

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 LARANJA
PÊRA E TANGOR 'MURCOTT' APÓS A INOCULAÇÃO DO
FUNGO *Alternaria alternata*

MARSELE MACHADO ISIDORO*

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

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

*** bolsista CNPQ/CAPES**

São Carlos - SP

2013

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

I81ev

Isidoro, Marsele Machado.

Estudo da variação do perfil químico de laranja pêra e tangor 'Murcott' após a inoculação do fungo *Alternaria alternata* / Marsele Machado Isidoro. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
224 p.

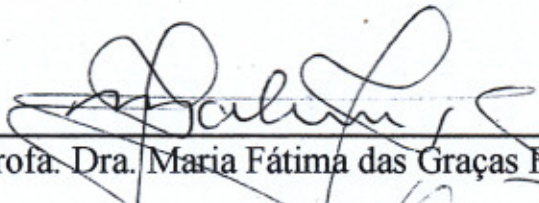
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Produtos naturais. 2. Perfil químico. 3. Mancha marrom de alternaria. 4. Microscopia eletrônica de varredura. 5. Quimiometria. I. Título.

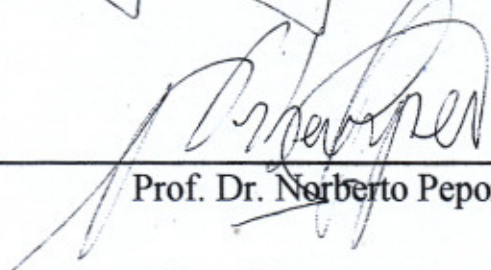
CDD: 547.3 (20^a)

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

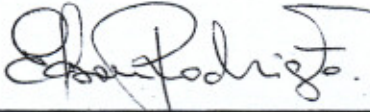
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata Marsele Machado Isidoro, realizada em 06 de fevereiro de 2013:



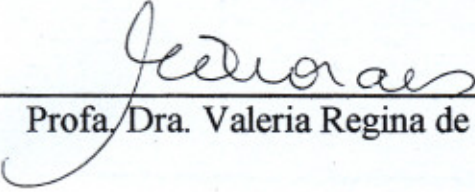
Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



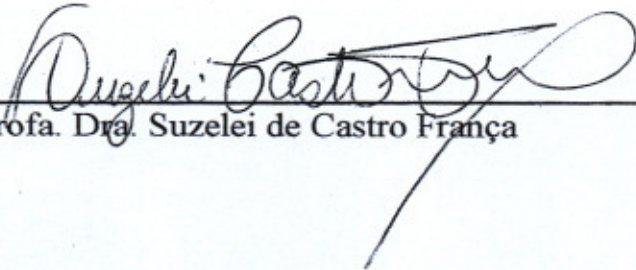
Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Profa. Dra. Valeria Regina de Souza Moraes



Profa. Dra. Suzelei de Castro França

Dedico este trabalho aos meus pais, Jose Maria e Sirley e aos meus irmãos Leonardo e Rodrigo pelo carinho, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho e sempre estar presente nos momentos de aflições e alegrias;

À amiga e professora Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, obrigada pela orientação, pelos ensinamentos e por acreditar que eu seria capaz de desenvolver este trabalho;

Ao amigo e professor Dr. Edson Rodrigues Filho pela contribuição dada a este trabalho;

À Irmã e amiga Dra. Kátia Prieto pela imensa amizade, carinho, prestatividade e colaboração na realização deste trabalho, minha eterna gratidão;

*Ao Dr. Marcos A. Machado e seu aluno de doutorado Rodrigo Stuart, do Centro de Citricultura APTA Citros “Sylvio Moreira”, Instituto Agronômico de Campinas-IAC, pela doação de um isolado de *A. alternata* para a realização desta tese;*

À prof Dra. Angélica Maria Penteado Martins Dias e a Dra Luciana Fernandes do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCar pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura;

Ao professor Dr Edenir Rodrigues P. Filho por toda contribuição nas análises quimiométricas e por sua amizade;

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e a pesquisadora Dra. Denise Brentan da Silva pela amizade, prestatividade, disponibilidade e conhecimentos transmitidos nas análises por MALDI-IMS;

Aos órgãos de fomento Capes e CNPq pela bolsa concedida;

