.*, 1992):

- ✓ Evita conseqüências da dissociação de caracteres de uma variedade qualquer, isto é, propaga uma planta com todas as suas qualidades inerentes à variedade que ela pertence;
- ✓ Reduz o porte médio das plantas, o que facilita a colheita dos frutos, dos tratos culturais relativos à poda, combate as doenças, etc.;
- ✓ Aumenta a produtividade, uma vez que a planta torna-se mais precoce quanto ao período de produção;
- ✓ Transforma plantas estéreis em plantas produtivas, através da inoculação de gemas ou mesmo ramos frutíferos;
- ✓ Perpetua plantas em solos impróprios.

Mas algumas observações devem ser levadas em consideração para que haja êxito na operação de enxertia, uma delas trata-se da compatibilidade entre o enxerto e o porta-enxerto, sendo que apenas plantas que possuam entre si

um certo grau de parentesco e analogia entre suas estruturas anatômicas podem ser enxertadas (RODRIGUES *et al.* , 1991).

Plantas provenientes de enxertos, depois que vão para o campo, exigem inspeções freqüentes de seu estado geral. Brotos chamados de ladrões, que nascem eventualmente em um porta-enxerto, abaixo do ponto de enxertia, devem ser podados logo, para impedir que o porta-enxerto cresça sozinho, rejeitando assim a copa que lhe foi implantada (RODRIGUES *et al.* , 1991).

O uso de porta-enxertos na citricultura permitiu elevados ganhos de produtividade, porém apresentou alguns pontos desfavoráveis para a citricultura, tais como algumas doenças: Gomose, Tristeza, Declínio e Morte súbita dos citros, as quais são muito expressivas na citricultura (MATTOS JUNIOR *et al.*, 2005).

1.4 Estudos fitoquímicos de *Citrus limonia* e Enxerto de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia*

O grupo de Produtos Naturais da UFSCar vem realizando estudos fitoquímicos das diferentes partes de enxertos, visando comparar o perfil químico encontrado com aqueles das plantas de origem (não enxertadas). Assim, realizou-se o estudo do enxerto de *Citrus sinensis* (laranja doce) sobre *C. limonia* (limão cravo) e também das partes inferiores do limão cravo. Foram estudadas as partes do enxerto separadamente, a raiz, o cavalo e a parte superior. Neste estudo isolou-se e identificou-se 27 metabólitos secundários pertencentes às classes dos limonóides, alcalóides, cumarinas e flavonóides (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O estudo da parte superior levou ao isolamento quase que exclusivamente de flavonóides (Figura 1.2). Apenas duas cumarinas foram isoladas, xantiletina das folhas e caule e xantoxiletina apenas no caule (Figura 1.3). Um limonóide, limonina, foi encontrado nas folhas (figura 1.4). O triterpeno friedelina foi

obtido nas folhas e caule (figura 1.4). Os esteróides comuns em planta, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3- β -glicopiranosil-sitosterol, também foram isolados do caule.

Os flavonóides 1-4 (figura 1.2), foram isolados anteriormente das folhas, 1-5 das cascas, e a hesperidina (9) das folhas, caules e raízes de *C. sinensis* (HAGGAG *et al.*, 1999, KAWAII *et al.*, 2000, LI, *et al.*, 2006 e SHI *et al.*, 2007). Já os flavonóides 5 e 8 foram relatados pela primeira vez nas folhas de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (RIBEIRO *et al.*, 2008).

As cumarinas xantiletina e xantoxiletina não haviam sido relatadas nas folhas e caules de *C. sinensis*, apenas nas raízes (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O limonóide limonina já havia sido isolado anteriormente nos frutos, raízes e galhos de *C. sinensis*, mas o curioso é que alguns autores observaram que a concentração do mesmo diminuía durante o período de crescimento dos cultivares, sendo isolado das folhas quando a planta apresentava 10 meses de idade. (YAMAMOTO, *et al.*, 1998).

O estudo fitoquímico do caule inferior do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* e também das raízes de *C. limonia* produzido através de germinação de sementes, conduziu ao isolamento dos flavonóides/flavanonas limoninanina, lupnifolina e eritrisenegalona, um alcalóide acridônico, 5-hidroxinoracronicina e o limonóide limonina, e também um segundo limonóide, o acetato de limonina e várias cumarinas, além dos esteróides comuns em planta, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol (RIBEIRO *et al.*, 2008). As estruturas estão relacionadas nas Figuras 1.2, 1.3 e 1.4.

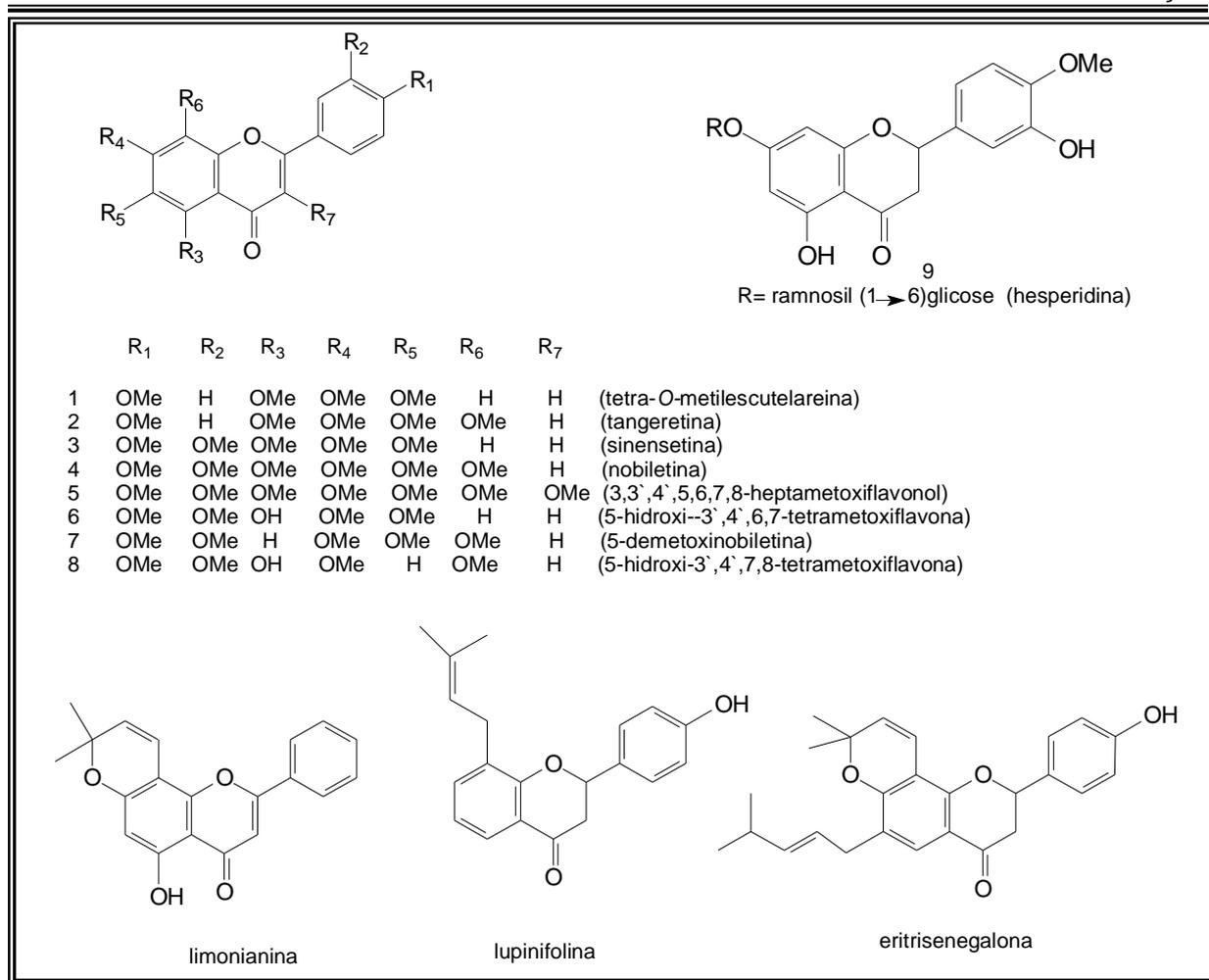


Figura 1.2. Estruturas dos flavonóides isolados de *C. sinensis* sobre *C. limonia* pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar (RIBEIRO *et al.*, 2008)..

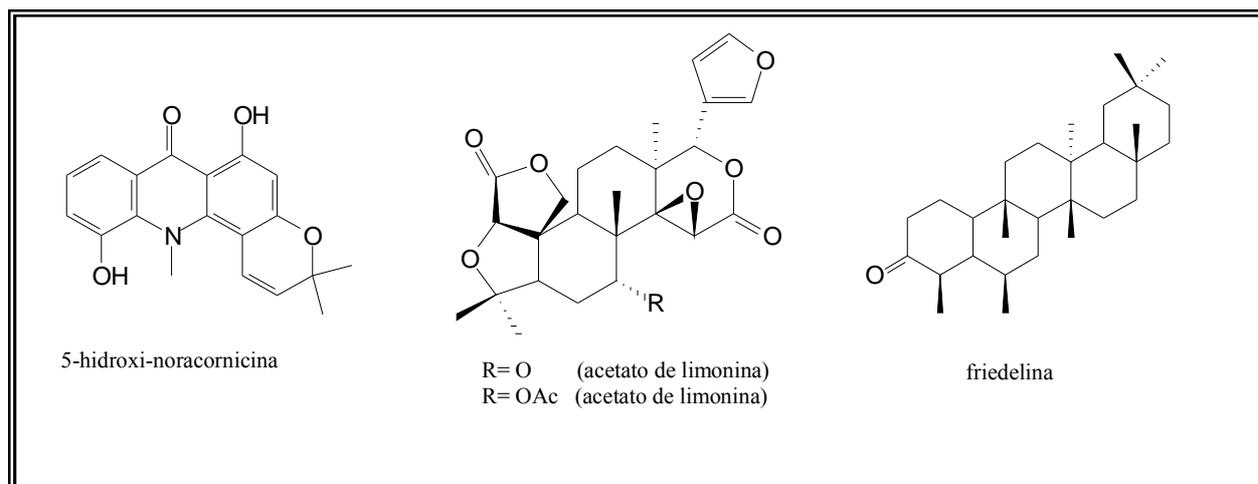


Figura 1.3. Estruturas dos limonóides, triterpeno e alcalóide isolados de citros pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar (RIBEIRO *et al.*, 2008)..

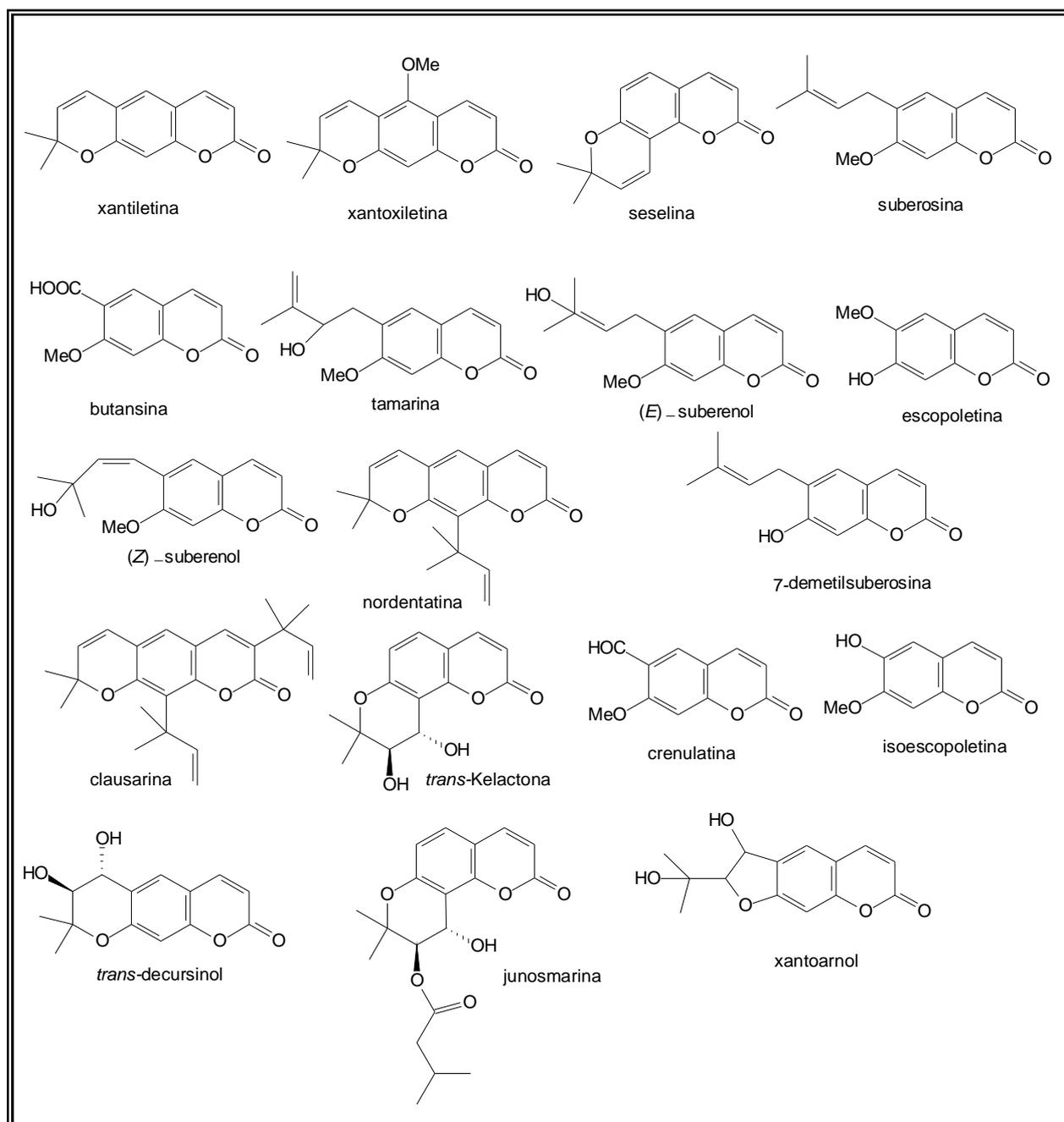


Figura 1.4. Estruturas das cumarinas isoladas de citros pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Plantas de *C. sinensis* e *C. limonia* tem sido bastante investigadas, mas não há dados de estudos de enxertos trabalhados separadamente. A única investigação dos caules de *C. limonia* revelou a presença das cumarinas imperatorina, xantotoxina, bergapteno, isopinellina, limetina, escopoletina, umbeliferona, xantotoxol e a esculetina (ABDEL-FATTAH, *et al.*, 2003).

Assim, vários compostos obtidos pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar do caule e do porta-enxerto de *C. limonia* ainda não haviam sido encontrados nos caules da planta desenvolvida por germinação de sementes. A literatura não menciona o isolamento da tamarina de *C. sinensis* e *C. limonia*, mas menciona seu isolamento nas raízes do híbrido de *C. paradise* x *C. tangerina* o que sugere que o isolamento da mesma nesse estudo se deu devido ao fato da tamarina estar sendo biossintetizada a partir da suberosina nos caules do porta-enxerto (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Em resumo, tem-se que na parte superior só foram encontrados dois compostos prenilados, as cumarinas xantiletina e xantoxiletina. A piranocumarina xantiletina foi isolada em grande quantidade (g) nas raízes e apenas em pequenas quantidades (mg) nas partes superiores. Esta observação leva a inferir que a reação de prenilação só ocorre nas raízes e as duas cumarinas teriam sido translocadas para as partes superiores, aparecendo no cavalo do enxerto e no enxerto originário da laranja. Isto também leva a questionar se poderiam ser estas cumarinas as responsáveis pela resistência de *C. limonia* (limão cravo) frente a várias pragas, como a *X. fastidiosa*.

1.4.1 Clorose Variegada dos Citros (CVC)

A Clorose Variegada do Citros (CVC) ou Amarelinho como é popularmente chamada, é uma das mais sérias doenças, causadora de prejuízos na citricultura brasileira. Foi identificada pela primeira vez no ano de 1987 em pomares do norte e nordeste de São Paulo e também no triangulo mineiro. Hoje encontra-se disseminada em todos os estados brasileiros produtores de citrinos (LARANJEIRA, 1997). Apesar da Fundecitrus, em seu último levantamento realizado em 2009 alegar que incidência de CVC caiu 9,5% desde 2005, hoje 39,19% das plantas do parque citrícola do estado de São Paulo estão

contaminadas com esta doença. Em 2005, o índice era de 43,28%, número semelhante a 2004 (43,84%) e 2003 (43,56%).

(<http://ultimosegundo.ig.com.br/economia/2009/11/04/citros+amarelinho+cai+94+desde+2005+informa+fundecitrus+9018949.html>).

A CVC é causada por uma bactéria Gram-negativa, denominada de *Xylella fastidiosa*, que ataca o xilema das plantas, causando o entupimento dos seus vasos responsáveis por levar água e nutrientes das raízes para as folhas.

Os sintomas da CVC manifestam nos ramos, folhas e frutos. As raízes não apresentam nenhuma anormalidade. Inicialmente podem-se encontrar apenas alguns ramos atacados na parte superior da planta, mas com o passar do tempo toda a árvore pode apresentar os sintomas típicos da CVC (LARANJEIRA, 1997). Quanto mais velha é a planta menor é o índice de contaminação da doença e quanto mais nova é a planta infectada mais rapidamente ela será totalmente afetada. Um sintoma típico da CVC é o aparecimento de pequenas manchas amareladas nas folhas maduras das copas; em folhas novas, mesmo de plantas altamente afetadas não há manifestação da doença. Surgem manchas amareladas na parte superior ou da frente da folha, e na parte inferior dessas cloroses manchas de coloração avermelhadas. Essas manchas podem ser pontuais ou difusas, não são necróticas e assemelham-se mais a um extravasamento de gomas (ROSSETTI *et al.*, 1990).

Os sintomas nos frutos surgem após o aparecimento dos sintomas foliares e apenas nos ramos afetados. Podem amarelar precocemente e lesões tipo marrom-escuras também podem aparecer (LARANJEIRA, 1997b).

Os frutos tornam-se pequenos, endurecidos, aparentam deficiência de potássio e chegam a causar danos à máquinas de moagem das fábricas de suco concentrado. Os frutos têm suas propriedades físicas e químicas internas bastante afetadas. O teor de sólidos e a acidez aumentam, diminuindo a concentração do suco, prejudicando bastante tanto a produção de sucos quanto a comercialização *in natura*. (LARANJEIRA *et al.*, 1999). A produção é

diminuída em número e peso de frutos. Há relatos que plantas saudáveis de laranja Natal produziram entre 30 e 35% mais que plantas doentes e que os danos podem chegar até 80% para a variedade Pêra, 67% para a Natal e 76% para Valência (LARANJEIRA, 2002).

Os prejuízos financeiros causados pela CVC na citricultura brasileira podem chegar a 100 milhões de dólares anuais (SOUZA *et al.*, 2003). A Figura 1.5 mostra folhas e frutos de plantas infectadas com a CVC.



Figura 1.5. Alguns estágios de folhas, frutos e plantas com sintomas de CVC

(Fonte: http://www.lbi.ic.unicamp.br/xylella_cvc-strain/home/mmachado.html).

1.4.2 A bactéria *Xylella fastidiosa*

Em 1990, através da microscopia eletrônica, estabeleceu-se uma associação da CVC com uma bactéria gram-negativa, com formatos de bastonetes, a qual estava limitada no xilema, e observou-se também que somente materiais sintomáticos possuíam o procarioto. As características da bactéria: tinha de 0,25 a 0,40 μm de diâmetro e comprimento variando de 1 a 4 μm . Essa bactéria foi identificada como sendo a *Xylella fastidiosa*. Outros aspectos sistemáticos da mesma são: não possui mobilidade, devido à ausência de

flagelos, é uma bactéria aeróbica, possui um lento crescimento em meios de cultura e não apresenta pigmentação (LARANJEIRA, 2002).

Como dito, essa bactéria está limitada ao xilema das plantas hospedeiras e também ao lúmen do canal alimentar dos insetos vetores, as cigarrinhas, insetos sugadores, que pertencem à ordem Hemíptera e ao grupo Cicalidae e se alimentam nos sistemas vasculares de vários tecidos vegetais (PARRA *et al.*; 2005). A primeira doença associada a essa bactéria foi a doença de Pierce, em vinhedos. Algumas outras doenças associadas à *X. fastidiosa* são escalduras nas folhas de ameixeira, café, amêndoa, cerejeira, olmo, pêra e alfafa. Essa bactéria pode ser encontrada também em café e várias plantas daninhas, como capim pé-de-galinha e braquiária (LARANJEIRA, 2002).

LIMA *et al* (1998) concluíram que as estirpes de *X. fastidiosa* em café e em citros eram semelhantes, significando que elas poderiam ser filogeneticamente próximas.

LOPES *et al.* (2000) e MONTEIRO *et al.* (2001) descobriram que o *Nicotina tabacum* e *Catharanthus roseus*, conhecidos popularmente como tabaco e vinca, são também hospedeiros da *X. fastidiosa*, o que pode representar um grande avanço para estudos da interação *Xylella*-hospedeiro vegetal.

No gênero *Citrus*, as laranjas doces como *C. sinensis*, as tangerinas (*C. reticulata*), tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*), tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*), lima ácida Taiti (*C. latifolia*) cultivadas são suscetíveis à *X. fastidiosa* e podem apresentar sintomas de CVC. Plantas de outros gêneros de Rutaceae e relacionados ao *Citrus*, como *Poncirus* e *Fortunella* não apresentam sintomáticas mesmo a presença da bactéria em seus tecidos xilomáticos (LARANJEIRA, 2002). Embora dentro do grupo de laranjas existam diferenças muito acentuadas em relação à suscetibilidade frente à *X. fastidiosa*, as laranjas doces são as mais suscetíveis. Tangerinas e seus híbridos como tangores ou tangelos podem ou não apresentar sintomas em campo, embora numa intensidade bem menor que nas laranjas doces e esses sintomas geralmente estão

restritos às folhas. Sendo os sintomas constatados apenas em variedades não-comerciais. Em espécies comerciais como Ponkan, cravo e murcote, constatou-se a presença da bactéria quando sobre-enxertadas em plantas de laranjas doentes, sendo possível que essas espécies sejam tolerantes à *X. fastidiosa* (MATTOS JUNIOR, 2005). Vale à pena ressaltar neste ponto que o limão cravo é tolerante à bactéria e não resistente, uma vez que foi constatada a presença de *X. fastidiosa* em algumas variedades de limão cravo por meio de PCR (Reação de Cadeia da Polimerase) (MATTOS JUNIOR, 2005).

A *X. fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno que teve seu genoma totalmente seqüenciado (SIMPSON *et al.* 2000). Utilizou-se a estirpe 9a5c, a qual foi utilizada neste projeto de doutorado, isolada da variedade laranja valência. Seu genoma apresenta um conteúdo Guanina-Citosina de 52,7% e é composto por um cromossomo principal de 2.679.305 pares de bases e dois plasmídeos, um de 51.158 pares de bases e outro menor de 1.285 pares de bases. (SOUZA, 2004). No genoma foram encontrados vários genes que são responsáveis pela adesão da bactéria na superfície de seu hospedeiro, e esse fator seguido da multiplicação e colonização bacteriana é característica da formação de biofilmes. Esse termo significa a habilidade de bactérias aderirem em superfícies sólidas e estabelecer uma comunidade microbiana e consiste num importante mecanismo de sobrevivência para as bactérias na natureza (SOUZA, 2004). MARQUES *et al.* (2002) caracterizaram a formação de biofilme da *X. fastidiosa* através de microscopia por varredura. Demonstrou-se que a bactéria pode formar biofilme em várias superfícies e que a morfologia desse biofilme dependerá da estirpe formada e também das condições ambientais analisadas (apud, SOUZA, 2004).

Outra característica importante é que a *X. fastidiosa* perde sua virulência após ser replicada várias vezes em meio de cultura. HOPKINS (1985) relata que as estirpes virulentas da bactéria, causadora da doença de “Pierce”, são obtidas após o isolamento da bactéria e que as fracamente virulentas e

avirulentas são obtidas após um ano de replicagem semanal. MONTEIRO *et al.* (2001) observaram também que a estirpe 9a5c da *X. fastidiosa* causadora da CVC após 8 replicagens, quando inoculadas em plantas de vinca, foi capaz de expressar sintomas em um número maior e mais rapidamente de plantas do que na mesma estirpe com 58 replicagens. Essa “perda” de virulência após muito tempo de cultivo *in vitro* é uma característica facilmente observada em bactérias patogênicas de uma grande faixa de hospedeiros (SOUZA, 2004). A Figura 1.6 mostra uma imagem em Microscopia Eletrônica de uma colônia de *X. fastidiosa*.

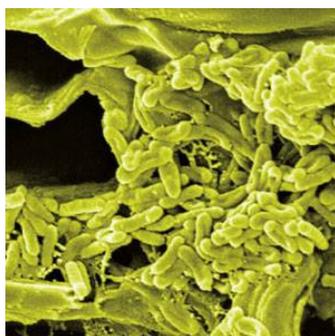


Figura 1.6. Colônias de bactéria *X. fastidiosa*, causadora da CVC em citros (Fonte: <http://revistapesquisa.fapesp.br/arq/r/pt/915/art3707img2.jpg>, © Elliot W. Kitajma/USP).

1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC ou CLAE)

A Cromatografia foi reconhecida formalmente apenas no início do século 20 com trabalhos desenvolvidos e publicados pelo russo Michael Semenovich Tswett, apesar de haver relatos de usos de métodos de separação durante quase toda a história da humanidade. Em 1906, Tswett publicou trabalhos os quais atribuíam corretamente o mecanismo envolvido numa separação cromatográfica, a qual se baseia na adsorção diferencial de componentes da amostra pelo sólido (fase estacionária) contido na coluna, ocorrendo o desenvolvimento pela passagem do solvente (fase móvel), o qual carrega os compostos menos atraídos pelo sólido para distâncias maiores dentro

da coluna, ou seja, a cromatografia consiste em um método físico-químico de separação, e está fundamentada na migração diferenciada dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a estacionária (COLLINS, 2009). Devido ao fato dessa técnica ser tão importante no desenvolvimento de várias áreas das ciências físicas e biológicas, vários autores têm chamado o século 20 e até mesmo o século 21 dos séculos da cromatografia (COLLINS, 2009).

Em todas as separações cromatográficas (gasosa, líquida e com fluido supercrítico) a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Esta fase móvel é então “forçada” através de uma fase estacionária imiscível fixa, a qual está colocada numa coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e a estacionária em vários graus.

Os componentes que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel e os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária movem-se mais rapidamente. Como consequência dessas diferenças na mobilidade, os componentes da amostra separam-se em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (TITATO, 2004).

Na análise qualitativa, um cromatograma fornece apenas informações qualitativas a respeito de cada analito em uma amostra, como o seu tempo de retenção ou sua posição sobre a fase após certo período de eluição. Apesar do tempo de retenção ser característico de um composto, ele não é único, ou seja, vários compostos podem ter o mesmo tempo de retenção nas condições cromatográficas empregadas.

É importante salientar que os cromatogramas podem não levar à identificação positiva das espécies presentes na amostra, mas fornecem evidência segura da ausência de certos compostos. Assim, se uma amostra não

produz uma banda cromatográfica no mesmo tempo de retenção que um determinado padrão usado em condições idênticas, pode-se considerar que o composto em questão ou está ausente ou sua presença ocorre em nível de concentração abaixo do limite de detecção do procedimento (SKOOG *et al.*, 2002).

A utilização da cromatografia não teria se difundido tanto se não fosse à informação quantitativa fornecida sobre as espécies separadas. A análise quantitativa em HPLC requer uma relação linear entre a magnitude do sinal e a concentração de um determinado soluto da amostra. A intensidade do sinal é dada pela área do pico ou pela altura do máximo. Quando o fluxo da coluna puder ser controlado com precisão, é melhor usar a área do pico, que é relativamente independente da composição da fase móvel (SKOOG *et al.*; 2002).

Em geral, os sistemas de HPLC já têm incorporados sistemas computadorizados de tratamentos de dados e quando concentrações padronizadas são usadas para preparar as curvas de calibração, é possível obter automaticamente um conjunto de resultados para cada composto isolado, relacionados com os tempos de retenção (MENDHAM, 2002)

Além do mais, as técnicas cromatográficas podem ser hifenadas, obtendo-se sistemas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (ou HPLC-MS) e outras técnicas que promovem o incremento no desempenho das análises em termos de eliminação de interferências instrumentais, correção de tempo de retenção, seletividade, habilidades nas separações cromatográficas e precisão de medidas. O uso dessas técnicas hifenadas tem-se destacado bastante na utilização de análise de perfis químicos (ou “*fingerprints*”, “*screening*”) de extratos vegetais, pois fornecem, ao mesmo tempo, informações analíticas e espectroscópicas importantes para a identificação *on line* das substâncias presentes nesses extratos

(MARTINS, 2008). Essa “hifenação” permite também verificar a presença de interferentes na eluição do composto de interesse a ser quantificado, além de tornar possível quantificações de substâncias que não apresentam grupos cromóforos, como no caso de triterpenos, dentre outros (MARTINS, 2008).

A CLAE apresenta várias vantagens em quantificações analíticas de fármacos, pesticidas, produtos naturais, etc., como: eficiência na separação, alta reprodutibilidade, linearidade, automação e habilidade de analisar vários compostos em um único método (RIBANI, 2004).

1.6 Espectrometria de Massas (EM ou MS)

A espectrometria de massas surgiu com experimentos de J.J. Thomson em 1897, ao observar uma deflexão do elétron dentro de um tubo catódico quando foi aplicado um campo elétrico, sendo esta uma das primeiras determinações da razão carga/massa (m/z).

A definição da espectrometria de massas pode ser dada pelas palavras do Prof. J. B. Fenn, ganhador do Prêmio Nobel de Química em 2002, pelo pioneiro trabalho no uso de *Electrospray* como fonte de ionização branda para a espectrometria de massas: “*a Espectrometria de Massas*” é a arte de medir átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares. Tal informação sobre a massa ou peso é muitas vezes suficiente, frequentemente necessária, e sempre útil na determinação da identidade de uma espécie. Para praticar esta arte, colocamos carga nas moléculas de interesse, isto é, os analitos, e então medimos como as trajetórias dos íons resultantes respondem, sob vácuo, a várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Claramente, a condição “*sine qua non*” deste método é a conversão de moléculas neutras de um analito em íons”

(<http://www.has.vcu.edu/che/people/bio/fenn.html>, apud LANÇAS (2009)).

Trata-se de uma técnica altamente sensível e que pode ser hifenada com outras técnicas como HPLC, tornando-a uma das mais apropriadas técnicas para o estudo de produtos naturais. Entre suas principais características estão o uso de diferentes princípios físicos para a ionização de amostras e separação de íons, de acordo com a massa, carga e razão massa/carga. Neste sentido, a espectrometria de massas é diferente de outras técnicas espectroscópicas, pois possibilita considerável flexibilidade na detecção, quantificação, identificação e determinação estrutural de compostos (HAGER, 2004.). O esquema genérico de um espectrômetro de massas é representado na Figura 1.7.

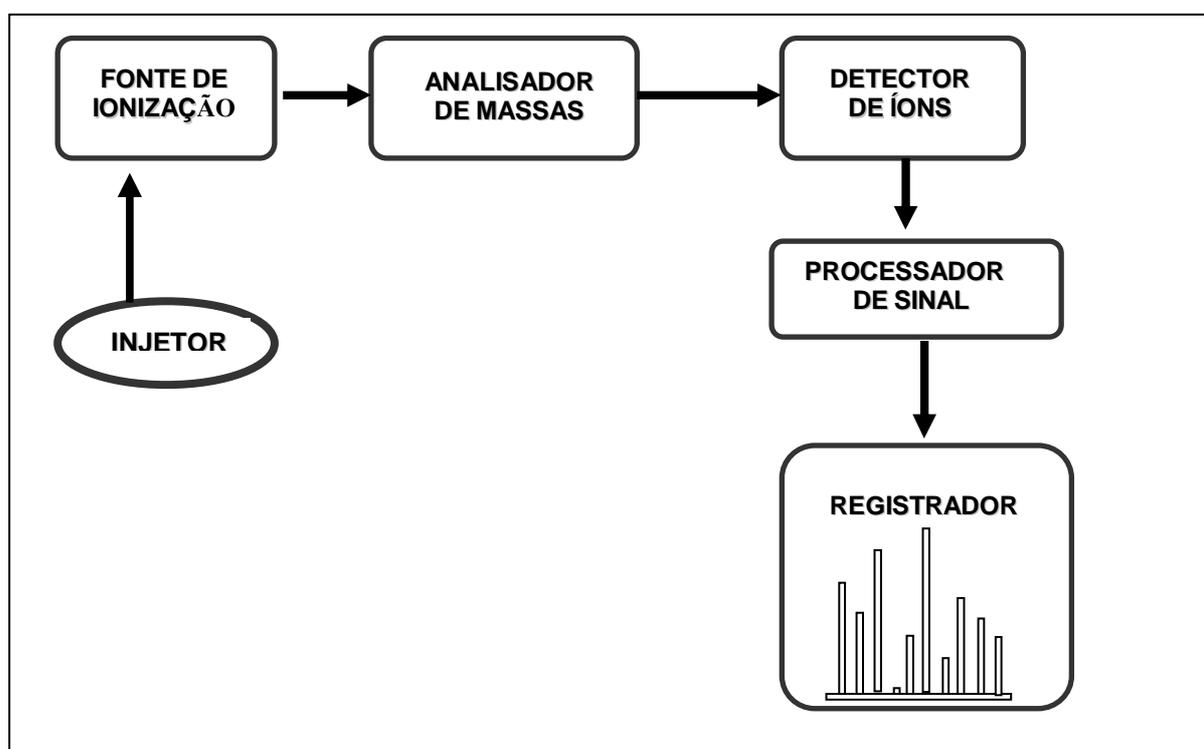


Figura 1.7. Esquema dos componentes de um Espectrômetro de Massas.

Nas últimas décadas foram desenvolvidas várias técnicas de ionização que permitiram a hifenação da cromatografia líquida com o espectrômetro de massa e a análise de substâncias com baixa pressão de vapor e termicamente lábeis (isto não era possível com técnicas convencionais mais

antigas como a de impacto eletrônico). Estas novas técnicas foram capazes de realizar a ionização de moléculas de uma forma branda, ou seja, com pouco excesso de energia interna. Desta forma, as interfaces que utilizam técnicas de ionização a pressão atmosférica (API) como a *eletronspray* (ESI) e ionização química (APCI) na análise dos compostos de interesse por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas estão entre as mais utilizadas nos dias de hoje (GELPI, 1995; MAURER, 1998 e NIESSEN, 1999).

A versatilidade dessas fontes, APCI e ESI, em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas permitiu a injeção direta de produtos termolábeis não voláteis em espectrômetros, sem a necessidade de preparação prévia das amostras (REVILLA *et al.*, 1999).

Portanto, essa técnica é hábil para a realização da ionização de moléculas orgânicas com pouco excesso de energia interna, reduzindo, geralmente, a fragmentação e tornando o íon (molecular ou pseudo-molecular) no pico base.

Será abordada neste trabalho a técnica da ionização química por APCI, uma vez que este foi o método de ionização utilizado nos metabólitos secundários identificados.

1.6.1 Ionização Química à Pressão Atmosférica- APCI

Solutos de polaridade e massa molar moderada, com um certo grau de volatilidade e não termolábeis, podem ser determinados com grande sensibilidade com o uso da ionização química. Nesta interface, a fase móvel vinda do sistema de HPLC é transformada em *spray* e rapidamente evaporada através de um fluxo de nitrogênio e do aquecimento do nebulizador a altas temperaturas (100-500°C). Embora essas temperaturas possam degradar os analitos, a alta vazão da fase móvel e o fluxo coaxial de nitrogênio evitam a quebra das moléculas.

Nesse modo de ionização, a amostra é ionizada devido à colisão com íons reagentes gerados a partir da fase móvel e uma descarga elétrica (3-6 kV) gerada na ponta de um filamento de aço (corona) posicionado próximo à entrada da região de alto vácuo do equipamento (Figura 1.8) (TITATO, 2004). Esses íons são normalmente ricos em elétrons e a colisão do analito ocorre sem transferência de energia excessiva aos íons quase-molecular formados, resultando em um menor grau de fragmentação.

A ionização das moléculas da amostra se dá na câmara de ionização por colisão com um excesso de íons reagentes, a uma pressão relativamente alta ($10^{-3} - 10^{-2}$ atm). Os íons reagentes são geralmente positivamente carregados, e são gerados ou de um gás puro ou de uma mistura de gases.

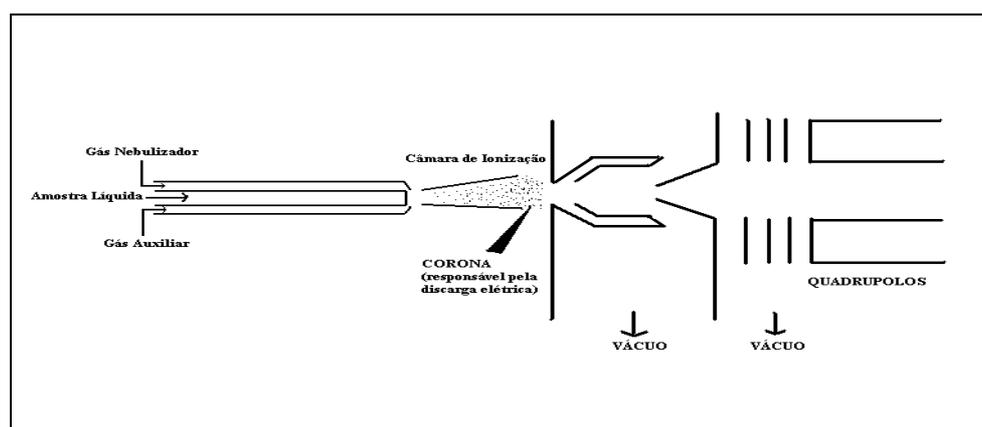


Figura 1.8. Representação esquemática de uma interface do tipo APCI no sistema EM (TITATO, 2004).

Para a escolha da composição do eluente é importante ter em mente que na ionização via APCI, as reações químicas ocorrem no spray. O processo começa com a formação de íons N_2^+ e O_2^- por meio de descargas contínuas da corona; que então reagem com o solvente e com moléculas do analito. Devido ao tempo relativamente longo de permanência na fonte de APCI, os íons detectados são resultantes de processos de equilíbrio em fase gasosa.

A composição do eluente afeta este equilíbrio de acordo com a afinidade por prótons dos compostos envolvidos. Por exemplo: um maior

número de compostos pode ser ionizado no modo positivo quando metanol é usado como modificador orgânico ao invés de acetonitrila, uma vez que a afinidade do metanol pelo próton é menor (favorecendo a ligação do analito com um próton) do que a afinidade da acetonitrila pelo próton. Portanto, na análise de íons positivos, é importante que os componentes do solvente tenham uma menor afinidade por próton do que o analito a ser determinado.

No entanto, quando o composto de interesse tem uma alta afinidade pelo próton pode ser necessário utilizar acetonitrila a fim de reduzir a ionização de compostos interferentes.

1.6.1.1 Analisadores de Massa

Imediatamente após a ionização, os íons em fase gasosa entram na região do espectrômetro de massas conhecida como analisador de massas.

O analisador de massas é usado para separar íons dentro de uma faixa selecionada de razão massa/carga (m/z), sendo estes separados por campos magnéticos ou campos elétricos, ou ainda medindo-se o tempo que eles levam para percorrer uma distância fixa. Dentre os analisadores de massas, são usados os quadrupolo, por tempo de voo (TOF) e o de aprisionamento de íons (*ion-trap*).

1.6.1.2 Analisadores de Massas Quadrupolares

Analisadores do tipo quadrupolar são empregados na análise de massas de substâncias por LC-MS. Quadrupolos são formados por quatro barras paralelas, nas quais aplica-se uma voltagem de corrente direta (DC) e um potencial de radiofrequência (RF). Os íons são acelerados no espaço entre as

barras e ao mesmo tempo as DC e RF são aumentadas simultaneamente enquanto sua razão é mantida constante.

Em um dado momento, todos os íons - exceto aqueles tendo um valor determinado de m/z - atingem as barras.

Assim, somente os íons que têm valores de m/z dentro de um intervalo limitado é que atingem o detector e são monitorados (FIGURA 1.9) (SKOOG *et al.*, 2002).

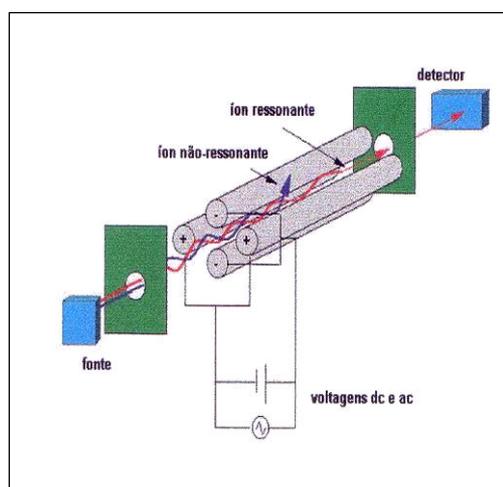


Figura 1.9. Esquema de um analisador de massas do tipo quadrupolar (SKOOG, 2002).

1.6.2 Espectrometria de Massas *Tandem*

A espectrometria de massas *tandem* fornece informações sobre a massa molar dos constituintes da amostra (na análise dos íons inicialmente formados) e também informações estruturais a partir do espectro de íons produzido na câmara de colisão, uma vez que as técnicas de ionização branda como ESI, APCI e MALDI, produzem preferencialmente adutos e íons moleculares, não fornecendo grandes informações estruturais.

Esses íons moleculares, os adutos e até mesmo fragmentos iônicos podem ser novamente fragmentados e analisados, o que auxilia na atribuição de suas estruturas.

A espectrometria de massas *tandem* envolve dois estágios de análise de massas separados por uma reação de fragmentação. Para um íon ser detectado, o íon precursor deve ser estável no primeiro estágio de análise de massas e o íon fragmento deve ser estável no segundo estágio (HAGER, 2004).

1.7 Quimiometria

A Quimiometria é uma área da química especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada. Segundo FERREIRA *et al.* (1999), a quimiometria não é uma disciplina da matemática, e sim da química, pois os problemas que ela se pressupõe a resolver são de interesse e originários da química, mesmo que as ferramentas para o tal provenham principalmente da matemática, estatística e computação. A definição de Quimiometria proposta pela Sociedade Internacional de Quimiometria é a seguinte: “*Quimiometria é a ciência relacionada a medidas realizadas em um sistema ou processo químico, obtendo informações sobre o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos*” (HIBBERT *et al.*, 2009). Ao se unir a Quimiometria e técnicas analíticas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) consegue-se classificar amostras em categorias ou grupos conforme suas semelhanças, ou ainda identificar variáveis que apresentem propriedades particulares para as amostras de interesse, uma vez que a primeira é uma poderosa ferramenta de análise de dados complexos e as demais possibilitam obtenções de um grande número de variáveis em uma única medida.

Inúmeros são os trabalhos utilizando a quimiometria aliada à HPLC e à RMN. YI *et al.* (2009) analisaram as alterações dos metabólitos secundários das cascas de tangerina através de *fingerprints* cromatográficos. MARTINS (2008) utilizou a análise multivariada juntamente com o perfil cromatográfico para o controle de qualidade de amostras comerciais de quebra-pedra. BOFFO

(2009) utilizou a RMN aliada a métodos quimiométricos para análise de méis e aguardentes. Neste projeto utilizou-se algumas ferramentas quimiométricas objetivando detectar, através de dados cromatográficos e de RMN, similaridades ou diferenças entre os espécimes de citros com a presença e ausência da bactéria *X. fastidiosa*.

Ao se analisar quimiometricamente um conjunto de dados, organiza-se os dados experimentais obtidos em uma matriz, chamada de matriz de dados, onde os experimentos ou amostras correspondem às linhas e os parâmetros dos experimentos (variáveis) correspondem às colunas. A matriz dos dados originais é constituída por n amostras e m variáveis. No caso da RMN as variáveis são os deslocamentos químicos e no caso do HPLC os tempos de retenção de um pico ou banda cromatográfica.

Geralmente são necessários alguns pré-tratamentos de dados, com o intuito de remover matematicamente fontes de variação indesejáveis como ruídos experimentais, desvios na linha de base, desalinhamentos de bandas cromatográficas, etc. Os tipos de pré-tratamento são: transformações, aplicadas às amostras e os pré-processamentos, aplicados às variáveis. As transformações minimizam ou eliminam variações aleatórias e sistemáticas ou uniformizam o conjunto de dados, tais como uso de logaritmos, normalizações, correção multiplicativa de sinal, transformada de Fourier, aplicação de derivadas, etc. Os pré-processamentos mais comumente usados são: centragem dos dados na média e auto-escalamento (MARTINS, 2008).

Em seguida, na matriz de dados, aplica-se métodos quimiométricos de análise exploratória como *Principal Components Analysis*- PCA e *Hierarchical Clusters Analysis*-HCA e também de classificação de amostras como *K- Nearest Neighbor*-KNN, *Soft Independent Modelling of Class Analogies*- SIMCA e *Partial Least Squares Discriminant Analysis* PLS-DA.

1.7.1 Principal Components Analysis (PCA)

A PCA ou Análise dos Componentes Principais, traduzida no português, trata-se de um método de análise multivariada o qual projeta dados n -dimensionais em um espaço de baixa dimensão, geralmente duas ou três. Essa projeção pode ser feita através do cálculo de componentes principais obtidas fazendo-se combinações lineares das variáveis originais (ROGGO *et al.*, 2007). Numa PCA, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos denominados *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais nos quais os dados são projetados (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os *scores* são as coordenadas das amostras nesse novo sistema de eixos e os *loadings* correspondem aos pesos ou importância das variáveis.

1.7.2 Hierarchical Clusters Analysis (HCA)

A HCA ou Análise de Agrupamentos Hierárquicos, trata-se de um método de reconhecimento não supervisionado de padrões, onde os dados multidimensionais são representados num gráfico bidimensional denominado dendograma. Neste dendograma considera-se cada amostra como um grupo unitário e faz-se agrupamentos sistematicamente, por similaridade. E quanto menor a distância entre essas amostras ou pontos no dendograma mais semelhantes são as mesmas (ROGGO *et al.*, 2007).

1.8 High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS)

A técnica de RMN HR-MAS, que pode ser traduzida como “Giro no Ângulo Mágico com Alta Resolução” é uma técnica da Ressonância Magnética Nuclear utilizada para análise de amostras semi-sólidas ou amostras sólidas hidratadas e trata-se de uma poderosa técnica no estudo de variações metabólitos em tecidos biológicos (HR-MAS). Um dos principais requisitos para que a amostra seja considerada semi-sólida é que suas moléculas devem ter um certo grau de mobilidade. E no caso de polímeros, sólidos puros ou resina essa mobilidade é adquirida ao adicionar-se um solvente, geralmente água para inchar a amostra. Mas em tecidos vegetais ou animais, a água contida nas suas células permite uma certa mobilidade dos metabólitos, fazendo com que uma folha fresca possa ser analisada diretamente ou *in natura* através da HR-MAS (VIZZOTTO, 2004).

Essa técnica também é muito sensível, podendo detectar substâncias com concentrações abaixo de 1 μM em uma mistura, requerendo uma quantidade mínima de material, quase que microgramas, e um baixo tempo de máquina para adquirir um espectro de RMN de ^1H (BROBERG *et al.*, 1998, CHIN *et al.*, 2000).

O princípio da técnica HR-MAS baseia-se no movimento giratório da amostra em velocidades da ordem de 3 a 5 KHz em um ângulo de $54,74^\circ$, considerado o ângulo mágico. Estes movimentos produzem a redução das larguras de linha, o aumento da resolução espectral, diminuição do acoplamento dipolar e também de deslocamentos químicos anisotrópicos (BROBERG *et al.*, 1998, CHIN *et al.*, 2000).

Diferentemente dos experimentos de RMN sólidos, a técnica de HR-MAS não requer potências elevadas para a realização dos experimentos, os únicos aparatos necessários são uma sonda específica e uma unidade

pneumática, necessária para controlar o giro da amostra em torno dos 5 KHz (MILLIS *et al.*, 1997).

Quando se quer observar moléculas não muito grandes em matérias vegetais, faz-se necessário eliminar alguns sinais provenientes da membrana e da parede celular dos mesmos. Geralmente estes “componentes” possuem tempos curtos de relaxação transversal e fornecem sinais alargados. Para o tal, utiliza-se uma seqüência de pulsos denominada CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gil). Essa seqüência mantém a magnetização no plano x-y através de sucessivos pulsos de 180° , seguidos por intervalos de tempo τ , até que os spins com valores menores de T_2 tenham relaxado, adquirindo-se então um espectro contendo apenas as ressonâncias de interesse (VIZZOTTO, 2004). A Figura 1.10 exemplifica essa seqüência CPMG.

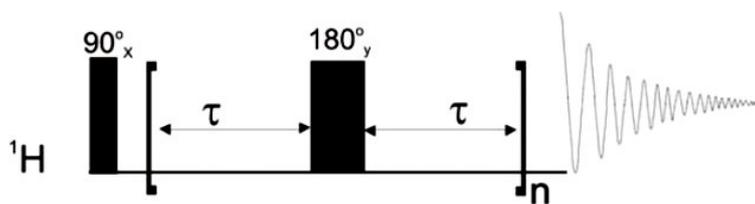


Figura 1.10. Seqüência de pulsos CPMG.

1.9 HPLC-UV-SPE-NMR

A Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada a Ressonância Magnética Nuclear (HPLC-NMR) surgiu em 1999 e trata-se de um acoplamento entre a cromatografia líquida (HPLC ou CLAE) e a ressonância magnética nuclear (NMR ou RMN). É uma técnica que fornece informações espectroscópicas altamente importantes para a elucidação estrutural dos metabólitos secundários presentes numa matriz complexa e é considerada atualmente uma das mais poderosas técnicas hifenadas. Mas como toda

hifenação como HPLC-MS, GC-MS, GC-GC, essa técnica possui algumas peculiaridades. Uma delas é a quantidade de amostras uma vez que na RMN tem-se de ter uma quantidade mínima para ser detectada e em HPLC a sobrecarga da coluna cromatográfica é um fator limitante na separação (SOUZA, 2009).

Outro cuidado é a composição da fase móvel, pois quanto mais heterogênea maior será o número de sinais interferentes gerados pelos solventes utilizados. Em sistemas de acoplamento direto entre HPLC e NMR utiliza-se como fase móvel água deuterada, a fim de diminuir custos com o uso de solventes orgânicos deuterados. Neste caso, torna-se necessário o uso de sequencias de pulsos especiais, possibilitando a supressão dos sinais relativos a este solvente (KLAUS, 2002).

Geralmente utiliza-se duas técnicas diferentes de interfaceamento: o modo de **fluxo contínuo** e o modo de **fluxo interrompido** (KLAUS, 1999). No fluxo contínuo, a separação cromatográfica é monitorada simultaneamente pela aquisição de espectros de ^1H RMN. A detecção fica limitada ao tempo de análise, onde o analito fica em contato com a bobina magnética, possibilitando apenas aquisições de espectros de ^1H RMN e utilizado somente para amostras mais concentradas (KLAUS, 2002). Já no modo de fluxo interrompido, quando o máximo da banda cromatográfica ou pico alcança a bobina de detecção, a corrida cromatográfica é interrompida. Deste modo é possível adquirir espectros com número de pulsos (ns) maiores, deixando-os com relações sinais ruídos maiores e ainda há possibilidade de aquisição de experimentos bi-dimensionais. Neste caso, tem-se o inconveniente que em cada corrida cromatográfica somente a análise de uma banda ou pico é possível por vez, pois efeitos como difusão de bandas e outros efeitos podem interferir na resolução cromatográfica enquanto o fluxo encontra-se interrompido (SOUZA, 2009).

Para solucionar os problemas citados acima, têm-se desenvolvido o acoplamento envolvendo o HPLC, a extração em fase sólida (SPE) e a RMN,

onde neste arranjo as diferentes bandas cromatográficas são “trapeadas” ou “aprisionadas” em cartuchos de SPE, possibilitando o acúmulo destas substâncias até a saturação dos mesmos aumentando significativamente sua concentração e a sensibilidade da técnica. Outra vantagem é que a corrida cromatográfica pode ser realizada com qualquer composição de fase móvel, não necessitando de solventes deuterados, uma vez que somente na transferência dos analitos trapeados dos cartuchos para o magneto é que se utiliza solventes deuterados (EXARCHOU *et al.*, 2005). A maior desvantagem do uso desta técnica esta na necessidade de otimizar as condições de trapeamento. Mas isso pode ser feito até mesmo com uma única corrida cromatográfica *off-line*, o que demana em pouco tempo e pequena quantidade de amostra. Outro fator a ser considerado é o valor desta unidade de SPE, a qual custa aproximadamente um quarto do valor do sistema como um todo (SOUZA, 2009). O Grupo de Produtos Naturais da UFSCar através do seu convênio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Controle Biorracional de Insetos Pragas adquiriu recentemente um HPLC-NMR o qual já foi instalado no Departamento de Química da UFSCar.

A Figura 1.11 exemplifica um sistema de acoplamento HPLC-SPE-NMR.

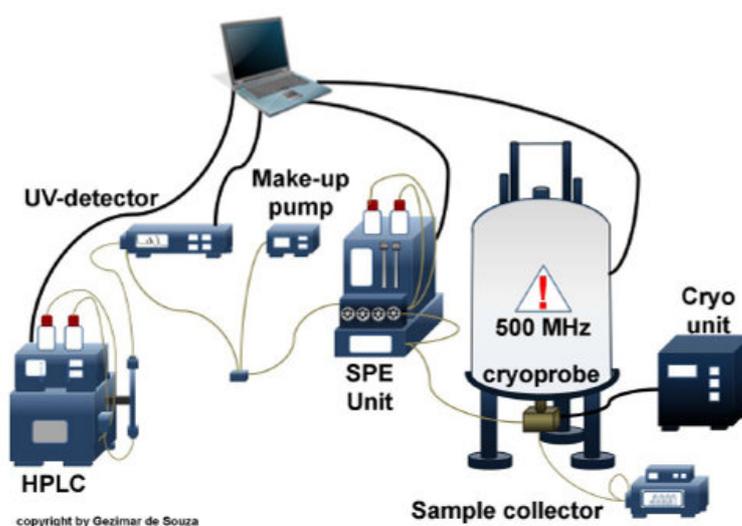


Figura 1.11. Esquema do sistema de HPLC-UV-SPE-NMR.

(Fonte: Souza 2009, © Gezimmar Donizetti de Souza/UFSCar)

2. Relevância do Trabalho

Conforme visto, em estudos fitoquímicos do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* realizados pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, pôde-se inferir que a reação de prenitação só ocorre nas raízes e as duas cumarinas xantiletina e xantoxiletina teriam sido translocadas para as partes superiores, aparecendo no cavalo do enxerto e no enxerto originário da laranja. Nos ensaios de inibição de desenvolvimento da *X. fastidiosa* verificou-se que a xantiletina apresentou o melhor resultado. Isto leva a questionar se poderia ser esta cumarina a responsável pela resistência de *C. limonia* à CVC. A xantiletina presente na parte superior do enxerto poderia não defender a planta contra a *X. fastidiosa*, devido a ela estar em pequena quantidade nestes órgãos.

Assim, visando encontrar estas respostas, o presente estudo visa o estudo das plantas matrizes, para verificar quais constituintes estariam no enxerto e não nas plantas mães. Para isto pretendem-se desenvolver metodologias de análises do perfil químico de *Citrus* através de LC/UV-MS. Os metabólitos já conhecidos no enxerto serão identificados com os padrões via CLAE e MS (MS/MS). Com a metodologia de análise de perfil químico desenvolvida, pretende-se aplicá-la na análise de variação deste no enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintoma após inoculação da bactéria, sem sintoma, mas com a *X. fastidiosa* presente (observada via Reação em Cadeia pela Polimerase -PCR) e na planta sadia (branco do experimento). Estes estudos poderão mostrar qual ou quais constituintes indicam mecanismo de defesa.

Conhecer as substâncias que estariam dando resistência a certos espécimens permitirá no futuro ampliar esta defesa a outros citros, utilizando as mesmas como bactericida sistêmico sem risco para a humanidade, pois seriam compostos da própria planta. Estas informações, em um futuro mais distante, permitirão desenvolver estudos genéticos, visando encontrar os genes que

codificam a síntese destes compostos e levá-los a aumentar a produção dos mesmos.

Sabe-se que a *X. fastidiosa* se desenvolve em biofilmes. Fazendo um levantamento de estudos destes biofilmes em outras bactérias foi verificado que eles se formam com a participação de substâncias sinalizadoras, entre elas alcalóides alquilquinolinos já isolados de espécies de *Citrus*. Assim, visando uma seqüência do projeto ao nível genético, procurou-se fazer o levantamento bibliográfico de ocorrência deste tipo de alcalóide. O uso destes alcalóides como bactericidas seria interessante, pois a bactéria dificilmente iria desenvolver mecanismo de defesa a uma substância similar a um de seus sinalizadores. Porém, os estudos genéticos seriam para um futuro após a tese.

Em resumo, os objetivos do trabalho foram:

1) Desenvolver metodologias para análises do perfil químico de *C.sinensis*, *C.limonia* e enxerto dos dois, através de LC/UV-MS.

2) Estudo do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintoma após inoculação da bactéria, sem sintoma, mas com a *X. fastidiosa* presente (observada via PCR) e planta sadia, analisando a variação de perfil químico.

3) Desenvolvimento de métodos de quantificação das cumarinas xantiletina e seselina e também dos flavonóides hesperidina e rutina por HPLC-UV e HPLC-MS/MS(SRM) em enxertos de *C.sinensis* sobre *C.limonia* com sintoma após inoculação da bactéria, sem sintoma, mas com a *X. fastidiosa* presente (observada via PCR) e planta sadia.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material Botânico

O porta-enxerto utilizado no desenvolvimento do trabalho foi o limão cravo (*C. limonia*) e a copa foi a laranja pêra (*C. sinensis*). As plantas utilizadas neste trabalho foram obtidas através da técnica de enxertia via borbulha, preparadas pelo pesquisador Sérgio Carvalho da Estação Experimental de Citricultura do Instituto Agrônomo de Campinas, cuja fazenda experimental encontra-se em Cordeirópolis, SP.

Paralelamente, produziu-se mudas por germinação de sementes de *C. limonia* e *C. sinensis* pés-francos. Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados com plantas da mesma idade e nas mesmas condições, evitando assim resultados equivocados de quantificação e de variação do perfil químico devido a fatores como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, etc.

3.2 Inoculação da Bactéria *Xylella fastidiosa*

O método de inoculação da bactéria *X. fastidiosa* empregado foi o mesmo utilizado por SOUSA *et al.* 2003, e por ALMEIDA *et al.* (2001) que consiste na inoculação mecânica, através de um objeto pontiagudo (agulha de seringa), por meio de pequenas perfurações para permitir a absorção da suspensão pelos vasos xilemáticos.

3.2.1 Avaliação da população bacteriana nos citros após inoculação da bactéria *X. fastidiosa*

Após 90 dias de inoculação avaliou-se a presença de *X. fastidiosa*, removendo as folhas, especificamente a nervura central, de todas as plantas

inoculadas extraindo-se o DNA genômico total (planta + bactéria) conforme Murray & Thompson (1980), e realizando a análise de PCR (*polymerase chain reaction* - reação em cadeia pela polimerase) dos extraídos a fim de verificar a presença ou não da bactéria. A revelação da PCR se deu em gel de agarose realizado num sistema de eletroforese horizontal horizon com fonte modelo 200, da Gibco BRL Life Technologies, USA.

3.3 Ressonância Magnética Nuclear

3.3.1 Medidas de HR-MAS em *citros* aliadas á ferramentas quimiométricas

Os experimentos de RMN foram realizados em um equipamento da marca BRUKER, modelo DRX 400, sob um campo magnético de 9,4 Tesla, cuja frequência do hidrogênio é de 400,21 MHz. As medidas de HR-MAS foram realizadas utilizando-se uma sonda específica para esta técnica, sendo esta uma sonda multinuclear de observação direta de 4 mm de diâmetro para aquisição dos espectros de RMN de ^1H . Empregou-se também um fluxo de ar comprimido e uma bomba pneumática numa pressão superior a 6 bares a fim de manter o giro da amostra em 5 KHz.

As análises quimiométricas foram realizadas em um microcomputador com sistema operacional Windows XP, utilizando os seguintes *softwares*: Microsoft Office Excel e Pirouette[®] versão 4.0 (Infometrix Inc.; Washington, USA).

3.4 Cromatografia

Todos os solventes utilizados foram de grau CLAE.

3.4.1 Análise da variação do perfil químico de *citros* via HPLC aliada á ferramentas quimiométricas

Para a análise da variação do perfil químico de *Citrus* utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Shimadzu com sistema quaternário de bombas 10 AD, detector tipo arranjo de diodos modelo SPD-10 AvP, injetor automático modelo SIL 10-A, com degaseificador Shimadzu DGA-10. As condições cromatográficas foram: Coluna Phenomenex® Luna C18 (55 x 4,6 mm), coluna de segurança C18 (4x3 mm); fase móvel MeOH: ACN (1:1) acidificada com 0,1 % de ácido fórmico **B**, e solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) **A**. A inclinação utilizada foi 15-40% em 16 min, 40-50% até os 25 min, 50-95% até os 40 min., permanecendo isocrático em 95% de **B** por 10 min; o retorno do gradiente foi feito em 10 min (95-15% de **B**). Detector (UV-DAD) $\lambda=190-600$ nm. A alça de amostragem foi de 20 μ l e a vazão de 1,0 ml/min.

As análises quimiométricas foram realizadas em um microcomputador com sistema operacional Windows XP, utilizando os seguintes *softwares*: Microsoft Office Excel®, Matlab® (Mathworks Inc.; Natick, USA), Pirouette® versão 4.0 (Infometrix Inc.; Washington, USA) e a rotina para alinhamento dos picos ou bandas cromatográficas foi disponibilizada no site http://www.models.klv.dk/source/DTW_COW/index.asp.

3.4.2 Análise dos extratos de citros utilizando a técnica HPLC-UV-SPE-NMR

Utilizou-se um equipamento da marca BRUKER, modelo AV500 Ultrashield, sob um campo magnético de 11,7 Tesla, (500,13 MHz para a frequência de hidrogênio). O sistema de HPLC-UV-SPE foi composto por um cromatógrafo Agilent Technologies modelo 1100, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e

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

As condições cromatográficas foram: Coluna Phenomenex® Luna C18 (150 x 4,6 mm), coluna de segurança C18 (4x3 mm); a fase móvel consistiu em ACN (**B**) e água (**A**). A inclinação do método utilizado foi 5-40% em 22 min, 40-45% até os 25 min, 45-55% até os 37 min, e de 55-95% até os 40 min, permanecendo isocrático em 95% de **B** por 10 min; o retorno do gradiente foi feito em 10 min (95-5% de **B**).

3.4.3 Análise da variação do perfil químico de citros via HPLC-MS/MS (ou CLAE-EM/EM)

Para a análise da variação do perfil químico de *Citrus* via HPLC-MS/MS utilizou-se o Cromatógrafo Líquido (Waters) – Alliance 2695 equipado com Detector de UV (PDA) para CLAE Waters 2996 Waters 2695 Separations Module acoplado ao Espectrômetro de Massas QuattroLC – MICROMASS, triplo-quadupolo, APCI.

As condições cromatográficas foram: Coluna Phenomenex® Luna C18 (150 x 4,6 mm), coluna de segurança C18 (4x3 mm); a fase móvel consistiu em MeOH: ACN (1:1) acidificada com 0,1 % de ácido fórmico **B**, e solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) **A**. A inclinação utilizada foi 15-40% em 16 min, 40-50% até os 25 min, 50-95% até os 40 min, permanecendo isocrático em 95% de **B** por 10 min; o retorno do gradiente foi feito em 10 min (95-15% de **B**). O fluxo de entrada no espectrômetro de massas foi regulado utilizando-se um splitter numa vazão de 0,3 ml/min.

3.4.4 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas raízes de citros

Para a quantificação das cumarinas xantiletina e seselina nas raízes dos citros em estudo, utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Shimadzu com sistema binário de bombas 10 AD, detector tipo arranjo de diodos modelo SPD-10 A, injetor automático modelo SIL 10-A, com desgaseificador Shimadzu DGA-10. As condições cromatográficas foram: Coluna Phenomenex® Luna C18 (150 x 4,6mm), coluna de segurança C18 (4x3 mm); fase móvel H₂O:MeOH:ACN (50:35:15) no modo reverso isocrático de eluição.

O tempo de duração da corrida foi de 50 min, sendo que dos 30 a 40 min aumentou-se a concentração da fase orgânica até 90% a fim de se realizar a “limpeza” da coluna cromatográfica, deixando-a isocrática por 10 min. Posteriormente condicionou-se a coluna com a fase móvel isocrática inicial (50:35:15) por 10 min entre cada análise.

A alça de amostragem foi 20 µl, a vazão de 1,0 ml/min e a temperatura do forno foi de 30°C. O comprimento de onda utilizado na quantificação das cumarinas foi de 220 nm.

3.4.5 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas folhas e caules de citros

A quantificação das cumarinas xantiletina e seselina nas folhas e caules superiores e inferiores de citros foi realizada via HPLC-MS/MS, onde utilizou-se o Cromatógrafo Líquido (Waters) – Alliance 2695 equipado com Detector de UV (PDA) para CLAE Waters 2996 Waters 2695 Separations Module acoplado ao Espectrômetro de Massas QuattroLC – MICROMASS, triplo-quadupolo, APCI.

As condições cromatográficas foram: Coluna X-terra® Phenyl Hexyl 3,5 µm (30 x 5 mm); fase móvel H₂O:MeOH:i-PropOH (62:35:2),

contendo 0,1% TFA, modo isocrático de eluição e duração de 10 min. O detector utilizado foi o DAD-UV, alça de amostragem de 20 µl e vazão de 0,9 ml/min.

3.4.6 Quantificação dos flavonóides hesperidina e rutina nas folhas e caules de citros

Para a quantificação dos flavonóides nas folhas, caules superiores e caules inferiores de citros utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A, detector de Ultravioleta G1314B e forno. As condições cromatográficas foram: Coluna Phenomenex® Luna C18 (25 x 4,6 mm), coluna de segurança C18 (4x3 mm); fase móvel H₂O:ACN:THF (80:5:15+ 0,1% ácido fórmico) no modo reverso isocrático de eluição. O tempo de duração da corrida foi de 40 min.

A alça de amostragem foi 20 µl, a vazão de 1,0 ml/min e a temperatura do forno foi de 40°C. O comprimento de onda utilizado na quantificação dos flavonóides foi de 283 nm.

3.5 Demais equipamentos, solventes e reagentes utilizados

Abaixo segue uma lista dos principais equipamentos, materiais, solventes e reagentes utilizados no decorrer deste trabalho de doutorado.

- ✓ Metanol grau HPLC- J.T. Baker e Mallinckrodt
- ✓ Acetonitrila HPLC – J.T. Baker e Mallinckrodt
- ✓ Membrana Teflon 0,45 e 0,20 µm (Millipore®)
- ✓ Tubos Falcon 15 e 50 mL
- ✓ Seringas de 1,0 e 5,0 mL

- ✓ Água Ultra Pura, obtida num sistema MILLI-Q, 18 Ohm .(Milipore)
- ✓ Padrões analíticos hesperidina e rutina, com grau de pureza de 90% via HPLC, Sigma-Aldrich
- ✓ Centrífuga marca Eppendorf modelo 5810R com sistema de refrigeração
- ✓ Ultra-turrax IKA T 10 basic
- ✓ Seringas HAMILTON Microliter 25, 50 e 250 μL
- ✓ Banho termostaticado com controle de temperatura, circulação de água e agitador magnético da Arsec
- ✓ Bomba Peristáltica
- ✓ Rota evaporador – Tecnal Mod. 120
- ✓ vórtex PHOENIX AP56.
- ✓ Evaporador rotativo Büchi com banho de aquecimento
- ✓ Evaporador de solvente a vácuo (SPEEDVAC) da Savant Speedvac Plus SC 10 A acoplado com um refrigerador Vapor Trap RVT-400 Savant, bomba a vácuo Savant VLP-200 e registrador Digital Vacuum Gauge DVG 50 Savant.
- ✓ Balança Analítica – Bel Engineering Mod. Mark 210A
- ✓ Balança semi-analítica – Bel Engineering Mod. Mark 500
- ✓ Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf), utilizado para realização dos ciclos de PCR
- ✓ Freezer -86°C da marca FORMA Scientific
- ✓ Micropipetas marca Eppendorf de 20-200 μL e 200- 1000 μL .
- ✓ Kit de reagentes de PCR TaqMan, obtido da Applied Biosystems
- ✓ Moinho Criogênico modelo 6750 Freezer MILL Keypad Overlayl (5 pex Cert Prep., USA)

4. Procedimento Experimental

4.1 Inoculação da Bactéria *Xylella fastidiosa*

Ao completar noventa dias após a enxertia de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, 70 mudas foram inoculadas mecanicamente com a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa*. Esta estirpe foi isolada de uma planta matriz de laranja pêra com sintomas de CVC mantida em casa de vegetação. A bactéria foi cultivada *in vitro* a 28 °C, por 10 dias, em placa de petri com meio de cultura PW agar. Para a inoculação nas plantas, colônias de *X. fastidiosa* foram retiradas do meio de cultura, ressuspensas em água destilada e removidas de restos do meio de cultura por centrifugação (3.000 xg/5 min). A concentração bacteriana da suspensão era de aproximadamente $4,9 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia por mililitros de solução (UFC ml⁻¹).

Em seguida pipetou-se 10 µl da suspensão e os depositou sobre os caules superiores das mudas em pelo menos 3 pontos. Perfurou-se com agulha sobre a gota da suspensão. Esse método de inoculação empregado foi o mesmo utilizado por SOUSA *et al.* 2003, e por ALMEIDA *et al.* (2001) que consiste na inoculação mecânica, através de um objeto pontiagudo (agulha de seringa), por meio de pequenas perfurações para permitir a absorção da suspensão pelos vasos xilemáticos. Com o intuito de obter uma maior eficiência de penetração bacteriana no interior do caule, as plantas foram submetidas a estresse hídrico de dois dias antes da inoculação, o que pôde resultar em uma rápida e completa absorção da suspensão. A região do caule inoculada com a bactéria foi marcada para que as folhas emitidas acima deste ponto fossem utilizadas nas avaliações.

Os enxertos inoculados, 10 enxertos não inoculados (mantidos como controle negativo), 80 mudas de laranja pêra pé-franco e 80 mudas de limão cravo pé-franco foram mantidas em casa de vegetação a 28 °C até a avaliação dos sintomas da doença e posterior preparo das amostras.

4.1.1 Avaliação da população bacteriana nos citros após inoculação da bactéria *X. fastidiosa*

Após três meses de inoculação da bactéria, em agosto de 2006, avaliou-se a presença de *X. fastidiosa*, removendo as folhas, especificamente a nervura central, de todas as plantas e extraiu-se o DNA genômico total (planta + bactéria) conforme Murray & Thompson (1980). A população bacteriana nas plantas inoculadas com a bactéria foi avaliada através da análise de PCR (*polymerase chain reaction* - reação em cadeia pela polimerase) dos extraídos a fim de verificar a presença ou não da bactéria. O procedimento de extração e posterior análise de PCR consistem nas seguintes etapas:

a) Amostras de 100 mg do pecíolo e parte da nervura central de uma folha recém colhida das plantas inoculadas com *X. fastidiosa* foram pesadas e trituradas em um almofariz sob nitrogênio líquido.

b) Em seguida as amostras trituradas foram transferidas para um eppendorf e acrescenta-se 800 µL da solução tampão CTAB (Tris-HCl 50mM, EDTA 10mM, NaCl 120mM, CTAB 1% e Mercaptoetanol 0,1%).

c) Homogeneizou-se os eppendorfs, vortexando-os por 10 s, incubando-os por 30 min em banho Maria a 60°C.

d) Resfriou-se à temperatura ambiente e adicionou-se 750 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); agitou-se suavemente em torno de 80 vezes.

e) Centrifugou-se por 8 min à 12000 rpm, e transferiu-se 550 µL da fase superior (sobrenadante) para outro eppendorf.

f) Na seqüência, às amostras acrescentou-se 0,1 volume (55 µL) de tampão de precipitação CTAB (Tris-HCl 50mM, EDTA 10mM, CTAB 1%), agita-se moderadamente; repetiu-se a etapa b (adição de clorofórmio) e centrifugou-se por 8 min a 12.000 rpm.

g) Transferiu-se novamente 450 μ L do sobrenadante resultante da centrifugação em f, adicionou-se 450 μ L de tampão de precipitação CTAB, agita-se levemente deixando em repouso por 20 min.

h) Após decorrido esse tempo, centrifugou-se por 4 min à 10000 rpm, descartou-se o sobrenadante e observou-se a presença do *pellet* aderido à parede do eppendorf.

i) Dissolveu-se o precipitado (*pellet*) em 400 μ L da solução TE alto sal (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM e NaCl 1M) em banho Maria a 65°C, adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto gelado e incubou-se a -80°C por 15 min ou overnight a -20°C.

j) Após, centrifugou-se por 20 min à 12000 rpm , separou-se o *pellet* do sobrenadante e o lavou com etanol 70%.

l) Centrifugou-se por 5 min à 12000 rpm, removeu-se o sobrenadante, acrescentou-se 400 μ L de etanol 100%, centrifugou-se por 5 min à 12000 rpm

m) Removeu-se o sobrenadante resultante da centrifugação em (l), secando-o a 55 °C por aproximadamente 10 min em estufa de circulação de ar.

n) Finalmente, dissolveu-se o *pellet* formado na etapa anterior em 40 μ L de TE + RNase , deixando-o reagir por 30 min à 37°C.

o) Revelou-se o produto da reação anterior em gel de agarose 0,8%.

No preparo do tampão de extração utilizou-se os seguintes reagentes e as seguintes proporções:

Tabela 4.1. Reagentes necessários para o preparado do tampão de extração de DNA genômico total (planta + bactéria) com sarcosyl.

Reagente	Quantidade/amostra
Tris-HCl (1M)	100 μ L
EDTA (0,5M)	20 μ L
NaCl (5M)	140 μ L
CTAB (5%)	200 μ L
Sarcosyl 10%	200 μ L
Mercaptor 140 mM	200 μ L
H ₂ O	até completar o volume de 900 μ L

Para a realização de PCR é necessário adicionar ao DNA extraído uma solução denominada de “mix” a qual possui os seguintes reagentes e padrões:

Tabela 4.2. Proporção entre padrões e reagentes necessários para o preparo do “mix” utilizado juntamente com o DNA genômico total na análise de PCR.

Reagente	Quantidade/amostra
TE (tampão alto sal)	2,5 μ L
MgCl ₂	1,25 μ L
DNTP 2,5 mM	1,0 μ L
Primer CVC-1	0,8 μ L
Primer CVC-272-2	0,8 μ L
TAQ polimerase	0,3 μ L
DNA	3 μ L
H ₂ O	15,35 μ L

Adicionou-se o DNA genômico (3 μL) num eppendorf de 500 μL ou num poço de placa de Elisa e em seguida adiciona-se o “mix” sob banho de gelo. Transferiu-se a placa ou o eppendorf para o aparelho Mastercycler Personal da Eppendorf, programou-se os ciclos de PCR e deixou a reação de PCR acontecer pelo prazo de 3 horas.

Ao final, pipetou-se 25 μL do produto de PCR, 5 μL de corante e 7 μL de Ladder e aplicou-se 10 μL no gel de agarose, o qual foi montado no suporte e adicionou-se o volume necessário da solução tampão de corrida, sendo então aplicada uma intensidade de corrente de 20 mA até o *loading buffer* atingir a metade do do gel. Neste momento, desmontou-se o sistema e iniciou-se o processo de revelação.

Para o preparo do gel de agarose utilizou-se os seguintes reagentes.

Tabela 4.3. Reagentes utilizados no preparo do gel de agarose.

Reagente	Quantidade
TE (tampão alto sal)	160 mL
Agarose	1,5 g
Brometo de etídio	4,5 μL

4.2 Ressonância Magnética Nuclear

4.2.1 Medidas de HR-MAS em citros aliadas á ferramentas quimiométricas

As partes vegetais de citros em estudo (raízes, caules inferiores, caules superiores e folhas) foram lavadas com água corrente para retirar o excesso de matéria orgânica, e colocadas em estufa de circulação de ar com temperatura controlada de 45°C por três dias com o intuito de desidratá-las totalmente. Em seguida, o material seco foi moído em moinho de facas Willey,

pulverizado em moinho criogênico e peneiradas utilizando uma peneira molecular de 0,25 μm , a fim de deixar todas as partículas homogêneas.

O procedimento de preparo das amostras para a medida de HR-MAS se deu de acordo com o protocolo de VIZZOTO (2004), onde inseriu-se uma pequena quantidade de amostra seca e moída num rotor cujo volume é de 24 μL . Adicionou-se também algumas gotas de uma solução de TSPA- d_4 em água deuterada (D_2O). O sinal do TSPA- d_4 é utilizado tanto para avaliar a qualidade da medida espectral quanto para calibrar o aparelho. O excesso da solução foi expelido após conectar o insert e fechar o rotor. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.3 Cromatografia

4.3.1 Análise da variação do perfil químico de citros via HPLC aliada á ferramentas quimiométricas

Assim como no item 4.2.1 as partes vegetais de citros foram lavadas com água corrente para retirar o excesso de matéria orgânica, e colocadas em estufa de circulação de ar com temperatura controlada de 45°C por três dias com o intuito de desidratá-las totalmente. Em seguida, o material seco foi moído em moinho de facas Willey, pulverizado em moinho criogênico e peneiradas utilizando uma peneira molecular de 0,25 μm , a fim de deixar todas as partículas homogêneas evitando assim erros experimentais de extração.

Pesou-se 50 mg de material seco, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de metanol:água (1:1), triturou-se e extraiu-se os metabólitos por 90 s utilizando-se um ultraturrax à 20000 rpm e centrifugou-se a 4000 rpm por 5 min. Filtrou-se o sobrenadante em filtros PTFE MILLIPORE® 30 mm de diâmetro e 0,22 μm de poro. Repetiu-se o procedimento de extração por mais duas vezes.

Secou-se o produto de extração num equipamento SpeedVac, re-suspendeu-se novamente em 6,0 mL na solução de metanol:água (1:1) e retirou-se uma alíquota de 20,0 µL para análise por HPLC-UV.

4.3.2 Análise dos extratos de citros utilizando a técnica HPLC-UV-SPE-NMR

O método de extração dos metabólitos secundários para a análise dos extratos de citros utilizando a técnica de HPLC-UV-SPE-NMR foi o mesmo citado anteriormente (item 4.3.1).

4.3.3 Análise da variação do perfil químico de citros via HPLC-MS/MS (ou CLAE-EM/EM)

Pesou-se 50 mg de material seco, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de metanol:água (1:1), triturou-se e extraiu-se os metabólitos por 90 s utilizando-se um ultraturrax à 20000 rpm e centrifugou-se a 4000 rpm por 5 min. Filtrou-se o sobrenadante em filtros PTFE MILLIPORE[®] 30 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro. Repetiu-se o procedimento de extração por mais duas vezes.

Secou-se o produto de extração num equipamento SpeedVac, re-suspendeu-se novamente em 6,0 mL na solução de metanol:água (1:1) e retirou-se uma alíquota de 1,0 mL para análise por HPLC-MS/MS.

4.3.4 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas raízes de citros

4.3.4.1 Preparo das amostras

Pesou-se 20 mg de material seco (raízes de citros), adicionou-se 1,0 mL de metanol 100%, agitou-se por 30 s utilizando-se um vórtex e centrifugou-se a 12000 rpm por 20 min. Filtrou-se o sobrenadante em filtros PTFE MILLIPORE[®] 30 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro. Repetiu-se o procedimento de extração por mais duas vezes.

Secou-se o produto de extração num equipamento SpeedVac, re-suspendeu novamente em 3,0 mL de metanol e retirou-se uma alíquota de 20,0 µL para análise por HPLC-UV.

Todas as extrações foram realizadas em triplicatas, ou seja, utilizou-se três amostras de 20 mg cada.

4.3.4.2 Preparo das soluções padrão, padrão estoque, padrões de análise e amostras controle de qualidade

Para o preparo das soluções padrão das cumarinas xantiletina e seselina utilizou-se o seguinte procedimento:

- a) xantiletina: Pesou-se exatamente uma massa 10 mg da cumarina xantiletina, a qual foi previamente isolada, e caracterizada por RMN de ¹H e por CG-MS, cujo grau de pureza via HPLC demonstrou-se maior que 95% e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida este padrão foi solubilizado em MeOH e armazenado a -20°C. Sua concentração nominal foi de 1 mg/mL , 1000 ppm ou 1000 µg/mL .
- b) Seselina: Assim como a xantiletina, pesou-se uma massa de 10 mg dessa cumarina, transferiu-a para um balão volumétrico de 10 mL e a

solubilizou em 10 mL de MeOH. Sua concentração nominal foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e a mesma foi armazenada a -20°C .

Em seguida preparou-se as soluções de trabalho, tanto da xantiletina quanto da seselina, também em MeOH, nas concentrações de 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ para os padrões de calibração e 12, 500 e 900 $\mu\text{g/mL}$ para os controles de qualidade.

A curva de calibração para o método desenvolvido foi a denominada curva de calibração por padronização externa e foi preparada como descrito abaixo:

Preparou-se em triplicata soluções de calibração, pipetando 100 μL das soluções de trabalho em tubos de ensaio, e evaporou-se o solvente através de ar comprimido. Após a secagem, solubilizou-se os padrões em 1 mL de MeOH e os agitou num vortex por 30 s. Obteve-se as seguintes concentrações finais dos padrões de calibração: 1, 2, 4, 10, 20, 40 e 100 $\mu\text{g/mL}$, tanto para a xantiletina quanto para a seselina. As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear, considerando a relação área do pico/concentração dos padrões. A linearidade da curva de calibração foi obtida pelo valor do coeficiente de correlação linear de Pearson.

As curvas de calibração por adição de padrão tanto para a xantiletina quanto para a seselina foram preparadas a partir das soluções padrão das mesmas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para isso utilizou-se as seguintes concentrações:

Xantiletina: 10, 15, 30, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$.

Seselina: 10, 15, 30, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$

Ambas as cumarinas foram adicionadas às matrizes de raízes de citros, secas em fluxo de ar afim de evaporar todo o solvente, e extraídas utilizando a metodologia citada no item 4.2.1.1.

Assim como na curva de calibração, as curvas de adição de padrão foram obtidas através da regressão linear, considerando a área das bandas

cromatográficas relativas às concentrações dos analitos já presentes nas matrizes mais os analitos adicionados às mesmas. Calculou-se os fatores de resposta para curva e através do cálculo de retorno, o teor das cumarinas em cada amostra e o poder de extração da técnica.

4.3.4.3 Figuras de mérito utilizadas na validação do método analítico por HPLC

As figuras de mérito utilizadas na validação do método analítico das cumarina xantiletina e seselina foram a seletividade, a eficiência de extração ou recuperação, a precisão (intra e inter dia) e exatidão.

Para a seletividade foram utilizadas seqüências de análise contendo três amostras. A recuperação se deu no preparo das curvas de adição de padrão, pois não havia amostras isentas dos analitos de interesse e nem padrões similares aos analitos que pudessem ser utilizados como padrão interno.

Para avaliação da precisão intra e inter dia preparou-se em quintuplicata, a partir das soluções padrão, amostras nas seguintes concentrações: 1,2; 50 e 90 µg/mL, em dias não consecutivos. A precisão do método analítico foi expressa no coeficiente de variação CV (%) das replicatas.

Já a exatidão foi expressa em porcentagem entre a razão do valor médio das concentrações extraídas sobre a concentração média das concentrações adicionadas. Além do cálculo acima, realizou-se também o chamado “teste cego” para o cálculo da exatidão. Os valores considerados aceitos foram:

- Precisão: CV menores que 3% para amostras preparadas a partir dos padrões estoque e 15% para as amostras de raízes;
- Exatidão: desvios aceitos menores que 2% do valor nominal da concentração.

4.3.4.4 Limites de Quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) foi determinado pela menor concentração, de três replicas, onde a precisão não excedia 20% de variabilidade e a exatidão não excedia os desvios de 20% do valor nominal da concentração. O limite de detecção (LD) foi determinado considerando a relação sinal/ruído de três vezes a linha de base referente as bandas cromatográficas da xantiletina e da seselina.

4.3.5 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas folhas, caules inferiores e caules superiores de citros

4.3.5.1 Preparo das amostras

As partes aéreas de citros (folhas, caules superiores e inferiores) depois de coletadas foram lavadas com água corrente e colocadas em estufa de circulação de ar com temperatura controlada de 45°C por três dias. Em seguida, o material seco foi moído em moinho de facas Willey, pulverizado em moinho criogênico e peneiradas utilizando uma peneira molecular de 0,25 µm.

Pesou-se 50 mg de material seco, adicionou-se 2,0 mL de metanol 100%, agitou-se por 30 s utilizando-se um vórtex, extraiu-se utilizando um ultraturrax IKA a 20000 rpm por 1 min e 30 s e centrifugou-se a 4000 rpm por 4 min. Filtrou-se o sobrenadante em filtros PTFE MILLIPORE® 30 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro. Repetiu-se o procedimento de extração por mais duas vezes.

Secou-se o produto de extração num equipamento SpeedVac, re-suspendeu novamente em 6,0 mL de metanol e retirou-se uma alíquota de 20,0 µL para análise por LC-MS-MS. Todas as extrações foram realizadas em triplicatas.

4.3.5.2 Preparo das soluções padrão, padrão estoque, padrões de análise e amostras controle de qualidade

Para o preparo das soluções padrão das cumarinas xantiletina e seselina utilizou-se o seguinte procedimento:

- c) Xantiletina: Pesou-se exatamente uma massa 10 mg da cumarina xantiletina, a qual foi previamente isolada, e caracterizada por RMN de ^1H e por CG-MS, cujo grau de pureza via HPLC demonstrou-se maior que 95% e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida este padrão foi solubilizado em MeOH, retirou-se uma alíquota de 1 mL e diluiu-se para 10 mL. A concentração nominal final foi de 10 $\mu\text{g/mL}$ e a solução foi armazenada a -20°C .
- d) Seselina: Assim como a xantiletina, pesou-se uma massa de 10 mg dessa cumarina, transferiu-a para um balão volumétrico de 100 mL, solubilizou-se em 100 mL de MeOH e a diluição foi feita até sua concentração nominal atingir 10 $\mu\text{g/mL}$ e a mesma foi armazenada a -20°C .

Em seguida preparou-se as soluções de trabalho, tanto da xantiletina quanto da seselina, também em MeOH, nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 1,00; 5,00; e 10 $\mu\text{g/mL}$ para os padrões de calibração e 0,012; 4,50 e 8,00 $\mu\text{g/mL}$ para os controles de qualidade.

A curva de calibração para o método desenvolvido foi a denominada curva de calibração por padronização externa e foi preparada analogamente ao item 4.2.2.2.

As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear, considerando a relação área do pico/concentração dos padrões. A linearidade da curva de calibração foi obtida pelo valor do coeficiente de correlação linear de Pearson.

As curvas de calibração por adição de padrão tanto para a xantiletina quanto para a seselina foram preparadas a partir das soluções padrão das mesmas na concentração de 100 µg/mL. Para isso utilizou-se as seguintes concentrações:

Xantiletina: 0,5; 1,0 e 3,0 µg/mL.

Seselina: 0,5; 1,0 e 3,0 µg/mL

Ambas as cumarinas foram adicionadas às matrizes de caules e folhas de citros, secas em fluxo de ar a fim de evaporar todo o solvente, e extraídas utilizando a metodologia citada no item 4.2.2.1.

As curvas de adição de padrão foram obtidas através da regressão linear, considerando a área das bandas cromatográficas relativas às concentrações dos analitos já presentes nas matrizes mais os analitos adicionados às mesmas.

4.3.5.3 Parâmetros utilizados do método analítico por HPLC-MS/MS

Não se utilizou todas as figuras de mérito necessárias para a validação do método analítico via HPLC-MS/MS das cumarinas xantiletina e seselina nas folhas e caules de citros, mas avaliou-se a seletividade, a eficiência de extração ou recuperação, a precisão e exatidão.

Para a seletividade foram utilizadas seqüências de análise contendo três amostras. A recuperação se deu no preparo das curvas de adição de padrão, pois não havia amostras isentas dos analitos de interesse e nem padrões similares aos analitos que pudessem ser utilizados como padrão interno.

Para a avaliação da precisão preparou-se em quintuplicata, a partir das soluções padrão, amostras nas seguintes concentrações: 0,012; 4,50 e 8,00 µg/mL. A precisão do método analítico foi expressa no coeficiente de variação CV (%) das replicatas. Já a exatidão foi expressa em porcentagem entre a razão

do valor médio das concentrações extraídas sobre a concentração média das concentrações adicionadas. Os valores considerados aceitos foram:

- Precisão: CV menores que 15% para amostras preparadas a partir dos padrões estoque e 20% para as amostras de folhas e caules;
- Exatidão: desvios aceitos menores que 15% do valor nominal da concentração.

4.3.5.4 Limites de Quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) foi determinado pela menor concentração, de três replicas, onde a precisão não excedia 20% de variabilidade e a exatidão não excedia desvios de 20% do valor nominal da concentração. O limite de detecção (LD) foi determinado considerando a relação sinal/ruído de três vezes a linha de base referente às bandas cromatográficas da xantiletina e da seselina.

4.3.6. Quantificação dos flavonóides hesperidina e rutina nas folhas e caules de citros

Para a quantificação dos flavonóides nas folhas, caules superiores e caules inferiores de citros pesou-se 50 mg de material seco, adicionou-se 2,0 mL de metanol:água (1:1), agitou-se por 30 s, extraiu-se utilizando um ultraturrax IKA a 20000 rpm por 1 min e 30 s e centrifugou-se a 4000 rpm por 4 min. Filtrou-se o sobrenadante em filtros PTFE MILLIPORE[®] 30 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro. Repetiu-se o procedimento de extração por mais duas vezes.

Secou-se o produto de extração num equipamento SpeedVac, re-suspendeu novamente em 6,0 mL de metanol e retirou-se uma alíquota de 20,0 µL para análise por HPLC-UV. Todas as extrações foram realizadas em triplicatas, ou seja, utilizou-se três amostras de 50 mg cada.

4.3.6.1 Preparo das soluções padrão, padrão estoque, padrões de análise e amostras controle de qualidade

Para o preparo das soluções padrão dos flavonóides hesperidina e rutina utilizou-se o seguinte procedimento:

- e) Hesperidina: pesou-se exatamente uma massa 10 mg da mesma, a qual foi obtida comercialmente, cujo grau de pureza está em torno de 90% e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida este padrão foi solubilizado em MeOH e armazenado a -20°C. Sua concentração nominal foi de 1 mg/mL ou 1000 ppm .
- f) Rutina: assim como a hesperidina, pesou-se de 10 mg do flavonóide, transferiu-a para um balão volumétrico de 10 mL e a solubilizou em 10 mL de MeOH. Sua concentração nominal foi de 1000 ppm e a mesma foi armazenada a -20°C.

Em seguida preparou-se as soluções de trabalho, tanto para a hesperidina quanto para a rutina, nas concentrações de 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL; 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL para os padrões de calibração da hesperidina e rutina respectivamente e 40, 500 e 900; 20, 250 e 450µg/mL para os controles de qualidade.

A curva de calibração para o método desenvolvido foi também a denominada curva de calibração por padronização externa e foi preparada de modo análogo ao item 4.3.4.2.

Obtiveram-se as seguintes concentrações finais dos padrões de calibração: 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL para a hesperidina e 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 µg/mL para a rutina. As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear, considerando a relação área do pico/concentração

dos padrões. A linearidade da curva de calibração foi obtida pelo valor do coeficiente de correlação linear de Pearson.

As curvas de calibração por adição de padrão para os flavonóides citados acima foram preparadas a partir das soluções padrões das mesmas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como trata-se de matrizes diferentes; folhas e caules, adicionou-se os padrões hesperidina e rutina numa matriz de caules e numa matriz de folhas.

As concentrações utilizadas foram:

- Hesperidina

folhas: 1,0; 3,0; 10; 50; 60 $\mu\text{g/mL}$.

caules: 3,0; 6,0; 20; 40; 70 $\mu\text{g/mL}$.

- Rutina:

folhas: 2,0; 6,0; 10; 20; 25; 35 $\mu\text{g/mL}$

caules: 5,0; 15,0; 30; 35; 45; $\mu\text{g/mL}$.

Ambos os flavonóides foram adicionadas às matrizes de raízes de *citrus*, secas em fluxo de ar a fim de evaporar todo o solvente, e extraídas utilizando a metodologia citada no item 4.2.1.1.

Assim como na curva de calibração, as curvas de adição de padrão foram obtidas através da regressão linear, considerando a área das bandas cromatográficas relativas às concentrações dos analitos já presentes nas matrizes mais os analitos adicionados às mesmas. Calculou-se os fatores de resposta para curva e através do cálculo de retorno, o teor dos flavonóides em cada amostra e o poder de extração de da técnica.

4.3.6.2 Figuras de mérito utilizadas na validação do método analítico por HPLC

As figuras de mérito utilizadas na validação do método analítico dos flavonóides foram: a seletividade, a eficiência de extração ou recuperação, a precisão (intra e inter dia) e a exatidão.

Para a seletividade foram utilizadas seqüências de análise contendo três amostras. A recuperação se deu no preparo das curvas de adição de padrão, pois não havia amostras isentas dos analitos de interesse e nem padrões similares aos analitos que pudessem ser utilizados como padrão interno.

Para avaliação das precisões intra e inter dia preparou-se em quintuplicata, a partir das soluções padrão, amostras nas seguintes concentrações: 4,0; 50 e 90 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0; 25 e 45 $\mu\text{g/mL}$ para a hesperidina e rutina respectivamente, em dias não consecutivos. A precisão do método analítico foi expressa no coeficiente de variação CV (%) das replicatas. Já a exatidão foi expressa em porcentagem entre a razão do valor médio das concentrações extraídas sobre a concentração média das concentrações adicionadas. Os valores considerados aceitos foram:

- Precisão: CV menores que 3% para amostras preparadas a partir dos padrões estoque e 15% para as amostras de folhas, caules superiores e inferiores;

- Exatidão: desvios aceitos menores que 2% do valor nominal da concentração.

5. Resultados e discussões

5.1 Resultados obtidos após a inoculação da bactéria *X. fastidiosa* em enxertos de citros

As avaliações dos sintomas de CVC nas plantas manipuladas com a bactéria *X. fastidiosa* iniciaram-se três meses após a inoculação, conforme indicado por LI (1997), apud JAIMES (2002). Um dos métodos mais seguros para a detecção da *X. fastidiosa* é através da amplificação do seu DNA pela reação da polimerase em cadeia, a PCR, onde utiliza-se primers para amplificar um fragmento de 733 pares de bases (pb) presentes nas folhas contaminadas com a bactéria (Lins et al, 2008). As amostras que apresentaram o fragmento de 733 pb amplificado foram consideradas positivas para a *X. fastidiosa*. Segundo informações pessoais da pesquisadora Dra Alessandra de Souza do Centro de Citricultura Apta Citros, a técnica de inoculação seguida neste trabalho tem uma eficiência de 60 a 80% em plantas jovens, sendo que à medida que as plantas envelhecem, diminui-se a eficiência. Mas neste trabalho, conseguiu-se 100% de inoculação, ou seja, constatou-se a presença da bactéria *X. fastidiosa* em todas as plantas inoculadas mecanicamente. A Figura 5.1 mostra o resultado da presença de DNA da *X. fastidiosa* em todas as mudas analisadas.

Ao observar a figura 5 notam-se bandas mais e menos intensas indicando que quanto maior a intensidade maior a concentração de DNA extraído e conseqüentemente maior a concentração bacteriana nas plantas. Mesmo sendo um teste qualitativo e não quantitativo, a Figura 5.1 mostra que a concentração de *X. fastidiosa*, apesar de ter sido inoculada numa mesma concentração de unidades formadoras de colônia, varia muito entre plantas com mesma idade, e também pode variar em concentração nas diferentes partes vegetais (LINS et al, 2008).

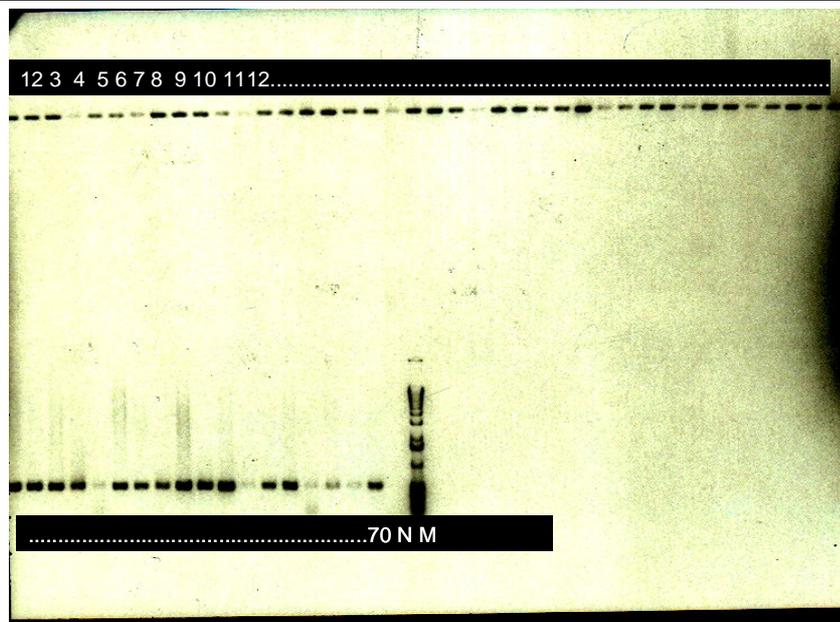


Figura 5.1. Gel de agarose dos produtos amplificados por PCR do DNA extraído das folhas de citros após a inoculação da bactéria *X. fastidiosa*: 1 até 70 plantas; N= controle negativo (água); M= marcadores.

Apesar de se ter comprovado a presença da bactéria, as plantas ainda não apresentavam sintomas de CVC, sendo necessário realizar observações visuais freqüentes do aparecimento dos sintomas, os quais foram surgindo ao decorrer de mais 60 dias. O intuito do projeto era analisar o perfil químico dos pés-francos de *C. sinensis* e *C. limonia*, do enxerto controle negativo, ou seja do enxerto sem inocular a bactéria e dos enxertos com a bactéria inoculada mas sem sintomas visíveis de CVC e com a bactéria inoculada e com sintomas de CVC. Como pôde-se notar nos procedimentos e nos resultados, um “ciclo” completo para que se tenha o material de estudo em mãos, leva em torno de oito meses, desde o preparo do enxerto até o aparecimento dos sintomas foliares da bactéria. Obteve-se 56 mudas de *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintomas de CVC e 14 mudas sem sintomas de CVC. Por falta de experiência não foi separado uma quantidade maior de plantas sem sintomas, mas com a bactéria presente. Também foi separada apenas uma pequena quantidade de plantas do controle, ou seja, os enxertos desenvolvidos nas mesmas condições, porém sem a inoculação da bactéria. Isto levou a muito

pouco material destas plantas para os estudos posteriores, principalmente de folhas.

Todas estas plantas foram separadas em folhas, caules (inferiores e superiores) e raízes, os quais foram rotulados como discriminados abaixo:

Limão cravo (*C. limonia*):

FLC - folhas do limão cravo

CLC - caules do limão cravo

RLC - raízes do limão cravo

Laranja pêra (*C. sinensis*):

FLP - folhas da laranja pêra

CLP - caules da laranja pêra

RLP - raízes da laranja pêra

Enxerto controle (enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem inocular a bactéria *X. fastidiosa*):

FEC - folhas do enxerto controle

CSEC - caules superiores do enxerto controle

CIEC - caules inferiores do enxerto controle

REC - raízes do enxerto controle

Enxerto sem sintomas de CVC (enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* com a bactéria *X. fastidiosa* inoculada, mas sem sintomas foliares de CVC):

FESS - folhas do enxerto sem sintomas de CVC

CSESS - caules superiores do enxerto sem sintomas de CVC

CIESS - caules inferiores do enxerto sem sintomas de CVC

RESS - raízes do enxerto sem sintomas de CVC

Enxerto com sintomas de CVC (enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* com a bactéria *X. fastidiosa* inoculada e com sintomas foliares de CVC):

FECS - folhas do enxerto com sintomas de CVC

CSECS - caules superiores do enxerto com sintomas de CVC

CIECS - caules inferiores do enxerto com sintomas de CVC

RECS - raízes do enxerto com sintomas de CVC

Os códigos citados acima serão utilizados deste ponto em diante nos resultados e discussões posteriores.

Na extração do DNA bacteriano foi utilizado um protocolo no qual alguns constituintes são muito importantes para evitar algumas reações químicas no meio. O tampão CTAB elimina polissacarídeos e polifenóis, os quais oxidam o DNA irreversivelmente, tornando-o inacessível às enzimas de restrições. O EDTA tem a função de quelar cofatores como o Mg^{2+} e Mn^{2+} inibindo as nucleases, as quais podem degradar o DNA. Os tampões de extração possuem pH em torno de oito, favorecendo a complexação dos cofatores com o EDTA. O mercaptoetanol e o clorofórmio possuem a função de desnaturar as proteínas presentes no meio, tornando-as insolúveis na fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucleicos. Ou seja, estes separam os ácidos nucleicos das proteínas.

5.2 Medidas de HR-MAS CPMG em amostras de Citros

Ao realizar as medidas espectroscópicas de HR-MAS utilizou-se a sequência de pulsos CPMG com supressão do sinal da água, a fim de “filtrar” os sinais de moléculas com tempo de relaxação (T_2) muito curto, o qual provoca o alargamento dos sinais, e minimizar o sinal oriundo da água deuterada. Outra função do uso da CPMG é suprimir os sinais provenientes de macromoléculas presentes nas células vegetais que são mais rígidas e maiores, fornecendo sinais

alargados os quais podem vir a encobrir deslocamentos provenientes de micromoléculas.

Inicialmente foram avaliados os espectros de RMN de ^1H CPMG HR-MAS visando de observar se os mesmos continham informações suficientes para distinguir os espécimens estudados e se as informações eram reprodutíveis nas mesmas partes vegetais. Foram obtidos espectros em triplicata para cada amostra de citros e de cada parte vegetal, e ainda considerou-se o deslocamento químico, a intensidade relativa e a largura da linha dos sinais presentes.

A Figura 5.2 mostra os espectros de RMN-HR de ^1H das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), em comparação com aqueles obtidos para os caules inferiores das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). Observa-se uma infinidade de deslocamentos químicos provenientes das mais diversas classes de metabólitos secundários. Todos os espectros possuem um bom grau de similaridade, mas ocorrem algumas variações nas intensidades dos sinais. Sendo assim, optou-se por analisar separadamente cada parte vegetal, comparando os pés-francos e os enxertos.