Ao grupo de RMN, principalmente ao professor Dr. Antônio G. Ferreira, Eduardo S. P. do Nascimento, Sérgio S. Thomasi e Elenilson G. Alves Filho pelo trabalho em colaboração realizado neste laboratório;

Aos professores do grupo de Produtos Naturais Dr. João Batista Fernandes, Dr. Paulo Cezar Vieira, Dr. Moacir Rossi Forim que direta ou indiretamente participaram da evolução desse trabalho;

Ao amigo Israel Cívico pelo auxílio nos experimentos LC-MS, sobretudo pela generosidade sempre dispensada;

À amiga Karla Malaquias pela amizade, prestatividade, disponibilidade e conhecimentos transmitidos nas análises por CG-MS;

Aos amigos Ana Paula Terezan e Edenilson Niculau pelo auxílio nos experimentos com os voláteis e por todos os ensinamentos transmitidos;

Ao amigo Dr. Leonardo Toffano pelo auxílio nos ensaios de inibição do fungo;

Ao mestrando Evandro L. Prieto pela grande ajuda sempre que precisei tanto na preparação dos extratos quanto na identificação do fungo;

Ao Dr Sebastião da Cruz Silva que me ensinou a dar os primeiros passos na pós-graduação, minha eterna gratidão;

À todos os amigos do laboratório de produtos naturais, pela amizade, ensinamentos, apoio, prestatividade e colaboração neste trabalho e por proporcionarem um ambiente de trabalho prazeroso e familiar, em especial aos amigos: Barbara Sayuri, Cristovam Desfocado Cerqueira, Fabiana Marques, Fernanda Villare, Graciele Juarez, Leila Gimenes, Marcela Burgger, Moacir Andrade, Murilo Lima, Priscila Gonçalves, Roberta Ávila, Sâmia Freitas, Suellen Demuner, Tatiane Albarici, Tatiani Bondância, Rodrigo Kitamura, Wesley Gomes.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico
Φ	Diâmetro
λ	comprimento de onda
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
ACN	Acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
ACP	Análise de componentes principais
Atm	Atmosfera
BDA	batata-dextrose-ágar
BOD	<i>biological oxygen demand</i>
CC	cromatografia em coluna
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
COSY	correlated spectroscopy
CDCl_3	clorofórmio deuterado
<i>d</i>	Dubleto
DAD	Diode Arrange Detector
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\text{DMSO-}d_6$	dimetilsulfóxido deuterado
ESI	Ionização por electrospray
Fundecitrus	fundação de defesa da citricultura
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IMS	<i>Imaging Mass Spectrometry</i>
<i>J</i>	constante de acoplamento
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
<i>m</i>	Multiplete
MALDI	<i>Matrix Absorption Laser Desorption Ionization</i>
MeOD	metanol deuterado
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMA	mancha marrom de alternária
MHz	mega-hertz

MS	<i>Mass Spectrometry</i>
m/z	razão massa/carga
PCA	Principal Components Analysis
PCR	Reação da polimerase em cadeia
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
<i>s</i>	Singleto
SAM	adenosil metionina
<i>sl</i>	singleto largo
SPME	Solid Phase Micro-Extraction
<i>t</i>	Tripleto
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TOF	Tempo de vôo
TMS	tetrametil Silano
TSP-D4	(trimetilsilil)-tetradeuterosódio propionato
UV-Vis	ultravioleta-visível