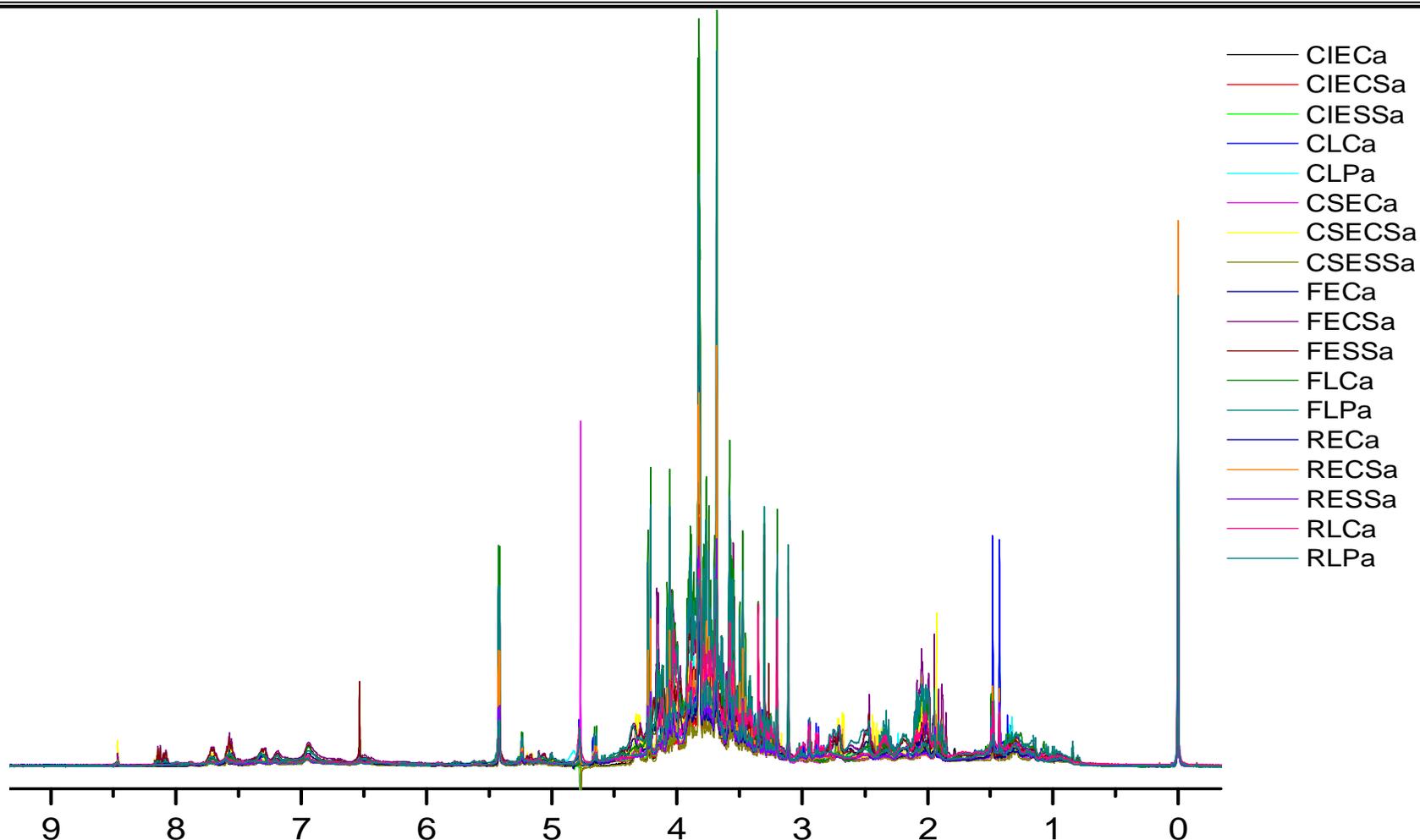


Figura 5.2. Espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), em comparação com aqueles obtidos para os caules inferiores da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). Experimentos realizados em triplicatas e com supressão do sinal da água (D_2O , 400 Mz)

Na Figura 5.3 foram colocados os espectros de RMN-HR de ^1H das amostras dos caules inferiores dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, CIEC, caule inferior com sintoma CIECS, caule inferior sem sintoma CIESS) em comparação com aqueles obtidos para os mesmos órgãos das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). Esta figura mostra que há uma variação de intensidade em alguns deslocamentos, sendo essa proveniente da diferença de concentração de açúcares presentes em todas as matrizes.

Nota-se que no espectro da amostra do limão cravo (CLCa), o qual é tolerante ao ataque da bactéria *X. fastidiosa*, aparecem sinais referentes a um metabólito que possui deslocamentos químicos nas regiões de δ 1,5 com mais intensidade que nas demais matrizes. No espectro da amostra do caule inferior da laranja pêra (CLPa), a qual não é resistente ao ataque bacteriano, aparecem sinais nas regiões de δ 3,6 a 4,0 e também na região de δ 5,5 mais intensos que naqueles das demais matrizes. Estes sinais são característicos de açúcares, e estes aparecem com deslocamentos muito próximos, mas em menor intensidade nas demais matrizes. Estes dados não permitem inferir defesas, pois a laranja pêra não é resistente à *X. fastidiosa*.

Analisando o espectro de RMN-HR de ^1H (Figura 5.4) da amostra do caule inferior do limão cravo (CLCa) separado daqueles das demais matrizes, verifica-se sinais de carboidratos o que poderia sugerir os deslocamentos próximos de δ 1,5 referirem-se às metilas de unidades de raminose. Contudo, a raminose apresenta um sinal em δ 5.40 (d, $J = 1.5$ Hz) referente ao seu hidrogênio anomérico, e um segundo sinal em δ 0.79 (d, $J = 6.5$ Hz) correspondente à sua metila em C-5, além dos outros sinais nas regiões de δ 3,6 a 4,0 (HARBONE, 1994). Os dois singletos intensos em δ 1.43 e 1.48 apresentam integrais para três hidrogênios cada, portanto não correspondem a dubletos. Os sinais da raminose podem até estarem presentes, mas em intensidades desprezíveis. Além disso, a diferença entre os deslocamentos químicos destes sinais levaram a um J de 20 Hz, confirmando que estes sinais

referem-se a metilas de outra classe de compostos. O metabólito (ou os) referente a estes sinais não permaneceram na mesma concentração (ou sua biossíntese foi inibida) nos enxertos oriundos deste limão cravo. Infelizmente este metabólito não foi identificado neste experimento e nem nos próximos que serão discutidos. Com isto, fica uma pergunta sem resposta, se seria ele o responsável pela resistência do limão cravo frente à *X. fastidiosa*.

Na Figura 5.5 foram colocados os espectros de RMN-HR de ^1H das amostras dos caules superiores dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, CSE, caule superior com sintoma CSECS, caule superior sem sintoma CSESS) em comparação com aqueles obtidos para os caules inferiores das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). Esta figura mostra que nos espectros referentes aos enxertos com (CSECS) e sem sintomas (CSESS) aparecem sinais mais desblindados entre δ 6.8 e 8.4 com baixa intensidade, mas praticamente ausentes no espectro da amostra da laranja pêra (CLP). Os sinais entre δ 7.5 e 8.4 aumentam um pouco em intensidade para enxertos com sintomas (CSECS) em relação àqueles da matriz sem sintomas (CSESS). Compostos aromáticos em maior concentração em matrizes com sintomas foram identificados em outros experimentos que serão discutidos mais a frente. Os sinais característicos de carboidratos são difíceis de avaliar comparativamente. Alguns sinais na região de δ 3.0 a 4.4 aumentam a intensidade no espectro da amostra do enxerto com sintomas (CSECS) e alguns se igualam àqueles da laranja pêra (CLP). Infelizmente não foi possível identificar nenhuma destas substâncias neste experimento, contudo a variação da intensidade de alguns sinais é indicativa da presença da bactéria.

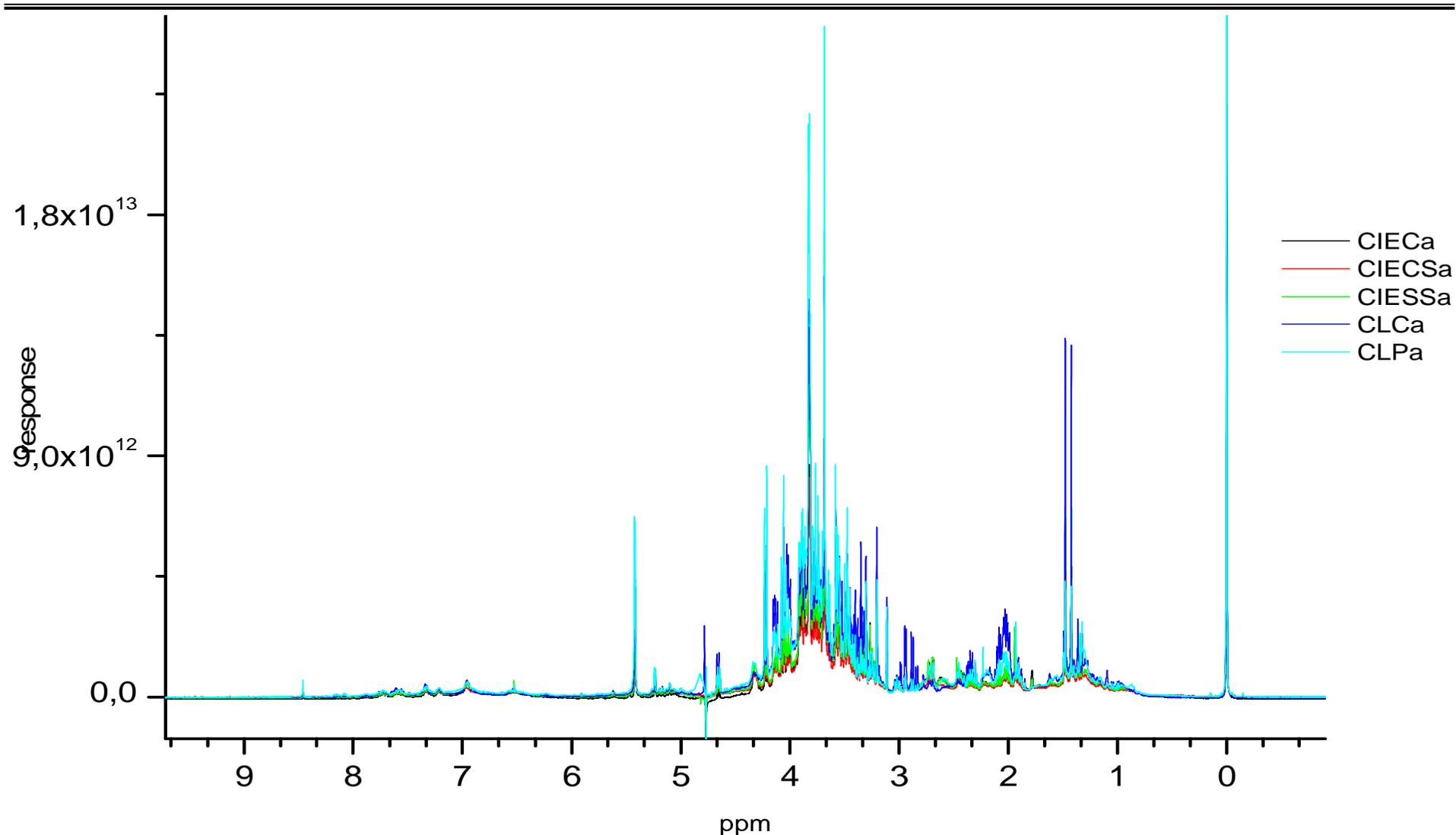


Figura 5.3. Espectros de RMN-HR de ^1H das amostras dos caules inferiores dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, CIEC, caule inferior com sintoma CIECS, caule inferior sem sintoma CIESS) em comparação com aqueles obtidos para os mesmos órgãos das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC), com supressão do sinal da água (D_2O , 400 Mz).

SpinWorks 3: Caule limao cravo

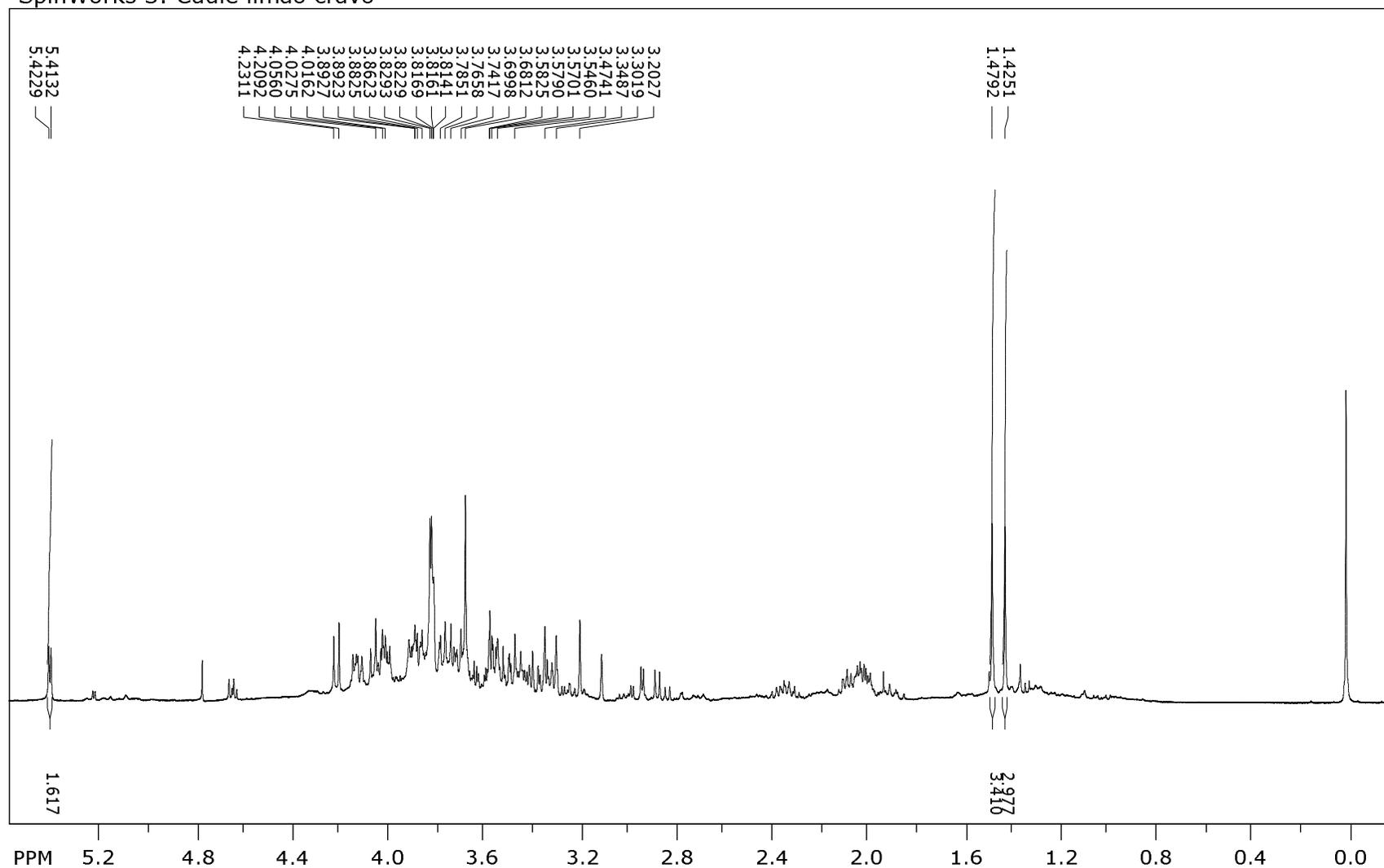


Figura 5.4. Espectro de RMN HR-MAS de ^1H da amostra do caule inferior do limão cravo (CLCa) separado daqueles das demais matrizes, com supressão do sinal da água ((D_2O , 400 Mz)

Na Figura 5.6 foram colocados os espectros de RMN-HR de ^1H das amostras das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS) em comparação com aqueles obtidos para os caules das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). O mesmo comentado acima para a análise dos caules superiores ocorre com as raízes, ou seja, os sinais característicos de carboidratos são difíceis de avaliar comparativamente. Contudo, é nítido o aumento da intensidade do carboidrato que possui o deslocamento do hidrogênio anomérico próximo a δ 5.3. Infelizmente não foi possível identificar nenhuma destas substâncias neste experimento.

A diferença nas intensidades de alguns sinais em todos os experimentos discutidos acima via os espectros de RMN-HR de ^1H mostra que o metabolismo secundário do enxerto com doença varia na planta como um todo, desde a raiz ao caule superior. Contudo, como os espectros foram difíceis de avaliar comparativamente, foi aplicado em cada matriz métodos quimiométricos de análise exploratória.

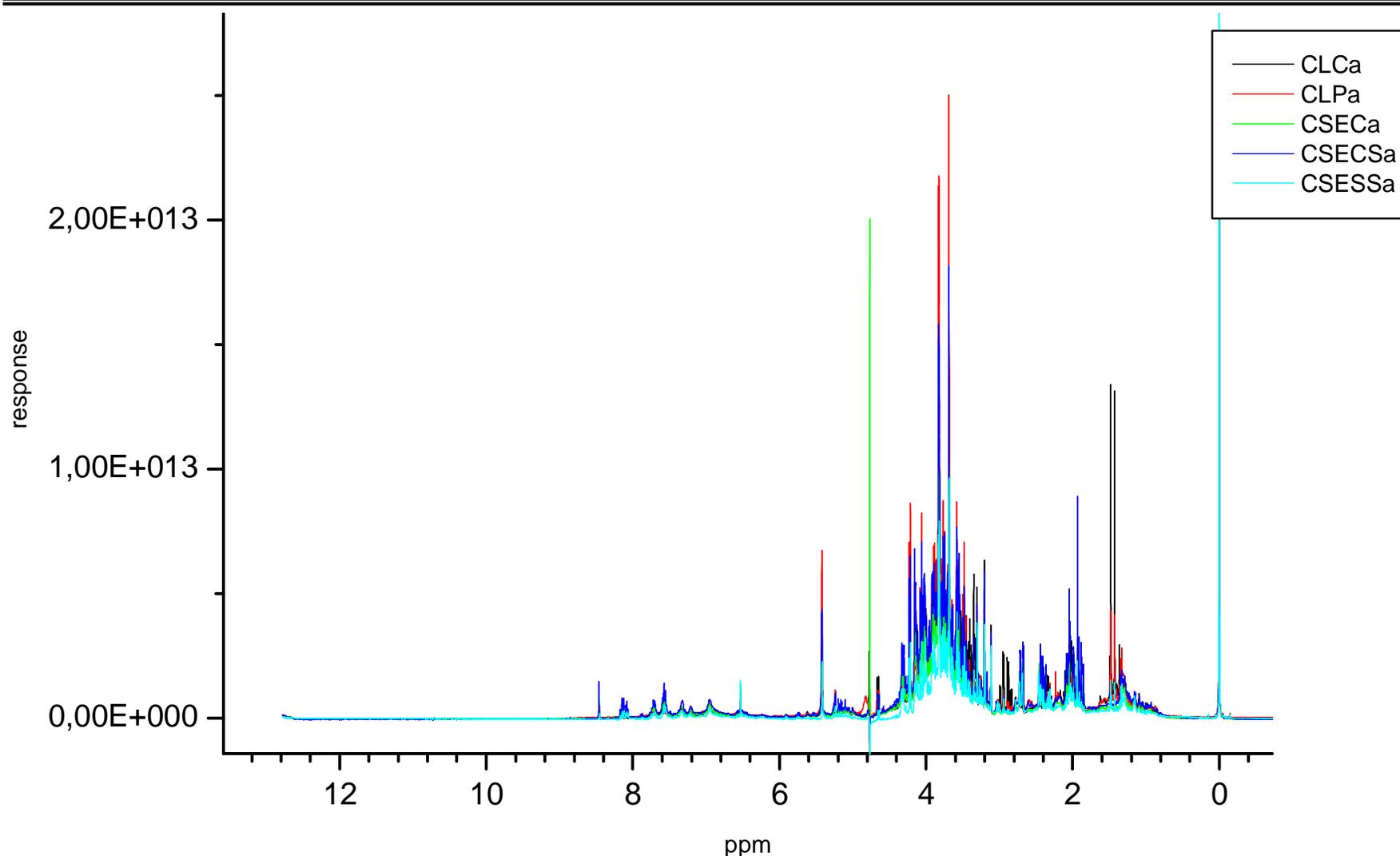


Figura 5.5. Espectros comparativos de RMN HR-MAS de ^1H das amostras dos caules superiores dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, CSEC, caule superior com sintoma CSECS, caule superior sem sintoma CSESS) em comparação com aqueles obtidos para a laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC), com supressão do sinal da água (D_2O , 400 Mz).

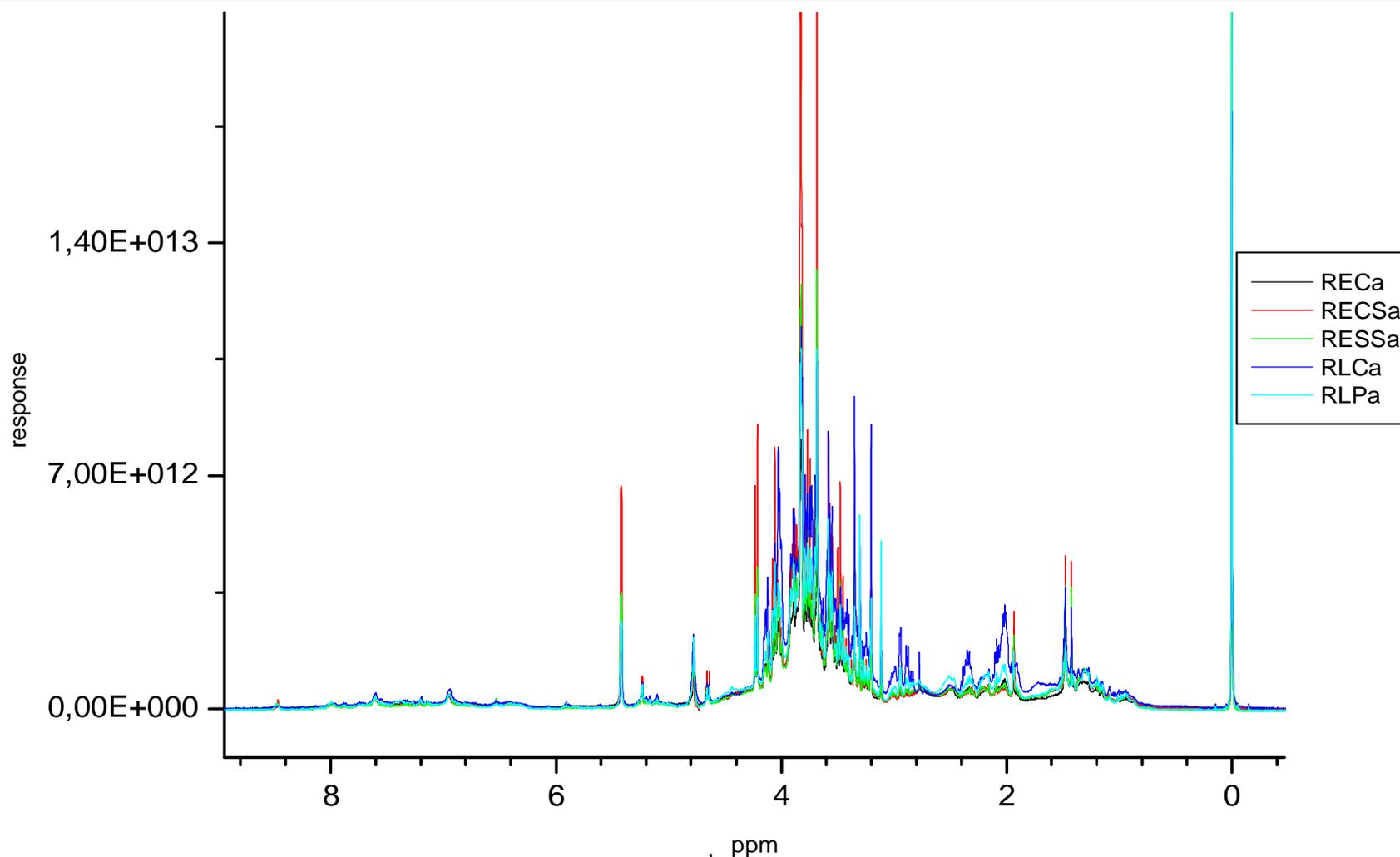


Figura 5.6. Espectros comparativos de RMN HR-MAS de ^1H das amostras das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS) em comparação com aqueles obtidos para os caules das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC), com supressão do sinal da água (D_2O , 400 Mz).

5.2.2 Análise Exploratória dos dados obtidos através da RMN de ^1H HR-MAS CPMG de amostras de Citros

A análise visual não foi totalmente eficaz para fornecer regiões espectrais em comum ou diferente na comparação das amostras estudadas, como discutido no item anterior. Ao se realizar uma análise exploratória destes dados espectroscópicos a mesma pode evidenciar possíveis regiões, separando assim amostras tolerantes das susceptíveis ao ataque bacteriano. Os dados espectroscópicos obtidos foram submetidos á análise de componentes principais (PCA) e a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA).

Todas as partes vegetais foram preparadas em triplicatas, eliminou-se algumas regiões espectrais que se tratavam de resíduos de água presente na amostra, o sinal referente ao TMS- d_4 e ruídos presentes entre os sinais, para então auto-escalar os espectros. Foram analisados simultaneamente todos os espectros de RMN-HR de ^1H obtidos para as amostras estudadas, caules inferiores e superiores, folhas e raízes, os quais geraram uma matriz. Inicialmente aplicou-se a análise de PCA nesta matriz. A matriz gerada, após as exclusões era formada por 54 linhas correspondentes a 18 partes vegetais em triplicata e 16467 colunas, correspondentes aos deslocamentos químicos. A Figura 5.7 relata o gráfico de linhas da matriz gerada.

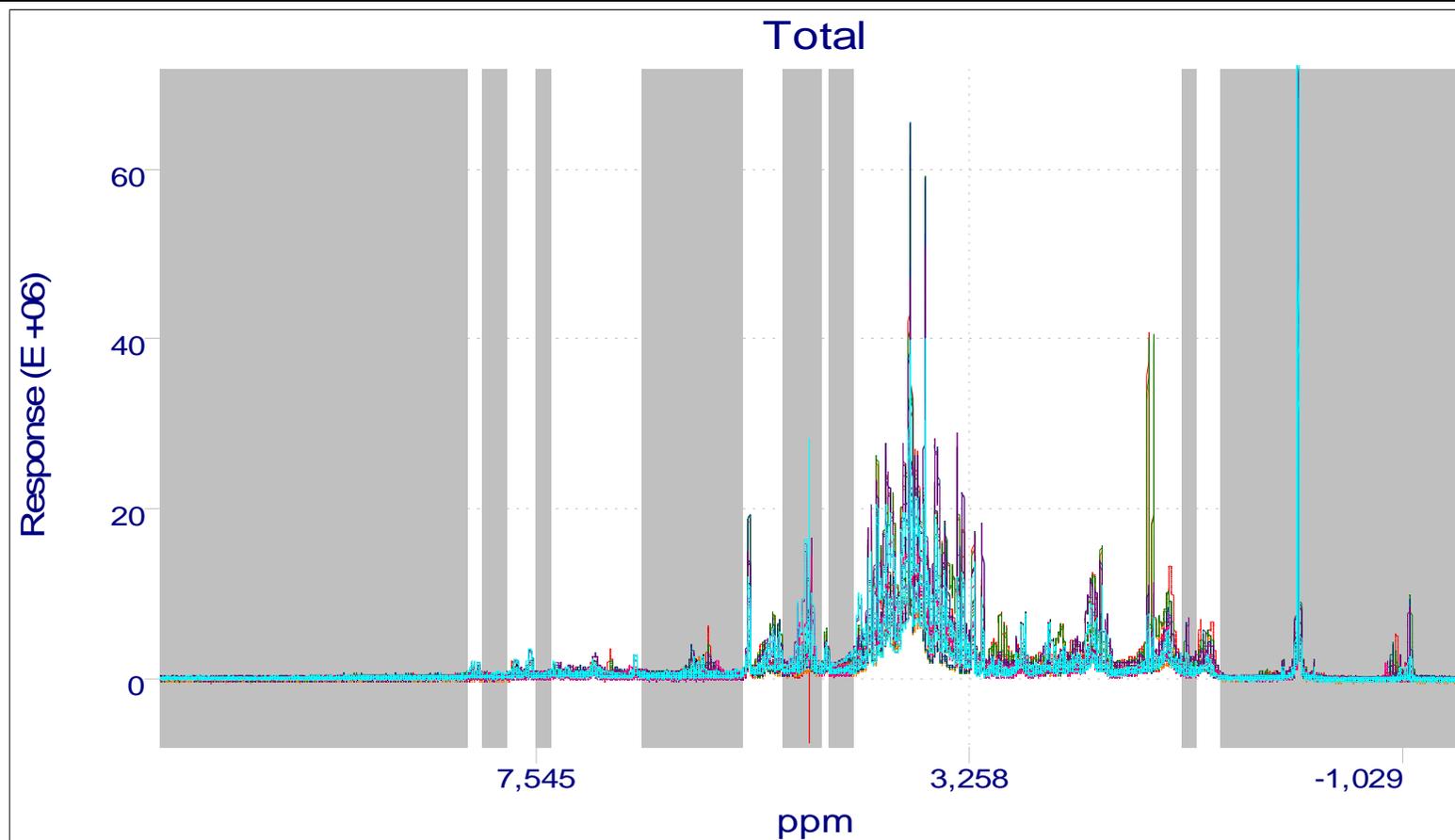


Figura 5.7. Gráfico de linhas correspondentes aos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma, RECS, raízes sem sintoma, RESS), em comparação com aqueles obtidos para os caules inferiores das plantas de origem, laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). Os blocos em cinza mostram as regiões do espectro excluídas na análise de quimiometria. (D_2O , 400 Mz)

Na Tabela 5.1 pode-se verificar a variância dos dados originais explicada por cada componente principal (PC), além da variância cumulativa dada por um número de PCs. Os valores auxiliam na escolha do número de PCs usados.

Tabela 5.1. Tabela de variância para a análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de todas as partes vegetais dos citros estudados.

	Variância	Porcentagem (%)	Cumulativa (%)
PC1	82720,60	12,74	12,74
PC2	79844,50	12,30	25,05
PC3	64494,30	9,93	34,98
PC4	42557,66	6,55	41,54
PC5	36038,28	5,55	47,10
PC6	29459,27	4,53	51,64
PC7	24945,73	3,84	55,48
PC8	24934,55	3,84	59,32
PC9	19811,97	3,05	62,38
PC10	18548,76	2,85	65,23
PC11	17362,48	2,67	67,91
PC12	15462,00	2,38	70,29
PC13	14457,16	2,22	72,52
PC14	11275,45	1,73	74,26
PC15	11549,05	1,77	76,04

A análise de PCA foi realizada utilizando-se 62,38% de informações dos dados originais descritos por 9 componentes principais. As informações citadas acima podem também ser verificadas através do gráfico da percentagem

da variância versus o número de PCs, o qual mostra um decréscimo nítido da variância com o aumento das PCs, fazendo com que as componentes principais sucessivas contenham cada vez menos informações a respeito dos dados. E quando a “curva” de variância pára de cair bruscamente, o número de PCs correspondente é aquele que deve ser usado para a análise dos dados. Analisando a Figura 5.8 conclui-se que após a nona PC têm-se uma pequena variação de dados.

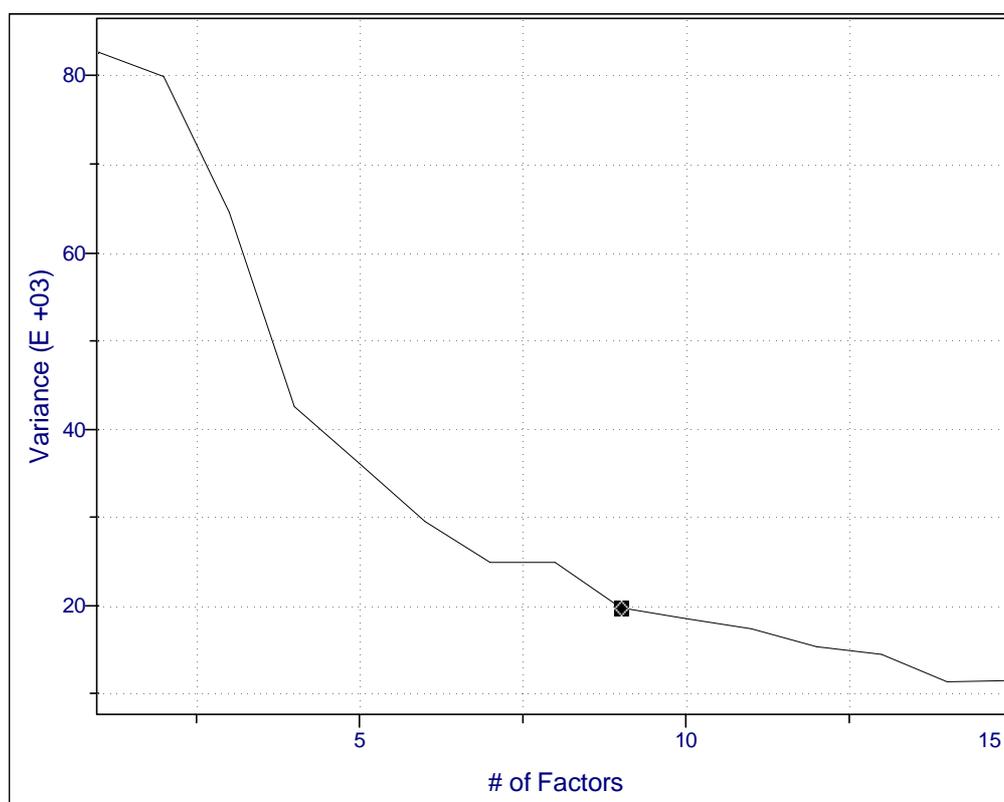


Figura 5.8. Gráfico da variância versus os números de PCs, para a análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de todas as partes vegetais dos citros estudados.

A diferenciação entre as matrizes foi obtida conforme descrito nos gráficos de escores representado na Figura 5.9.

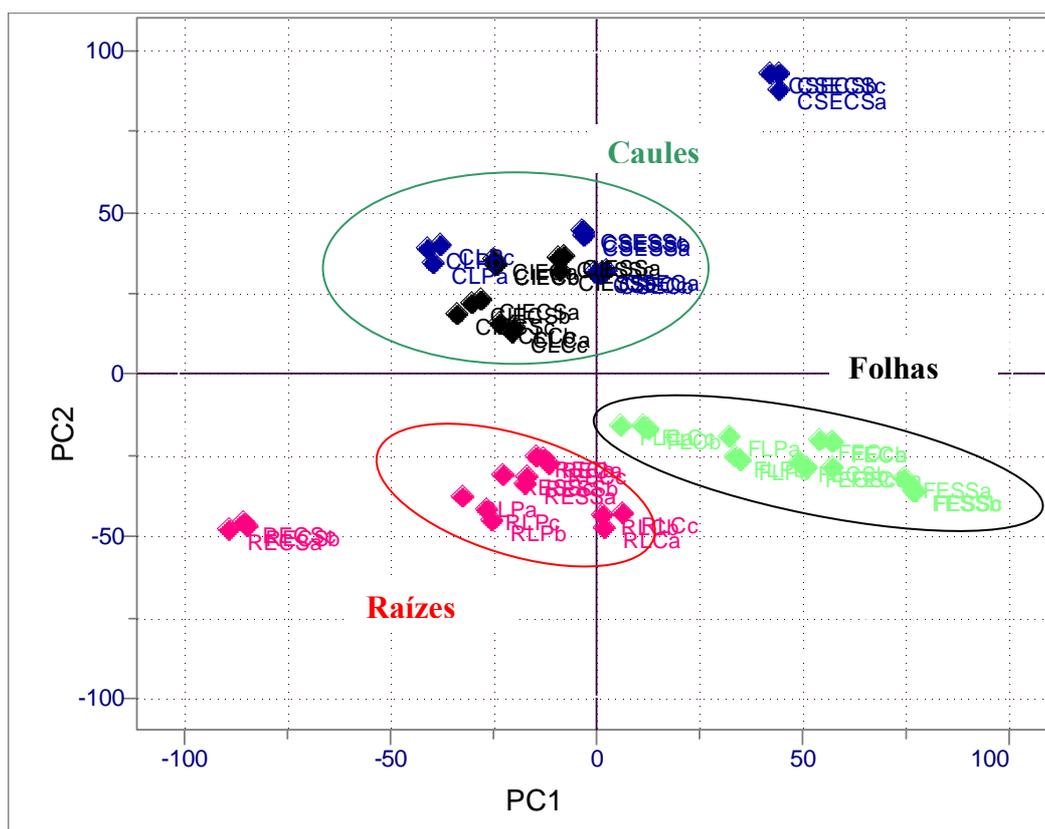


Figura 5.9. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de todas as partes vegetais dos citros estudados. As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

Observa-se que os valores positivos de PC1 e PC2 são responsáveis pela separação entre as matrizes das folhas e dos caules. Contudo, não houve separação entre as diferentes matrizes das folhas, assim como entre aquelas dos caules. O mesmo foi observado para as matrizes das raízes em comparação com aquelas das folhas e caules, onde há uma tendência de separação entre ambos na PC1 e também na PC2. Analisando a Figura 5.9 nota-se que as replicatas entre as amostras estão bastante próximas, mostrando assim que a análise dos dados via RMN de ^1H por HRMAS foi bem reprodutível.

A análise por HCA, Figura 5.10, confirma a separação das matrizes dos caules daquelas das folhas e raízes, mostrando que os caules inferiores e superiores possuem pouca similaridade química com as demais partes vegetais, enquanto as raízes se correlacionam em pequena intensidade com as folhas. Pode-se observar também que há uma separação entre as matrizes das raízes com sintomas de CVC e as demais raízes.

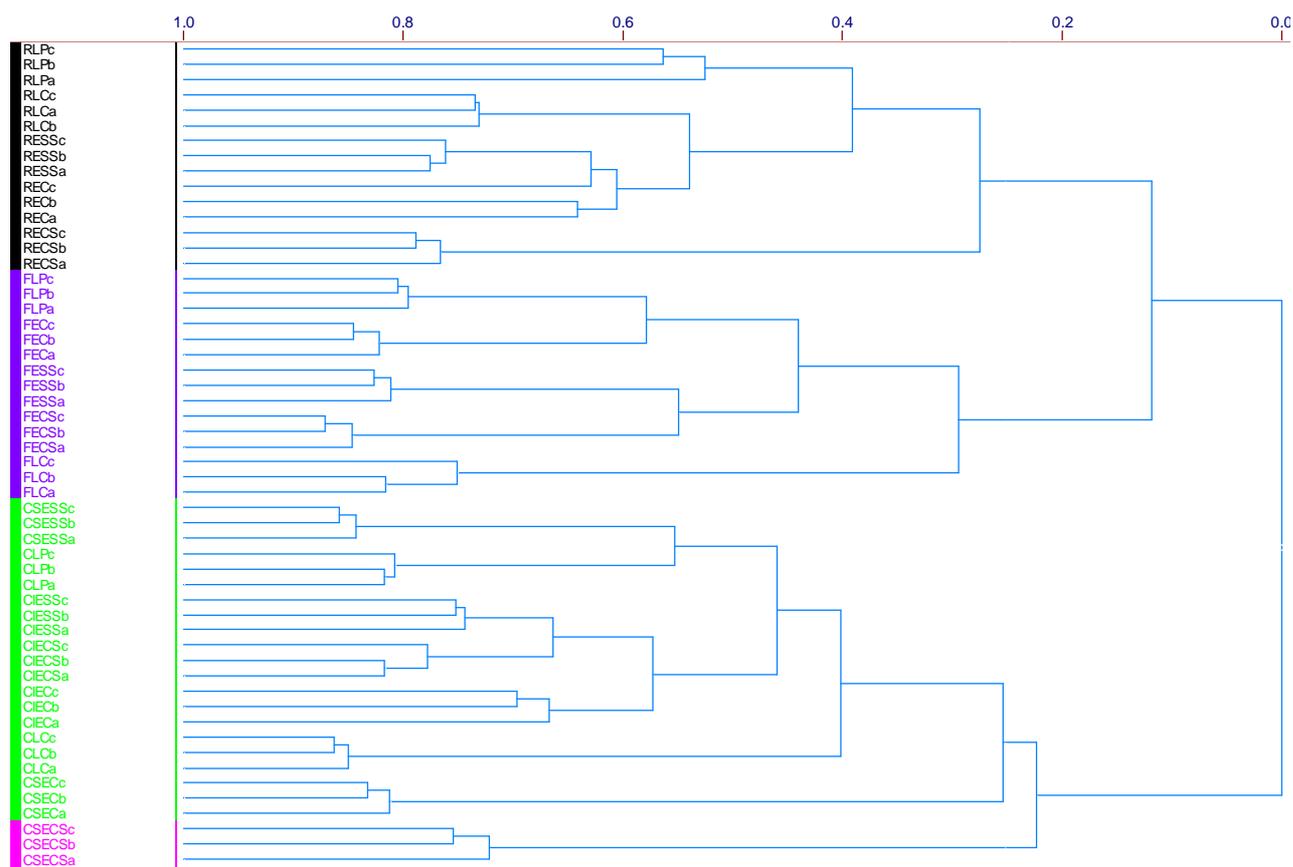


Figura 5.10. Dendrograma obtido na análise por HCA com os dados de RMN HR-MAS de ^1H das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), das folhas dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS), das folhas do limão cravo (FLC) e da laranja pêra (FLP), dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz. (similaridade de 0,25%).

Os resultados acima não são fáceis de analisar como um todo, assim estes foram analisados individualmente entre as respectivas partes vegetais, uma vez que se trata de matrizes que possuem um comportamento químico consideravelmente diferente. Na fitoquímica clássica realizada pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, isolou-se quase que exclusivamente flavonóides nas partes superiores e cumarinas nas raízes.

5.2.2.1 Análise Exploratória dos dados obtidos através da RMN de ^1H HR-MAS das amostras das folhas dos citros estudados

Ao realizar a PCA e a HCA das folhas, Figuras 5.11 e 5.12 respectivamente, observou-se que há uma separação através da PC1 entre as matrizes das folhas de limão cravo das demais folhas (laranja pêra e folhas dos enxertos), demonstrando aqui que o perfil químico do limão cravo difere dos demais e pode ser separado através da quimiometria. Já pela PC2 têm-se a separação entre as matrizes das folhas do enxerto controle (positivo) com aquelas das folhas de laranja e do enxerto com a bactéria presente (sintomática e assintomática; negativo), demonstrando que o perfil químico das plantas tende a ser mais próximo do perfil químico da laranja pêra que é suscetível ao ataque bacteriano. A Figura 5.12 mostra claramente o isolamento das matrizes folhas do limão cravo no início do dendograma.

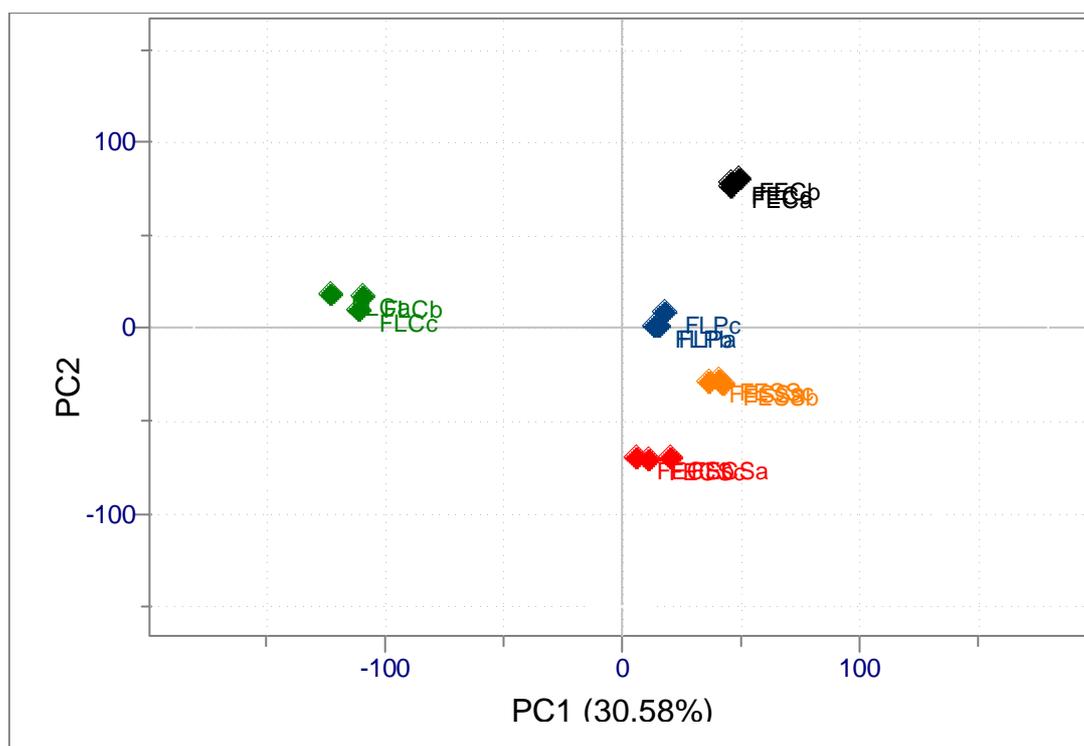


Figura 5.11. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

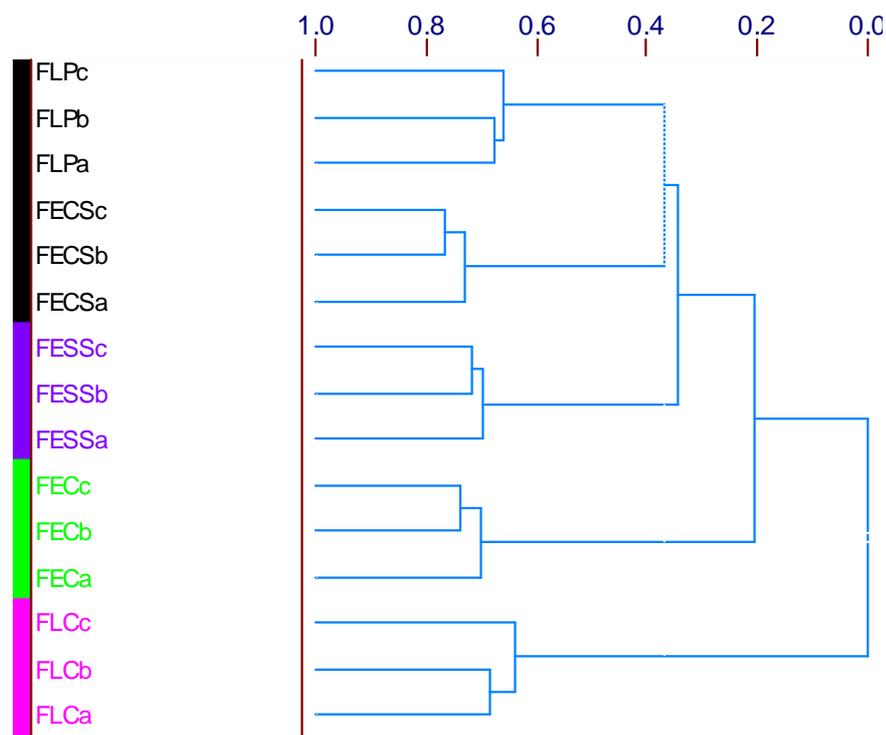


Figura 5.12. Dendrograma obtido na análise por HCA com os dados de RMN HR-MAS de ^1H das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). (similaridade de 0,38%).

A análise das faixas de deslocamentos químicos foi feita com o intuito de otimizar também melhores faixas espectrais que poderiam vir a corroborar com as análises de PCA e HCA. O primeiro intervalo de deslocamento químico foi compreendido entre δ 1,0 a 3,0.

A Figura 5.13 mostra que apesar da reprodutibilidade nos dados da espécie do limão cravo não ter sido boa, pode-se distinguir três grupos. Um grupo compreendido pelas matrizes das folhas do enxerto com sintomas de CVC bem caracterizado pela PC2; outro grupo compreendido pelas matrizes das folhas de limão cravo, caracterizado pelas PC1 e PC2 e um terceiro grupo compreendido pelas matrizes das folhas dos enxertos controle, enxerto sem sintomas de CVC e laranja pêra, mostrando que há uma variação do perfil químico no intervalo de deslocamento de δ 1,0 a 3,0.

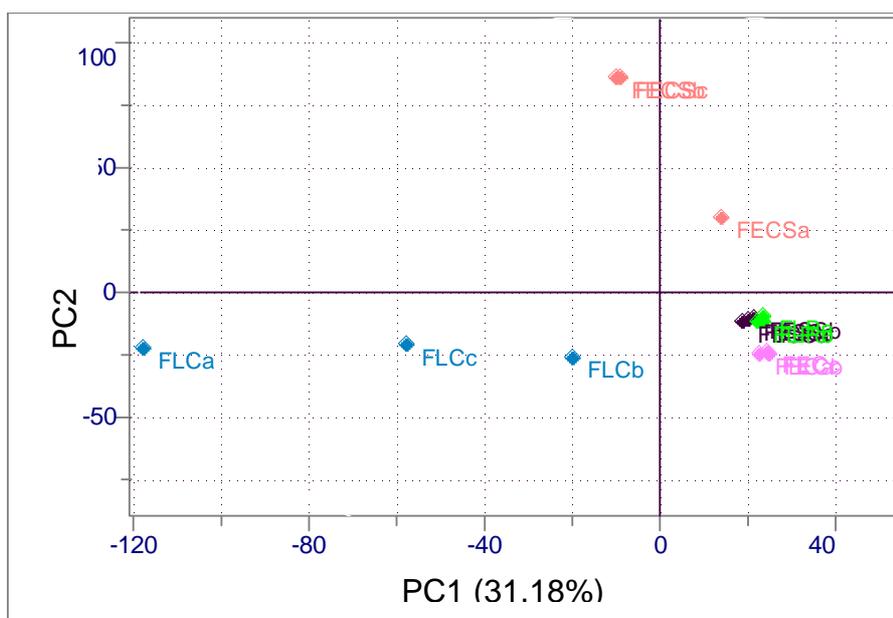


Figura 5.13. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

O mesmo comportamento ocorre ao analisar a região espectral de entre δ 3,0 a 5,5 conforme pode ser observado na figura 5.14, havendo alteração apenas nos valores de PC1 para as matrizes das folhas de limão cravo.

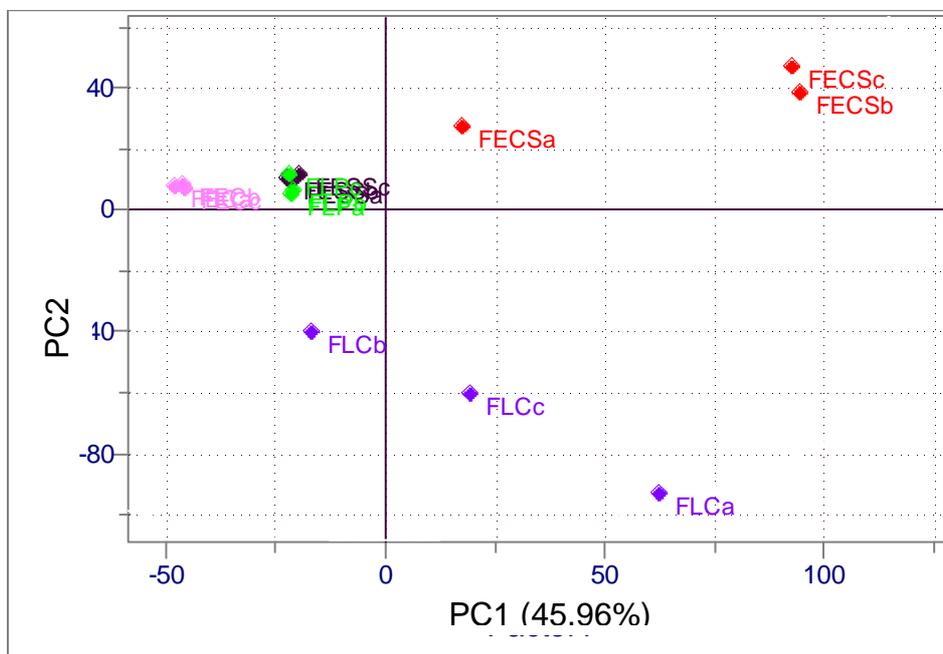


Figura 5.14. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 3,0 a 5,5, das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

A terceira região espectral analisada foi a denominada de aromática, compreendida entre δ 6,5 a 8,0. A análise dessa região (Figuras 5.15 e 5.16) mostra que as matrizes das folhas do limão cravo estão separadas daquelas das folhas da laranja pêra e do enxerto controle através da PC2, enquanto as matrizes das folhas das espécies com a bactéria presente estão muito próximas entre si.

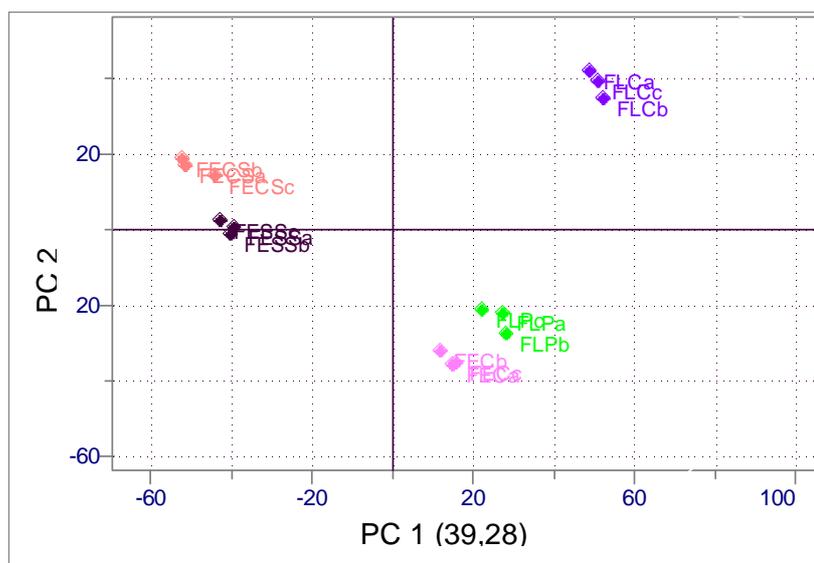


Figura 5.15. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 6,5 a 8,0, das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

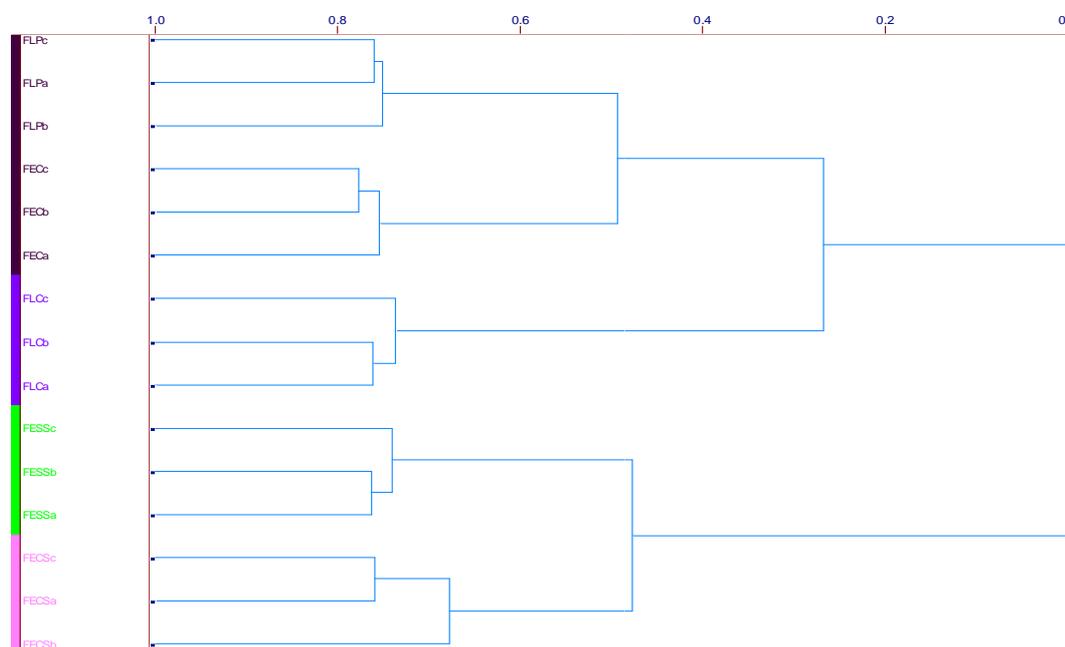


Figura 5.16. Dendrograma obtido na análise por HCA com os dados de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 6,5 a 8,0, das amostras das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP). (similaridade de 0,48%).

5.2.2.2 Análise Exploratória dos dados obtidos através da RMN de ^1H HR-MAS das amostras dos caules dos citros estudados.

Nas Figuras 5.17 e 5.18 foi observado o agrupamento das matrizes dos caules superiores separadamente daquelas dos inferiores, enquanto a matriz do caule superior do enxerto com sintomas (CSECS) foi a que mais se diferiu das demais. Todas as matrizes dos caules inferiores dos enxertos comportaram-se de forma análoga àsquelas dos caules dos pés-francos de laranja e de limão, apesar de não haver separação significativa. As matrizes dos caules inferiores do enxerto com sintomas de CVC (CIECS) caem na mesma região de PCA daqueles dos caules do limão cravo.

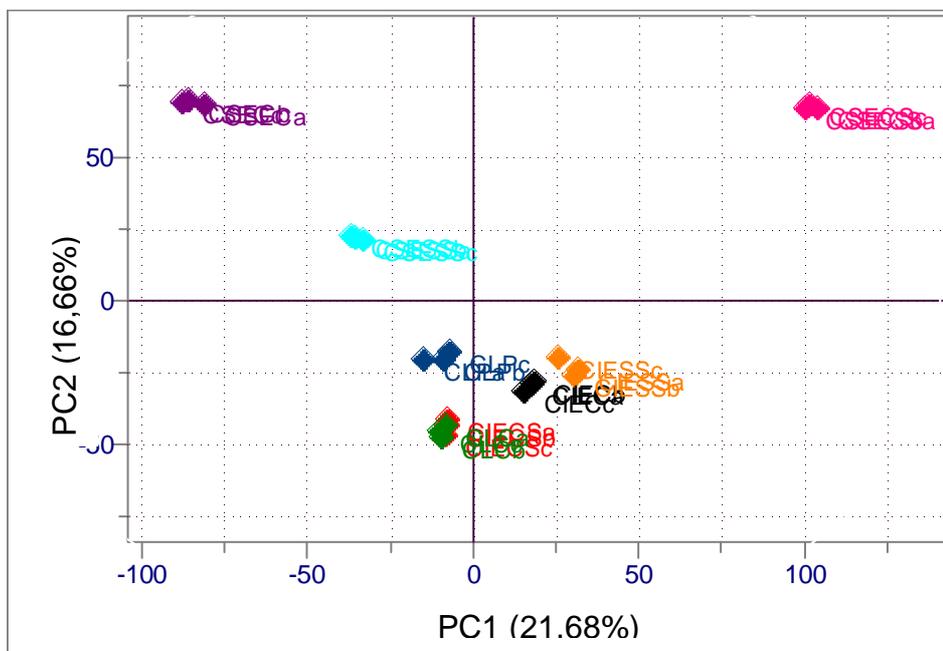


Figura 5.17. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIE e CSE respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

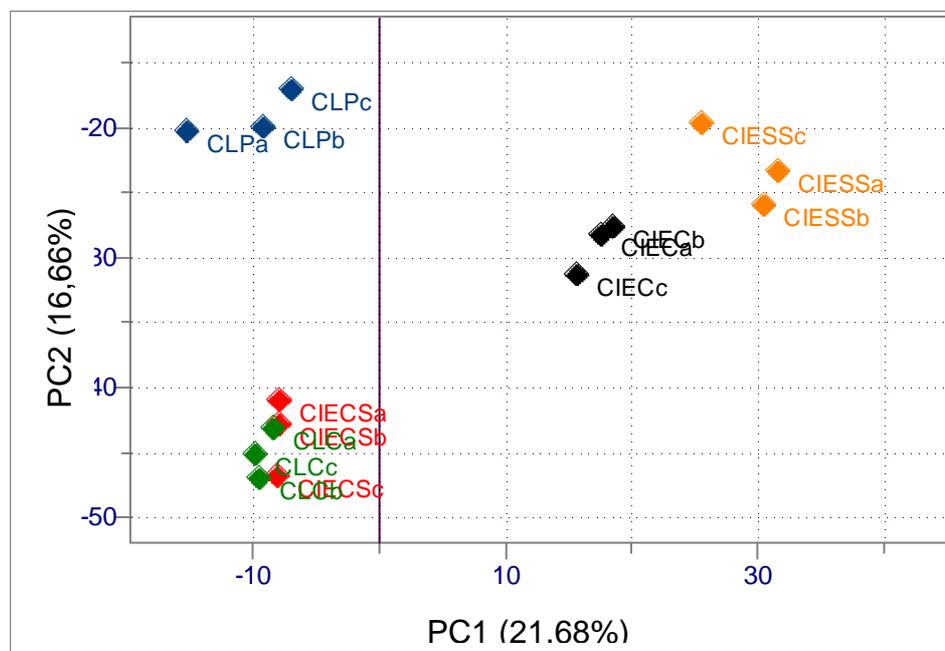


Figura 5.18. Ampliação do gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados.

A PCA das matrizes dos caules em δ 1,0 a 3,0 (Figura 5.19) mostrou uma grande separação daquelas dos caules do limão cravo em relação às demais. Novamente foi observado que as matrizes dos caules inferiores se aproximaram mais daquelas dos caules da laranja pêra e não do limão cravo.

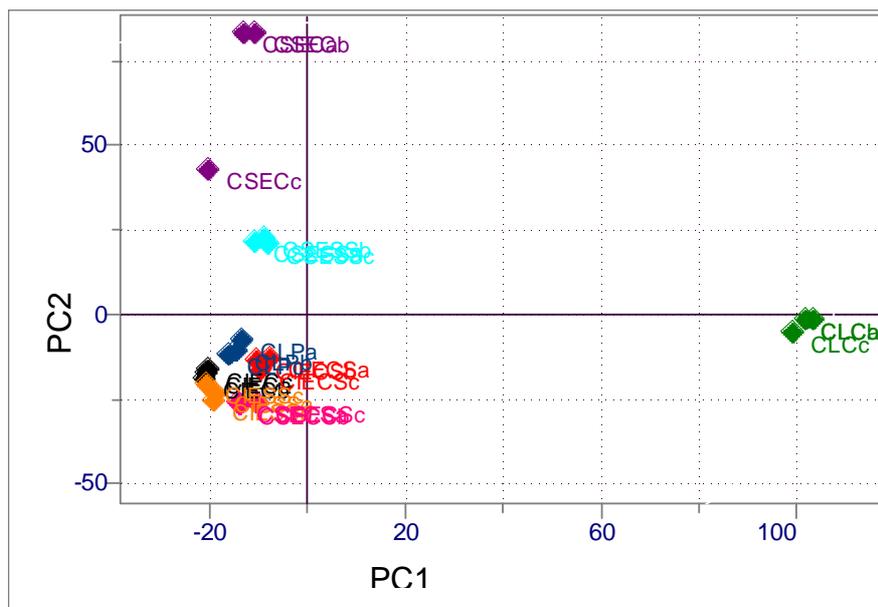


Figura 5.19. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSE respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

Ao analisar a região espectral de entre δ 3,0 a 5,5 conforme pode ser observado na Figura 5.20, nota-se que a PCA nessa região comporta-se de modo análogo à região de δ 1,0 a 3,0. Verifica-se a separação da matriz do caule do limão cravo daquelas dos caules superiores e inferiores do enxerto com sintomas, indicando que estas últimas possuem características químicas semelhantes aos caules de laranja pêra.

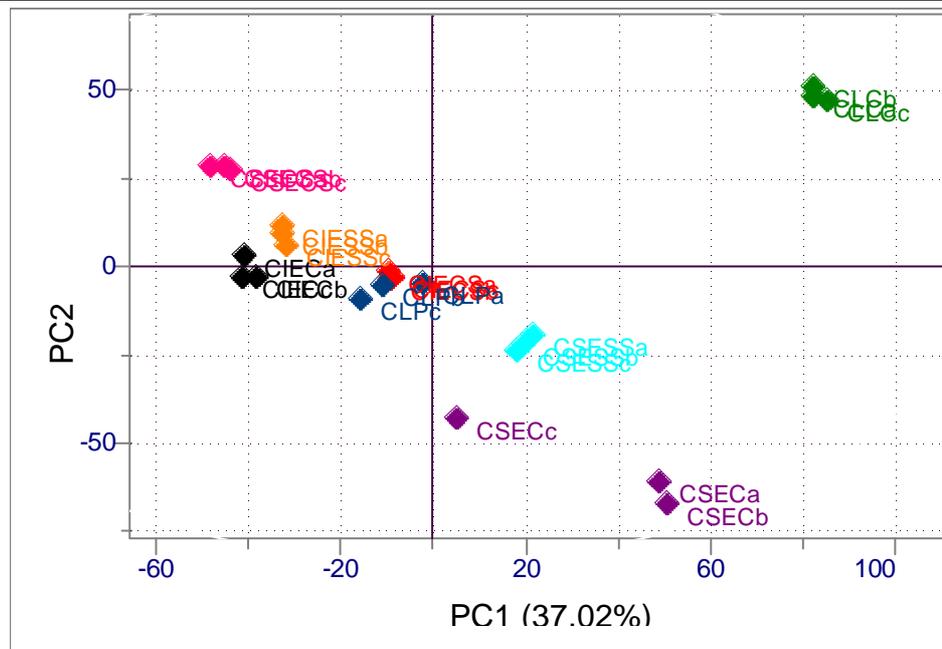


Figura 5.20. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 3,0 a 5,5, das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

Na região aromática compreendida entre δ 6,5 a 8,0 observa-se a separação entre as matrizes dos caules superiores com sintomas de CVC e controle das demais matrizes dos caules através da PC2 (Figura 5.21). Não há separação entre as matrizes dos caules inferiores ao se analisar essa região espectral.

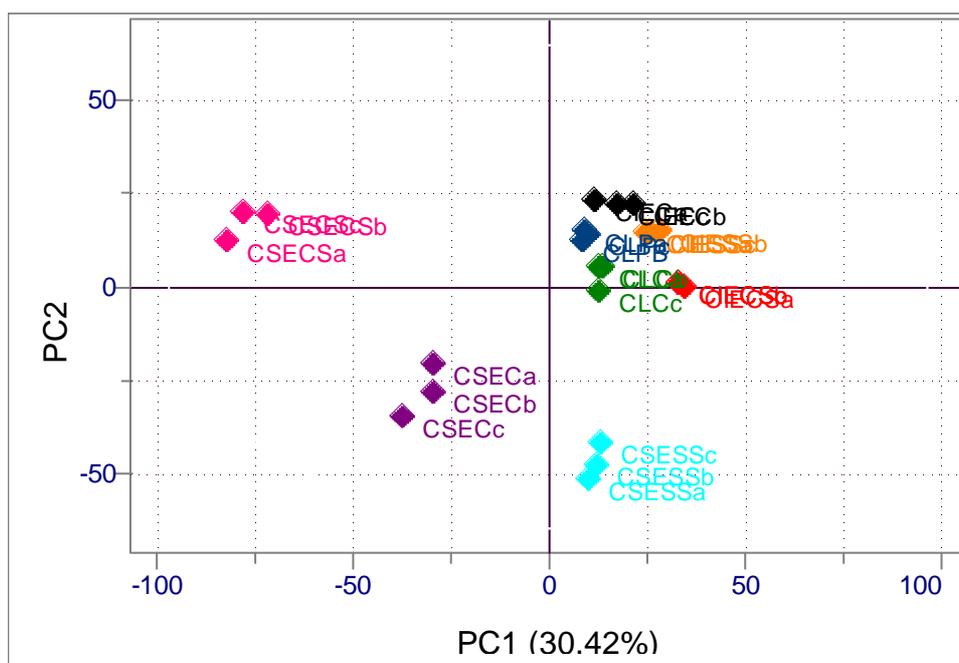


Figura 5.21. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 6,8 a 8,0, das amostras dos caules superiores e inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

5.2.2.3 Análise Exploratória dos dados obtidos através da RMN de ^1H HR-MAS das amostras das raízes dos citros estudados

Analisando a PCA das matrizes das raízes (Figura 5.22), nota-se um comportamento análogo àquelas das folhas, sendo que a diferença está no fato de que forma-se três grupos bem distintos entre si. Um grupo é constituído pelas matrizes das raízes do enxerto com sintomas de CVC. Um segundo grupo compreende as matrizes das raízes dos enxertos controle e aquelas sem sintomas de CVC. Um terceiro grupo é constituído pelas matrizes das raízes da laranja pêra.

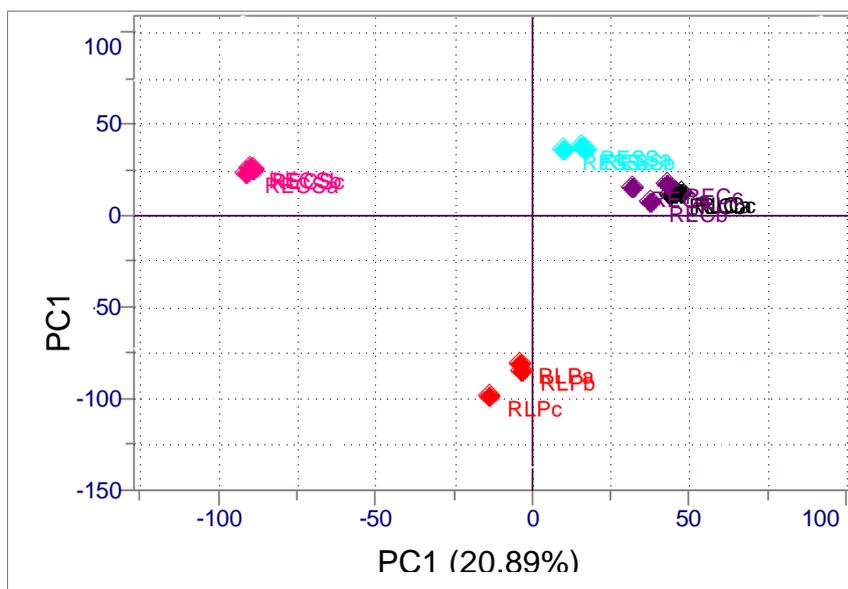


Figura 5.22. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras das raízes dos citros estudados (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, RE; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

Com esse resultado pode-se inferir que quando há a presença da bactéria, mas a planta não apresenta sintoma, estas possuem similaridades químicas às raízes do limão cravo, ou seja, ao padrão. Mas à medida que a bactéria se desenvolve na planta e o sintoma aparece, o enxerto comporta-se quimicamente diferente do limão cravo, seu porta-enxerto. A análise de PC2 relata que se pode separar quimiometricamente as matrizes das raízes da laranja pêra daquelas das raízes dos enxertos do limão cravo.

Analisando a HCA através da Figura 5.23 nota-se que apesar da similaridade ser baixa, tem-se uma similaridade entre as matrizes das raízes do enxerto com sintomas de CVC com aquelas das raízes de laranja pêra, mostrando assim uma tendência na produção de metabólitos secundários pelo enxerto similares aos metabólitos da laranja pêra.

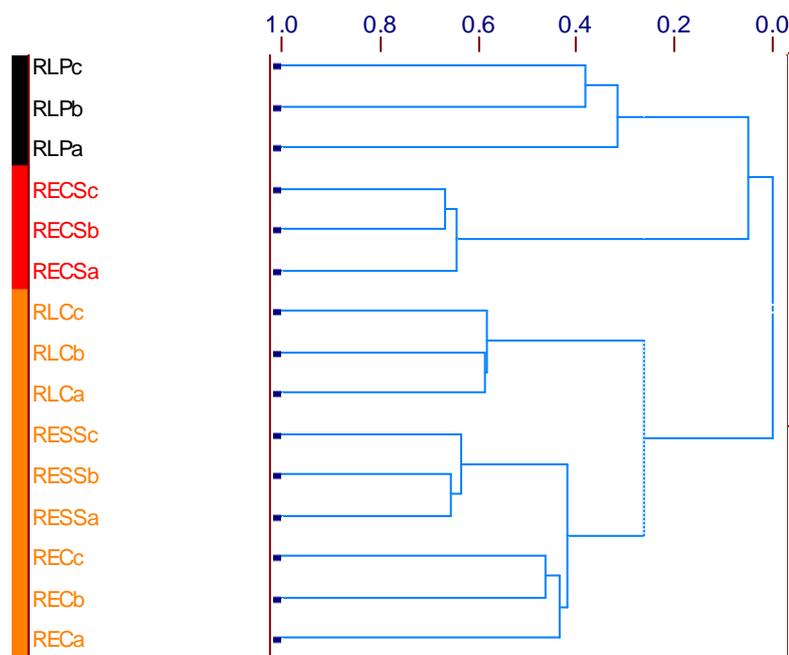


Figura 5.23. Dendrograma obtido na análise por HCA com os dados de RMN HR-MAS de ^1H das amostras das raízes dos citros estudados (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, RE; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC). (similaridade de 0,25%).

O mais interessante foi o resultado obtido com a análise das matrizes das raízes no deslocamento de δ 1,0 a 3,0. Tem-se novamente a separação das matrizes das raízes com sintomas de CVC daquelas dos demais enxertos e das raízes do limão cravo. Verifica-se também uma similaridade entre as matrizes das raízes da laranja pêra e aquelas das raízes com sintomas de CVC. Isto pode ser visto em PC1, onde tanto as matrizes das raízes de laranja quanto do enxerto com sintomas aparecem em valores negativos de PC1 e as demais em valores positivos (Figura 5.24).

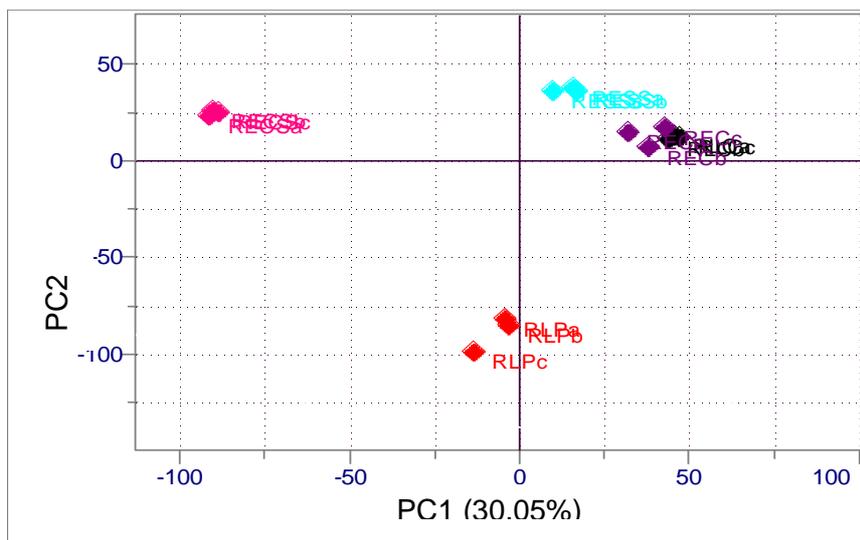


Figura 5.24. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das amostras das raízes dos citros estudados (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

Relacionando os valores das componentes principais dos gráficos de *scores* aos valores do gráfico de *loadings*, verifica-se que as variáveis destacadas em amarelo são as responsáveis pelo agrupamento (Figuras 5.25 e 5.26). Assim, pode-se verificar que as principais influências foram os sinais de deslocamentos químicos mais intensos, provavelmente devido ao aumento da produção pela planta de alguns metabolitos em comum entre as espécies de laranja pêra e enxerto com sintomas de CVC.

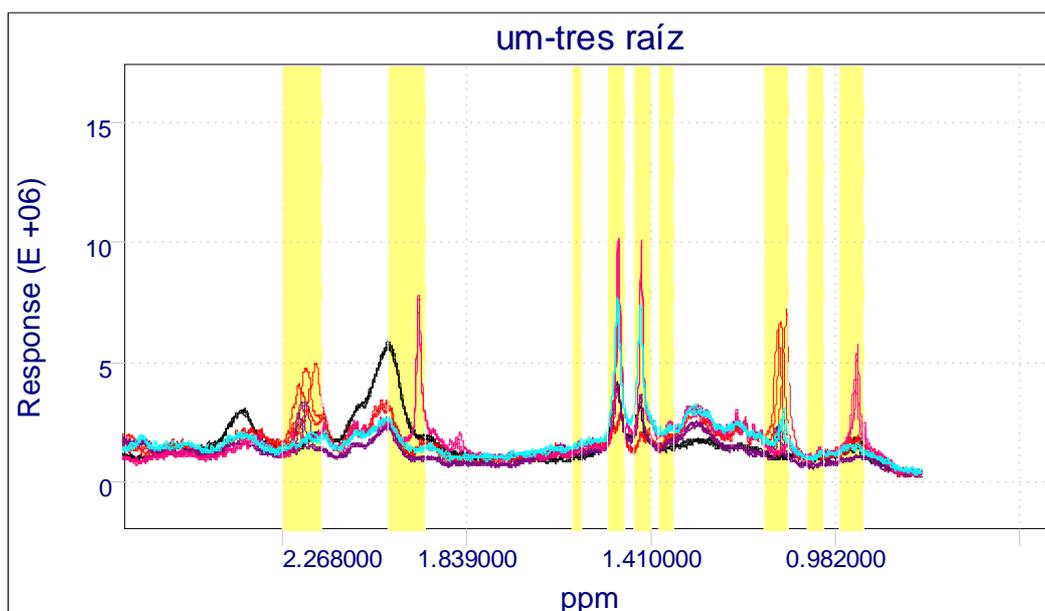


Figura 5.25. Gráfico de *loadings* (PC2) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das matrizes das raízes dos citros estudados.

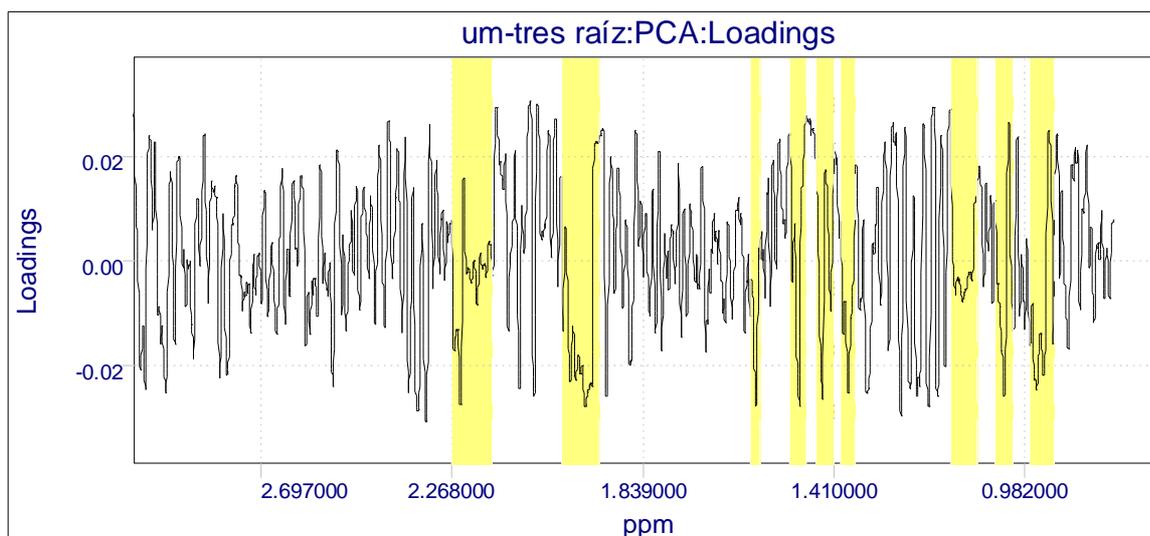


Figura 5.26. Gráfico de linhas dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 1,0 a 3,0, das matrizes das raízes dos citros estudados, destacando em amarelo as variáveis descritas por valores negativos de PC2 responsáveis pela diferenciação das raízes de laranja pêra.

Na região espectral entre δ 3,0 a 5,5 novamente verifica-se a separação das matrizes das raízes com sintomas de CVC daquelas dos demais enxertos e das raízes do limão cravo. Verifica-se também uma similaridade entre

as matrizes das raízes da laranja pêra e aquelas das raízes com sintomas de CVC (Figura 5.27).

Na região denominada de aromática (Figura 5.28) têm-se a separação das matrizes estudadas em três grupos distintos: grupo 1: amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC, raízes do enxerto sem sintomas, RESS, e raízes do limão cravo, RLC; grupo 2: raízes da laranja pêra, RLP; grupo 3: raízes do enxerto com sintomas, RECS. Esta informação é interessante, pois sugere que as raízes doentes (RECS) sintetizaram compostos aromáticos diferentes daqueles já existentes em seus citros de origem, limão cravo (RLC) e laranja pêra. Também pode-se inferir que as raízes do enxerto sem sintomas (RESS) devem ter o mesmo perfil quanto aos compostos aromáticos que aquele do limão cravo (RLC).

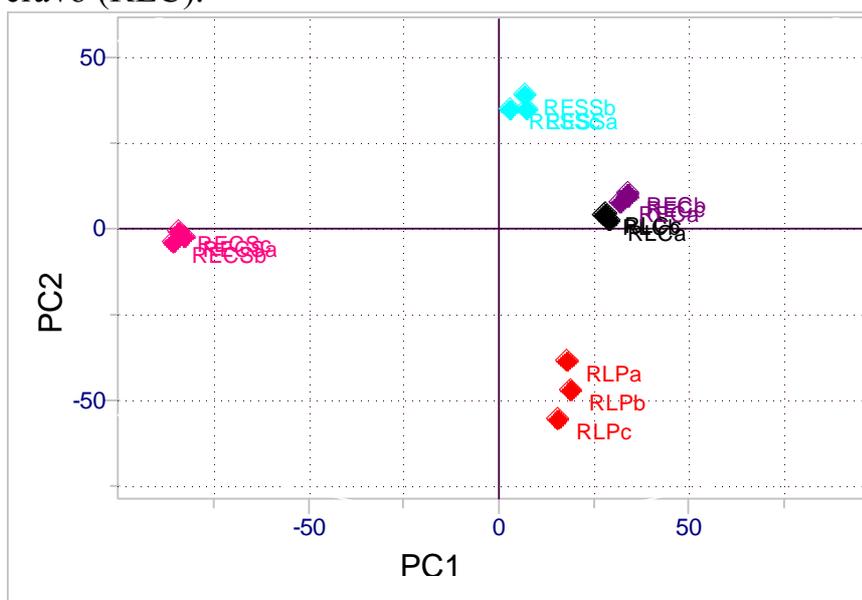


Figura 5.27. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , região de δ 3,0 a 5,5, das amostras das raízes dos citros estudadas (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC).

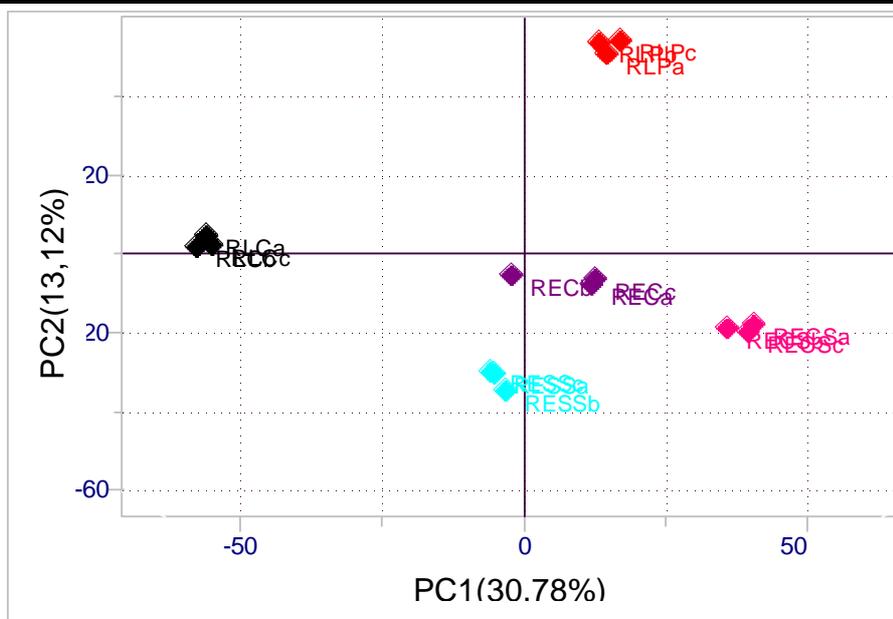


Figura 5.28. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 da análise conjunta de todos os dados dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H (região aromática) das amostras das raízes dos citros estudadas (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, RE; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC).

Os estudos RMN HR-MAS de ^1H analisados com as ferramentas quimiométricas permitiram observar no geral diferenças entre as matrizes dos citros com sintomas de CVC e aquelas das plantas sem sintomas, assim como entre estas duas e as plantas que lhes deram origens (laranja pêra e limão cravo). Assim, estes estudos mostraram que os objetivos iniciais do projeto poderiam ser alcançados. Pois se não houvesse diferenças significativas no perfil químico das matrizes estudadas, as hipóteses do projeto seriam inválidas. A quimiometria não mostra quais as diferenças nos perfis químicos, mas garante que elas existem e são significativas. As análises de RMN HR-MAS de ^1H também não permitiram identificar os respectivos compostos que diferenciam as matrizes estudadas, mas já indicam serem eles carboidratos e substâncias aromáticas. Finalmente, os dados obtidos neste estudo indicaram no geral que o projeto pode ser desenvolvido com segurança de sucesso.

5.3 Análises da variação do perfil químico dos citros estudados via HPLC aliada á ferramentas quimiométricas

A análise do perfil químico de uma dada espécie constitui um método qualitativo e pode-se ou não validar esses métodos utilizando as propriedades de mérito como a repetibilidade, e a precisão de injeção. Nesse trabalho, foram feitas extrações em triplicatas de cada parte vegetal e comparou-se visualmente a repetibilidade e a precisão de injeção através da sobreposição das bandas cromatográficas e dos tempos de retenção. Pode-se concluir que a técnica de extração apresentou uma boa reprodutibilidade. A validação da extração foi feita ao quantificar alguns metabólitos e será discutida posteriormente. Apesar de se ter realizado o experimento utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD) numa faixa espectral de 190 a 600 nm, escolheu-se um comprimento de onda fixo, 260 nm. Esse comprimento de onda foi o que melhor representou o perfil cromatográfico e as bandas nele presentes. Alguns comprimentos de onda dão uma deflexão de solvente muito grande deixando a linha de base com desvio acentuado. Outros, por sua vez, são muito seletivos e podem inibir ou mascarar sinais de moléculas que possuem comprimento de onda máximo diferente do escolhido.

As Figuras 5.29 a 5.32 mostram os cromatogramas obtidos com as replicatas (n=3) de todas as partes vegetais das espécies estudadas no comprimento de onde de 260 nm.

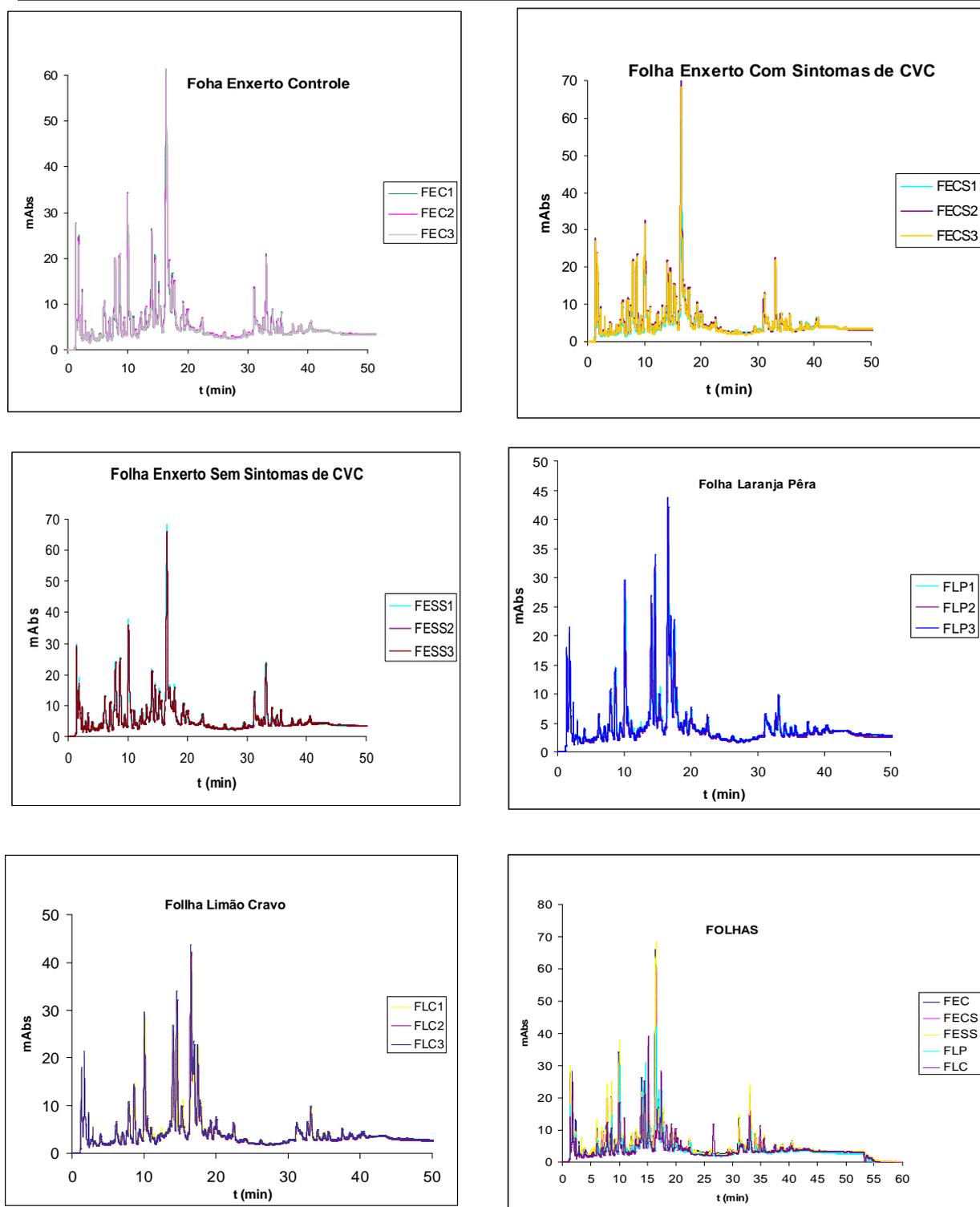


Figura 5.29. Cromatogramas sobrepostos das replicatas ($n=3$) dos extratos das folhas dos citros estudados (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS, folhas do limão cravo, FLC, e da laranja pêra FLP), ($\lambda = 260$ nm).

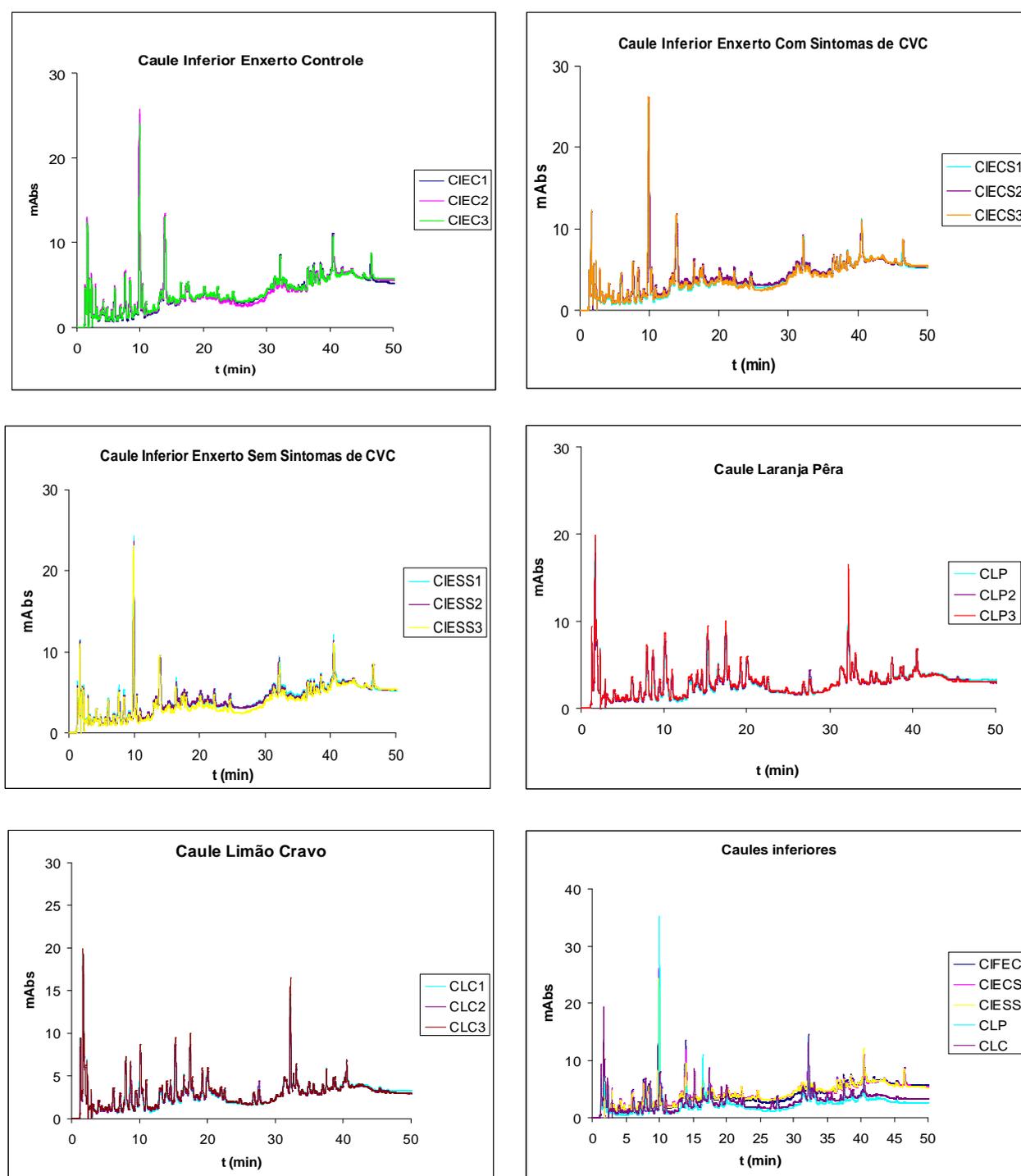


Figura 5.30. Cromatogramas sobrepostos das replicatas ($n=3$) dos extratos dos caules inferiores dos citros estudados (amostra padrão do caule inferior sem inocular a bactéria, CIEC; caule inferior com sintoma, CIECS; caule inferior sem sintoma, CIESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC), ($\lambda = 260$ nm).

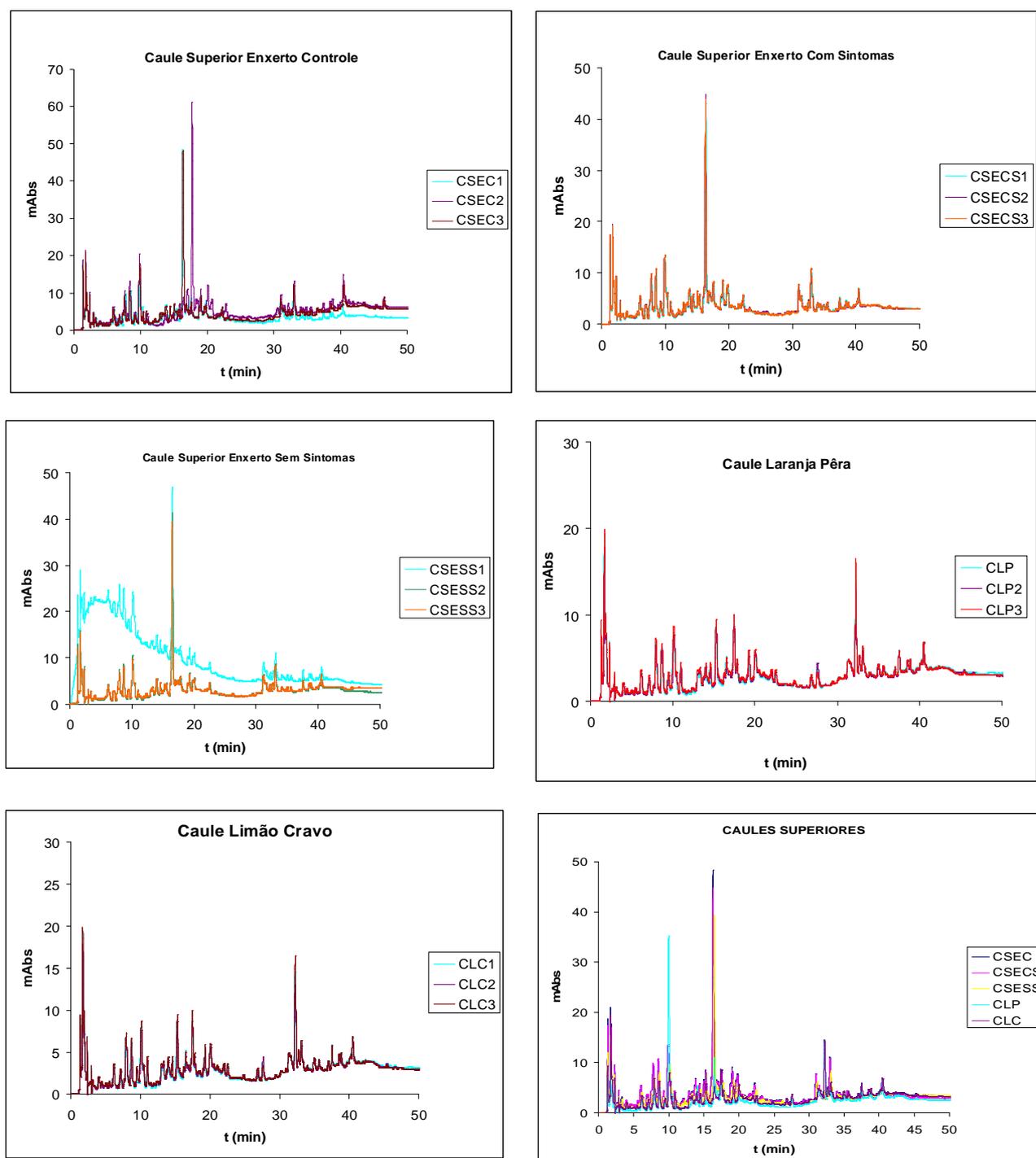


Figura 5.31. Cromatogramas sobrepostos das replicatas ($n=3$) dos extratos dos caules superiores dos citros estudados (amostra padrão do caule superior sem inocular a bactéria, CSEC; caule superior com sintoma, CSECS; caule superior sem sintoma, CSESS, caule da laranja pêra, CLP, caule do limão cravo, CLC), ($\lambda = 260 \text{ nm}$).

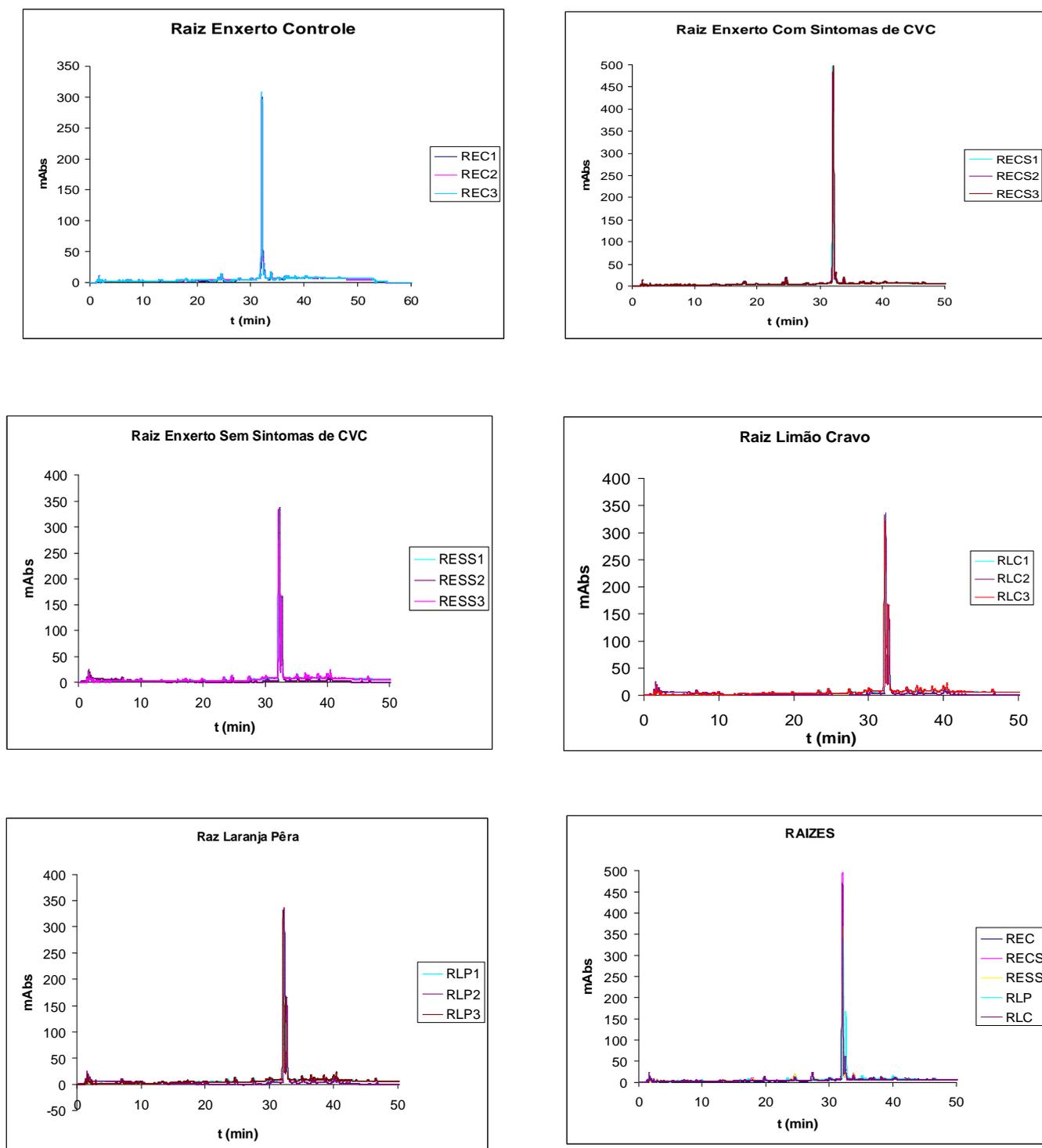


Figura 5.32. Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos das raízes dos citros estudados (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS; raízes da laranja pêra, RLP, e do limão cravo, RLC). ($\lambda = 260 \text{ nm}$).

Estes cromatogramas foram analisados pela quimiometria, os quais foram transformados em dados numéricos e organizados numa matriz, onde as linhas representavam as amostras, e as colunas representavam as variáveis, ou seja, os tempos de retenção de cada banda cromatográfica. O comprimento de onda utilizado para representar as amostras foi o de 260 nm. Contudo, a corrida cromatográfica foi realizada na faixa de 190 a 600 nm, avaliando outros comprimentos de onda como 220, 254, 300, 365, 400, 450 nm. Escolheu-se o comprimento de onda de 260 nm devido ao fato de que essa região não apresentava um grande desvio da linha de base e também se obteve nesse comprimento de onda uma intensidade razoável da maioria das bandas cromatográficas.

A matriz gerada apresentou 54 linhas e 4220 colunas e os cromatogramas desta amostras foram submetidos ao alinhamento, de acordo com o método proposto por Skov et AL (ano, referencia não foi citada). O método citado pressupõe a existência de uma referência, a partir da qual as demais serão alinhadas e que deve apresentar um elevado índice de similaridade com relação ao conjunto total de amostras.

Utilizou-se como referência uma amostra de cada parte vegetal; para as folhas, utilizou-se o cromatograma das amostras das folhas do enxerto com sintomas de CVC, para os caules utilizaram-se as amostras do caule inferior do enxerto sem sintomas de CVC e para as raízes as amostras da raiz do enxerto com sintomas de CVC.

Em alguns casos pode-se realizar uma redução do número de variáveis deixando assim os cálculos computacionais mais rápidos, uma vez que o conjunto de dados é menor. Mas, para o alinhamento de cromatogramas ao reduzir o número de variáveis pode haver distorções nas formas de áreas e bandas, fazendo com que sua aplicação deva ser minuciosamente avaliada. Nesse trabalho, não se aplicou o recurso matemático citado acima. Para o alinhamento dos cromatogramas utilizou-se intervalos amplos de m (segment

length) e t (slack size), e à medida que se obteve os resultados, intervalos menores foram utilizados, até que seus valores convergissem.

Os valores obtidos para m e t foram:

- Folhas: 302 e 115 respectivamente
- Caules: 500 e 150 respectivamente
- Raízes: 124 e 1 respectivamente

Assim, os cromatogramas da matriz [54 x 4220] foram alinhados através do algoritmo COW (Correlation Optimized Warping) utilizando os segmentos de tamanho m e o grau de flexibilidade t mostrado acima.

Ao analisar o perfil químico via HPLC-DAD tem que ser considerado todas as bandas com maiores e menores intensidades numa mesma proporção, sendo necessário auto-escalonar os dados cromatográficos para em seguida aplicar a quimiometria.

Os dados cromatográficos obtidos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) e a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA).

A análise de PCA foi realizada utilizando-se 97,05% de informações dos dados originais descritos por 3 componentes principais. A diferenciação foi obtida conforme descrito nos gráficos de *scores* representados nas Figuras 5.33 e 5.34. Nestas figuras observa-se nitidamente a separação das matrizes das raízes (valores positivos de PC1 e PC2) daquelas referentes às folhas e caules. Contudo não houve separação entre as matrizes de cada órgão. Verifica-se uma tendência de separação entre as matrizes das folhas e dos caules em PC2. Ampliando-se um pouco o gráfico observa-se que há também uma tendência de agrupamento das matrizes das raízes do enxerto com e sem sintomas (RECS, RESS) com aquelas das raízes do limão cravo (RLC). As matrizes das raízes de laranja pêra (RLP) estão bem diferenciadas das demais.

Na análise conjunta de todas as matrizes estudadas a quimiometria mostrou haver diferenças relevantes entre as matrizes das partes aéreas daquelas referentes às partes inferiores dos citros estudados. Todas as observações acima foram confirmadas no dendograma obtido na análise de HCA para estas matrizes estudadas (Figura 5.35).

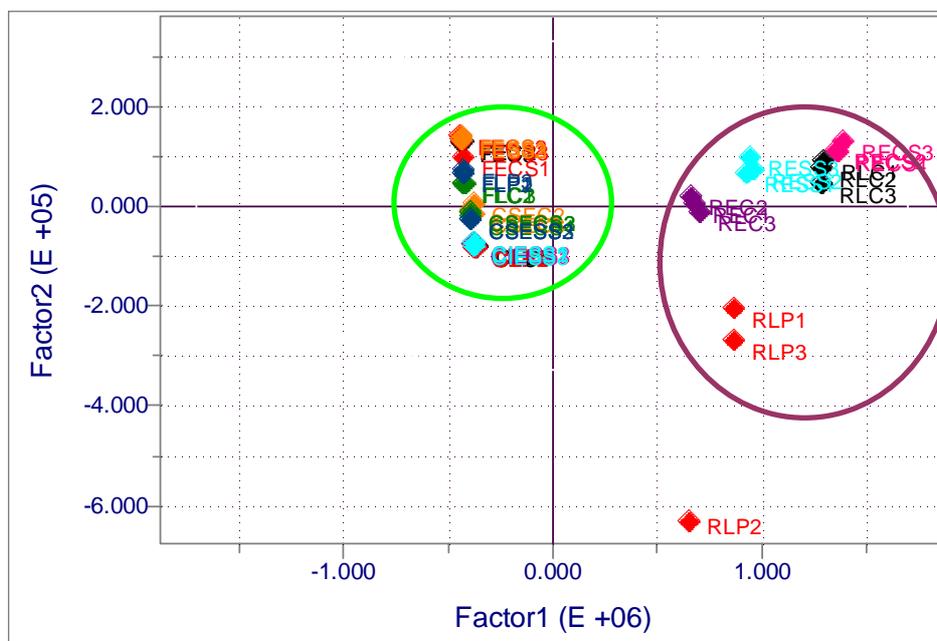


Figura 5.33. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos cromatogramas das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), das folhas dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS), das folhas do limão cravo (FLC) e da laranja pêra (FLP), dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz, ($\lambda = 260 \text{ nm}$).

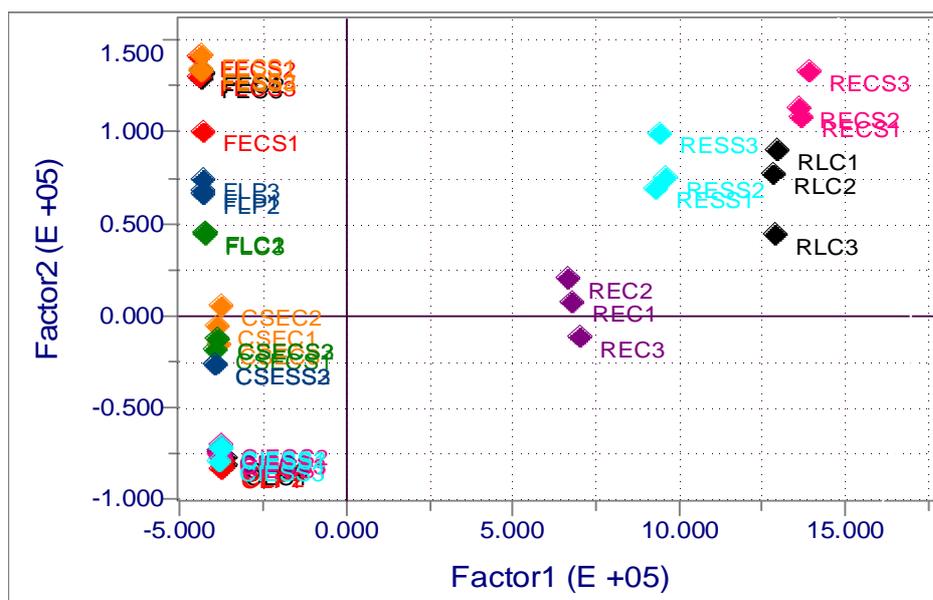


Figura 5.34. Ampliação do gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm), contendo todas as matrizes das partes vegetais dos citros estudados.

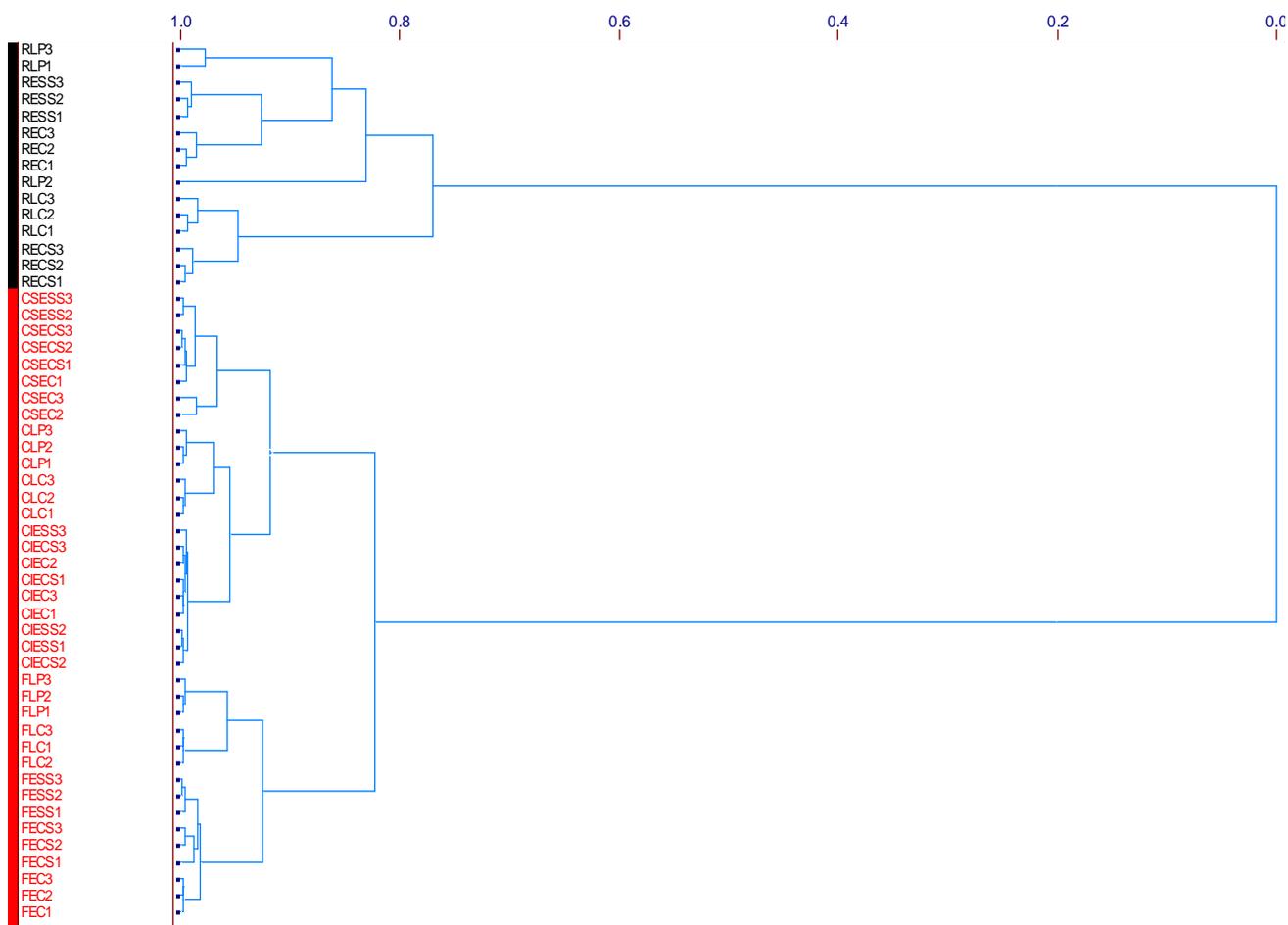


Figura 5.35. Dendrograma dos dados cromatográficos ($\lambda = 260$ nm), das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIEC e CSEC respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), das raízes dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, REC, raízes com sintoma RECS, raízes sem sintoma RESS), das folhas dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS), das folhas do limão cravo (FLC) e da laranja pêra (FLP), dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz, (similaridade de 0,20%).

Verificou-se nestas análises que não foi possível observar uma boa separação entre as matrizes de cada órgão, assim, visando uma análise mais refinada, as matrizes de cada órgão foram re-avaliadas separadamente. As Figuras 5.36 e 5.37 mostram as matrizes das folhas separadas em três grupos distintos: grupo 1 incluindo as matrizes das folhas da laranja pêra (FLP), grupo 2 compreende as matrizes das folhas do limão cravo (FLC) e o terceiro grupo inclui as matrizes das folhas dos enxertos destes dois citros (FEC). Verifica-se em PC2 que há uma tendência de separação das matrizes da folhas com e sem sintomas (FECS, FESS) daquelas referentes às amostras padrões onde a bactéria não foi inoculada (FEC). Também pode ser observado que as matrizes da folhas dos enxertos com e sem sintomas (FECS, FESS) assemelham-se mais àquelas do limão cravo (FLC). As matrizes das amostras padrões onde a bactéria não foi inoculada (FEC) aproximam-se mais da folhas da laranja pêra (FLP).

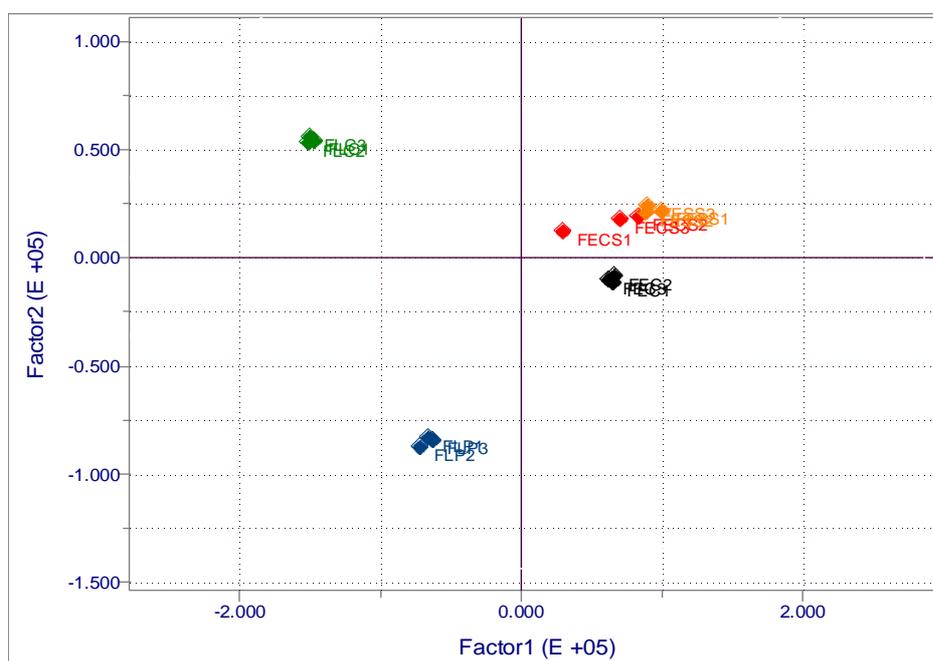


Figura 5.36. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm), das amostras das folhas dos enxertos (amostra padrão sem inocular a bactéria, FEC, folhas com sintoma FECS, folhas sem sintoma FESS), das folhas do limão cravo (FLC) e da laranja pêra (FLP). As análises foram feitas em triplicatas e as letras a, b e c referem-se a cada matriz.

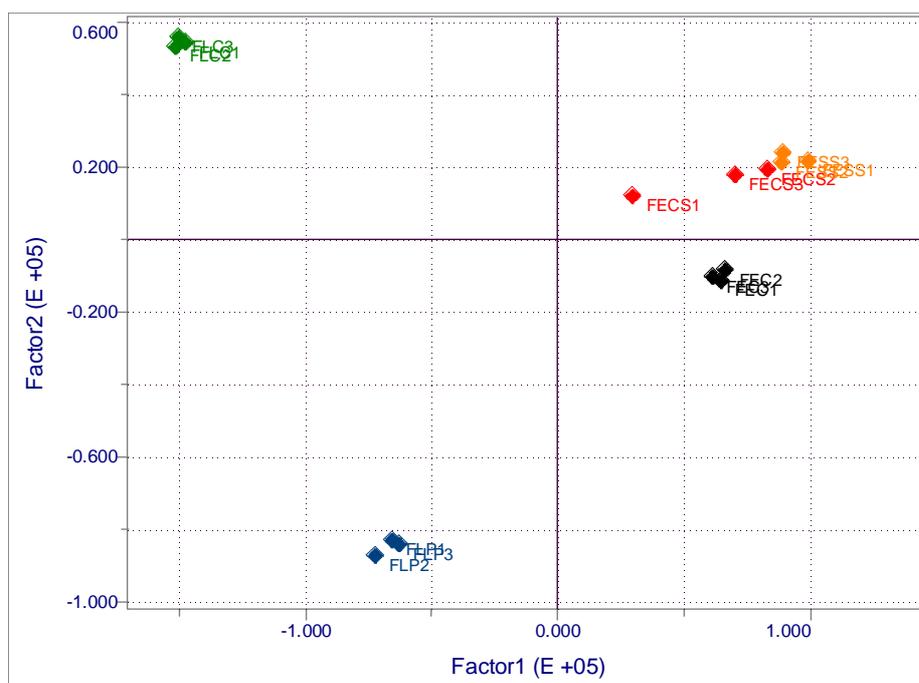


Figura 5.37. Ampliação do gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm) das amostras das folhas dos citros estudados.

Correlacionando os gráficos de linhas e *loadings* com os cromatogramas pode-se relacionar alguns tempos de retenção de substâncias e também a concentração das mesmas com a discriminação obtida, ou seja, a separação quimiométrica está relacionada com variação de concentração de algumas substâncias (Figuras 5.38 e 5.39). Uma dessas substâncias trata-se de uma cumarina, o bergapteno, cujo tempo de retenção é de aproximadamente 25 min e está presente apenas nas folhas de limão cravo e nas folhas do enxerto com sintomas de CVC. A identificação da mesma se deu via LC-MS e será discutida posteriormente neste trabalho (pág. 219).

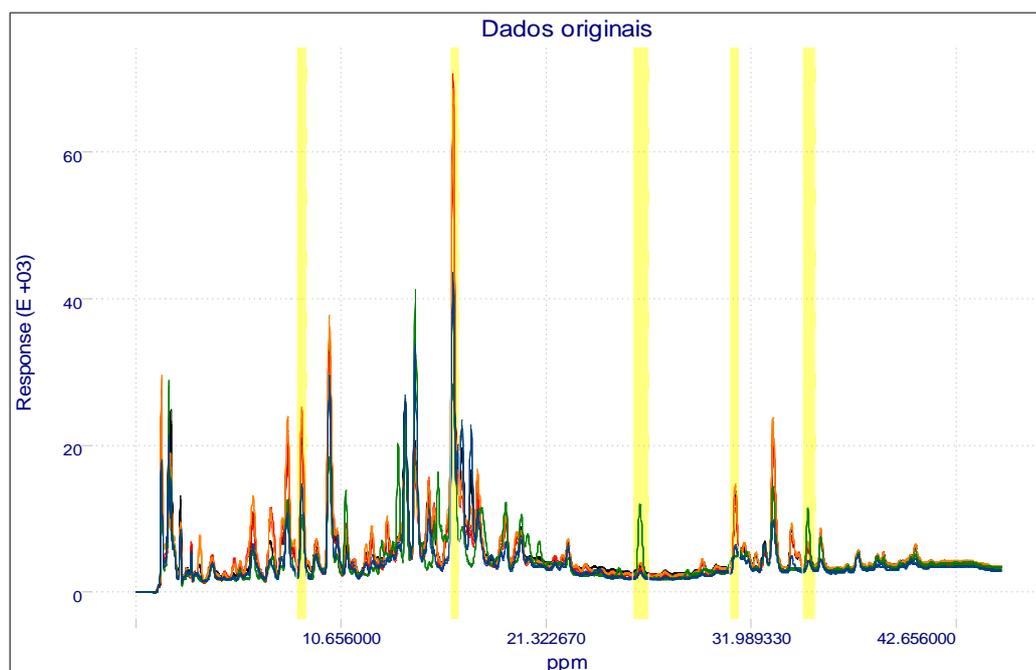


Figura 5.38. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm) das amostras das folhas dos citros estudados.

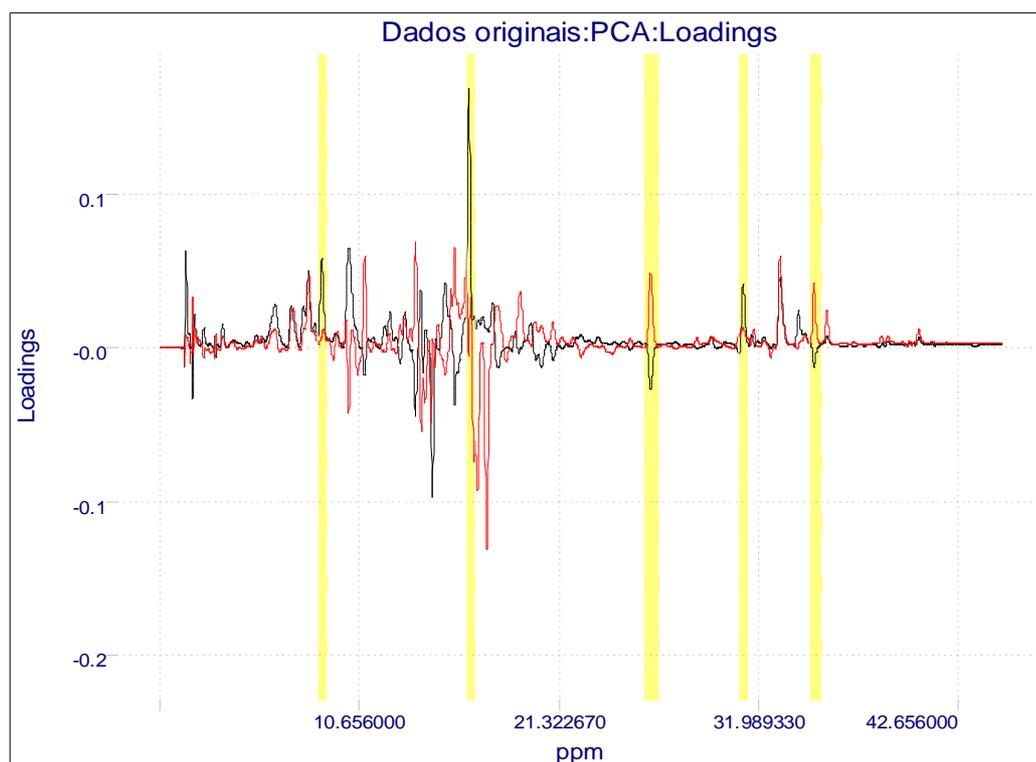


Figura 5.39. Gráfico de linhas dos cromatogramas das amostras das folhas dos citros estudados, destacando em amarelo as variáveis responsáveis pela diferenciação das matrizes.

A Figura 5.40 mostra as matrizes dos caules superiores e inferiores separadas em três grupos: grupo 1 inclui as matrizes dos caules superiores do enxerto com e sem sintomas (CSECS, CSESS), juntamente com aquelas dos caules superiores referentes às amostras padrões onde a bactéria não foi inoculada (CSEC), o grupo 2 compreende estas mesmas matrizes mas referentes aos caules inferiores do enxerto (CIECS, CIESS, CIEC), no grupo três encontram-se as matrizes dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC). O perfil químico destes dois últimos é muito diferente, e, portanto não é clara a proximidade destes dois como mostrou a quimiometria. Também verifica-se que há uma tendência de separação das matrizes dos caules superiores com e sem sintomas (CSECS, CSESS) daquelas referentes às amostras padrões onde a bactéria não foi inoculada (CSEC).

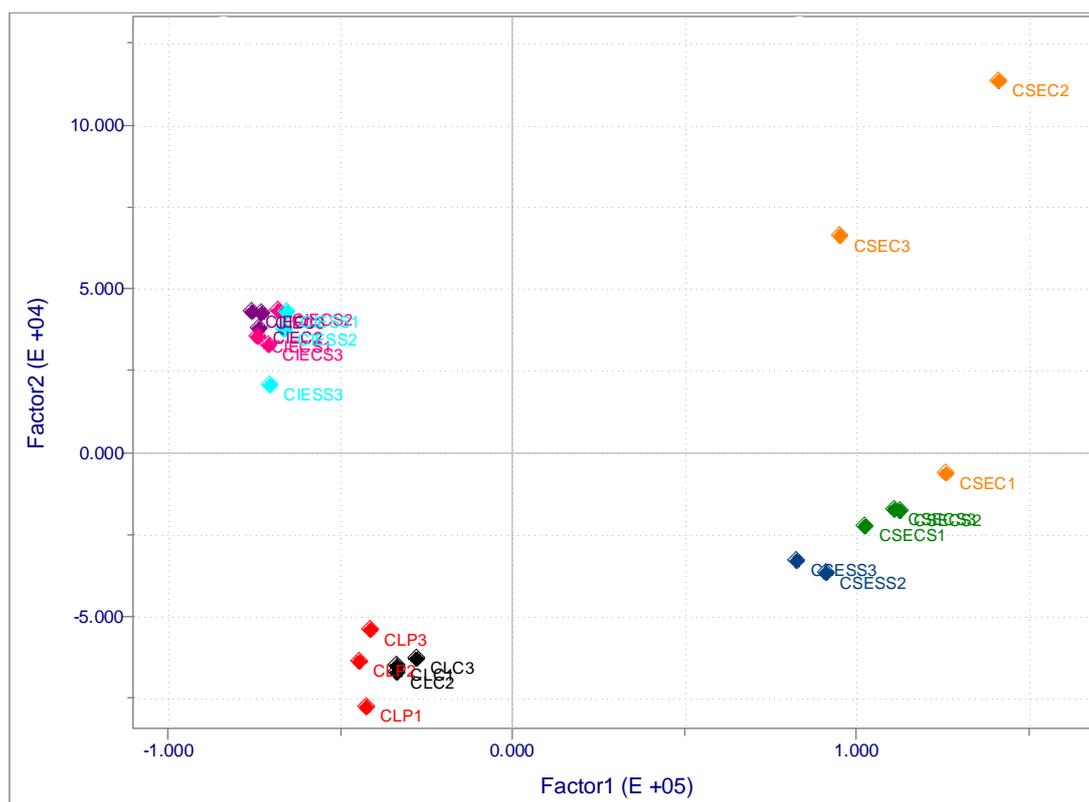


Figura 5.40. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos cromatogramas das amostras dos caules inferiores e superiores dos enxertos (amostra padrão do caule inferior e superior sem inocular a bactéria, CIE e CSE respectivamente; caule inferior e superior com sintoma, CIECS, CSECS; caule inferior e superior sem sintoma, CIESS, CSESS), dos caules da laranja pêra (CLP) e limão cravo (CLC), ($\lambda = 260$ nm).

Por outro lado, ao analisar o gráfico de *scores* PC1xPC2 das raízes dos citros estudados observa-se uma maior coerência com o que se conhece sobre resistência à *X. fastidiosa*. Considerando que o limão cravo é resistente à *X. fastidiosa*, seria esperado que as raízes do enxerto com sintomas de CVC apresentassem perfil químico próximo deste último como um mecanismo de defesa. A Figura 5.41 confirma esta hipótese, pois ela mostra uma estreita proximidade das matrizes das raízes do enxerto com sintoma (RECS) com aquelas do limão cravo (RLC). As matrizes das raízes do enxerto sem sintoma (RESS) por fatores ainda não claros mantêm a bactéria em baixa concentração, sendo um indicativo de que o seu mecanismo de defesa não foi ativado. Com isto seria esperado para estas matrizes um perfil químico próximo àquele da amostra padrão do enxerto sem inocular a bactéria (REC). A Figura 5.41 também confirma esta hipótese, mostrando certa proximidade destas matrizes (RESS e REC), onde a matriz RESSa encontra-se na interseção dos dois quadrantes, e as demais muito próximo da linha divisória negativa e positiva. Estas mesmas observações são reforçadas nos gráficos de linhas e *loadings* com os cromatogramas dos extratos das diferentes raízes estudadas (Figuras 5.42 e 5.43).

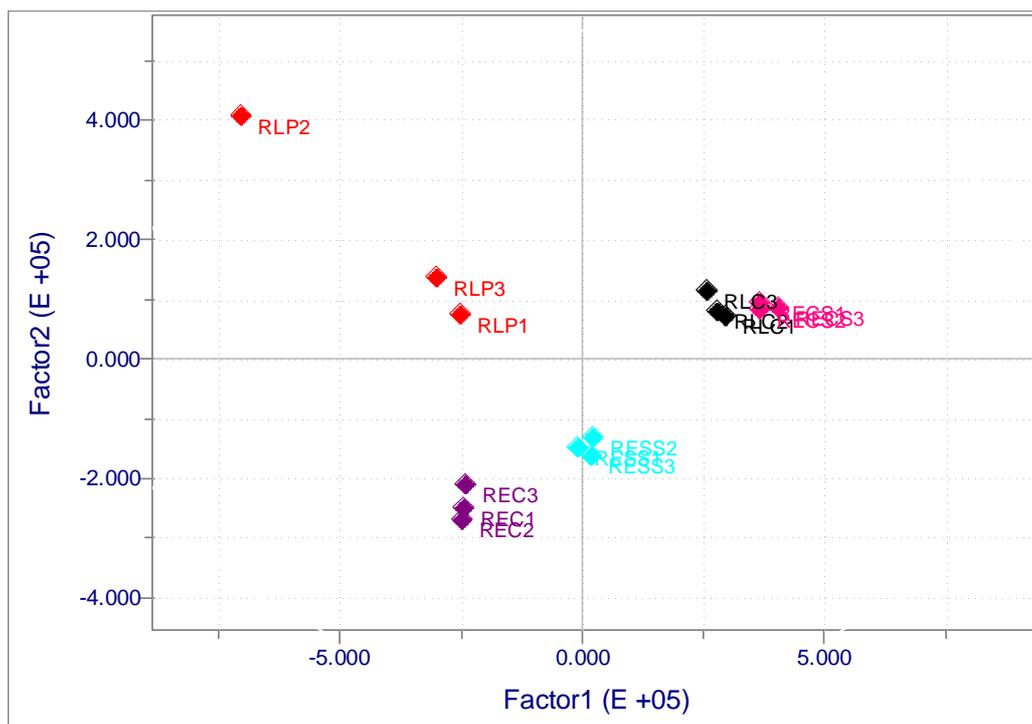


Figura 5.41. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos cromatogramas das amostras das raízes dos enxertos (amostra padrão das raízes sem inocular a bactéria, REC; raízes com e sem sintomas, RECS, RESS), das raízes da laranja pêra (RLP) e do limão cravo (RLC), ($\lambda = 260$ nm).

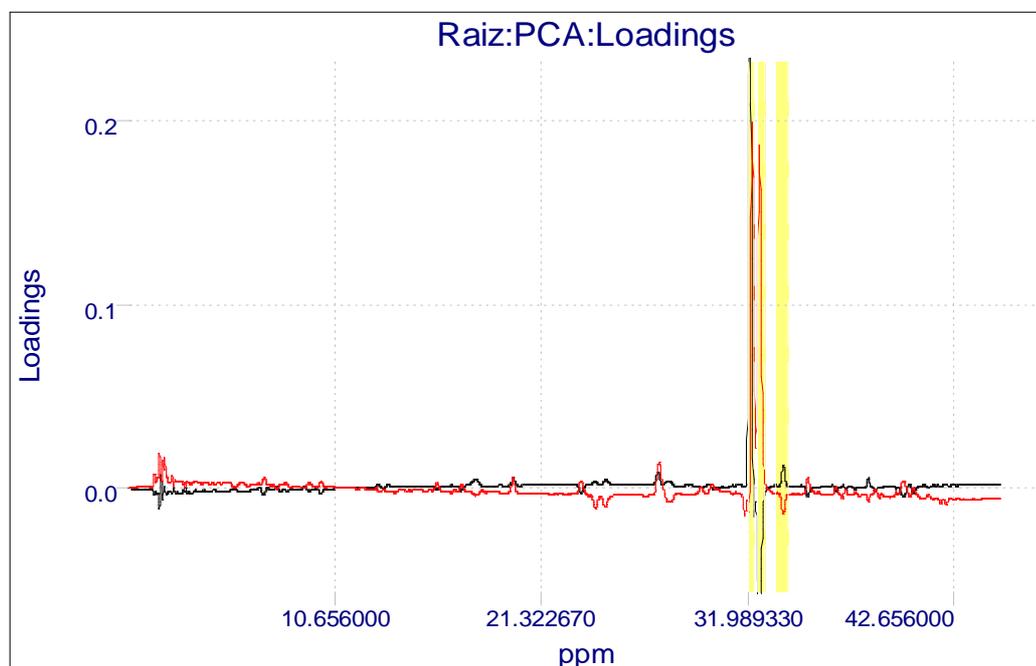


Figura 5.42. Gráfico de *loadings* (PC1 x PC2) dos cromatogramas ($\lambda = 260$ nm), das matrizes das raízes dos citros estudados.

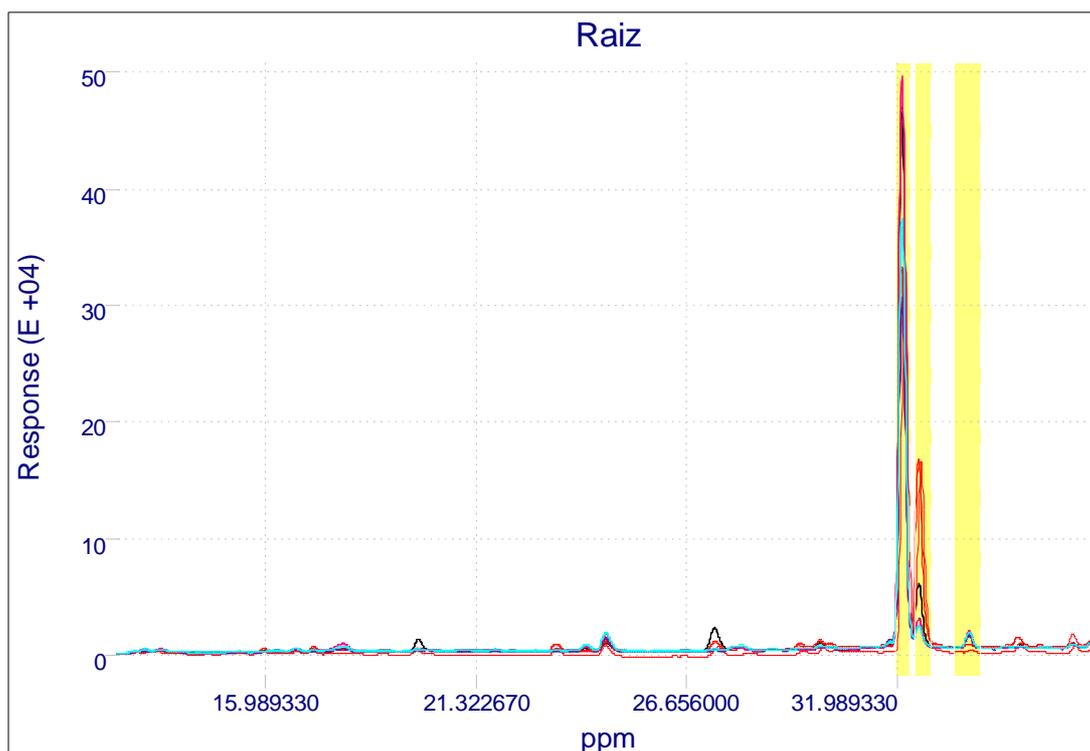


Figura 5.43. Gráfico linhas dos cromatogramas das matrizes das raízes dos citros estudados, destacando em amarelo as variáveis responsáveis pela diferenciação das matrizes.

As duas substâncias, nos tempos de retenção em 32 e 33 min aproximadamente, são as cumarinas preniladas xantiletina e seselina respectivamente, as quais estão presentes em grandes quantidades nas raízes dos citros estudados. Podem ser consideradas substâncias marcadoras da presença da bactéria *X. fastidiosa*, pois estas foram quantificadas e apresentaram variação em suas concentrações quando na presença da bactéria. Estes dados serão discutidos em tópicos mais a frente.

Os estudos de HPLC analisados com as ferramentas quimiométricas levaram a resultados similares àqueles obtidos com RMN HR-MAS, ou seja, ambos permitiram observar no geral diferenças entre as matrizes dos citros com sintomas de CVC e aquelas das plantas sem sintomas, assim como entre estas duas e as plantas que lhes deram origens (laranja pêra e limão cravo). A quimiometria não mostrou quais as diferenças nos perfis químicos em

ambos os estudos, mas garante que elas existem e são significativas. Finalmente, os dados obtidos nestes estudos indicaram no geral que o projeto podia ser desenvolvido com segurança de sucesso. Contudo, é importante ressaltar que o presente estudo não avaliou as variações sazonais e nem diferentes idade das plantas. Todas as plantas estudadas possuíam a mesma idade. Novos estudos serão necessários para se avaliar as variáveis citadas acima bem como outras.

5.4 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas raízes dos citros estudados

As cumarinas preniladas xantiletina e seselina são comuns na família Rutaceae e estão presentes em quantidades razoáveis nas raízes dos citros estudados (Figura 5.44). A literatura relata várias atividades biológicas para estas cumarinas. A seselina já foi reportada a possuir: - efeitos antinociceptivos, ou seja, efeitos que impedem as funções do organismo de detectarem estímulos lesivos sobre o mesmo como uma agulhada e ou uma queimadura, funcionando como um anestésico (LIMA et al., 2006); - efeitos anti-proliferativos em várias linhagens de células cancerosas como linfomas e leucemia (GUNATILAKA et al., 1994; MAGITAIS et al., 1998; ; LIN et al., 2003); - bloqueador de edemas das patas de camundongos (GARCIA-ARGAEZ et al., 2000;); dentre várias outras atividades. A xantiletina é citada a possuir atividades: - antiplaquetária; - anticancerígena (GLJNATILAU & KINGSTON, 1994); - potencial herbicida (ANAYA et al., 2005); - inibição à fungos simbióticos de formiga cortadeira (GODOY et al., 2005).

Em citros ambas cumarinas têm sido relatadas como compostos antifúngicos. Segundo KHAN (1985) elas foram acumuladas no tronco e raízes de citros quando estes foram infectados por *Phytophthora ssp.*

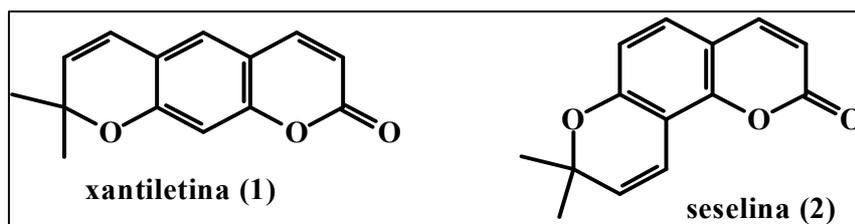


Figura 5.44. Estruturas moleculares das cumarinas preniladas xantiletina (1) e seselina (2).

Com o intuito de verificar o acúmulo ou não dessas duas cumarinas nas raízes dos citros estudados, quando os mesmos foram inoculados com a bactéria *X. fastidiosa*, desenvolveu-se um método analítico via HPLC-DAD para quantificá-las. Este constituiu em uma modificação de um método desenvolvido por RIBEIRO (2006), para avaliar a formação das cumarinas xantiletina, seselina e suberosina via a prenilação de umbeliferona. Nas partes superiores, folhas e caules, as concentrações de xantiletina e seselina são muito baixas, com isto, para estes órgãos foi necessário desenvolver um segundo método, via LC-MS e será discutido no tópico posterior (item 5.5).

O método foi desenvolvido utilizando amostras das raízes do enxerto de *Citrus sinensis* sobre *C. limonia* (Cs-CI, no restante do texto este enxerto será citado por esta sigla). Inicialmente analisou-se (item 3.4.4 do procedimento experimental) a pureza das bandas cromatográficas de interesse. Amostras de raízes do enxerto Cs-CI foram analisadas utilizando um DAD com varredura entre 190 e 600 nm (Figura 5.45). Os cromatogramas apresentaram boa seletividade ($\alpha = 1,7$) entre as bandas referentes as duas cumarinas xantiletina e seselina nos $t_r = 17,30$ min e $t_r = 19,01$ min, respectivamente. Não foi detectado nenhum interferente nas eluições das mesmas (visto via gráfico comparativo dos λ , dado via software) e na quantificação o comprimento de onda selecionado foi o de 220 nm.

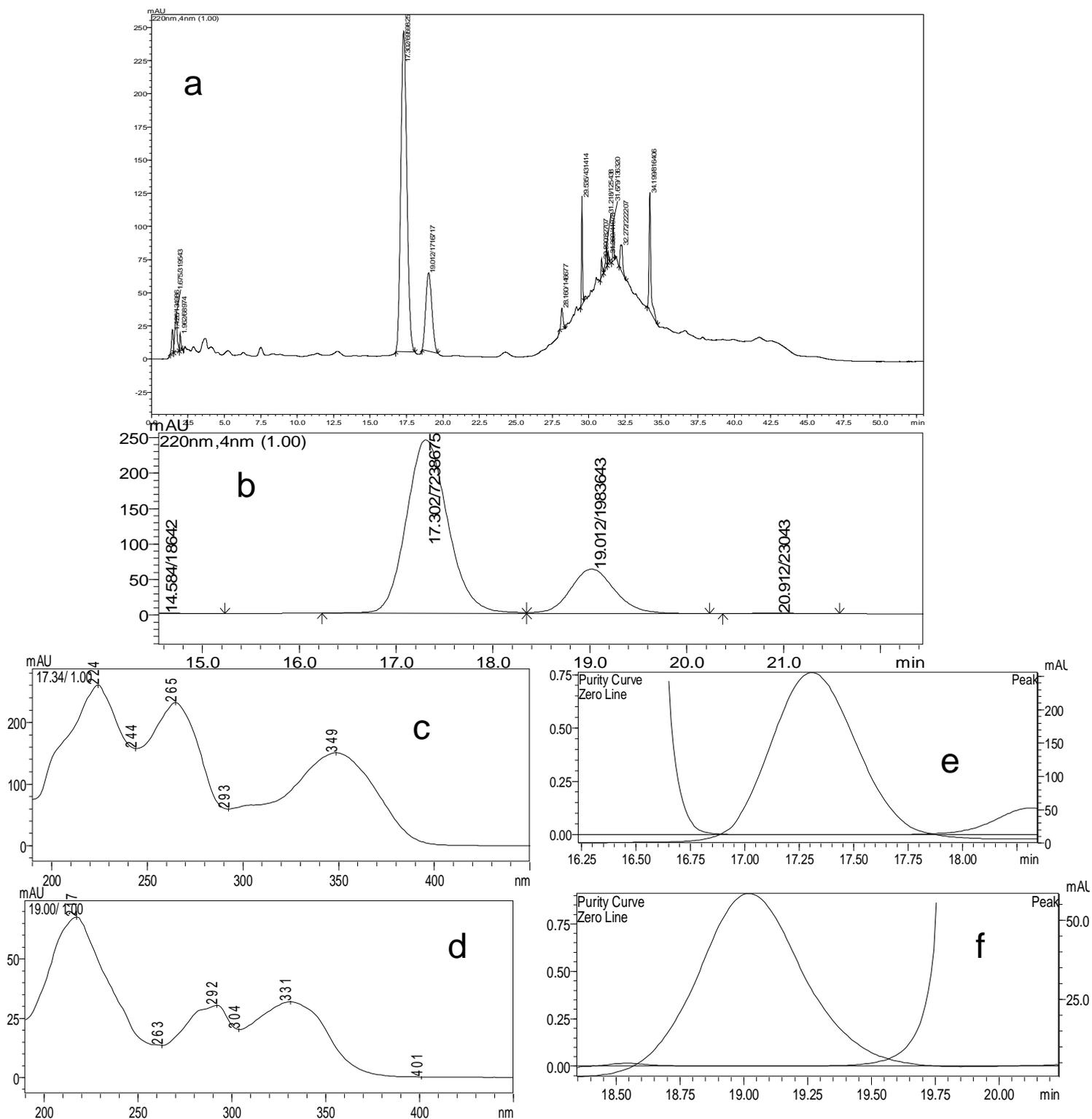


Figura 5.45. a) Cromatograma do extrato das raízes do enxerto Cs-Cl com sintomas de CVC; b) ampliação do cromatograma mostrando a separação entre as cumarinas; c) e d) espectros de UV da xantiletina e seselina respectivamente; e) e f) curvas de pureza de banda cromatográfica entre 190 e 600 nm para as cumarinas xantiletina e seselina respectivamente.

O método de quantificação foi validado seguindo as normas estabelecidas pela ANVISA, publicadas em 2003 (Resolução RE nº 899, ANVISA 2003). Segundo RIBANI *et al.*; (2004) uma validação engloba todos os procedimentos necessários para demonstrar se o método empregado para a quantificação da concentração de uma amostra em uma matriz é eficaz e específico para a aplicação desejada. Os parâmetros necessários para medir a aceitabilidade do desempenho de um método analítico de acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*) e ANVISA são: linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, seletividade e recuperação. Para uma melhor discussão os conceitos destes parâmetros serão resumidos a seguir.

A Linearidade é a habilidade das respostas analíticas serem diretamente proporcionais às concentrações das substâncias em estudo. Para medi-la constrói-se uma curva com a matriz que irá ser utilizada em triplicata com seis ou mais concentrações diferentes. O desvio do limite de quantificação (LQ) deve ser menor ou igual a 20% e para os demais pontos da curva devem ser menores ou iguais a 15%. O coeficiente de correlação deve ser igual ou superior a 0,95% (RIBANI *et al.*, 2004).

A Precisão do método avalia a repetibilidade, a precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade é o grau de concordância entre resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente às múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. Os coeficientes de variação (CV) obtidos no mínimo de três matrizes para o controle de qualidade (CQ), CQB - baixo, CQM – médio e CQA - alto devem ser menores ou iguais a 15%. A precisão intermediária expressa as variações dentro de um laboratório, como: dias diferentes, analistas diferentes, métodos diferentes, ou equipamentos diferentes, sobre uma mesma amostra ou padrão, definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais). Os resultados dos dados obtidos em dias alternados, por um mesmo analista, usando um mesmo equipamento, mesmas concentrações e

mesma metodologia, deverão ser o mesmo (RIBANI et al., 2004). A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de medição (mudança de operador, local, equipamentos, etc.), ou seja, colaboração inter-laboratorial (RIBANI et al., 2004).

A Exatidão deve apresentar valores compreendidos entre mais ou menos 15% do valor nominal do (CQB), (CQM) e (CQA) e de mais ou menos 20% para LQ, calculados a partir de no mínimo três matrizes diferentes (RIBANI et al., 2004). A Sensibilidade descreve quanto à resposta varia com a variação da concentração do analito, a menor concentração da curva pode ser aceita como o LQ do método quando o CV para o controle de qualidade for inferior a 20% (RIBANI et al., 2004).

A Seletividade é a habilidade de um método separar, do composto de interesse, componentes da amostra que serão visíveis no detector. A resposta de interferentes no tempo de retenção da substância investigada deve ser inferior a 20% da resposta do LQ (RIBANI et al., 2004).

A Recuperação é a relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra, fortificada com uma quantidade conhecida do analito, e o valor teórico desta quantidade fortificada (RIBANI et al., 2004).

A análise da linearidade do método no estudo das amostras das raízes do enxerto Cs-Cl foram utilizados dois métodos de calibração: calibração por padronização externa e calibração por adição de padrão. A primeira é utilizada quando as amostras não precisam passar por um pré-tratamento extenso, como é o caso das amostras das raízes do enxerto Cs-Cl neste trabalho. A curva de calibração foi feita por padrões de calibração, os quais são soluções de concentrações conhecidas do analito, ou dos analitos (xantiletina e seselina). A determinação das concentrações dos analitos nas diversas raízes do enxerto Cs-Cl foi feita pela comparação da área dos picos correspondentes as cumarinas em estudo com as áreas obtidas a partir das soluções padrão de calibração.

A calibração por adição de padrão é realizada quando não é possível obter uma matriz ou extrato isento dos analitos em interesse, em matrizes muito complexas ou quando existem interações fortes entre o analito e a matriz. Segundo Snyder *et. al.*; (1997), para a construção de uma curva de adição de padrão adicionam-se diferentes concentrações do analito ou dos analitos de interesse à matriz, a qual já contém uma quantidade conhecida do(s) mesmo(s). Extrapolam-se a reta, a fim de determinar a concentração do analito [C], cuja regressão linear foi definida pelas concentrações analisadas.

Ao se obter curvas por padronização externa e por adição de padrão e ao compará-las se obtiver curvas paralelas, pode-se afirmar que a matriz não influencia e não interfere na quantificação do analito de interesse. Nestas condições pode-se determinar a concentração do analito em diferentes amostras utilizando simplesmente a regressão obtida a partir da padronização externa.

A construção da curva de calibração por padronização externa se deu através do preparo de sete concentrações diferentes variando entre 1 e 100 μL em triplicata e a regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas das bandas cromatográficas e a concentração das amostras (vide o item 4.3.4.2 Preparo das soluções padrão, padrão estoque, padrões de análise e amostras controle de qualidade, pag. 48). As Figuras 5.46 e 5.47 mostram as curvas por padronização externa e por adição de padrão das cumarinas xantilena e seselina respectivamente. As Tabelas 5.2 e 5.3 contêm as precisões e exatidões determinadas para as curvas de calibração externa da xantiletina e seselina respectivamente.

Tabela 5.2. Precisão (CV%) e exatidão (%) determinadas para a curva de calibração externa do padrão xantiletina.

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	Exatidão (%)
01	1,0	0,6	96,5
02	2,0	0,5	97,6
03	4,0	0,9	98,6
04	10,0	1,4	99,1
05	20,0	0,1	101,5
06	40,0	1,6	99,9
07	100,0	0,9	100,0

Tabela 5.3. Precisão (CV%) e exatidão (%) determinadas para a curva de calibração externa do padrão seselina.

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	Exatidão (%)
01	1,0	0,9	102,7
02	2,0	0,9	97,6
03	4,0	2,7	101,1
04	10,0	1,4	98,7
05	20,0	0,1	101,1
06	40,0	2,0	99,7
07	100,0	0,6	100,0

Entre as réplicas (n=3) da xantiletina, o coeficiente de variação não ultrapassou os 2%. Os coeficientes de correlação obtidos para a curva de padronização externa e pela curva de adição de padrão foram 1,0000 e 0,9991 respectivamente, valores estes acima do preconizado pela ANVISA que é de 0,98. E as curvas possuem 96% de similaridade, demonstrando assim a alta seletividade do método e a não-interferência da matriz na resposta analítica (Figura 5.46).

Já para a seselina, entre as réplicas (n=3), o coeficiente de variação não ultrapassou 3% e os coeficientes de correlação obtidos para as curvas de padronização e adição de padrão foram 1,000 e 0,9982 respectivamente. Ambas possuem 106% de similaridade, demonstrando, como para a análise da xantiletina, a alta seletividade do método e a não-interferência da matriz na resposta analítica (Figura 5.47).

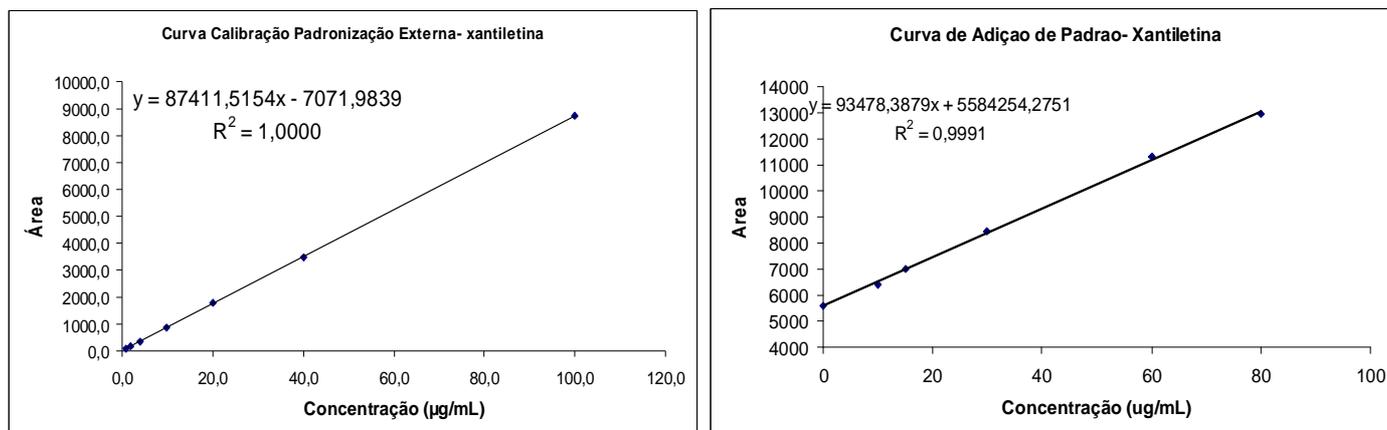


Figura 5.46. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da cumarina xantiletina em raízes do enxerto Cs-Cl.

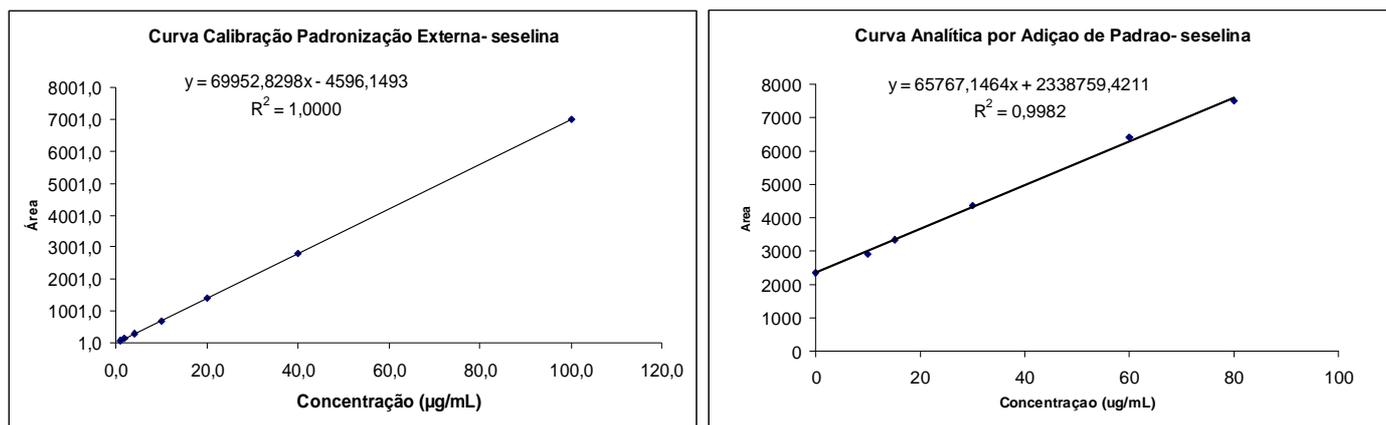


Figura 5.47. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da cumarina seselina em raízes do enxerto Cs-Cl.

A fim de se comparar a quantificação entre as duas curvas, foram avaliadas as concentrações das cumarinas na matriz da raiz do enxerto Cs-Cl controle. Pela curva de calibração por padronização externa, as concentrações médias da xantiletina e da seselina no referido extrato foram de 62,23 e 33,53 µg/mL respectivamente. Ao utilizar a curva de adição de padrão foram encontradas as concentrações 59, 73 e 35,53 µg/mL para as cumarinas xantiletina e seselina, respectivamente. As variações foram de 4,17 e 5,6% para ambas cumarinas, respectivamente, mostrando assim que a matriz está influenciando muito pouco na extração, uma vez que a variação está bem abaixo da aceita pelo método.

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas preparando-se amostras em três diferentes concentrações, as quais foram denominadas de controle de qualidade. Foram elas: concentrações baixas: 1,2 µg/mL, média: 50 µg/mL e alta: 90 µg/mL, tanto para a xantiletina quanto para a seselina, respectivamente, em quintuplicata e em três dias não-consecutivos. A precisão do método foi determinada calculando-se o desvio padrão relativo entre as áreas obtidas para as replicatas analisadas, e a exatidão foi determinada pelo desvio da concentração média experimental em relação a concentração teórica, em valores

percentuais. Os valores aceitos são de até 15% para a exatidão e a precisão nas concentrações acima do limite de quantificação, segundo resolução da ANVISA.

A precisão do método para a xantiletina variou de 0,4 a 1,6% e para a seselina de 1,0 a 3,1 %. A exatidão variou de 97,5 a 105,8% para a xantiletina e para a seselina de 94,8 a 108,9%, mostrando assim que os valores encontram-se nos limites aceitáveis pela norma da ANVISA. Nas Tabelas 5.4 e 5.5 encontram-se os valores da precisão e exatidão para o método de quantificação das cumarinas xantiletina e seselina em raízes do enxerto Cs-Cl.

Tabela 5.4. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação da cumarina xantiletina.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		Média	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
1,2	1,2	104,1	0,4	97,5	1,6	104,3	1,06	101,9
50,0	0,4	102,0	1,6	102,3	1,4	105,8	1,13	103,36
90,0	0,9	104,0	1,0	104,7	0,5	105,7	0,80	104,8

Tabela 5.5. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação da cumarina seselina.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		Média	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
1,2	1,8	108,7	1,5	105,1	1,9	108,9	1,73	107,5
50,0	3,1	101,0	1,5	103,1	1,7	104,4	2,1	102,8
90,0	1,0	94,8	1,3	103,0	1,0	103,3	1,1	100,3

Avaliou-se a exatidão do método também pelo chamado teste cego, onde um segundo analista preparou duas amostras com concentrações desconhecidas do autor do trabalho. As amostras obtiveram uma precisão de 103,1 e 102,2 % para a menos concentrada e de 105,4 e 99,4% para a mais concentrada, correspondentes as cumarinas xantiletina e seselina respectivamente, conforme mostrado nas tabelas 5.6 e 5.7.

Tabela 5.6. Valores de exatidão para o teste cego da xantiletina.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão (%)
1	25	25,77	103,1
2	70	73,78	105,4

Tabela 5.7. Valores de exatidão para o teste cego da seselina.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Exatidão (%)
1	30	30,67	102,2
2	65	64,63	99,43

O limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a menor concentração quantitativamente determinada com valores aceitáveis de precisão e exatidão. Segundo a ANVISA, os valores devem estar na faixa de 15 a 20%. Para se determinar o limite de quantificação do método em discussão foram preparadas amostras em concentrações decrescentes e em triplicata, onde se obteve tanto para a xantiletina quanto para a seselina a concentração de

quantificação de 1,0 µg/mL, apesar do coeficiente de variação estar na faixa de 0,6%. Como era de se esperar valores bem maiores de concentração para ambas cumarinas no extrato, optou-se por assumir esse valor de limite inferior de quantificação.

O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração que o método é capaz de diferenciar, com confiança do ruído experimental. Segundo a ANVISA este valor deve estar entre 2 a 3 vezes superior ao ruído apresentado pela linha de base. Análogo à determinação do LQ injetou-se amostras preparadas em concentrações decrescentes e em triplicatas, e foram obtidos como limites de detecção 0,02 e 0,05 µg/mL para a xantiletina e seselina respectivamente.

Todos os dados discutidos acima mostram que o método desenvolvido para a análise quantitativa das cumarinas xantiletina e seselina nas raízes do enxerto Cs-Cl está validado. Com isto este método foi utilizado com segurança na análise quantitativa destas cumarinas em amostras de raízes de: laranja pêra, limão cravo, enxerto de Cs-Cl sem inoculação da bactéria *X. fastidiosa* (amostra controle), enxerto de Cs-Cl onde a bactéria foi inoculada mas não apresentaram sintomas e enxerto de Cs-Cl com sintomas de CVC. Tentou-se analisar também as partes superiores como os caules e folhas, mas não se obteve sucesso devido a co-eluições de metabólitos interferentes e devido também à baixa concentração dos mesmos nestas partes vegetais. Os valores quantitativos serão discriminados com relação à concentração das cumarinas nos extratos secos (mg/Kg de extrato), uma vez que a extrapolação para a concentração em relação à planta seca se reflete apenas nas condições utilizadas de extração.

As Tabelas 5.8 e 5.9 mostram os resultados obtidos (em mg/ kg de amostra seca) na quantificação das cumarinas xantiletina e seselina nas raízes dos citros estudados.

Tabela 5.8. Concentração de xantiletina nas raízes de *citrus*.

Amostra	Matéria seca de planta (mg Kg⁻¹)	Desvio padrão (±)
Raízes laranja pêra	8142,8	147,9
Raízes limão cravo	12709,9	415,4
Raízes enxerto controle	9226,8	135,1
Raízes enxerto com sintomas	13321,9	592,8
Raízes enxerto sem sintomas	12070,5	495,9

Tabela 5.9. Concentração de seselina nas raízes de *citrus*.

Amostra	Matéria seca de planta (mg Kg⁻¹)	Desvio padrão (±)
Raízes laranja pêra	18052,0	920,4
Raízes limão cravo	8047,7	452,7
Raízes enxerto controle	4972,7	115,2
Raízes enxerto com sintomas	4681,1	230,6
Raízes enxerto sem sintomas	3442,9	111,6

A Figura 5.48 mostra a correlação entre ambas as cumarinas nas raízes das matrizes dos citros estudados.

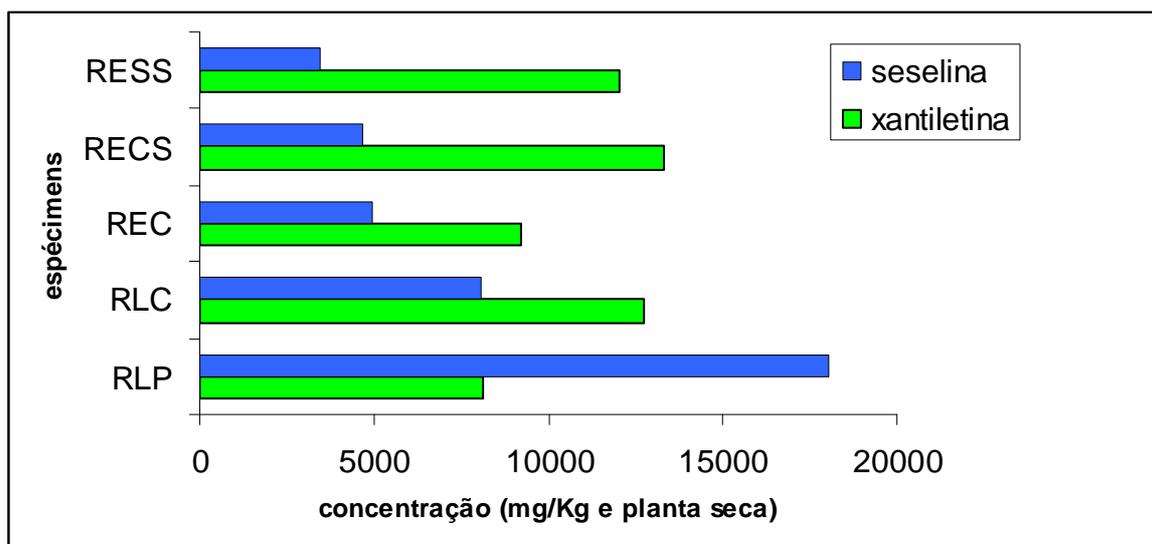


Figura 5.48. Concentração das cumarinas xantiletina e seselina nas raízes dos citros estudados. Matrizes de raízes de: laranja pêra (RLP), limão cravo (RLC), enxerto de Cs-Cl sem inoculação da bactéria (REC), enxerto de Cs-Cl onde a bactéria foi inoculada, mas não apresentaram sintomas (RESS) e enxerto de Cs-Cl com sintomas de CVC (RECS).

Analisando os dados obtidos verifica-se que a concentração da seselina nas raízes da laranja pêra é 2,2 (18052,0/8142,8) vezes maiores que aquela encontrada para a xantiletina. A concentração da seselina é 3,6 vezes menor na raiz do enxerto sem inoculação da bactéria (REC) que aquela da raiz da laranja pêra como pé-franco. Contudo, a concentração da xantiletina na planta padrão REC é menor em 1,37 vezes que aquela das raízes do limão cravo e maior em 1,13 vezes que aquela da laranja pêra. Estes dados indicam o que era esperado pelas definições de enxertia, em que a planta mantém as características das plantas de origem, com pequenas variações. Ou seja, as raízes do enxerto de Cs-Cl assemelham-se mais àsquelas do limão cravo de origem e não àsquelas da laranja pêra que origina a copa da planta.

Comparando os dados referentes aos enxertos sadios e com CVC verifica-se que a concentração da seselina diminui cerca 1,06 (4972,7/4681,1) vezes nas raízes do enxerto com sintoma (RECS) e de 1,44 (4972,7/3442,9)

vezes naquelas onde a bactéria foi inoculada, mas não apresentaram sintomas (RESS), quando comparado ao controle (enxerto de Cs-Cl sem inoculação da bactéria, REC). A concentração da xantiletina ao contrario aumenta nestas mesmas matrizes numa relação de 1,44 (9226,8/13321,9) e 0,76 (9226,8/12070,5), respectivamente. A concentração da xantiletina nas raízes do enxerto com sintoma (RECS) é um pouco maior (1,04 vezes) que àquela das raízes do limão cravo (RLC), o qual é resistente a *X. fastidiosa*. Estes resultados sugerem que os enxertos de Cs-Cl na presença da bactéria inibem a biossíntese da cumarina angular seselina, desviando a prenilação da umbeliferona para o carbono C-6, para posteriormente levar à xantiletina em um percentual maior.

Compostos préformados, presentes em plantas sadias que podem representar uma barreira química às infecções por patógenos em potencial, são chamados de compostos antimicrobianos préformados ou fitoantecipinas. Por outro lado, os compostos sintetizados em resposta ao ataque de patógenos ou estresse, como parte da resposta de defesa da planta, são chamados fitoalexinas (OSBOURN, 1999). Compostos antimicrobianos pré-formados ficam retidos dentro das células vegetais como constituintes biologicamente ativos, ou como precursores inativos os quais podem ser prontamente ativados em resposta ao ataque do patógeno (OSBOURN, 1999).

A *Xylella fastidiosa* limita-se ao xilema das plantas afetadas, estando presente em todas as partes da planta em que exista tal tipo de estrutura. O conjunto de vasos xilema-floema, também chamados tecidos ou feixes vasculares, forma um sistema vascular contínuo que percorre a planta inteira, incluindo folhas, ramos, caule, tronco, raízes, flores, frutos e sementes. Com isto, esta bactéria vem sendo encontrada em todos estes órgãos (PRIA JÚNIOR et. al., 2003).

Os enxertos de Cs-Cl com sintomas de CVC (RECS) e aqueles onde a bactéria foi inoculada, mas não apresentaram sintomas (RESS) possuem a habilidade de acumularem xantiletina nas raízes, a qual poderia

potencialmente reduzir o desenvolvimento da bactéria, ou seja, estarem agindo como fitoantecipina, pois segundo as informações acima a *X. fastidiosa* também se desenvolvem nas raízes.

5.5 Quantificação das cumarinas preniladas xantiletina e seselina nas folhas e caules dos citros estudados

O método validado via HPLC discutido no item acima não foi eficiente na quantificação de seselina e xantiletina nas partes superiores dos citros estudados, principalmente nas folhas, onde a concentração de ambas é muito baixa e tem-se uma grande quantidade de interferentes. Partiu-se então para a análise das mesmas utilizando a técnica de espectrometria de massas no modo denominado de SRM (Selected Reaction Monitoring). Esse modo envolve o monitoramento de uma ou mais transições específicas em uma dada condição e os efeitos de interferentes são quase totalmente minimizados, ou eliminados, a não ser que haja um metabólito que possua a mesma transição no mesmo tempo de retenção. As análises de quantificação foram feitas utilizando APCI no modo positivo de ionização (Atmospheric Pressure Chemical Ionization).

Os extratos foram analisados por LC-MS/MS e os parâmetros de separação cromatográfica foram ajustados para o espectrômetro de massas “Micromass Quattro LC”, acoplado ao sistema de dados “Masslynx” (v4.1). A ionização por APCI no modo positivo AP⁺, e os demais parâmetros podem ser observados na Tabela 5.10 abaixo:

Tabela 5.10. Parâmetros utilizados no LC-MS\MS.

Parâmetros LC/MS/MS					
T (min)	Eluição isocrática			Potencial do capilar	3,53kV
	H ₂ O 0,1% TFA	MeOH 0,1%TFA	i-PropOH 0,1%TFA	Potencial do cone	41V
0	62	35,0	3,0	Potencial cone extrator	41V
10	62	35,0	3,0	Potencial lentes RF	0,71V
10,1	End			Temperatura do probe	350°C
				Temperatura do bloco da fonte	45°C
				Pressão do gás de colisão	1,7.10 ⁻⁵ mbar
				Pressão do vácuo	9,9.10 ⁻⁴ mbar
				Fluxo do gás de dessolvatação (N ₂)	741L/h
				Energia de colisão	25,0 eV
				Temperatura da coluna	33 °C

TFA: ácido trifluoracético; i-PropOH: álcool isopropanol;

Na quantificação utilizou-se uma coluna X-terra Waters MS C18 3.5 micra 3.0 x 30 mm, aumentando a resolução e a separação cromatográfica. Os compostos em estudo são isômeros quanto à posição do anel pirano, contudo nas condições do experimento elas possuem caminhos de fragmentação distintos (Figuras 5.53 e 5.54). As transições definidas para o experimento de SRM foram baseadas nos espectros de íons fragmentados destes compostos (figuras 5.49 a 5.52), onde se selecionou as seguintes transições: xantiletina m/z 229 → 213 (dwell time 0,30 s) e seselina 229 → 175 (dwell time 0,30s).

O tempo de monitoramento foi de 10 minutos para cada substância, sendo necessário realizar duas corridas para a análise destas cumarinas em cada extrato. O tempo de retenção médio da xantiletina foi de 3,90 minutos e da seselina de 4,15 minutos.

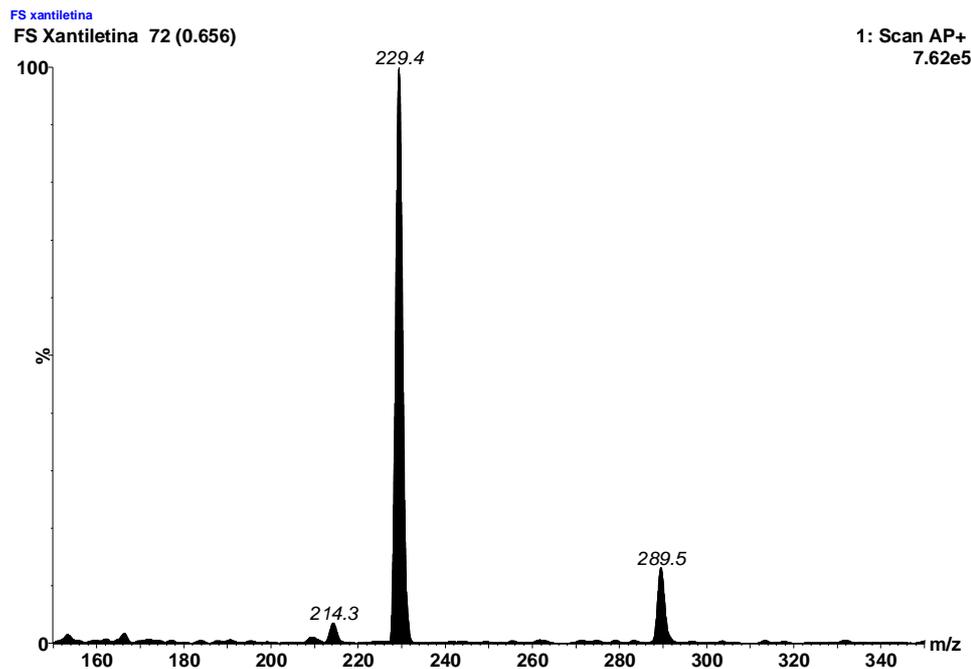


Figura 5.49. Espectro de massas (*full scan*) para a cumarina xantiletina no modo positivo de ionização AP+.

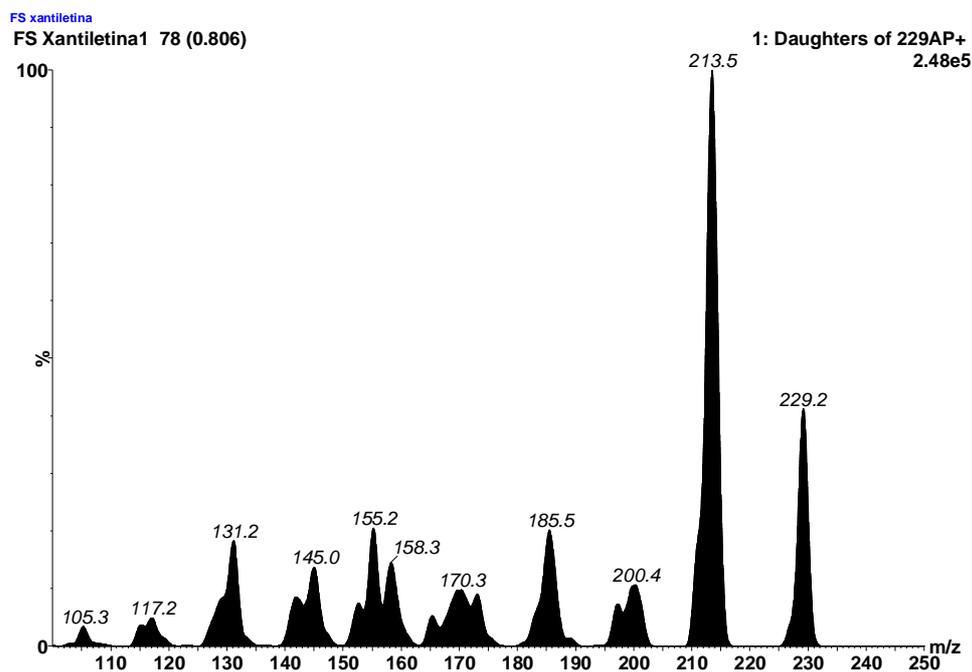


Figura 5.50. Espectro de íons produtos para a cumarina xantiletina no modo positivo de ionização AP+, energia de colisão de 25 eV, mostrando a transição mais estável $m/z\ 229 \rightarrow 213$, na forma de $[M+H]^+$.

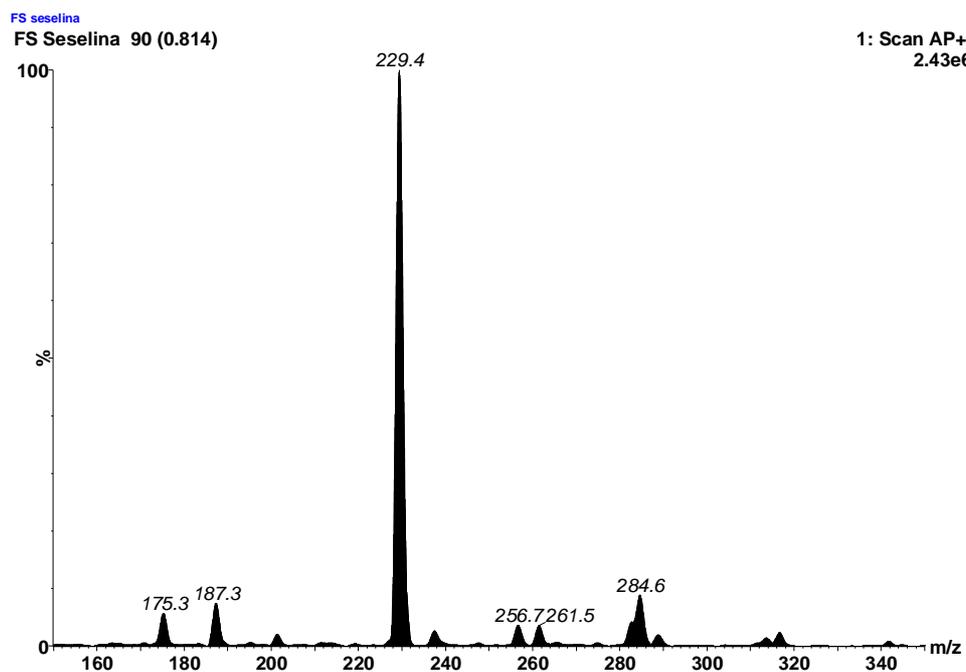


Figura 5.51. Espectro de massas (*full scan*) para a cumarina seselina no modo positivo de ionização AP+.

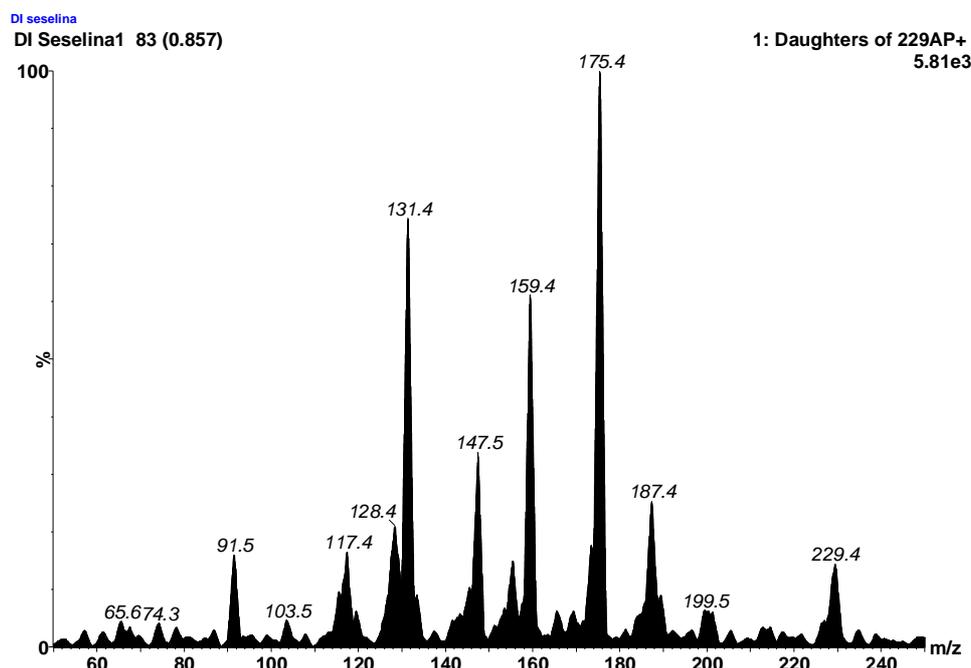


Figura 5.52. Espectro de íons produtos para a cumarina seselina no modo positivo de ionização AP+, energia de colisão de 25 eV, mostrando a transição mais estável $m/z\ 229 \rightarrow 175$ na forma de $[M+H]^+$.

As propostas de fragmentações para a transição 229→213 referente á xantiletina e para a transição 229→175 referente à seselina encontram-se abaixo Figuras 5.53 e 5.54.

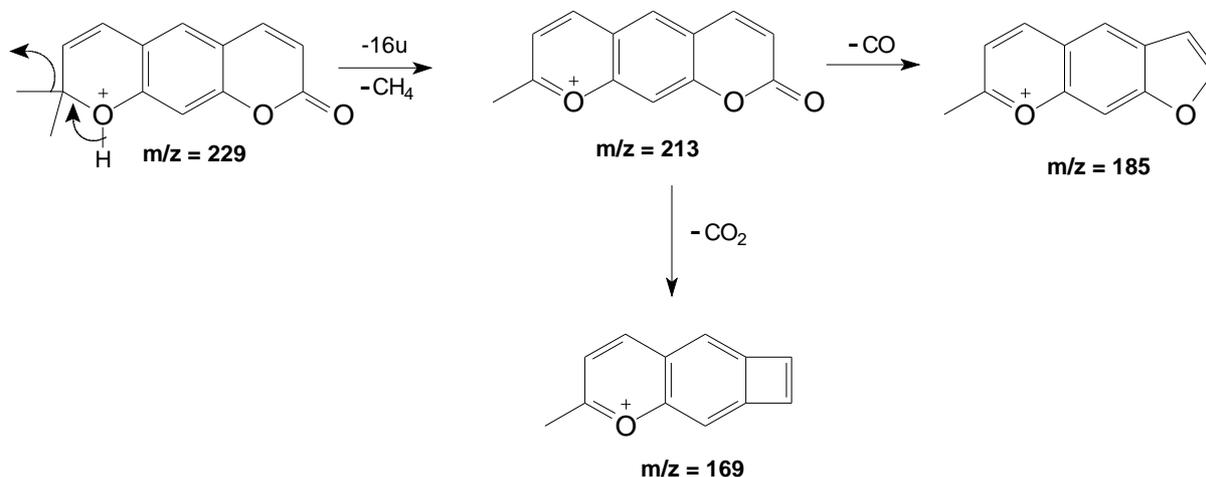


Figura 5.53. Proposta de fragmentação para a xantiletina no modo positivo AP+.

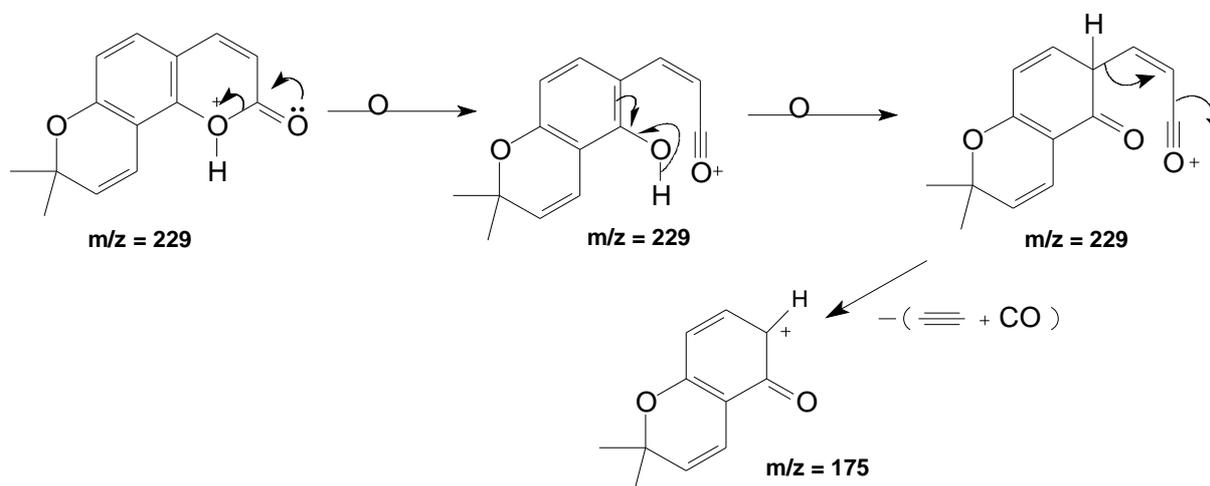


Figura 5.54. Proposta de fragmentação para a seselina no modo positivo AP+.

Para a quantificação das cumarinas nas partes superiores dos citros estudados não se utilizou todas as figuras de mérito para a validação do método. Utilizou-se a curva de calibração por padronização externa em triplicata e em seis concentrações diferentes: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10 ug/mL tanto para a xantiletina quanto para a seselina. As Figuras 5.55 e 5.56 mostram a menor e a maior concentração das curvas para a xantiletina e seselina respectivamente.

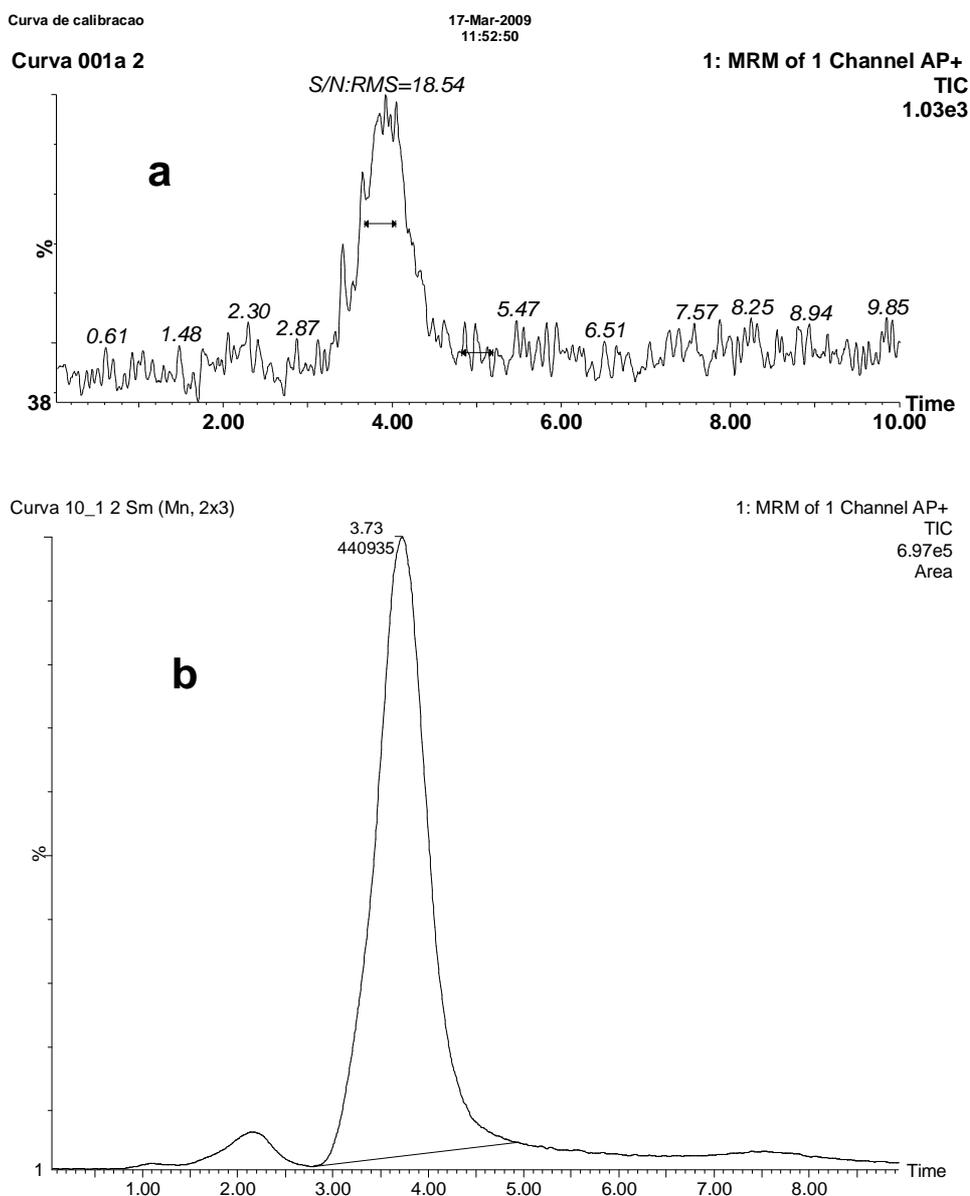


Figura 5.55. Cromatograma de SRM para as concentrações 0,01 (a) e 10 ug/mL (b) da cumarina xantiletina.

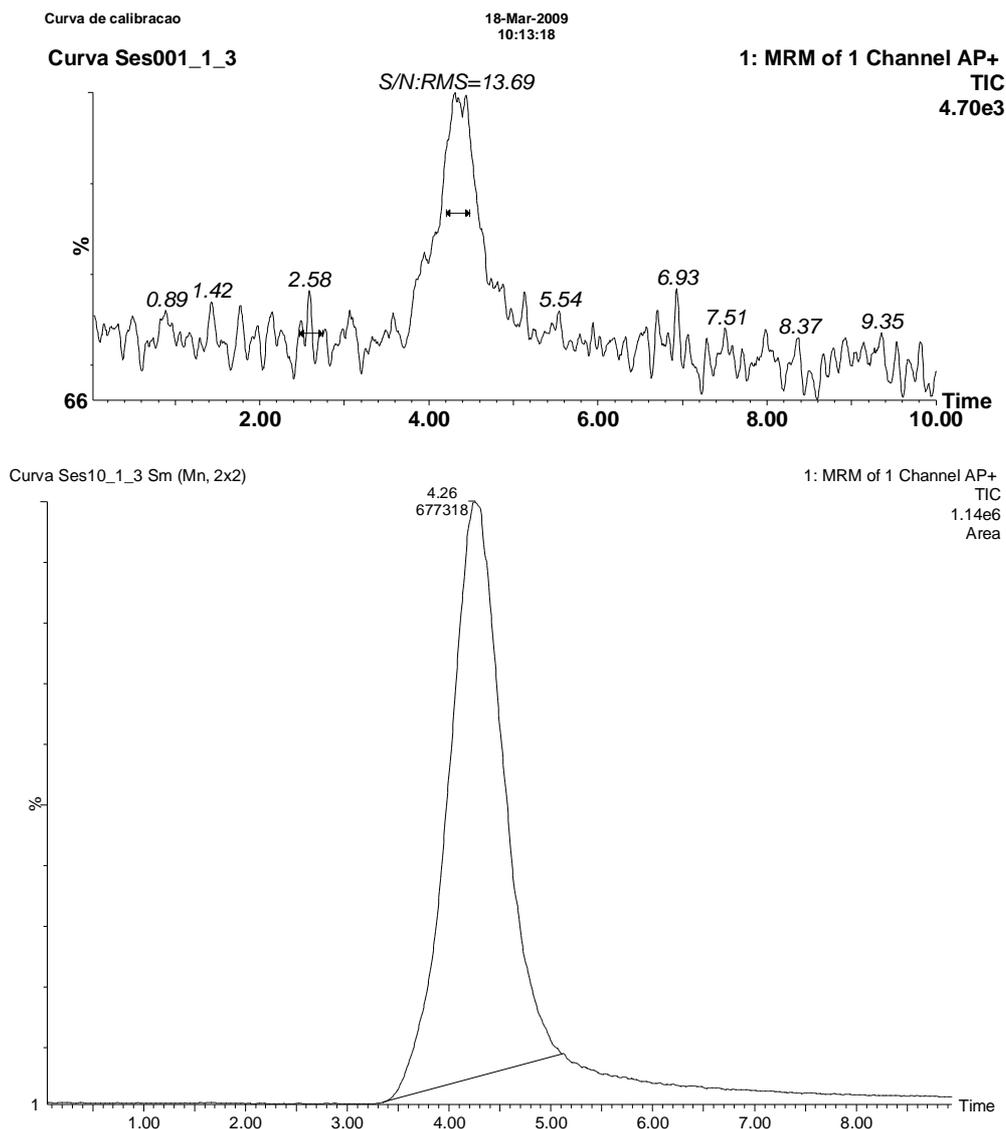


Figura 5.56. Cromatograma de SRM para as concentrações 0,01 (a) e 10 ug/mL (b) da cumarina seselina.

Pode-se observar que se escolheu como o limite de quantificação uma concentração que apresentava entre 10 e 20 vezes a relação sinal ruído.

Já nas Figuras 5.57 e 5.58 são apresentadas as curvas de calibração por padronização externa utilizadas para quantificar as cumarinas nas partes superiores dos citros estudados.

Compound name: Xantiletina
Correlation coefficient: $r = 0.999876$, $r^2 = 0.999753$
Calibration curve: $43926.3 * x + -208.451$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

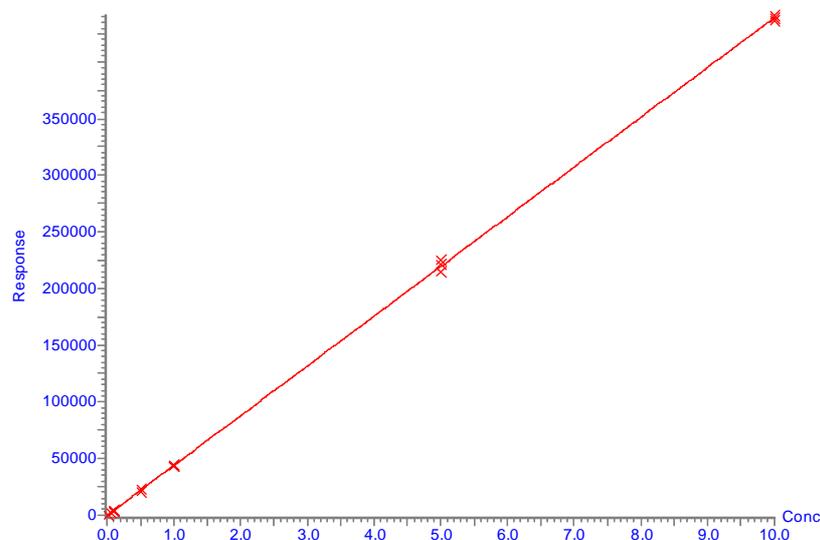


Figura 5.57. Curva de calibração por padronização externa para o método de quantificação da cumarina xantiletina nas folhas e caules dos citros estudados.

Compound name: Seselina
Correlation coefficient: $r = 0.999919$, $r^2 = 0.999839$
Calibration curve: $75254 * x + -164.645$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

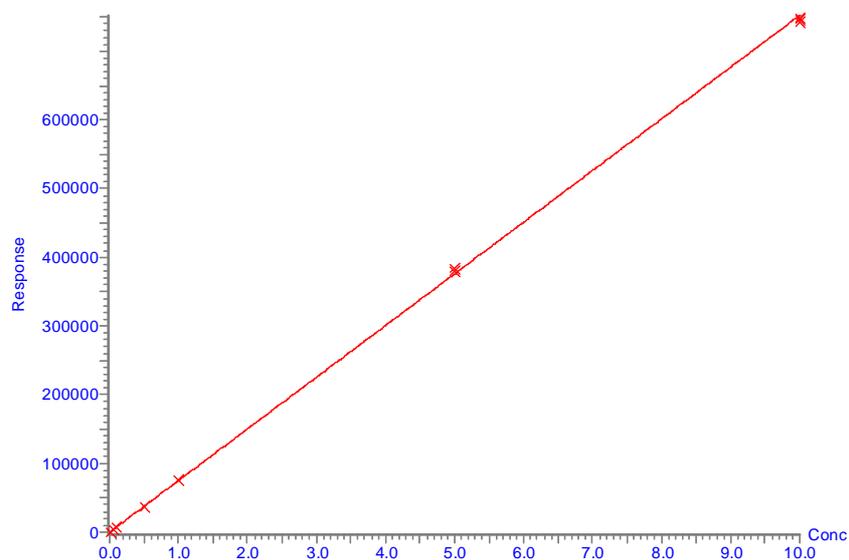


Figura 5.58. Curva de calibração por padronização externa para o método de quantificação da cumarina seselina nas folhas e caules dos citros estudados.

As curvas foram construídas a partir dos valores de áreas gerados pela integração das bandas referentes às cumarinas xantiletina e seselina. A linearidade da curva referente à xantiletina foi de $r^2 = 0,9997$ e da seselina foi de $r^2 = 0,9998$.

Para se avaliar a precisão e a exatidão do método foram preparadas amostras em três diferentes concentrações, as quais foram denominadas de controle de qualidade. Foram elas: concentrações baixas: 0,012 $\mu\text{g/mL}$, média: 4,5 $\mu\text{g/mL}$ e alta: 8,0 $\mu\text{g/mL}$, tanto para a xantiletina quanto para a seselina respectivamente, em quintuplicata. A precisão do método foi determinada calculando-se o desvio padrão relativo entre as áreas obtidas para as replicatas analisadas e a exatidão foi determinada pelo desvio da concentração média experimental em relação à concentração teórica, em valores percentuais. A precisão do método para a xantiletina variou de 1,2 a 4,4% e para a seselina de 4,0 a 11,2 %. Já a exatidão variou de 88,6 a 93,3% para a xantiletina e para a seselina de 94,8 a 108,9%, mostrando assim que os valores são aceitos para os limites aceitáveis pela norma da ANVISA. As Tabelas 5.11 e 5.12 apresentam os valores da precisão e da exatidão para o método de quantificação das cumarinas xantiletina e seselina em raízes dos citros estudados.

Tabela 5.11. Valores percentuais de precisão e exatidão, do método de quantificação da cumarina xantiletina.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(n=5)	
	CV	Exatidão
0,012	4,4	103,3
4,5	1,2	101,5
8,0	1,8	102,7

Tabela 5.12. Valores percentuais de precisão e exatidão, do método de quantificação da cumarina seselina.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(n=5)	
	CV	Exatidão (%)
0,012	4,0	93,3
4,5	8,9	91,8
8,0	11,2	88,6

A análise da recuperação e ou eficiência de extração se deu adicionando aos extratos das folhas e caules de laranja pêra concentrações de 0,5; 1,0 e 3,0 $\mu\text{g/mL}$ da xantiletina e seselina. As concentrações médias de leitura, sem considerar os fatores de diluição e utilizando a curva de padronização externa foram:

- Xantiletina:

folhas de laranja pêra: 0,1 $\mu\text{g/mL}$

caules de laranja pêra: 5,80 $\mu\text{g/mL}$

- Seselina:

folhas de laranja pêra: 0,12 $\mu\text{g/mL}$

caules de laranja pêra: 0,17 $\mu\text{g/mL}$

Logo, ao se adicionar as cumarinas nas concentrações citadas acima era de se esperar, após a extração das mesmas as seguintes concentrações:

- Xantiletina:

folhas de laranja pêra: 0,6; 1,1 e 3,1 $\mu\text{g/mL}$

caules laranja pêra: 5,9; 6,8 e 8,8 $\mu\text{g/mL}$

- Seselina:

folhas de laranja pêra: 0,62; 1,12 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$

caules laranja pêra: 0,67; 1,17 e 3,17 $\mu\text{g/mL}$

As concentrações médias obtidas/extraídas foram:

- Xantiletina:

folhas de laranja pêra: 0,64; 1,38 e 3,8 $\mu\text{g/mL}$

caules laranja pêra: 5,93; 6,89 e 8,79 $\mu\text{g/mL}$

-Seselina:

folhas de laranja pêra: 0,64; 1,12 e 3,17 $\mu\text{g/mL}$

caules laranja pêra: 0,77; 1,24 e 3,35 $\mu\text{g/mL}$

Logo, dividindo-se o valor médio da concentração obtida pelo valor médio da concentração esperada tem-se a porcentagem de extração e conseqüentemente a eficiência média de extração das cumarinas nas folhas e caules dos citros estudados. O valor de recuperação médio está discriminado na Tabela 5.13.

Tabela 5.13. Recuperação/eficiência de extração dos metabólitos quantificados nas folhas e caules de *citrus*.

Controles de qualidade Adicionados	Xantiletina		Seselina	
	Recuperação (%) n=3		Recuperação (%) n=3	
	FLP	CLP	FLP	CLP
CQB (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	106	100	103	114
CQM (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	125	101	100	105
CQA (3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	112	98	101	105

Estes dados mostram que o método é bem eficiente ao considerar os valores médios de extração; obteve-se um erro sistemático a mais do esperado apenas na “dopagem” das folhas com a xantiletina na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, contudo bem aceito nas demais análises.

Após a construção da curva de calibração e análise das recuperações, exatidão e precisão, as duas cumarinas foram quantificadas nas folhas e caules dos citros estudados. Para isso preparou-se em triplicata as matrizes e foram aplicados os valores das áreas encontradas na equação correspondente a cada curva de calibração por padronização externa.

As Tabelas 5.14 e 5.15 mostram as médias das concentrações das amostras matrizes das folhas, caules inferiores e superiores, juntamente com o desvio padrão para a xantiletina e seselina respectivamente.

Tabela 5.14. Concentração da cumarina xantiletina nas matrizes de folhas e caules dos citros estudados.

Amostra	mg/Kg de planta seca	Desvio padrão (\pm)
Folhas laranja pêra	10,45	0,43
Folhas limão cravo	11,16	1,52
Folhas enxerto controle	56,93	2,10
Folhas enxerto com sintomas	11,38	0,49
Folhas enxerto sem sintomas	66,61	3,01
Caule superior enxerto controle	23,27	1,38
Caule superior enxerto com sintomas de CVC	24,66	0,64
Caule superior enxerto sem sintomas de CVC	23,56	1,62
Caule laranja pêra	654,25	10,53
Caule limão cravo	684,04	9,96
Caule inferior enxerto controle	182,89	51,21
Caule inferior enxerto com sintomas de CVC	245,59	5,29
Caule inferior enxerto sem sintomas de CVC	192,16	5,07

Tabela 5.15. Concentração da cumarina seselina nas matrizes de folhas e caules dos citros estudados.

Amostra	mg/Kg de planta seca	Desvio padrão (\pm)
Folhas laranja pêra	13,99	1,92
Folhas limão cravo	3,83	0,52
Folhas enxerto controle	21,2	3,20
Folhas enxerto com sintomas	3,4	0,58
Folhas enxerto sem sintomas	12,2	0,45
Caule superior enxerto controle	9,1	0,72
Caule superior enxerto com sintomas de CVC	10,4	0,76
Caule superior enxerto sem sintomas de CVC	8,3	0,40
Caule laranja pêra	20,5	0,18
Caule limão cravo	46,7	2,95
Caule inferior enxerto controle	10,2	0,09
Caule inferior enxerto com sintomas de CVC	10,8	0,30
Caule inferior enxerto sem sintomas de CVC	7,5	0,30

A Figura 5.59 correlaciona as concentrações encontradas para ambas as cumarinas nas folhas e a Figura 5.60 mostra as mesmas correlações nos caules das matrizes dos citros estudados.

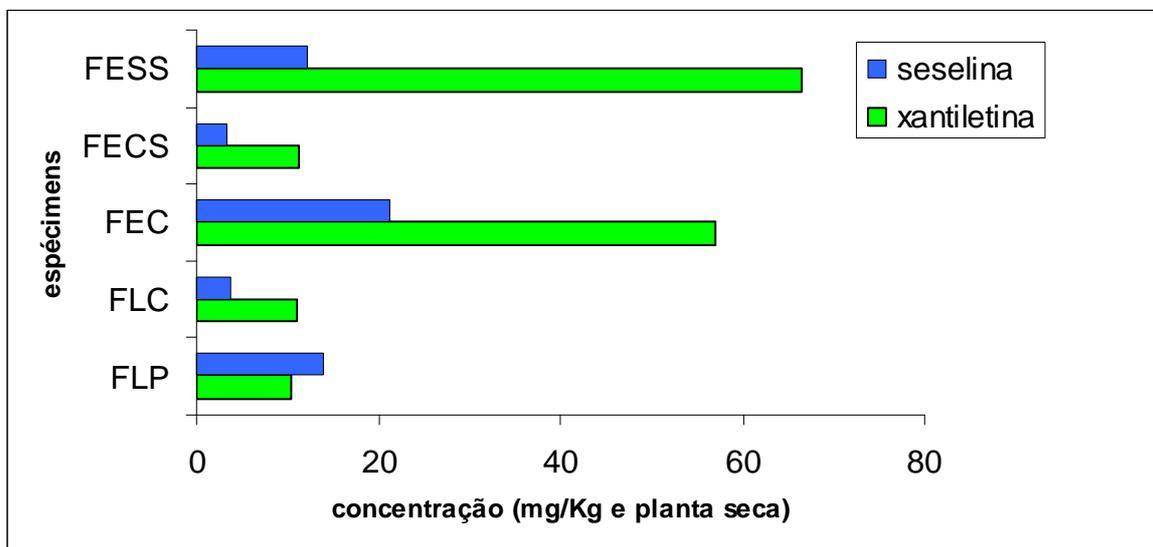


Figura 5.59. Concentração das cumarinas xantiletina e seselina nas folhas dos citros estudados.