RESUMO

ESTUDO DA VARIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE LARANJA PÊRA E TANGOR ‘MURCOTT’ APÓS A INOCULAÇÃO DO FUNGO *Alternaria alternata* – O presente trabalho descreve o estudo da variação do perfil químico de citros após a inoculação do fungo *Alternaria alternata*, responsável pela Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA) que é uma das mais sérias doenças em pomares de tangerinas, causando grandes prejuízos à citricultura brasileira. Para isso, inoculou-se *A. alternata* em mudas de laranja pêra, variedade considerada resistente a esta doença e tangor “Murcott”, uma das variedades mais suscetíveis à doença e avaliou-se a modificação dos constituintes químicos através de estudo utilizando CLAE-DAD aliado a ferramentas quimiométricas e análise dos voláteis destas variedades. O estudo da interação histopatológica entre este micro-organismo e as variedades de citros estudadas foi feito utilizando MEV-Ambiental, onde foi possível observar a forma de penetração do fungo no tecido de citros suscetível. Também foi feito o estudo fitoquímico de citros com o objetivo de obter substâncias para ensaio de inibição do crescimento micelial e formação de apressório de *A. alternata*, que resultou no isolamento de 17 metabólitos secundários. Ao analisar a variação do perfil químico dos citros estudados através da análise quimiométrica foi possível detectar nas folhas de tangor murcott uma possível resposta local desta espécie. Então, para verificação deste resultado foi feito um experimento em RMN ^1H 600 MHz onde foi observado o acúmulo do flavonoide apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas com sintomas de MMA, quando comparada as folhas controle e sem sintoma. Este resultado estimulou a investigação da distribuição desta substância em folhas intactas de tangor “Murcott” controle e com sintomas de MMA, que foi feita utilizando o MALDI-IMS, indicando um acúmulo desta substância em folhas sintomáticas de tangor “Murcott”.

ABSTRACT

STUDY OF VARIATION IN THE CHEMICAL PROFILE OF SWEET ORANGE AND 'MURCOTT' TANGOR INDUCED BY INOCULATION OF *Alternaria alternata* - This paper describes the study of variation in the chemical profile of citrus after inoculation of the fungus *Alternaria alternata*, who causes the disease known as alternaria brown spot (ABS), which is one of the most serious diseases in orchards of tangerines, causing major damage to the Brazilian citrus. For this, *A. alternate* was inoculated in sweet orange (resistant) and "Murcott" tangor (susceptible) to evaluated the modification of chemical constituents through study using HPLC-DAD coupled with chemometric tools and analysis of constituents volatile of these varieties. The histopathological study of the interaction between this microorganism and citrus varieties studied was done using SEM-Environmental and was observed the penetration of the fungus into the tissue of citrus susceptible. The phytochemical study of citrus was done with the objective of obtaining substances for testing inhibition of mycelial growth and appressoria formation of *A. alternata*, which resulted in the isolation of 17 secondary metabolites. The chemometric analyses of the variation of the chemical profile of citrus studied detected a possible local response in leaves of "Murcott" Tangor. Then, to check this result was done in an experiment in ^1H NMR 600 MHz and was observed a accumulation of flavonoid apigenin 7-O-rutinoside in leaves of "Murcott" tangor with symptoms of ABS, when compared to control of this leaves. This result stimulated the investigation of the distribution of this substance in leaves intact "Murcott" tangor control and leaves with symptoms of ABS, which was performed using MALDI-IMS, indicating an accumulation of this substance in symptomatic leaves of "Murcott" tangor.

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Iniciadores utilizados na reação de PCR para a identificação da espécie.....	35
TABELA 3.2 - Massas das partições dos extratos etanólicos.	37
TABELA 3.3 - Massas das partições dos extratos etanólicos.	51
TABELA 3.4 - Método utilizado na análise dos voláteis obtidos por hidrodestilação em CG-EM.....	53
TABELA 3.5 - Códigos utilizados na avaliação da variação do perfil químico por RMN 600 MHz.	58
TABELA 4.1 - Dados de RMN ¹ H dos flavonoides F1-F5 juntamente com os dados encontrados na literatura (LI et al, 2006).	78
TABELA 4.2 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Apigenina-7- α -O-rutinosídeo (F6) juntamente com os dados descritos na literatura (WANG et al., 1998) para F6.	86
TABELA 4.3 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Hesperidina (F7) juntamente com os dados descritos na literatura (PIZZOLATTI, et al., 2003) para F7.	93
TABELA 4.4 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da Nomilina (L1) juntamente com os dados encontrados na literatura (POULOSE, et al., 2007).....	98
TABELA 4.5 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da limonina (L2) juntamente com os dados encontrados na literatura (RIBEIRO et. al., 2005).....	103
TABELA 4.6 - Dados de RMN ¹ H das cumarinas C1-C5 juntamente com os dados encontrados na literatura (DE MELO et al., 2009); (WU et al., 1983); (AHMAD, 1984).....	111
TABELA 4.7 - Principais doenças fúngicas em citros onde se recomenda utilização de Cercobin.....	118

TABELA 4.8 - Compostos voláteis obtidos por SPME e identificados em T. ‘Murcott’ controle e após a inoculação de <i>A. alternata</i>	128
TABELA 4.9 - Compostos voláteis obtidos por SPME e identificados em L. Pêra controle e após a inoculação de <i>A. alternata</i>	128
TABELA 4.10 - Compostos voláteis obtidos por hidrodestilação e identificados em T. ‘Murcott’ controle e após a inoculação de <i>A. alternata</i>	134
TABELA 4.11 - Compostos voláteis obtidos por hidrodestilação e identificados em L. Pêra controle e após a inoculação de <i>A. alternata</i>	135
TABELA 4.12 - Dados de RMN ¹ H de Tangeretina (1) e Nobiletina (2) juntamente com os dados descritos na literatura para estas substâncias (LI et al., 2006).	167
TABELA 4.13 - Dados de RMN ¹ H de Apigenina 7-O-rutinosídeo (3) Narirutina (4) juntamente com os dados descritos na literatura para estas substâncias.	173

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Laranja Pêra (copa) enxertada sobre o Limão Cravo (porta-enxerto).	4
FIGURA 1.2 - Substâncias isoladas da copa de <i>Citrus sinensis</i> (laranja doce) pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar.	7
FIGURA 1.4 - Substâncias identificadas no flavedo de tangor ‘Murcott’ (<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>) (WANG et. al., 2007).	9
FIGURA 1.6 - Lesões características de mancha marrom de alternaria em tangor ‘Murcot’. (A) Lesões severas em folhas. (B) Lesões em ramos (C) Lesões em frutos. (BASTIANEL et al., 2005)	15
FIGURA 1.7 - Estrutura das toxinas ACT I e II.	19

FIGURA 1.8 - Ciclo de <i>Alternaria alternata</i> em folhas de <i>Citrus</i> (STUART et al., 2009).	20
FIGURA 1.9 - Mudas de Laranja pêra e Tangor “Murcott” utilizadas no experimento de inoculação de <i>Alternaria alternata</i>	32
FIGURA 3.1 - Metodologia utilizada na medida do crescimento micelial do fungo <i>A. alternata</i>	49
FIGURA 3.2 - Metodologia para análise da resposta química de T. ‘Murcott’ ao fungo <i>A. alternata</i>	57
FIGURA 3.3 - Metodologia para análise da distribuição de Apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas de T. ‘Murcott’ através de MALDI-IMS.	61
FIGURA 4.1 - Gel de agarose 1% corado com brometo de Etídio. M - Marcador de peso molecular 1kb plus NEOBIO; 1 e 2 - Presença de <i>A. alternata</i> ; 3 e 4 - Controle (550pb- espécie).	66
FIGURA 4.3 - (a) Cromatograma da mistura E1 + E2 + E3; (b) Espectro de massas do sitosterol; (c) Espectro de massas do estigmasterol; (d) Espectro de massas do campesterol.	74
FIGURA 4.4 - Espectro de RMN ¹ H da Sinensetina (F1). (CDCl ₃ , 400 MHz).	79
FIGURA 4.8 - Espectro de RMN ¹ H da Tangeretina (F5). (CDCl ₃ , 400 MHz).	81
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ¹ H da Apigenina 7-O-rutinosídeo (F6). (DMSO, 400 MHz)	87
FIGURA 4.11 - Mapa de contorno COSY da Apigenina-7-O-rutinosídeo (F6) (DMSO, 400 MHz).	88
FIGURA 4.12 - Ampliação do mapa de contorno COSY da Apigenina-7-O-rutinosídeo (11) (DMSO, 400 MHz).	88
FIGURA 4.13 - Espectro de HSQC da Apigenina-7-O-rutinosídeo (11) (400 MHz)	89