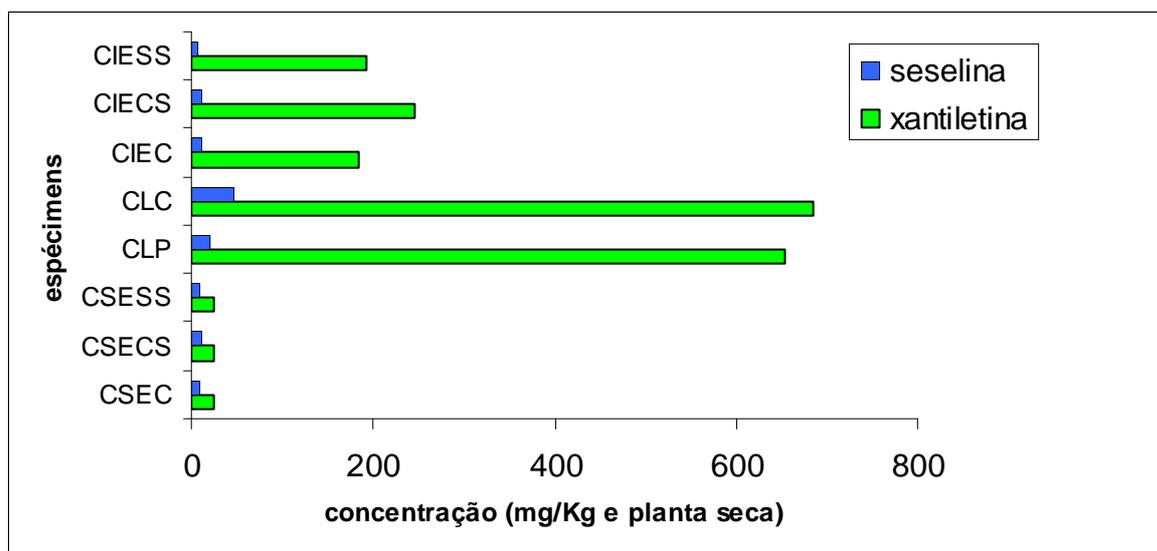


Figura 5.60. Concentração das cumarinas xantiletina e seselina nos caules dos citros estudados.

Analisando tanto a Tabela 5.14 quanto a Figura 5.59, verifica-se que a concentração da seselina é maior nas folhas da laranja pêra em comparação com as folhas do limão cravo. Ao contrário, a concentração da xantiletina tanto nas folhas do limão cravo quanto nas folhas da laranja pêra é similar. Quando há a enxertia de laranja pêra sobre o limão cravo a concentração dessas duas cumarina aumentam, porém a da xantiletina cresce em 5,10 vezes àquela do limão cravo, sugerindo que a planta responde à enxertia interferindo na biossíntese da xantiletina. Este dado leva a hipótese de que esta reação seria uma resposta adaptativa da laranja pêra a um novo ambiente, ou seja, vivendo sobre o limão cravo e não diretamente ao solo.

A concentração da seselina diminui nas folhas do enxerto sem sintomas (FESS) enquanto a xantiletina aumenta um pouco quando comparado com os dados do enxerto sem inoculação da bactéria (FEC). O mais interessante é a diminuição da concentração da xantiletina no enxerto com sintomas (FECS), a qual é 5,00 vezes menor que aquela do padrão FEC. Comparando a concentração da seselina e xantiletina nas folhas (13,99 – 12,20 mg/kg, respectivamente) com aquelas encontradas nas raízes (3442,9 – 18052,0 mg/kg, respectivamente), pode-se dizer que estas cumarinas se acumulam neste último órgão. Nos estudos das raízes o aumento na concentração da xantiletina indicou ser esta uma fitoantecipina na presença da *X. fastidiosa*. A diminuição da concentração desta cumarina em 5,00 vezes nas folhas com sintomas (FECS) em comparação àquela do padrão também pode ser interpretada como uma reação ao patógeno. A sua diminuição pode estar ocorrendo devido à sua necessidade nas raízes com CVC e conseqüentemente sendo translocadas para as folhas em menores concentrações que aquelas nas plantas saudáveis. Portanto, nas folhas mais uma vez a xantiletina se mostra como uma fitoantecipina, porém diminuindo em concentração para agir como potencial inibidor da bactéria nas raízes. Uma segunda hipótese seria que a redução da biossíntese dessas cumarinas nas folhas dar-se-ia devido ao precursor delas, o ácido cinâmico, estar sendo desviado para

a formação de uma segunda fitoantecipina de ação mais foliar, um flavonóide, o qual será discutido mais a frente.

Analisando a Tabela 5.15 e a Figura 5.60, observa-se que nos caules superiores dos enxertos não há variação significativa da concentração das duas cumarinas na presença da bactéria em estudo e nem em relação ao processo de enxertia. Aliás, a concentração destas cumarinas neste órgão é muito pequena quando comparado com os caules inferiores.

A concentração da xantiletina nos caules do limão cravo e da laranja pêra é similar. Quando há a enxertia de laranja pêra sobre o limão cravo a concentração desta cumarina diminui muito tanto no caule superior como no inferior, sugerindo que a planta responde à enxertia interferindo na biossíntese da xantiletina. Este efeito também foi observado nas raízes, mas em uma intensidade menor. O quanto diminui ($684,04 - 182,89 = 501,15$ mg/kg) desta cumarina no caule inferior no enxerto não corresponde ao quanto ela aumenta nas folhas ($10,45 - 56,93 = - 46,48$ mg/kg). Ou seja, parte desprezível estaria sendo translocada para as folhas. O caule inferior do enxerto corresponde ao mesmo do limão cravo de origem, não havendo incompatibilidade física para a translocação da xantiletina das raízes para o caule inferior. Isto sugere a inibição de translocação ou da biossíntese desta cumarina como uma resposta ao implante da laranja pêra sobre este caule. O caule superior é de origem da laranja pêra, e neste caso a hipótese de incompatibilidade física entre o sistema de translocação da xantiletina das raízes a esta região seria mais aceito para explicar a menor concentração desta cumarina nesta parte do enxerto.

A concentração da seselina é muito pequena no caule inferior do enxerto sadio e não varia com a bactéria em seu interior. A xantiletina também não varia muito nestas matrizes, sendo um pouco maior naquela com sintoma de CVC (CIECS). A pequena variação nas concentrações da seselina e xantiletina nos caules superiores e inferiores nas plantas sadias e com sintoma de CVC sugere que nestes órgãos elas não servem como sinalizadoras da doença.

5.6 Quantificação dos flavonóides hesperidina e rutina nas folhas e caules dos citros estudados

Os flavonóides hesperidina e rutina também são bastante comuns na família Rutaceae e estão presentes nos frutos, casca dos frutos, folhas e caules de citros (Figura 5.61). HARBONE e WILLIANS (2000) em uma revisão sobre flavonóides relatam uma série de atividades biológicas para esta classe, e em algumas incluem a hesperidina e rutina. Dentre elas destacam-se as analgésicas, inibidoras de crescimentos larvais e pupais, redutores de edemas em patas de ratos, anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, esta última aumenta a resistência e a sobrevivência das plantas, dentre várias outras.

Na indústria de sucos, a hesperidina é um subproduto da chamada polpa cítrica peletizada, a qual vem sendo estudada como substituta de alimentos concentrados e na dieta de aves, eqüinos, suínos e bovinos. A hesperidina encontra-se numa proporção de mais ou menos 2% de peso em relação à polpa cítrica (BATISTA et al, 2009).

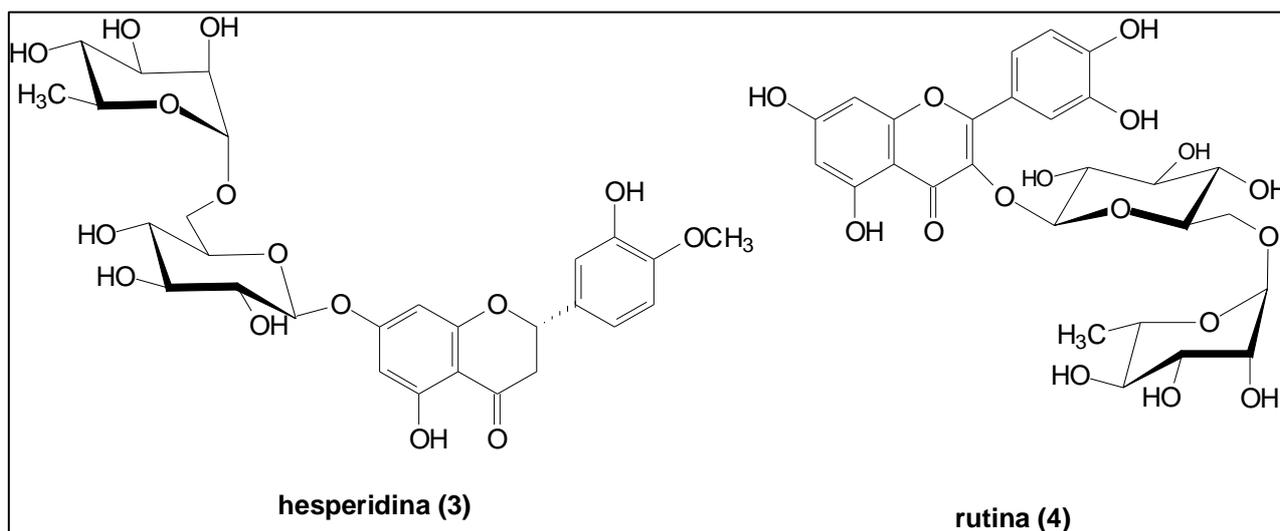


Figura 5.61. Estruturas moleculares dos flavonóides hesperidina (3) e rutina (4).

GOTTARDI *et al.* (2004) relatam a presença de cristais no lúmen de alguns vasos xilemáticos em plantas com sintomas de CVC, os quais são originários de células do parênquima do xilema, e que possivelmente estes sejam

do flavonóide hesperidina. ABDELNUR (2006) desenvolveu um método de quantificação deste flavonóide avaliando o seu teor em algumas espécies de citros como *Citrus limonia* sem CVC, *C. sinensis* com e sem CVC e *C. reticulata* sem CVC. Como as plantas não possuíam a mesma idade e não houve um controle sobre a inoculação da bactéria, foi necessário desenvolver e validar um segundo método de quantificação deste flavonóide. Sabendo que tem-se um segundo flavonóide comum em citros, a rutina, e que na literatura não há nenhum relato da quantificação dos dois quando se tem a bactéria inoculada em espécies de citros, optou-se por quantificá-los simultaneamente em uma mesma análise.

O método desenvolvido por ABDELNUR (2006) utiliza como fase móvel uma composição de água:metanol:acetonitrila. A literatura mostra que esta fase ternária ou a binária entre água:acetonitrila ou água:metano são comuns em estudos similares. Contudo, ao se repetir o estudo de ABDELNUR (2006) observou-se a co-eluição da hesperidina com um segundo flavonóide, a naringina. Assim, foi necessário desenvolver um segundo método o qual conseguisse a separação entre estes dois flavonóides. Inicialmente tentou-se utilizar H₂O:ACN:Ácido Acético 71:27:2. As Figuras 5.62 à 5.65 mostram que nestas condições ainda há a co-eluição entre a hesperidina e a naringina.

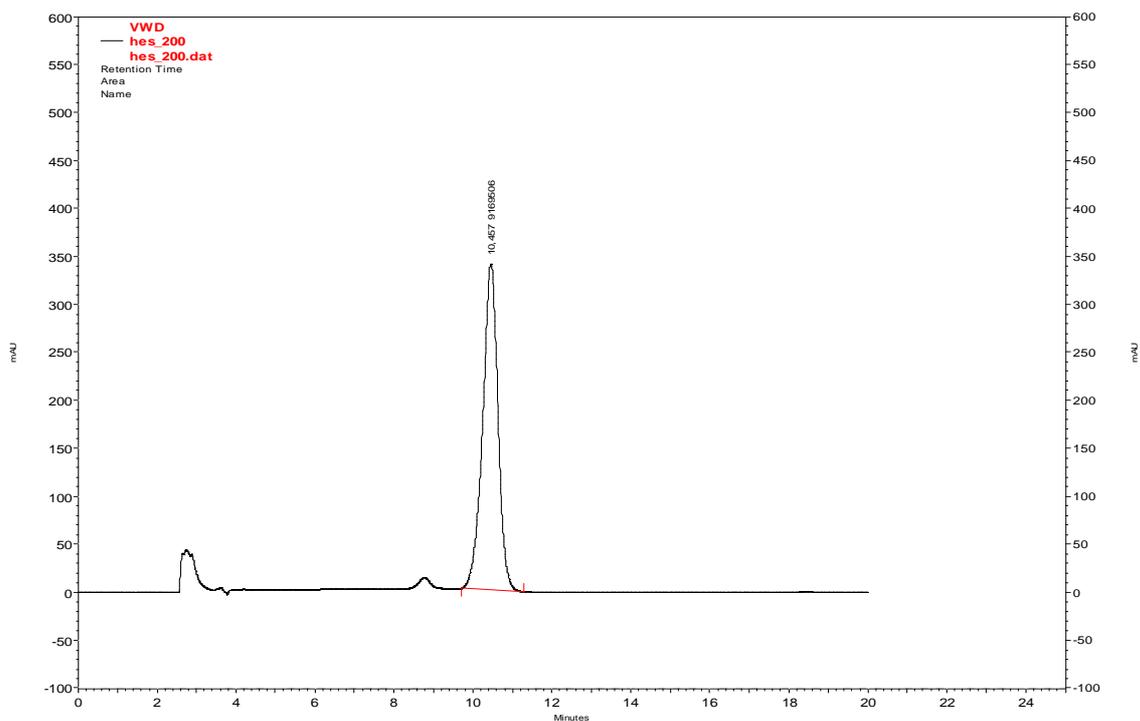


Figura 5.62. Cromatograma do padrão hesperidina concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 µm Fase móvel H₂O:ACN:Ácido Acético 71:27:2 λ =283nm, fluxo 1,0 ml/min.

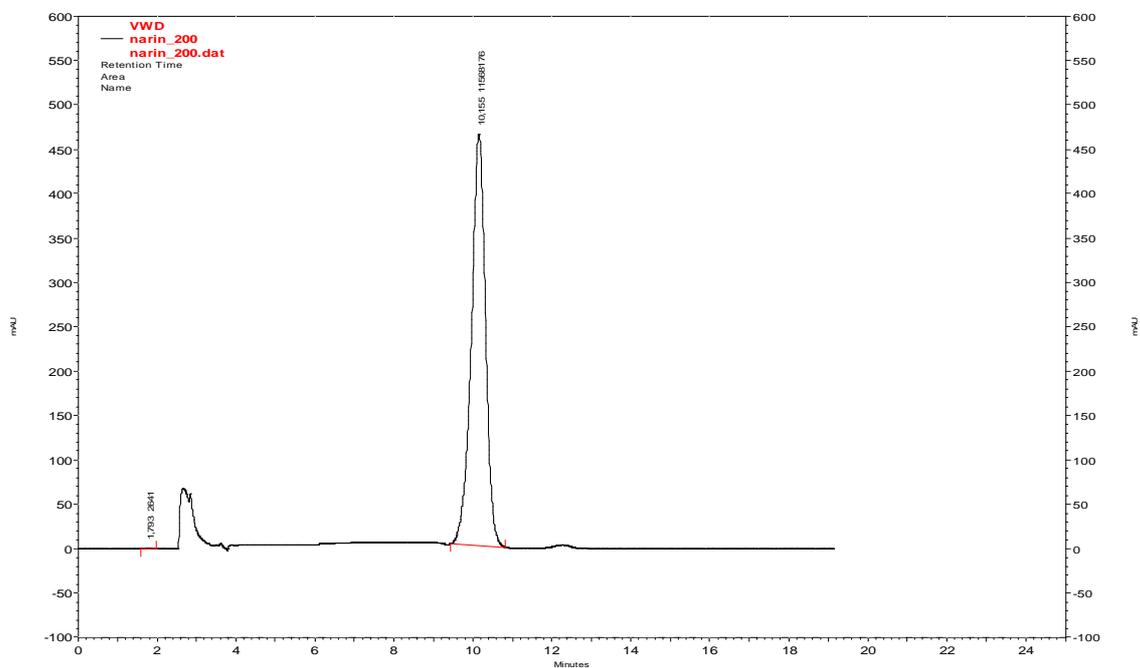


Figura 5.63. Cromatograma do padrão naringina concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 µm Fase móvel H₂O:ACN:Ácido Acético 71:27:2 λ =283nm, fluxo 1,0 ml/min.

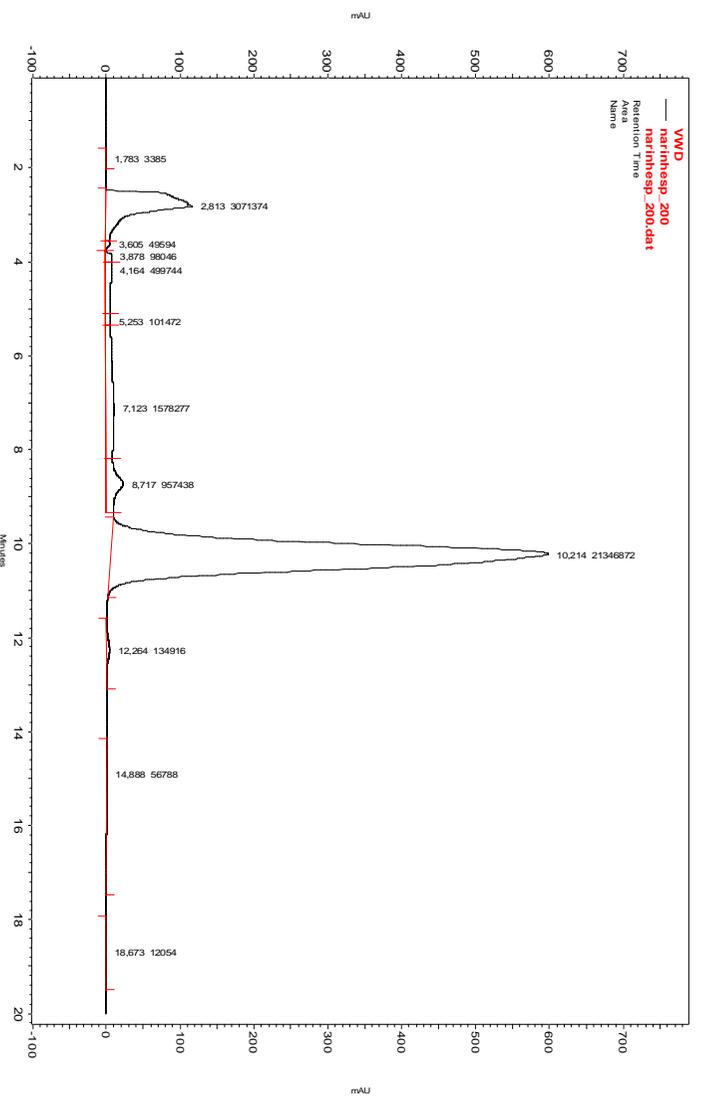


Figura 5.64. Cromatograma da mistura contendo os dois padrões: hesperidina e naringina concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 µm Fase móvel H₂O:ACN:Ácido Acético 71:27:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.

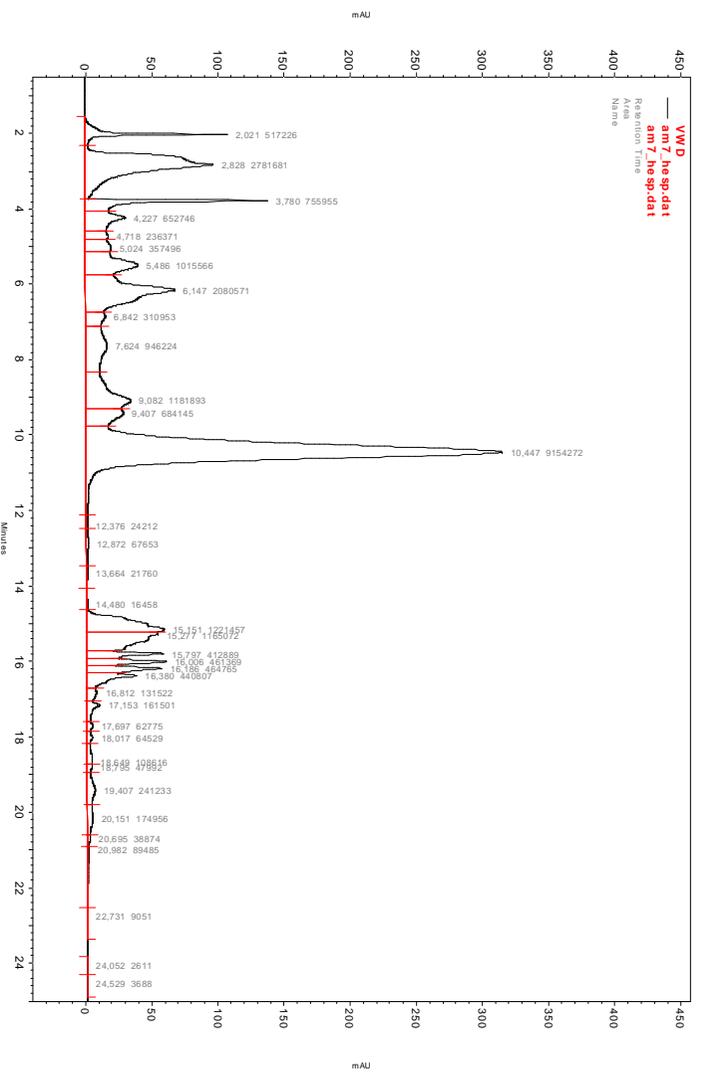


Figura 5.65. Cromatograma de uma amostra das folhas de um dos citros estudados. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 µm Fase móvel H₂O:ACN:Ácido Acético 71:27:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.

A Figura 5.65 mostra que ao se tentar quantificar a hesperidina utilizando as condições citadas acima, haverá a quantificação da hesperidina e da naringina juntas.

RUSSEL *et al.*; (1992) haviam observado a co-eluição de alguns ácidos hidrocínâmicos quando os mesmos estavam sendo quantificados no suco de laranja e propuseram o uso de solventes como o tetraidro furano (THF) para separá-los. DEL RIO *et al.*; (2004), também propuseram o uso de THF na composição da fase móvel para a separação de polimetoxiflavonas nos frutos de *C. sinensis*. Diante disso desenvolveu-se um método analítico que continha como fase móvel o THF em sua composição. Os resultados obtidos foram muito interessantes, pois se obteve uma excelente separação entre as duas substâncias como pode ser observado na Figura 5.66.

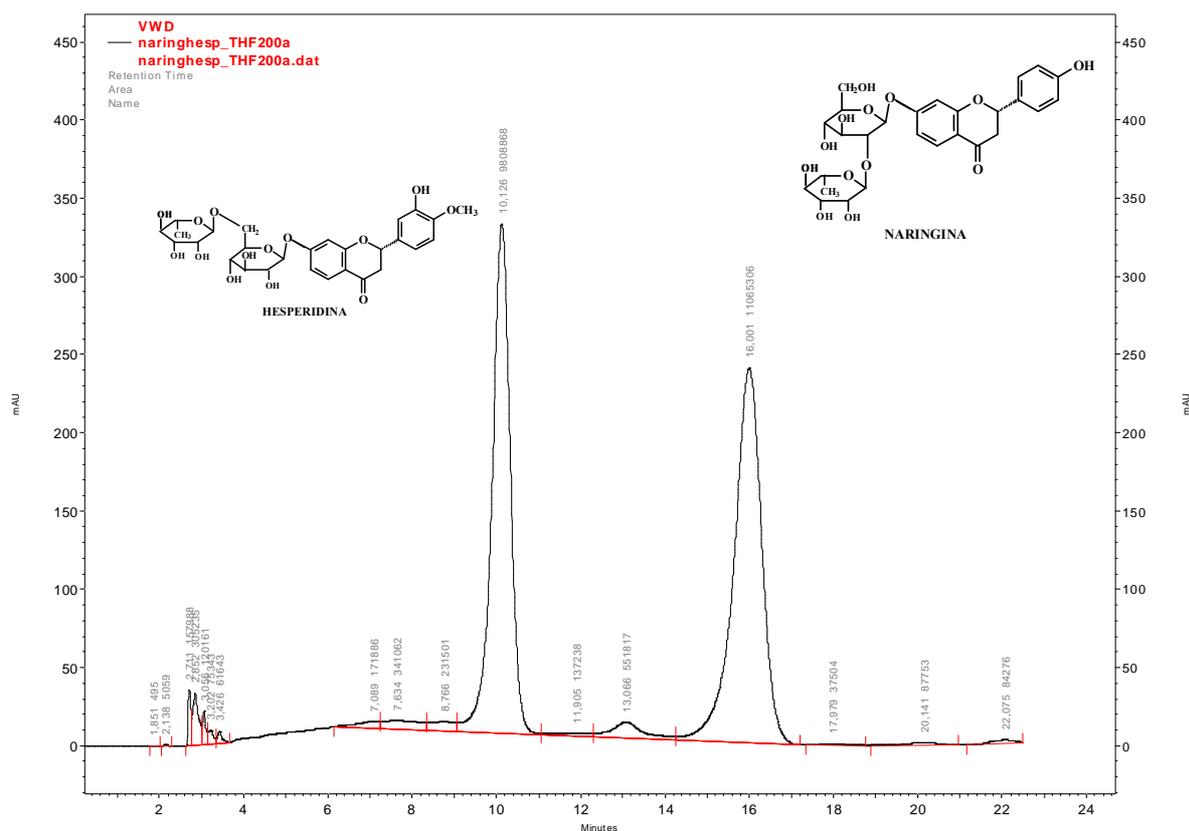


Figura 5.66. Cromatograma da mistura contendo os padrões hesperidina e naringina na concentração 200 µg/ml. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 5x4,6 mm 10 µm Fase móvel H₂O:THF:Acido Acético 77:21:2 λ=283nm, fluxo 1,0 ml/min.

Em seguida, adicionou-se á mistura um terceiro padrão, a rutina, para observar a separação ou não da mesma frente aos outros dois flavonóides, e mais uma vez obteve-se uma excelente separação, como mostra a Figura 5.67.

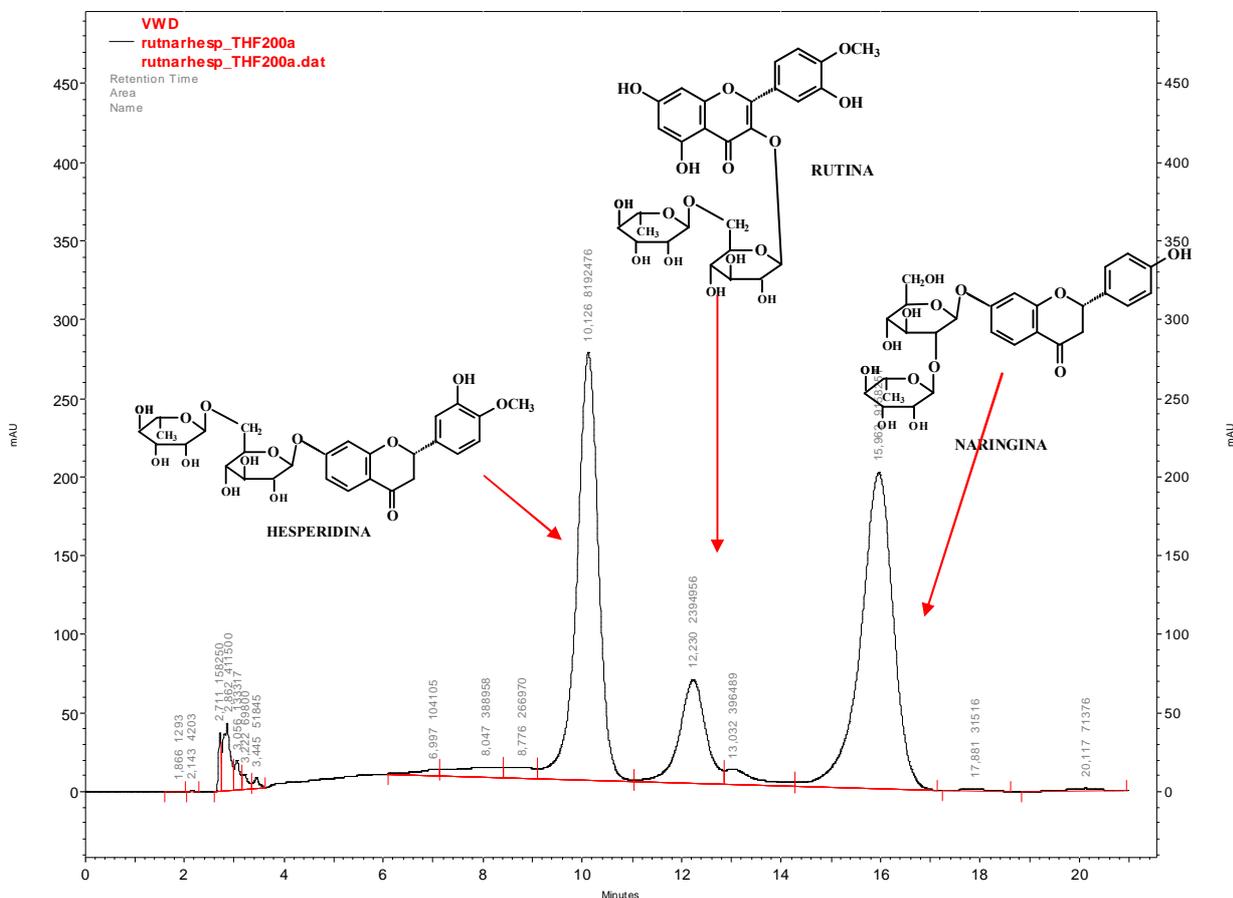


Figura 5.67. Cromatograma da mistura contendo os padrões hesperidina, rutina e naringina na concentração 200 $\mu\text{g/ml}$. Condições analíticas: Coluna Gemini C18 5x4,6 mm 10 μm . Fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{THF}:\text{Acido Acético}$ 77:21:2 $\lambda=283\text{nm}$, fluxo 1,0 ml/min.

Como o THF é um solvente que em percentuais elevados pode danificar o sistema de HPLC, o último passo foi otimizar as condições diminuindo a porcentagem do mesmo na fase móvel. Para isso diminuiu-se a concentração de 21% para 15%, adicionou-se a ACN numa proporção de 5%, substituiu-se o ácido acético que estava numa porcentagem de 2% para o fórmico numa porcentagem de 0,1% e obteve-se a excelente separação (Figura 5.68).

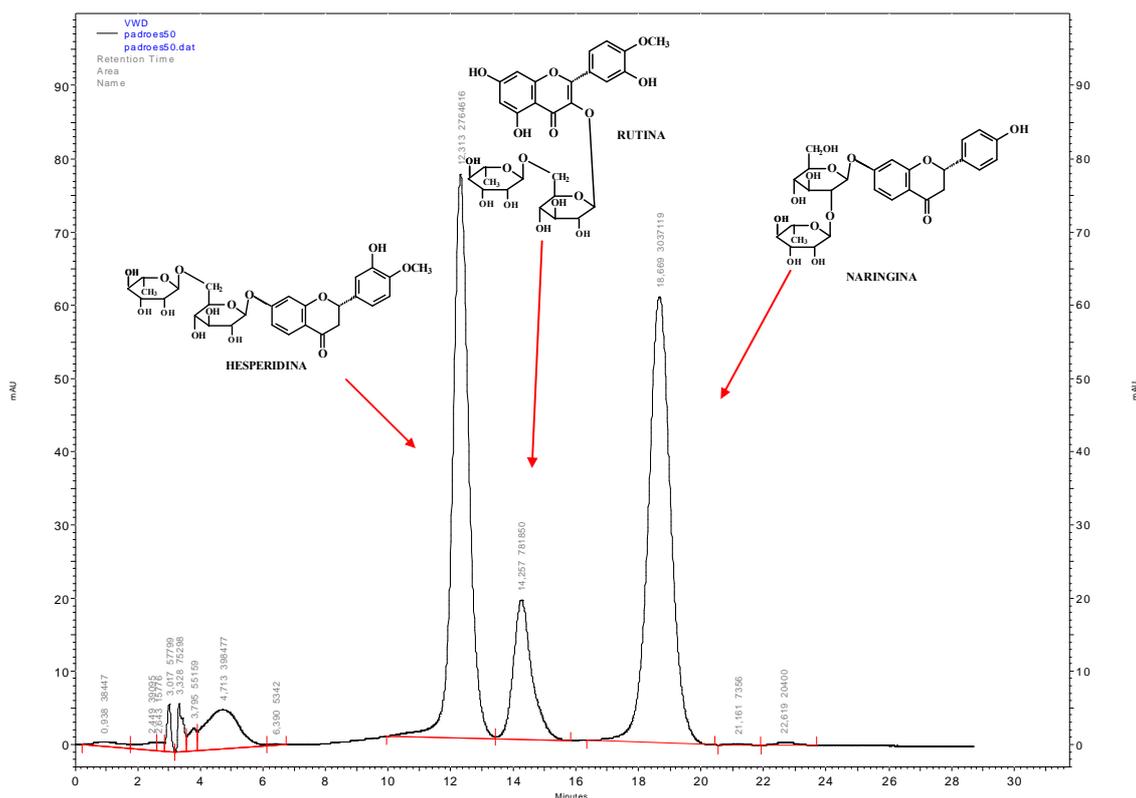


Figura 5.68. Cromatograma da mistura contendo os padrões hesperidina, rutina e naringina (100 $\mu\text{g/ml}$). Condições analíticas: Coluna Gemini C18 25x4,6 mm 10 μm . Fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{THF}:\text{Acido Fórmico}$ 78:6:16:0,1 $\lambda=282\text{nm}$, fluxo 1,0 ml/min.

Finalmente, foram ajustados alguns parâmetros como temperatura do forno, diminuindo-se um pouco mais o tempo de retenção da hesperidina e da rutina e retirou-se a naringina como padrão, pois não se tinha como objetivo a quantificação da mesma neste trabalho.

O método final consistiu na seguinte composição de fase móvel: água:acetonitrila:tetrahydrofurano:ácido fórmico (80:5:15:0,1) e a temperatura do forno 40°C, volume de injeção 20 μL , $\lambda=282\text{nm}$, fluxo 1,0 ml/min (Figura 5.69). A Figura 5.70 refere-se ao cromatograma das folhas do enxerto com sintomas de CVC, mostrando a alta concentração da hesperidina e a baixa concentração da rutina.

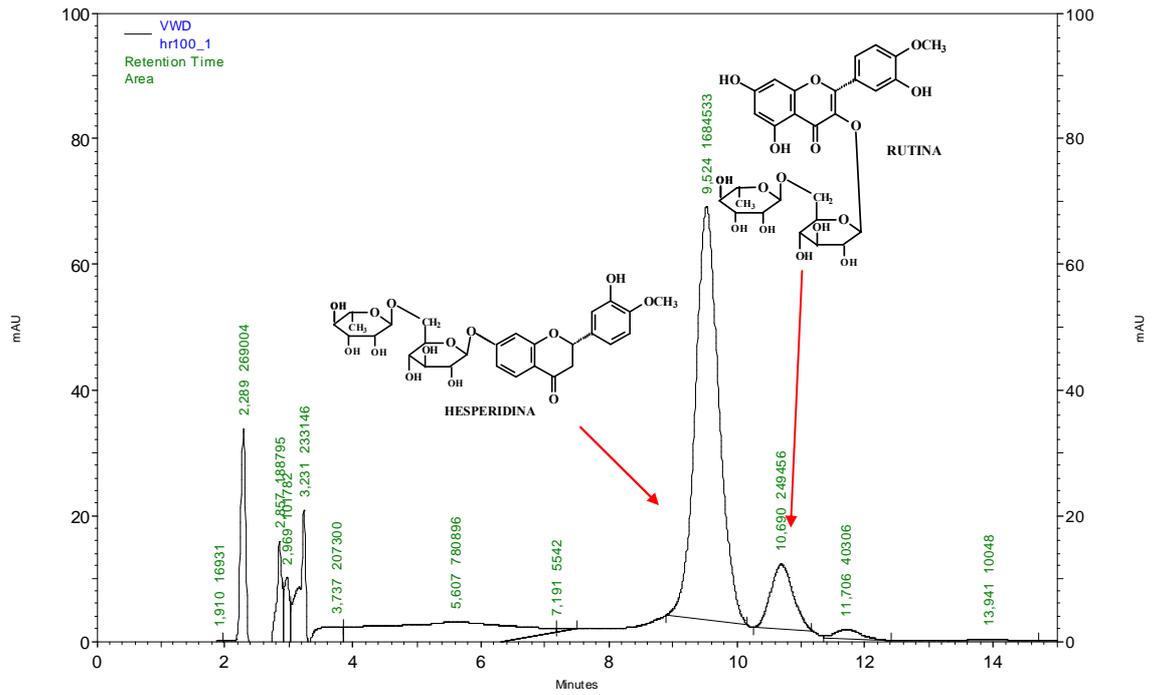


Figura 5.69. Cromatograma da mistura contendo os padrões hesperidina e rutina (100 e 50 µg/ml respectivamente).

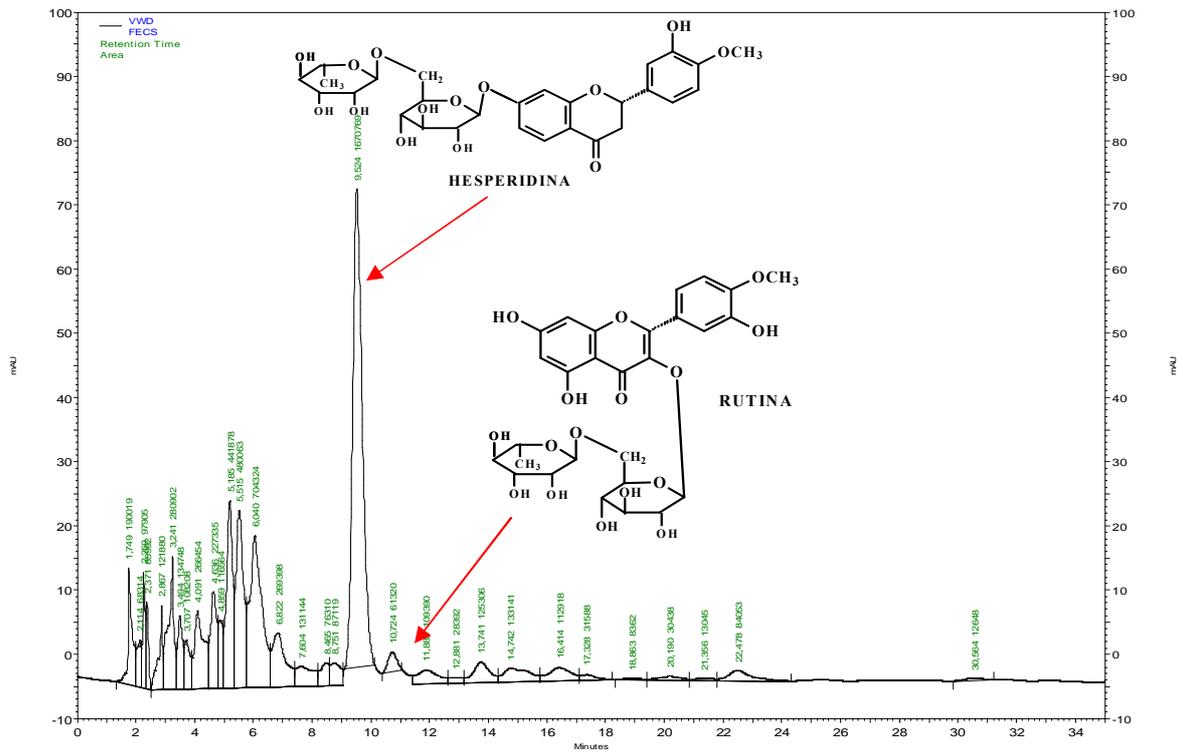


Figura 5.70. Cromatograma da matriz das folhas do enxerto de *C. sinensis*/*C. limonia* com sintomas de CVC.

Visando reforçar a robustez do método acima, as purezas das bandas cromatográficas de interesse foram avaliada com um detetor universal. Para isso, as matrizes dos citros estudados foram analisadas utilizando um DAD com varredura entre 190 e 600 nm. Os cromatogramas apresentaram boa seletividade ($\alpha = 1,5$) entre as bandas referentes aos dois flavonóides nos $t_r = 9,52$ min e $t_r = 10,70$ min da hesperidina e rutina respectivamente. Não foi detectado nenhum interferente nas eluições das mesmas (visto via gráfico comparativo dos λ , dado via software). Na quantificação o comprimento de onda selecionado foi o de 283 nm.

Este método de quantificação dos flavonóides de interesse foi validado seguindo as mesmas normas estabelecidas pela ANVISA e utilizadas na validação do método de quantificação das cumarinas xantiletina e seselina, discutidas anteriormente.

Para a análise da linearidade do método utilizou-se dois métodos de calibração: calibração por padronização externa e calibração por adição de padrão. A curva de calibração por padronização externa foi feita utilizando soluções de concentrações conhecidas dos analitos hesperidina e rutina. A determinação das concentrações dos analitos nas matrizes dos citros estudados foi feita pela comparação da área dos flavonóides em estudo com as áreas obtidas a partir das soluções padrões de calibração.

A construção da curva de calibração por padronização externa se deu através do preparo de oito concentrações diferentes variando entre 2 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata para a hesperidina, e oito concentrações diferentes variando de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata para a rutina. A regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas das bandas cromatográficas e a concentração das amostras. As Figuras 5.71 a 5.74 mostram as curvas por padronização externa e por adição de padrão da hesperidina e da rutina nas folhas e caules do limão cravo, respectivamente.

As Tabelas 5.16 e 5.17 mostram as precisões e exatidões determinadas para as curvas de calibração externa dos flavonóides quantificados.

Tabela 5.16. Precisão (CV%) e exatidão (%) determinadas para a curva de calibração externa do padrão hesperidina.

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	Exatidão (%)
01	1,0	2,5	97,4
02	2,0	0,2	98,0
03	5,0	1,2	98,1
04	10,0	0,4	99,0
05	20,0	0,8	101,2
06	40,0	1,7	99,9
07	60,0	1,9	99,8
08	80,0	1,8	101,0

Tabela 5.17. Precisão (CV%) e exatidão (%) determinadas para a curva de calibração externa do padrão rutina.

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	Exatidão (%)
01	1,0	2,5	93,2
02	2,5	2,7	99,5
03	5,0	2,2	98,8
04	10,0	1,1	102,9
05	20,0	2,0	99,5
06	30,0	1,7	99,0
07	40,0	0,5	101,0
08	50,0	0,8	99,7

Entre as réplicas (n=3) da hesperidina, o coeficiente de variação não ultrapassou os 2,5%. Os coeficientes de correlação obtidos para a curva de padronização externa e pela curva de adição de padrão nas folhas do limão cravo foram 0,9999 e 0,9996 respectivamente, valores estes acima do preconizado pela ANVISA que é de 0,98. E as curvas possuem 105% de similaridade, demonstrando assim a alta seletividade do método e a não-interferência da matriz na resposta analítica (Figura 5.71). Os coeficientes de correlação das curvas referentes à quantificação da hesperidina nos caules foram 0,9999 e 0,9998 e a similaridade de 116%.

Resultados similares foram obtidos para a rutina, entre as réplicas (n=3), o coeficiente de variação não ultrapassou 3% e os coeficientes de correlação obtidos para as curvas de padronização e adição de padrão nas folhas do limão cravo foram 0,9999 e 0,9998 respectivamente. Ambas possuem 103% de similaridade, demonstrando a alta seletividade do método e a não-interferência da matriz na resposta analítica (Figura 5.73). Os coeficientes de correlação das curvas referentes à quantificação da rutina nos caules do limão cravo foram 0,9998 e 0,9996 e a similaridade de 109%.

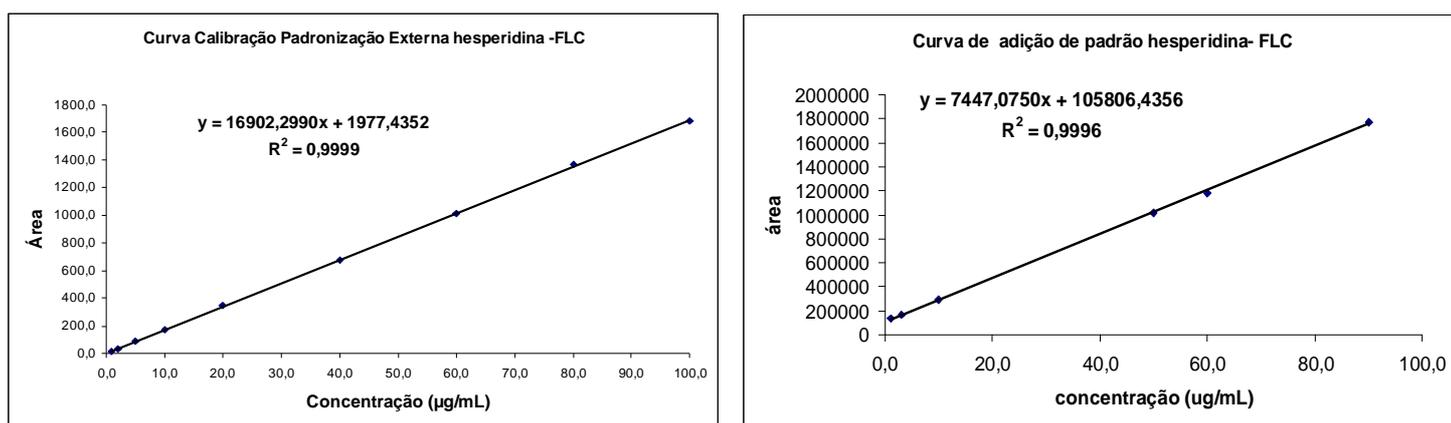


Figura 5.71. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da hesperidina nas folhas do limão cravo.

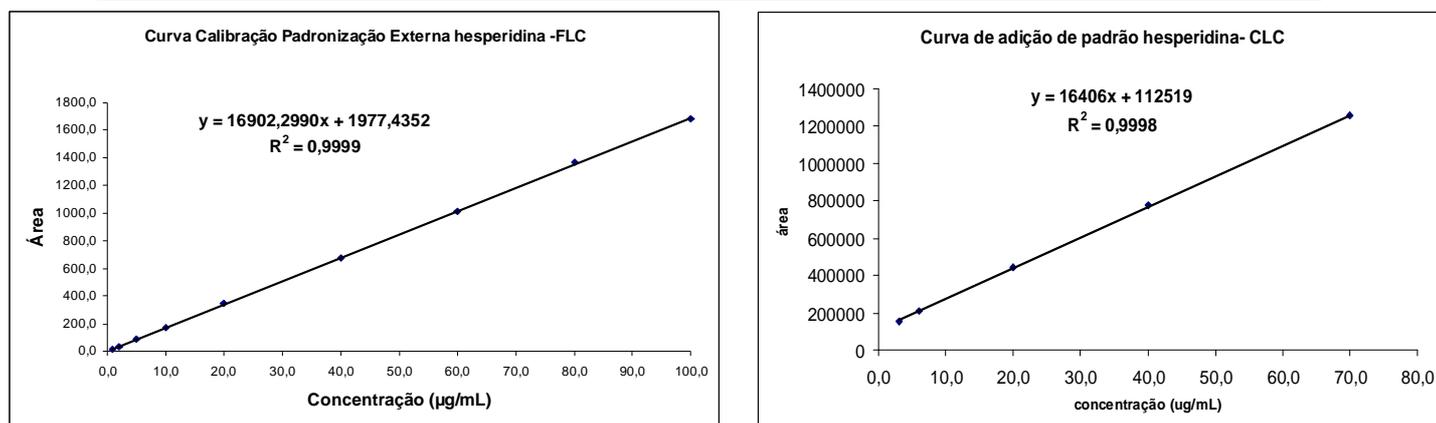


Figura 5.72. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da hesperidina nos caules do limão cravo.

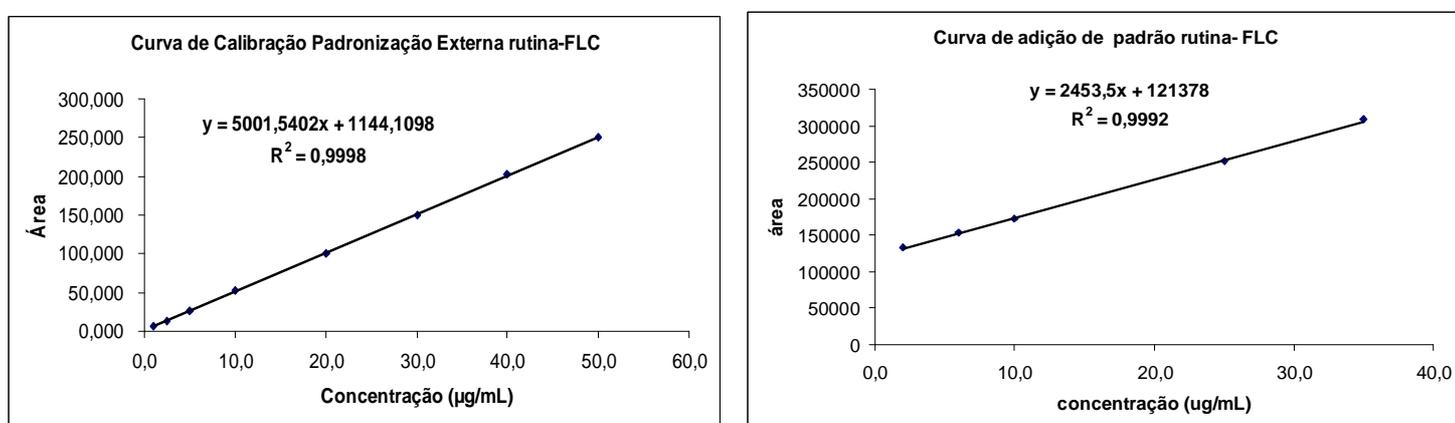


Figura 5.73. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da rutina nas folhas do limão cravo.

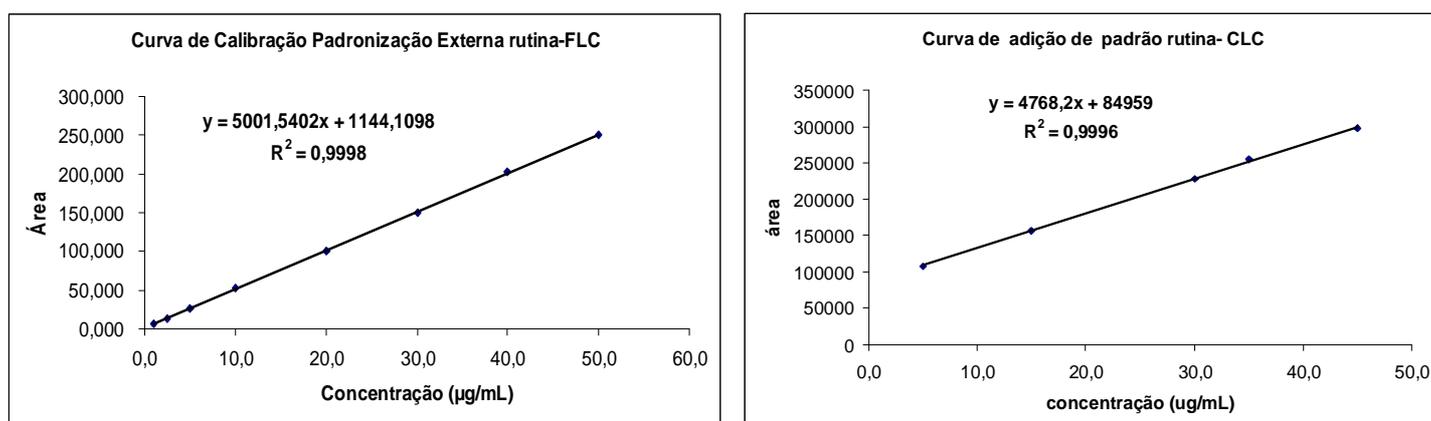


Figura 5.74. Curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão respectivamente, para o método de quantificação da rutina nos caules do limão cravo.

Para se avaliar a precisão e a exatidão do método foram preparadas amostras em três diferentes concentrações, as quais foram denominadas de controle de qualidade. Foram elas: concentrações baixas: 4,0 µg/mL, média: 50 µg/mL e alta: 90 µg/mL, para a hesperidina e 2,0 µg/mL, média: 25 µg/mL e alta: 45 µg/mL para a rutina, em quintuplicata e a análise foi feita em três dias não-consecutivos.

A precisão do método foi determinada calculando-se o desvio padrão relativo entre as áreas obtidas para as replicatas analisadas, e a exatidão foi determinada pelo desvio da concentração média experimental em relação à concentração teórica, em valores percentuais.

A precisão do método para a hesperidina variou de 0,5 a 2,6% e para a rutina de 0,6 a 3,3 %. A exatidão variou de 96,2 a 101,2% para a hesperidina e para a rutina de 97,3 a 102,4%, mostrando assim que os valores estão dentro dos limites aceitáveis pela norma da ANVISA. As Tabelas 5.18 e 5.19 mostram os valores da precisão e exatidão para o método de quantificação dos flavonóides hesperidina e rutina.

Tabela 5.18. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação do flavonóide hesperidina.

Concentração (µg mL ⁻¹)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
4,0	2,2	96,6	1,8	97,8	2,6	96,2
50,0	0,8	100,2	0,5	100,8	1,7	101,2
90,0	0,9	101,2	0,7	101,4	0,8	101,2

Tabela 5.19. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação do flavonóide rutina.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão
2,0	2,6	97,3	1,1	100,3	3,3	100,2
25,0	0,6	101,4	1,7	101,0	1,7	102,1
45,0	1,0	100,8	0,8	100,2	2,1	102,4

Para se determinar o limite de quantificação do método foram preparadas amostras em concentrações decrescentes em triplicata, onde obteve-se para a hesperidina a concentração de quantificação de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ e para a rutina 1,0 $\mu\text{g/mL}$, apesar do coeficiente de variação estar na faixa de 2,5%. Como era de se esperar valores bem maiores de concentração de ambos os flavonóides no extrato, optou-se por assumir esses valores de limites inferiores de quantificação.

O limite de detecção foi determinado de modo análogo à determinação do LQ, injetou-se amostras preparadas em concentrações decrescentes em triplicatas e chegou-se como limites de detecção 0,6 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para a hesperidina e rutina respectivamente.

Os dados acima mostraram que o método quantitativo estava validado, com isto, aplicou-o nas matrizes de folhas, caules inferiores e caules superiores de: laranja pêra, limão cravo, enxerto destes dois (padrão), enxertos em que a bactéria *X. fastidiosa* foi inoculada, mas não apresentaram sintomas, e enxerto com sintomas de CVC. Os valores quantitativos foram discriminados com relação à concentração dos flavonóides nos extratos secos (mg/Kg de extrato).

A Tabela 5.20 mostra os resultados obtidos (em mg/ kg de amostra seca) na quantificação dos flavonóides hesperidina e rutina nas matrizes dos citros estudados.

Tabela 5.20. Concentração (mg/Kg de planta seca) de hesperidina e rutina nas partes superiores das matrizes dos citros estudados.

Amostra	hesperidina	rutina
Folhas laranja pêra	13768,90	6966,90
Folhas limão cravo	3168,40	11328,50
Folhas enxerto controle	15413,60	2668,43
Folhas enxerto com sintomas	23368,40	2927,18
Folhas enxerto sem sintomas	18770,70	2843,53
Caule superior enxerto controle	13825,30	477,32
Caule superior enxerto com sintomas de CVC	17332,70	828,85
Caule superior enxerto sem sintomas de CVC	9142,00	388,94
Caule laranja pêra	3793,10	1020,30
Caule limão cravo	691,59	1896,70
Caule inferior enxerto controle	695,00	728,11
Caule inferior enxerto com sintomas de CVC	469,16	529,40
Caule inferior enxerto sem sintomas de CVC	773,10	703,28

As Figuras 5.75 e 5.76 correlacionam ambos os flavonóides nas folhas e nos caules das matrizes dos citros estudados.

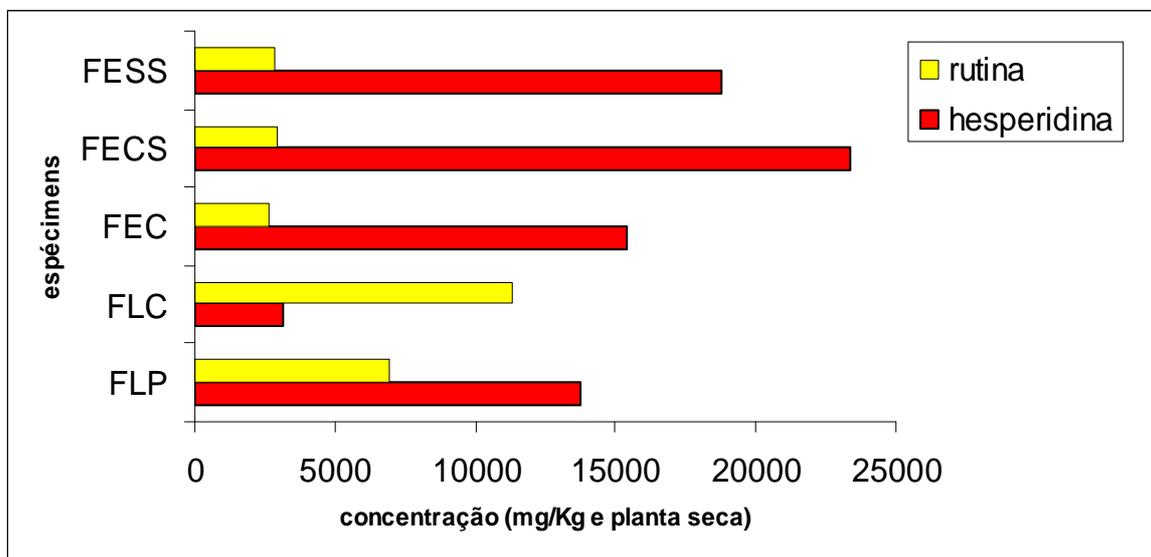


Figura 5.75. Concentração dos flavonóides hesperidina e rutina nas matrizes de folhas dos citros estudados.

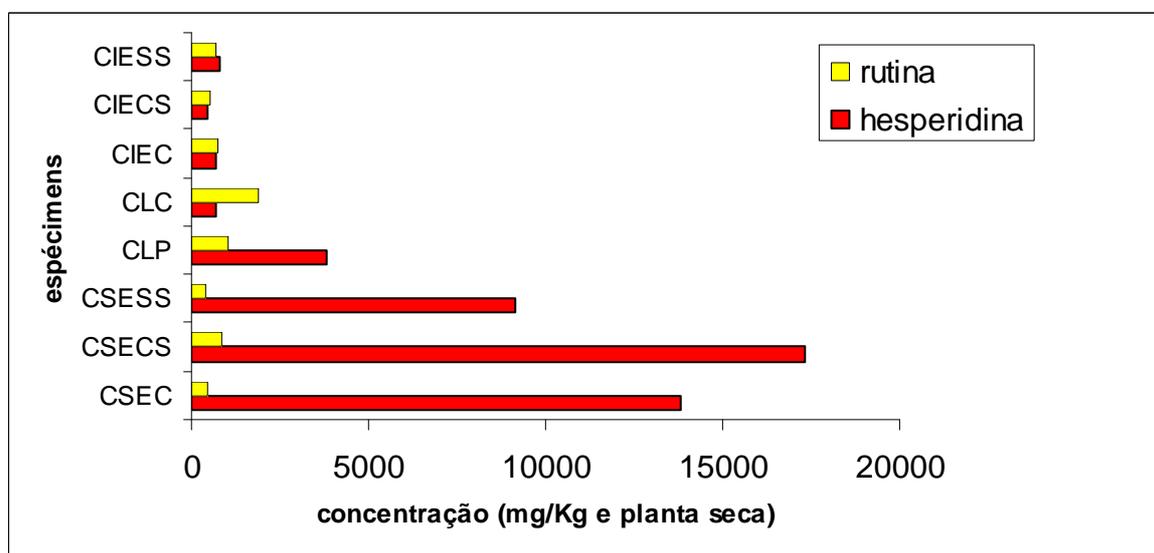


Figura 5.76. Concentração dos flavonóides hesperidina e rutina nas matrizes de caules dos citros estudados.

Analisando tanto a Tabela 5.20 quanto a Figura 5.75, verifica-se que a concentração da hesperidina é muito maior nas folhas da laranja pêra em comparação com as folhas do limão cravo. Ao contrário, a concentração da rutina é maior nas folhas do limão cravo e menor nas folhas da laranja pêra. Quando há a enxertia de laranja pêra sobre o limão cravo a concentração da rutina diminui em 2,61 vezes àquela da laranja pêra, enquanto a da hesperidina se mantém quase ao mesmo nível desta última. A diminuição na concentração da rutina leva a hipótese de que esta reação seria uma resposta adaptativa da laranja pêra a um novo ambiente, ou seja, vivendo sobre o limão cravo e não diretamente ao solo. A concentração da rutina no geral não se altera quando as folhas deste enxerto possuem a bactéria em seu interior. Ao contrário a concentração da hesperidina nas folhas com sintomas de CVC (FECS) aumenta em 1,69 vezes àquela do enxerto padrão (FEC), e em 1,22 vezes naquelas onde a bactéria foi inoculada, mas não apresentaram o sintoma (FESS).

A Figura 5.76 mostra que nos caules inferiores não há variação significativa da concentração dos dois flavonóides na presença da bactéria em estudo e nem em relação ao processo de enxertia. Aliás a concentração da hesperidina neste órgão é muito pequena quando comparado com os caules superiores. O perfil hesperidina e rutina nos caules superiores do enxerto padrão (CSEC) mostra uma relação similar ao da laranja pêra, mas nestes a concentração da hesperidina é bem maior, 3,64 vezes àquela da laranja pêra. Esta reação pode ser uma resposta adaptativa da laranja pêra a um novo ambiente, vivendo sobre o limão cravo. Parece que a enxertia ocasionou variações metabólicas que levaram a inibir o caminho biossintético que leva às flavonas, diminuindo a concentração de rutina em suas folhas, e com isto acumulando a flavanona hesperidina no caule superior.

A concentração da rutina no geral não se altera quando os caules superiores deste enxerto possuem a bactéria em seu interior. Ao contrário a concentração da hesperidina nestes com sintomas de CVC (CSECS) aumenta em

1,25 vezes àquela do enxerto padrão (CSEC). O interessante é a diminuição da concentração da hesperidina (1,51 vezes o CSEC) no enxerto com a bactéria, mas sem sintomas (CSESS). Este resultado permite inferir que a hesperidina estaria sendo deslocada para as folhas nas plantas com a bactéria e sem sintomas, pois neste órgão há um aumento na concentração deste flavonóide de 1,22 vezes em relação ao padrão. Logo, a variação na concentração da hesperidina no enxerto na presença da bactéria pode ser interpretada como uma reação ao patógeno, e este flavonóide sendo uma fitoantecipina.

O contraste a esta hipótese é que a hesperidina ocorre em baixa concentração nas folhas e caules do limão cravo, o qual é resistente à *X. fastidiosa*. Portanto, a pergunta se algum metabólito secundário estaria envolvido nesta resistência, permanece sem resposta. Sendo o tema deste trabalho uma linha de pesquisa esta não poderia ser concluída com uma única tese. Ou seja, o estudo do limão cravo após inoculação da *X. fastidiosa* está em desenvolvimento por um segundo aluno do grupo de PN da UFSCar.

Os resultados acima corroboram com os encontrados por ABDELNUR (2006), a qual afirmou que a hesperidina está em maior concentração nos enxertos de *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintomas de CVC. Neste estudo de Abdelnur e neste realizado pelo doutorando não houve um controle de sazonalidade.

Com o conhecimento parcial do perfil químico do enxerto de *Citrus sinensis* sobre *C. limonia*, o passo seguinte foi desenvolver a bactéria *X. fastidiosa*, assim como metodologia de bioensaios de inibição de seu desenvolvimento. Os ensaios iniciais foram realizados com a bactéria na fase estacionária, pois a literatura cita que é neste estágio que ela encontra-se mais resistente. Assim, a concentração mínima inibitória determinada seria suficiente para inibir a bactéria em qualquer uma das fases. No entanto, posteriormente resolveram-se fazer os ensaios em ambas as fases para verificar se as mudanças nos MICs seriam discrepantes ou discretas. Pode-se verificar que os resultados

são relativamente próximos e que, portanto, não há diferenças discrepantes entre as duas fases. A partir destes dados começou-se a realizar os experimentos utilizando-se apenas a fase exponencial. Os resultados até o momento mostraram MICs muito bons, contudo não se tem dados na literatura para comparação, exceto com antibióticos de uso em humanos e o protocolo do ensaio foi diferente, ou seja, estes eram colocados junto com a bactéria para se desenvolver e não após esta já estar desenvolvida. Entre as substâncias que mostraram boa atividade estão a flavanona hesperidina (3.3 μM) e as cumarinas xantiletina (4.4 μM) e seselina (6,1 μM) (RIBEIRO et al., 2008). Estes dados confirmam o potencial da xantiletina e hesperidina em agirem como uma barreira ao desenvolvimento do patógeno, ou seja, permitindo classificá-los como fitoantecipinas na presença da *X. fastidiosa*. Estes estudos de bioensaios foram desenvolvidos por um segundo aluno de doutorado do grupo de PN da UFSCar.

5.7 Análise da variação do perfil químico dos citros estudados via HPLC-MS/MS

Os estudos de quantificação dos compostos anteriores foram baseados no conhecimento experimental sobre o perfil químico dos citros estudados, onde se sabia que a xantiletina, seselina, rutina e hesperidina ocorrem em quantidades relevantes nestas plantas. Porém, para se complementar as informações obtidas nos estudos de quimiometria sobre os espectros de RMN de ^1H (via HR-MAS CPMG) e cromatogramas de HPLC das matrizes dos citros estudados, estas mesmas amostras foram analisadas via HPLC-MS/MS.

As análises foram qualitativas, não foi desenvolvido um método de quantificação para todos os metabólitos que serão discutidos, mas a maneira como a análise foi feita permite inferir em quantificação, como será mostrado em discussões mais a frente. Infelizmente, ao realizar este estudo não se pode

comparar os metabólitos mais polares (KUSTER *et al.*; 2006), uma vez que a fonte de ionização ESI estava com problemas técnicos e conseguiu-se utilizar apenas a fonte de APCI. Propõe-se neste ponto a realização futura da análise do perfil químico das amostras dos citros estudadas utilizando a técnica de ESI, identificando os metabólitos mais polares ainda não identificados, e complementando assim o estudo de cada matriz. A faixa cromatográfica para estes estudos ficou compreendida entre os tempos de retenção de 20 a 40 min. Os metabólitos presentes na faixa de 0 a 20 min. não foram analisados utilizando a técnica de HPLC-MS/MS.

5.7.1 Análise de algumas cumarinas padrões APCI

Antes de iniciar o estudo de identificação das bandas cromatográficas, foram analisados alguns padrões de cumarinas isolados anteriormente dos citros em estudo (cedidos pelo grupo de PN da UFSCar). As cumarinas xantiletina, seselina, umbeliferona, metoxiseselina e tamarina foram analisadas por APCI no modo positivo de ionização. Os espectros obtidos e propostas de fragmentações serão discutidos a seguir.

5.7.1.1 Proposta de fragmentação para a cumarina umbeliferona por APCI no modo positivo de ionização

Analisando a Figura 5.77, referente aos íons produtos para $m/z = 163$ observa-se que o mesmo gera seis fragmentos com porcentagens consideráveis, sendo o $m/z 107$ o íon base. A proposta de fragmentação para a umbeliferona pode ser observada na Figura 5.78. A perda de monóxido de carbono (CO) na molécula protonada $[M+H^+]$ com $m/z 163$ leva ao íon produto $m/z 135$, sendo este um possível precursor do íon base $m/z 107$. Este se forma após a perda de mais uma unidade de CO e possível rearranjo na molécula do

íon levando a um segundo de estabilidade maior. Este íon de m/z 107 pode sofrer outros rearranjos e posteriormente perder novamente CO, formando o íon produto m/z 79, este último após a perda de H₂ leva ao íon m/z 77.

O espectro de íons produtos também mostra a perda de dióxido de carbono (CO₂) na molécula protonada [M+H⁺] com m/z 163 o qual leva ao íon produto m/z 119. Este último pode perder CO e posteriormente sofrer rearranjos formando o íon tropílio m/z 91.

A umbeliferona foi inicialmente considerada como um possível padrão, mas posteriormente verificou-se que ela aparece num tempo de retenção de aproximadamente 6,5 minutos, e como esta região do cromatograma não apresenta muitas diferenças entre os enxertos estudos, ela não foi analisada.

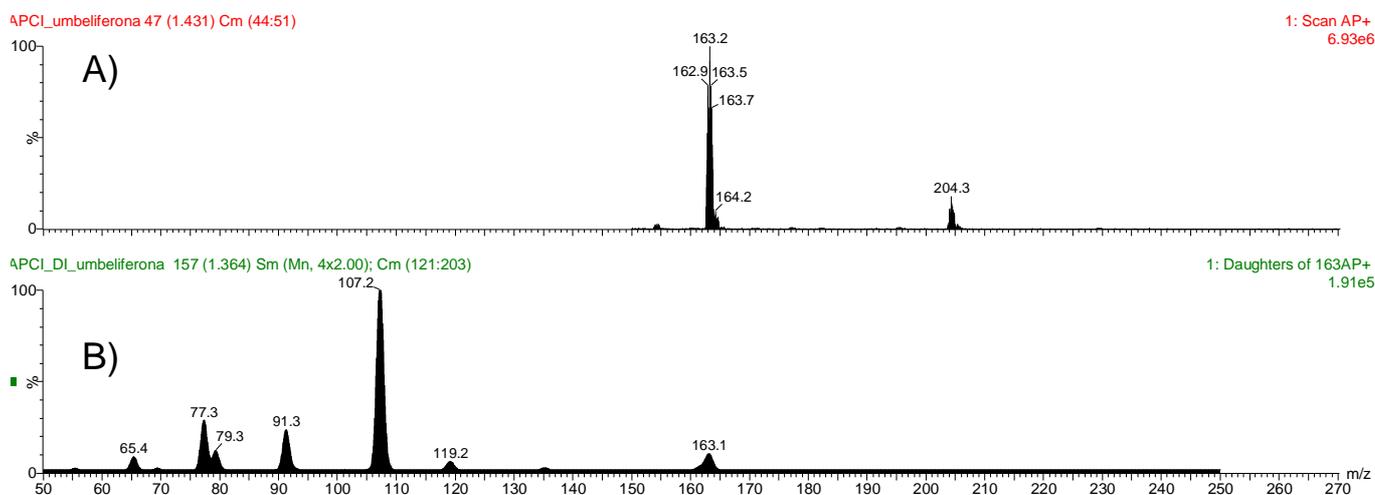


Figura 5.77. Espectros de massas obtidos para umbeliferona por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *full scan*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 163 na forma de de [M+H]⁺.

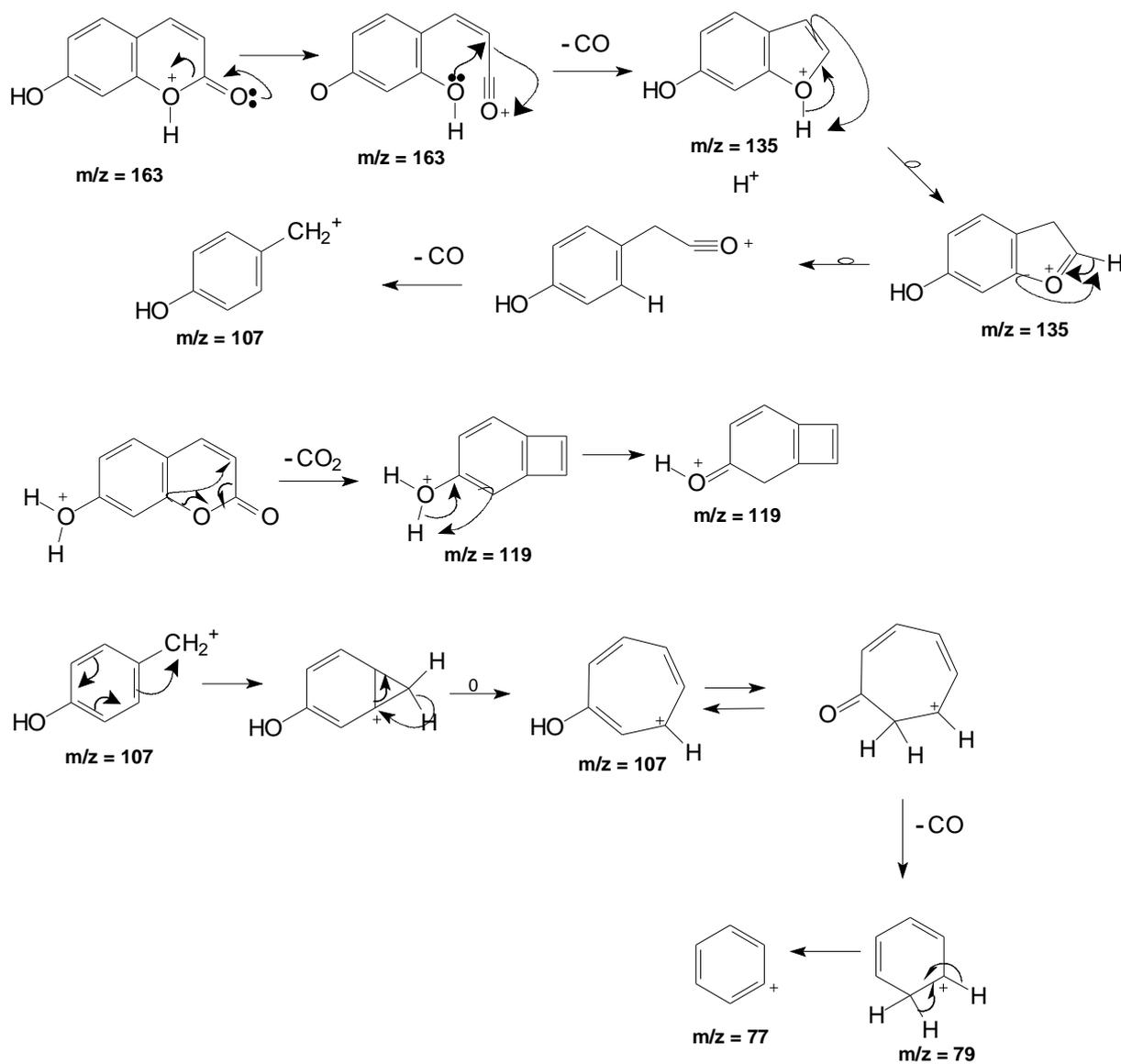


Figura 5.78. Proposta de fragmentação para a cumarina umbeliferona.

5.7.1.2 Proposta de fragmentação para a cumarina metoxiseselina por APCI no modo positivo de ionização

Analisando a Figura 5.79 a qual mostra os íons produtos para m/z 259 observa-se que o mesmo gera alguns fragmentos com porcentagens próximas, sendo m/z 189 o pico base. A proposta de fragmentação para a metoxiseselina pode ser observada na Figura 5.80. A abertura do anel pirano na molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z 259 e posterior perda de uma unidade C_3H_4 e H_2 leva ao íon produto m/z 217, o qual posteriormente perde CO e forma o pico base m/z 189. Perda de mais uma unidade de CO no íon m/z 189 leva ao íon produto m/z 161. O interessante é o íon de m/z par, ou seja, com m/z 202, o qual poderia se originar do íon m/z 217 com a perda de uma metila radicalar. Os demais fragmentos se formam após a abertura do anel lactônico da cumarina e os caminhos que levam a alguns íons produtos podem ser vistos na figura 5.83.

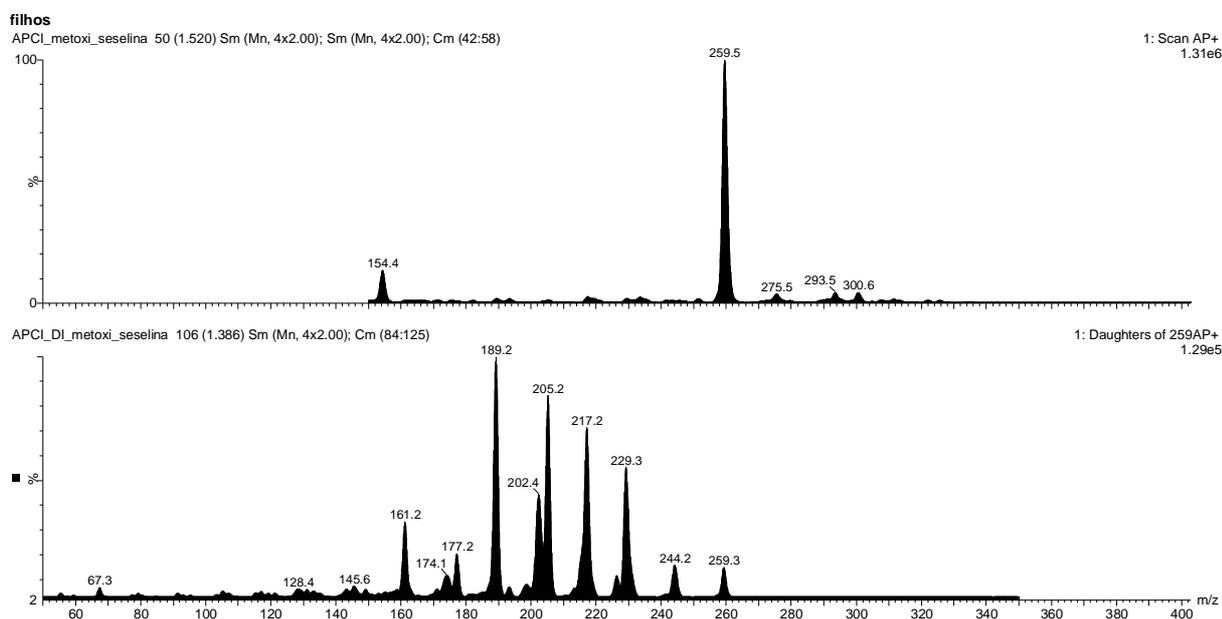


Figura 5.79. Espectros de massas obtidos para metoxiseselina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *full scan*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 259 na forma de $[M+H]^+$.

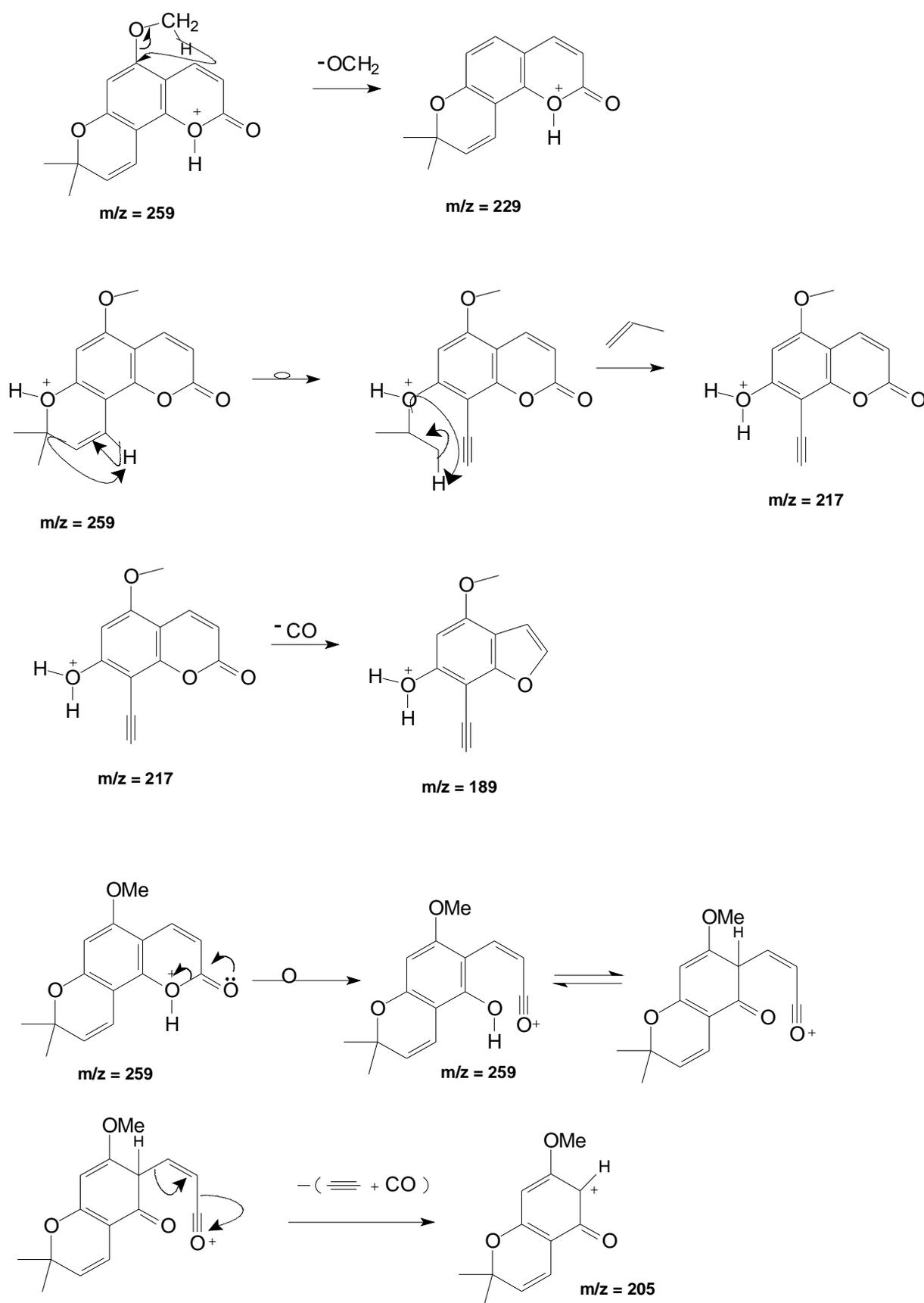


Figura 5.80. Proposta de fragmentação para a cumarina metoxiseselina.

5.7.1.3 Proposta de fragmentação para a cumarina tamarina por APCI no modo positivo de ionização

O espectro dos íons produtos para m/z 261 apresentou dois íons produtos com intensidade relativamente alta cada um, m/z 190 e 161. O interessante novamente é a formação de íons via mecanismo radicalar, ou seja, o íon de m/z par 190, o qual poderia se originar do íon m/z 261 com a perda de uma unidade C_4H_7O radicalar. Propostas para outros fragmentos são mostrados na figura 5.82. Outros caminhos poderiam ser propostos em todas as discussões desta tese, considerando que as análises não foram feitas em um espectrômetro de alta resolução e também não foram usados metabólitos marcados, por exemplo, deuterados, que poderiam confirmar algumas rotas.

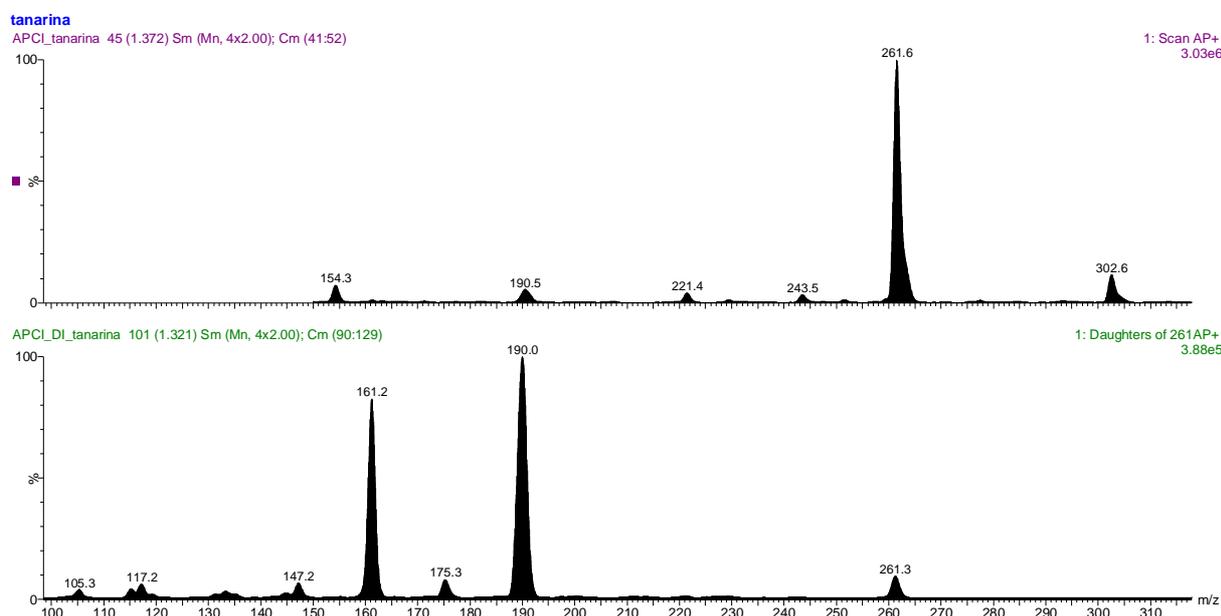


Figura 5.81. Espectros de massas obtidos para tamarina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *full scan*; B)) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 261 na forma de $[M+H]^+$.

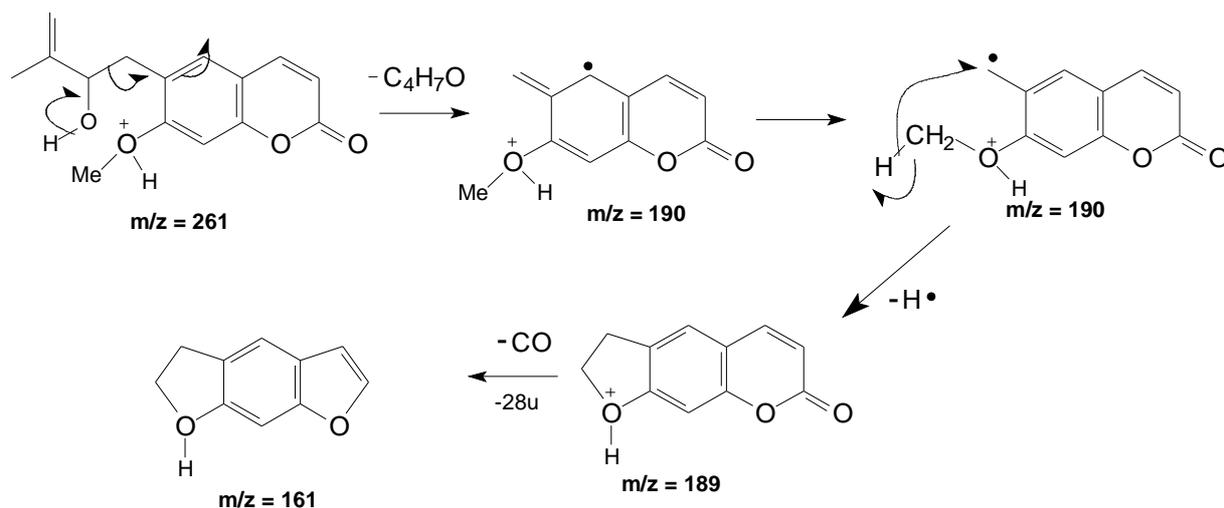


Figura 5.82. Proposta de fragmentação para a cumarina tamarina.

5.7.2 Análise da variação do perfil químico nas raízes dos citros estudados

Os perfis cromatográficos das raízes dos citros estudados estão mostrados nas Figuras 5.83 e 5.84 abaixo.

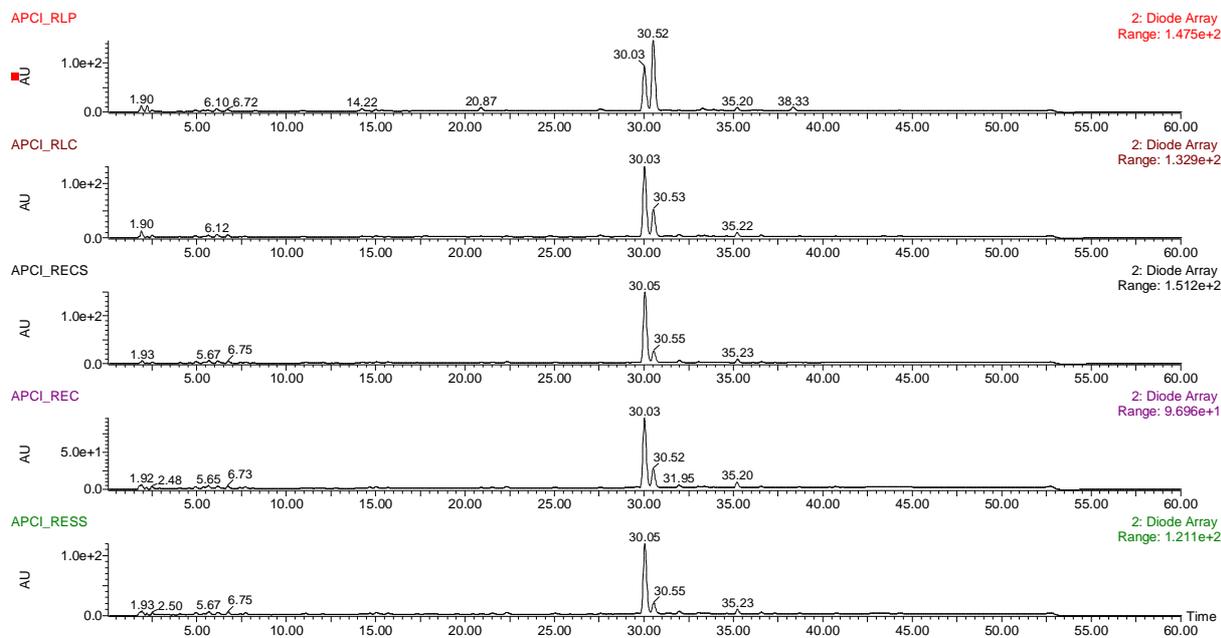


Figura 5.83. Cromatogramas HPLC-DAD comparativos dos extratos das raízes dos citros estudados

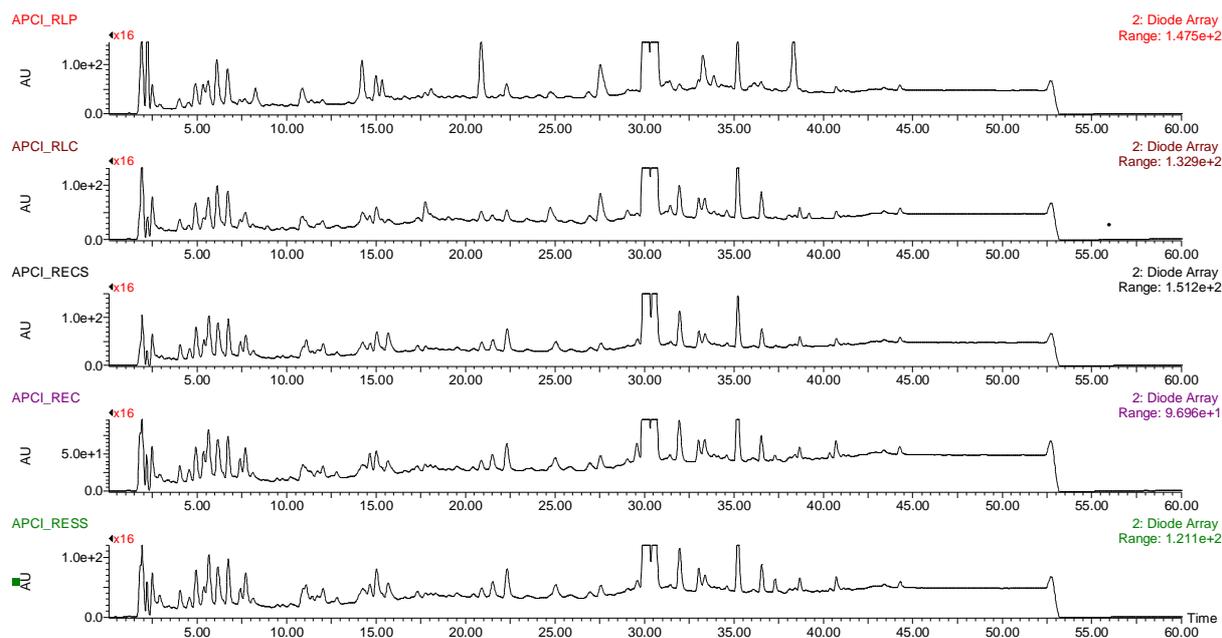


Figura 5.84. Ampliação dos cromatogramas HPLC-DAD comparativos dos extratos das raízes dos citros estudados.

Analisando apenas a Figura 5.83 observa-se a presença de duas bandas muito intensas em tempos de retenção de aproximadamente 30 minutos. Essas bandas foram previamente identificadas e até mesmo quantificadas, sendo as cumarinas xantiletina e seselina. Estes cromatogramas repetem as observações discutidas nos tópicos anteriores, as matrizes das raízes da laranja pêra (RLP) mostram o pico da seselina em uma intensidade maior que aquele da xantiletina. O cromatograma das raízes dos enxertos com (RECS, RESS) ou sem a bactéria (REC) em seu interior se assemelha ao do limão cravo, os quais já foram comentados anteriormente. Ao se aplicar um zoom nos cromatogramas observa-se uma gama de metabólitos com uma boa separação cromatográfica. Uma análise superficial dos cromatogramas ampliados permite considerá-los muito similares às bandas cromatográficas diferenciando-se em intensidades nas respectivas matrizes das raízes analisadas. Vários destes metabólitos foram identificados via a técnica de APCI no modo positivo de ionização. A Figura 5.85 apresenta o cromatograma de íons totais destas matrizes.

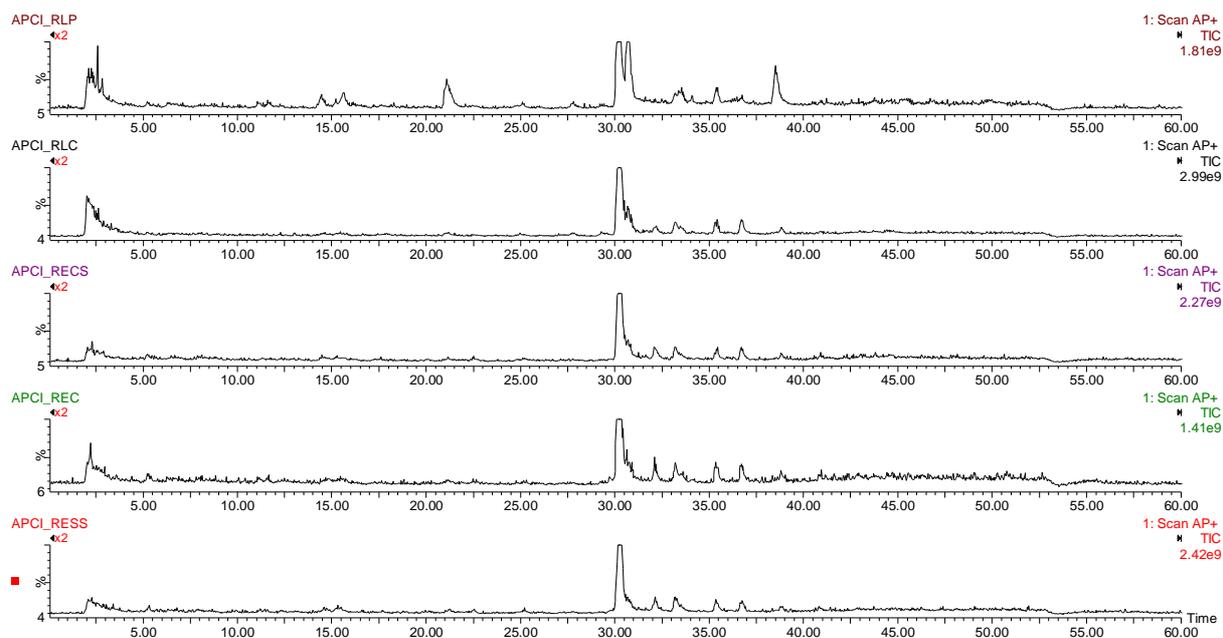


Figura 5.85. Cromatograma de íons totais (TIC) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das raízes dos citros estudados, RLP, RLC, REC, RECS e RESS respectivamente.

5.7.2.1 Identificação das bandas cromatográficas das raízes dos citros estudados

O estudo dos cromatogramas acima obtidos por HPLC-DAD e dos íons totais (TIC) por APCI no modo positivo de ionização dos extratos das raízes dos citros estudados, RLP, RLC, REC, RECS e RESS, permitiu identificar 12 metabólitos secundários. O cromatograma HPLC-DAD das raízes da laranja pêra foi utilizado como modelo para mostrar as doze bandas cromatográficas identificadas (Figura 5.86).

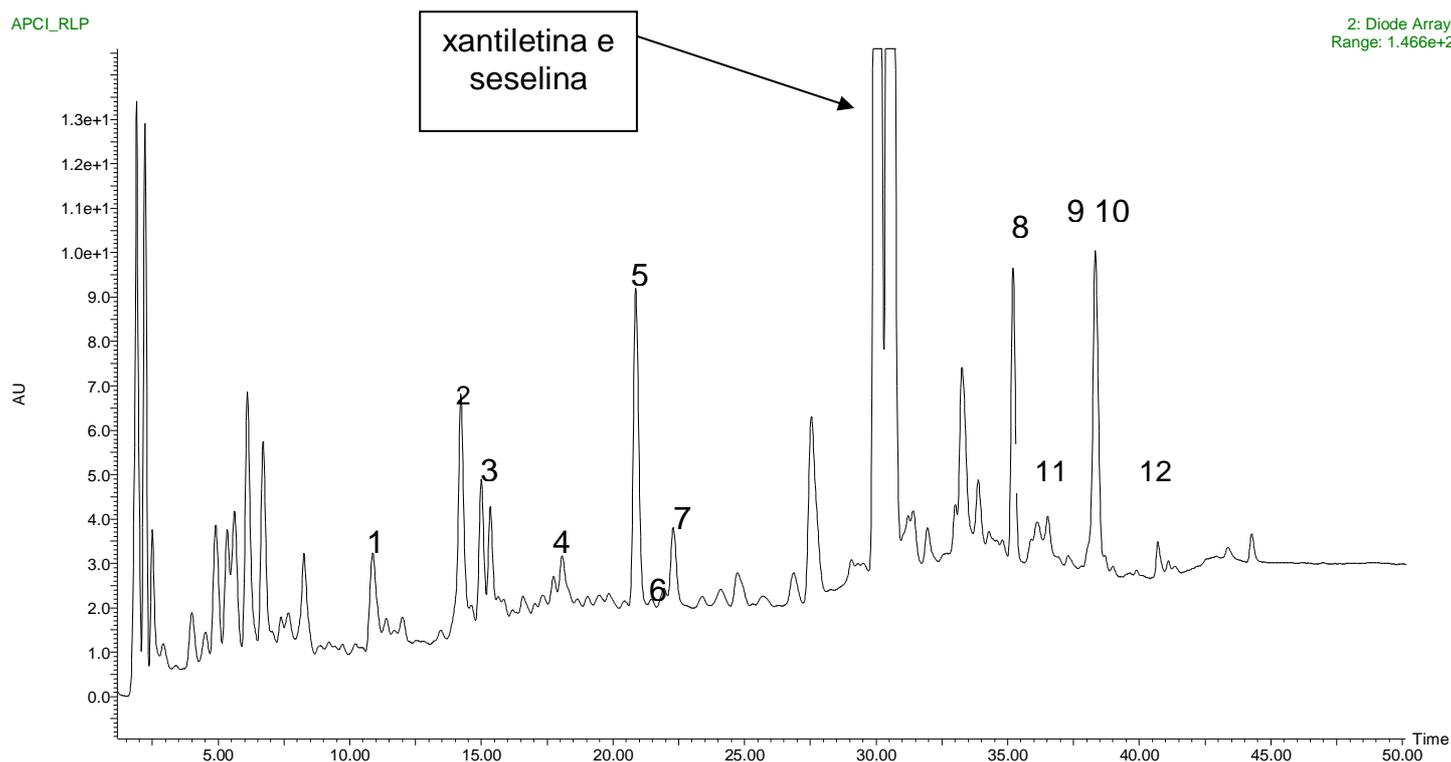


Figura 5.86. Cromatogramas HPLC-DAD do extrato das raízes de laranja pêra com os respectivos sinais cromatográficos identificados.

5.7.2.1.1 Sinais cromatográficos 1, 2 e 3: xantoarnol, diidrosuberenol e decursinol

A análise das bandas cromatográficas denominadas 1, 2 e 3 por APCI no modo positivo de ionização mostrou para todas elas o íon quasimolecular m/z 263. Os espectros de íons produtos de m/z 263 para estas bandas cromatográficas mostraram alguns íons distintos, indicando referirem a três compostos diferentes.

O espectro de íons produtos de m/z 263 para a banda cromatográfica 1 de Rt 11,0 min (Figura 5.87a) permitiu identificar a cumarina xantoarnol. A proposta de fragmentação para a cumarina responsável pela banda 1, justificando os íons produtos mostrados no espectro da figura 5.87b, permitem

confirmar ser esta o xantoarnol. Esta cumarina foi isolada anteriormente das raízes de citros pelo grupo de PN da UFSCar.

O espectro de íons produtos de m/z 263 para a banda cromatográfica 2 de Rt 14,5 min (Figura 5.87c) sugeriu ser a cumarina diidrosuberenol. A proposta de fragmentação para esta cumarina encontra-se na figura 5.87d. Esta cumarina não foi encontrada antes nas raízes dos citros estudados, provavelmente por estar em baixa quantidade. A literatura mostra sua ocorrência em *Citrus acidissima* (GHOSH *et al.*; 1982).

O espectro de íons produtos de m/z 263 para a banda cromatográfica 3 de Rt 15,28 min (Figura 5.87e) mostra íons que correspondem à fragmentação da cumarina decursinol. A proposta de fragmentação para esta cumarina encontra-se na figura 5.87f. Esta cumarina foi isolada anteriormente das raízes de citros pelo grupo de PN da UFSCar (RIBEIRO *et al.*; 2008).

Os cromatogramas do íon selecionado m/z 263 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.87g), permitem inferir sobre as diferentes concentrações destas cumarinas nas raízes dos citros estudados. Analisando este cromatograma e a tabela 5.21, verifica-se que a banda correspondente à cumarina xantoarnol mostra a menor área em todas as matrizes dos citros estudados, sendo identificada em maior quantidade na laranja pêra (RLP). No limão cravo (RLC) visivelmente ela não foi detectada.

A banda correspondente à cumarina diidrosuberenol mostra maiores áreas nas matrizes das raízes dos pés-francos laranja (RLP) pêra e limão cravo (RLC), sendo bem menor nesta última. Quando a laranja pêra é enxertada sobre o limão cravo a concentração desta cumarina diminui muito, mas o mais interessante é que ela aumenta quando este enxerto possui a bactéria *X. fastidiosa* em seu interior (RECS e RESS).

A banda correspondente à cumarina decursinol também mostra maiores áreas nas matrizes das raízes dos pés-francos laranja pêra (RLP) e limão cravo (RLC), sendo menor nesta última. No enxerto padrão (REC, sem a

bactéria) a concentração desta cumarina diminui muito, aumentando quando este enxerto possui a bactéria em seu interior (RECS e RESS).

Estes dados reforçam as hipóteses feitas na quantificação da xantiletina e seselina nestas mesmas matrizes. Neste estudo de quantificação os resultados sugerem que os enxertos de Cs-Cl na presença da bactéria inibem a biossíntese da cumarina angular seselina, desviando a prenilação da umbeliferona para o carbono C-6, para posteriormente levar à xantiletina em um percentual maior. As cumarinas diidrosuberenol e decursinol são derivados de intermediários na formação da xantiletina. Ou seja, estes dados mais uma vez reforçam a proposta de que a presença do patógeno induz a inibição da rota de prenilação em C-8 em favor daquela em C-6.

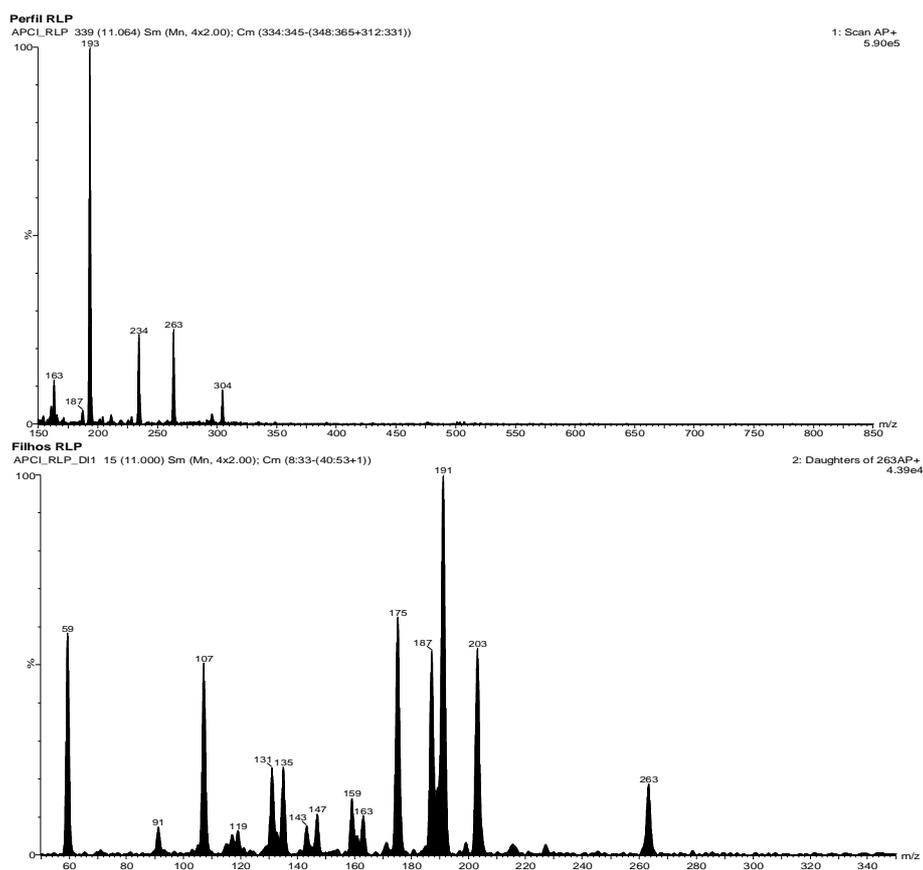


Figura 5.87a. Espectros de massas obtidos para a cumarina xantarnol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *ion selecionado*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 263 na forma de $[M+H]^+$.

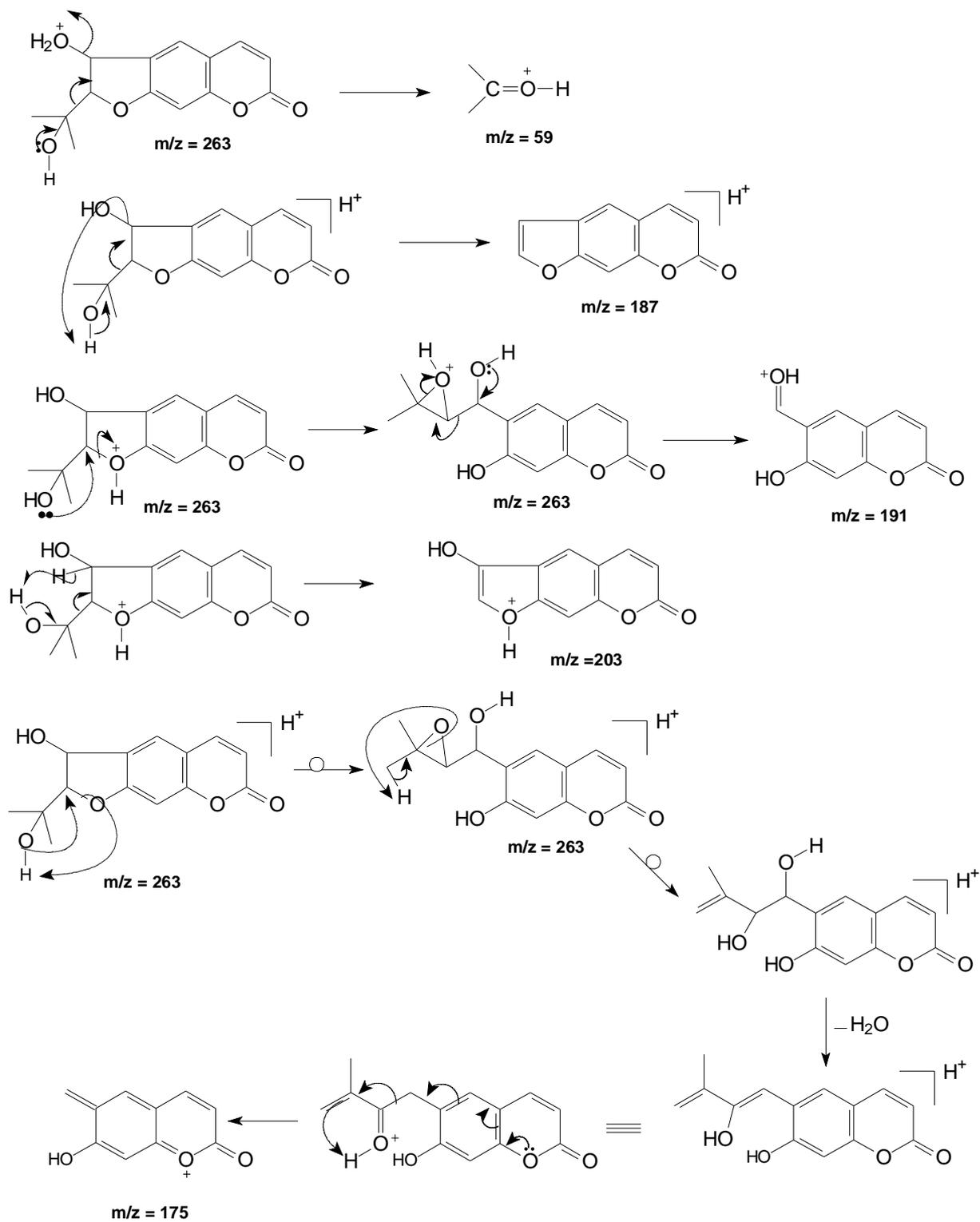


Figura 5.87b. Proposta de fragmentação para a cumarina xantoarnol.

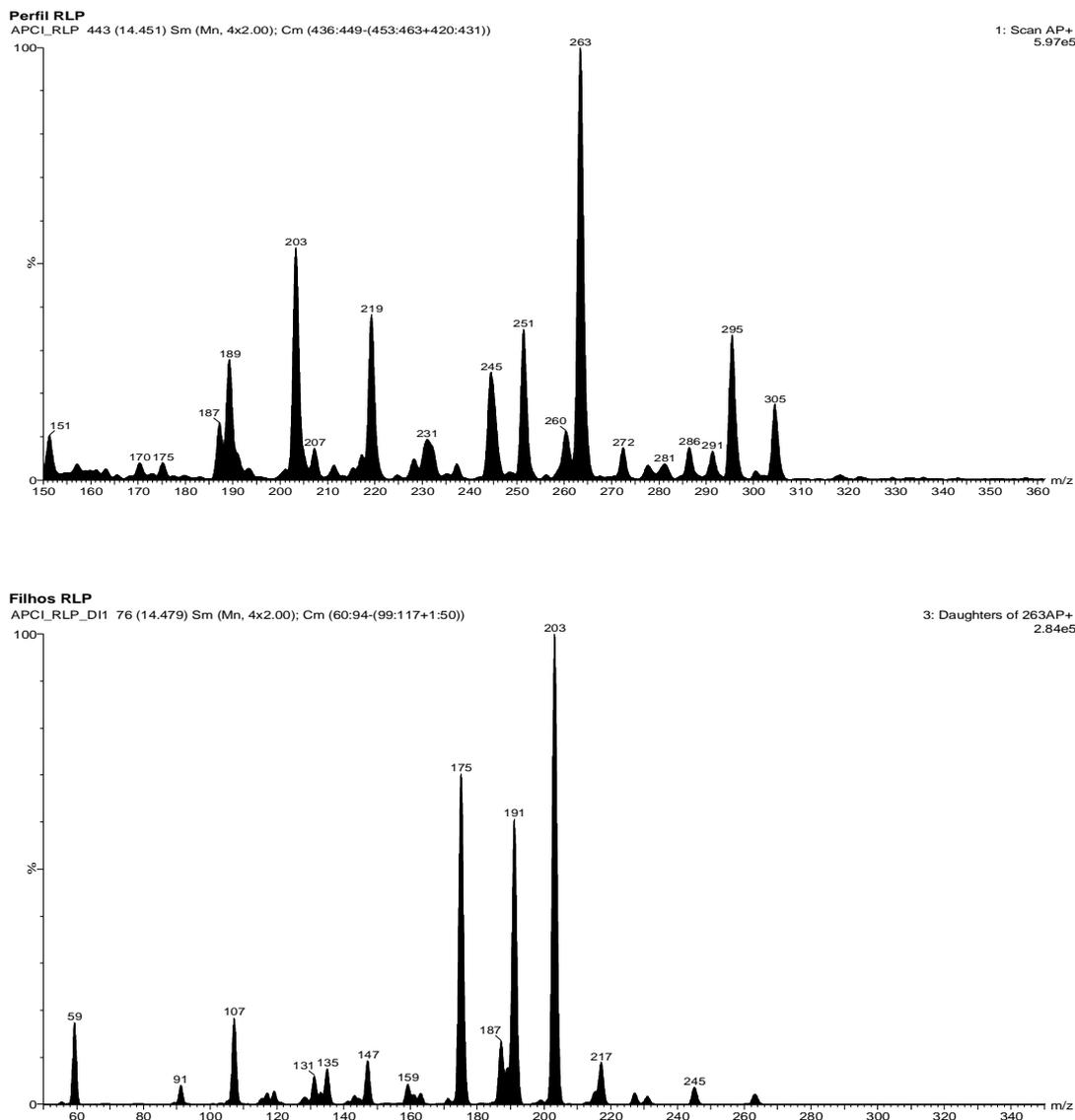


Figura 5.87c. Espectros de massas obtidos para a cumarina diidrosberberinol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *íon selecionado*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 263 na forma de $[M+H]^+$.

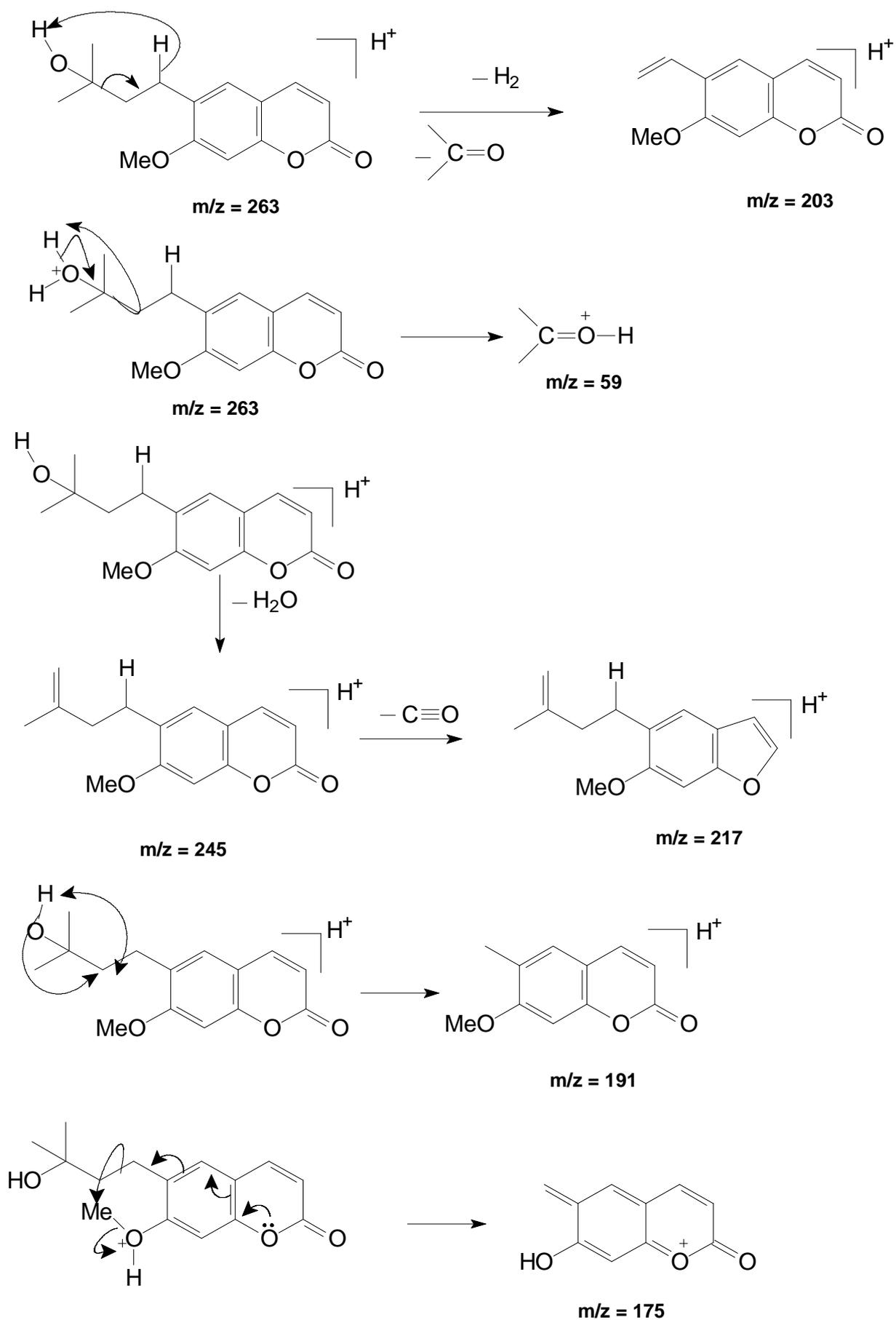


Figura 5.87d. Proposta de fragmentação para a cumarina diidrosuberenoil.

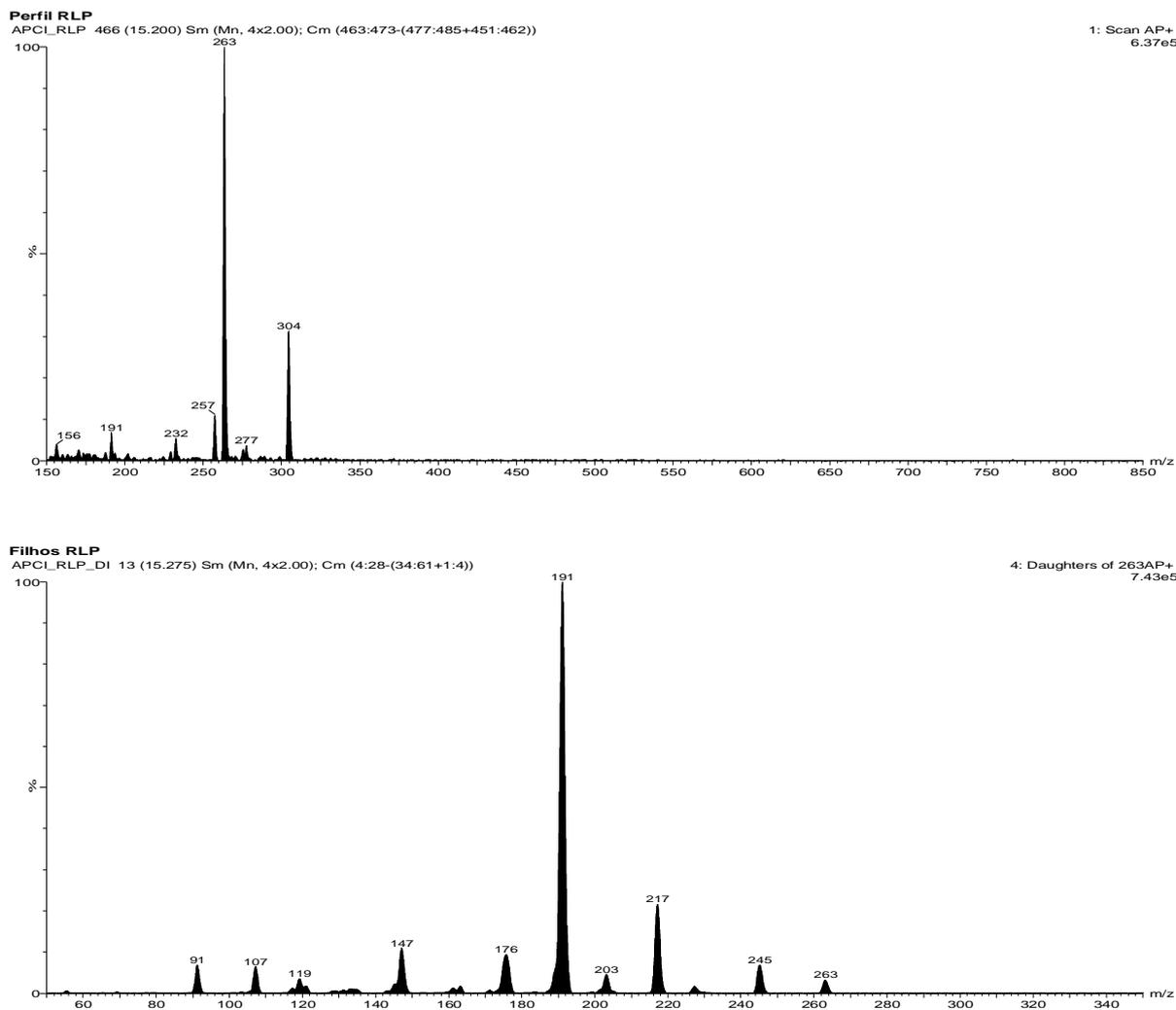


Figura 5.87e. Espectros de massas obtidos para a cumarina decursinol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *íon selecionado*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 263 na forma de $[M+H]^+$.

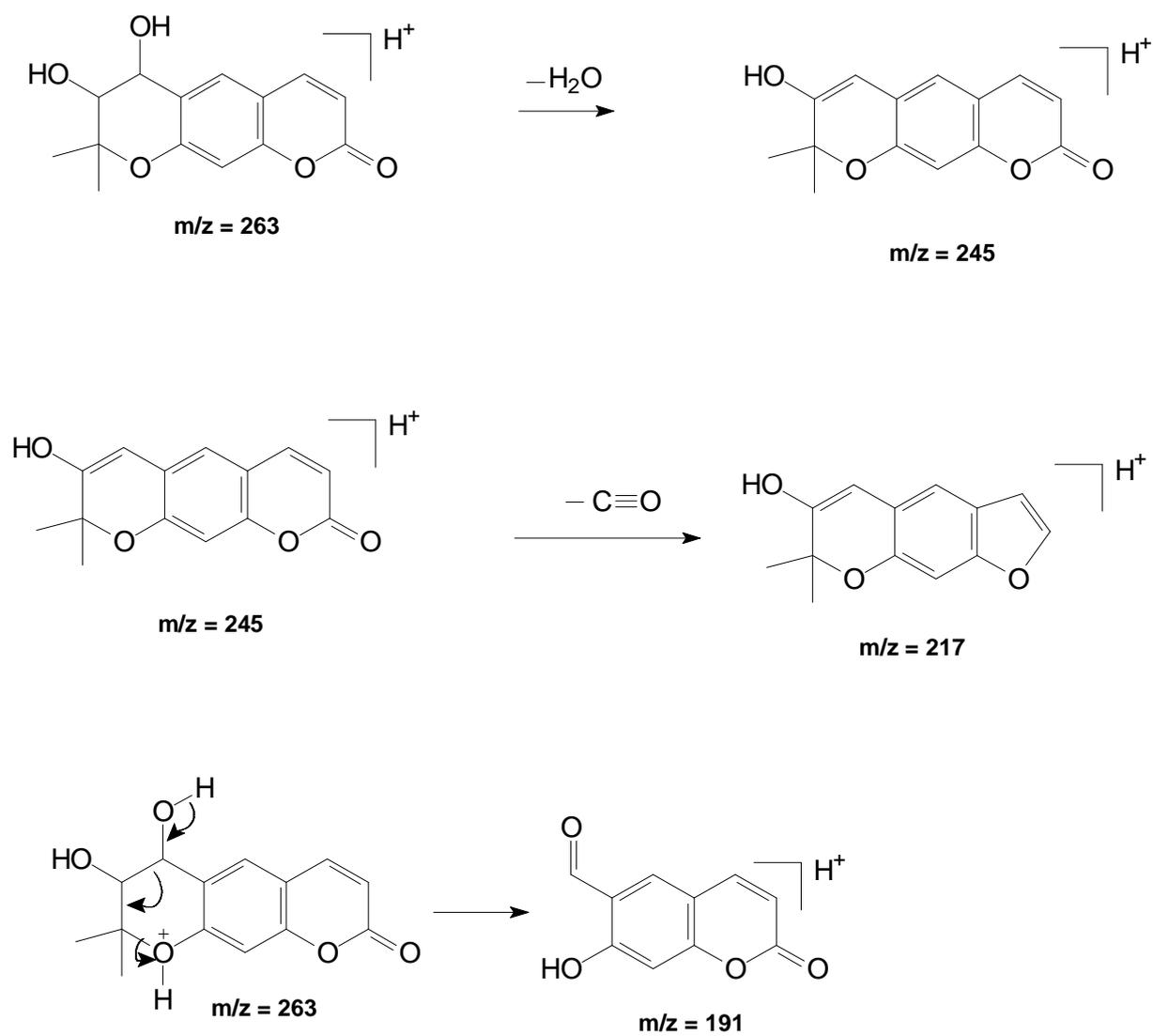


Figura 5.87f. Proposta de fragmentação para a cumarina decursinol.

Tabela 5.21. Extratos das raízes dos citros estudados contendo as cumarinas xantoarnol, diidrosuberenol e decursinol com suas respectivas áreas.

Cumarina	Área do Íon selecionado ($m/z=263$) nas raízes de cada citros estudado				
	RLP	RLC	REC	RESS	RECS
Xantoarnol (1)	1238209	nd*	174967	220139	384626
Diidrosuberenol (2)	4985412	1682149	816029	1545891	1777884
decursinol (3)	5989126	3384448	2409555	6159335	4738674

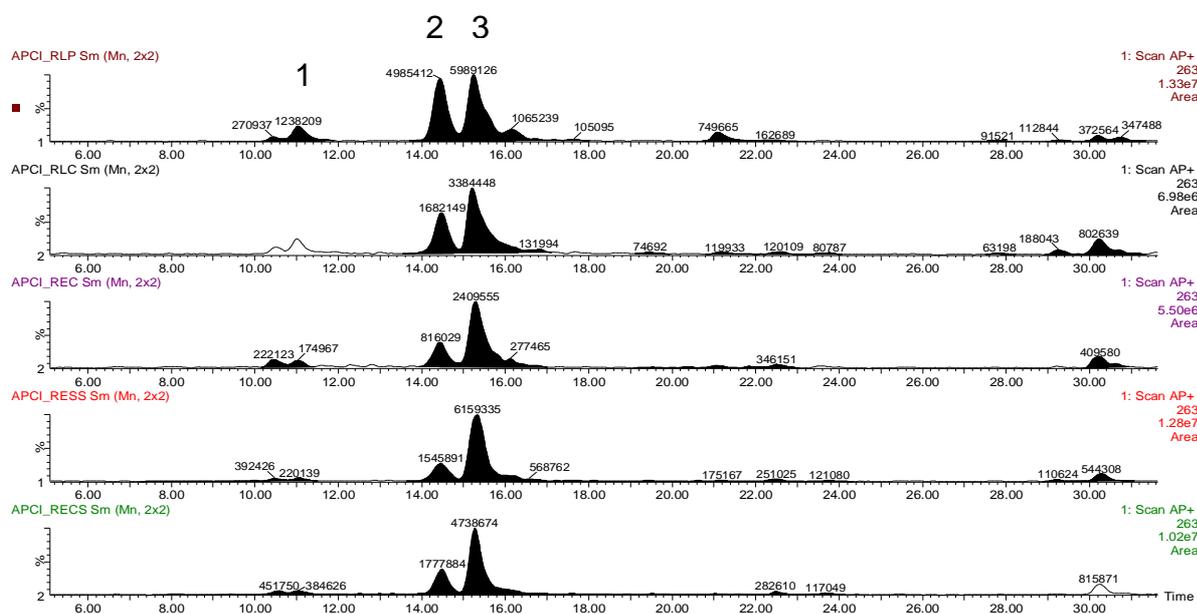


Figura 5.87g. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=263$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

5.7.2.1.2 Sinal cromatográfico 4: cumarina ulopterol

A análise da banda cromatográfica denominada 4 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 279. O espectro de íons produtos de m/z 279 para a banda cromatográfica 4 de Rt 17,6 min (Figura 5.88a) permitiu identificar a cumarina ulopterol. A proposta de fragmentação para ulopterol encontra-se na Figura 5.88b. Esta cumarina não foi isolada anteriormente das raízes dos citros estudados, provavelmente devido à sua baixa concentração neste órgão. Ela foi relatada pela primeira vez em *Eremocitrus glauca* por DREYER & HUEY (1974), como sendo um artefato da suberosina, e mais tarde foi isolada de algumas espécies de Rutaceae como *Coleonema álbum*, *Micromelum pubescens*, *Ruta pinata*, *Zanthoxylum arnottianum* (WATERMAN (1983).

O cromatograma do íon selecionado m/z 279 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.88c) mostra maior área para aquela das raízes do pé-franco limão cravo (RLC), no enxerto padrão (REC, sem a bactéria) a concentração desta cumarina diminui muito, aumentando quando este enxerto possui a bactéria em seu interior (RECS e RESS). Esta observação permite inferir a mesma hipótese acima. A cumarina ulopterol é um derivado do intermediário na formação da xantiletina. Ou seja, estes dados mais uma vez reforçam a proposta de que a presença do patógeno induz a inibição da rota de prenilação em C-8 em favor daquela em C-6.

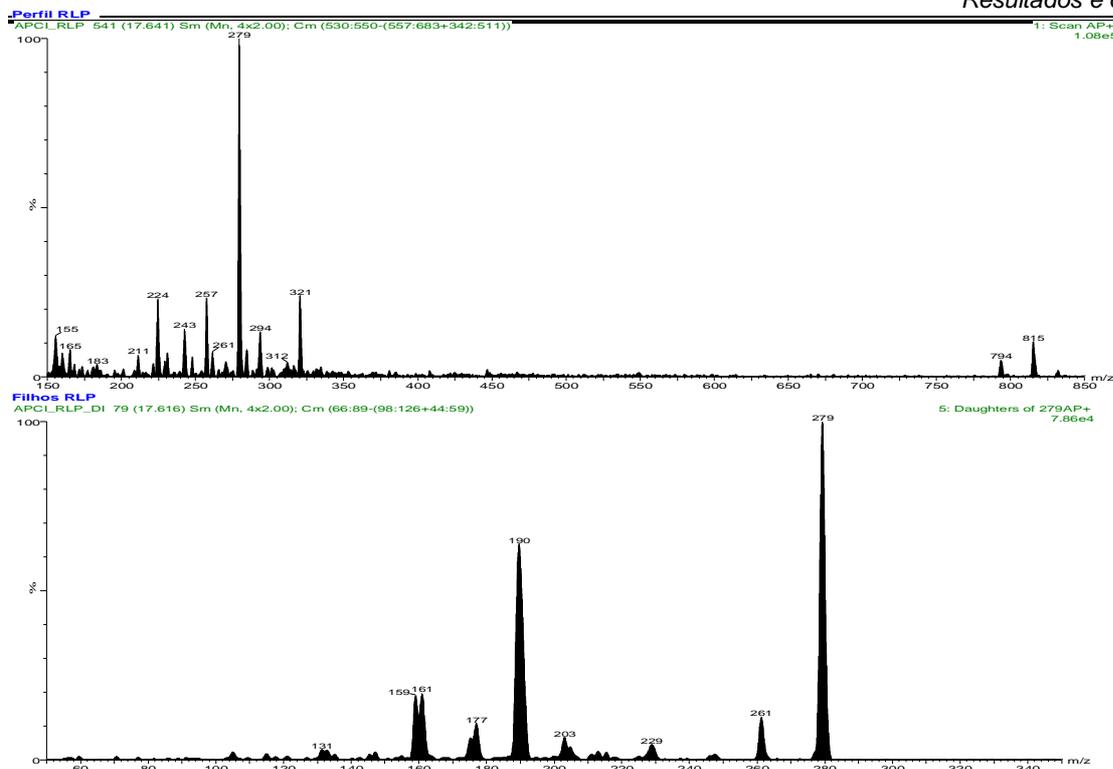


Figura 5.88a. Espectros de massas obtidos para a cumarina ulopterin por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *ion selecionado*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 279 na forma de $[M+H]^+$.

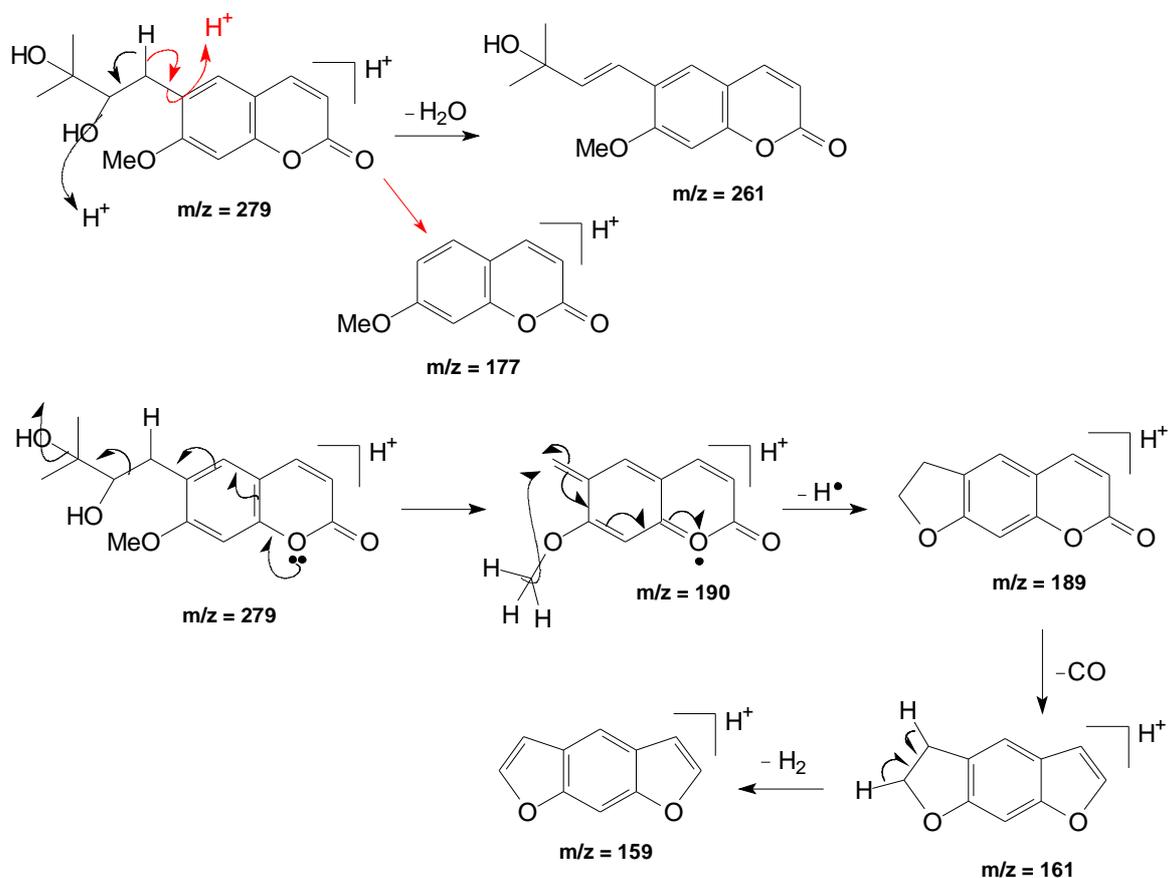


Figura 5.88b. Proposta de fragmentação para a cumarina ulopterin.

Tabela 5.22. Extratos das raízes dos citros estudados contendo ulopterol com suas respectivas áreas.

Cumarina	Área do Íon selecionado ($m/z=279$) nas raízes de cada citros estudado				
	RLP	RLC	REC	RESS	RECS
ulopterol	1126986	2094542	1143078	2055973	2641213

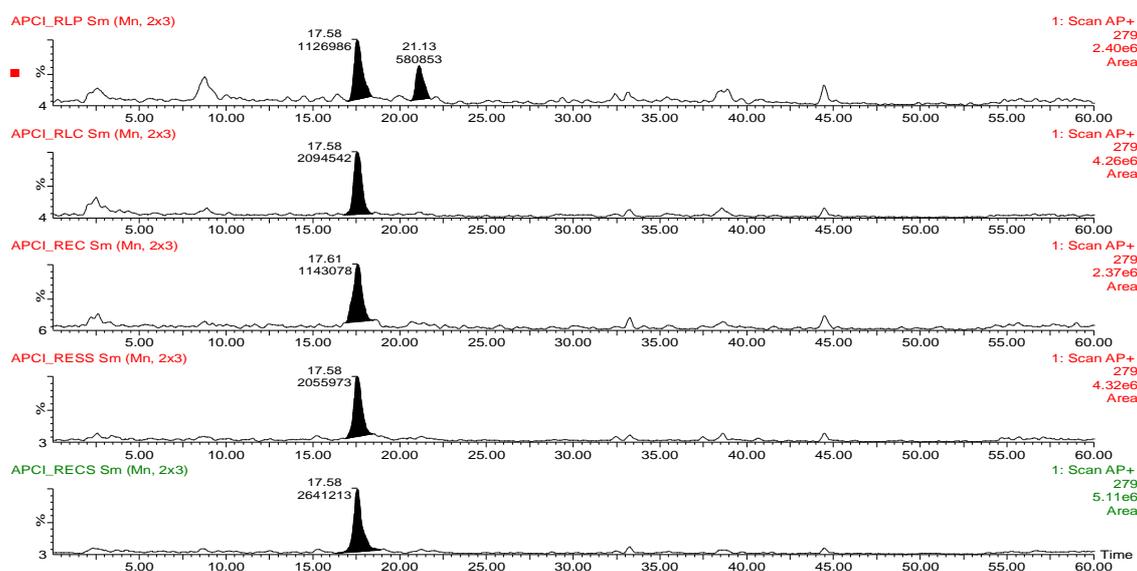


Figura 5.88c. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=279$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

5.7.2.1.3 Sinais cromatográficos 5 e 8: cumarinas ostol e suberosina

A análise das bandas cromatográficas denominadas 5 e 8 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 245. O espectro de íons produtos de m/z 245 para a banda cromatográfica 5 de Rt 21.1 min (Figura 5.89a) permitiu identificar a cumarina ostol. A proposta de fragmentação para ostol encontra-se na Figura 5.89c. O espectro de íons

produtos de m/z 245 para a banda cromatográfica 8 de R_t 35,3 min (Figura 5.89b) permitiu identificar a cumarina suberosina. A proposta de fragmentação para suberosina encontra-se na Figura 5.89d. O interessante é que a diferença entre os dois isômeros está na posição da prenila, na suberosina ela se encontra em C-6 e no ostol em C-8 e isto leva a propriedades físicas e químicas distintas, ostol mais polar, e as fragmentações por APCI no modo positivo de ionização mostrou pouquíssimos íons produtos similares. Por exemplo, analisando os perfis de fragmentação tanto do ostol quanto da suberosina (página 185), observa-se o íon $m/z=203$, característico apenas do primeiro composto (ostol). Porém, esta fragmentação deveria ser encontrada no espectro de massas da suberosina; fato esse que não ocorre. Logo, a proposta envolvendo o anel lactônico justifica a presença de $m/z=203$ apenas no ostol. O ostol não foi isolado anteriormente nas raízes dos citros estudados no presente trabalho, porém o grupo de PN da UFSCar isolou a suberosina nestas mesmas matrizes. O cromatograma do íon selecionado m/z 245 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.89e) e a tabela 5.23 mostram que a concentração do ostol no pé-franco laranja pêra é cerca de 6 vezes maior que aquela nos enxertos estudados, nestes a sua biossíntese parece ser baixa, o que explicaria o grupo de PN não ter isolado esta cumarina em seus estudos com cromatografia em coluna de bancada. GUENTER & GERHARD (1992) citam seu isolamento no óleo de laranja doce (pêra).

No enxerto a concentração de ostol nas raízes fica abaixo daquela encontrada para o pé-franco limão cravo, aumentando um pouco quando estas plantas possuem a bactéria em seu interior (RECS e RESS). Contudo, nas plantas com sintomas de CVC (RECS) este aumento ocorre em apenas 1,23 vezes a concentração do enxerto padrão (REC). Este aumento para as cumarinas com a prenilação em C-6 discutidas anteriormente foi na faixa de duas vezes (diidrosuberenol 2,18; decursinol 1,97; ulopterol 2,31). A comparação dos dados para o ostol com aqueles das cumarinas preniladas em C-6, mais uma vez

reforçam a proposta de que presença do patógeno induz a inibição da rota de prenilação em C-8 em favor daquela em C-6.

A concentração da suberosina no pé-franco limão cravo é um pouco maior que aquela da laranja pêra, no enxerto ela diminui um pouco e nestes com a bactéria a concentração varia muito pouco. Naqueles onde a bactéria foi inoculada, mas não apresentaram sintomas (RESS) a concentração da suberosina aumenta muito pouco em 1,05 àquela do enxerto padrão (REC), ao contrário nos enxertos com sintomas de CVC ela diminui em 1,08. Esta pequena variação, ou mesmo a diminuição na concentração é facilmente explicada, devido ao consumo da suberosina na formação da xantiletina a qual aumenta em 1,44 vezes na presença da *X. fastidiosa*, dados discutidos anteriormente na quantificação desta cumarina nestas matrizes. A suberosina é o precursor direto da xantiletina e das demais cumarinas preniladas em C-6 citadas acima com seus respectivos aumento na planta com sintoma de CVC, ou seja, a sua diminuição nas plantas doentes seria esperada.

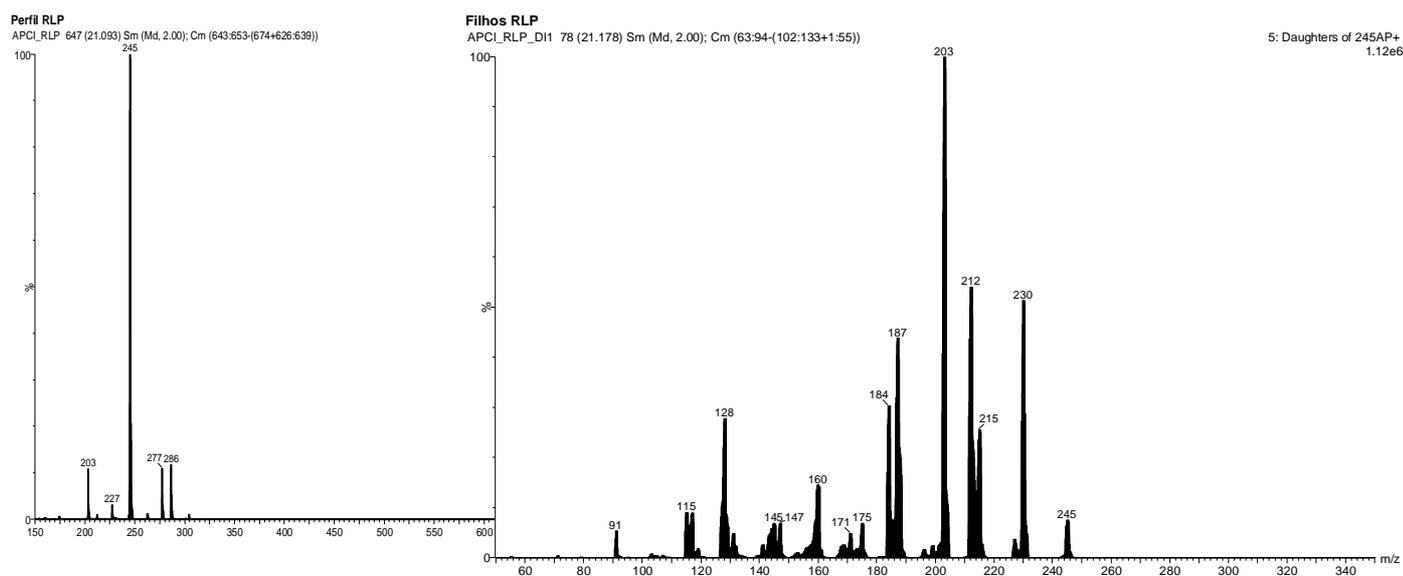


Figura 5.89a. Espectros de massas obtidos para a cumarina ostol por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *ion selecionado*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 245 na forma de $[M+H]^+$.

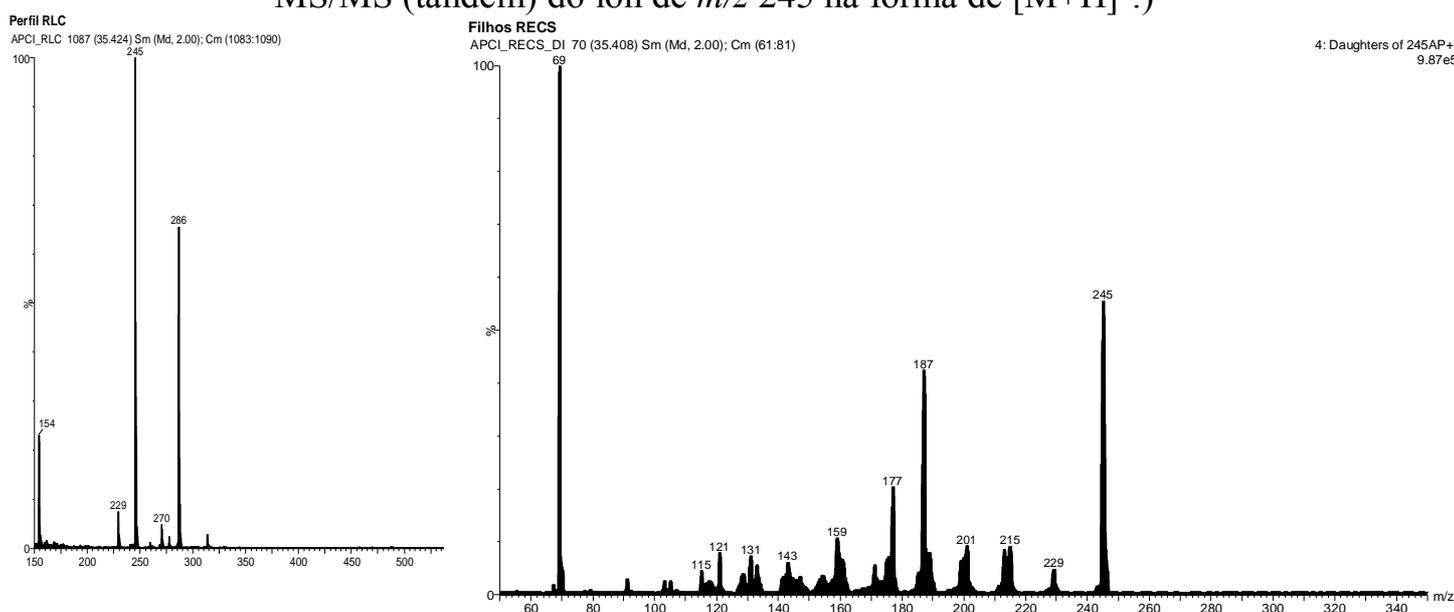


Figura 5.89b. Espectros de massas obtidos para a cumarina suberosina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *ion selecionado*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 245 na forma de $[M+H]^+$.

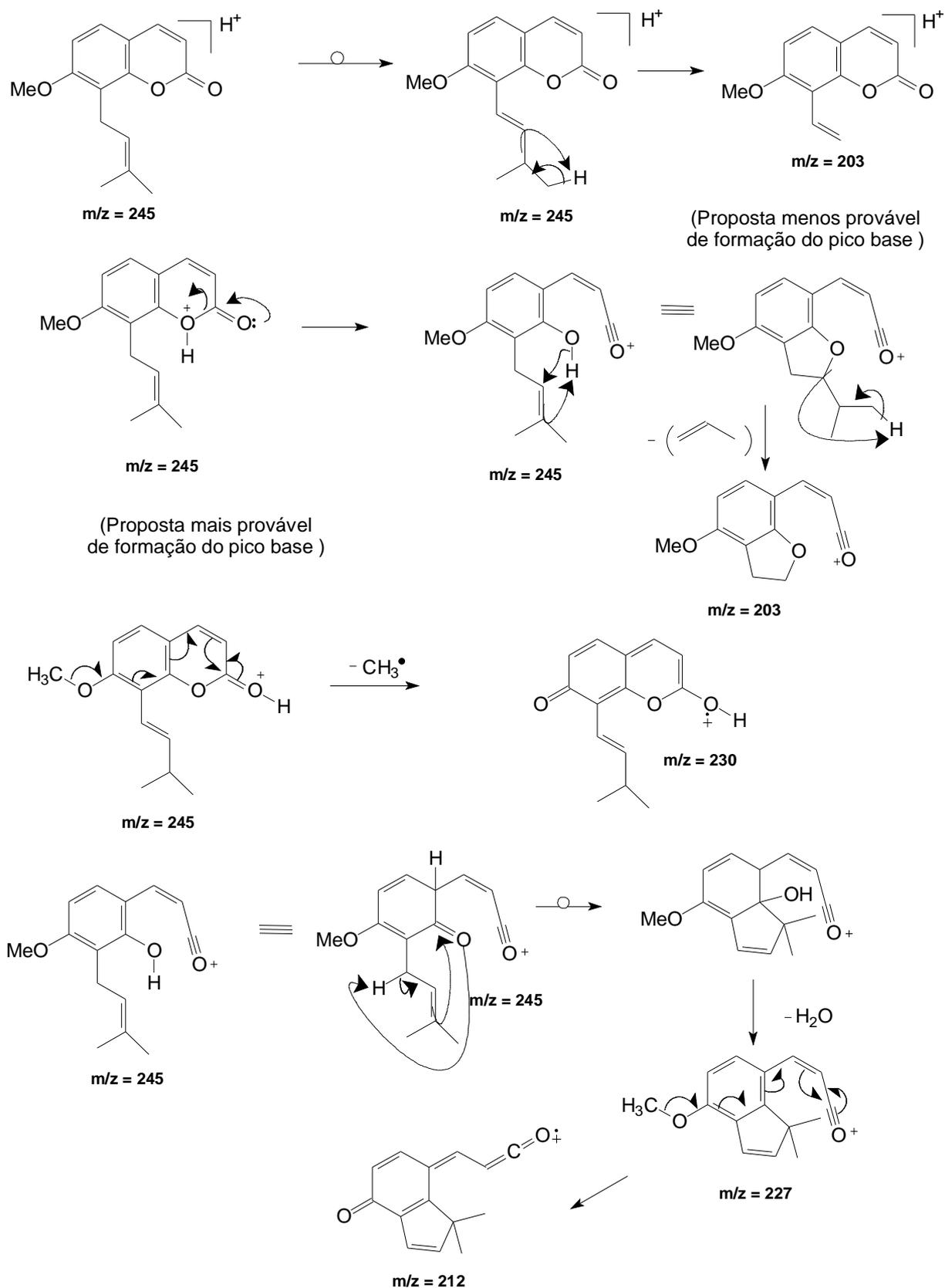


Figura 5.89c. Proposta de fragmentação para a cumarina ostol.

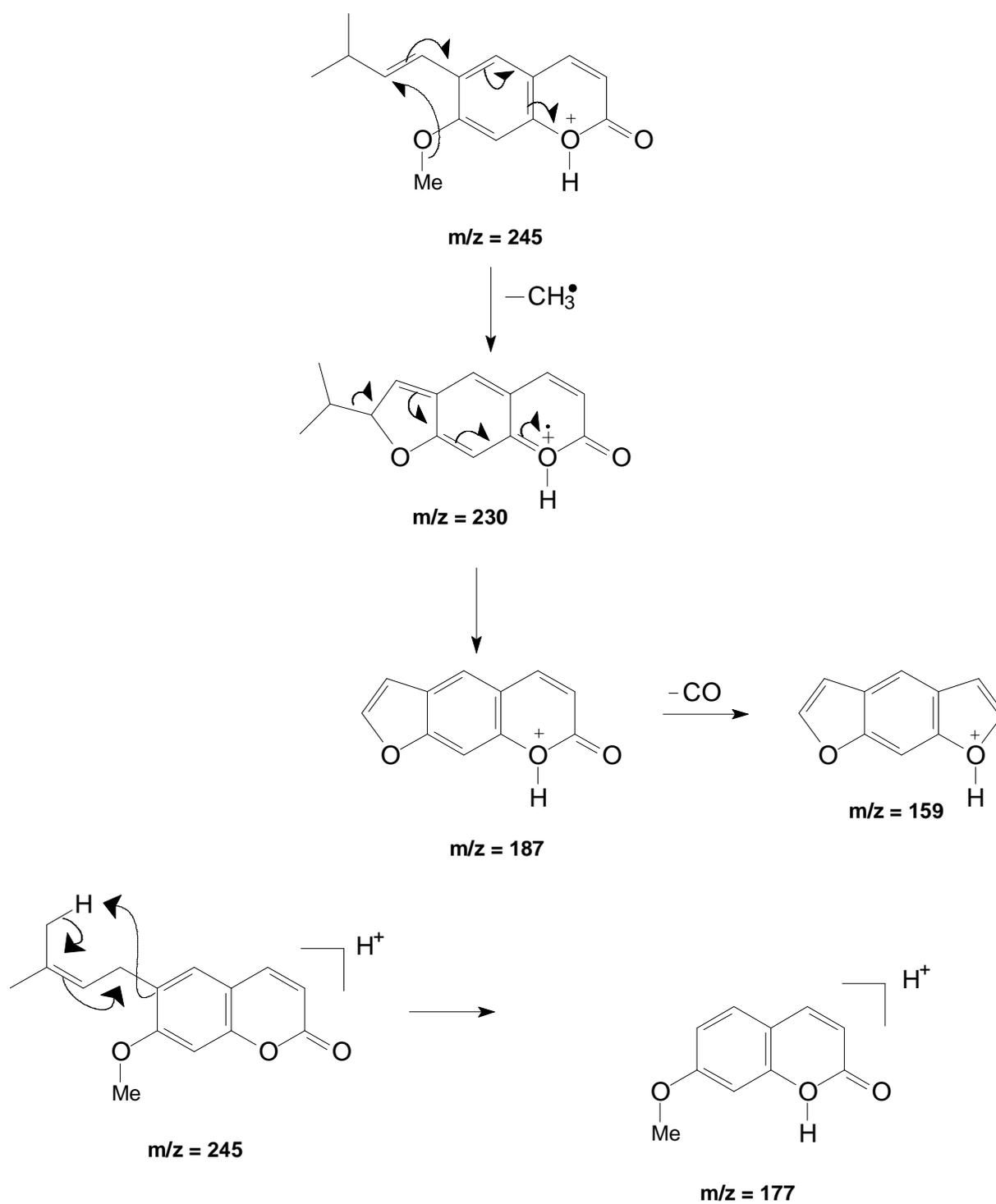


Figura 5.89d. Proposta de fragmentação para a cumarina suberosina.

Tabela 5.23. Extratos das raízes dos citros estudados contendo as cumarinas ostol e suberosina com suas respectivas áreas.

Cumarina	Área do Íon selecionado ($m/z=245$) nas raízes de cada citros estudado				
	RLP	RLC	REC	RESS	RECS
ostol	43419640	7467196	5015809	7038496	6174218
suberosina	10932822	16906664	10302929	10884051	9539211

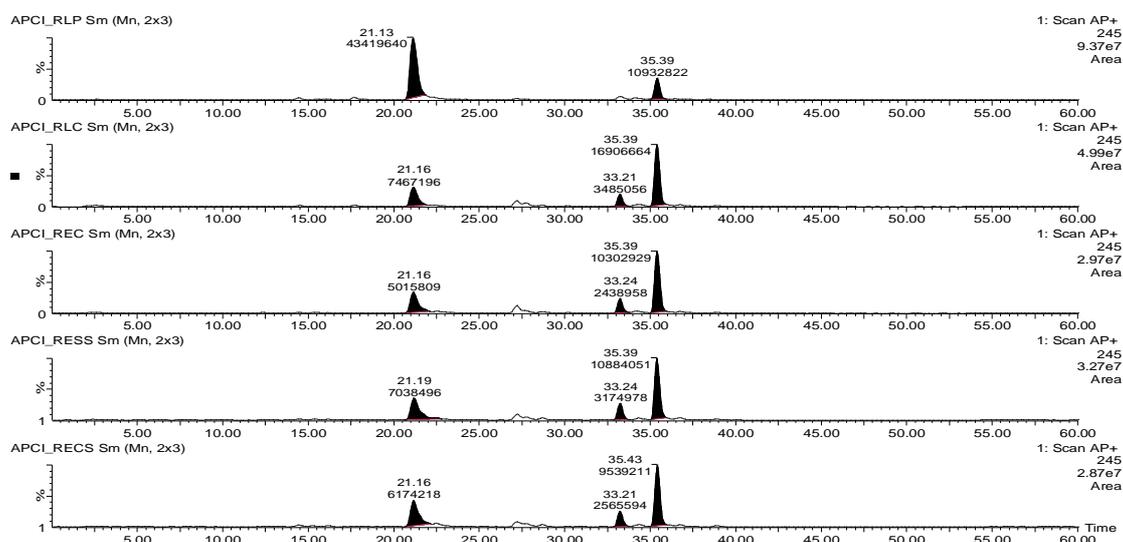


Figura 5.89e. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=245$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

5.7.2.1.4 Sinal cromatográfico 6: cumarina suberenol

A análise da banda cromatográfica denominada 6 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 261 (Figura 5.90a). Este íon aparece em várias outras bandas cromatográficas destas matrizes (Figura 5.90c), mas isto não é estranho, pois este pode ser o fragmento em outras cumarinas presentes nas matrizes, mas sem interesse, pois não houve variação em suas intensidades. Contudo, o espectro de íons produtos de m/z 261 para a banda cromatográfica 6 de Rt 22,5 min (Figura 5.90c) permitiu identificar

com segurança a cumarina suberenol. A proposta de fragmentação para suberenol encontra-se na Figura 5.90b. Dois isômeros desta cumarina foram isolados anteriormente pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar nestas matrizes, os isômeros E e Z. Neste estudo não foi possível verificar se os dois isômeros co-eluíram juntos, pois não se conseguiu estes como padrões. Isto teria sido interessante, pois permitiria verificar se os íons produtos de m/z 261 para elas seriam distintos ou variariam apenas em intensidades.

O cromatograma do íon selecionado m/z 261 com as respectivas áreas (Figura 5.90a) e a tabela 5.24 mostram maior área para aquela das raízes do pé-franco limão cravo (RLC), no enxerto padrão (REC, sem a bactéria) a concentração desta cumarina diminui muito, aumentando quando este enxerto possui a bactéria em seu interior (RECS e RESS, 1,69 e 1,77 vezes o padrão REC, respectivamente). Esta observação permite inferir a mesma hipótese acima. Ou seja, estes dados mais uma vez reforçam a proposta de que a presença do patógeno induz a inibição da rota de prenilação em C-8 em favor daquela em C-6.

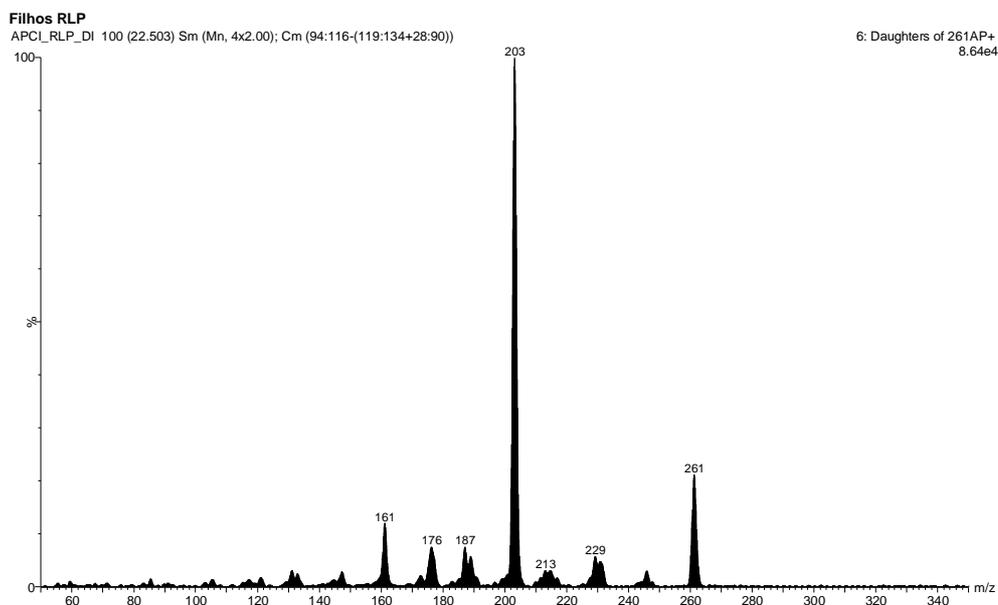


Figura 5.90a. Espectros de massas obtidos para a cumarina suberenol por APCI no modo positivo de análise: Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 261 na forma de $[M+H]^+$.

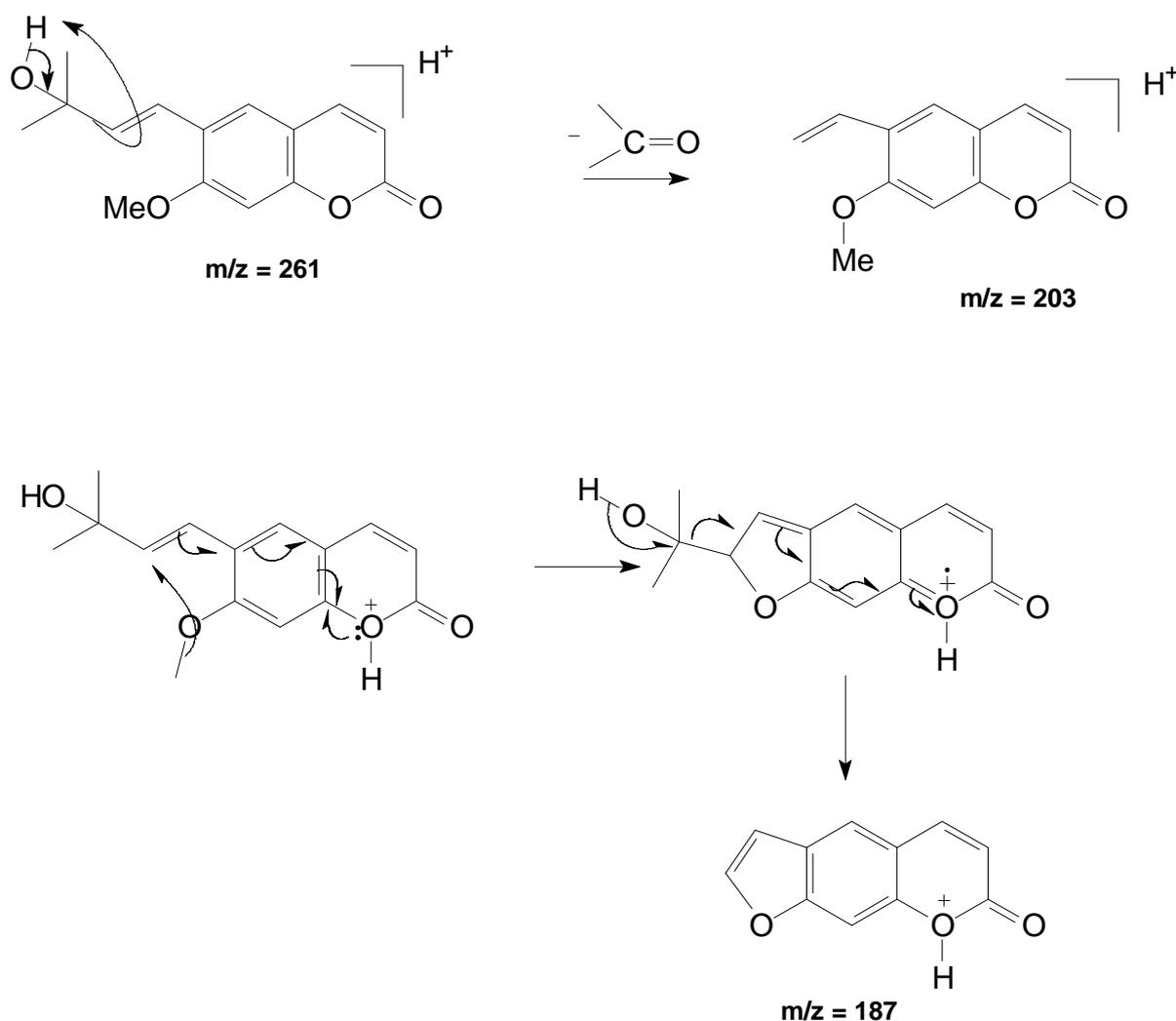


Figura 5.90b. Proposta de fragmentação para a cumarina suberenol.

Tabela 5.24. Extratos das raízes dos citros estudados contendo a cumarina suberenol com suas respectivas áreas.

Cumarina	Área do Íon selecionado ($m/z=261$) nas raízes de cada citros estudado				
	RLP	RLC	REC	RESS	RECS
Suberenol (R6)	874662	996093	684310	1213540	1155967

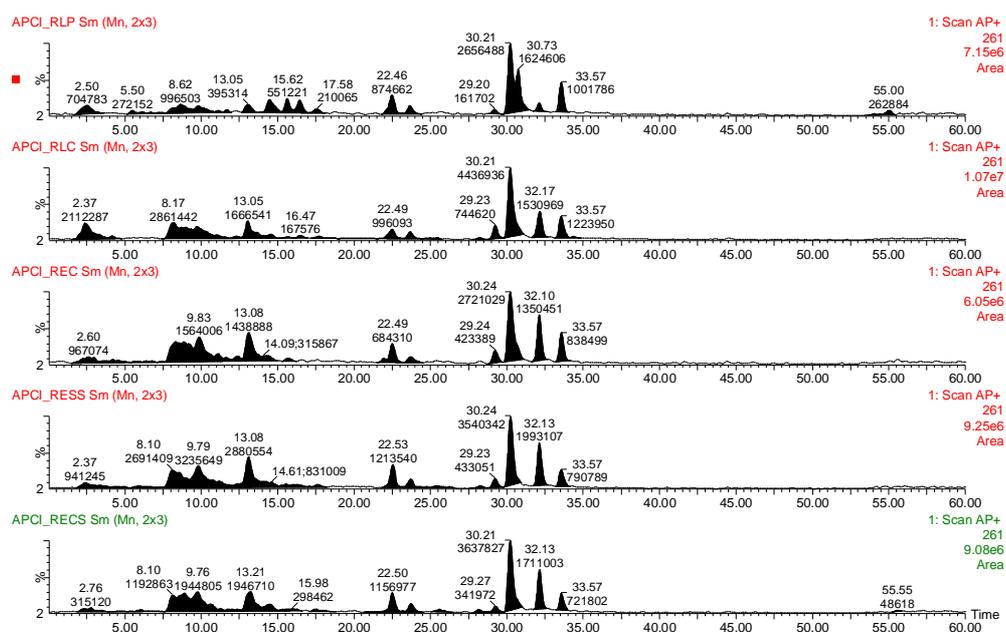


Figura 5.90c. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=261$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

5.7.2.1.5 Sinal cromatográfico 7: cumarina citrubutina

A análise da banda cromatográfica denominada 7 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 243 (Figura 5.91a). Este íon também aparece em várias outras bandas cromatográficas destas matrizes (Figura 5.91b, mas isto não é estranho, pois este pode ser o fragmento em outras cumarinas presentes nas matrizes, mas sem interesse, pois não houve variação em suas intensidades. Contudo, o espectro de íons produtos de m/z 243 para a banda cromatográfica 7 de Rt 22,6 min (Figura 5.91a) permitiu identificar com segurança a cumarina citrubutina. A proposta de fragmentação para citrubutina encontra-se na Figura 5.91c. Esta cumarina não foi citada anteriormente nos citros estudados, provavelmente devido a sua baixa concentração. Ela foi isolada pela primeira vez de *Citrus grandis* e é encontrada também em *Ruta graveolens* (Wu & SHUNG, 1988; STASHENKO *et al.*; 2000).

O cromatograma do íon selecionado m/z 243 com as respectivas áreas (Figura 5.91c) e a tabela 5.25 mostram maior área para aquela das raízes do pé-franco laranja pêra (RLP), aumentando no enxerto padrão (REC, sem a bactéria) e quando este possui a bactéria em seu interior (RECS e RESS, 1,42 e 1,27 vezes o padrão REC, respectivamente). Esta observação permite inferir a mesma hipótese acima. Ou seja, estes dados mais uma vez reforçam a proposta de que a presença do patógeno induz a inibição da rota de prenilação em C-8 em favor daquela em C-6.

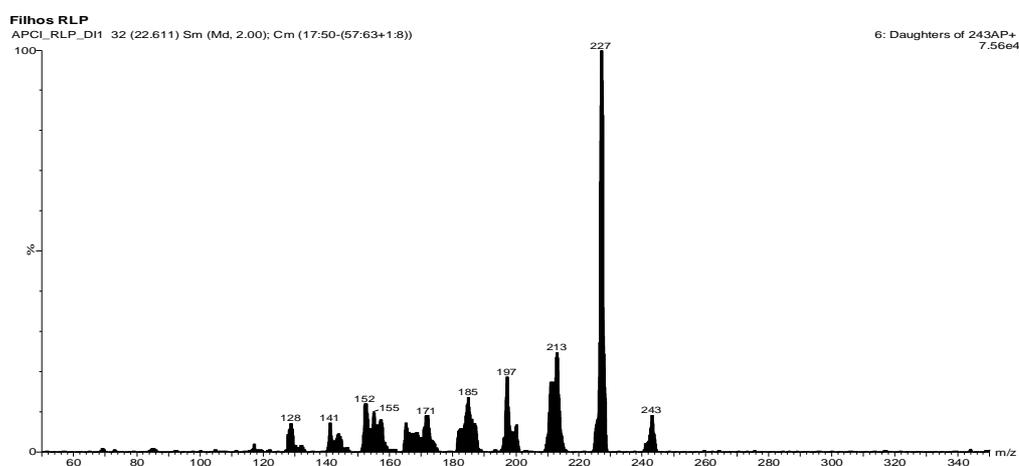


Figura 5.91a Espectros de massas obtidos para a cumarina citrbutina por APCI no modo positivo de análise: B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 243 na forma de $[M+H]^+$.

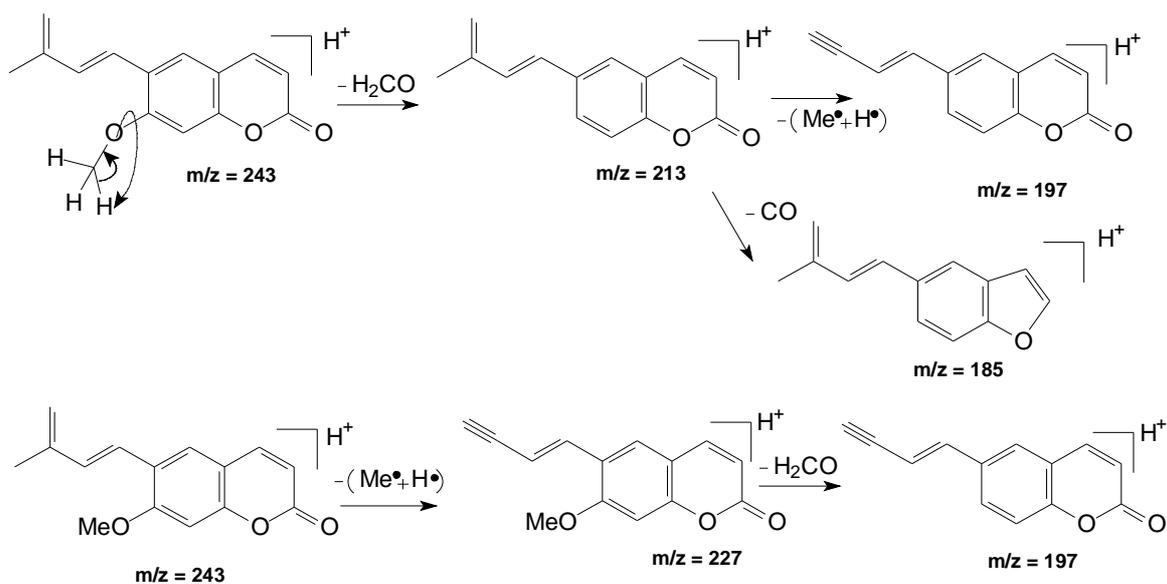


Figura 5.91b. Proposta de fragmentação para a cumarina citrbutina.

Tabela 5.25. Extratos das raízes de *citrus* contendo a cumarina citrubutina com suas respectivas áreas.

Cumarina	Área do Íon selecionado ($m/z=261$) nas raízes de cada citros estudados				
	RLP	RLC	REC	RESS	RECS
citrubutina	1342985	1223010	1562447	1984558	2222058

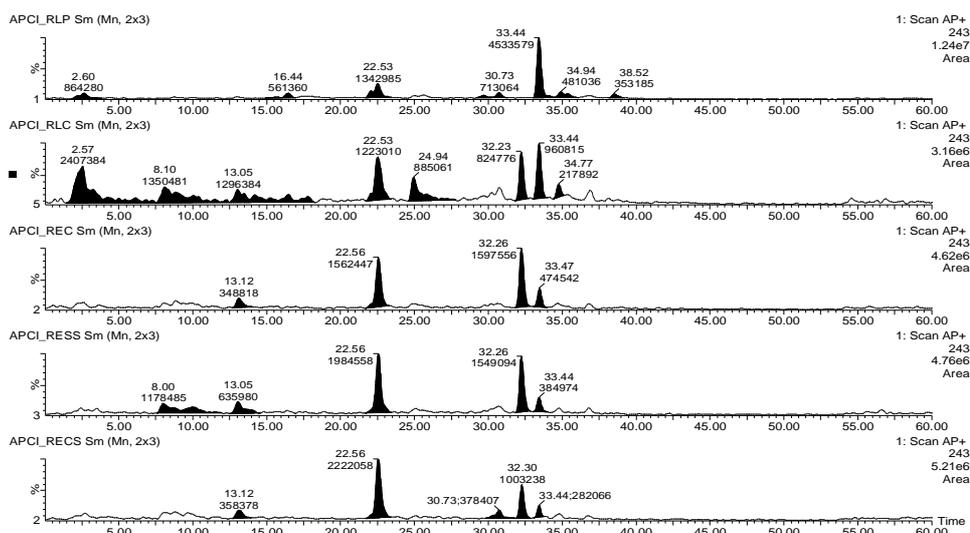


Figura 5.91c Cromatograma de íons selecionados ($m/z=243$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

5.7.2.1.6 Sinal cromatográfico 11: cumarina nordentatina

A análise da banda cromatográfica denominada 11 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 313. O espectro de íons produtos de m/z 313 para a banda cromatográfica 11 de Rt 36,71 min (Figura 5.92a) permitiu identificar a cumarina nordentatina. A proposta de fragmentação para nordentatina encontra-se na Figura 5.92c. Esta cumarina foi isolada anteriormente do enxerto padrão (REC) pelo grupo de PN da UFSCar.

O cromatograma do íon selecionado m/z 313 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.92b) mostra maior área para aquela das raízes do pé-franco limão cravo (RLC), no enxerto padrão (REC, sem a bactéria) a concentração desta cumarina diminui, aumentando um pouco quando este enxerto possui a bactéria em seu interior (RECS e RESS, 1,06 e 1,19 vezes o enxerto padrão RLC, respectivamente). A cumarina nordentatina deriva biossinteticamente da xantiletina por uma hidroxilação em C-5 e uma prenilação em C-8, mas o ataque ocorre em C-3' da unidade dimetilalilpirofosfato. A pequena variação na concentração desta cumarina na planta com CVC mostra novamente que a prenilação em C-8 é bem menos favorecida que aquela em C-6 na presença do patógeno.

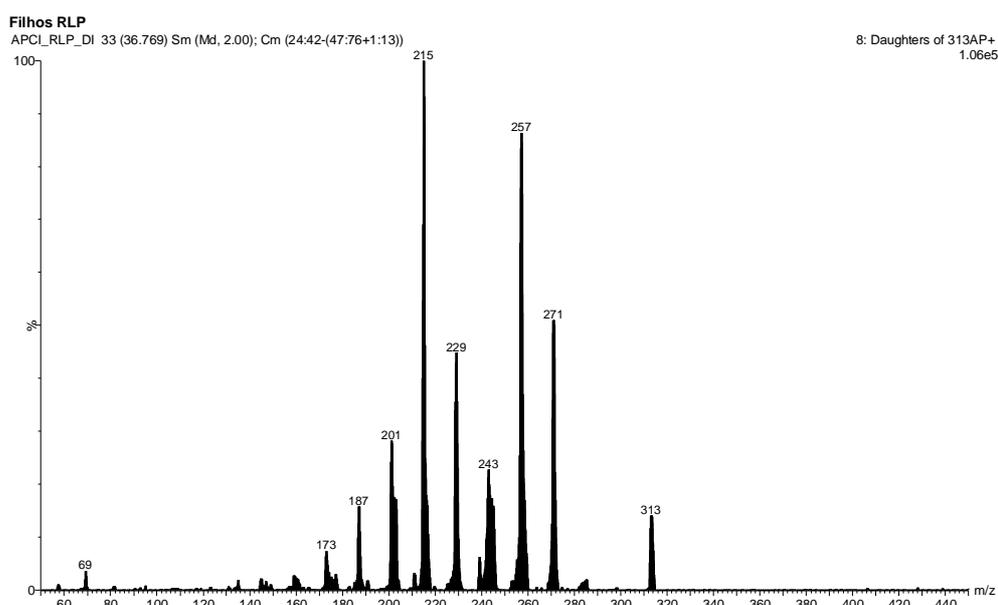


Figura 5.92a. Espectro de massas obtido para a cumarina nordentatina por APCI no modo positivo de análise: B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 313 na forma de $[M+H]^+$.

Tabela 5.27. Extratos das raízes dos citros estudados contendo a cumarina nordentatina com suas respectivas áreas.

Cumarina	Área do Íon selecionado ($m/z = 313$) nas raízes de cada citros estudado				
	RLP	RLC	REC	RESS	RECS
nordentatina	4245070	22286730	13220985	15692293	13982694

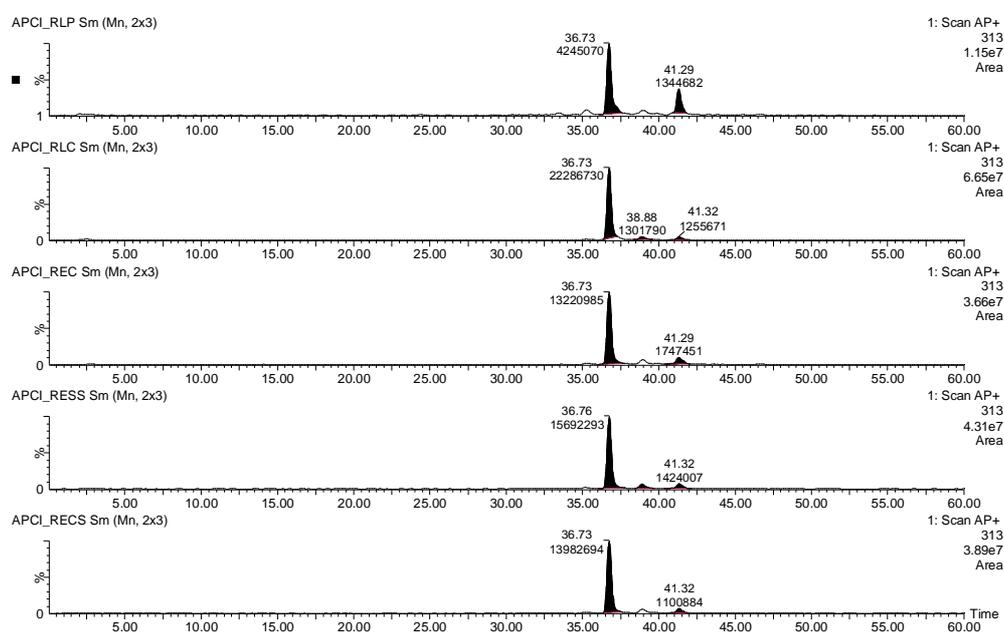


Figura 5.92b. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=313$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

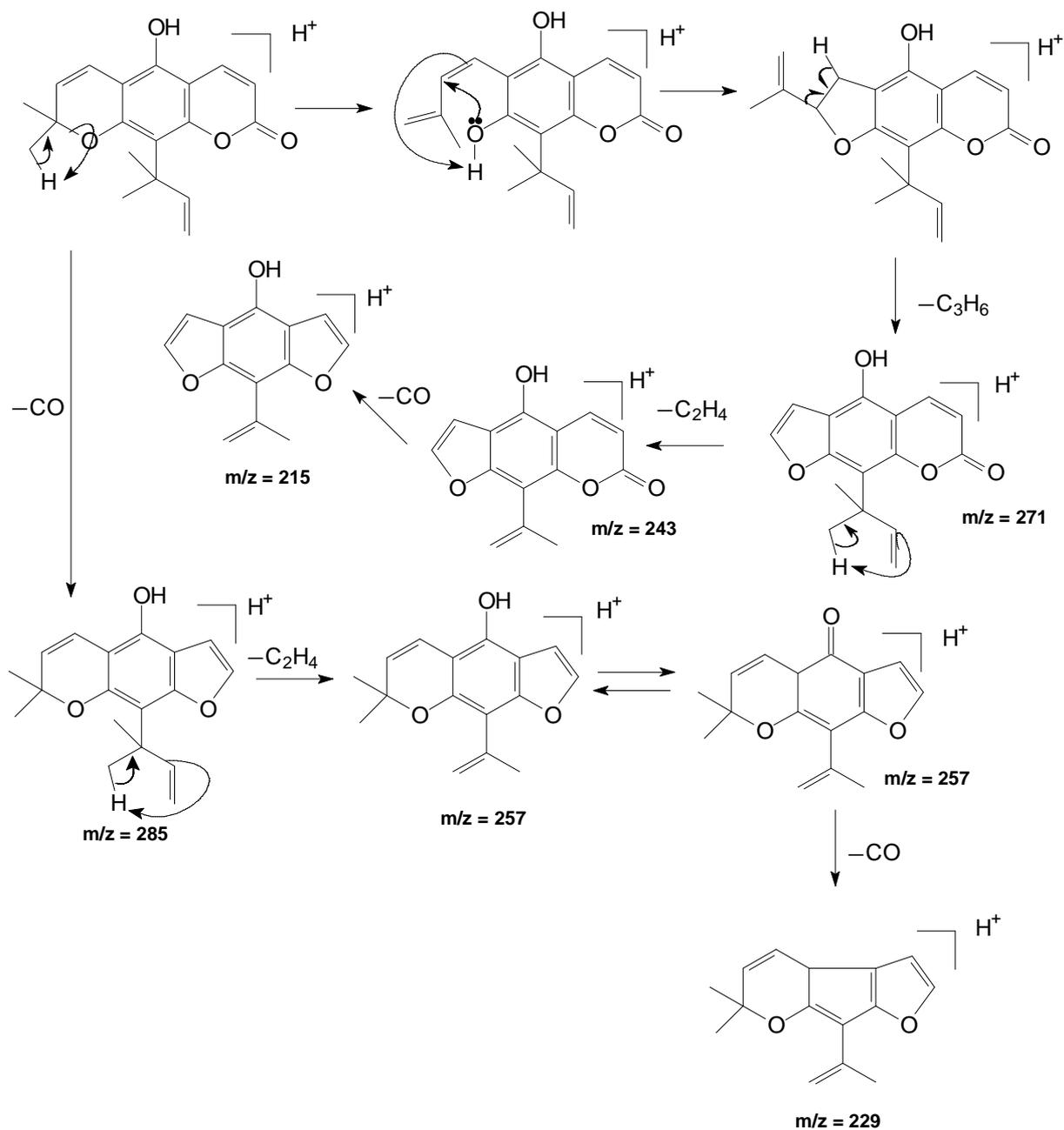


Figura 5.92c. Proposta de fragmentação para a cumarina nordentatina.

5.7.2.1.7 Sinal cromatográfico 12: cumarina clausarina

A análise da banda cromatográfica denominada 12 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 381. O espectro de íons produtos de m/z 381 para a banda cromatográfica 12 de R_t 40,90 min (Figura 5.93a) permitiu identificar a cumarina clausarina. A proposta de fragmentação para clausarina encontra-se na Figura 5.93c. Esta cumarina foi isolada anteriormente do enxerto padrão (REC) pelo grupo de PN da UFSCar.

O cromatograma do íon selecionado m/z 381 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.93b e tabela 5.28) mostra áreas similares para as raízes do pé-franco limão cravo (RLC) e laranja pêra (RLP). No enxerto padrão (REC, sem a bactéria) a concentração desta cumarina aumenta muito, diminuindo quando este enxerto possui a bactéria em seu interior (RECS e RESS, 1,70 e 1,09 vezes o enxerto padrão RLC, respectivamente). Estes dados mais uma vez reforçam a proposta de que presença do patógeno induz a inibição da rota de prenilação em C-8 e C-3 em favor daquela em C-6.

Tabela 5.28. Extratos das raízes dos citros estudados contendo a cumarina clausarina com suas respectivas áreas.

Cumarina	Área do Íon selecionado ($m/z = 381$) nas raízes de cada citros estudado				
	RLP	RLC	REC	RESS	RECS
clausarina	1778637	1813764	3192502	2911658	1878310

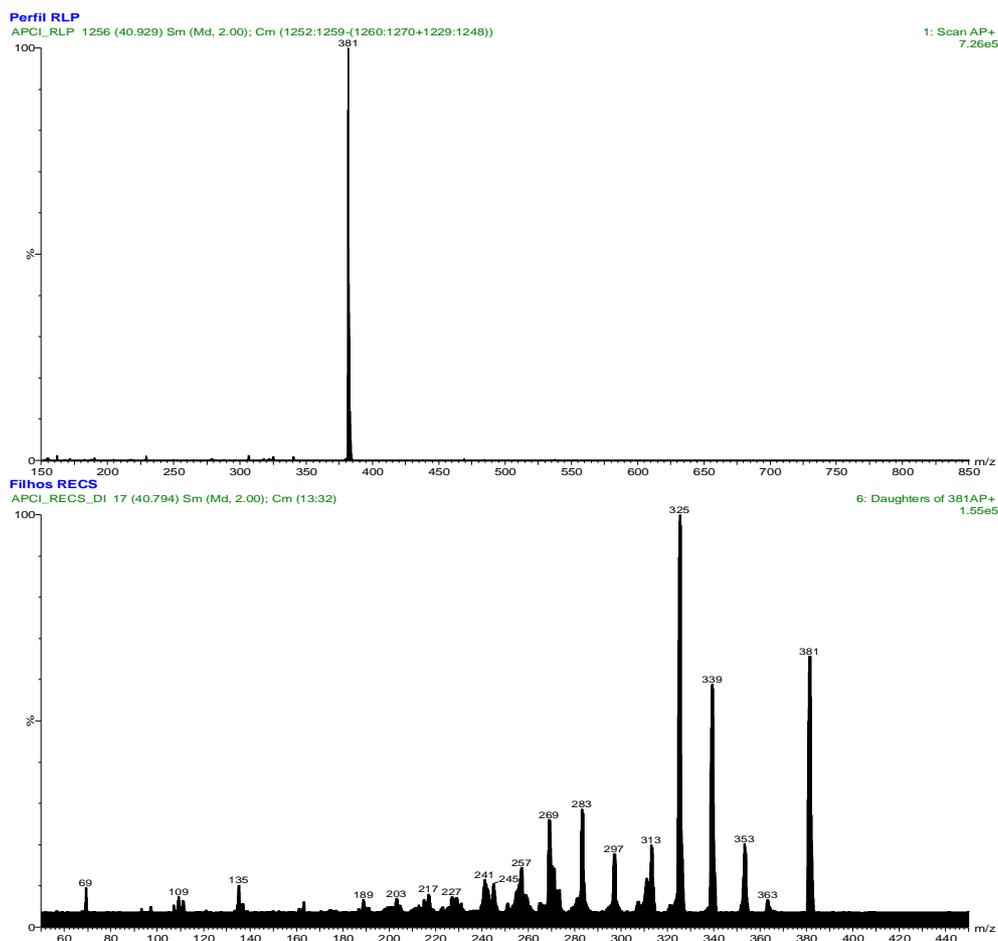


Figura 5.93a. Espectros de massas obtidos para cumarina clausarina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *ion selecionado*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 381 na forma de $[M+H]^+$.

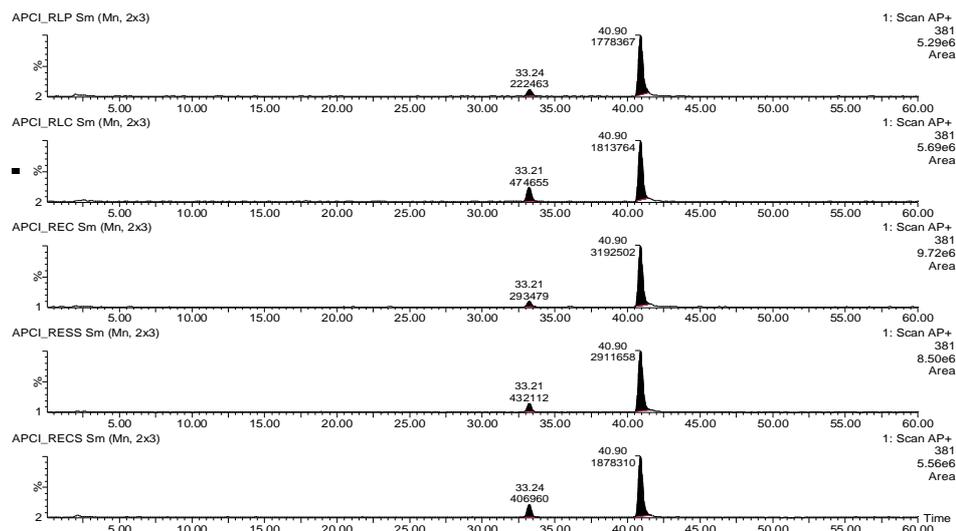


Figura 5.993b. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=381$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

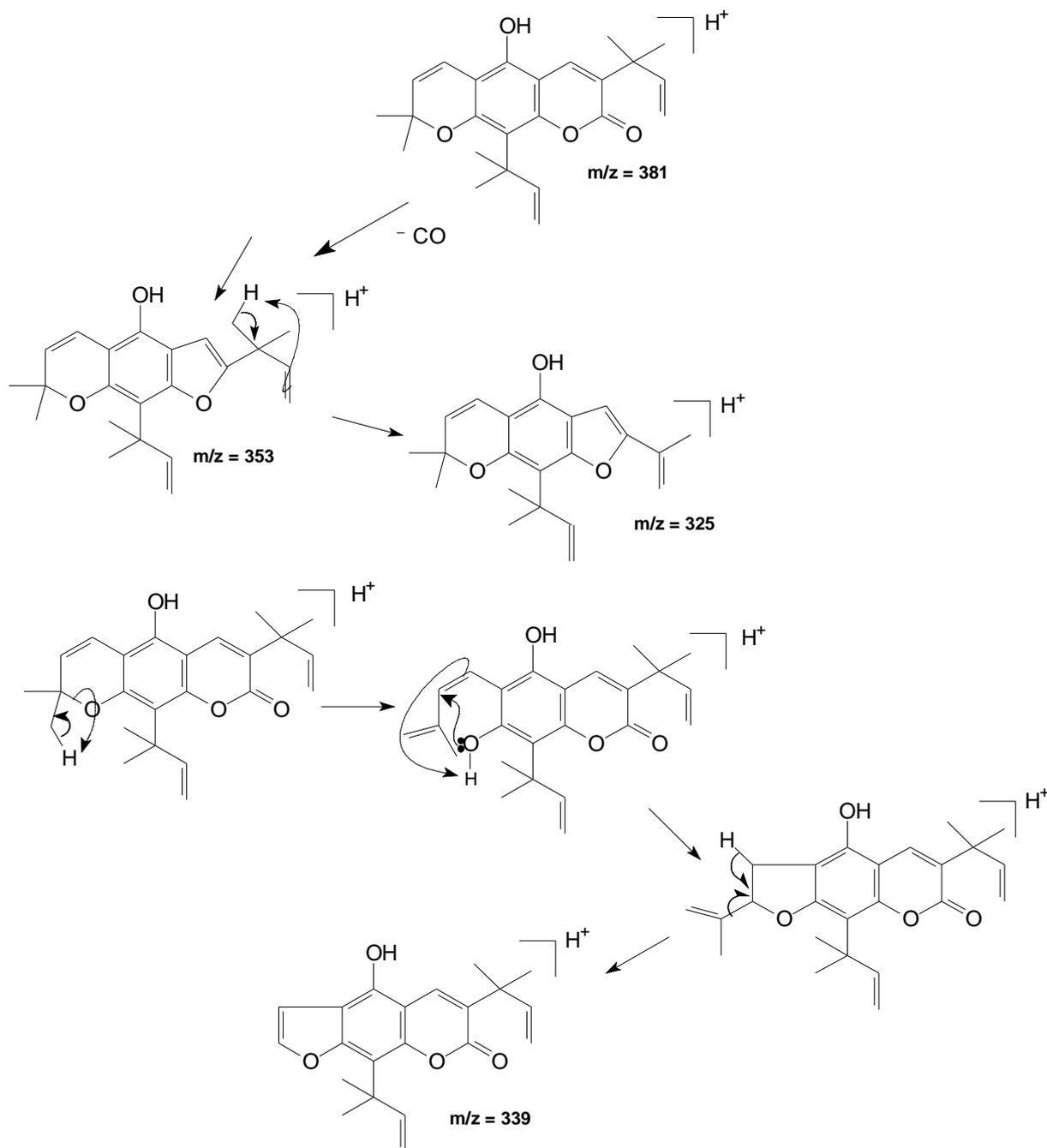


Figura 5.93c. Proposta de fragmentação para a cumarina clausarina.

5.7.2.1.8 Sinal cromatográfico 9: limonóide limonina

A análise da banda cromatográfica denominada 9 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 471. O espectro de íons produtos de m/z 471 para a banda cromatográfica 9 de R_t 38,5 min (Figura 5.94a) permitiu identificar o limonóide limonina. A proposta de fragmentação para a limonina encontra-se na Figura 5.94c. Este limonóide foi isolado anteriormente das raízes do enxerto padrão (REC) pelo grupo de PN da UFSCar.

O cromatograma do íon selecionado m/z 471 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.94b) mostra que a limonina foi detectada apenas na raiz laranja pêra. Nas demais matrizes sua concentração deve estar muito baixa, pois o software não reconheceu como área, e não conseguiu integrar.

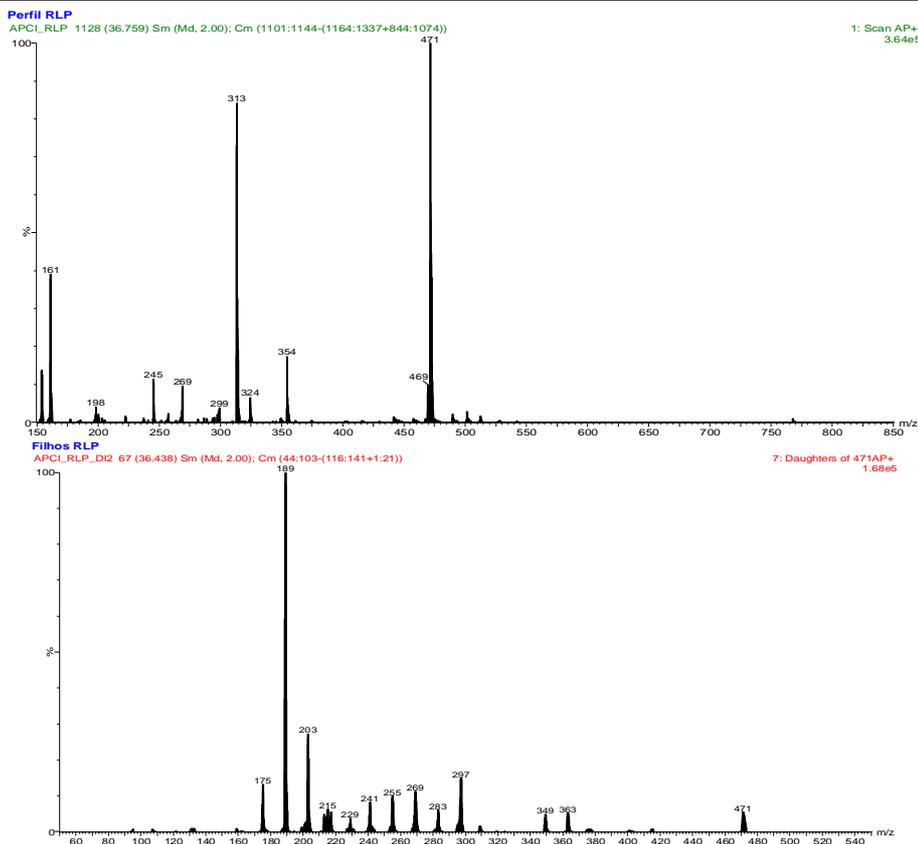


Figura 5.94a. Espectros de massas obtidos para o limonóide limonina por APCI no modo positivo de análise: A) Espectro *ion selecionado*; B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 471 na forma de $[M+H]^+$.

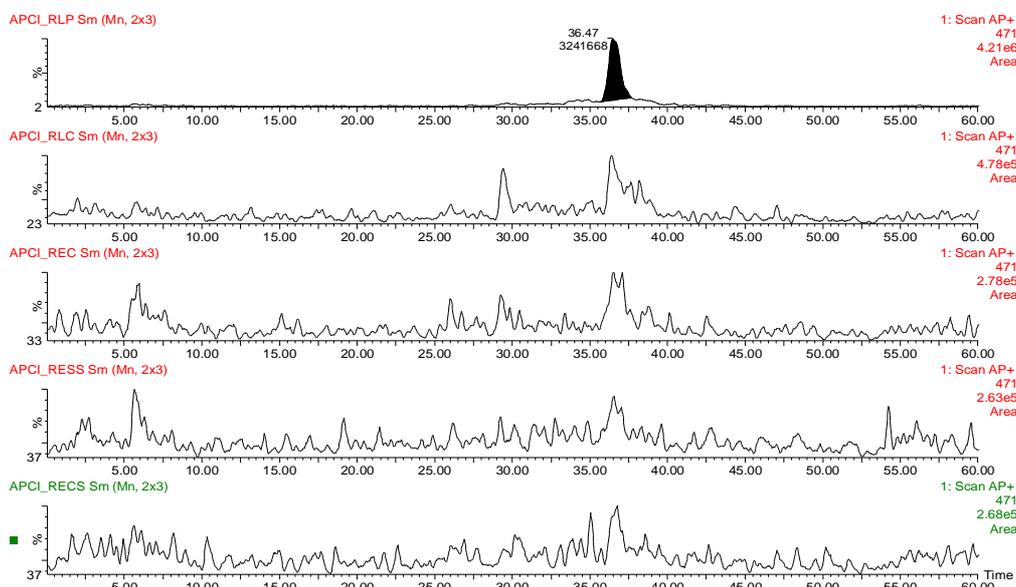


Figura 5.94b. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=471$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das raízes RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

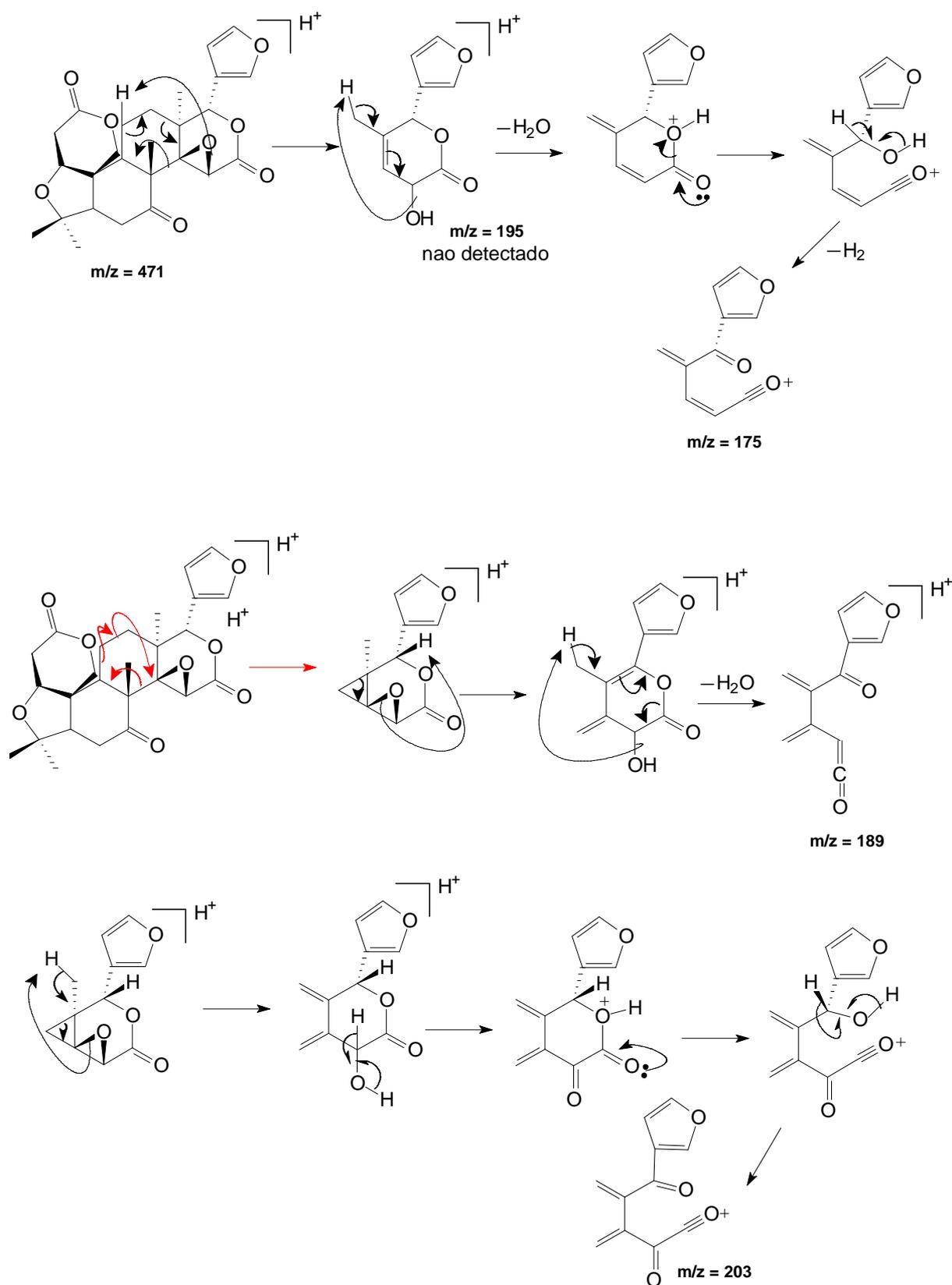


Figura 5.94c. Proposta de fragmentação para o limonóide limonina.

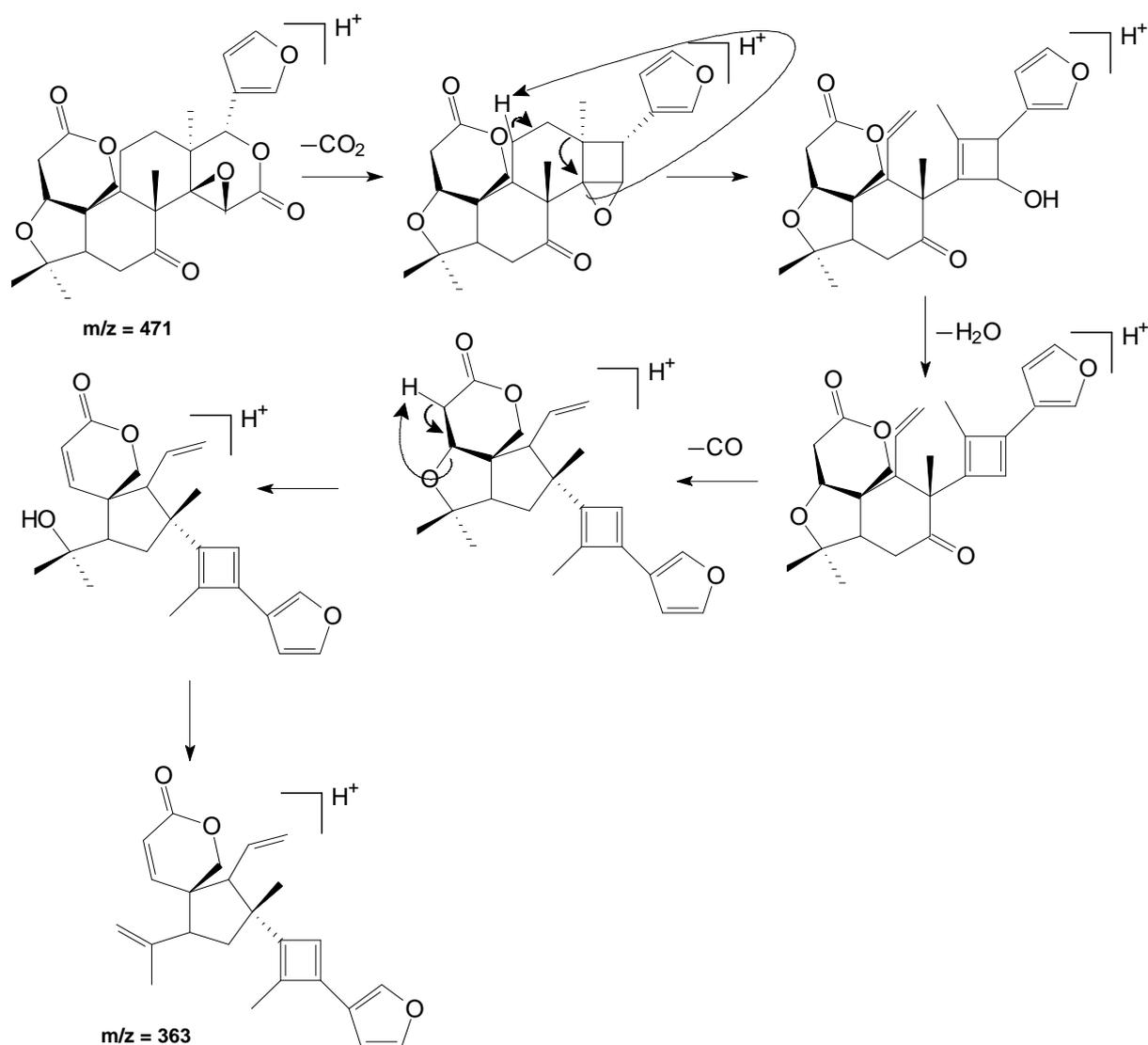


Figura 5.94d. Continuação da proposta de fragmentação para o limonóide limonina.