FIGURA 4.14 - Espectro de HSQC da Apigenina-7-O-rutinosídeo (F6) (DMSO, 400 MHz).	89
FIGURA 4.15 - Espectro de HMBC da Apigenina-7-O-rutinosídeo (F6) (DMSO, 400 MHz).	90
FIGURA 4.16 - Espectro de RMN ¹ H da hesperidina (F7) (400 MHz, DMSO)	94
FIGURA 4.18 - Ampliação do mapa de contorno COSY da Hesperidina (F7) (400 MHz, DMSO).	95
FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ¹³ C da hesperidina (F7) (100 MHz, DMSO).	95
FIGURA 4.20 - Espectro de RMN ¹ H da Nomilina (L1) (400 MHz).....	99
FIGURA 4.21 - Espectro de RMN ¹³ C da Nomilina (L1) (100 MHz).	99
FIGURA 4.22 - Mapa de contorno COSY da Nomilina (L1) (400 MHz).	100
FIGURA 4.23 - Espectro de RMN ¹ H da Limonina (L2) (400 MHz).	104
FIGURA 4.24 - Mapa de contorno COSY da Limonina (L2) (400 MHz).	104
FIGURA 4.25 - Ampliação do mapa de contorno de COSY da Limonina (L2) (400 MHz, CDCl ₃)	105
FIGURA 4.27 - Espectro de RMN ¹ H da Umbeliferona (C1) (400 MHz, CDCl ₃).	112
FIGURA 4.29 - Espectro de RMN ¹ H da Seselina (C3) (400 MHz).....	113
FIGURA 4.30 - Espectro de RMN ¹ H da Suberosina (C4) (400 MHz, CDCl ₃).	113
FIGURA 4.31- Espectro de RMN ¹ H de Suberenol (C5) (400 MHz, CDCl ₃).	114
FIGURA 4.33: Efeito dos compostos naturais isolados de espécies de Citros no crescimento micelial de <i>A. alternata</i> . As barras representam a média ± desvio padrão.....	119

FIGURA 4.34 - Efeito dos compostos naturais isolados de espécies de <i>Citrus</i> na inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de <i>A. alternata</i> . As barras representam a média \pm desvio padrão.....	121
FIGURA 4.35 - Cromatogramas das fibras CAR/PDMS (Fibra Preta) e PDMS/DVB (Fibra Azul) quando expostas durante 45 min a folhas de T. ‘Murcott’.....	123
FIGURA 4.36 - Cromatogramas das fibras CAR/PDMS (Fibra Preta) e PDMS/DVB (Fibra Azul) quando expostas durante 45 min a folhas de L. Pêra.....	124
FIGURA 4.37 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis das folhas de T. ‘Murcott’ com utilização da fibra preta (CAR/PDMS) em 30, 45 e 60 minutos.	125
FIGURA 4.39 - Histograma dos compostos voláteis que apresentaram maior variação quantitativa na análise comparativa por HS-SPME de folhas de T. ‘Murcott’ controle com folhas com sintomas de MMA.	129
FIGURA 4.40 - Histograma dos compostos voláteis que apresentaram maior variação quantitativa na análise comparativa por HS-SPME de folhas de L. Pêra controle com folhas com sintomas de MMA.	129
FIGURA 4.43 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis de Citros por HS-SPME.	132
FIGURA 4.44 - Histograma dos compostos voláteis que apresentaram maior variação quantitativa na análise comparativa por Hidrodestilação de folhas de T. ‘Murcott’ controle com folhas com sintomas de MMA.....	136
FIGURA 4.45 - Histograma dos compostos voláteis que apresentaram maior variação quantitativa na análise comparativa por Hidrodestilação de folhas de L. Pêra controle com folhas com sintomas de MMA.....	136
FIGURA 4.49 - Eletrofotomicrografias de varredura da superfície foliar adaxial de L. Pêra (1) e T. ‘Murcott’ (2), sendo: (A) controles e colonizadas	

por *Alternaria alternata* (B) 16 h, (C) 24 h e (D) 48 h após a inoculação.