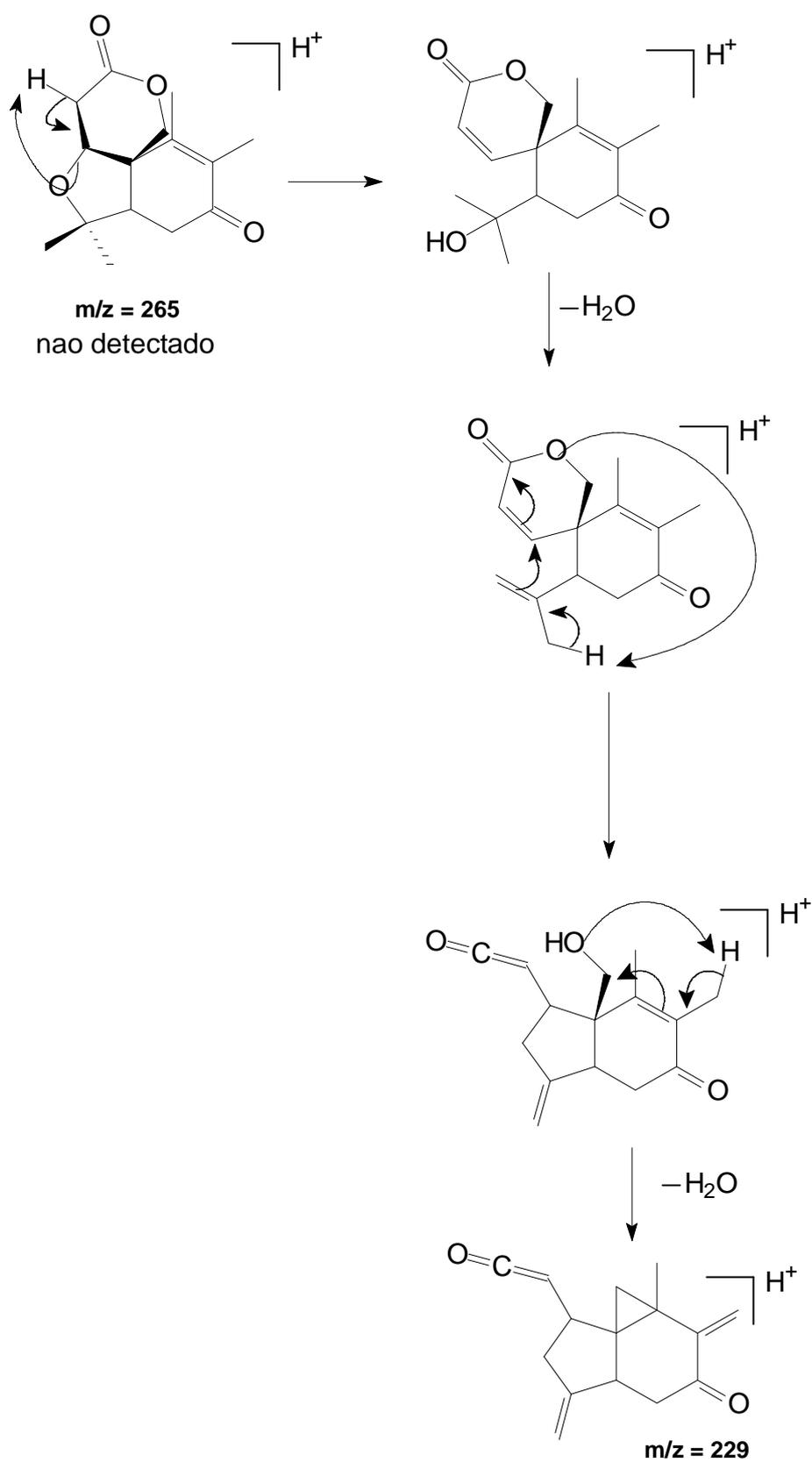


Figura 5.94e. Continuação da proposta de fragmentação para o limonóide limonina.

5.7.2.1.9 Sinal cromatográfico 10: limonóide limonina diosfenol (R10)

A banda cromatográfica 10 corresponde a dois limonóides, ou seja, os dois co-eluíram em R_t 38,5 min, um deles é a limonina discutida no item anterior. A segunda análise desta banda por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 485. O espectro de íons produtos de m/z 485 para a banda cromatográfica 10 (Figura 5.95b) também permitiu identificar o limonóide limonina diosfenol. A proposta de fragmentação para limonina diosfenol encontra-se na Figura 5.93d. Este limonóide não foi isolado anteriormente nas raízes do enxerto padrão (REC) pelo grupo de PN da UFSCar.

O cromatograma do íon selecionado m/z 485 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.93a) e a tabela 5.29 mostram para a banda das raízes do pé-franco laranja pêra (RLP) uma área 25,1 vezes maior que aquela do limão cravo (RLC). No enxerto padrão (REC, sem a bactéria) a concentração deste limonóide nas raízes é um pouco menor que aquela do limão cravo, diminuindo um pouco quando este enxerto possui a bactéria em seu interior (RECS e RESS, 1,07 e 1,38 vezes o enxerto padrão REC, respectivamente). Estes dados indicam o que era esperado pelas definições de enxertia, em que a planta mantém as características das plantas de origem, com pequenas variações. Ou seja, as raízes do enxerto de Cs-CI assemelham-se mais às daquelas do limão cravo de origem e não às daquelas da laranja pêra que origina a copa da planta. A diminuição na concentração deste metabólito nas plantas com a bactéria em seu interior poderia ser uma reação ao patógeno. Não é claro se estaria havendo uma inibição do caminho que leva aos terpenos em favor daquele do chiquimato, levando a maiores concentrações das cumarinas como foi visto nos itens anteriores.

O composto identificado como 10, o limonóide limonia diosfenol, é bastante conhecido na Família Rutaceae sendo encontrado em *Dictamnus angustifolius* (WU *et al.*; 1999), *Evodia rutaecarpa* (Xiu-Wei & Jie, 2007), *Evodia fargesii* Dode (QUAN-WEN *et al.*; 2006), dentre outras.

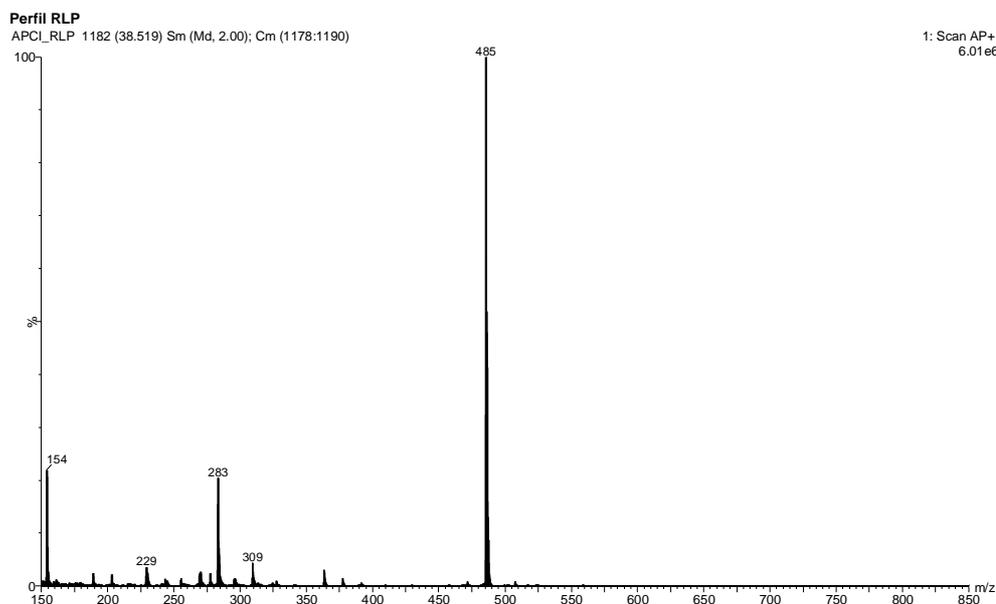


Figura 5.95a. Espectro de massas obtido para o limonóide limonina diosfenol por APCI no modo positivo de análise: Espectro *ion selecionado*.

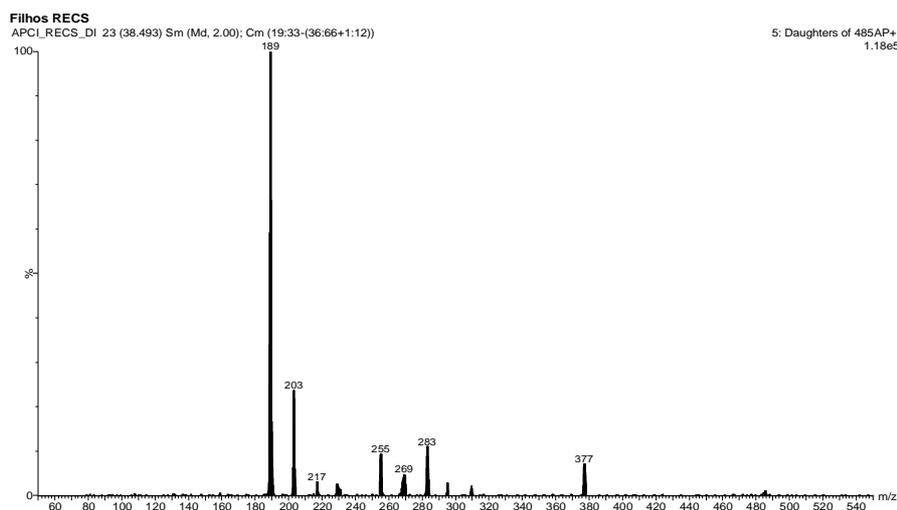


Figura 5.95b. Espectro de massas obtido para o limonóide limonina diosfenol por APCI no modo positivo de análise: B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 485 na forma de $[M+H]^+$.

Tabela 5.29. Extratos das raízes dos citros estudados contendo o limonóide limonina diosfenol com suas respectivas áreas.

Cumarina	Área do Íon selecionado ($m/z = 485$) nas raízes de cada citros estudado				
	RLP	RLC	REC	RESS	RECS
Limonina	17004330	678163	511937	371515	474807
diosfenol					

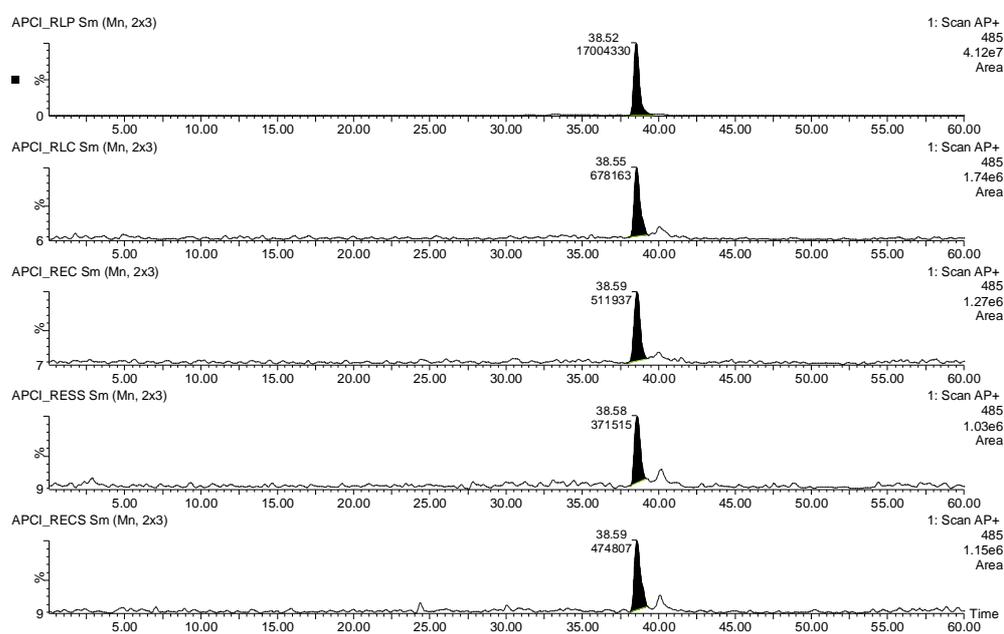


Figura 5.95c. Cromatograma de íons selecionados ($m/z=485$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

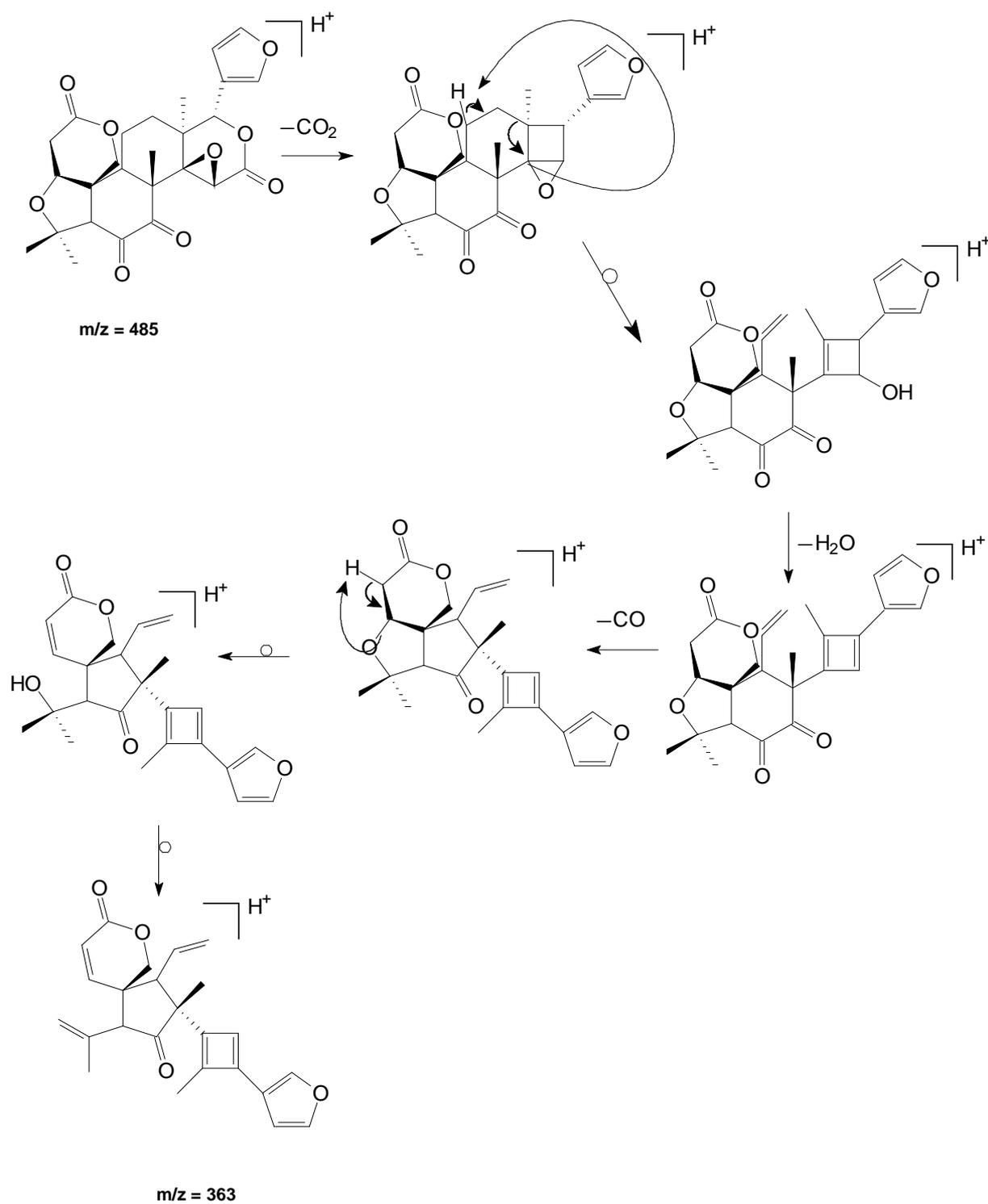


Figura 5.95d. Proposta de fragmentação para o limonóide limonina diosfenol.

5.7.3 Análise da variação do perfil químico das folhas dos citros estudados

Os perfis cromatográficos das folhas dos citros estudados estão mostrados nas Figuras 5.96 e 5.97.

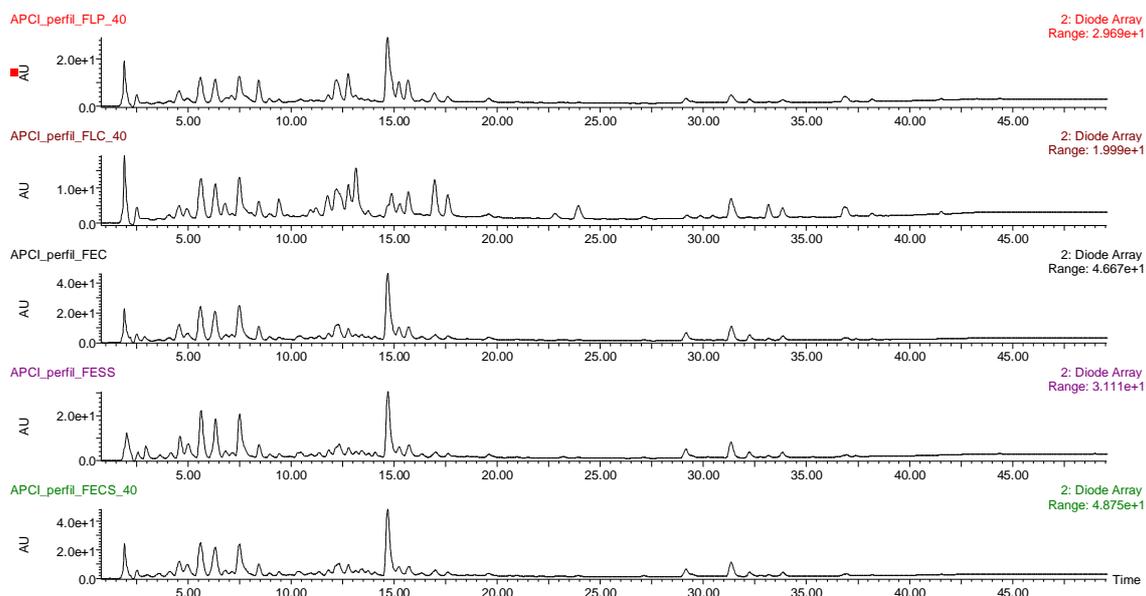


Figura 5.96. Cromatogramas HPLC-DAD comparativos dos extratos das folhas dos citros estudados.

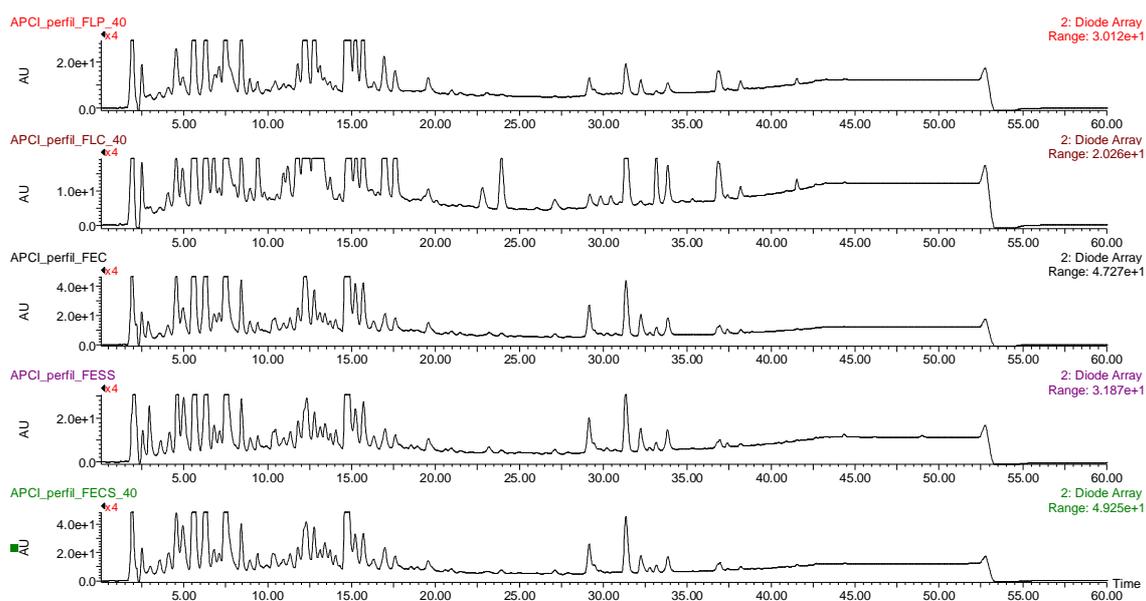


Figura 5.97. Ampliação dos cromatogramas HPLC-DAD comparativos dos extratos das folhas dos citros estudados.

Analisando a Figura 5.96 observa-se a presença de uma banda intensa no tempo de retenção de aproximadamente 15 minutos. Essa banda foi previamente identificada e até mesmo quantificada, correspondendo aos flavonóides hesperidina e rutina que nestas condições possuem o mesmo tempo de retenção (co-eluição). Ao se aplicar um zoom nos cromatogramas observa-se uma gama de metabólitos com uma boa separação cromatográfica. Uma análise superficial dos cromatogramas ampliados permite considerá-los muito similares, as bandas cromatográficas diferenciam-se em intensidades nas respectivas matrizes das folhas analisadas. Nas matrizes das folhas do limão cravo (FLC) aparecem duas bandas em torno de $R_t = 24,0$ minutos, que visivelmente são características somente destas plantas. Vários destes metabólitos foram identificados via a técnica de APCI no modo positivo de ionização. A Figura 5.98 apresenta o cromatograma de íons totais destas matrizes.

Os cromatogramas do íon selecionado com as respectivas áreas para cada matriz analisada permitem inferir sobre as diferentes concentrações dos respectivos metabólitos nas folhas dos citros estudados, pois os experimentos foram feitos com concentrações iguais de cada matriz analisada. Estas discussões serão feitas nos próximos itens.

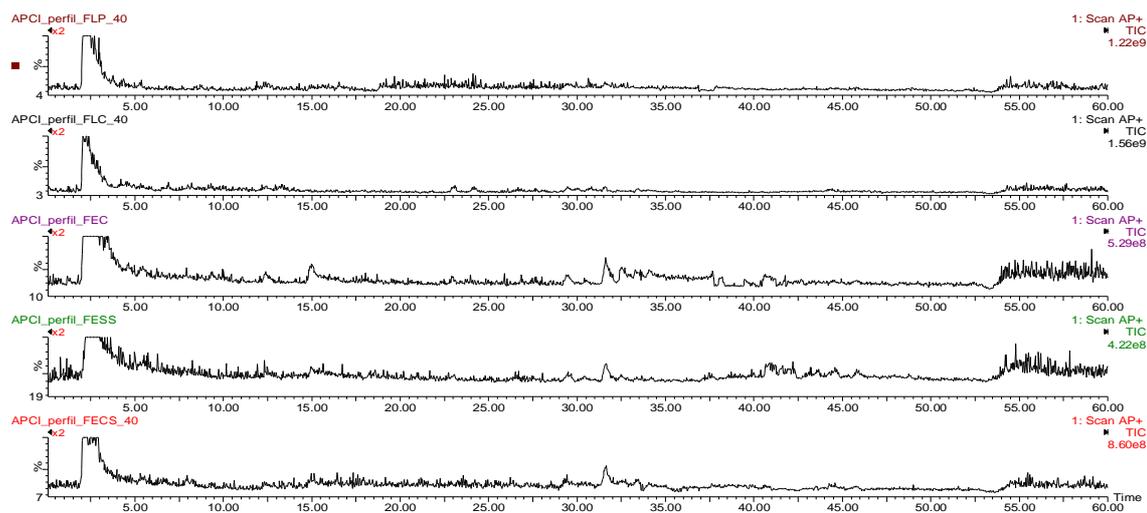


Figura 5.98. Cromatogramas de íons totais (TIC) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.

5.7.3.1 Identificação das bandas cromatográficas nas folhas dos citros estudados

Os espectros de massas, os tempos de retenções referentes à corrida cromatográfica via HPLC-DAD e os íons produtos formados a partir dos íons observados no TIC por APCI no modo positivo de ionização dos extratos das folhas dos citros estudados, FLP, FLC, FEC, FECS e FESS, permitiram identificar 8 metabólitos secundários de média polaridade. A maioria deles são flavonóides previamente isolados e identificados pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, presentes nas folhas dos citros estudados.

O cromatograma HPLC-DAD das folhas do limão cravo foi utilizado como modelo para mostrar as oito bandas cromatográficas identificadas (Figura 5.99).

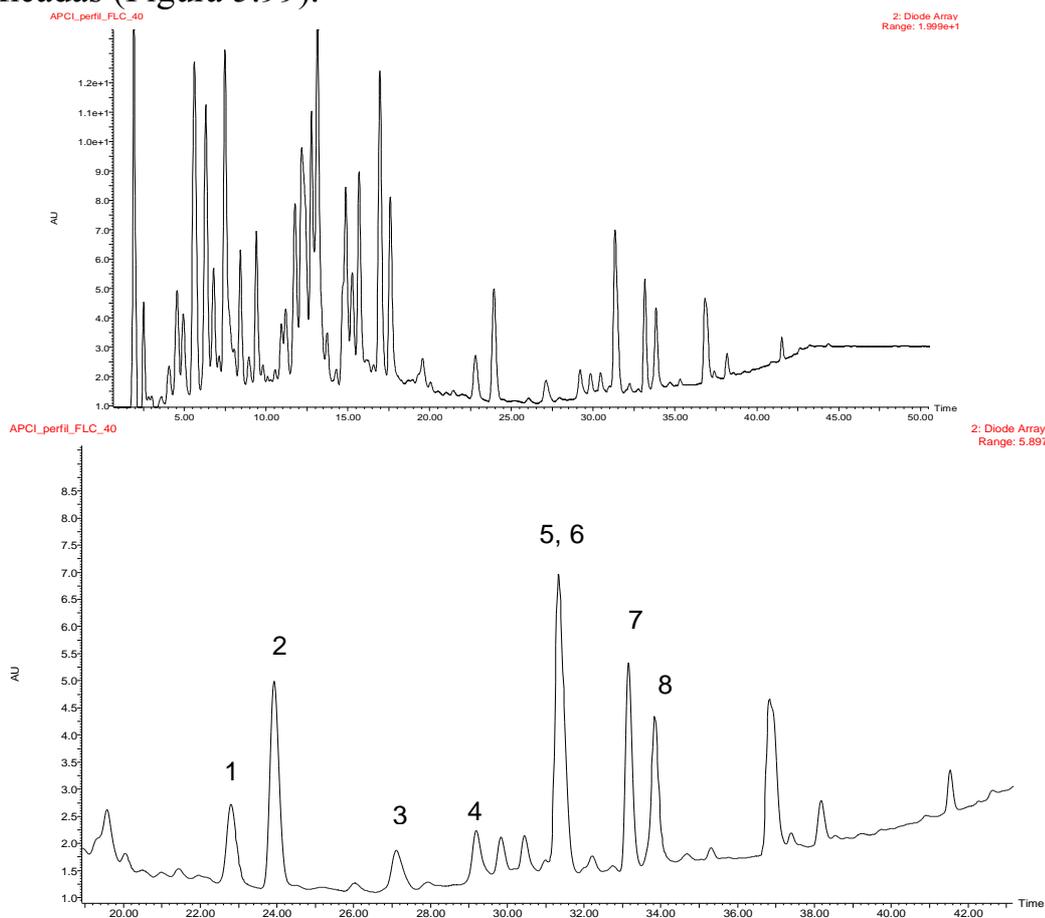


Figura 5.99. Cromatogramas HPLC-DAD comparativos do extrato das folhas do limão cravo com os respectivos sinais cromatográficos identificados.

Estas matrizes também foram analisadas por LC-NMR, e alguns dos metabólitos identificados via LC-MS/MS foram confirmados utilizando os seus dados de RMN de ^1H , obtidos com esta segunda metodologia. Nas análises onde isto foi possível as discussões serão feitas com ambos os dados. Infelizmente, para esta tese não houve tempo hábil para analisar os extratos das raízes dos citros estudados utilizando a técnica de LC-NMR, pois este equipamento chegou ao DQ-UFSCar recentemente.

As Figuras 5.100 e 5.101 mostram como modelo os cromatogramas obtidos utilizando a técnica de LC-NMR nas análises das folhas do limão cravo (FLC).

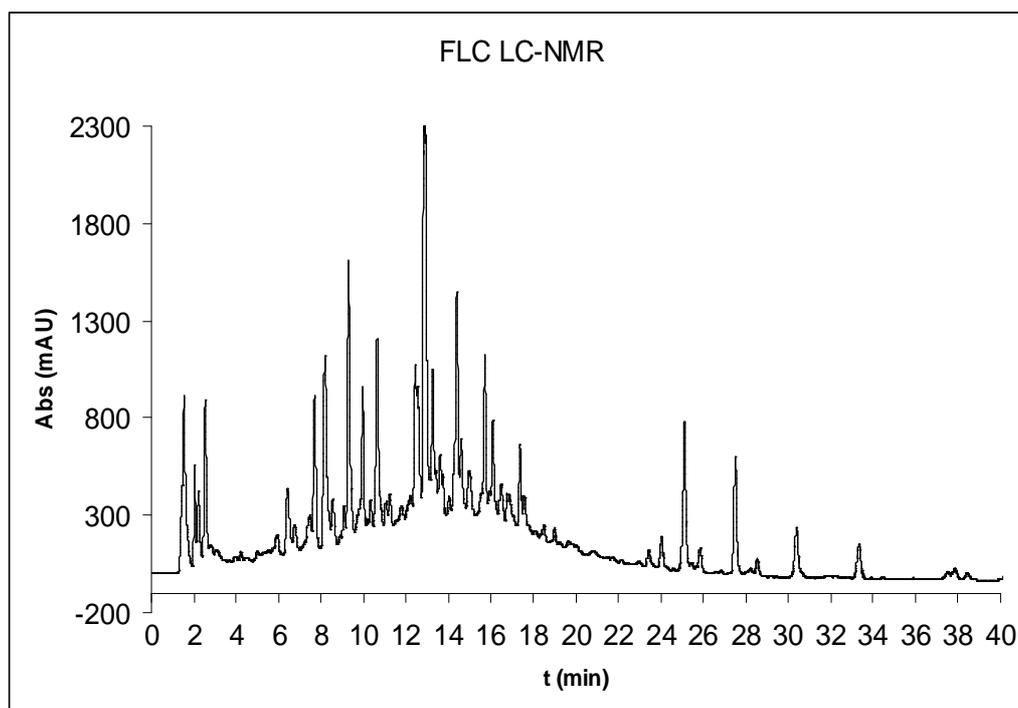


Figura 5.100. Projeção do Cromatograma de LC-NMR das folhas do limão cravo obtido via software Micronal Origin.

Analysis Info

Analysis Name E:\091215_UFSCar\lc\OrangeBR\FLC_112409_1109.d
Method Citrus.m
Sample Name FLC_112409
Comment

Acquisition Date 26.11.2009 16:15:06

Operator mago
Instrument micrOTOF

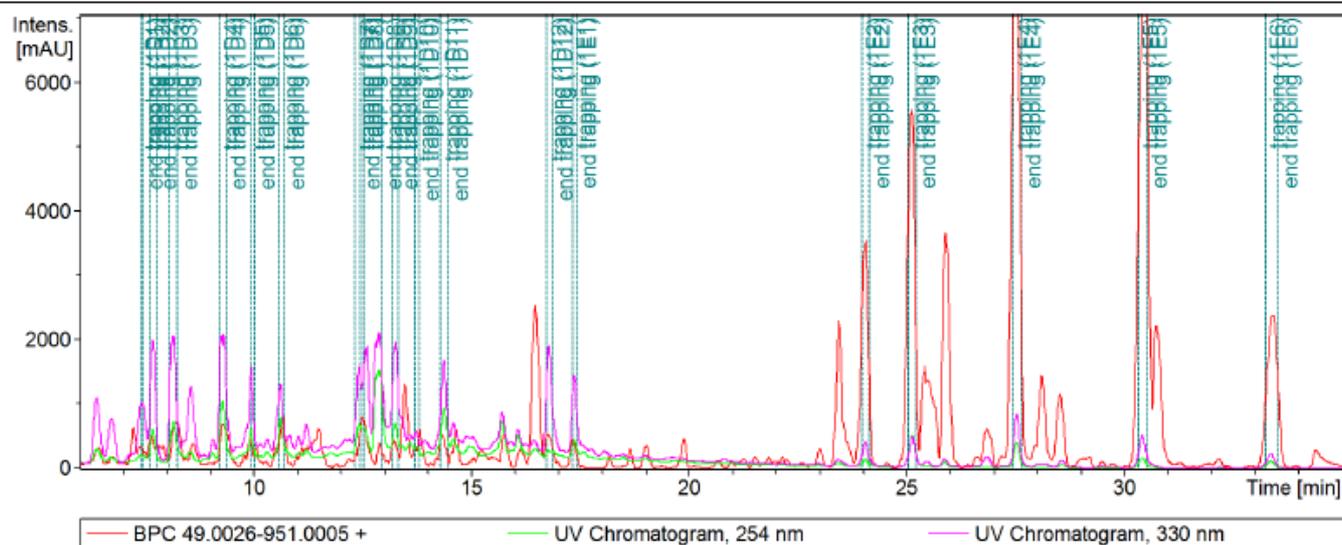


Figura 5.101. Cromatograma de HPLC-NMR das folhas do limão cravo especificando as bandas cromatográficas “trapeadas” em cartucho de SPE para posterior análise.

Comparando os cromatogramas obtidos pelas técnicas LC-MS/MS e LC-NMR pode se verificar que as bandas basicamente são as mesmas nos primeiros 25 minutos, posteriormente há uma diferença de aproximadamente 2 min. a mais no tempo de retenção de cada metabólito na técnica de LC-NMR. Isto pode ser exemplificado pelo tempo de retenção do metabólito correspondente à banda 1, o qual em LC-MS/MS eluiu num R_t de aproximadamente 22,5 min e na técnica de LC-NMR em 24,3 min aproximadamente.

5.7.3.1.1 Sinal cromatográfico 1: cumarina limetina ou citropteno

A análise da banda cromatográfica denominada 1 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 207. O espectro de íons produtos de m/z 207 para a banda cromatográfica 1 de R_t 22,5 min (Figura 5.103) permitiu identificar uma cumarina dimetoxilada, podendo ser escoparona (6,7-dimetoxicumarina), 6,8-dimetoxicumarina, limetina ou citropteno (5,7-dimetoxicumarina) ou 7,8-dimetoxicumarina. Considerando íon produto m/z 192 com uma intensidade relevante, este poderia levar a sugerir a cumarina escoparona (6,7-dimetoxicumarina), pois nesta estrutura a perda de uma metila radicalar do íon quasimolecular 207 levaria um fragmento com melhor estabilidade entre todos os demais isômeros (Figura 5.105). A 6,8-dimetoxicumarina também levaria a um fragmento estável, mas esta não é conhecida como natural em planta superior, e portanto seria descartada. Este modelo é excelente para se mostrar a importância do uso de padrões ou da técnica de LC-NMR. Neste trabalho contou-se com poucos padrões, pois o grupo onde os estudos foram realizados vem utilizando os metabólitos isolados em bioensaios. Felizmente o LC-NMR forneceu para a banda cromatográfica denominada 1 o espectro de RMN de ^1H que se encontra na figura 5.104, o qual mostrou dois dubletos em δ 7,97 ($J= 9,8$ Hz, 1H) e δ 6,10 ($J= 9,8$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios 3 e 4, e outros dois dubletos em δ 6,48 e 6,41 com constantes de acoplamento de 2,0 Hz (Tabela 5.30), indicando a presença de substituintes em posições meta, e permitindo atribuí-los aos H-6 e H-8. Estes deslocamentos químicos só permitem a banda 1 referir-se à limetina ou citropteno (5,7-dimetoxicumarina). Comparou-se os sinais de RMN de ^1H com a literatura (KAWAII *et al.*; 1990) e concluiu-se que a proposta estava correta. Esta cumarina não foi isolada anteriormente das plantas estudadas, provavelmente por estar em pequena concentração. Mas,

ela tem sido encontrada em várias espécies de *Citrus*. A proposta de fragmentação para a limetina encontra-se na Figura 5.105.

O cromatograma do íon selecionado m/z 207 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.106a) mostra que a limetina está presente apenas nas folhas de limão cravo (FLC). No cromatograma da matriz das folhas do enxerto com sintomas de CVC (FECS) parece haver a banda referente a esta cumarina, mas sem informação sobre a respectiva área. Assim, estes dados não são sólidos como indicadores da doença nos enxertos.

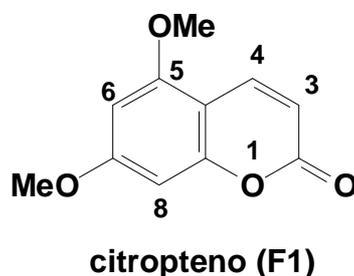


Figura 5.102. Estrutura da cumarina citropteno.

Tabela 5.30. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da cumarina citropteno em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).

Posição	δH	J (Hz)	$\delta^*\text{H}^*$	J^* (Hz)**
3	6,09 (d)	9,8	6,14 (d)	9,7
4	7,97 (d)	9,8	7,95 (d)	9,7
6	6,41 (d)	2,0	6,40 (d),	2,5
ou 8	6,48 (d)	2,0	6,26 (d)	2,5
5-OMe	3,89	-	3,87 (s)	-
7-OMe	3,85	-	3,84 (s)	-

* e ** $\delta^*\text{H}$ e J^* (Hz) são deslocamentos químicos e constantes obtidos da literatura (KAWAII *et al.*; 1990).

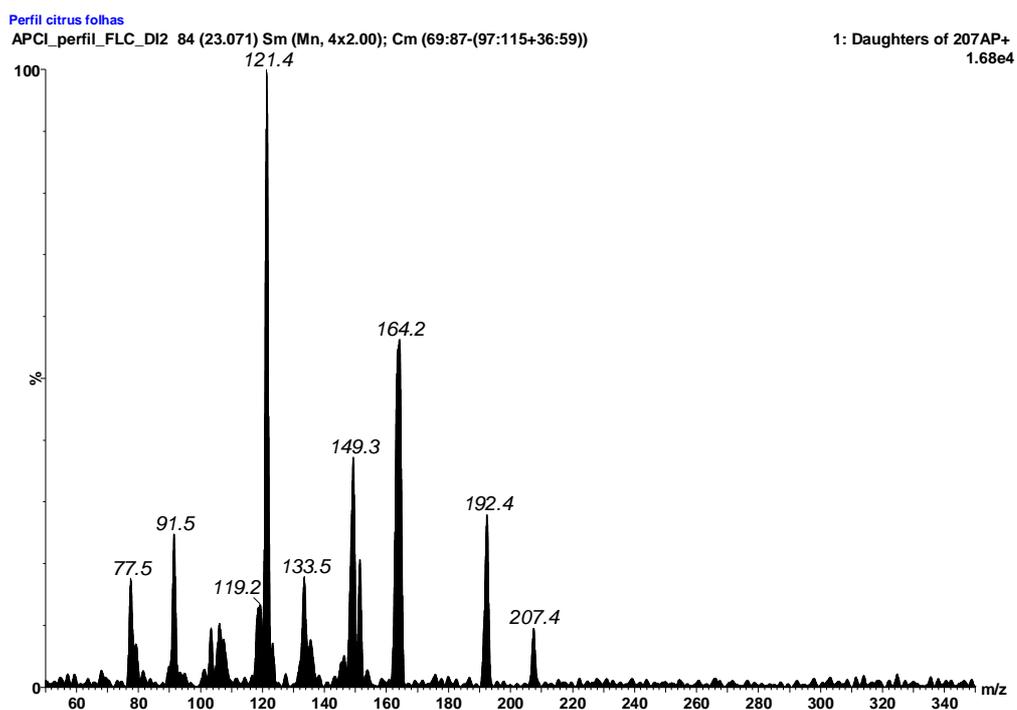


Figura 5.103. Espectro de massas obtido para a cumarina citropteno por APCI no modo positivo de análise: B) Espectro de massas MS/MS (tandem) do íon de m/z 217 na forma de $[M+H]^+$.

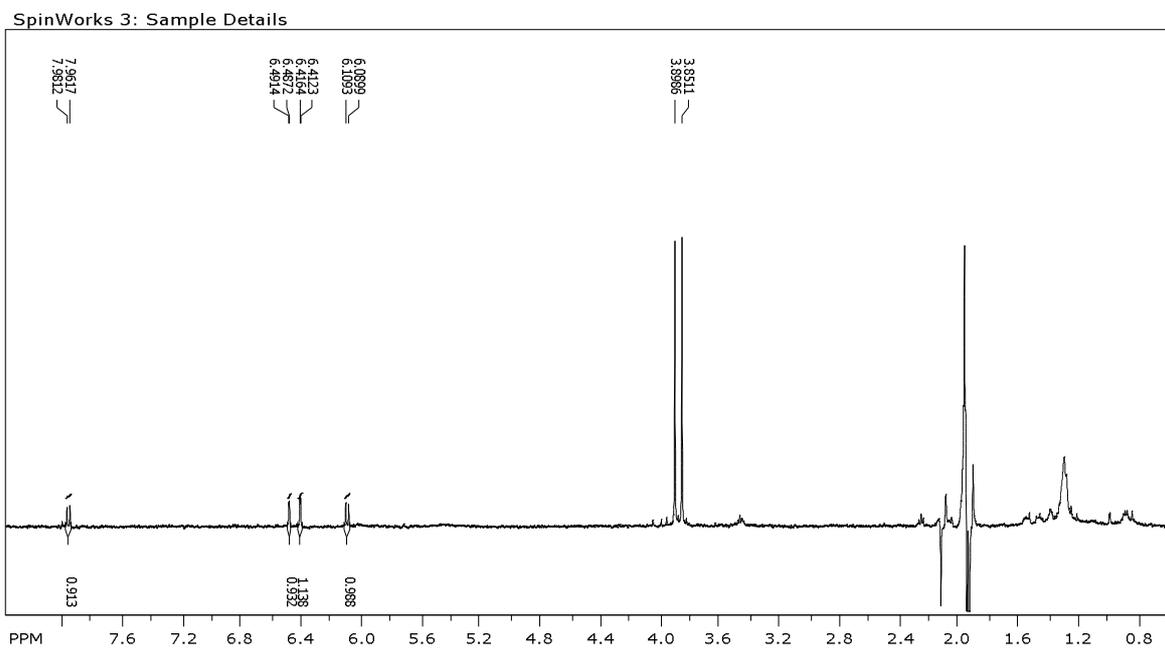


Figura 5.104. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da cumarina citropteno.

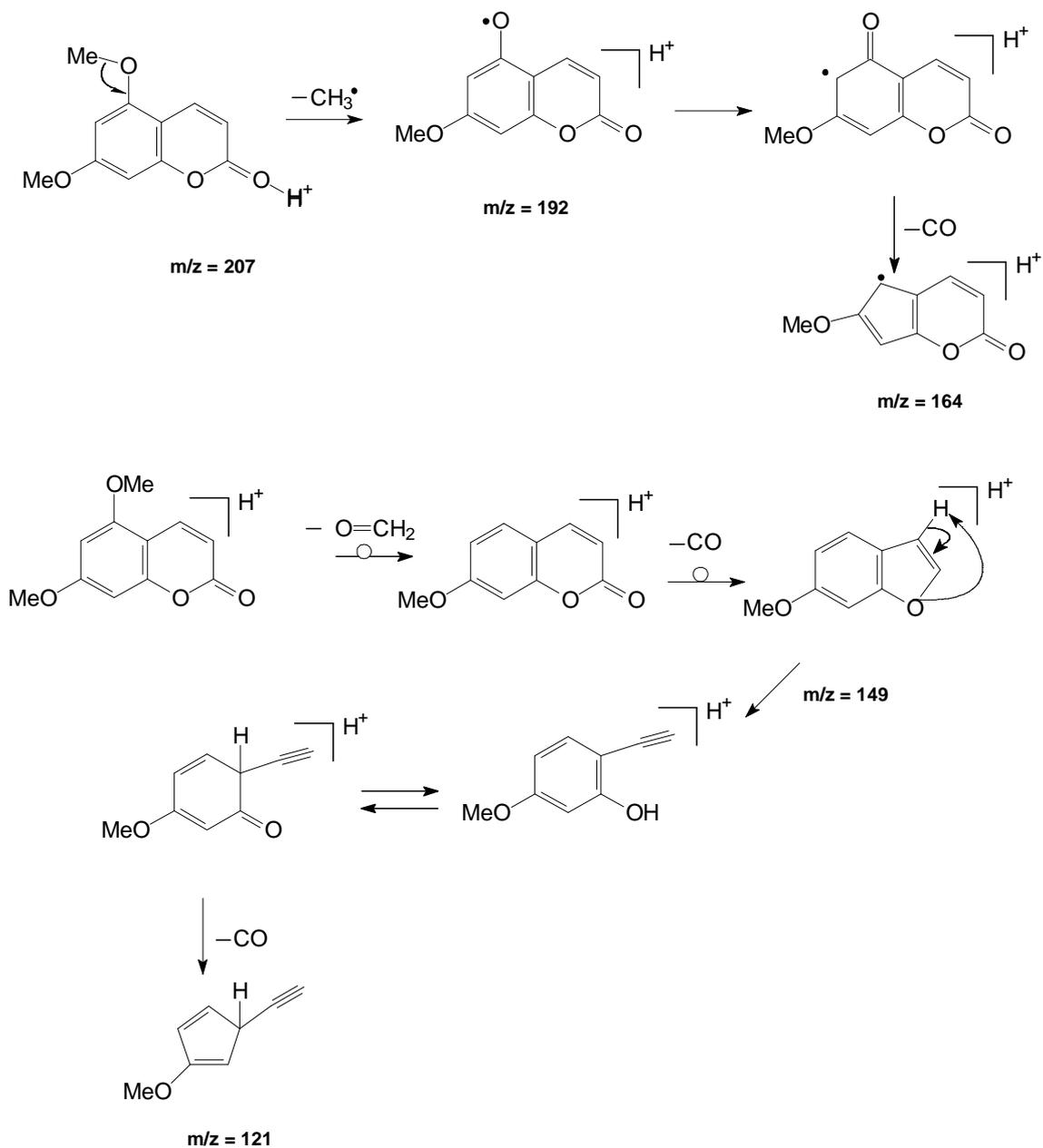


Figura 5.105. Proposta de fragmentação da cumarina citropteno.

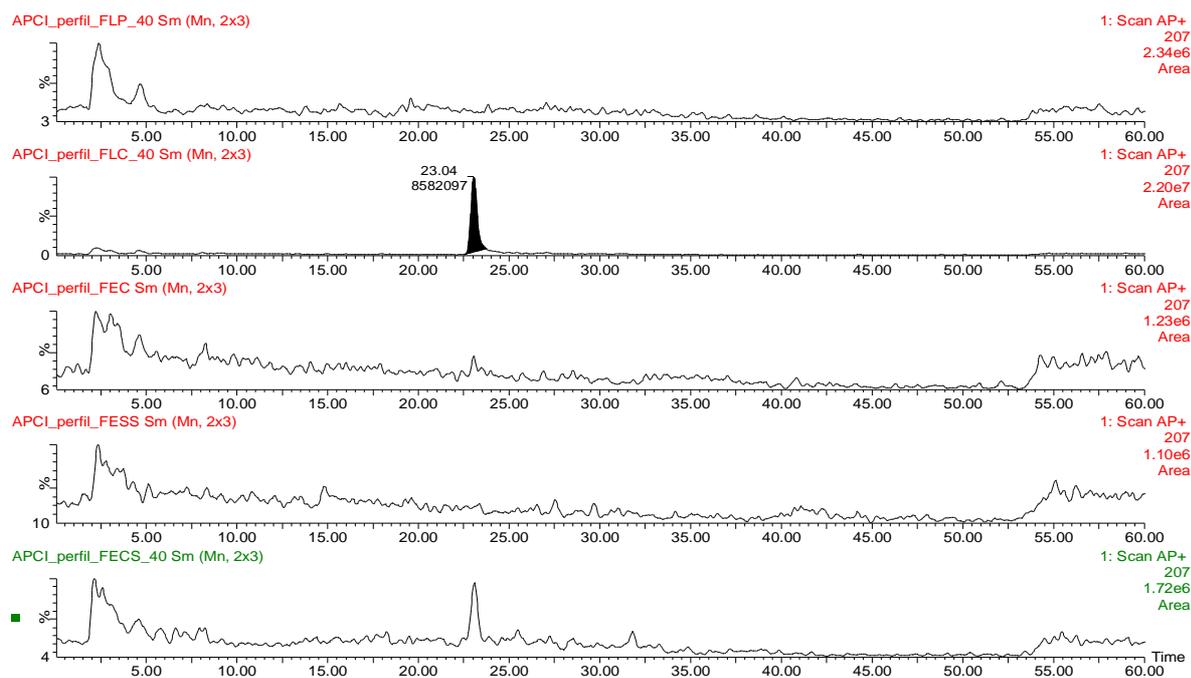


Figura 5.106a. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=207$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.

5.7.3.1.2 Sinal cromatográfico 2: cumarina bergapteno

A análise da banda cromatográfica denominada 2 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 217. O espectro de íons produtos de m/z 217 para a banda cromatográfica 2 de R_t 24,2 min (Figura 5.108) permitiu identificar uma furanocumarina metoxilada, podendo ser ela uma furanolínea ou angular. Ou seja, a linear poderia ser o bergapteno (metoxila em C-5) ou xantotoxina (metoxila em C-8), e a angular a esfondina (metoxila em C-6) ou isobergapteno (metoxila em C-5). Este modelo novamente é excelente para se mostrar a importância do uso de padrões ou da técnica de LC-NMR. O grupo não possuía estes padrões, mas felizmente o LC-NMR forneceu para a banda cromatográfica denominada 2 o espectro de RMN de ^1H que se encontra na figura 5.110, o qual mostrou dois dubletos em δ 8,18 ($J= 9,8$ Hz, 1H) e δ 6,22 ($J= 9,8$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios 3 e 4, um singlete em δ 7,15 referente ao H-8 e mais dois dubletos em δ 7,72 e 7,19 ($J= 2,0$ Hz) referentes aos H-2' e H-3', confirmando uma furano cumarina. Um singlete integrando para 3 hidrogênios em δ 4,27 indicou a presença de uma metoxila. Comparou-se os sinais de RMN de ^1H com a literatura (BENAHMED *et al.*; 2008; MASUDA *et al.*; 1997) e concluiu-se que a cumarina identificada trata-se da furanocumarina linear bergapteno. Os dados espectrais da mesma encontram-se na Tabela 5.31.

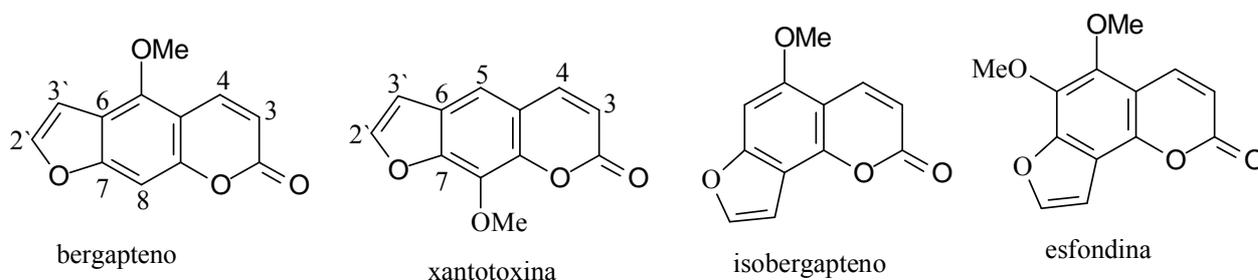


Figura 5.107. Possíveis estruturas das furanocumarinas pertencentes ao sinal cromatográfico 2

Na ausência de padrão tentou-se obter na literatura espectro de massas via APCI no modo positivos para estas cumarinas, mas infelizmente não foram localizados. A proposta de fragmentação para o bergapteno encontra-se na Figura 5.109.

Tabela 5.31. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da cumarina bergapteno em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).

Posição	δH	J (Hz)	$\delta^*\text{H}^*$	J^* (Hz)**
3	6,22 (d)	9,8	6,27 (d)	9,9
4	8,18 (d)	9,8	8,14 (d)	9,9
8	7,15 (s)		7,11 (s)	-
2'	7,72 (d)	2,0	7,57 (d)	2,4
3'	7,19 (d)	2,0	7,01 (d)	2,4
5-OMe	4,27	-	4,27	-

*:** $\delta^*\text{H}$ e J^* (Hz) são deslocamentos químicos e constantes obtidos da literatura (BENAHMED *et al.*; 2008).

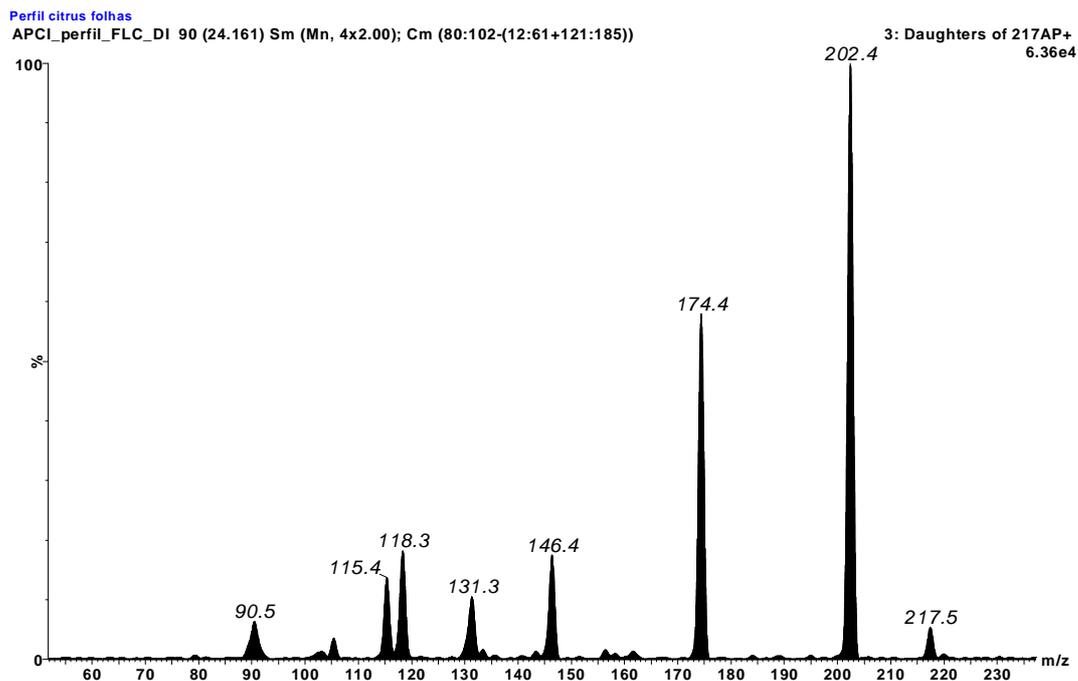


Figura 5.108. Espectro de massas obtido para a cumarina bergapteno por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 217.

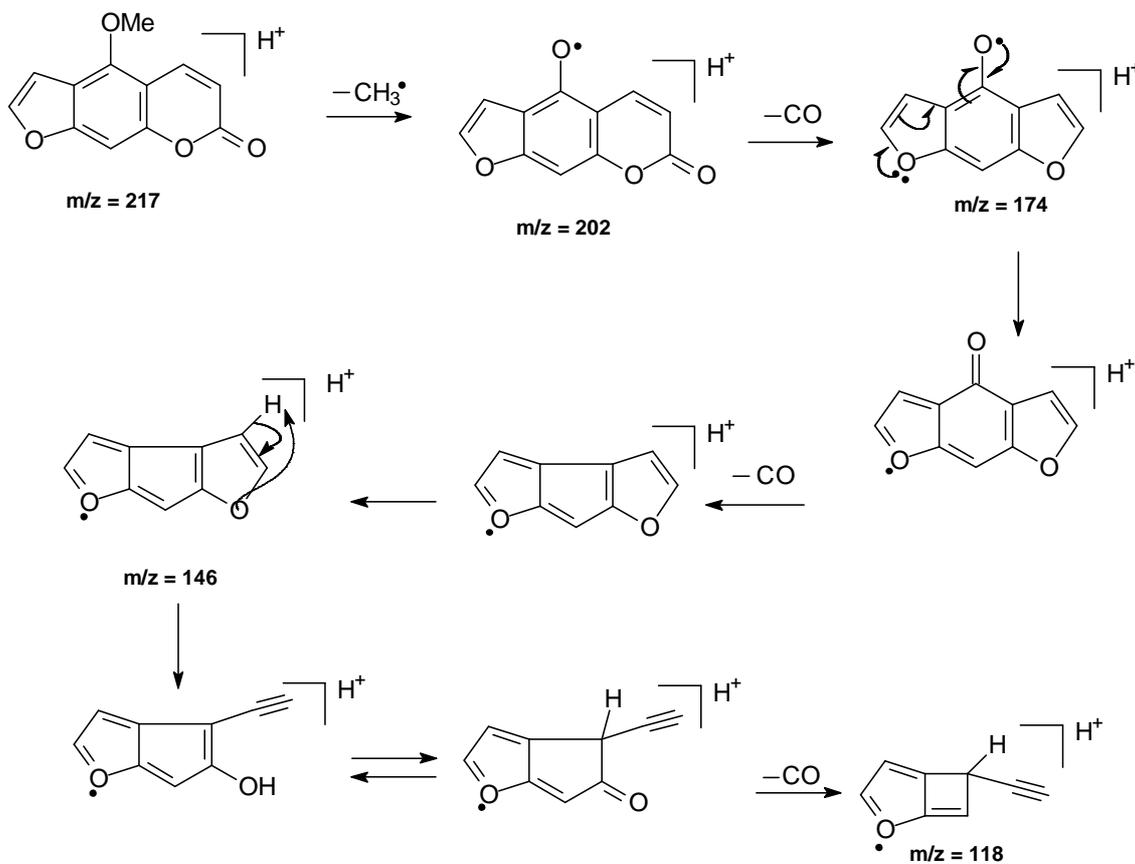


Figura 5.109. Proposta de fragmentação da cumarina bergapteno.

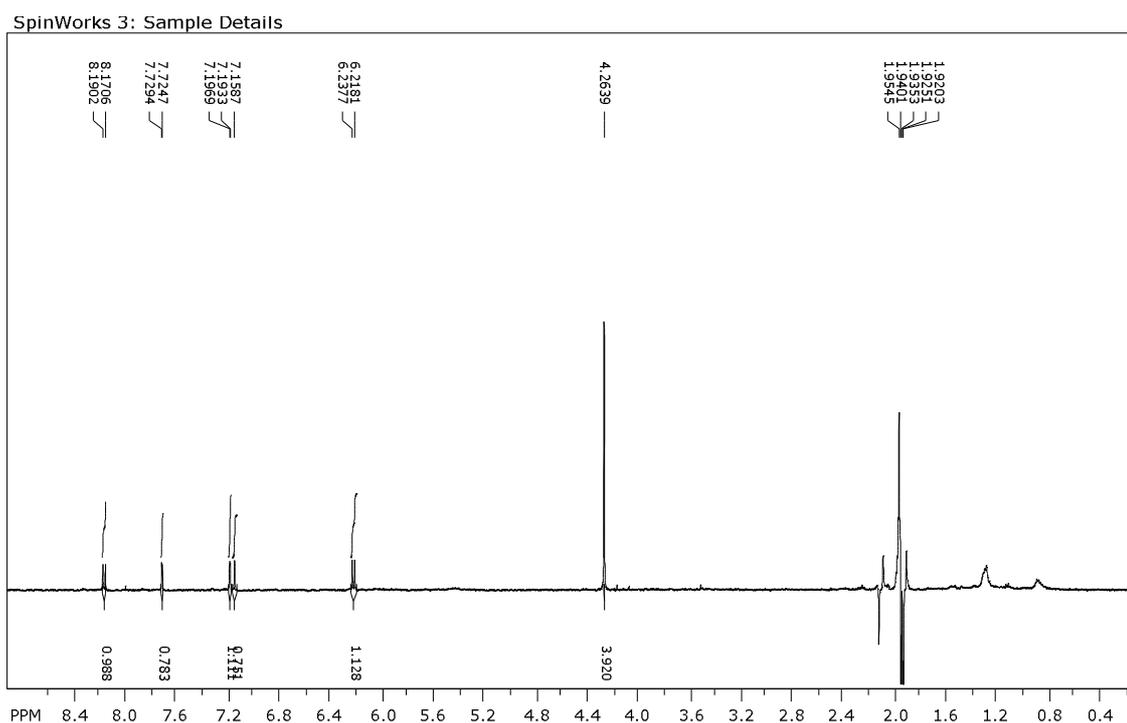


Figura 5.110. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da cumarina bergapteno.

O cromatograma do íon selecionado m/z 217 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.111) mostra que o bergapteno está presente nas folhas do limão cravo (FLC) em uma concentração 10,4 vezes maior que aquela encontrada para as folhas do enxerto com sintoma de CVC (FECS). Nas demais matrizes esta cumarina parece estar ausente. Estes dados são difíceis de explicar, pois o esperado pelas definições de enxertia, é que a planta mantém as características das plantas de origem, com pequenas variações. Ou seja, as folhas do enxerto de Cs-Cl devem assemelhar-se mais àquelas da laranja pêra que origina a copa da planta, e nesta não foi detectado o bergapteno. Não se pode dizer que há uma diminuição na concentração do bergapteno nas folhas dos enxertos com CVC, pois no enxerto padrão onde a bactéria não foi inoculada esta cumarina não foi detectada. Ela teria que estar sendo

biossintetizada nas folhas do enxerto doente como uma reação ao patógeno, ou sendo translocada de outro órgão da planta, o qual se origina do limão cravo. Esta segunda hipótese será reforçada em um tópico mais a frente onde se discutirá os resultados de estudos dos caules destas plantas via a busca de alguns íons selecionados por APCI.

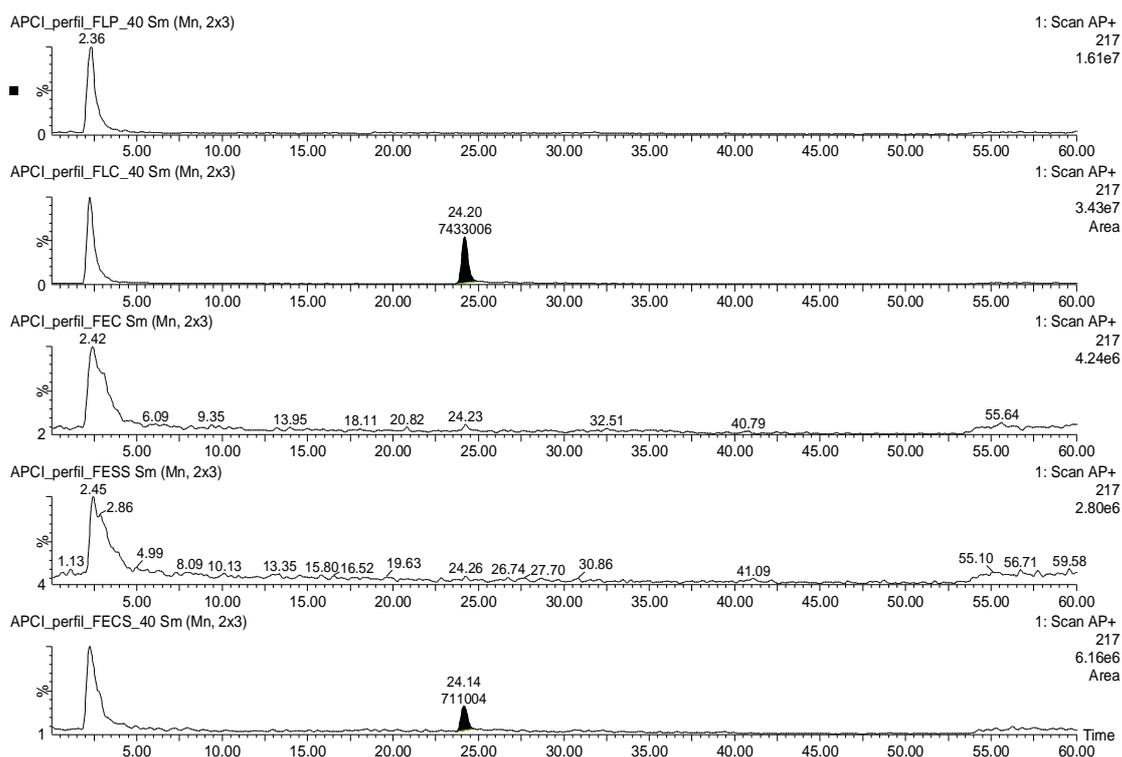


Figura 5.111. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=217$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.

5.7.3.1.3 Bandas cromatográficas 3, 4 e 7: flavonóides sinensetina, 5-demetoxinobiletina e tangeretina

A análise da banda cromatográfica denominada 3, 4 e 7 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 373. O espectro de íons produtos de m/z 373 e 343 para estas bandas cromatográficas (Figura 5.113-5.115) permitiu identificar três flavonóides pentametoxilados. A técnica de APCI é mais branda que a técnica de CG-MS, a qual utiliza 70 eV para fragmentar uma molécula, enquanto a utilizada neste trabalho usou 15 eV. Com isto, não foram observados íons produtos provenientes de RDA (Retro Diels-Alder) a partir do íon $m/z=$ 373. Estes auxiliariam a posicionar os grupos metoxílicos nos anéis A e B com facilidade. A Retro Diels-Alder aparece, mas não diretamente no íon $M+H$, como será discutido mais a frente. Contudo, alguns fragmentos eram característicos de um dos isômeros, permitindo identificar um deles com segurança. A formação destes íons e suas identidades com os respectivos flavonóides serão discutidos a seguir. Ou seja, não será mostrado para esses três compostos os perfis de fragmentação separadamente, mas apenas alguns íons produtos fundamentais para a diferenciação entre os três flavonóides isômeros. As Figuras 5.113-5.15 mostram os espectros de massas obtidos para as bandas cromatográficas 3, 4 e 7 por APCI no modo positivo de análise com íons produto de m/z 373 e 343.

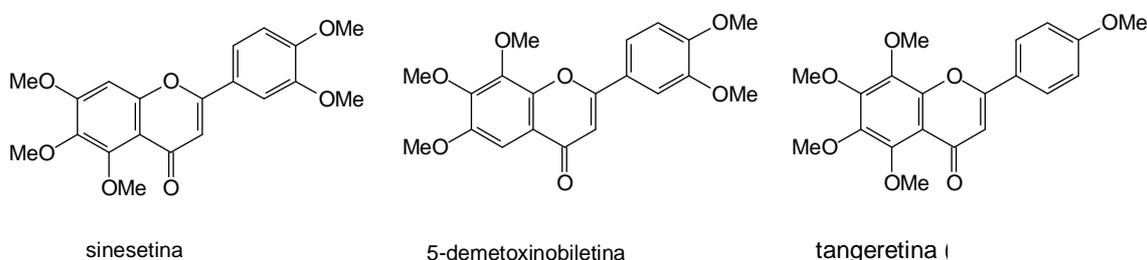


Figura 5.112. Estrutura dos flavonóides sinensetina, 5-demetoxinobiletina e tangeretina.

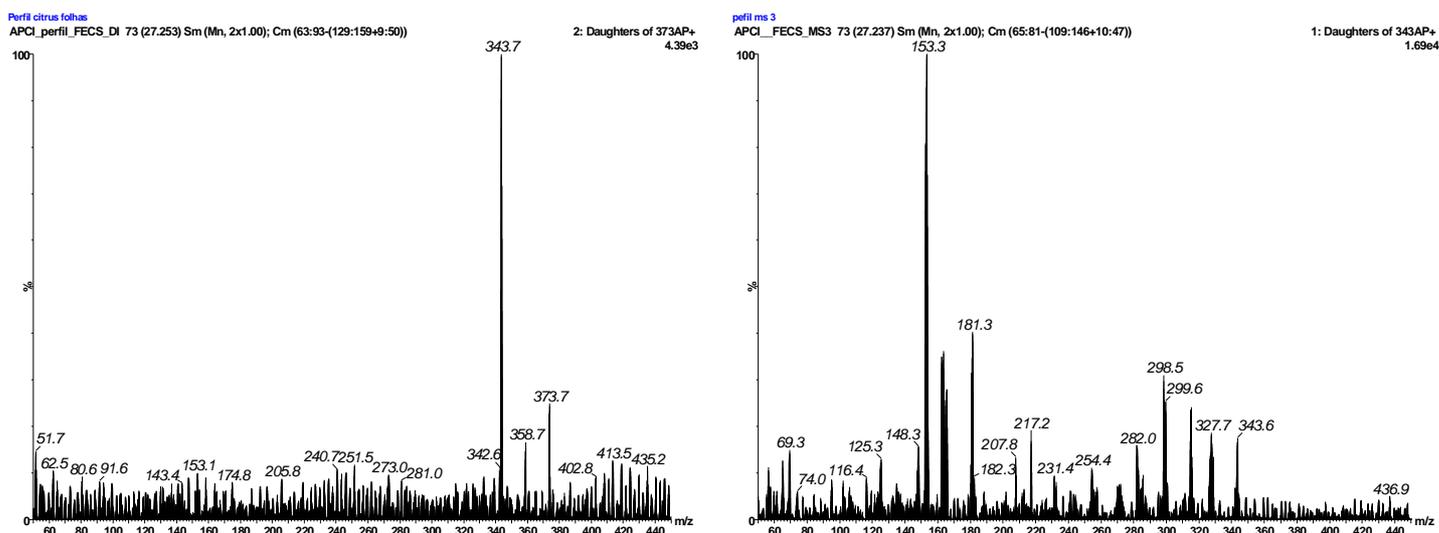


Figura 5.113. Espectros de massas obtidos para a banda cromatográfica 3 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 373 e 343.

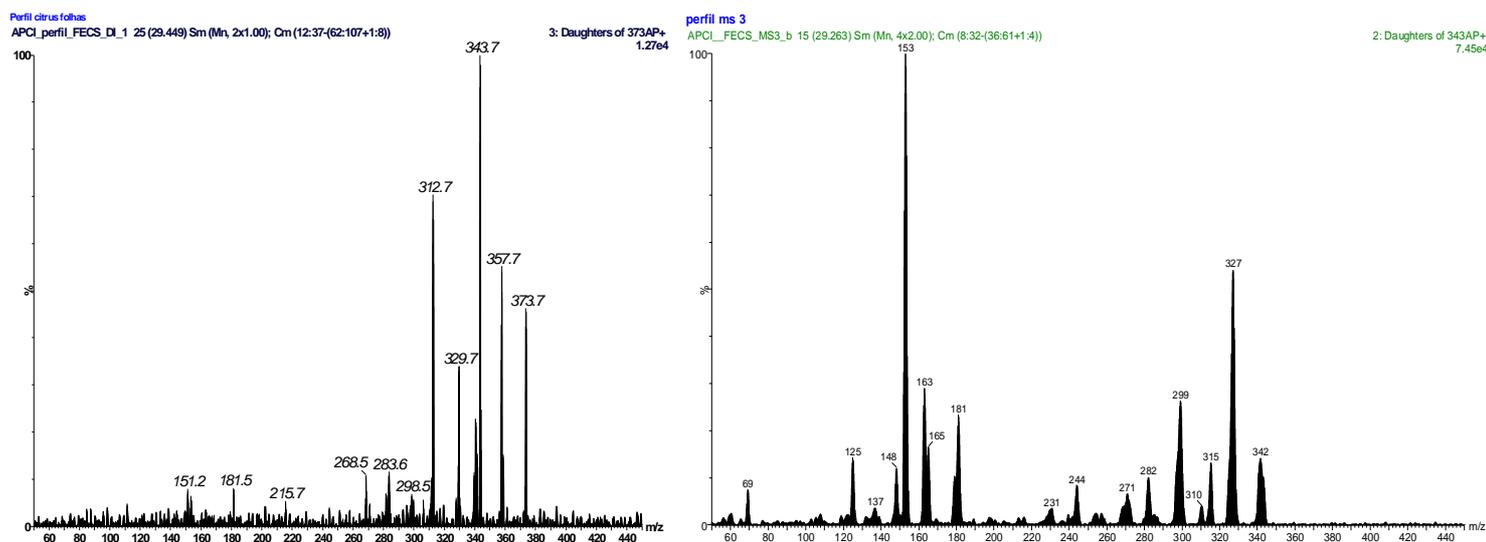


Figura 5.114. Espectros de massas obtidos para a banda cromatográfica 4 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 373 e 343.

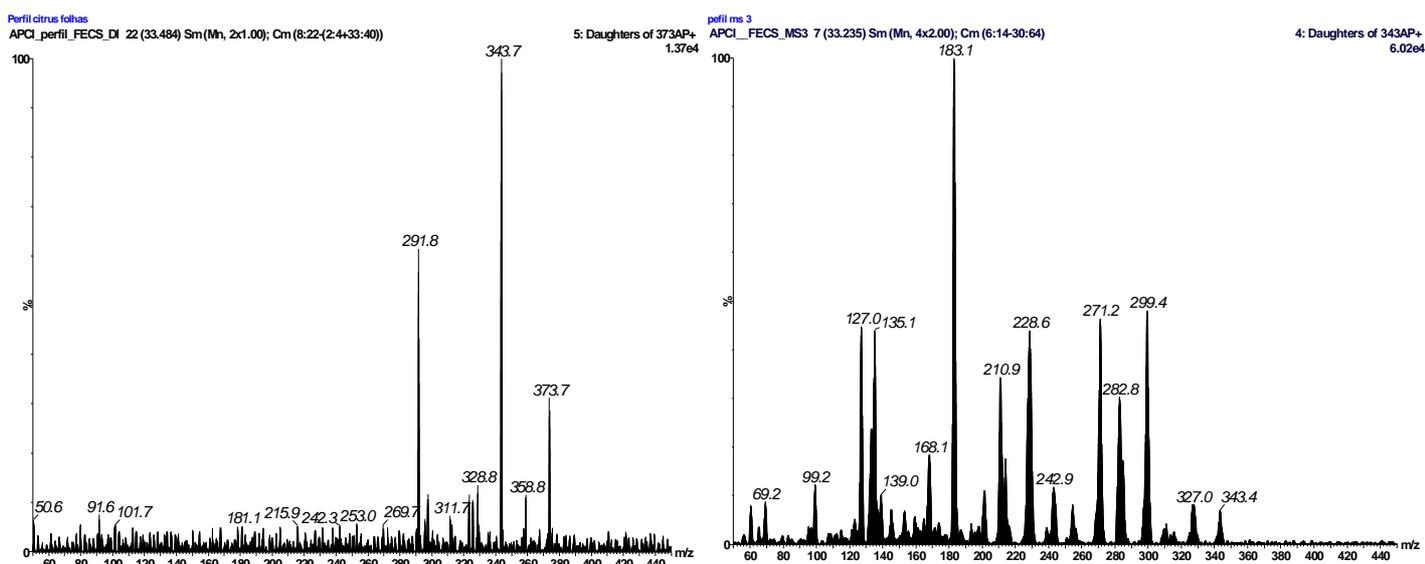


Figura 5.115. Espectros de massas obtidos para banda cromatográfica 7 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 373 e 343.

Ao analisar os espectros de massas das Figuras 5.113 a 5.115 referentes aos íons produtos de $m/z=373$, observa-se que apenas a banda cromatográfica 7 apresenta o íon $m/z=291$. Considerando o anel B monometoxilado, e este anel perdendo uma unidade C_5H_6O a partir do íon $M+H$ leva ao íon $C_{15}H_{14}O_6$ íon ($m/z=291$) numa proporção de aproximadamente 70%, mostrando ser um íon bastante estável (Figura 5.116). Portanto, este fragmento sugere para a banda cromatográfica 7 o flavonóide tangeretina.

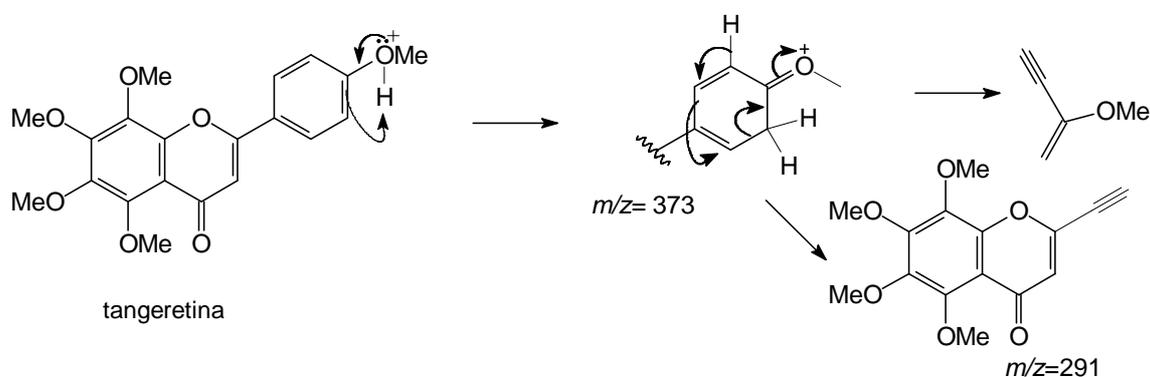


Figura 5.116. Proposta de formação do íon $m/z = 291$ referente à banda cromatográfica 7.

O íon m/z 343 o qual aparece nos espectros das três bandas cromatográficas pode ter se formado pela perda de uma unidade $H_2C=O$. A Retro Diels-Alder ocorrendo neste íon correspondente à banda cromatográfica 7 leva aos íons m/z 211 e 133, este último confirma o anel B monometoxilado. O íon m/z 135 formado a partir do m/z 343 via mecanismo mostrado na figura 5.117, também confirma o anel B monometoxilado. Os íons m/z 135 e 133 também indicam a ausência de metoxila em C-3 (Flavonol). Os íons m/z 211 e 183 (oriundo do m/z 211, pico base) mostram que a perda do metanal no íon $M+H$ para levar ao m/z 343 ocorreu no anel A, confirmando o anel A totalmente metoxilado. Estes dados permitem confirmar com segurança o flavonóide tangeretina para a banda cromatográfica 7 (Figura 5.117). Este foi isolado anteriormente pelo grupo de PN da UFSCar nas folhas do enxerto padrão (FEC) (Ribeiro et al., 2008), reforçando a proposta acima.

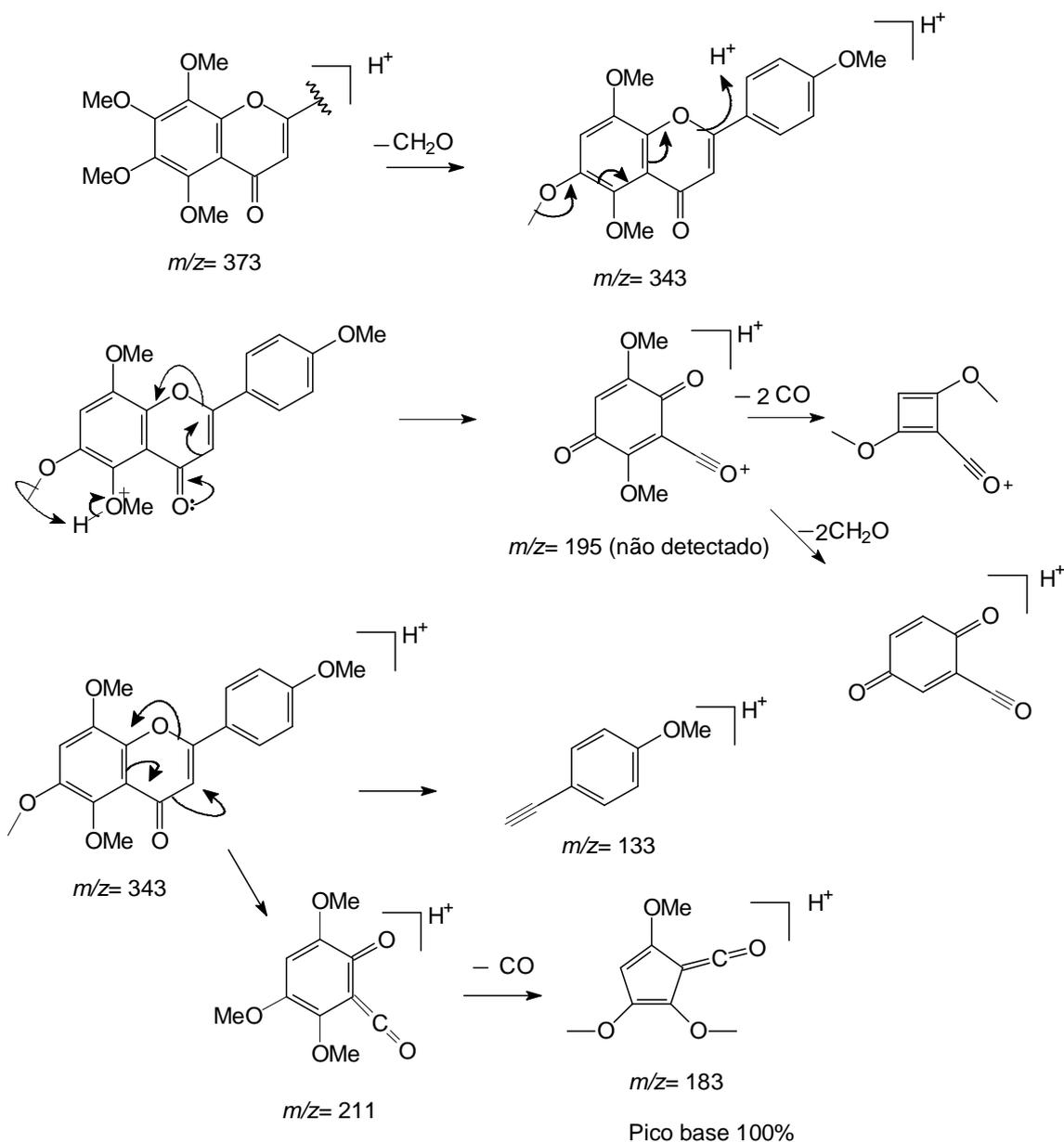


Figura 5.117. Propostas de formação dos íons m/z 343, 133, 135, 183 e 211 referentes à banda cromatográfica 7.

As matrizes das folhas do limão cravo foram analisadas via LC-NMR, como comentado anteriormente. Este flavonóide ocorre nestas folhas e, assim, esta banda (7, figura 5.99, pág, 211) foi separada e seu espectro de RMN de ^1H registrado. Analisando este espectro (Figuras 5.118a, b e c) observaram-se a presença de cinco singletos na região de δ 3,80 a 4,05 integrando para três hidrogênios, sinais esses característicos de

metoxilas presentes na molécula. Observou-se também um singlete em δ 6,54 característico do H-3 de flavonóide. Observaram-se ainda sinais na região de δ 7,0 a 7,7. Nessa região tem-se um dubleto em δ 7,08 com constante de acoplamento de 8,5 Hz e integrando para dois hidrogênios. Outro sinal foi observado na região de δ 7,93 que também integrou para dois hidrogênios. Diante desses dados verifica-se tratar de um flavonóide pentametoxilado e que o mesmo possuía um plano de simetria no anel B, sugerindo, portanto o flavonóide tangeretina. Os dados espectrais, comparados com a literatura estão discriminados na tabela 5.32.

Tabela 5.32. Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do flavonóide tangeretina (banda 7, ou 10) em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).

H	tangeretina	tangeretina*
2'	7,93 d (8,9)	7,87 d (9,0)
3'	7,08 d (8,9)	7,02 d (9,0)
5'	7,08 d (8,9)	7,02 d (9,0)
6'	7,93 d (8,9)	7,87 d (9,0)
H-3	6,54 s	6,61 s
OMe	3,82 s	3,89 s
OMe	3,86 s	3,95 s
OMe	3,87 s	3,95
OMe	3,98 s	4,02 s
OMe	4,05 s	4,10 s

- (LI *et al.*; 2006).

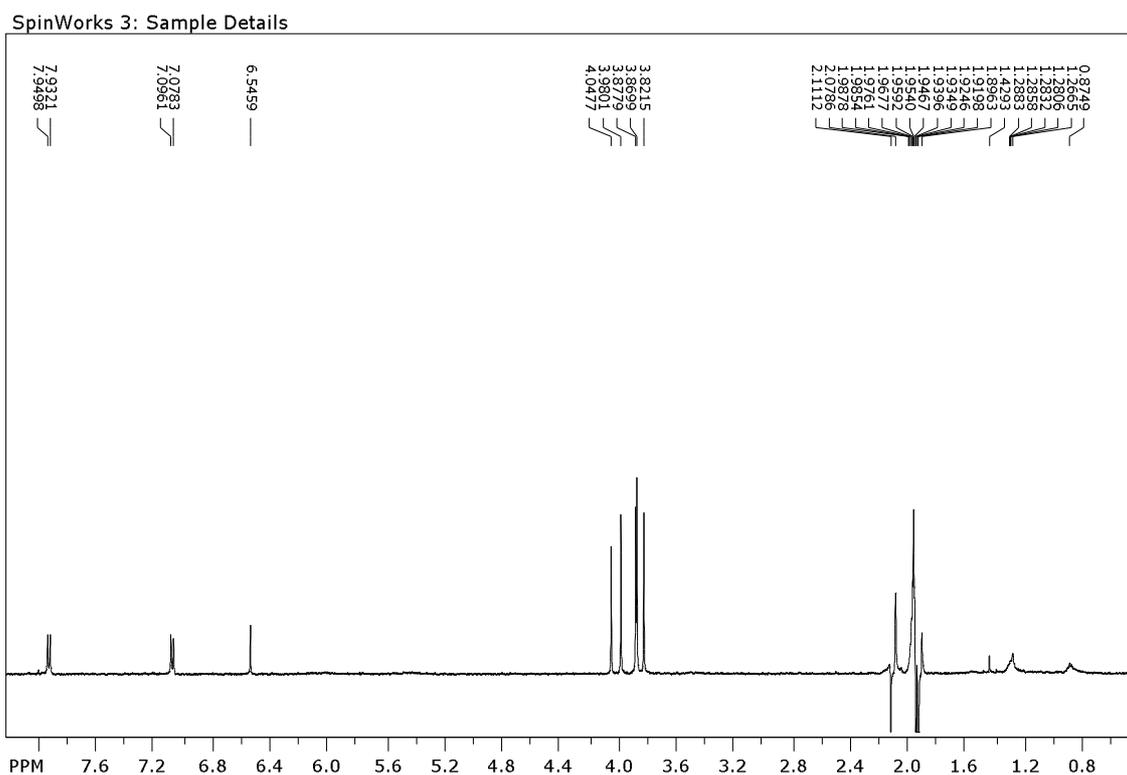


Figura 5.118a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 7 ou 10, flavonóide tangeretina.

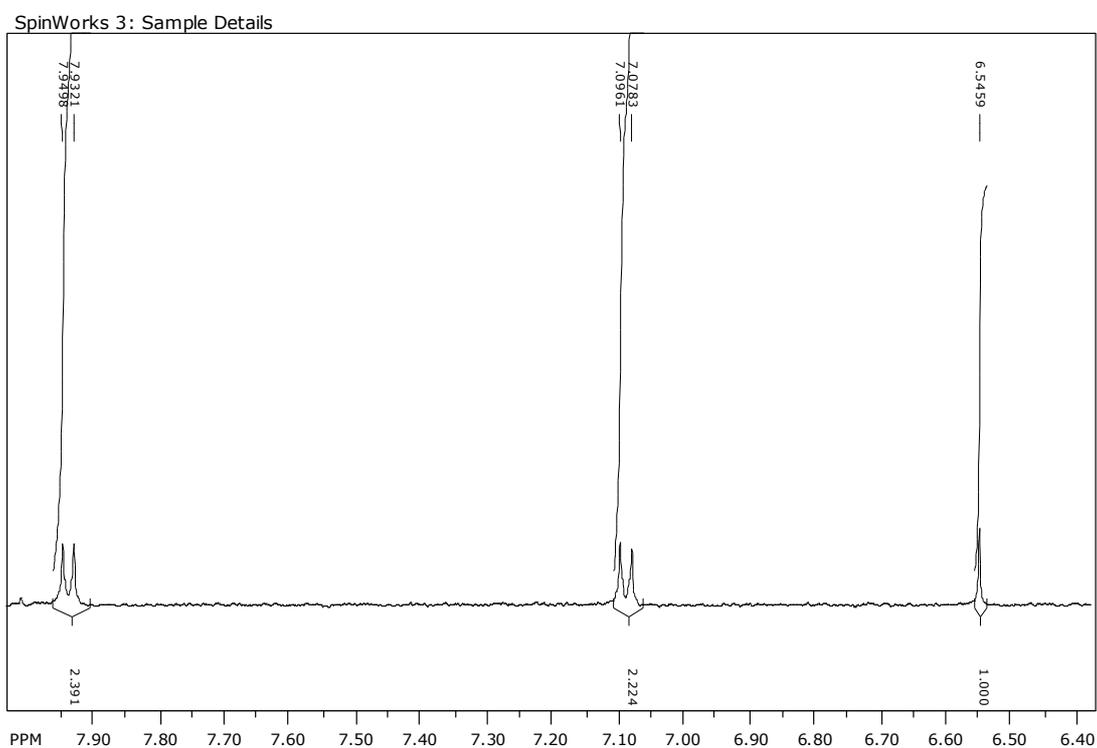


Figura 5.118b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 7 ou 10, flavonóide tangeretina.

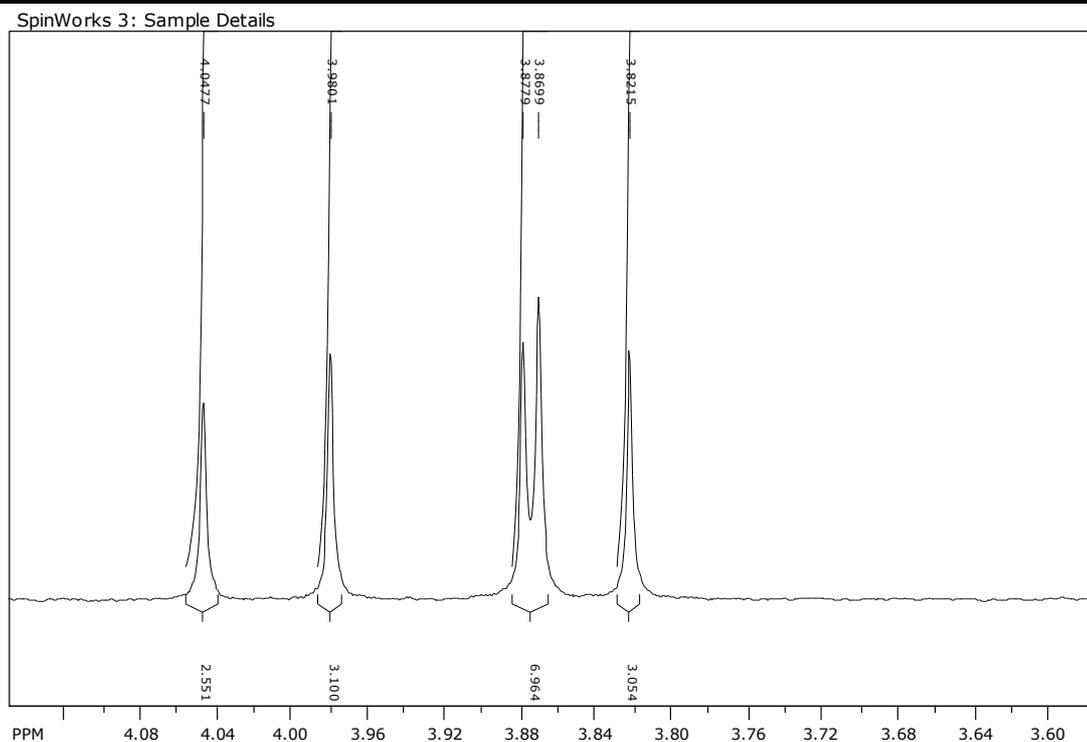


Figura 5.118c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 7 ou 10, flavonóide tangeretina.

A Retro Diels-Alder ocorrendo no íon m/z 373 correspondente às bandas cromatográficas 3 e 4 que leva aos íons m/z 181 e 163, este último indica o anel B dimetoxilado e sem metoxila em C-3 (Figura 5.119). O íon m/z 165 formado a partir do m/z 343 via mecanismo mostrado na figura 5.121, também confirma o anel B dimetoxilado. Os dados discutidos acima mostram que os flavonóides correspondentes às bandas 3 e 4 possuem o anel A trimetoxilado, portanto podendo ser 5,6,7-, 6,7,8-, 5,7,8-, 5,6,8-trimetoxi.

O íon m/z 358 aparece apenas nas bandas cromatográficas 3 (m/z 358,7) e 7 (m/z 358,8); o íon em m/z 357,7 que aparece para a banda 4 corresponde a outro tipo de fragmentação que será discutida posteriormente, ou seja refere-se ao m/z 357 e não 358. A formação deste íon se daria pela perda de uma metila radicalar. Uma interação eletrônica entre o oxigênio da posição 1 do anel C e os carbonos C-6 e C-8

permitiriam a perda de metila radicalar (Figura 5.119). Porém, esta proposta não descartaria nenhuma das sugestões com anel A trimetoxilado acima. Uma segunda possibilidade seria a perda da metila radicalar em C-5 e o radical formado ser estabilizado por uma interação com a carbonila em C-4 protonada, o que é bem conhecido nos flavonóides 5-hidroxilados (Figura 5.118). Esta possibilidade permitiria descartar o flavonóide com o anel A 6,7,8-trimetoxilado, sugerindo para a banda cromatográfica 4 o flavonóide 5-demetoxinobiletina, a qual não apresenta o íon produto m/z 358. Esta banda cromatográfica 4 mostra íons produtos (m/z 357 e 327) os quais parecem se formarem pela perda de uma unidade CH_4 , o que ocorre pela derivação tanto do íon quasimolecular m/z 373 quanto do íon produto 343 (Figura 5.120). A explicação para a perda de CH_4 poderia ser diminuir a tensão estérica de metoxilas vizinhas. Contudo, não é uma boa explicação, pois isto não ocorreu na banda 7 com intensidade relevante, a qual corresponde ao flavonóide tangeretina com o anel A totalmente metoxilado. A 5-demetoxinobiletina foi isolado anteriormente pelo grupo de PN da UFSCar nas folhas do enxerto padrão (FEC) (Ribeiro et al., 2008), reforçando a proposta acima.

Restam para a banda 3 três possibilidades 5,6,7,3',4'-, 5,7,8, 3',4'-, ou 5,6,8,3',4'-pentametoxiflavona. Os íons produtos analisados para esta banda não permitem diferenciar estes três flavonóides. A hipótese de que este flavonóide seria a sinensetina seria reforçada no fato de que esta foi isolada anteriormente pelo grupo de PN da UFSCar nas folhas do enxerto padrão (FEC) (Ribeiro et al., 2008). Infelizmente o grupo não possui mais este padrão. Contudo, o extrato dos caules superiores do enxerto com sintoma de CVC foi analisado via LC-NMR e a banda cromatográfica com tempo de retenção em torno de 27 min foi confirmada ser o flavonóide sinensetina ao analisar o seu espectro de RMN de ^1H (discutido mais a frente no item 5.8.2.3). O tempo de retenção obtido nas

mesmas condições para as folhas foi também nesta faixa, 27,4 min. Portanto, a hipótese de que a banda cromatográfica 3 refere-se ao flavonóide sinensetina foi mais uma vez reforçada.

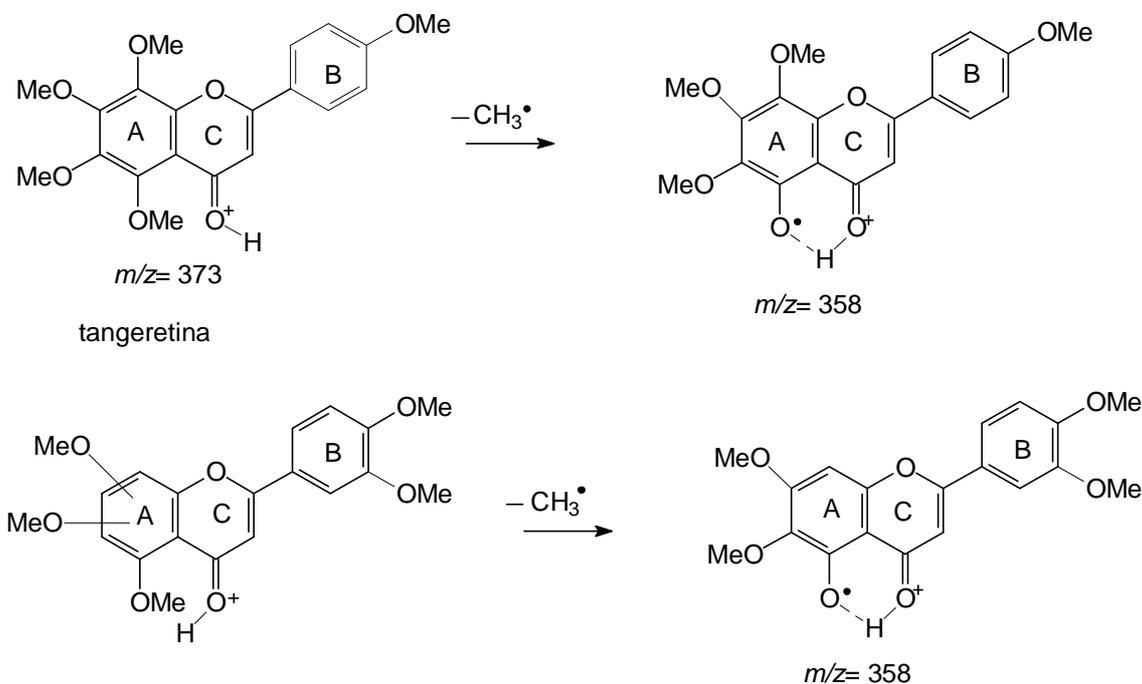


Figura 5.119. Propostas de formação do íon $m/z=358$ referentes às bandas cromatográficas 3 e 7.

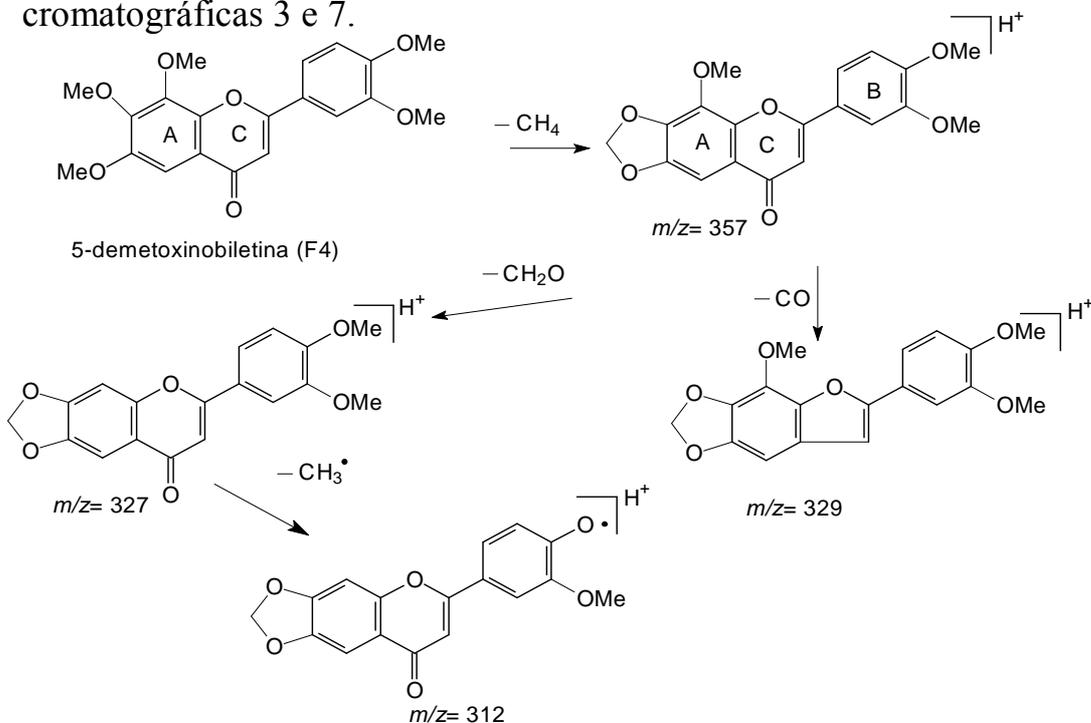


Figura 5.120. Proposta de formação dos íons $m/z=357$, 329, 327 e 312 referentes à banda cromatográfica 4.

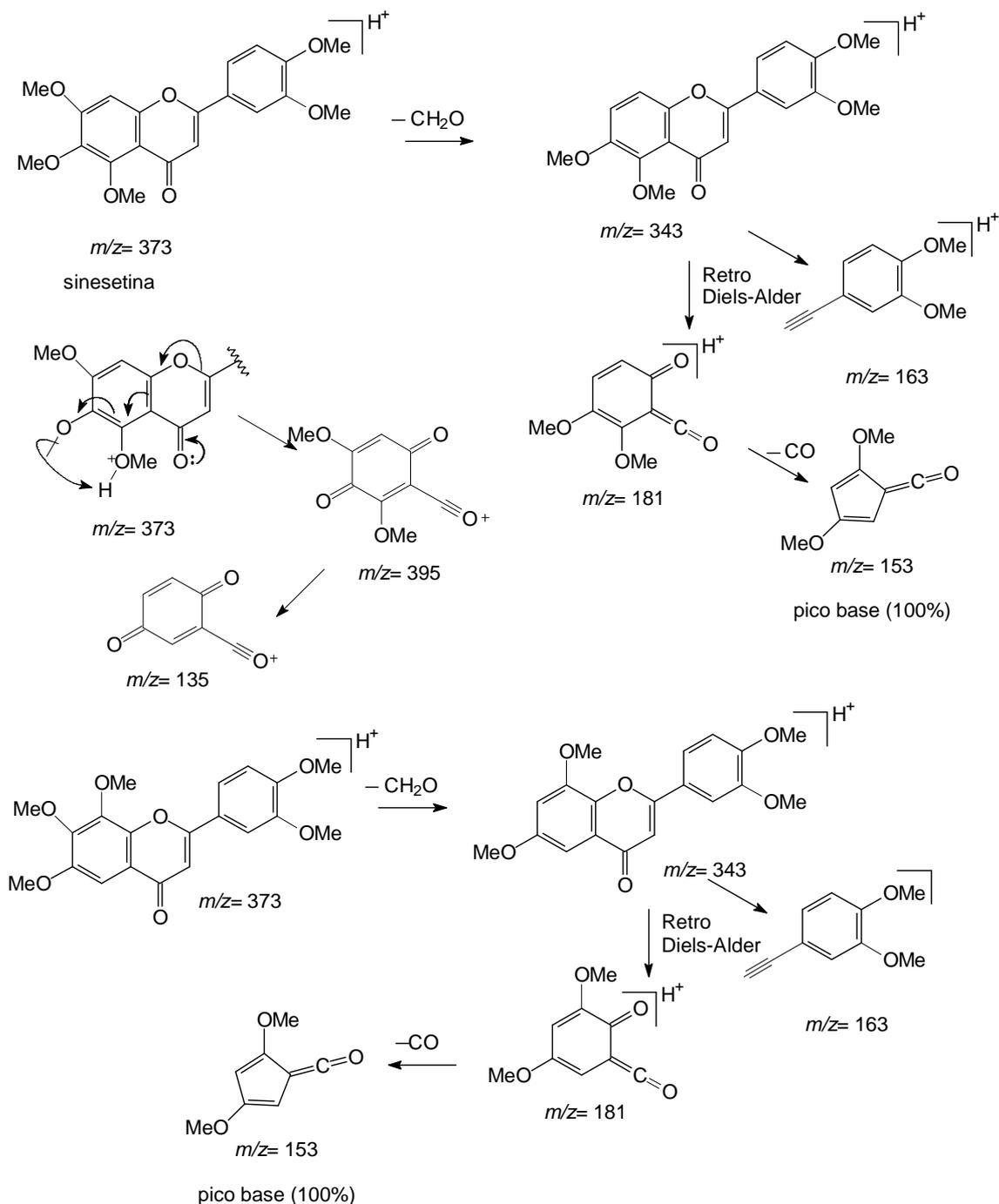


Figura 5.121. Propostas de formação dos íons produtos $m/z = 181$, 165 , 163 e 153 referentes às bandas cromatográficas 3 e 4.

O cromatograma do íon selecionado $m/z = 373$ com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.122) mostra que o primeiro flavonóide, provavelmente a sinensetina, aparece em bem menor

quantidade que os demais, sendo que nas folhas da laranja pêra sua concentração é a mais baixa. O segundo flavonóide, a 5-demetoxinobiletina, aparece com baixa concentração nas folhas do limão cravo e em quantidade relevante nas folhas da laranja pêra, no entanto no enxerto destes dois sua concentração aumenta em 2,37 vezes. Segundo as definições de enxertia a planta mantém as características das plantas de origem, com pequenas variações. Ou seja, as folhas do enxerto de Cs-CI devem assemelhar-se mais àquelas da laranja pêra que origina a copa da planta, e isto foi observado nesta amostra. Contudo, o aumento na concentração da 5-demetoxinobiletina em 2,37 vezes àquela da planta de origem pode ser interpretada como uma reação da laranja pêra estando sobre o limão cravo. Sua concentração também aumenta quando o enxerto possui sintomas de CVC (1,26 vezes àquela do enxerto padrão). Este aumento pode ser interpretado como uma reação da planta ao patógeno, permitindo classificar este flavonóide como uma fitoantecipina. Interessante que naqueles enxertos com a *X. fastidiosa* em seu interior, mas sem sintoma de CVC, a concentração deste flavonóide diminui numa relação (-2,97 vezes àquela do enxerto padrão, FEC) maior que aquela de seu aumento quando na formação do enxerto (2,37 vezes FLP).

A bactéria necessita se aderir à superfície de seu hospedeiro, em seguida ocorre a sua multiplicação e colonização formando o biofilme, o que então leva ao sintoma da doença. A diminuição da concentração do flavonóide 5-demetoxinobiletina também mostra uma reação da planta frente ao patógeno, mas provavelmente em favor do aumento de algum outro metabólito que estaria interferindo na interação bactéria-hospedeiro e levando à inibição da formação do biofilme, e conseqüentemente a ausência de sintoma de CVC na planta. A bactéria inoculada nas plantas foi de um mesmo lote desenvolvido para esta finalidade. As plantas estudadas receberam a bactéria no mesmo período e as análises foram feitas todas

também no mesmo intervalo dado para o desenvolvimento da bactéria. As plantas tinham todas elas a mesma idade, porém, lógico não eram exatamente os mesmos indivíduos. Portanto, saber por que algumas plantas apresentaram sintoma de CVC e outras não são reações difíceis de entender. Um número maior de plantas apresentou o sintoma de CVC. Aquelas tolerantes (sem sintoma de CVC) seriam genótipos diferentes e com isto utilizam fitoantecipinas distintas, ou seja, elas variam a biossíntese do mesmo flavonóide (5-demetoxinobiletina) em sentidos opostos, a tolerante diminui e a suscetível aumenta. Esta é uma pergunta ainda sem resposta nesta tese.

O flavonóide tangeretina está presente em maior quantidade nas folhas do limão cravo e em menor naquelas da laranja pêra. No enxerto padrão a concentração deste flavonóide nas folhas diminui quando comparado ao limão cravo e aumenta em relação à planta de origem. A concentração deste também diminui nas plantas com a bactéria em seu interior, porém em um percentual maior naquelas sem sintomas de CVC (-3,15 e -1,21, em comparação ao padrão, FEC). Neste caso a reação da planta é homogênea. Provavelmente a diminuição ocorre em favor do aumento de algum outro metabólito, o qual foi sintetizado em um percentual maior nas plantas mais tolerantes.

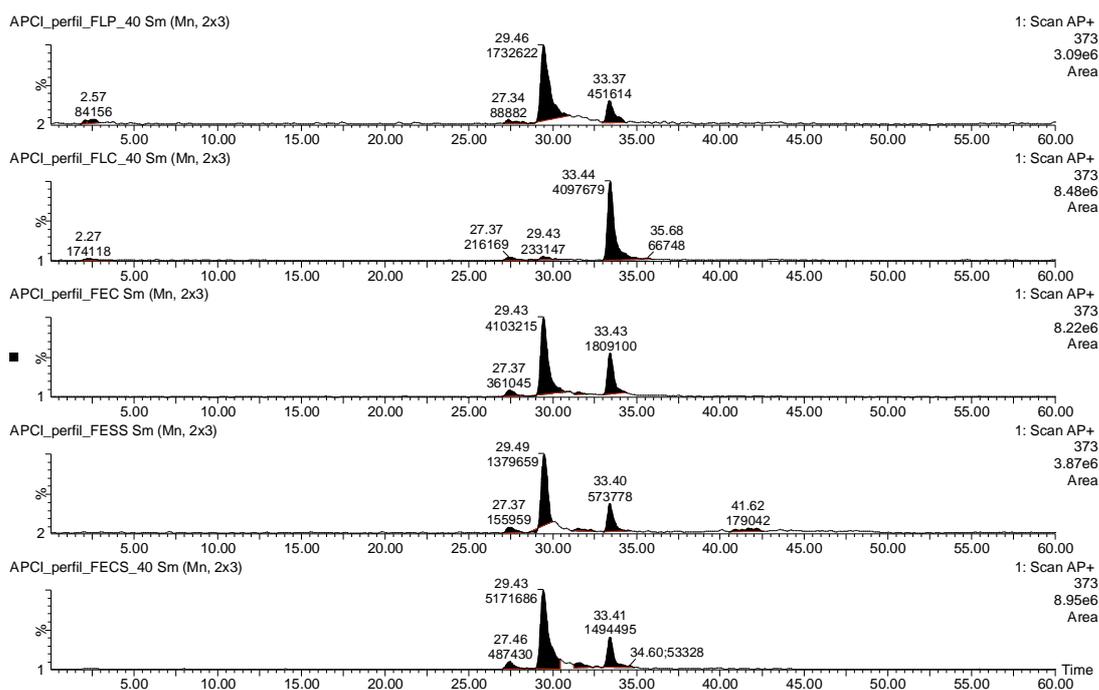


Figura 5.122. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=373$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.

5.7.3.1.4 Bandas cromatográficas 5 e 8: flavonóides 5(ou 7)-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona e 6-hidroxi-3',4',5,7,8-pentametoxiflavona

A análise da banda cromatográfica denominada 5 (31,5 min) e 8 (34,2min) por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 389. O espectro de íons produtos de m/z 389 para a banda cromatográfica 5 (Figura 5.124) permitiu identificar um flavonóide monohidroxilado e pentametoxilado. A Retro Diels-Alder ocorrendo no íon m/z 389 correspondente à banda cromatográfica 5 leva aos íons m/z 227 e 163 em baixas intensidades, mas importantes, este último indica o anel B dimetoxilado e sem metoxila ou hidroxila em C-3 (Figura 5.125). Portanto,

o anel A é monohidroxilado e trimetoxilado. Os íons produtos analisados para esta banda não permitem posicionar a hidroxila no anel A com segurança. Uma possibilidade seria a perda de CH_4 e um hidrogênio radicalar da hidroxila em C-5 a partir do íon m/z 373, e este radical formado ser estabilizado por uma interação com a carbonila em C-4 protonada, o que é bem conhecido nos flavonóides 5-hidroxilados (Figura 5.124). Esta possibilidade permitiria explicar este ser o pico base (100%), sugerindo para a banda cromatográfica 5 o flavonóide 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona. Porém, a hidroxila em C-7 estaria em uma posição *para* em relação à carbonila, e o radical formado também seria muito bem estabilizado por conjugação. Esta conjugação formaria uma hidroxila íon positivo radicalar (Figura 5.124), o que é muito comum na espectroscopia via GC/MS. Portanto, propor para a banda cromatográfica 5 o flavonóide 7-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona não pode ser descartado.

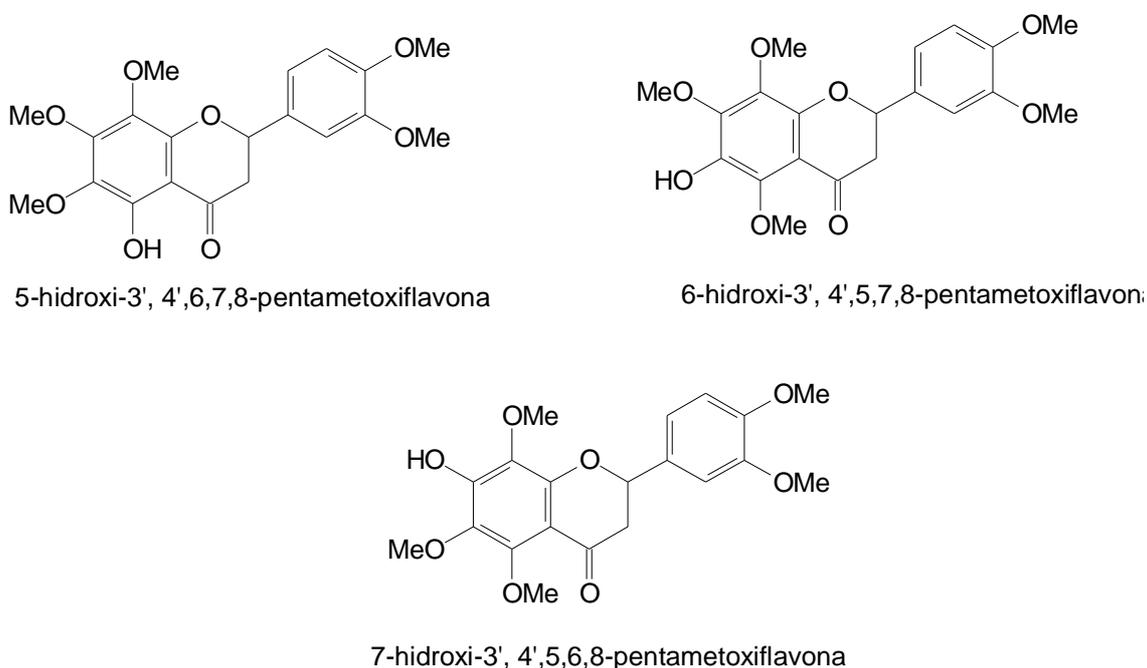


Figura 5.123. Fórmulas estruturais dos flavonóides 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona, 6-hidroxi-3',4',5,7,8-pentametoxiflavona e 7-hidroxi-3',4',5,6,8-pentametoxiflavona.

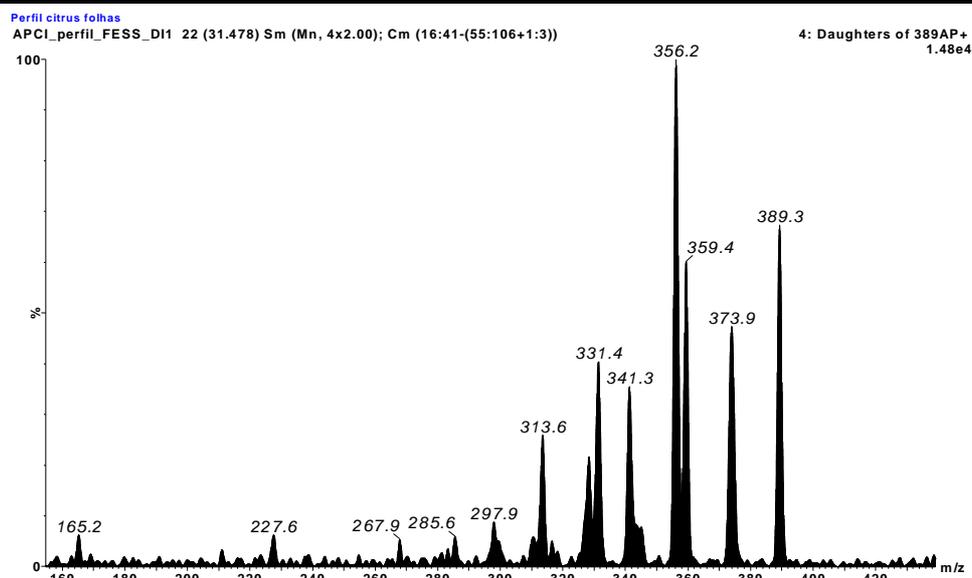


Figura 5.124. Espectro de massas obtido para a banda cromatográfica 5 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 389.

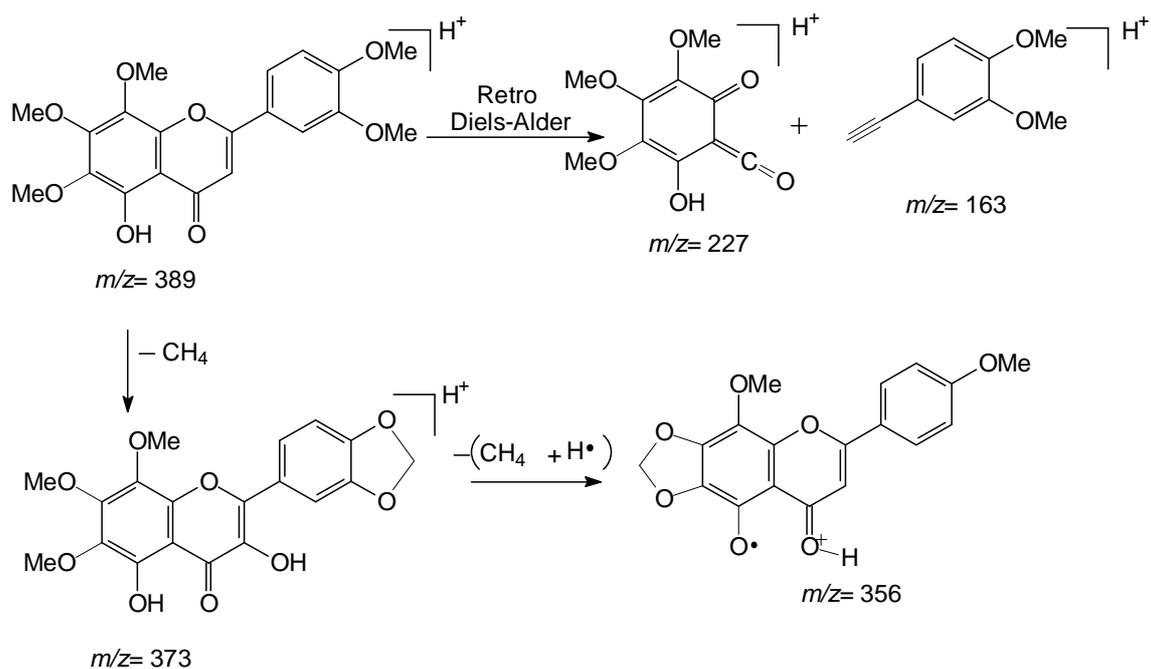


Figura 5.125. Proposta de fragmentação do flavonóide 5-hidroxi-3', 4',6,7,8-pentametoxiflavona.

As matrizes das folhas do limão cravo foram analisadas via LC-NMR, como comentado anteriormente. Este flavonóide ocorre nestas folhas e, assim, esta banda (07, figura 5.101, tempo de retenção próximo ao da banda 5 comentada acima) foi separada e seu espectro de RMN de ^1H registrado. Este mostrou cinco sinais de deslocamentos químicos na região de δ 3,8 a 4,10. Esses sinais integravam para três hidrogênios cada um e são característicos de grupos metoxilas (δ 3,86, 3H, OMe; 3,89 3H, OMe; 3,91, 3H, OMe; 3,95 3H, OMe; 4,06 3H, OMe). Observaram-se também sinais de quatro hidrogênios aromáticos na região de δ 7,1 a 8,0. Esses dados foram comparados com a literatura (LI *et al.*; 2006), sendo semelhantes ao flavonóide 5-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona (tabela 5.31). Este flavonóide não foi isolado anteriormente pelo grupo de PN da UFSCar nas folhas do enxerto padrão (FEC). Ele foi relatado nas cascas de *Citrus sinensis* (laranja pêra) (LI *et al.*; 2006). Nas folhas do enxerto deste último sobre o limão cravo este flavonóide está sendo citado pela primeira vez. Contudo, a ausência do sinal característico de hidroxila em C-5 impede de se confirmar a presença desta com segurança, e permitindo sugerir a presença do flavonóide 7-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona. Este último foi obtido por modificação estrutural e os dados de RMN de ^1H também estão na tabela 5.33 e estes não permitem descartar esta última possibilidade (Koga *et al.*, 2007).

Tabela 5.33. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do flavonóide 5 (ou 7)-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).

Posição	Composto identificado		<i>5-hidroxi</i> (literatura)		<i>7-hidroxi</i> (literatura)	
	δH	J (Hz)	$\delta^*\text{H}^*$	J^* (Hz)**	$\delta^*\text{H}^*$	J^* (Hz)**
2'	7,10 d	8,5	7,11 d	9	7,00 d	8,1
5'	7,50 d	2,0	7,51 d	2,0	7,42 s	-
6'	7,65 dd	(8,5; 2,0)	7,63 dd	(9,0; 2,0)	7,57 d	8,4
6	6,73 s	-	6,73 s	-	6,73 s	-
OMe	3,86	-	3,82	-	3,97	-
OMe	3,89	-	3,84	-	3,97	-
OMe	3,91	-	3,86	-	3,98	-
OMe	3,95	-	3,92	-	4,00	-
OMe	4,06	-	4,02	-	4,04	-

* ** $\delta^*\text{H}$ e J^* (Hz) são deslocamentos químicos e constantes obtidos da literatura (LI *et al.*; 2006; Koga *et al.*, 2007).

O espectro de íons produtos de m/z 389 para a banda cromatográfica 8 (Figura 5.128) permitiu identificar um flavonóide também monohidroxilado e pentametoxilado. A Retro Diels-Alder ocorrendo no íon m/z 389 correspondente à banda cromatográfica 8 leva aos íons m/z 227 e 163 em baixas intensidades, mas importantes, este último indica o anel B dimetoxilado e sem metoxila ou hidroxila em C-3 (Figura 5.129). O íon m/z 227 aparece em uma intensidade um pouco maior, mais confiável, e este garante o anel A monohidroxilado e trimetoxilado. A diferença entre este flavonóide e aquele da banda 5 está no pico base, o qual no anterior era m/z 356 e neste 359. Uma possibilidade seria a perda de CH_3 radicalar em C-5, levando ao íon produto m/z 374 a partir do íon m/z 389, e este radical formado ser estabilizado por uma interação com a carbonila em C-4 protonada, o que é bem conhecido nos flavonóides 5-hidroxilados (Figura 5.129). Esta possibilidade permitiria explicar não ter se formado o íon m/z 356 em percentual relevante, sugerindo a presença de uma metoxila em C-5. Porém, a proposta feita para o flavonóide da banda 4 com hidroxila em C-7, o qual também explica o íon base m/z 356, sugere um caminho estável. Esta mesma proposta com a eliminação de metoxila radicalar da posição 7 também levaria ao íon m/z 374 (figura 5.129) com a mesma condição de estabilidade discutida para a banda cromatográfica 5. Esta segunda proposta é mais coerente com as discussões feitas para a banda 5.

O espectro de íons produtos também mostra a perda de duas unidades de CH_2O , a primeira levando ao pico base m/z 359, e a segunda acompanhada pela eliminação de um hidrogênio radicalar da hidroxila posicionada em C-6 levando ao íon m/z 328, no qual o radical pode ser estabilizado por conjugação com o oxigênio do heterocíclico C. Outro íon produto observado é o m/z 341, o qual pode se formar pela perda de três unidades de CH_4 formando três metilenodioxilas. Estes dados permitem sugerir para a banda cromatográfica 8 o flavonóide 6-hidroxi-3',4',5,7,8-

pentametoxiflavona. Infelizmente para este não foi possível obter dados espectrais de RMN.

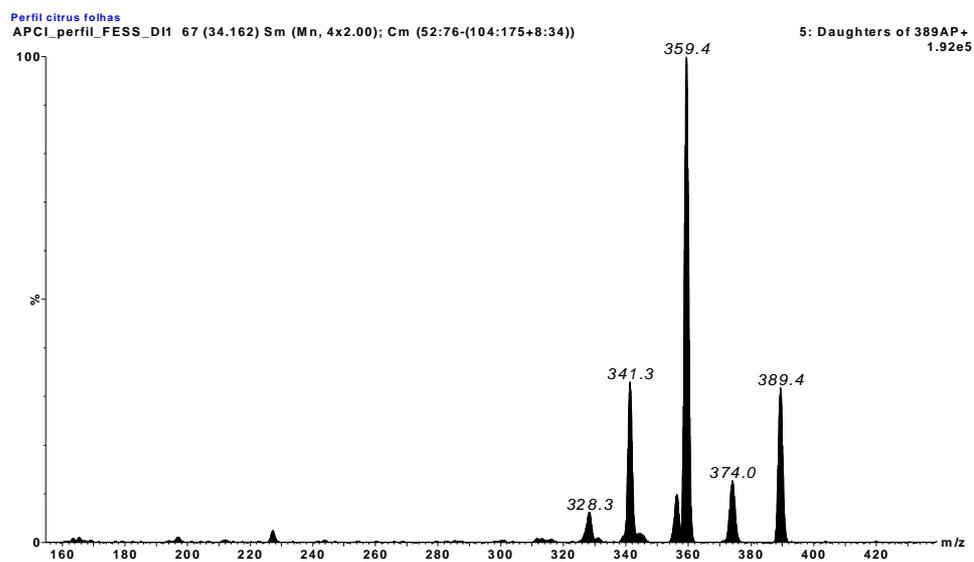


Figura 5.128. Espectro de massas obtido para a banda cromatográfica 8 por APCI no modo positivo de análise: íons produto de m/z 389.

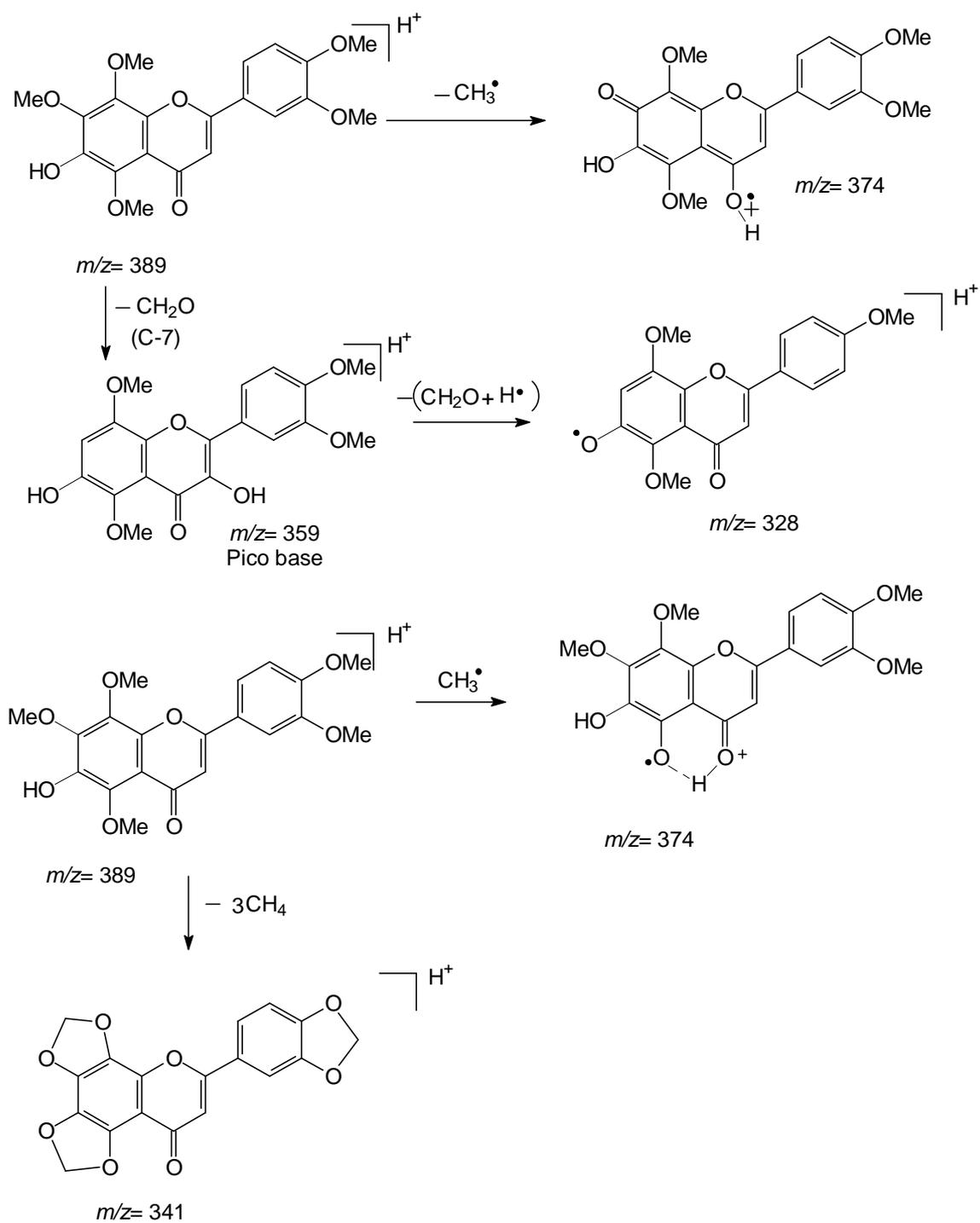


Figura 5.129. Proposta de fragmentação do flavonóide 6-hidroxi-3', 4',5,7,8-pentametoxiflavona.

5.7.3.1.5 Banda cromatográfico 6: flavonóide nobiletina

A análise da banda cromatográfica denominada 6 por APCI no modo positivo de ionização mostrou o íon quasimolecular m/z 403. O espectro de íons produtos de m/z 403 e 373 para esta banda cromatográfica (Figura 5.130) permitiu identificar um flavonóide hexametoxilados. Não foram observados íons produtos provenientes de RDA (Retro Diels-Alder) a partir do íon m/z 403. O íon m/z 373 pode ter se formado pela perda de uma unidade $H_2C=O$. A Retro Diels-Alder ocorrendo neste íon leva aos íons m/z 211 e 163, este último confirma o anel B dimetoxilado e a ausência de metoxila em C-3. Os íons m/z 211 e 183 (oriundo do m/z 211, pico base) mostram que a perda do metanal no íon $M+H$ para levar ao m/z 343 ocorreu no anel A, confirmando o anel A totalmente metoxilado. Estes dados permitem confirmar com segurança o flavonóide nobiletina para a banda cromatográfica 6 (Figura 5.131, outros fragmentos são mostrados nesta figura). Este flavonóide foi isolado anteriormente pelo grupo de PN da UFSCar nas folhas do enxerto padrão (FEC) (Ribeiro et al., 2008), reforçando a proposta acima.

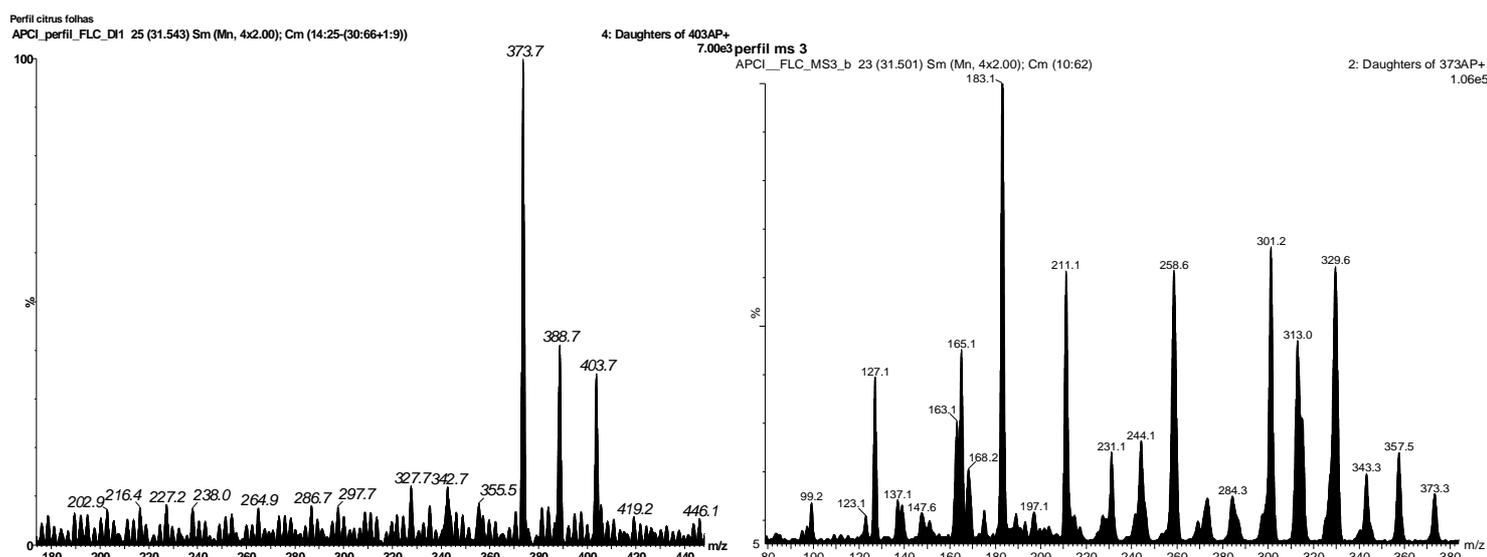


Figura 5.130. Espectros de massas obtidos para a banda cromatográfica 6 por APCI no modo positivo de análise: íons produtos de (a) m/z 403 e (b) 373.

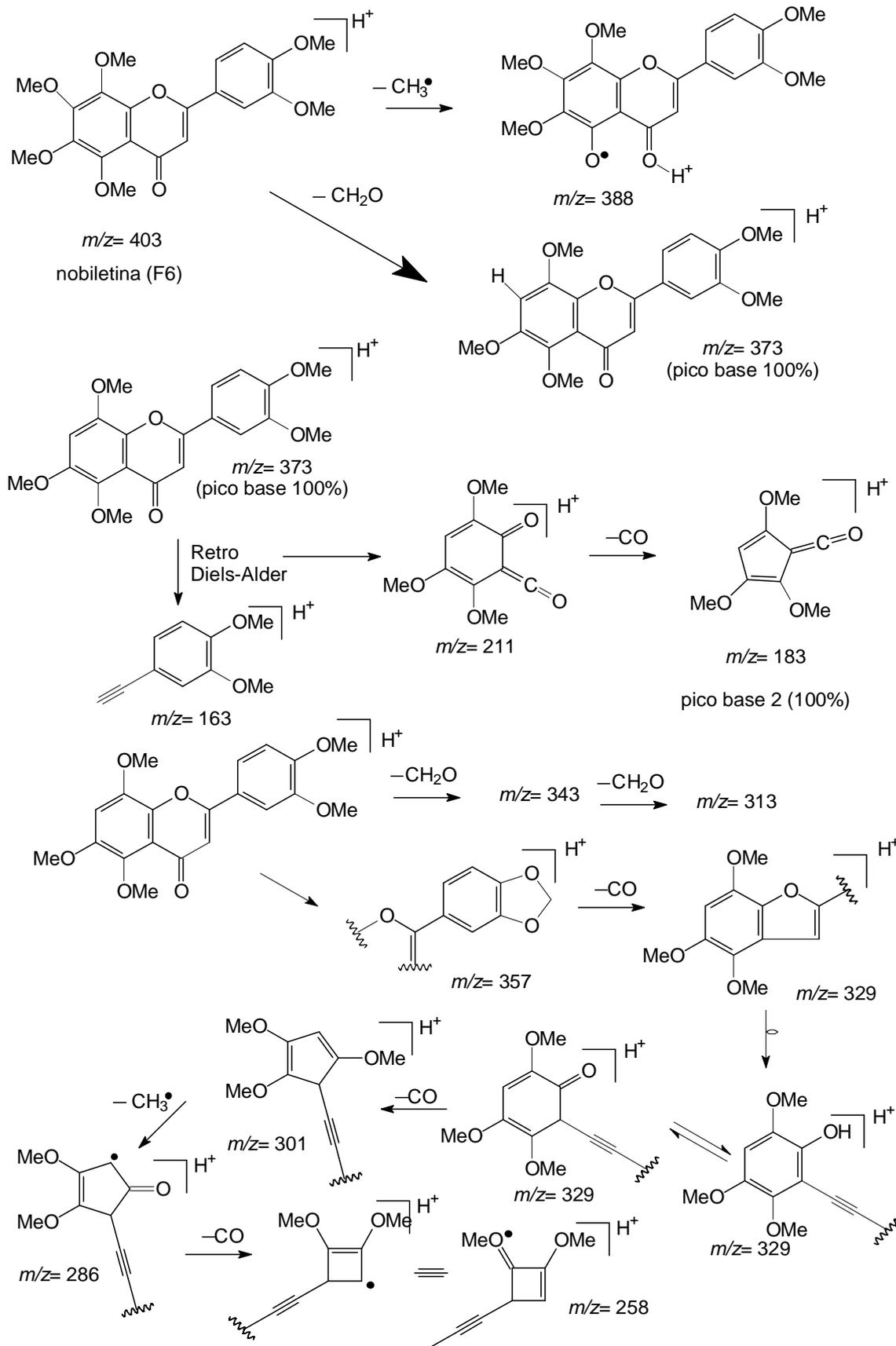


Figura 5.131. Proposta de fragmentação do flavonóide nobiletina.

O cromatograma do íon selecionado m/z 403 com as respectivas áreas para cada matriz analisada (Figura 5.132) mostra que a nobiletina aparece com baixa concentração nas folhas da laranja pêra e em quantidade maior nas folhas do limão cravo, no entanto no enxerto destes dois sua concentração aumenta em 2,13 vezes àquela da planta de origem (FLP). Este aumento pode ser interpretado como uma reação da laranja pêra estando sobre o limão cravo. Sua concentração também aumenta quando o enxerto possui sintomas de CVC (1,59 vezes àquela do enxerto padrão). Este aumento pode ser interpretado como uma reação da planta ao patógeno, permitindo classificar este flavonóide como uma fitoantecipina. Interessante que naqueles enxertos com a *X. fatidiosa* em seu interior, mas sem sintoma de CVC, a concentração deste flavonóide diminui em - 1,66 vezes àquela do enxerto padrão, FEC. Isto também foi observado com o flavonóide 5-demetoxinobiletina discutido anteriormente. Ou seja, novamente observa-se a variação da biossíntese de outro flavonóide, a nobiletina, em sentidos opostos, as plantas tolerantes (FESS) diminuem sua concentração e a suscetível (FECS) aumenta. Esta é uma pergunta ainda sem resposta nesta tese.

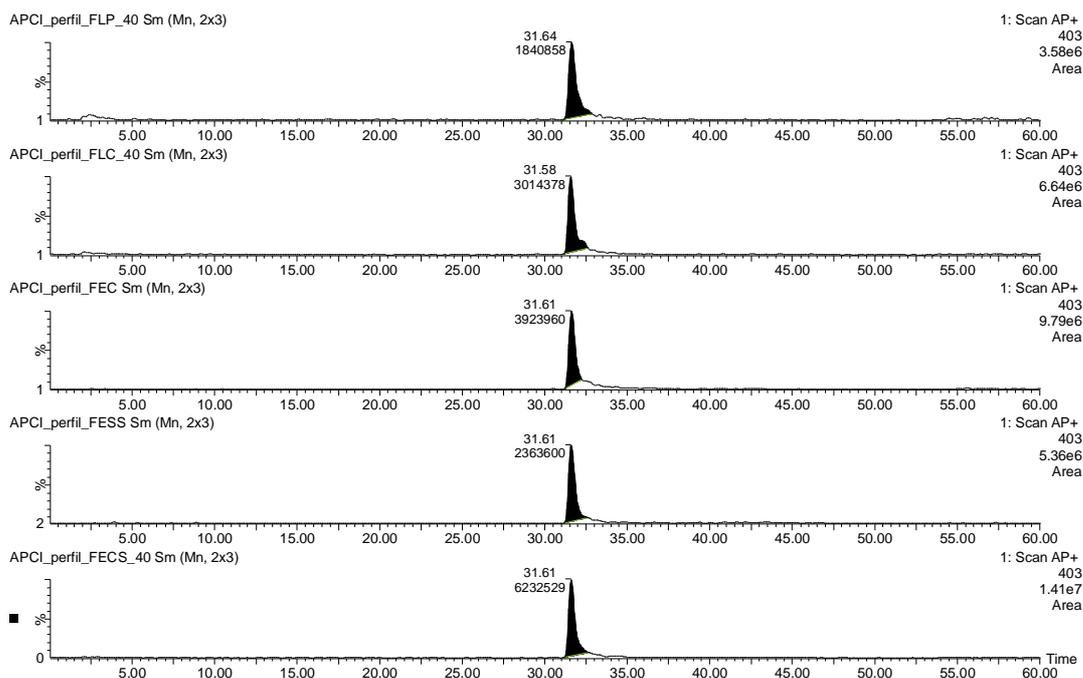


Figura 5.132. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=403$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes folhas: FLP, FLC, FEC, FESS e FECS, respectivamente.

Nobiletina é encontrada em grande quantidade no suco e nas cascas dos frutos de citros. Recentemente um grupo de pesquisadores analisou o metabolismo do nobiletina sobre microssomas de fígado de ratos, hamsters e porcos, obtendo vários flavonóides desmetilados, entre eles os 6-hidroxi-3', 4',5,7,8-pentametoxiflavona e 7-hidroxi-3', 4',5,7,8-pentametoxiflavona (Koga et al., 2007).

Foi comentado anteriormente que a bactéria inoculada nas plantas dos citros estudados foi de um mesmo lote desenvolvido para esta finalidade. As plantas estudadas receberam a bactéria no mesmo período e as análises foram feitas todas também no mesmo intervalo dado para o desenvolvimento da bactéria. As plantas tinham todas elas a mesma idade, porém, lógico não eram exatamente os mesmos indivíduos. Portanto, saber por que algumas plantas apresentaram sintoma de CVC e outras não são reações difíceis de entender. Um número maior de plantas apresentou o

sintoma de CVC. Aquelas tolerantes (sem sintoma de CVC) seriam genótipos diferentes e com isto utilizam fitoantecipinas distintas? Conhecendo o metabolismo da nobiletina discutido acima, pode-se propor para as plantas tolerantes serem realmente genótipos diferentes, e um dos mecanismos de defesa ser a modificação deste flavonóide naqueles dois obtidos em ensaios com animais. Estes dois flavonóides seriam mais tóxicos à *X. fastidiosa*, impedindo o seu desenvolvimento ao nível em que a planta expressa os sintomas de CVC. Isto também explicaria a diminuição da nobiletina nas plantas tolerantes e o seu aumento naquelas não tolerantes. O mesmo pode estar ocorrendo com 5-demetoxinobiletina discutido anteriormente, porém seus produtos de desmetilação não foram detectados por estarem em baixa concentração.

5.7.4 Análise da variação do perfil químico nos caules inferiores e superiores dos citros estudados

Ao analisar os cromatogramas de íons totais dos caules superiores e inferiores de todas as plantas de citros estudadas, verificou-se que todos os metabólitos secundários possíveis de serem identificados eram os mesmos já analisados e discutidos nas folhas e raízes das mesmas plantas. Os íons *quasimoleculares* (M+H) m/z 373 referentes aos flavonóides sinensetina e 5-demetoxinobiletina, cujos tempos de retenção no método analítico desenvolvido foi de aproximadamente 29 e 33 min, foram encontrados nos caules superiores e inferiores. Estes dois flavonóides foram identificados nas folhas dos citros estudados.

O íon *quasimolecular* (M+H) m/z 403, identificado como nobiletina e com tempo de retenção de aproximadamente 31,5 min, foi encontrado nos caules inferiores e superiores. A nobiletina foi também detectada nas folhas dos citros estudados.

O íon *quasimolecular* (M+H) m/z 245 referente à cumarina ostol e identificada nas raízes dos citros estudados, também foi detectada com tempo de retenção de aproximadamente 35 min nos caules superiores e inferiores dos citros estudados.

O íon *quasimolecular* (M+H) m/z 313 correspondente à cumarina nordentatina e identificada nas raízes dos citros estudados, também foi encontrada com o tempo de retenção de aproximadamente 37 min nos caules (nos caules superiores e inferiores dos citros estudados).

O íon *quasimolecular* (M+H) m/z 381 correspondente à cumarina clausarina identificada nas raízes dos citros estudados, também foi encontrada com o tempo de retenção de aproximadamente 41 min nos caules nos caules superiores e inferiores dos citros estudados.

5.7.5 Análise das cumarinas limetina e bergapteno nas raízes e caules dos citros estudados

A cumarina limetina foi encontrada apenas nas folhas de limão cravo (FLC), com Rt de 22,5 min. Visando verificar se esta seria encontrada nos demais órgãos o seu íon *quasimolecular* (M+H) m/z 207 foi selecionado para análise em todos os citros estudados. Este íon parece estar presente apenas no caule do limão cravo (Figura 5.133 a, b e c). Estes dados mostram que esta cumarina não parece ser um marcador da doença CVC.

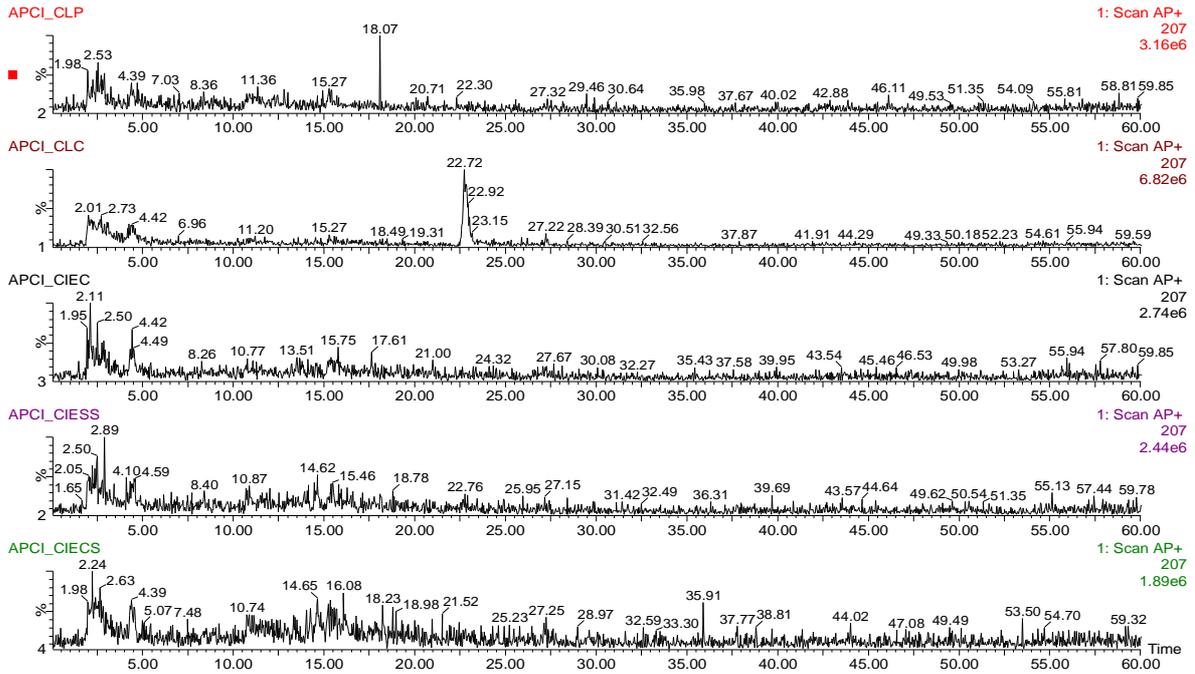


Figura 5.133a. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=207$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos dos seguintes caules inferiores: CLP, CLC, CIEC, CIESS e CIECS, respectivamente.

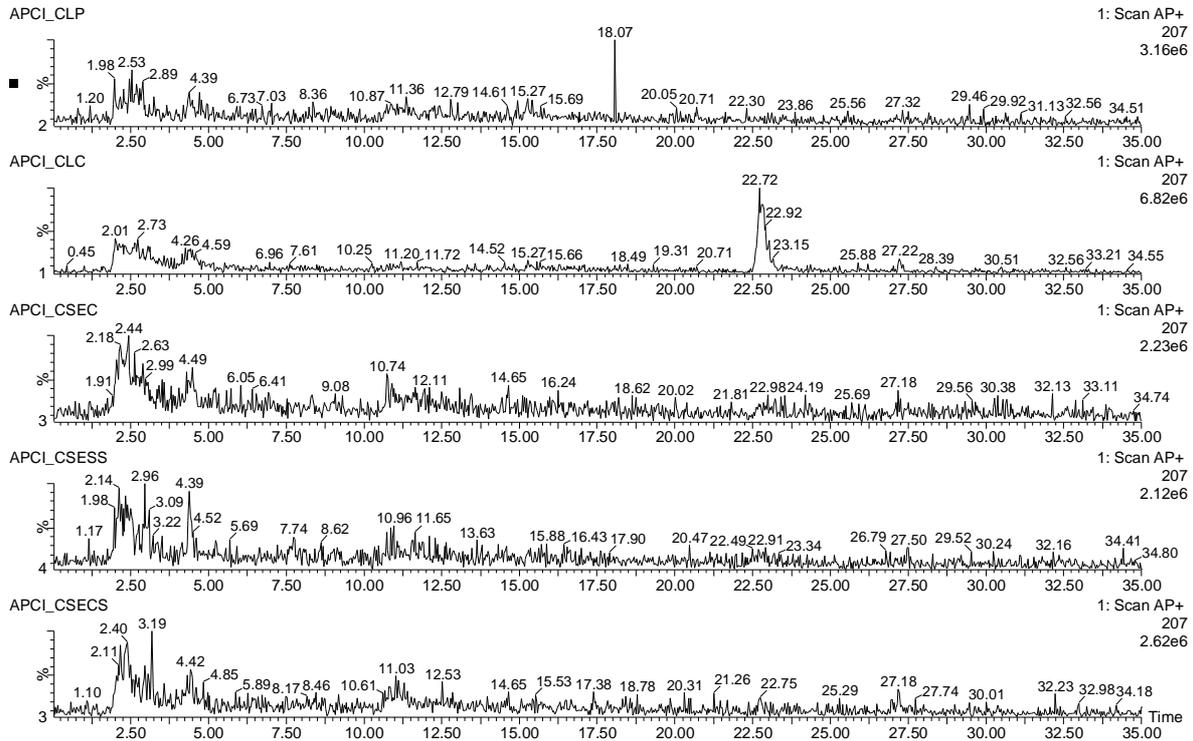


Figura 5.133b. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=207$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos dos seguintes caules superiores: CLP, CLC, CSEC, CSESS e CSECS, respectivamente.

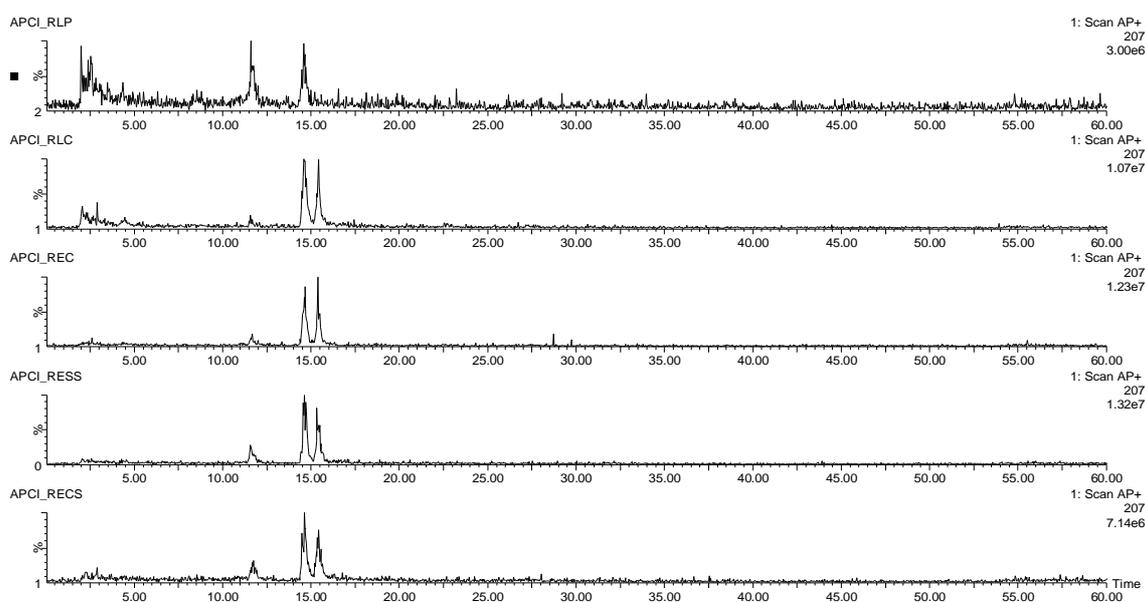


Figura 5.133c. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=207$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

A cumarina bergapteno foi encontrada nas folhas do limão cravo (FLC, Rt 24.2 min) em uma concentração 10,4 vezes maior que aquela encontrada para as folhas do enxerto com sintoma de CVC (FECS). Nas matrizes das folhas da laranja pêra esta cumarina parece estar ausente. Estes dados são difíceis de explicar, pois o esperado pelas definições de enxertia, é que a planta mantém as características das plantas de origem, com pequenas variações. Ou seja, seria esperado encontrar bergapteno nas folhas da laranja pêra. Outro fato interessante foi não ter sido encontrado bergapteno nas folhas das plantas com a bactéria em seu interior, mas sem sintomas de CVC.

Visando verificar se esta cumarina estivesse sendo translocada dos caules ou raízes para as folhas no enxerto, o seu íon *quasimolecular* (M+H) m/z 217 foi selecionado para análise em todos os citros estudados. Este íon foi detectado apenas no caule do limão cravo (Figura 5.134 a, b e c). Esta informação sugere que a cumarina bergapteno estaria sendo

translocada do caule do porta-enxerto limão cravo para as folhas na copa da árvore. O aumento da sua concentração nas folhas das plantas com sintomas de CVC sugere ser esta uma fitoantecipina.

MASUDA *et al.* (1998) relata o bergapteno e outras furanocumarinas como sendo fitoalexinas isoladas de *Glenhina littoralis* após a inoculação de *Pseudomonas cichorri* nas suas raízes. Os autores relatam que a produção do bergapteno se dá devido ao *stress* da planta durante o processo de desenvolvimento da bactéria. Esses dados da literatura reforçam a hipótese de que bergapteno seria uma fitoantecipina no enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintomas de CVC.

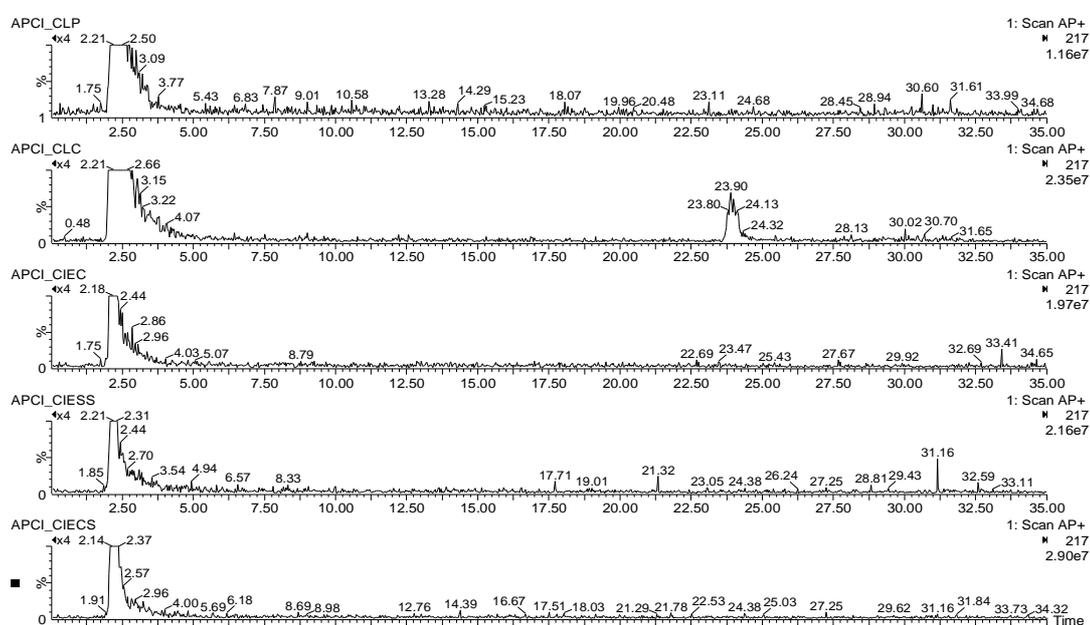


Figura 5.134a. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=217$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos dos seguintes caules inferiores: CLP, CLC, CIEC, CIESS e CIECS, respectivamente.

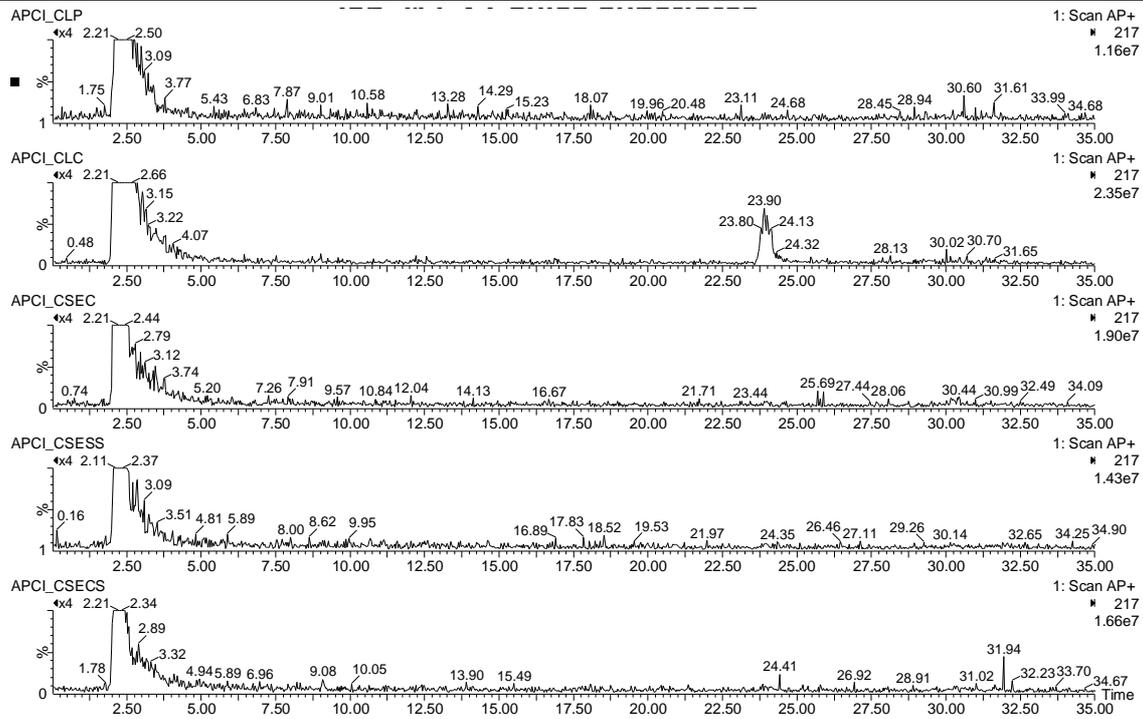


Figura 5.134b. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=217$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos dos seguintes caules superiores: CLP, CLC, CEC, CESS e CECS, respectivamente.

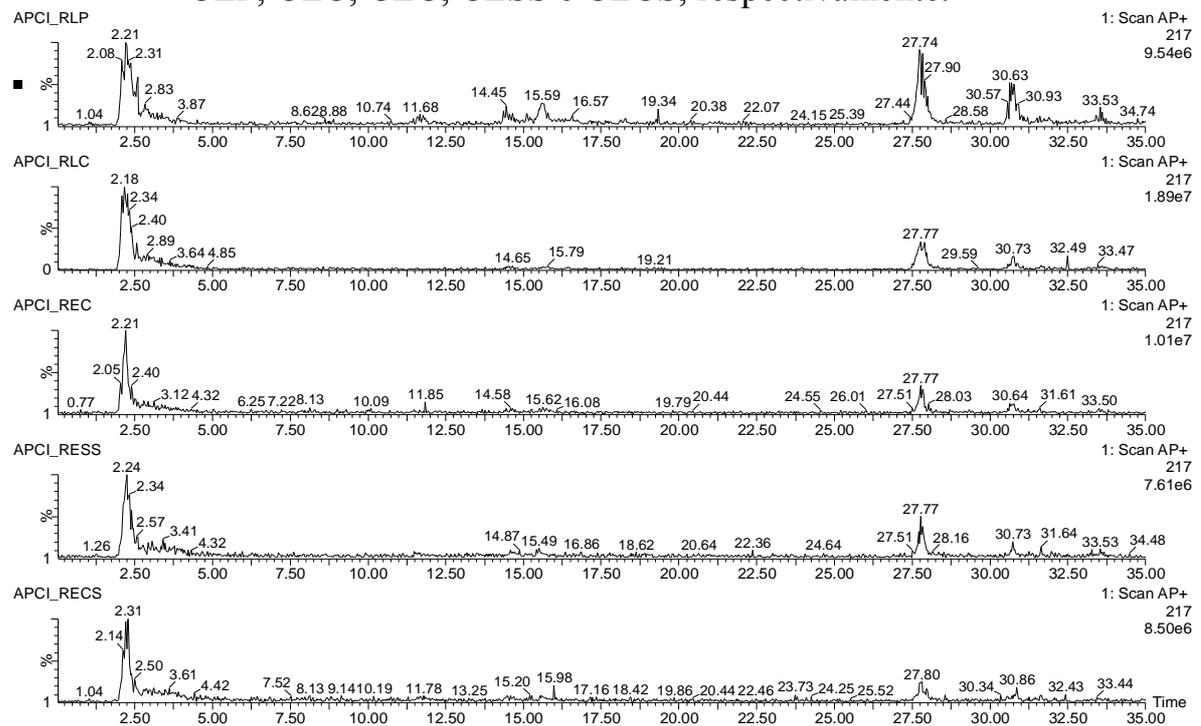


Figura 5.134c. Cromatogramas de íons selecionados ($m/z=217$) APCI no modo positivo de ionização dos extratos das seguintes raízes: RLP, RLC, REC, RESS e RECS, respectivamente.

5.8 Análise da variação do perfil químico dos citros estudados via LC-NMR

5.8.1 Análise da variação do perfil químico nas folhas do limão cravo utilizando a técnica LC-NMR

A técnica de LC-NMR foi aplicada apenas nos extratos das folhas do limão cravo. Esse experimento foi realizado pela Dra. Cristina Daolio na Alemanha, e utilizou-se a matriz de limão cravo, pois foi a única matriz “injetada” em tempo hábil de conclusão deste trabalho. O aparelho de LC-NMR chegou ao grupo onde a tese foi desenvolvida muito recentemente, com isto não foi possível analisar as demais as matrizes estudadas via LC-MS. Um grande problema encontrado nesta técnica foi o fato de ter realizado apenas experimentos de RMN de ^1H , os quais nem sempre permitem definir uma estrutura com segurança. Ttrabalhos fututros serão realizados com as demais matrizes, principiamente aquelas infectadas com a bactéria afim de se determinar outros metabólitos secundários não citados neste trabalho.

O cromatograma obtido via LC-MS/MS, foi mostrado no item anterior e será novamente apresentado abaixo com as especificações das bandas cromatográficas identificadas via LC-NMR.

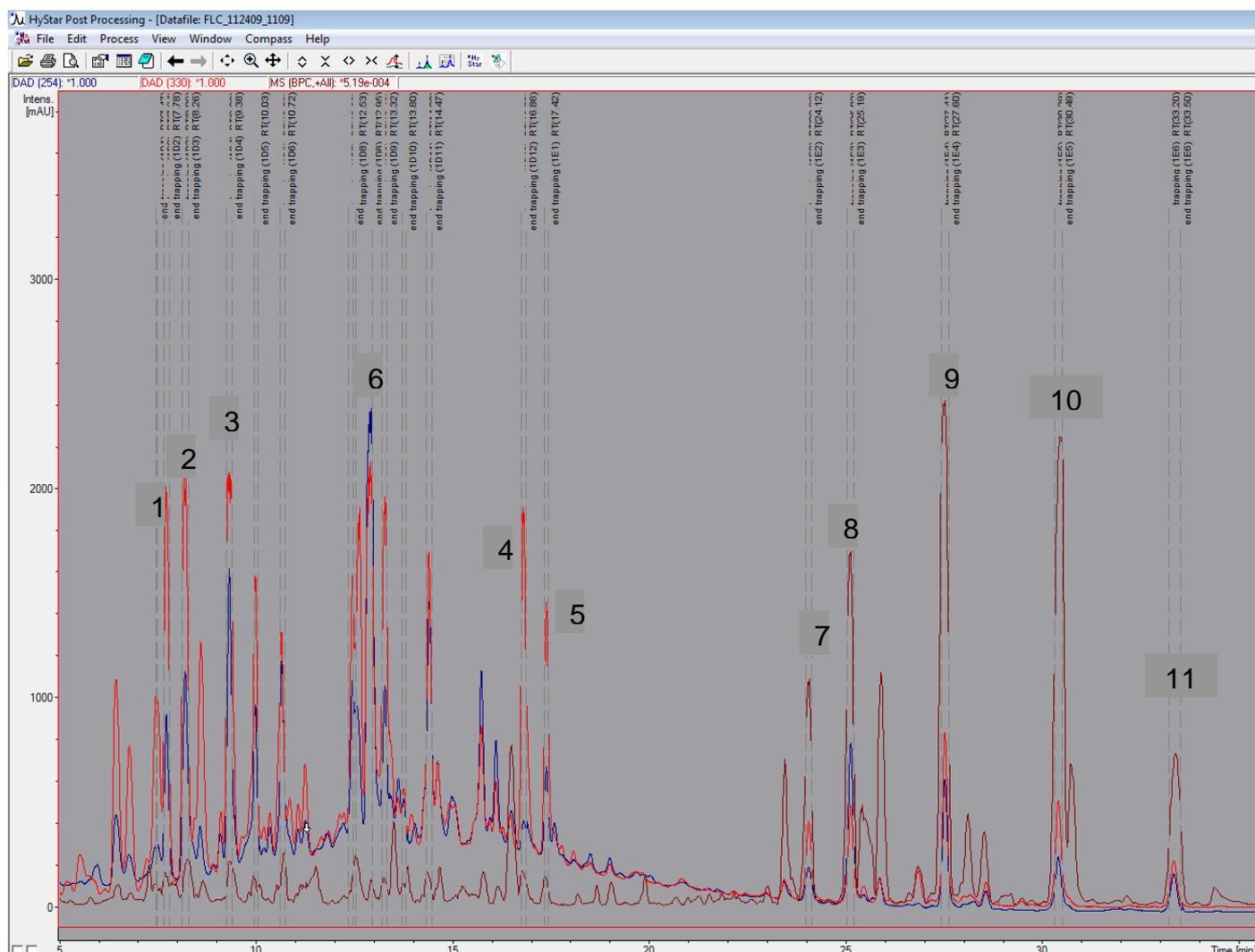


Figura 5.135. Cromatograma de HPLC-NMR das folhas de limão cravo especificando as bandas cromatográficas “trapeadas” em cartucho de SPE.

Apesar de se ter aprisionado várias bandas cromatográficas, algumas delas não serão discutidas, pois a relação sinal ruído e a pureza de algumas delas não levaram a bons espectros de RMN de ^1H . Conseguiu-se neste trabalho, identificar 11 metabólitos secundários presentes nas folhas do limão cravo. A banda cromatográfica 10 refere-se ao flavonóide tangeretina e esta foi discutida no item 5.7.3.1.3.

5.8.1.1 Sinais cromatográficos 1 a 6: compostos derivados da ácido *p*-metoxicinâmico

Ao analisar os espectros obtidos via LC-NMR para as bandas cromatográficas de 1 a 6, observou-se que todos possuíam certo grau de semelhança, sendo que todos eles mostravam como cadeia principal uma unidade do ácido cinâmico substituída (a cadeia principal de quase todos os metabólitos discutidos abaixo é formada pelo ácido 4-metoxicinâmico). Observou-se dois dubletos com constante de acoplamento de 16 Hz pertencentes aos hidrogênios Ha e Hb, um singleto integrando para três hidrogênios na região de δ 4,0 referente à uma metoxila. Na região dos aromáticos, entre δ 6,5 a 7,5, todos os espectros apresentavam sinais para três hidrogênios nesta região com constante de acoplamento de aproximadamente 8,0 e 2,0 Hz e multiplicidades de dubleto e duplo dubleto, sugerindo assim a presença de anel aromático substituído nas posições 1, 3 e 4. Nas posições 1 e 4, os dados sugerem a cadeia do ácido cinâmico e de metoxila, respectivamente. Os outros dados espectrais referem-se ao substituinte na posição 3. Estes dados serão discutidos a seguir analisando o espectro de RMN de ^1H obtido para cada uma das bandas cromatográficas.

A banda cromatográfica 1 apresentou no seu espectro de RMN de ^1H (figuras 5.36a, b e c,) dois dubletos em δ 6,35 ($J = 16,0$ Hz, 1H) e δ 7,60 ($J = 16,0$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios H α e H β pertencentes à cadeia em C-1 do ácido *p*-metoxicinâmico. Apresentou também um dubleto em δ 7,22 ($J = 1,7$ Hz, 1H) referente ao hidrogênio H-3 do anel aromático. Os hidrogênios H-5 e H-6 deste anel apresentaram-se como, duplo dubleto em δ 7,13 ($J = 8,0$ e 1,7Hz, 1H, H-6) e dubleto em 6,84 ($J = 8,0$ Hz, 1H, H-5). Observou-se também outros sinais em δ 4,27 dd

($J = 5,6$ e $3,0$ Hz, 1H), δ 4,30 d ($J = 3,0$, 1H), δ 4,35 d ($J = 3,5$ Hz, 1H) e δ 5,37 dd ($J = 5,6$ e $3,0$ Hz, 1H), sugerindo corresponderem a hidrogênios carbinólicos presentes na molécula (figuras 5.116a; 5.116b e 5.166c). Estes dados permitem propor para a banda cromatográfica 1 o ácido 3-(1,3,4-trihidroxi-2,5-lactona)-4-metoxicinâmico.

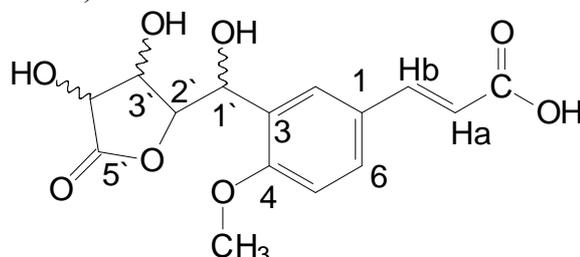


Figura 5.136. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 1.

Essa cadeia lateral lactônica pode ser formada através de uma C-prenilação do ácido cinâmico, a qual é favorecida pelo grupo-OMe em C-4, orientador orto-para. A figura abaixo mostra uma possível rota biogenética para o composto ácido 3-(1,3,4-trihidroxi-2,5-lactona)-4-metoxicinâmico.

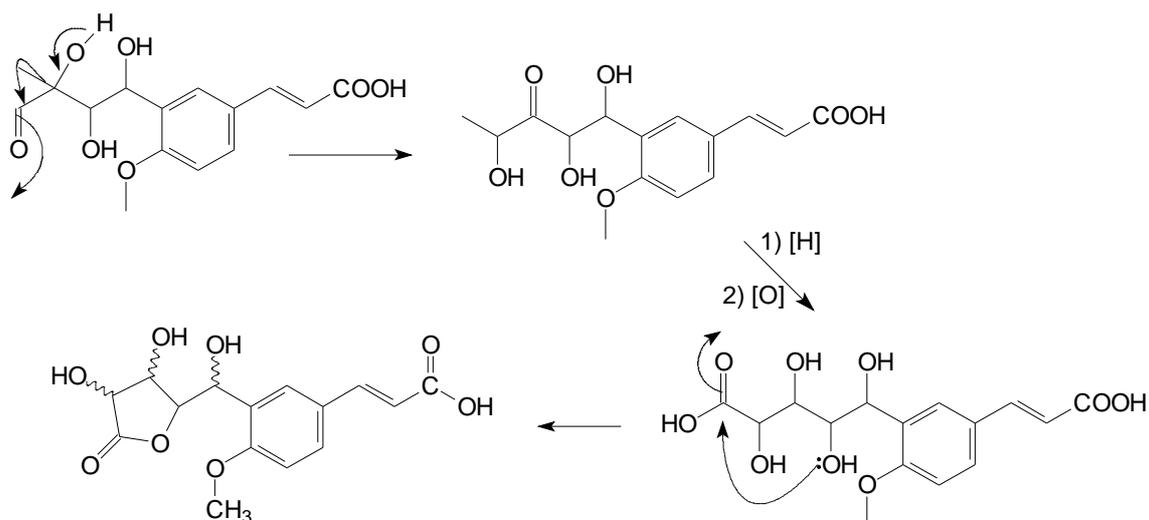


Figura 5.137. Provável rota biogenética para formação referente à banda cromatográfica 1.

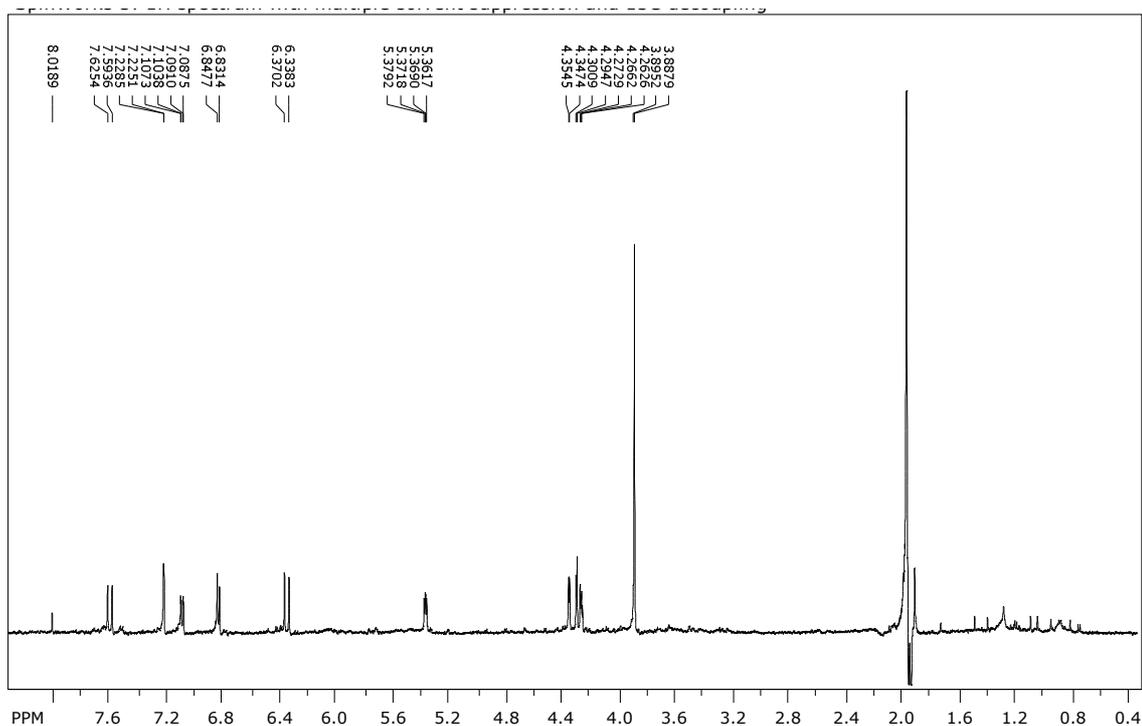


Figura 5.138a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 1.

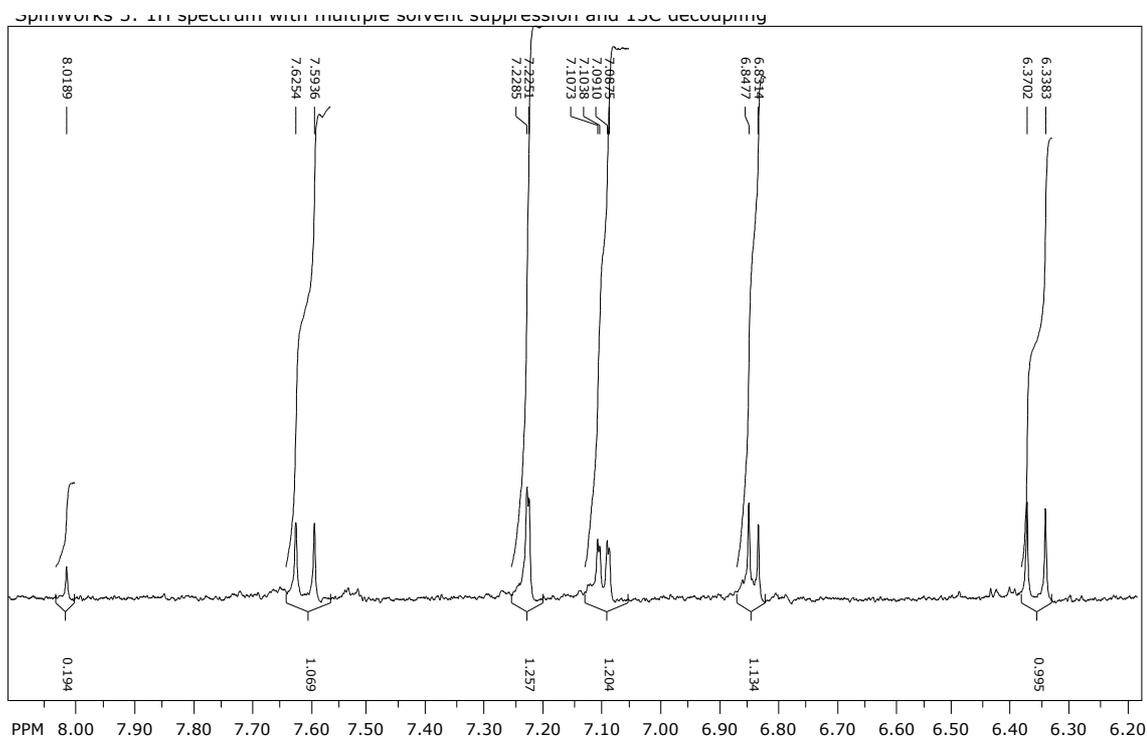


Figura 5.138b. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 1..

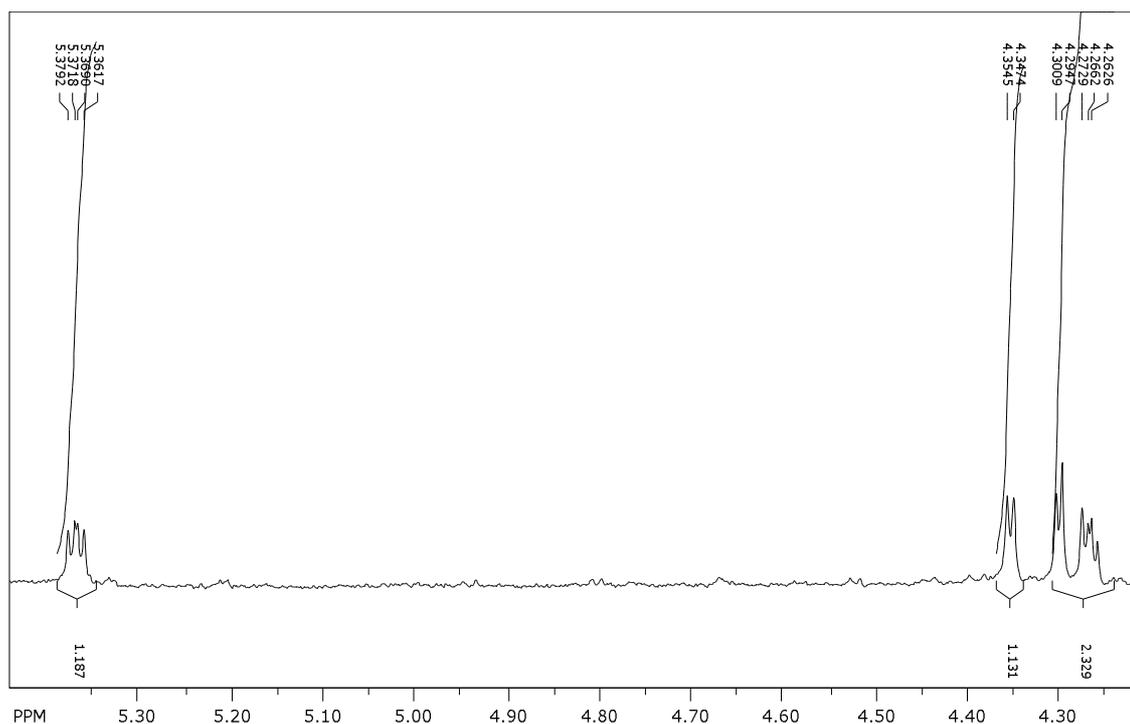


Figura 5.138c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 1.

A banda cromatográfica 2 apresentou em seu espectro de RMN de ^1H (figura 5.139a, b e c, página 263) todos os sinais referentes ao composto ácido 3-(1,3,4-triidroxi-2,5-lactona)-4-metoxi cinâmico em intensidade menor. Outros sinais em intensidades maiores observados forma 2 dubletos em δ 6,43 ($J= 16,0$ Hz, 1H) e δ 7,67 ($J= 16,0$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios $\text{H}\alpha$ e $\text{H}\beta$ do ácido *p*-metoxicinâmico e um dubleto em δ 7,26 ($J= 1,7$ Hz, 1H) referente ao H-3 do anel aromático. Os hidrogênios H-5 e H-6 deste anel apresentaram-se como, duplo dubleto em δ 7,12 ($J= 8,0$ e 1,7 Hz, 1H, H-6) e dubleto em 6,84 ($J= 8,0$ Hz, 1H, H-5). Também foram observados sinais em δ 4,07 d ($J= 4,2$ Hz, 1H), δ 4,21 dd ($J= 3,9$ e 4,2 Hz, 1H) e δ 5,22 d ($J= 3,9$ Hz, 1H), sugerindo corresponderem a hidrogênios carbinólicos presentes na molécula. Esses dados sugerem para o sinal cromatográfico 2 os seguintes compostos em

mistura: ácido 3-(1,3,4-triidroxi-2,5-lactona)-4-metoxi cinâmico e ácido 3-(3,4-driidroxi-2,5-lactona)-4-metoxi cinâmico.

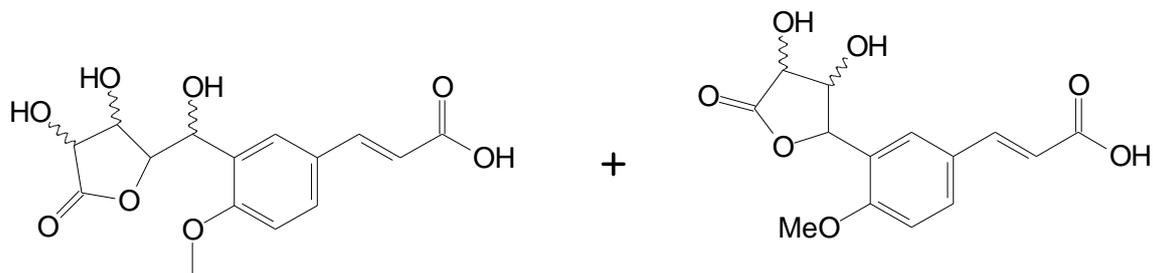


Figura 5.139. Prováveis estruturas das substâncias referentes à banda cromatográfica 2.

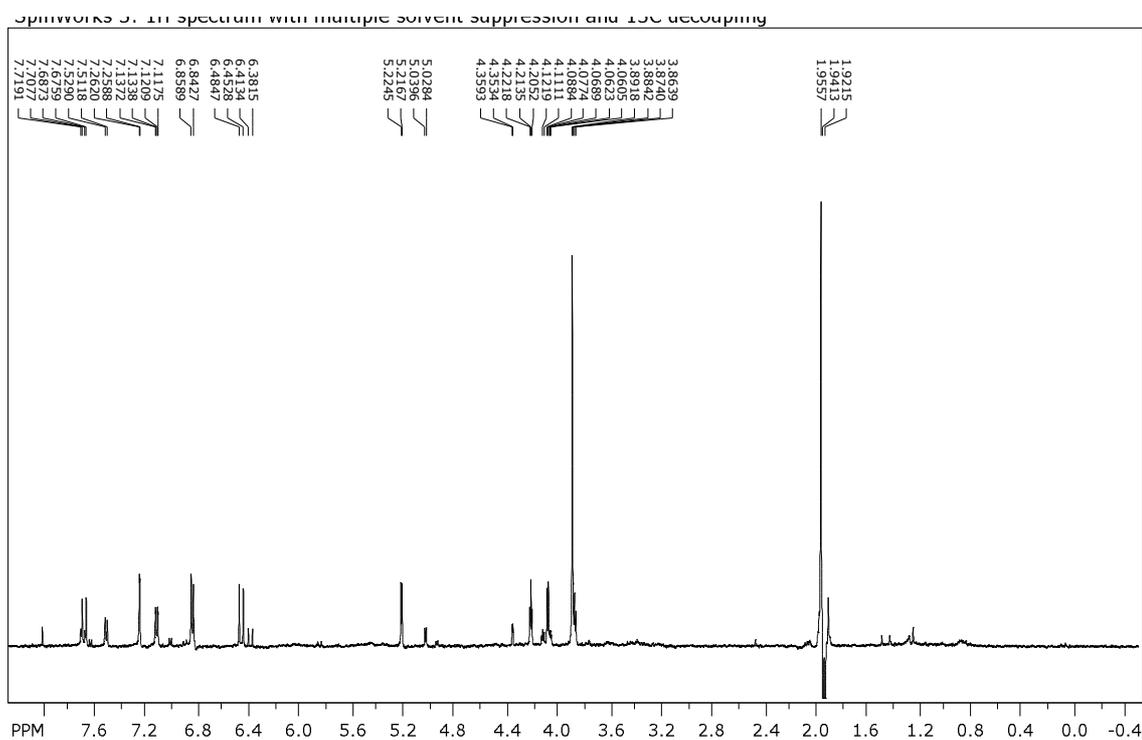


Figura 5.140a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) dos compostos referentes à banda cromatográfica 2.

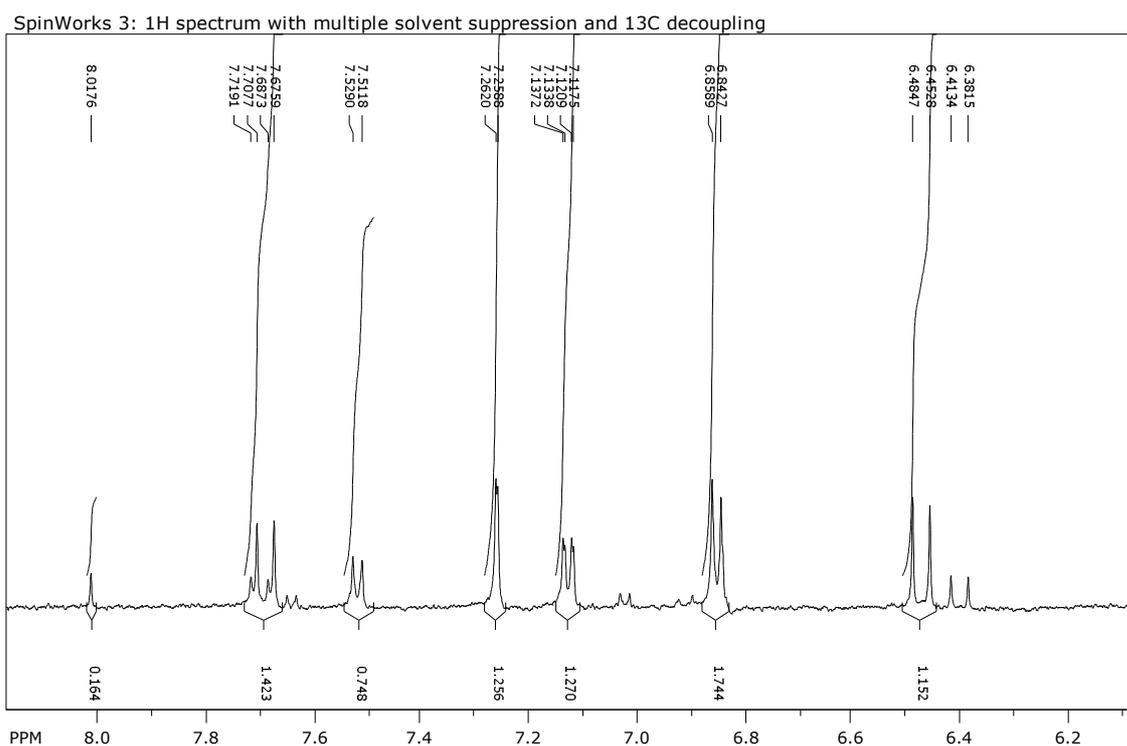


Figura 5.140b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) dos compostos referentes à banda cromatográfica 2

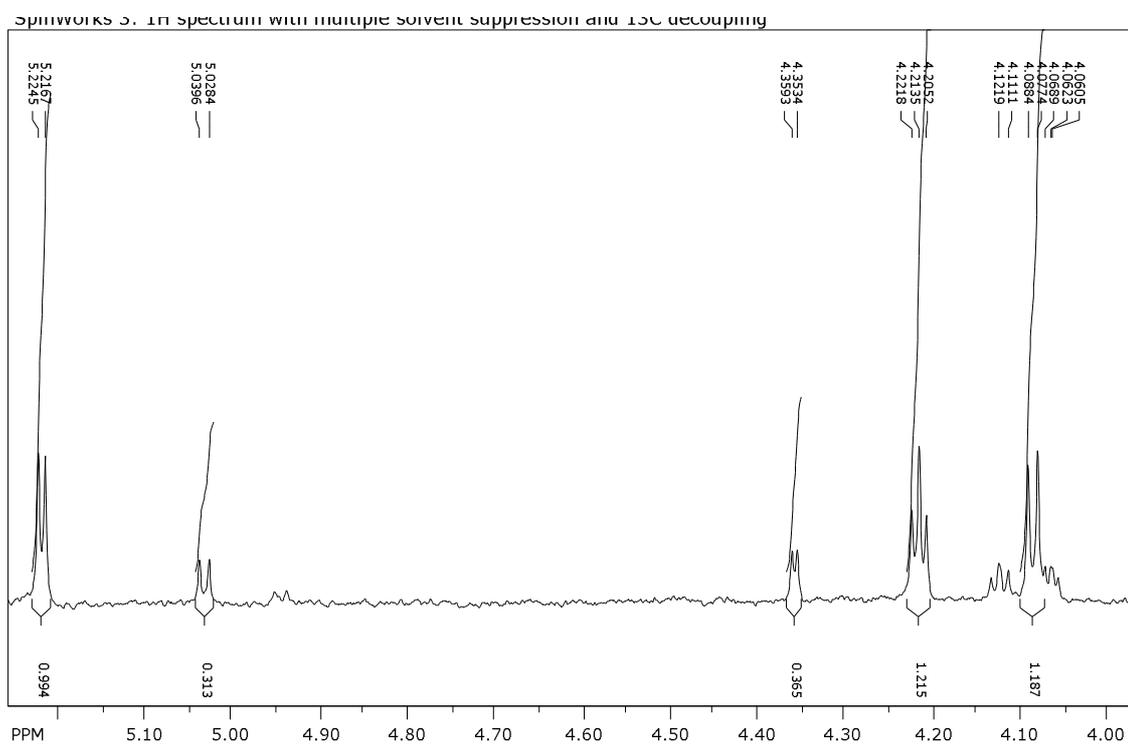


Figura 5.140c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) dos compostos referentes à banda cromatográfica 2

O espectro de RMN de ^1H (figuras 5.143a, b e c) referente à banda cromatográfica 3 mostrou todos os deslocamentos químicos pertencentes à cadeia do ácido 4-metoxicinâmico e outros similares àqueles da lactona discutida acima, mas com constantes de acoplamento diferentes, δ 4,07 dd ($J= 4,4$ e $3,0$ Hz, 1H), δ 4,13 dd ($J= 5,7$ e $4,4$ Hz, 1H), δ 4,36 d ($J= 3,0$ Hz, 1H) e δ 5,04 d ($J= 5,7$ Hz, 1H). Estes dados sugerem a presença de uma lactona de seis membros ligada ao C-3, e definindo a estrutura como ácido 3-(2,3,4-trihidroxi-1,5-lactona)-4-metoxi cinâmico.

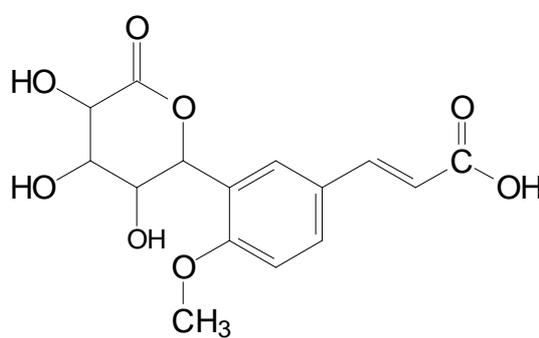


Figura 5.141. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 3.

Essa proposição se deu por análise das constantes de acoplamento como abaixo:

- O primeiro foi que ao analisar as constantes de acoplamento pode-se deduzir tratar-se de constantes 1,2 equatoriais, equatoriais ($J_{e,e} = 3,0$), constantes 1,2 axiais, equatoriais ($J_{a,e} = 4,4$ Hz) e constantes 1,2 axiais, axiais ($J_{a,e} = 5,7$ Hz).

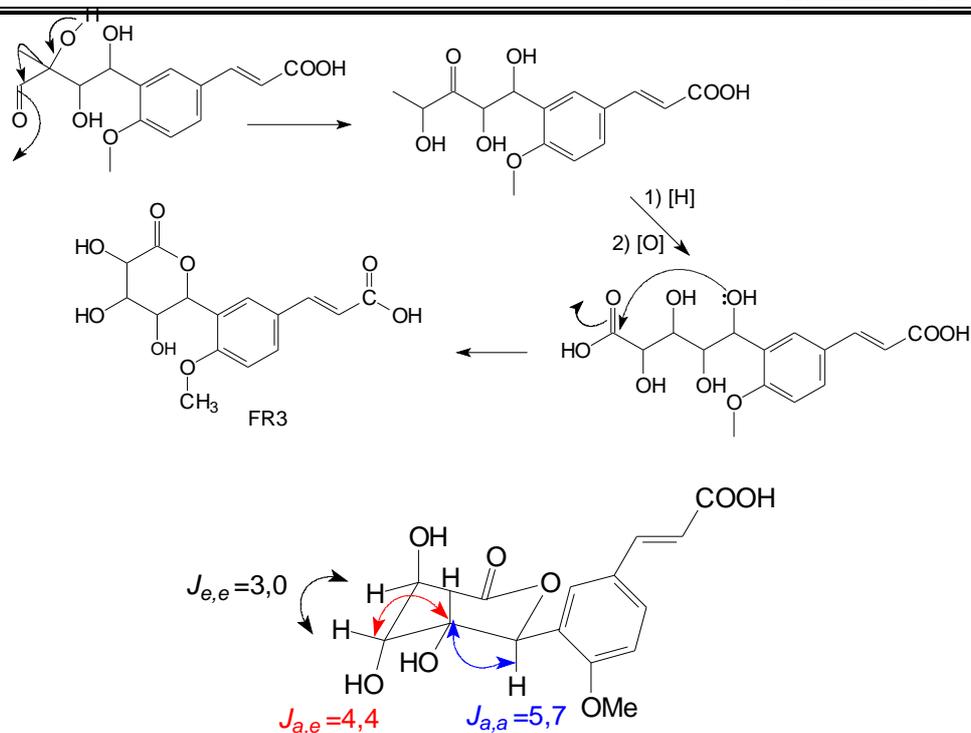


Figura 5.142. Provável rota biogênica para formação do composto ácido 3-(2,3,4-trihidroxi-1,5-lactona)-4-metoxi cinâmico, especificando as constantes de acoplamento da conformação cadeira adotada pela molécula.

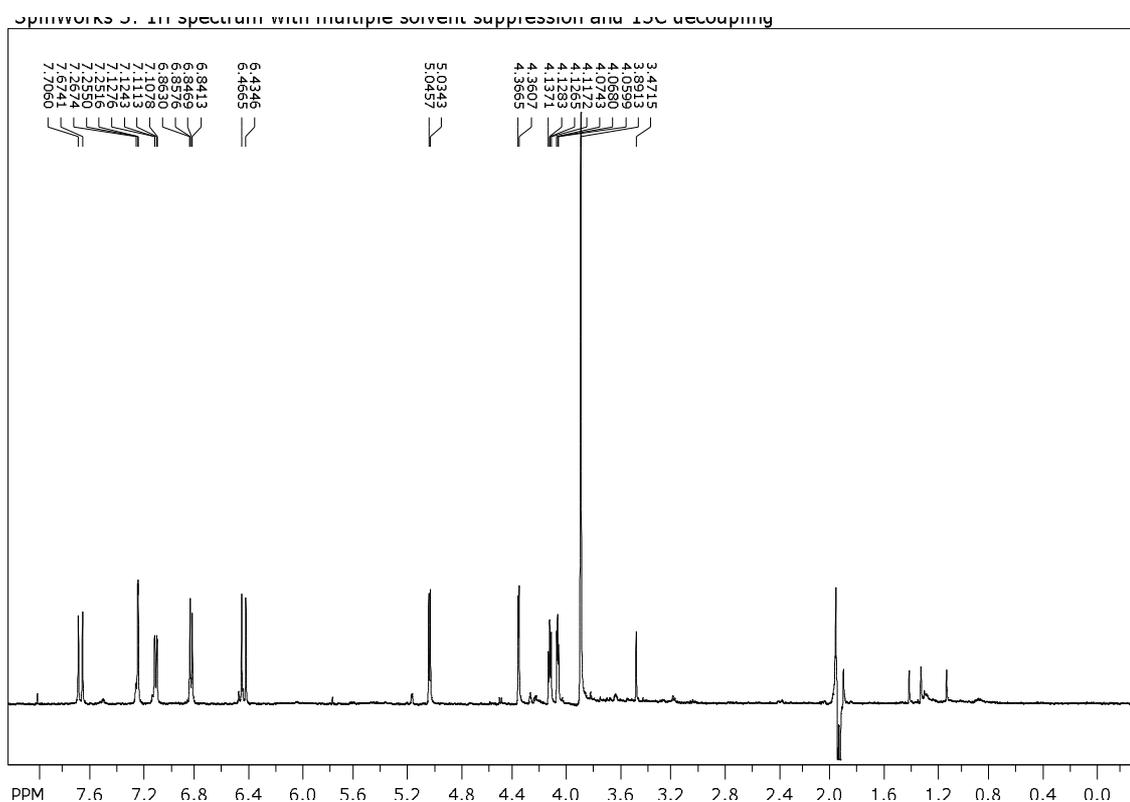


Figura 5.143a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 3

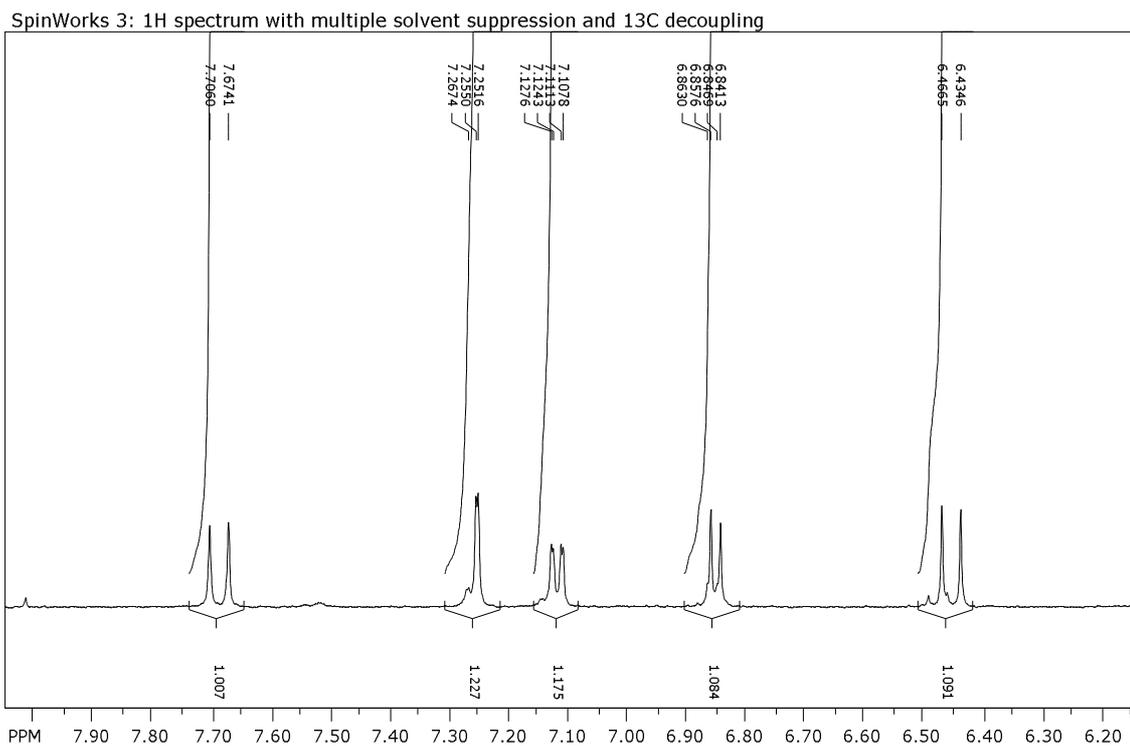


Figura 5.143b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 3.

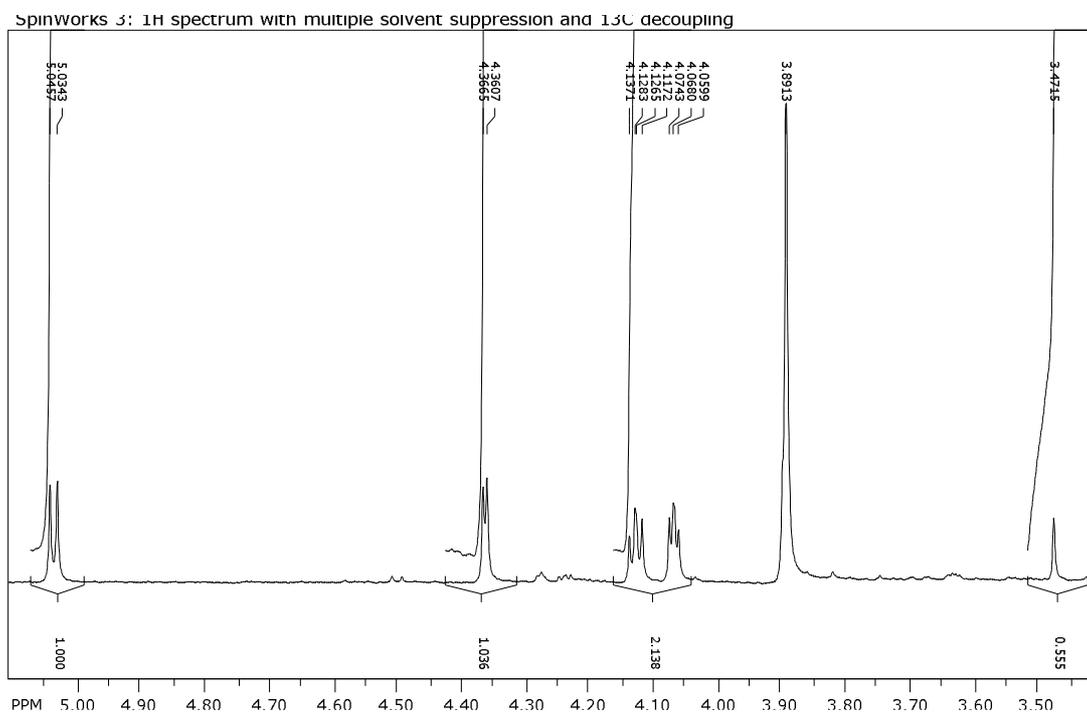


Figura 5.143c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 3.

A banda cromatográfica 4 também apresentou espectro de RMN muito próximo dos demais acima. Observou-se a presença dos hidrogênios H α e H β na região de δ 6,5 a 7,5, e os sinais do anel aromático também na região citada acima. O que se diferenciou foi a integração dos hidrogênios aromáticos, que agora passaram para dois hidrogênios cada, ou seja, os hidrogênios H-2, H-3, H-5 e H-6 do anel aromático apresentaram-se como, dubleto em δ 7,51 ($J= 8,0$ Hz, 2H, H-2/H-6) e dubleto em 6,84 ($J= 8,5$ Hz, 2H, H-3/H-5), sugerindo o anel aromático substituído nas posições 1 e 4. Além desses sinais observou-se também em δ 3,49 um multiplete e em δ 2,78 e 2,58 dois duplos dubletos com constantes de $J= 16,9$ e 5,5 Hz sugerindo que o anel aromático possui um substituinte em C-4 oxidado. Os deslocamentos destes dois últimos sinais sugerem serem eles vizinhos de uma carboxila (ou carbonila) e de um centro estereogênico. Outro deslocamento químico da molécula foi em δ 5,38 d ($J= 3,6$ Hz, 1H). No espectro dessa substância (Figuras 5.1472a, b e c) observou-se também apenas a presença de uma metoxila em δ 3,63, sugerindo a presença de um grupo funcional éster na molécula. Estes dados não permitem posicionar a metoxila, mas sugerem fortemente a estrutura 4-(2-hidroxi-2,5-lactona)-cinamato de metila.

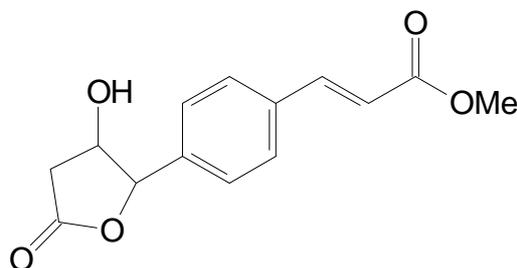
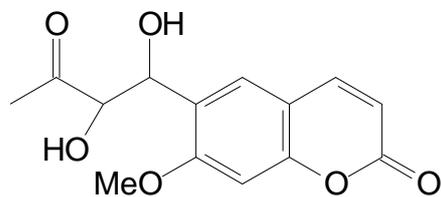


Figura 5.144. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 4.

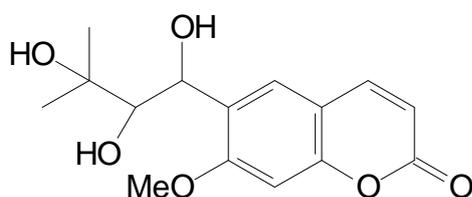
Consultando a literatura, chegou-se em uma cumarina isolada de *Citrus grandis* que possui uma unidade C-4 em sua estrutura, a butansina B, cuja fórmula estrutural é mostrada abaixo (WU *et al.*; 1994):



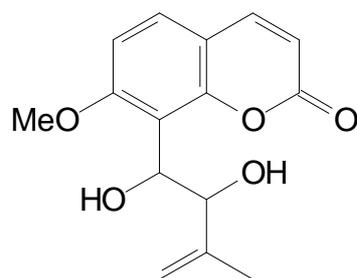
butansina B

Figura 5.145. Fórmula estrutural da cumarina butansina B.