..... 144

FIGURA 4.50 - Eletrofotomicrografias de varredura da superfície foliar de T. 'Murcott', sendo: (A) Face adaxial 24 h após a inoculação de *A. alternata*; (B) Face abaxial 48 h após a inoculação de *A. alternata*; (C) Face abaxial 48 h após a inoculação de *A. alternata*..... 147

FIGURA 4.51 - Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos das raízes dos citros estudados. (T): T. 'Murcott; (L): L. Pêra; (TRC e LRC): amostras controle, sem inocular o fungo; (TRSS e LRSS): raízes de amostras sem sintoma; (TRF e LRF): raízes de amostras com sintoma. ($\lambda = 254$ nm). 150

FIGURA 4.52 - Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos dos caules do porta-enxerto dos citros estudados. (T): T. 'Murcott; (L): L. Pêra; (TCiC e LCiC): amostras controle, sem inocular o fungo; (TCiSS e LCiSS): amostras sem sintoma; (TCiF e LCiF): amostras com sintoma. ($\lambda = 254$ nm). 151

FIGURA 4.53 - Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos dos caules superiores dos citros estudados. (T): T. 'Murcott; (L): L. Pêra; (TCsC e LCsC): amostras controle, sem inocular o fungo; (TCsSS e LCsSS): amostras sem sintoma; (TCsF e LCsF): amostras com sintoma. ($\lambda = 254$ nm)..... 152

FIGURA 4.54 - Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos das folhas dos citros estudados. (T): T. 'Murcott; (L): L. Pêra; (TFC e LFC): amostras controle, sem inocular o fungo; (TFSS e LFSS): folhas de amostras sem sintoma; (TFF e LFF): folhas de amostras com sintoma. ($\lambda = 254$ nm). 153

FIGURA 4.55 - Sobreposição de todos os cromatogramas analisados. Em branco: regiões selecionadas ($\lambda = 254$ nm). 156

FIGURA 4.56 - Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos cromatogramas das amostras de citros estudados (T): T. ‘Murcott; (L): L. Pêra. (TRC e LRC): amostras de raízes controle; (TRSS e LRSS): amostras de raízes sem sintoma; (TRF e LRF): amostras de raízes com sintoma. (TCiC e LCiC): amostras de caule do porta-enxerto controle; (TCiSS e LCiSS): amostras de caule do porta-enxerto sem sintoma; (TCiF e LCiF): amostras de caule do porta-enxerto com sintoma. (TCsC e LCsC): amostras de caule superior controle; (TCsSS e LCsSS): amostras de caule superior sem sintoma; (TCsF e LCsF): amostras de caule superior com sintoma. (TFC e LFC): amostras de folhas controle; (TFSS e LFSS): amostras de folhas sem sintoma; (TFF e LFF): amostras de folhas com sintoma. ($\lambda = 254 \text{ nm}$)... 158

FIGURA 4.57 - Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos cromatogramas das amostras de citros estudados (T): T. ‘Murcott; (L): L. Pêra. (TFC e LFC): amostras de folhas controle; (TFSS e LFSS): amostras de folhas sem sintoma; (TFF e LFF): amostras de folhas com sintoma. ($\lambda = 254 \text{ nm}$)... 159

FIGURA 4.58 - Calibração dos sinais de referência (TSP-d₄) do espectro de RMN ¹H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA. 161

FIGURA 4.59 - Espectro de RMN ¹H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA. 162

FIGURA 4.60 - Ampliação do espectro de RMN ¹H na região característica dos hidrogênios aromáticos de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA. 162

FIGURA 4.61 - Identificação da Substância **1** por comparação entre os Espectros de RMN ¹H de 2TBa: Controle da folha de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e Padrão de Tangeretina. 164

FIGURA 4.62 - Ampliação dos Espectros de RMN ¹ H de 2TBa: Controle da folha de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e padrão de Tangeretina.....	164
FIGURA 4.63 - Ampliação dos Espectros de RMN ¹ H de 2TBa: Controle da folha de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e padrão de Tangeretina.....	165
FIGURA 4.64 - Identificação da Substância 2 por comparação entre os Espectros de RMN ¹ H de 2TBa: Controle da folha de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e Padrão de Nobiletina.....	165
FIGURA 4.65 - Ampliação dos Espectros de RMN ¹ H de 2TBa: Controle da folha de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e padrão de Nobiletina.....	166
FIGURA 4.66 - Ampliação dos Espectros de RMN ¹ H de 2TBa: Controle da folha de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e padrão de Nobiletina.....	166
FIGURA 4.67 - Identificação da Substância 3 por comparação entre os Espectros de RMN ¹ H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e Padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.....	168
FIGURA 4.68 - Ampliação dos Espectros de RMN ¹ H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.	168
FIGURA 4.69: Ampliação dos Espectros de RMN ¹ H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.	169
FIGURA 4.70 - Espectros de RMN ¹ H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e da mistura de Apigenina-7-O-rutinosídeo com 4 . 169	169
FIGURA 4.71 - Ampliação dos Espectros de RMN ¹ H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.	170
FIGURA 4.72 - Ampliação dos Espectros de RMN ¹ H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.	170