Os autores acima relatam também a presença de mais duas cumarinas isoladas de *C. grandis* que possuem em sua estrutura unidades C-5 com dióis geminais como substituintes. São as cumarinas murrangatina e butansina C.



butansina C



murrangatina

Figura 5.146. Fórmulas estruturais das cumarinas butansina C e murrangatina.

Os hidrogênios carbinólicos dessas moléculas possuem os seguintes deslocamentos químicos H-1', δ 5,30 d ($J= 8,5$ Hz) e H-2', δ 4,57 ($J= 8,5$ Hz). Confirmando o padrão de substituição proposto para o composto referente à banda cromatográfica 4.

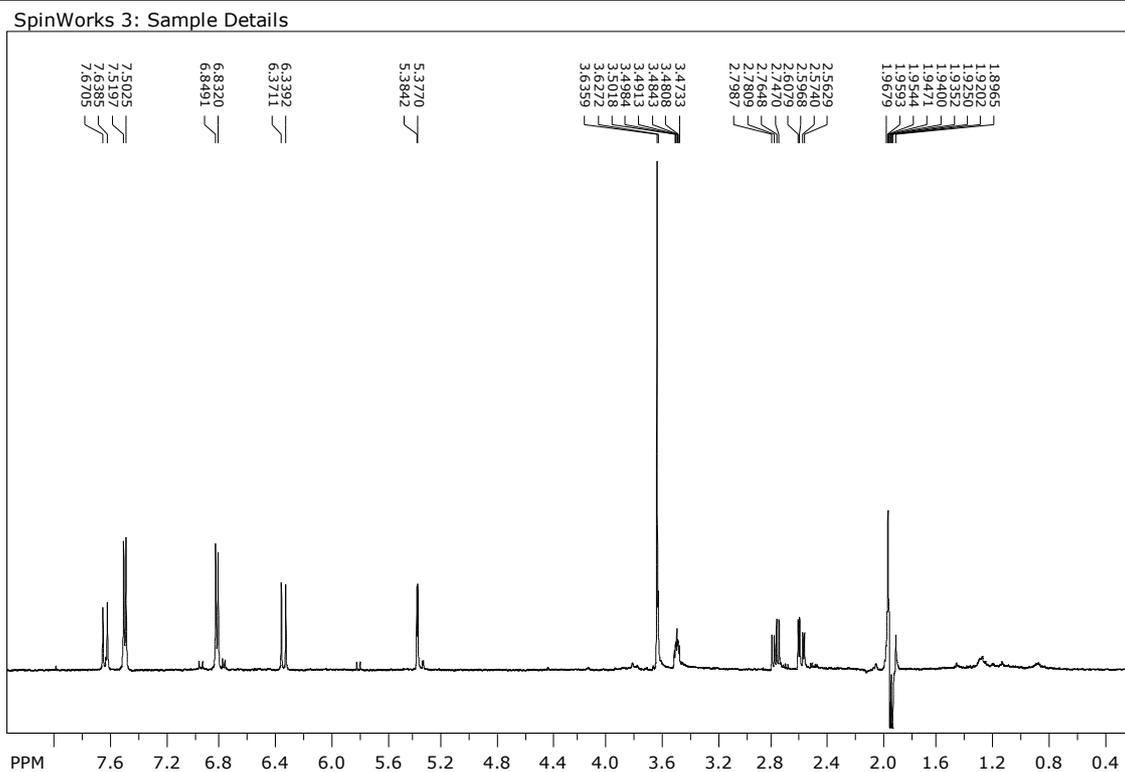


Figura 5.147a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 4.

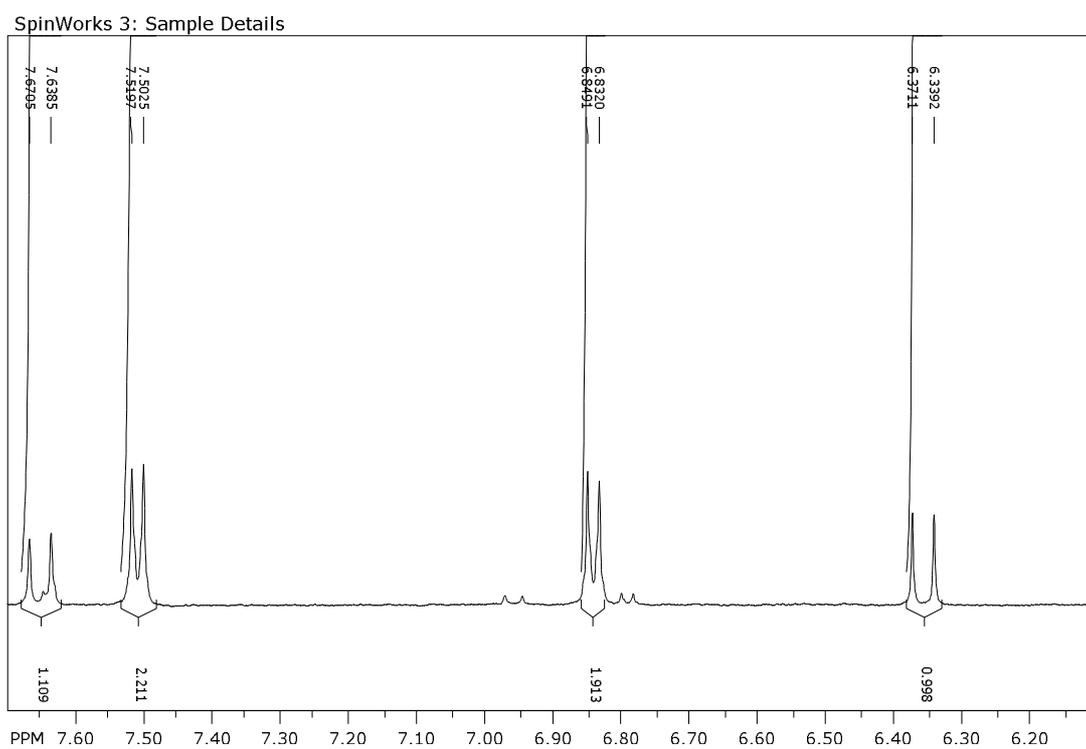


Figura 5.147b. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 4

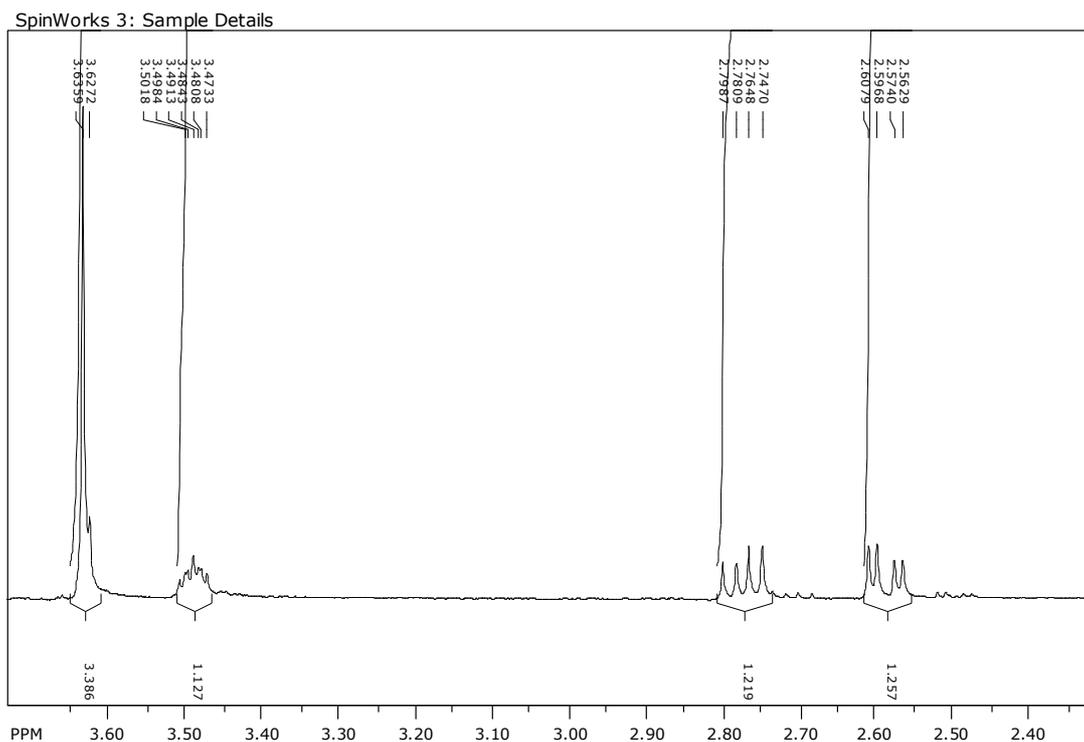


Figura 5.147c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 4

Analisando o espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica 5 (Figuras 5.149 a, b e c) observou-se além dos sinais característicos do ácido *p*-metoxicinâmico mais cinco sinais de hidrogênios, δ 3,64 s (3H), pertencente a um grupo substituinte -OMe, δ 2,57 dd ($J= 16,8$ e 5,6 Hz), 2,76 dd ($J= 16,8$ e 8,9 Hz), 3,47 m e 5,38 d ($J= 3,4$ Hz). Comparando-se esses dados com aqueles obtidos para o composto metil 4-(1,2-diidroxibutílico)-cinamato, e correlacionando com aqueles das cumarinas butansina B, C e murrangatina, pode-se propor a estrutura 3-(3-hidroxi-2,5-lactona)-4-metoxi-cinamato de metila para o composto referente à banda cromatográfica 5 (Figura 1.148).

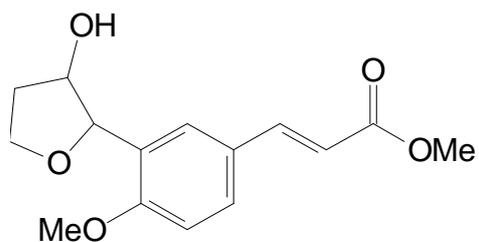


Figura 5.148. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 5.

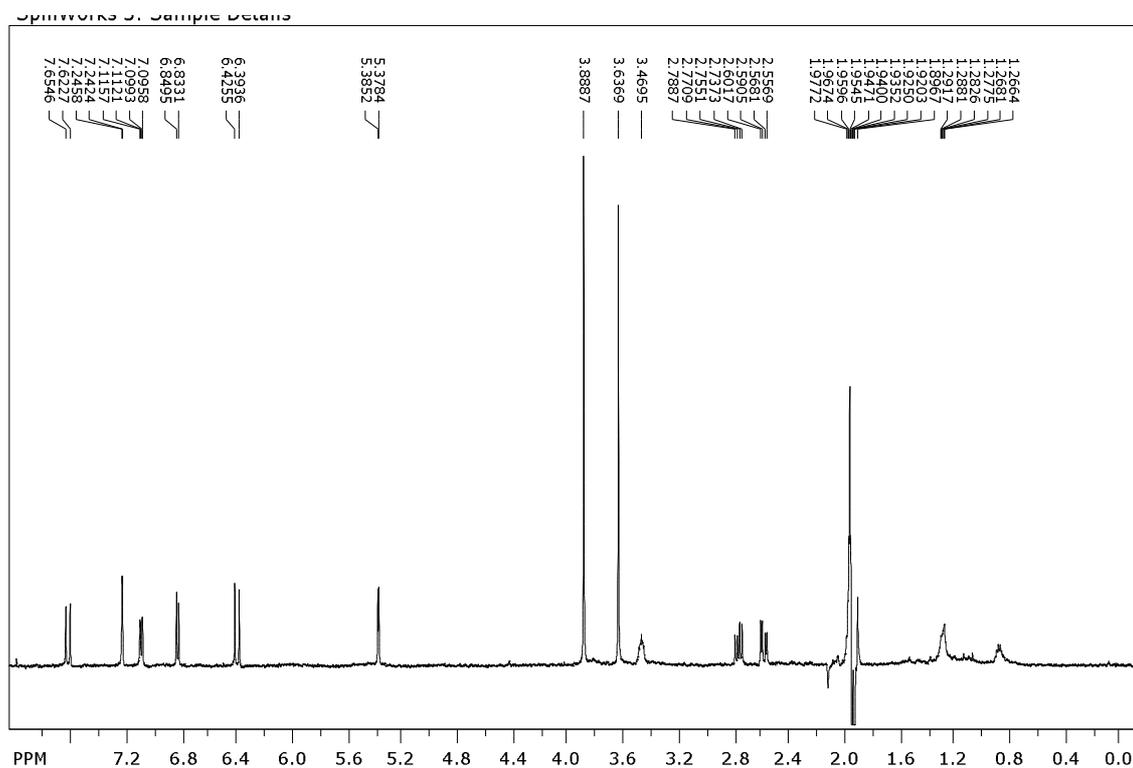


Figura 5.149a. Espectro de RMN de ¹H (CD₃CN, 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 5.

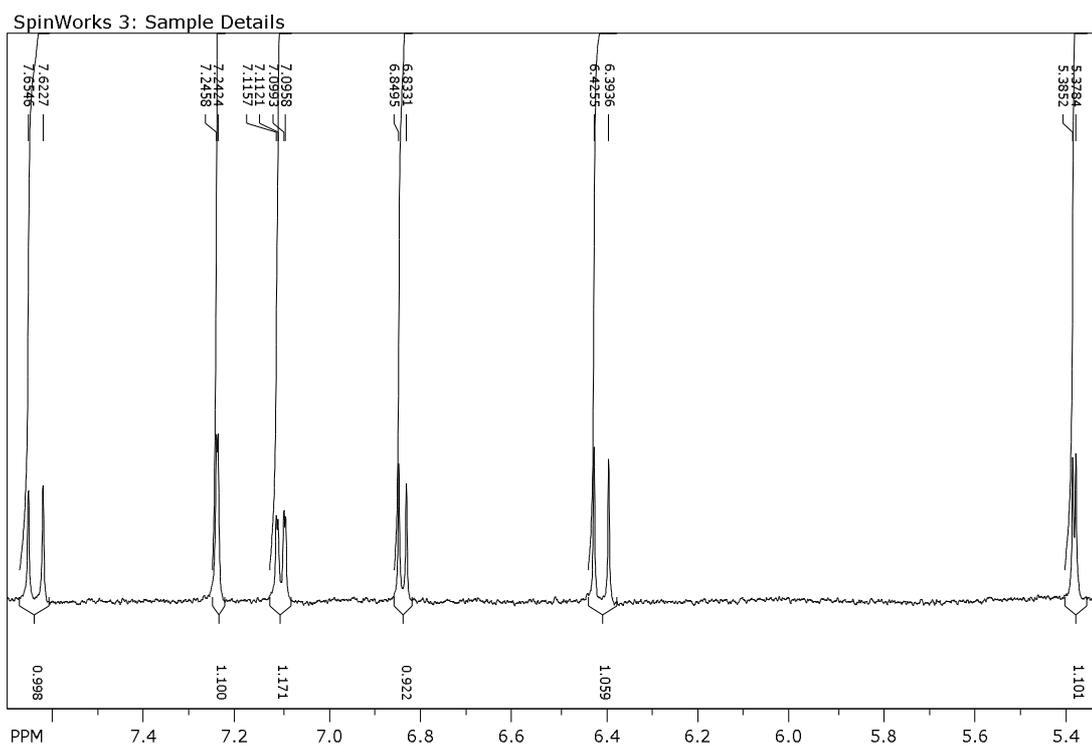


Figura 5.149b. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 5.

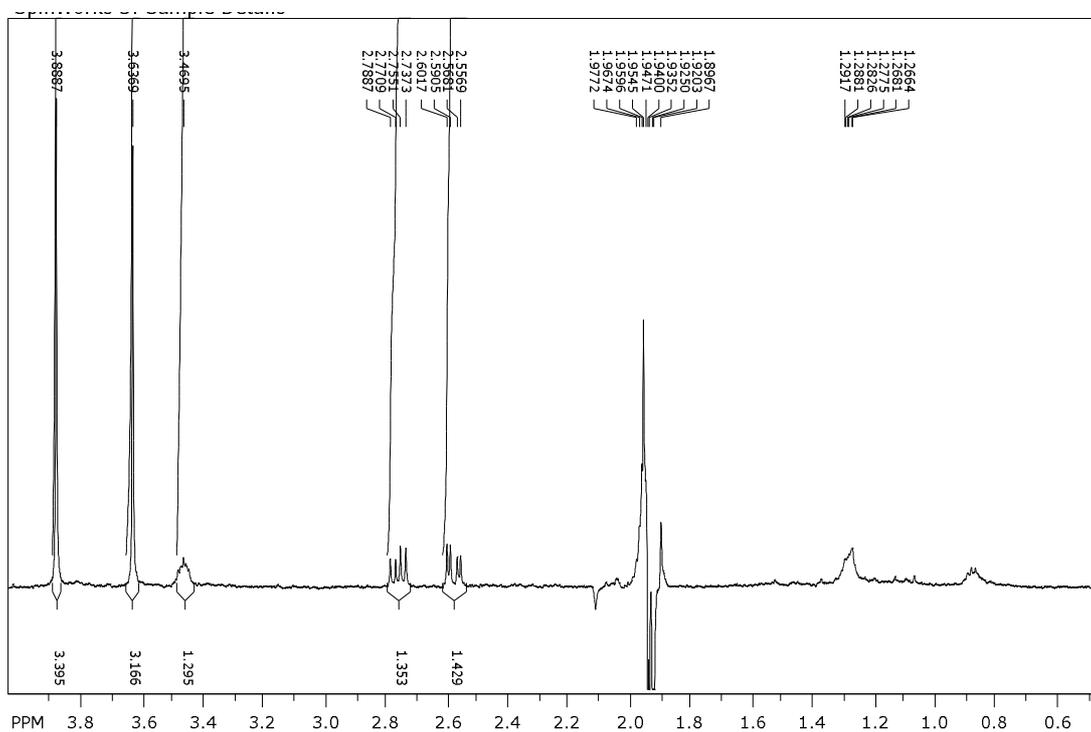


Figura 5.149c. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 5.

A banda cromatográfica 6 possui um tempo de retenção menor que aquelas discutidas anteriormente. Contudo ela foi denominada 6 devido ao fato de seu espectro de RMN de ^1H apresentar deslocamentos químicos similares àqueles do composto anterior, exceto o sinal para duas metoxilas. Assim, um único sinal de metoxila em δ 3.88 indica a presença do ácido 3-(1,2-diidroxibutílico)-4-metoxicinâmico (Figura 5.150). Os demais sinais no espectro sugerem um segundo derivado do ácido *p*-metoxicinâmico (δ 7,57 d, $J = 16,0$; 6,32 d, $J = 16,0$; 7,21 d, $J = 1,6$; 6,83 d, $J = 8,0$; 7,10 dd, $J = 8,0$ e $1,6$; 3,88 s) também substituído em C-3. Na ausência de sinais que justificasse um substituinte em C-3 foi proposto a presença de uma carboxila, sugerindo ser o ácido 3-carboxi-4-metoxicinâmico para o segundo constituinte da banda cromatográfica 6 (Figura 5.150). O grupo de PN da UFSCar isolou dos enxertos em estudo a cumarina buntasina (6-carboxi-7-metoxicumarina) (Ribeiro et al., 2008), o que reforça a proposta acima.

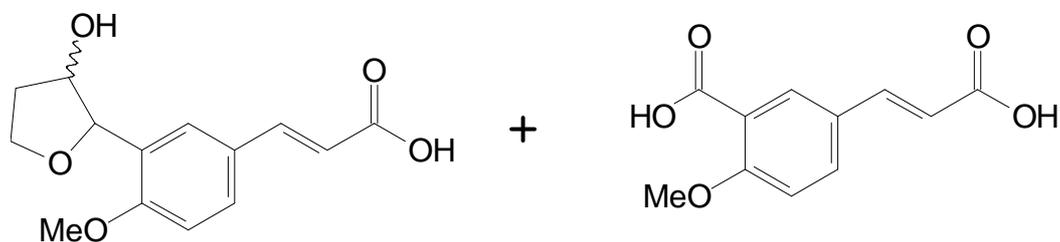


Figura 5.150. Prováveis estruturas das substâncias referentes à banda cromatográfica 6.

Até o presente momento, não há nenhum relato desses metabólitos discutidos acima na literatura, sendo, portanto compostos inéditos na literatura.

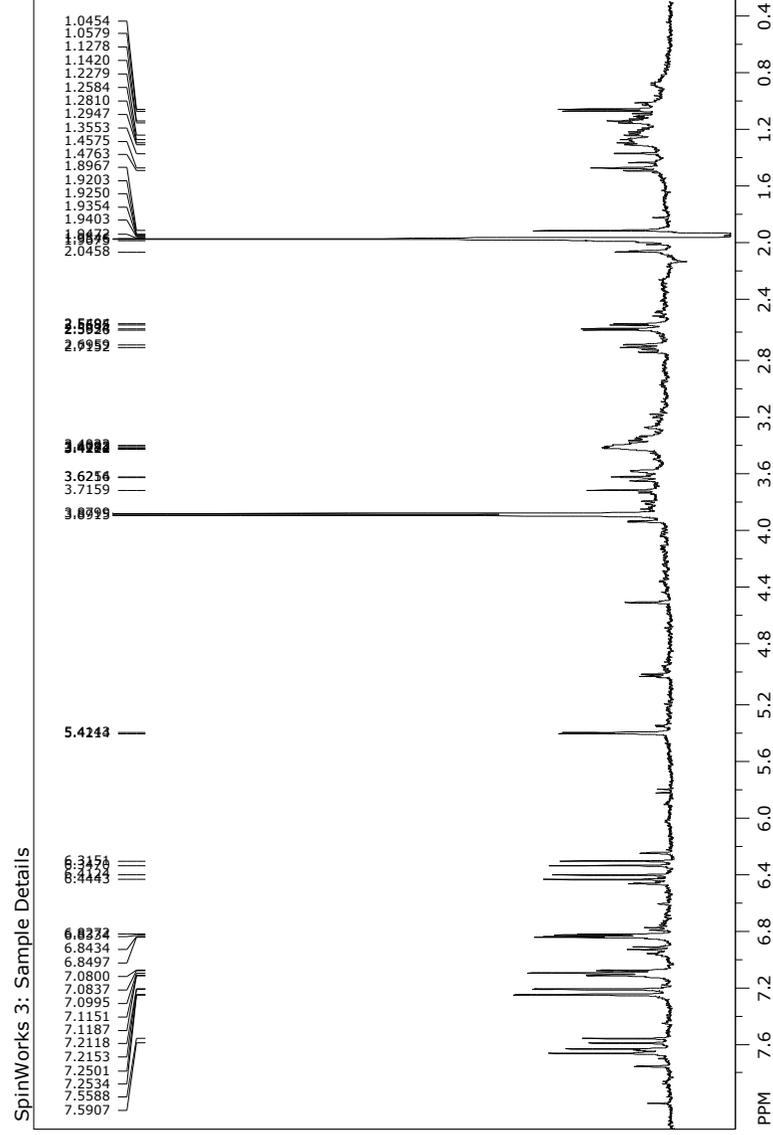


Figura 5.151a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) dos compostos referentes à banda cromatográfica 6.

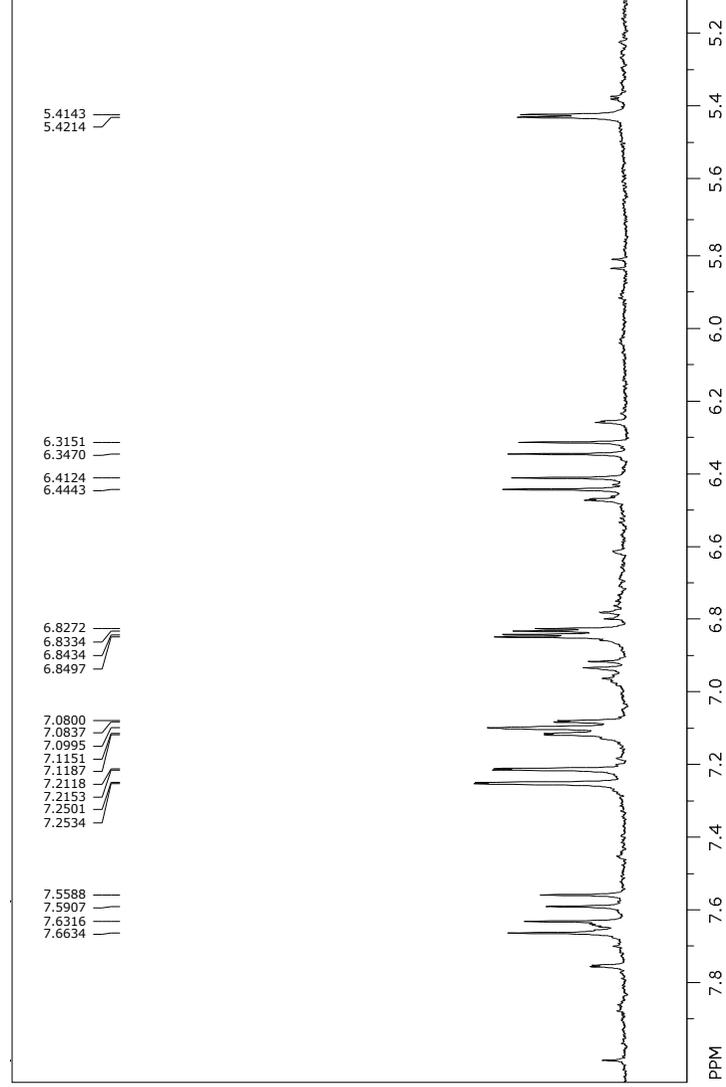


Figura 5.151b. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 6.

Tabela 5.34. Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) para os derivados do ácido cinâmico identificados via LC-NMR nos citros estudados (as constantes J estão em Hz).

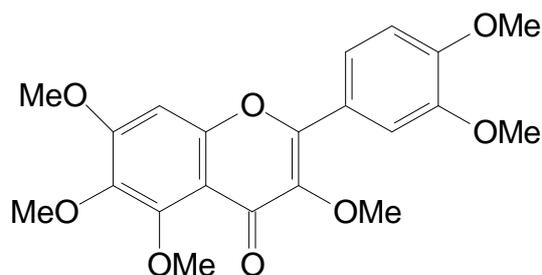
H	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6a	Banda 6b	Ac. 4- metoxicinâmico
Ha	6,34 d (16,0)	6,46 d (16,0)	6,44 d (16,0)	6,35 d (16,0)	6,40 d (16,0)	6,41 d (16,0)	6,32 d (16,0)	6,33 d (15,8)
Hb	7,60 d (16,0)	7,68 d (16,0)	7,66 d (16,0)	7,65 d (16,0)	7,63 d (16,0)	7,63 d (16,0)	7,57 d (16,0)	7,75 d (16,0)
2	7,23 d (1,7)	7,26 d (1,6)	7,25 d (1,6)	7,51 d (1,7)	7,25 d (1,7)	7,25 d (1,7)	7,21 d (1,6)	7,51 d (8,8)
3	-	-	-	-	-	-	-	6,92 d (8,8)
4-OMe	3,88 s	3,88 s	3,89 s	-	3,89 s	3,89 s	3,88 s	3,85 s
5	6,84d (8,0)	6,85d (8,0)	6,84d (8,0)	6,84 d (8,5)	6,84 d (8,2)	6,84 d (8,0)	6,83 d (8,0)	7,51 d (8,8)
6	7,10 dd (8,0; 1,7)	7,13 dd (8,0; 1,7)	7,11 dd (8,0; 1,7)	7,11 dd (8,2; 1,7)	7,10 dd (8,2; 1,7)	7,11 dd (8,2; 1,6)	7,10 dd (8,0; 1,6)	6,92 d (8,8)
1'	4,35 d (3,5)	5,22 d (3,9)	5,04 d (5,7)	5,38d (3,6)	5,38 d (3,4)	5,42 d (3,4)	-	
2'	5,37 dd (5,6; 3,5)	4,21 dd (3,9; 4,2)	4,13 dd (5,7; 4,4)	3,49	3,47 m	3,42 m	-	
3'	4,27 dd (5,6; 3,0)	4,07 d (4,2)	4,07 dd (4,4; 3,0)	2,58 dd (16,9; 8,9)	2,57 dd (16,8; 8,9)	2,57 dd (16,8; 8,9)	-	
				2,78dd (16,9; 8,9)	2,76dd (16,8; 8,9)	2,72dd (16,8; 8,9)		
4'	4,30 d (3,0)		4,36 d (3,0)	-	-	-	-	
COOMe	-	-	-	3,63 s	3,64 s	-	-	

5.8.1.2 Sinais cromatográficos 7, 8 e 11: cumarinas critopteno, bergapteno e flavonóide 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona respectivamente

Os compostos pertencentes às bandas cromatográficas 7, 8 e 11 ($R_t = 23,0, 25,0$ e $33,0$ min, respectivamente) já foram discutidos nos itens 5.7.2.1, 5.7.2.1.2 e 5.7.2.1.4 respectivamente.

5.8.1.3 Sinal cromatográfico 9: flavonóide 3',4',3,5,6,7-hexametoxiflavona

Analisando o espectro de RMN de ^1H (Figuras 5.153a, b e c) da banda cromatográfica 9 observou-se a presença de seis singletos na região de δ 3,80 a 4,05 ppm integrando para três hidrogênios, sinais esses característicos de metoxilas presentes na molécula. Observou-se também um singlete em δ 6,59, sendo característico do H-3 ou H-6 ou H-8 de flavonóide. Geralmente indicativo do H-3. Observaram-se também sinais na região de δ 7,0 a 7,7. Nessa região tem-se um dubleto em δ 7,10 com constante de acoplamento de $J = 8,5$ Hz atribuído ao H-5' do anel B. Outros dois hidrogênios correspondentes a esse anel são o H-6' δ 7,61 dd ($J = 8,5$ e $2,0$ Hz) e H-2' δ 7,50 d ($J = 2,0$ Hz). Ao comparar esses dados espectrais com a literatura observou-se que o composto poderia ser tanto a 3',4',3,5,6,7-hexametoxiflavona (Figura 5.152) quanto a nobiletina, identificada no item 5.7.2.1.5. O sinal em δ 7,59 é muito próximo do sinal de RMN de H-3 da nobiletina, mas todas as metoxilas estão com deslocamentos químicos mais próximos da 3',4',3,5,6,7-hexametoxiflavona. Contudo a nobiletina aparece no cromatograma das folhas do limão cravo em 31,5 min (figura 5.131) e a banda em análise corresponde ao tempo de retenção próximo de 27,0 min, sugerindo um segundo flavonóide. Assim, foi considerado o flavonóide 3',4',3,5,6,7-hexametoxiflavona para a banda cromatográfica 9. Este foi isolado das cascas da laranja pêra (LI *et al.*; 2006). Os dados espectrais, comparados com a literatura estão na tabela Tabela 5.34.



3',4',3,5,6,7-hexametoxiflavona

Figura 5.152. Provável estrutura da substância referente à banda cromatográfica 9.

Tabela 5.35. Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do flavonóide 3',4',3,5,6,7-hexametoxiflavona em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz). As constantes J estão em Hz.

H	3',4',3,5,6,7- hexametoxiflavona	3',4',3,5,6,7- hexametoxiflavona*	nobiletina*
2'	7,48 d (2,0)	7,70 d (2,0)	7,42 d (2,0)
5'	7,08 d (8,0)	6,99 d (9,0)	7,00 d (9,0)
6'	7,61 dd (8,0; 2,0)	7,71 dd (9,0; 2,0)	7,57 dd (9,0; 2,0)
H-3/H-8	6,59 s	6,75 s	6,63 s
OMe	3,82 s	3,87 s	3,95 s
OMe	3,87 s	3,92 s	3,95 s
OMe	3,88 s	3,97 s	3,97 s
OMe	3,90 s	3,98 s	3,98 s
OMe	3,99 s	3,98 s	40,3 s
OMe	4,05 s	3,99 s	4,11 s

*(LI *et al.*; 2006).

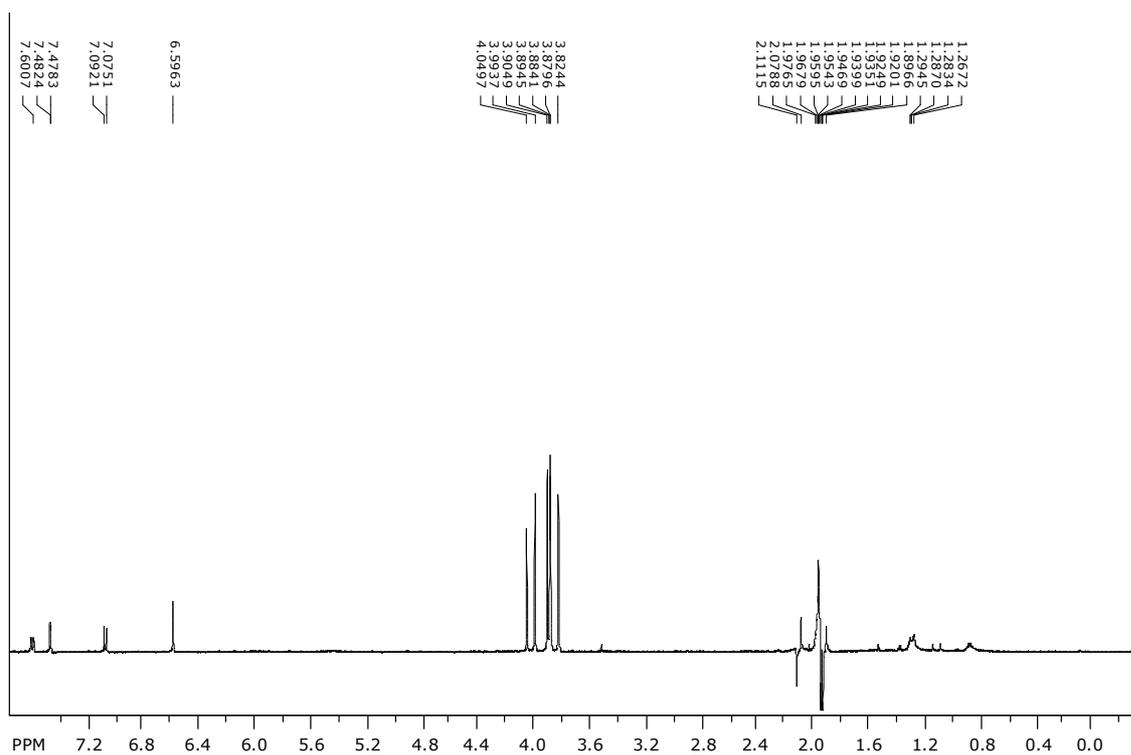


Figura 5.153a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 9

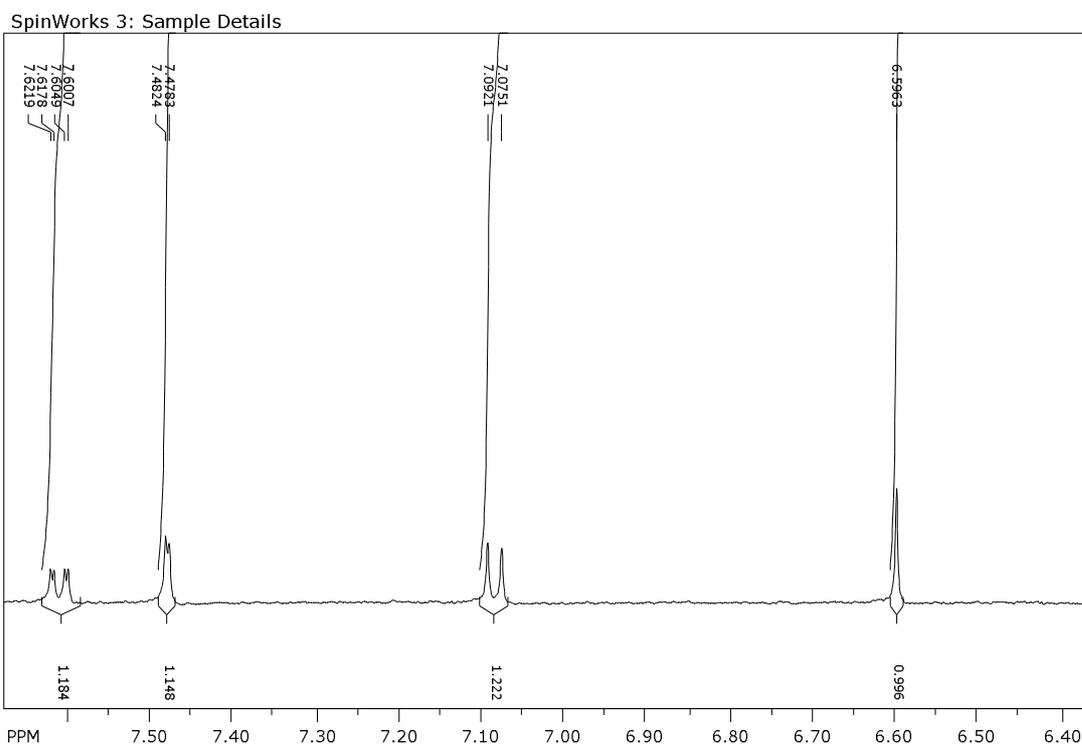


Figura 5.153b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 9

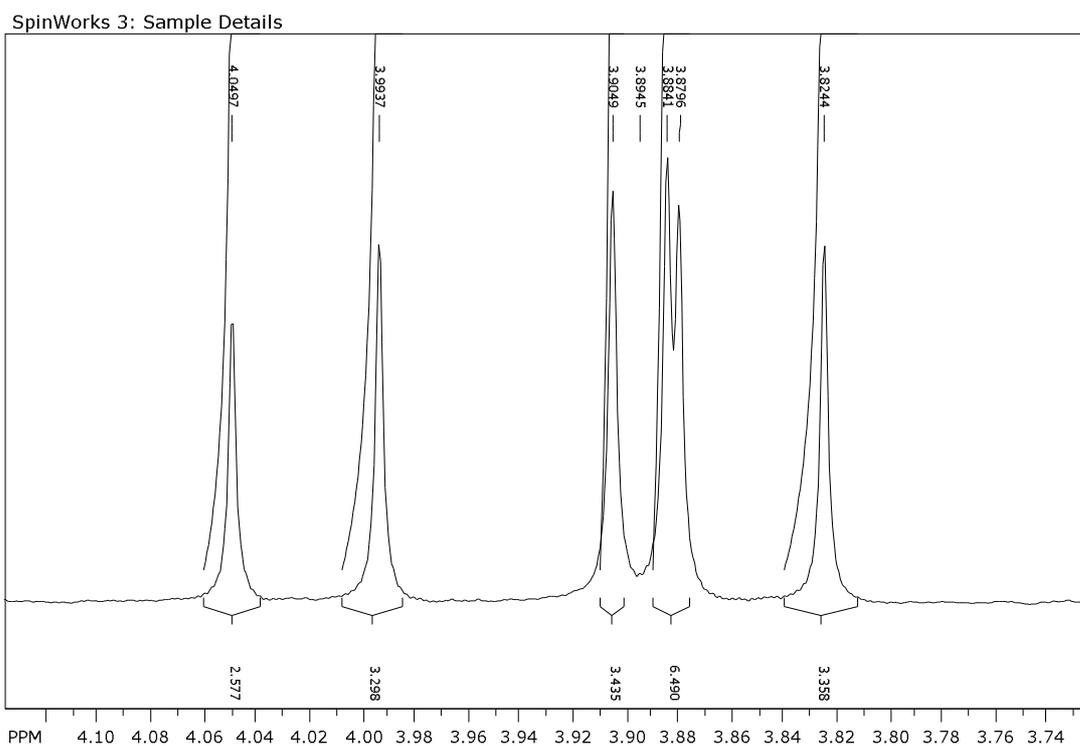


Figura 5.153 c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do composto referente à banda cromatográfica 9

5.8.1.4 Sinal cromatográfico 10: flavonóide 3',5,6,7,8-pentametoxiflavona ou tangeretina

O composto pertencente à banda cromatográfica já foi discutido no item 5.7.2.1.3 .

5.8.2 Análise da variação do perfil químico nos caules dos citros estudados utilizando a técnica LC-NMR

Foram analisadas através da técnica de LC-NMR algumas bandas cromatográficas do extrato dos caules superiores do enxerto com sintomas de CVC. O cromatograma obtido através da injeção destes extratos com as especificações das bandas cromatográficas identificadas pode ser visualizado na figura abaixo.

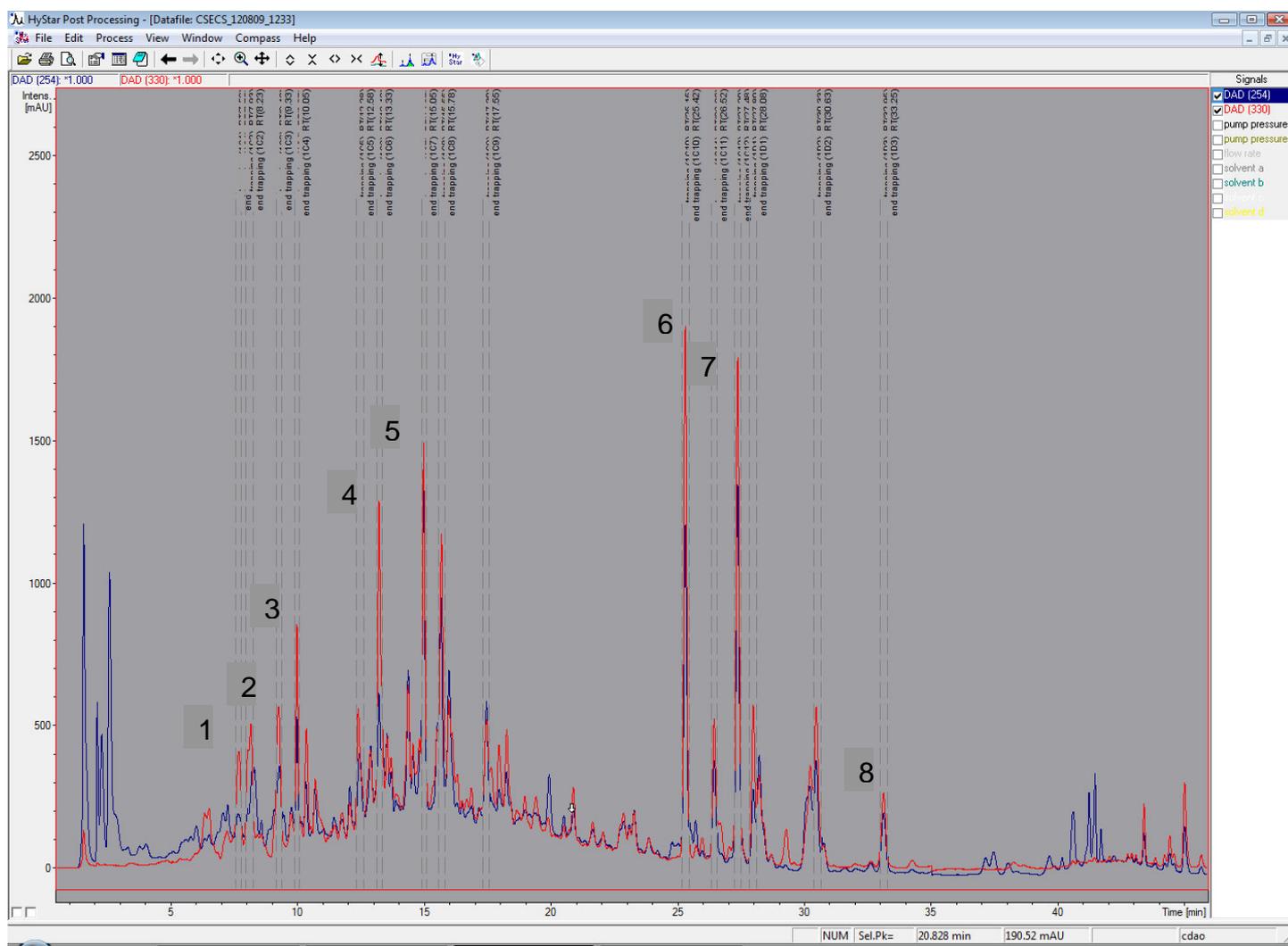


Figura 5.154. Cromatograma de LC-NMR dos caules superiores do enxerto com sintomas de CVC, especificando as bandas cromatográficas “trapeadas” em cartucho de SPE.

A maioria dessas bandas já foi discutida no item anterior (5.7.2), contudo, foram identificados alguns metabólitos diferentes daqueles citados anteriormente através de técnica de LC-MS. Conseguiu-se nesta análise sugerir estruturas para 09 metabólitos.

5.8.2.1 Sinais cromatográficos 1, 2, 3, 4, 7 e 8: compostos derivados do ácido *p*-metoxicinâmico e flavonóides

Aos sinais cromatográficos 1, 2, 3, 4, 7 e 8 foram sugeridos os seguintes metabólitos secundários, os quais foram identificados anteriormente nas folhas dos citros estudados

- Sinal cromatográfico 1: ácido 3-(1,3,4-triidroxi-2,5-lactona)-4-metoxi cinâmico;
- Sinal cromatográfico 2: ácido 3-(3,4-diidroxi-2,5-lactona)-4-metoxi cinâmico;
- Sinal cromatográfico 3: ácido 3-(2,3,4-triidroxi-1,5-lactona)-4-metoxi cinâmico;
- Sinal cromatográfico 4: ácido 3-carboxi-4-metoxicinâmico;
- Sinal cromatográfico 7: tangeretina
- Sinal cromatográfico 8: 5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona.

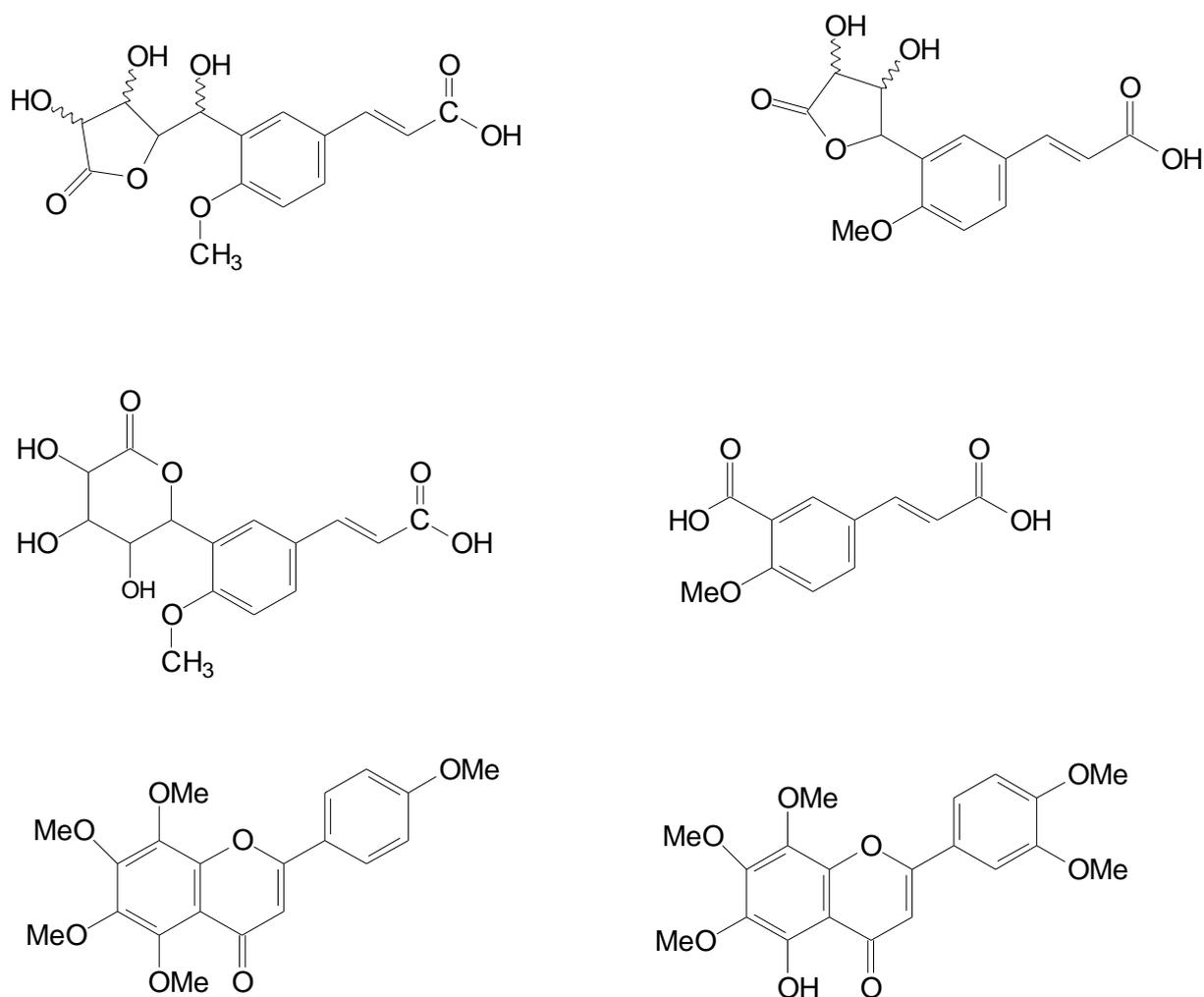


Figura 5.155. Prováveis estruturas das substâncias referentes às bandas cromatográficas 1, 2, 3, 4, 7 e 8, da análise via LC-NMR dos caules superiores do enxerto com sintomas de CVC.

5.8.2.2 Sinal cromatográfico 5: flavonóide glicosilado derivado da hesperetina

Analisando o espectro de RMN de ^1H da banda cromatográfica 5, observou-se inicialmente um dubleto de metila integrando para três hidrogênios em δ 1,14, o que sugeriu na molécula a presença de uma unidade de açúcar. A constante de acoplamento desse sinal foi de $J = 12$ Hz e de acordo com HARBONE, 1994, trata-se de uma unidade β -raminosídeca. Outro sinal

observado no espectro de RMN de ^1H foi em δ 4,95 d (8,0 Hz) confirmando assim a presença de do resíduo β -raminosídeo na molécula. O espectro de RMN apresentou também dois deslocamentos químicos na região alifática: δ 3,14, o qual foi observado como um multipletto devido à presença de interferentes, e δ 2,79 dd (17,2 e 3,0 Hz), os quais acoplaram com o sinal em δ 5,43 dd (12,8 e 3,0 Hz) sendo referentes aos hidrogênios H-3pseudoax, H-3pseudoeq e H-2, respectivamente, do anel C de uma flavanona. Pode-se inferir também que o anel A dessa flavanona estivesse di-oxigenados nas posições 5-7 devido à presença de dois singletos largos em δ 6,95 e 6,98, atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 deste anel. Os demais hidrogênios da unidade glicosídica estão compreendidos na região entre δ 3,00 a 4,00.

Outra constatação bastante interessante foi ao analisar a região dos deslocamentos químicos pertencentes ao anel B, onde se observou apenas um singletto com intensidade um pouco maior que outros singletos nesta região, δ 6,15, sugerindo assim que este anel estava substituído nas posições 3',4' e 5'. O deslocamento em δ 6,15 foi atribuído ao H-6' ao H-2'. Foi sugerida também a presença de uma metoxila, devido ao singletto em δ 3.86. Considerando a ausência de sinal característico de hidroxila em C-5, estes dados sugerem a presença do flavonóide 7- β ,D-raminosil-3',4',5'-triidroxi-5-metoxiflavanona.

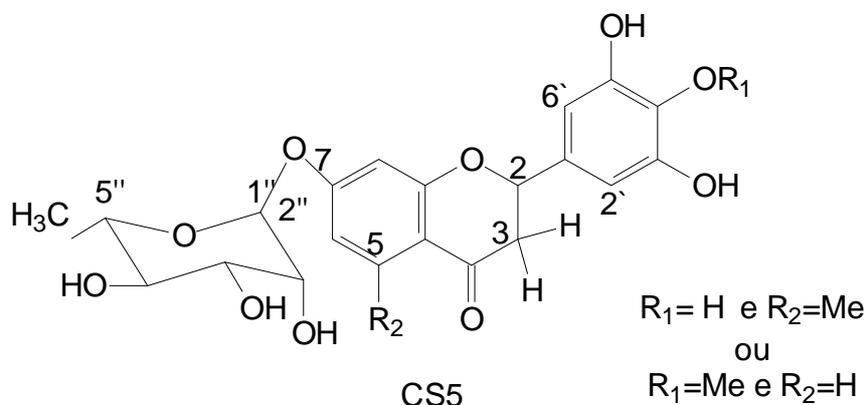


Figura 5.156. Provável estrutural para a banda cromatográfica 5

Fazendo uma busca na literatura não se encontrou relatos do composto proposto acima, sendo uma possível flavanona glicosilada inédita.

SHIMODA *et al.*; 2008 administraram a hesperetina em células de cultura de *Ipoema batatas* e *Eucalyptus perriniana* e obtiveram produtos glicosilados da mesma, dentre eles a Hesperetina 7-O-[6-O-(β -D-glicopiranosil)]- β -D-glucopiranosídica.

E como o metabólito sugerido acima foi isolado dos caules com sintomas de CVC, sugere-se neste ponto que possa ter havido uma biotransformação da hesperetina, a qual é comum em *citrus* no produto glicosilado proposto. Essa biotransformação pode ter ocorrido tanto pela bactéria, pois é sabido que a hesperetina possui várias propriedades biológicas como anticâncer, antimutagênica, anticarcinogênica dentre outras ou mesmo pela planta que ao tentar se defender do ataque bacteriano modificou estruturalmente a hesperetina “tentando” aumentar seu poder frente à *X. fastidiosa* (Borradaile *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2001; SHIMODA *et al.*; 2008).

Os dados espectrais do composto 5, comparados com a literatura estão discriminados na tabela 5.36. E os espectros de RMN de ^1H desse composto encontram-se nas Figuras 5.157a, b e c.

Tabela 5.36. Deslocamentos químicos (δ ppm) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do flavonóide 7-*o*- β ,D-raminosil-3',4',5'-triidroxi-5-metoxiflavanona em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz) do flavonóide hesperetina glicosilada.

H	7- <i>o</i> - β ,D-raminosil-3',4',5'-triidroxi-5-metoxiflavanona.	hesperetina glicosilada*
2	5,41 dd (12,7; 3,0)	5,52 dd (12,8; 2,8)
3- eq	3,20 m	3,32 dd (17,8; 12,8)
3-ax	2,78 dd (17,2; 3,0)	2,78 dd (17,8; 2,8)
2'	6,15 s	7,25 d (2,0)
5'	-	7,09 d (8,4)
6'	6,15 s	7,03 dd (8,4; 2,0)
6	6,95 s	6,14 d (2,8)
8	6,98 s	6,18 d (2,8)
1''	4,64 s	5,05 d (8,0)
2''		
3''		
4''	3,20 a 3,95 m	3,20 a 3,95 m
5''		
6''		

* (SHIMODA *et al.*; 2008).

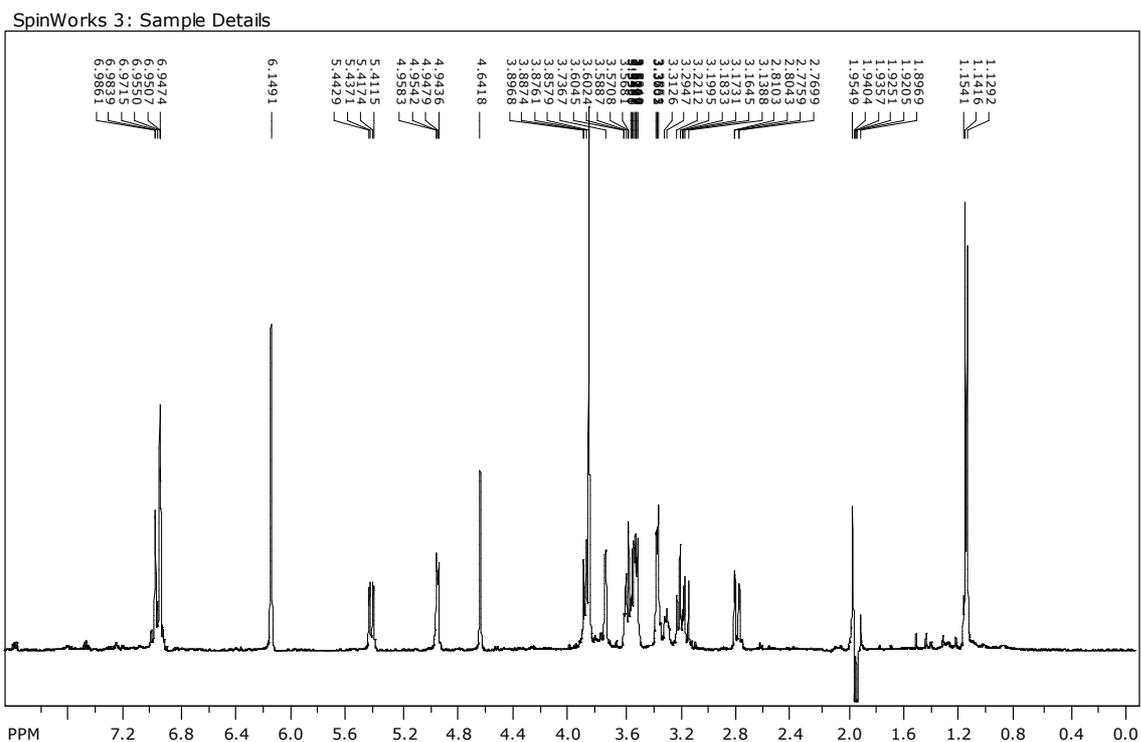


Figura 5.157a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica flavonóide glicosilado derivado da hesperetina.

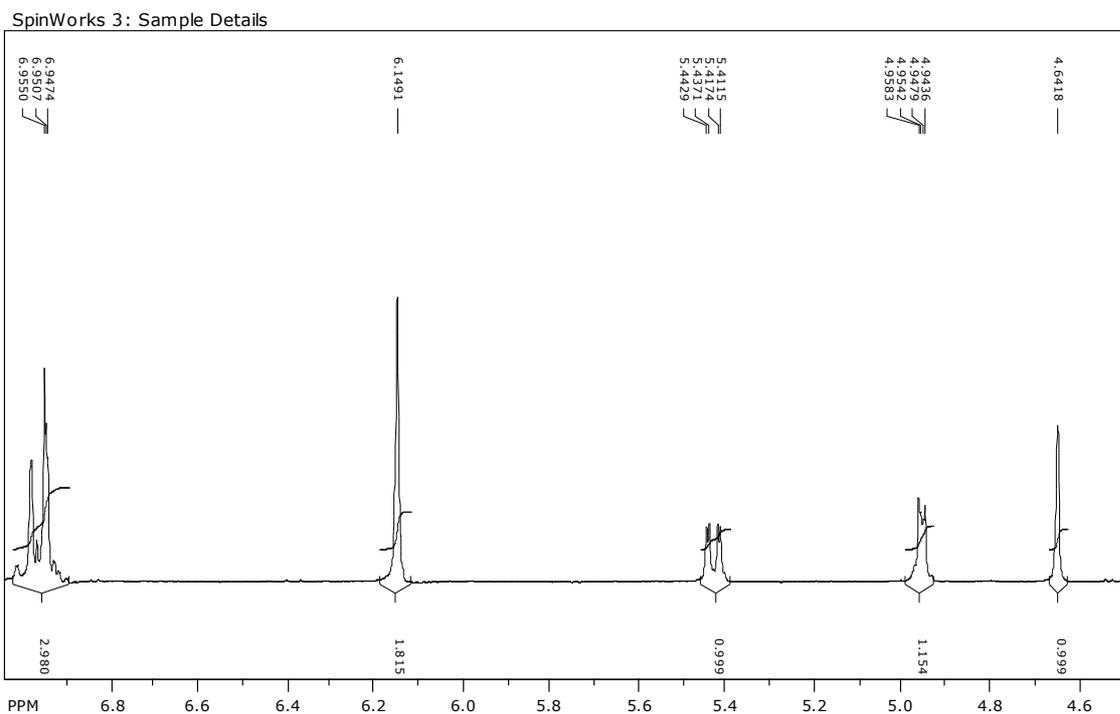


Figura 5.157b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica flavonóide glicosilado derivado da hesperetina.

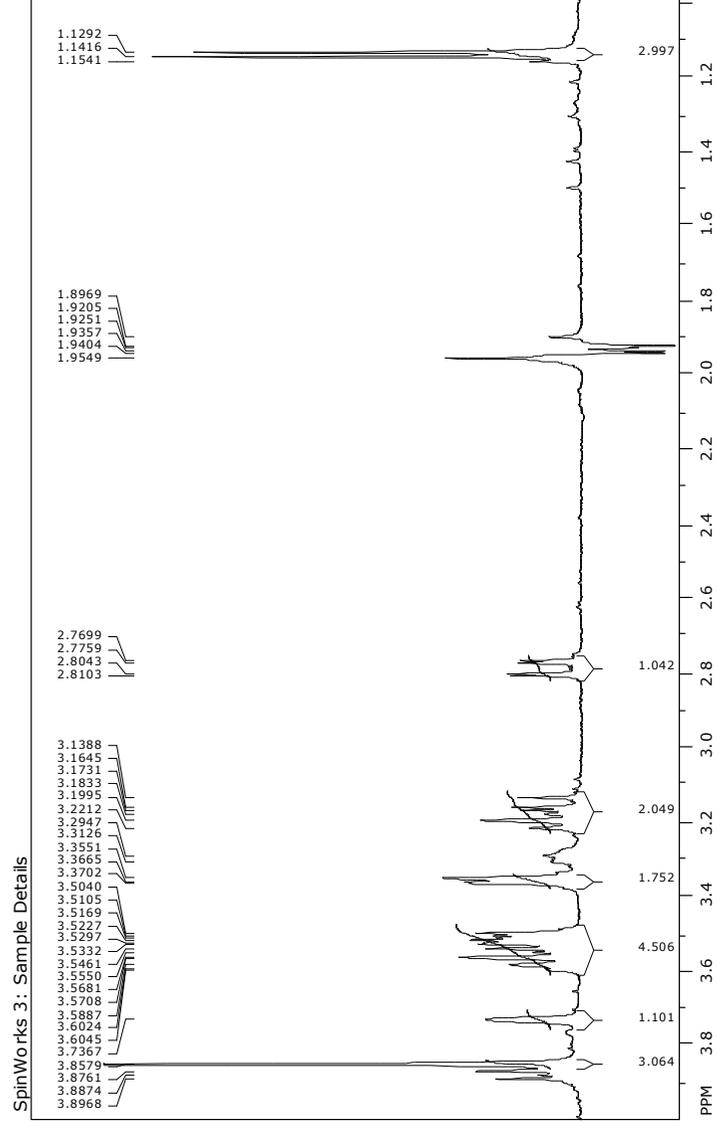
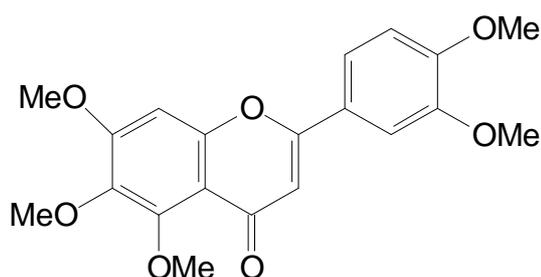


Figura 5.157c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica flavonóide glicosilado derivado da hesperetina.

5.8.2.3 Sinal cromatográfico 6: flavonóide 3',4',5,6,7-pentametoxiflavona ou sinensetina

Analisando o espectro de RMN de ^1H (figuras 5.126a, b e c) da banda cromatográfica CR6 observou-se a presença de cinco singletos na região de δ 3,80 a 4,05 ppm integrando para três hidrogênios, sinais esses característicos de metoxilas $-\text{OMe}$ presentes na molécula. Observou-se um singlete em δ p 6,56 ppm, sendo característico do H-3 de flavonóide. Observou-se também sinais e na região de δ 7,0 a 7,7 ppm. Nessa região tem-se um duplo dubleto em δ 7,58 ppm com constantes de acoplamento de $J= 9,0$ e $2,0$ Hz e integrando para um hidrogênio. Outro sinal foi um dubleto observado na região de δ 7,46 ppm que também integrou-se para um hidrogênio. Diante desses dados supôs-se que tratava-se de um flavonóide pentametoxilado e que o mesmo possuía no anel B duas metoxilas, devido ao padrão de substituição exibido no espectro de RMN de ^1H , sendo, portanto, o flavonóide sinensetina (figura 5.159). Os dados espectrais, comparados com a literatura estão discriminados na tabela Tabela 5.37 e os espectros de RMN de ^1H desse composto encontram-se nas Figuras 5.160a, b e c.



3',4',5,6,7,pentametoxiflavona
ou sinensetina

Figura 5.159. Fórmula estrutural pertencente à banda cromatográfica 6 .

Tabela 5.37. Deslocamentos químicos (δ ppm) de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) do flavonóide sinensetina em comparação com os dados da literatura (CDCl_3 , 400 MHz).

H	sinensetina	sinensetina*
2'	7,46 d (2,0)	7,33 d (2,0)
5'	7,06 d (8,5)	6,97 d (9,0)
6'	7,58 dd (8,5; 2,0)	7,52 dd (9,0; 2,0)
H-3	6,56 s	6,54 s
H-8	7,05 s	6,80 s
OMe	3,84 s	3,93 s
OMe	3,85 s	3,97 s
OMe	3,87 s	3,98 s
OMe	3,91 s	3,99 s
OMe	3,95 s	3,99 s

* (LI *et al.*; 2006).

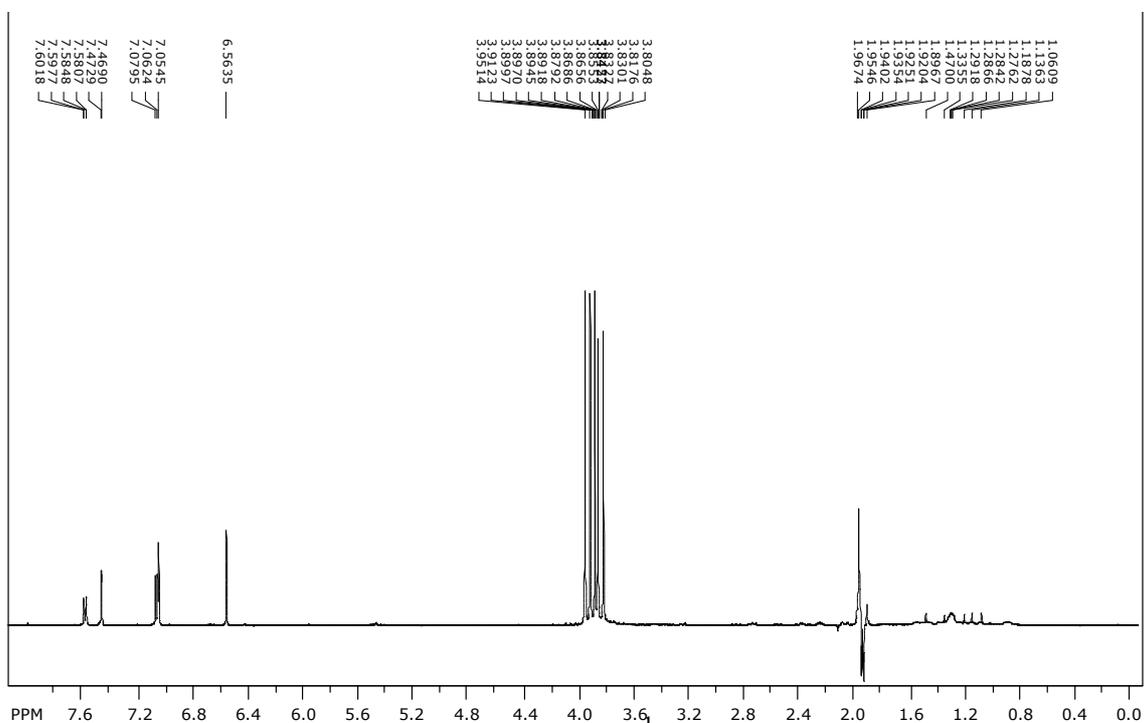


Figura 5.160a. Espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 6, flavonóide sinensetina.

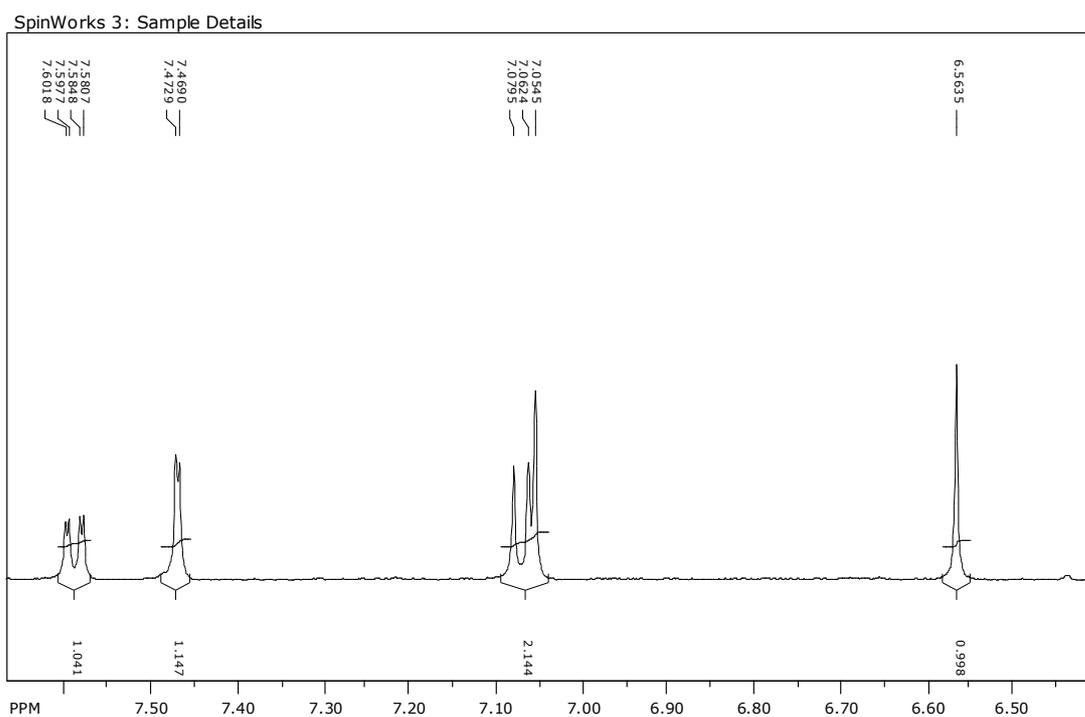


Figura 5.160b. Ampliação 1 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 6, flavonóide sinensetina.

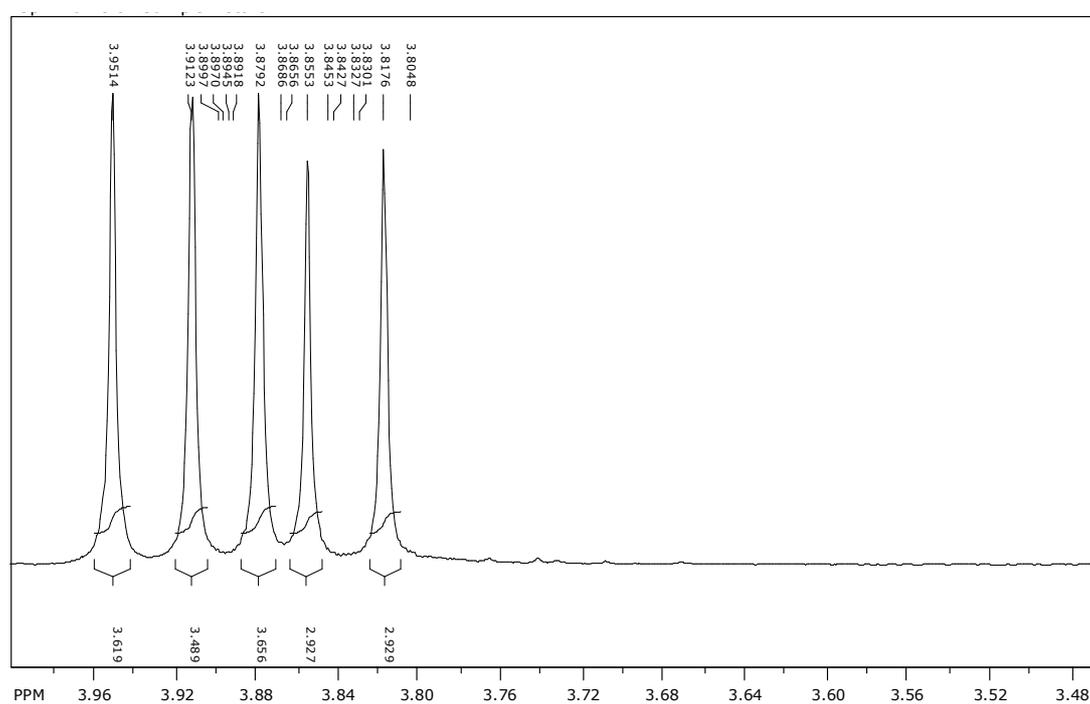


Figura 5.160c. Ampliação 2 do espectro de RMN de ^1H (CD_3CN , 500 MHz) da banda cromatográfica 6, flavonóide sinensetina.

6. Conclusões

Ao aplicar o método de inoculação mecânica da bactéria *X. fastidiosa* conseguiu-se, com 100% de inoculação, obter todo o material vegetal necessário para a realização do presente estudo da variação do perfil químico de *C. sinensis*, *C. limonia* e enxerto destes dois. Ao analisar o perfil químico dos enxertos e pés-francos, através de validações de métodos cromatográficos via HPLC-DAD-UV e HPLC-MS/MS, observou-se que a planta responde produzindo alguns metabólitos em maior ou menor quantidade em resposta à enxertia e à presença da bactéria. Avaliando as respostas das plantas enxertadas em comparação àquelas que lhe deram origem, os respectivos pés-francos, verifica-se que nas raízes entre as 12 cumarinas detectadas há diminuição na concentração de 10 delas e um pequeno aumento em apenas duas (Tabela 6.1).

Nas folhas do enxerto somente as cumarinas seselina e xantiletina foram detectadas em concentrações possíveis de serem bem avaliadas, e estas aumentam no processo de enxertia. Os principais metabólitos detectados nas folhas do enxerto foram flavonóides polimetoxilados. Entre os 8 detectados, exceto um (Rutina), todos tiveram suas concentrações aumentadas no enxerto em comparação às plantas de origem. Estes dados sugerem que no processo de enxertia a planta responde inibindo o caminho biossintético do ácido cinâmico que leva às cumarinas em favor de uma maior ativação daquele que leva aos flavonóides. Nas raízes também foram detectados dois limonóides, mas somente um em concentrações possíveis de serem bem avaliadas. Estas diminuem no processo de enxertia. Apenas um limonóide avaliado não seria relevante para uma comparação com os dados acima, ou seja, também sugerir estar havendo inibição do caminho biossintético dos terpenos em favor daquele que leva aos flavonóides.

Avaliando as respostas das plantas enxertadas com a bactéria em seu interior, mas sem sintomas de CVC, verifica-se que nas raízes entre as 12 cumarinas detectadas há aumento na concentração de 10 delas e pequena

diminuição em apenas duas. A seselina é uma das cumarinas que mostrou concentração menor, sugerindo uma reação da planta inibindo a biossíntese de derivados angulares em favor das demais que são preniladas em C-6 (lineares). A segunda cumarina, clausarina, possui unidades prenilas em C-6, C-8 e C-3 sendo que a posição das duas últimas explicaria a diminuição na concentração, ou seja, se formariam pelo caminho das angulares. Contudo, a variação de sua concentração é praticamente desprezível (- 1,09). Entre os 8 flavonóides detectados nas folhas, 6 tiveram suas concentrações diminuídas no enxerto sem sintomas de CVC. Os dois flavonóides que mostraram concentrações aumentadas foram os flavonóides glicosilados, rutina e hesperidina. Estes dados permitem concluir que nas plantas tolerantes (sem sintomas) a reação maior parece estar nas raízes com 10 cumarinas agindo como fitoantecipinas e ou fitoalexinas.

Avaliando as respostas das plantas enxertadas com sintomas de CVC em comparação àquelas em que a bactéria não foi inoculada, verifica-se que nas raízes entre as 12 cumarinas detectadas há aumento na concentração de 8 delas e pequena diminuição em apenas quatro. A seselina é novamente uma das cumarinas que mostrou concentração menor, sugerindo a mesma explicação dada acima. Em duas outras a xantiletina e suberosina a variação na concentração é desprezível (- 1,05, -1,08). A quarta cumarina é a clausarina classificada acima entre as angulares. Entre os 8 flavonóides detectados nas folhas, 6 tiveram suas concentrações aumentadas no enxerto com sintomas de CVC e em duas elas diminuíram. Estes dados sugerem que nas plantas com sintomas de CVC a reação das plantas parece ocorrer em ambos os órgãos, folhas e raízes, com flavonóides e cumarinas atuando como fitoantecipinas e ou fitoalexinas.

As ferramentas quimiométricas de PCA e HCA aplicados aos dados obtidos nos estudos de HPLC-DAD e HR-MAS permitiram discriminar as plantas contaminadas com a bactéria das espécies sadias, assim como os

respectivos indivíduos. Por exemplo, as folhas se separam em três grupos bem distintos, folhas de laranja pêra, limão cravo e folhas do enxerto de laranja pêra sobre limão cravo. Há uma tendência de separação, observado via PC2, das folhas do enxerto com a bactéria presente (com e sem sintomas de CVC) diante das folhas controle (sem a bactéria presente). O padrão comportamento quimiométrico das plantas infectadas é similar ao padrão das folhas do limão cravo. Ao contrário, o comportamento das plantas saudias é similar àquele da laranja pêra. Já analisando todas as partes vegetais juntas pode-se concluir que há uma separação quimiométrica entre as partes vegetais, mas não há uma separação entre plantas infectadas e plantas saudias, sendo, portanto, necessário sempre o estudo das partes vegetais separadamente para que se possa aplicar essa técnica na diferenciação de plantas com sintomas de CVC.

Ao analisar a variação do perfil químico dos citros estudados através do HPLC-NMR foi possível detectar a presença de uma nova classe de metabólitos secundários derivados do ácido *p*-metoxicinâmico contendo anéis diidropirano e diidrofurano bastante oxidados. Do mesmo modo, ao analisar os compostos de média polaridade, através da técnica de LC-MS/MS foi possível identificar nas raízes várias cumarinas não citadas na literatura para nenhuma das duas espécies que constituem o enxerto, como diidrosuberenol, 2',3'-diidrosuberosina, citrubutina, o limonóide limonina diosfenol, o flavonóide 3-hidroxi-3',4',5,7,8-pentametoxiflavona.

Finalmente, observou-se que a cumarina bergapteno está presente em quantidade razoável apenas nas folhas do limão cravo, o qual é tolerante à *X. fastidiosa*, e quando o enxerto apresenta os sintomas da CVC há uma pequena produção desta em suas folhas, indicando ser esta uma fitoantecipinas.

Por fim, concluiu-se que os objetivos do projeto foram alcançados, os estudos dos perfis químicos permitiram diferenciar as plantas doentes daquelas saudias, indicando potenciais bactericidas para futuros estudos frente à *X. fastidiosa*. Os dados obtidos também abriram as portas para novos estudos,

entre eles entender a interação entre a bactéria e o limão cravo, já que este apresenta uma tolerância elevada à *X. fastidiosa*.

Tabela 6.1. Variação do perfil químico dos citros estudados: dados dos cromatogramas de íon selecionado

Composto	Laranja pêra	Limão cravo	Enxerto	Enxerto tolerante*	Enxerto com CVC
Cumarina simples					
Limetina (folhas)	nd	8582097	nd	nd	nd
Cumarinas angulares					
Seselina					
Raízes	18052,0**	8047,7**	- 1,61	- 2,34	- 1,72
Caule superior	20,05**		- 2,25	- 2,47	- 1,97
Caule inferior		46,7**	- 4,58	- 1,36	+ 1,06
Folhas	13,99**	3,83**	+ 1,51	- 1,74	- 6,23
Ostol					
Raíz	43419640	7467196	- 1,49	+ 1,40	+ 1,23
Cumarinas lineares					
Xantiletina					
Raízes	8142,8**	12709,9**	- 1,37	+ 1,05	- 1,05
Caule superior	654,25**		- 28,12	+1,01	+ 1,06
Caule inferior		684,04**	- 3,74	+ 1,05	+ 1,34
Folhas	10,45**	11,16**	+ 5,10	+ 1,17	- 5,0
Xantoarnol					
Raízes	1238209 ⁺⁺	nd	- 7,07	+ 1,26	+ 2,20
Diidrosuberenol					
Raízes	4985412 ⁺⁺	1682149 ⁺⁺	- 2,06	+ 1,89	+ 2,18
Decursinol					
Raízes	5989126 ⁺⁺	3384448 ⁺⁺	- 1,40	+ 2,56	+ 1,97
Ulopterol					
Raíz	1126986 ⁺⁺	2094542 ⁺⁺	- 1,83	+ 1,80	+ 2,31
Suberosina					
Raíz	10932822 ⁺⁺	16906664 ⁺⁺	- 1,64	+ 1,05	- 1,08
Suberenol					
Raíz	874662 ⁺⁺	996093 ⁺⁺	- 1,46	+ 1,77	+ 1,69
Citrubutina					
Raíz	1342985 ⁺⁺	1223010 ⁺⁺	+ 1,28	+ 1,27	+ 1,42
Nordentatina					
Raíz	4245070 ⁺⁺	22286730 ⁺⁺	- 1,68	+ 1,19	+ 1,06
Clausarina					
Raíz	1778637 ⁺⁺	1813764 ⁺⁺	+ 1,76	- 1,09	- 1,70
Bergapteno					
Folhas	nd	7433006 ⁺⁺	nd	nd	- 10,4
Flavonóides					

Rutina						
Raízes	-	-	-	-	-	-
Caule superior	1020,30**		- 2,14	- 1,23	+ 1,74	
Caule inferior		1896,70**	- 2,60	- 1,03	- 1,37	
Folhas	6966,90**	11328,50**	- 2,61	+ 1,06	+ 1,09	
Hesperidina						
Raízes	-	-	-	-	-	-
Caule superior	3793,10**		+ 3,64	- 1,51	+ 1,25	
Caule inferior		691,59**	+ 1,00	+ 1,11	- 1,48	
Folhas	13768,90**	3168,40**	+ 1,12	+ 1,22	+ 1,52	
Sinesetina						
Folhas	88882 ⁺⁺	216169 ⁺⁺	+ 4,06 (361045) ⁺⁺	- 2,31 (155959) ⁺⁺	+ 1,35 (487430) ⁺⁺	
5-demetoxi-nobiletina						
Folhas	1732622 ⁺⁺	233147 ⁺⁺	+ 2,37 (4103215)	- 2,97 (1379659)	+ 1,26 (5171686)	
Tangeretina						
Folhas	451614	4097679	+ 4,01 (1809100)	- 3,15 (573778)	- 1,21 (1494495)	
6-hidroxi-3', 4',5,7,8-penta-metoxiflavona						
Folhas						
5-hidroxi-3',4',6,7,8-pentametoxiflavona						
Folhas						
Nobiletina						
Folhas	1840858	3014378	+ 2,13 (3923960)	- 1,66 (2363600)	+ 1,59 (6232529)	
Limonóides						
Limonina						
Raíz	nd	nd	nd	nd	Nd	
Limonina diosfenol	17004330	678163	- 1,32	- 1,38	- 1,08	
Raíz						

*Planta tem a bactéria em seu interior, mas sem sintoma de CVC. **Dados de quantificação mg/kg de planta seca. ⁺⁺ Valores referentes à áreas dos picos integrados via software.

7. Referências Bibliográficas

ABDEL-FATTAH, M. E.; TAHA, K. E.; ABDELAZIZ, M. H.; MISSALEM, A. A.; ELKHRISY, E. A. M. Chemical constituents of *Citrus limonia* and *Foeniculum Vulgare*. *J. Heterocycl. Chem.* **13**: 45–48, 2003.

ABDELNUR, P. V. *Estudo Fitoquímico de Citrus: Resistência a Xylella fastidiosa e Interação com Oncometopia facialis*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de mestrado, 275p

ALMEIDA, R. P. P.; PEREIRA, E. F.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R. S.; Multiplication and movimento f a citrus strain os *Xylella fastidiosa* Within Sweet Orange. *Plant Diseases*, **85**(4): 382-386, 2001.

ANAYA, A. L.; RUBALCAVA, M.M.; ORTEGA, R.C.; SANTANA, C.G.; MONTEERRUBIO, P.N.S.; BAUTISTA, B.E.H.; RACHEL, M.R. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry*, **66** (4): 487-494, 2005.

BENAHMED, M.; Akkal, S.; ELOMRI, 3 H. LAOUER, P. V.; SEGUIN, E. SECONDARY CONSTITUENTS FROM *Carum montanum* *Chemistry of Natural Compounds*, **44** (4): 25-29, 2008.

BOFFO, E.F. *Utilização da RMN aliada a Métodos Quimimétricos na Análise de Méis e Aguardentes*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2009. Tese de Doutorado, 177p.

BORRADAILE, N. M.; CARROLL, K.K.; KUROWSKA, E.M.; Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids* **34**: 591–598, 1999.

BROBERG, A.; KENNE, L.; PEDERSEN, M. In-situ Identification of major metabolites in the red alga *Glacilariopsis lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear resonance spectroscopy. *Planta* **206** (2) 300, 1998.

BURKE, A. B.; PARKINS, H.; Coumarins from *Amyris balsamifera*. *Phytochemistry*, **18** (6): 1073-1075, 1979.

CASTEL, W. S.; TUCKER, D. P. H.; KREZDORN, A. H. Rootstocks. Gainesville University of Florida, 1992.

Disponível em (<http://edis.ifas.ufl.edu/hs178>), acesso em 16/01/2010.

CÉSAR, H. P.; *Manal Prático do Enxertador*, 215^a ed. São Paulo: Editora Nobel, 1996.

CHIBA, H.; UEHARA, M.; WU, J.; WANG, X.; MASUYAMA, R.; SUZUKI, K.; KANAZAWA, K.; ISHIMI, Y., 2003. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J. Nutr.* 133, 1892–1897, 2003.

CHIN, J.A.; CHEN, A. D.; SHAPIRO, M. J. SPEED: Spin- Echo Enhanced Diffusion Filtered Spectroscopy. A New Tool for High Resolution MAS NMR. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 2(3): 293, 2000.

CitrusBR (<http://www.citrusbr.com>), acessado em 15/01/2010.

COLLINS, C. H.; Pilares da Cromatografia. In Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. *Scientia Chromatografica*, 1(1): 7-20, 2009.

DREYER, D. L.; HUEY, P. F.; Coumarins in *Eremocitrus glauca*; [*Phytochemistry*](#), 13 (7): Pages 1237-1239, 1974.

ENGLER, A. Rutaceae, Simaroubaceae, Burseraceae, In: ENGLER, A. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. 2^a ed. Leipzig, Wilhelm Engelmann, p.187-456, 1931.

EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; VAN BEEK, T. A.; VERVORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P.; ALBERTI, K.; LC-NMR coupling technology: Recent advancements and applications in natural products analysis. *Magn. Reson. Chem* 43(9): 681-687, 2005.

FERREIA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. *Química Nova*, 22(5): 724-731, 1999.

FIGUEIREDO, J. O.; HIROCE, R., “Influência do Porta-enxerto na Qualidade do Fruto e Aspectos Nutricionais relacionados à Qualidade”. In: Seminário Internacional de Citros- Porta-Enxertos, 1, 1990. Jaboticabal, FUNEP, 111-121. 1990.

FORIM, M. R.; *Estudo Fitoquímico do Enxerto de Azadirachta indica sobre Melia azedarach: Quantificação de Substâncias Inseticidas*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de mestrado, 320 p.

GARCIA, C. F.; *Estudo Comparativo de Pé-Francos e Enxertos do Gênero Citrus: correlação entre seus metabólitos e o processo de enxertia*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2005. Tese de doutorado, 262 p.

GARCÍA-ARGÂEZ, A.N., RAMÍREZ APAN, T.O., PARRA DELGADO, H., VEL 'AZQUEZ, G., MARTÍNEZ- V'AZQUEZ, M., Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Medica* 66, 279–281, 2000.

GARG, A., GARG, S.; ZANEVELD, L.J.D.; SINGLA, A.K.; Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.* 15: 655–669, 2001.

GELPI, E.. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 703: 59-80, 1995.

GUNATILAKA, A.A.; KINGSTON, D.G.; WIJERATNE, E.M.; BANDARA, B.M.; HOFMANN, G.A.; JOHNSON, R.K.; Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. *Journal of Natural Products* 57, 518–520, 1994.

GHOSH, P.; SIL, P.; MAJUMDAR, S.; THAKUR, S.; A coumarin from *Limonia acidissima*. *Phytochemistry*, 21(1), 240-1, 1982.

GLJNATILAU, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I. 1994. Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. *Journal of Natural Products*, 57, (4): 518-520.

GODOY, M.F.P.; VICTOR, S.R.; BELLINI, A.M.; GUERREIRO, G.; ROCHA W.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; BACCCI-JR, M.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES J.B.; PAGNOCCA F.C.. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3B): 669-672, 2005.

HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, London: 676 p, 1994.

HASHEM, F. A. Phenolic compounds of *Erucaria microcarpa* Boiss. and their effect as scavengers for singlet oxygen. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences* , 41/42: 59-73, 2003.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Annals of Botany* 89, 503-512, 2002.

HIBBERT, D. B.; MINKKINEN, P.; FABER, N.M.; , WISE, B. M. IUPAC project: A glossary of concepts and terms in chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, **642**:3–5, 2009.

HOPKINS, D. L.; Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of bacterium that causes Pierce's Disease of grapevines. *Phytopathology*, **75**: 713-717, 1985.

IMRAM, M.; RIAZ, N.; IBRAHIM, M.; AHMED, E.; RASOOL, M. A.; MALIK, A.; MOAZZAM, M.; Further Phytochemical Studies on *Aerva persica*. *J. Chem. Soc. Pak*, **31** (1): 207-9, 2009.

JAIMES, E. P. G.; DE SOUZA, P. S.; WICKERT, E.; DONADIO L. C.; AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À *Xylella fastidiosa* EM GERMOPLASMA DE TANGERINA E HÍBRIDOS INTRODUZIDOS DA ITÁLIA E CÔRSEGA, *Rev. Bras. Frutic*, **24**(2): 579-582, 2002.

KALINOVA, J.; DADAKOVA E.; Rutin and Total Quercetin Content in Amaranth. *Plant Foods Hum Nutr* 64:68–74(2009).

KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M.; Isolation of Furocoumarins from Bergamot Fruits as HL-60 Differentiation-Inducing Compounds *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4073-4078, 1999.

KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M.; KOIZUMI, M.; ITO, C.; FURUKAWA, H. Quantitative study of flavonoids in leaves of Citrus plants. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3865–3871, 2000.

KLAUS, A. LC-NMR: theory and experiment. *On-line LC-NMR Relat. Tech.* 1-22, 2002.

KLAUS, A. Liquid Chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, **856** (1-2), 199-211, 1999.

KUSTER M.; ALDA, M. L.; BARCELO, D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. *Mass Spectrometry Reviews*, **25** (6): 900–916, 2006.

LANÇAS, F. M.; A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente compatíveis? *Scientia Chromatografica*, **1**(2): 35-61, 2009.

LARANJEIRA, F.F., PELAZZO, D. Danos qualitativos à produção de laranja “Natal” causados pela clorose variegada do citros. *Laranja*, **20**(1):77-91, 1999.

LARANJEIRA, F.F. Dez anos de clorose variegada do citros: o quê sabemos?. *Laranja*, **18**(1):123-141, 1997b.

LARANJEIRA, F.F. *Dinâmica temporal e espacial da clorose variegada dos citros*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP, Dissertação de mestrado, 1997a, 150p.

LARANJEIRA, F.F. *Epidemiologia da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP, Tese de doutorado, 2002, 158 p.

LI, S.; LO, C-Y.; HO, C-T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4176–4185, 2006.

LI, W.B. *Avaliação do comportamento de variedades de copas e porta-enxertos à clorose variegada dos citros*. 1997. - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), 55 f.

LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S.; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R. H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Coffe leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparasion with *Xylella fastidiosa* o citrus. *Plant disease*, **82**(1): 94-97, 1998.

LIMA, V.; SILVA, C.B.; MAFEZOLI, J.; BEZERRA, M. M.; Moraes, M.O.; MOURÃO, G.S.; SILVA, J.N.; Oliveira, M.C.; Antinociceptive activity of the pyranocoumarin seselin in mice. *Fitoterapia*, **77**, 574–578, 2006.

LIN, L.C.; YANG, L.L.; CHOU, C.J.; Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry* **62**, 619–622, 2003.

LINS, R. O.; Abreu, M. S.; Alves, E.; Barbosa, J. F.; Magela r.; CONSTATAÇÃO DE *Xylella fastidiosa* EM PECÍOLOS E HIPOCOTILOS DE CAFEEIRO COM SINTOMAS DE MANCHA MANTEIGOSA *Ciênc. agrotec.*, **32** (1): 42-47, 2008.

- LIU, Q-W; TAN, C-H; QU, S-J; FAN, X; ZHU, D-Y. Chemical constituents of *Evodia fargesii* Dode. *Zhongguo Tianran Yaowu*, **4**(1): 25-29. (2006).
- LOPES, S. A.; RIBEIRO, D. M.; ROBERTO, P. G.; FRANÇA, S. C.; SANTOS, J. M.; *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant- *Xylella fastidiosa* interactions. *Plant disease*, **84**(8): 827-830, 2000.
- LUN-ZHAO YI, L.; YUAN, D.; LIANG, Y.; XIE, P.; ZHAO, Y. Fingerprinting alterations of secondary metabolites of tangerine peels during growth by HPLC–DAD and chemometric methods. *Analytica Chimica Acta*, **649**:43-51, 2009.
- MAGITAI, P.; MELLIU, E.; SKALTOUNIS, A.L.; MITAKU, S.; LE'ONCE, S.; RENARD, P.; PIERRE', A.; ATASSI, G.; Synthesis and cytotoxic activity of pyranocoumarins of seselin and xanthyletin series. *Journal of Natural Products* 61, 982–986, 1998.
- MARTINS, L. R. R., *Perfil Cromatográfico e Análise Multivariada para o Controle de Qualidade de Amostras Comerciais do gênero Phyllanthus (quebra-pedra)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2008. Tese de Doutorado, 154p.
- MASUDA, T.; TAKASUGI, M.; ANETAI, M.; PSORALEN AND OTHER LINEAR FURANOCOUMARINS AS PHYTOALEXINS IN *GLEHNNIA LITTORALIS*. *Phytochemistry*, **47** (1): 13-16, 1998.
- MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J.; *Citros*, Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005.
- MAURER, H. H.. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology". *Journal of Chromatography B*, **713**: 3-25, 1998.
- MELO, M. F. F.; ZICKEL, C. M.; Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta bot. bras.* **18**(1): 73-90, 2004.
- MENDHAM, J; DENNEY, R.C; BARNES, J.D; THOMAS, M.J.K; Vogel *Análise Química Quantitativa*. 6ª edição. LTC editora. 2002. 462 p.
- MILLIS, K. K.; MAAS, W. E.; CORY, D. G.; SINGER, S. Gradient , high-resolution, magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy of human adipocyte tissue. *Magnetic Ressonance in Medicine*, **38**(3): 399, 1997.

MONTEIRO, P. B.; RENAUDIN, J.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; AYRES, A. J.; GARNIER, M. ; BOVÉ, J. M. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant disease*, **85**(3): 246-251, 2001.

Mudas Cítricas Citrolima

(<http://www.citrolima.com.br/onlinclon/crescimentoInicial.htm>), acessado em 16/01/2010.

NIESSEN, W.M.A.. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry”. *Journal of Chromatography*, **858**: 179-197, 1999.

OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; FERREIRA, M. M. C. Uso da análise exploratória de dados na avaliação de modificadores químicos para determinação direta e simultânea de metais em álcool combustível por GFAAS. *Eclética Química*, **31**(1): 7-12, 2006.

OSBOURN, A. E. Review. Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genetics and Biology*, **26**(3): 163-168, 1999.

PARRA, J. R.P.; LOPES, J.R S.; ZUCCHI, R.A.; GUEDES, J.V.C.; *Biologia de insetos-praga e vetores. Citros*, 1ª edição, FAPESP, 2005.

PIRANI, J. R. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. *Rodriguésia* **56** (86): 189-204, 2005.

POMPEU JUNIOR, J.; Porta-Enxertos: In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU Jr., J.; AMARO, A. A.; SEMPIONATO, O. R.; *Citricultura Brasileira*, 2ª ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991.

Portal de notícias do IG

(<http://ultimosegundo.ig.com.br/economia/2009/11/04/citros+amarelinho+cai+94+desde+2005+informa+fundecitrus+9018949.html>) acessado em 16/01/2010.

Projeto Orchidstudium. (<http://www.orchidstudium.com/>), acessado em 18/01/2010.

Resolução RE nº 899. Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*. 29 de maio de 2003.

REVILLA, I., *et al.* Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection”. *Journal of Chromatography A*, **847**: 83-90, 1999.

- RIBANI, M. et al Validação em Métodos Cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771-780, 2004.
- RIBEIRO, A. B.; ABDELNUR, P. F.; GARCIA, C. F.; BELINI, A.; SEVERINO, V. G. P.; DA SILVA, M. F. G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P. C.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A.; Chemical Characterization of *Citrus sinensis* Grafted on *C. limonia* and the Effect of Some Isolated Compounds on the Growth of *Xylella fastidiosa*. *J. Agric. Food Chem.*, **56** (17): 7815-7822, 2008.
- RIBEIRO, A. B.; *Fitoquímica do Enxerto de Citrus sinensis sobre C. limonia e da espécie Nycticalanthus speciosus (Rutaceae) e Biossíntese de Cumarinas Preniladas*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Tese de doutorado, 262 p.
- ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **44**: 683-700, 2007.
- RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU Jr., J.; AMARO, A. A.; SEMPIONATO, O. R.; *Citricultura Brasileira*, 2^a ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991.
- ROSSETTI, V. AND DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos Citros: revisão. *Laranja*, **11**(1):1-14, 1990.
- ROW, L. R.; SASTRY, G. P.; Chemical investigation of *Citrus mitis*. V. Some reactions of Citromitin. *Indian Journal of Chemistry*, **1**: 207-9, 1963.
- SAKELLARIOU, D.; MERILES, C. A.; MARTIN, R. W.; ALEXANDER, A. P. NMR in rotating magnetic fields: magic-angle field spinning. *Magnetic Resonance Imaging*, **23**: 295–299, 2005.
- SALIBE, A. A.; “Importância do Porta-Enxerto na Citricultura”. In: Encontro Nacional de Fruticultura, Rio de Janeiro, v 5, 1998. PESAGRO-RIO/SBF, 1987.
- SANYAL, R.; BADAMI, B. V.; A new Synthesis of 3-arylpropenoic acids and 5-phenyl-2,4- pentadienoic acid from 4-acetyl-3-arylsydnonones and arylaldehydes. *Org. Commun.* **2** (2): 42-48(2009).
- SHIMODA, K.; HAMADA, K.; HAMADA, H.; Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures *Phytochemistry* **69**: 1135–1140, 2008.

- SHI, R.; LIU, B.; LI, J.; ZHIBIN, D. Total Flavonoids Extract of *Citrus aurantium* and Its Manufacturing Method. CN Patent 101062165; CAN 147:547801 AN 2007: 1255965.
- SKOOG, D.A; HOLLER, F.J; NIEMAN, T.A. Princípios de Análise Instrumental. 5ª edição. ED. Bookman. Porto Alegre: 2002. 836 p.
- SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA P. *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, **406**:151-159, 2000.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; Quantification (including trace analysis). In: *Practical HPLC method development*. 2 ed. New York Wiley, 1997.
- SILVA, M. F. G. F. da; GOTTLIEB, O. R.; EHRENDORFER, F. Chemosystematics of Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. *Plant Systematics and Evolution*, **161** (3-4): 97-134, 1988.
- SOUZA, A. A.; *Análise comparativa da expressão dos genes de Xylella fastidiosa* associados à patogenicidade e formação de biofilmes. Campinas, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, tese de doutorado, 2004, 100 p.
- SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLLETA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; YANAI, G. M.; MUTO, N. H.; OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; MACHADO, M. A. Analysis of the gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Molecular Plant- Microbe Interactions*, **16**(10): 867-875, 2003.
- SOUZA, G. D. *Toxinas Produzidas por Fungos do Gênero Fusarium e Alternaria: Aspectos Analíticos e Químicos-Ecológicos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2009. Tese de Doutorado, 253p.
- STEVENS, P. F.; *Ordem Sapindales*, 2006.
(<http://www.mobot.org/mobot/research/curators/stevens.shtml>), acessado em 16/01/2010
- STASHENKO, E. E.; ACOSTA, R.; MARTINEZ, J. R.; High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* , **43**(1-3): 379-390, 2000.

The Jonh Deere Home Page
(http://www.deere.com.br/pt_BR/ag/veja_mais/info_mercado/citrus.html),
acessado em 15/01/2010).

TITATO, G. M., *Desenvolvimento de Metodologia para a Determinação de Pesticidas Seleccionados em um Sistema de Cromatografia em Fase Líquida Acoplado a Espectrometria de Massas (HPLC-MS): Comparação entre ESI e APCI*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 166p.

Virginia Commonwealth University- Department of Chemistry,
(<http://www.has.vcu.edu/che/people/bio/fenn.html>), acessado em 20/01/2010.

VIZZOTTO, L. *Estudos e Aplicações das Técnicas de RMN HR-MAS e DOSY em Plantas e Extratos de Plantas da Ordem Rutales*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 196p.

WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F.; *Chemistry and Chemical Taxonomy of The Rutales*. London, Academic Press, 1983.

WOLLENWEBER, E.; ROITMAN, J. N.; A Novel Methyl Ether of Quercetagenin from *Chromolaena odorata* Leaf Exudate. *Biochemical Systematics and Ecology*, **24**(5): 479-480, 1996.

PRIA JÚNIOR, W. D.; LACAVA, P. M.; WENBIN L.; COSTA, P.C.; JOHN S. HARTUNG, J. S.; DETECÇÃO DA *XYLELLA FASTIDIOSA* EM SEMENTES E SUA TRANSLOCAÇÃO PARA PLÂNTULAS DE LARANJA-DOCE. *LARANJA*, **24**:(2): 397-412, 2003.

WU, T. S.; Alkaloids and coumarins of *Citrus grandis*. *Phytochemistry*, **27**(11): 3717-18, (1988).

WU, T. S.; HUANG, S. C.; LAI, J. S.; Stem bark coumarins of *Citrus grandis*. *Phytochemistry*, **36**(1) : 217-9, (1994).

WU Tian-Shung.; LI, Chia-Ying.; LEU, Yannn-Lii.; HU, Chang-Qi.; Limonoids and alkaloids of the root bark of *Dictamnus angustifolius*. *Phytochemistry*, **50**: (3): 509-512, 1999.

YAMAMOTO, M.; MATSUMOTO, R.; YAMADA, Y. Varietal difference of juice and shoot limonoids concentration in Citrus and the relationship between shoots and juice limonin concentration. *Kaju Shikenjo Hokoku*, **30/31**: 25-37; CAN 130:209043 AN 1999: 4026, 1998.

YANG, X-W; TENG, J.; Chemical constituents of the unripe fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 16(1): 20-23, (2007).

ZHANG, M., ZHANG, J.P., JI, H.T., WANG, J.S., QIAN, D.H., Effect of six flavonoids on proliferation of hepatic stellate cells in Vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* **21**: 253–256, 2000.

ZIEGLER, G.; SPITELLER, G.; A coumarin and a diterpene from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valencia (Rutaceae). *Flavour and Fragrance Journal* **7**(3):, 141-5. (1992).