FIGURA 4.73 - Espectro de RMN ^1H da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD).....	174
FIGURA 4.75 - Mapa de contorno HSQC da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD).	175
FIGURA 4.77 - Mapa de contorno COSY da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD).	176
FIGURA 4.79 - Mapa de contorno HMBC da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD)	177
FIGURA 4.80 - Cromatograma da mistura das substâncias (3) e (4) ($\lambda = 280 \text{ nm}$).....	177
FIGURA 4.82 - Espectro do íon produto $[\text{M} - \text{H}]^- = 577$ para a substância (3).	178
FIGURA 4.83 - Cromatograma de íon selecionado para a substância (4).	178
FIGURA 4.85 - Análise da Substância 5 por comparação entre os Espectros de RMN ^1H de 2TBa: Folhas controle de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e LBa: Extrato obtido de folhas de laranja pêra.....	180
FIGURA 4.87 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e LBa: Extrato obtido de folhas de laranja pêra.....	181
FIGURA 4.90 - Espectro de RMN ^1H das Folhas de Tangor de 2,0 cm com análise na região próxima à lesão (b): 1TBb: Controle; 1TSb: Sem sintoma; 1TFb: Com sintoma de MMA.	183
FIGURA 4.91 - Ampliação do espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 2,0 cm com análise na região próxima à lesão (a): 1TBb: Controle; 1TSb: Sem sintoma; 1TFb: Com sintoma de MMA.....	183
FIGURA 4.93 - Ampliação do espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA.....	185

FIGURA 4.95 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise na região próxima à lesão (a): 2TBb: Controle; 2TSb: Sem sintoma; 2TFb: Com sintoma de MMA.....	186
FIGURA 4.96 - Espectro de RMN ¹ H de Folhas de Tangor de 5,0 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 3TBa: Controle; 3TSa: Sem sintoma; 3TFa: Com sintoma de MMA.	187
FIGURA 4.98 - Espectro de RMN ¹ H das Folhas de Tangor de 5,0 cm com análise na região próxima à lesão (b): 3TBb: Controle; 3TSb: Sem sintoma; 3TFb: Com sintoma de MMA.	188
FIGURA 4.99 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H de Folhas de Tangor de 5,0 cm com análise na região próxima à lesão (a): 3TBb: Controle; 3TSb: Sem sintoma; 3TFb: Com sintoma de MMA.....	188
FIGURA 4.100 - Sobreposição de todos os espectros analisados por PCA das folhas de T. ‘Murcott’ controle, sem sintomas e com sintoma de MMA.	190
FIGURA 4.101 - Sobreposição dos espectros de RMN ¹ H na região selecionada para análise por PCA dos extratos representativos das folhas de T. ‘Murcott’ controle, sem sintomas e com sintoma de MMA.....	190
FIGURA 4.102 - Curva de variância versus componentes principais, extraída da análise de PCA das amostras de folha de tangerina.	191
FIGURA 4.103 - Gráfico de <i>scores</i> (PC1 x PC2) dos espectros de RMN ¹ H na região de 6,0-8,5 ppm das folhas de Tangor ‘Murcott’. TFC (em preto) folhas controle; TFSS (em verde) folhas sem sintomas de MMA e TFF (em azul) folhas com sintoma de MMA.	192
FIGURA 4.104 - Espectro MS/MS do íon de <i>m/z</i> 601,014 [M + Na] ⁺	196
FIGURA 4.105 - A : Imagem referente a extração do íon de <i>m/z</i> 292,967; B : Imagem referente a extração do íon de <i>m/z</i> 331,025. Onde 1 : Face adaxial de folhas de T. ‘Murcott’ com sintomas e 2 : Face adaxial de folhas de T. ‘Murcott’ controle.	196

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1 - Proposta de fragmentação do Sitosterol (E1).	75
ESQUEMA 4.2 - Proposta biogenética para L1 e L2.....	106
ESQUEMA 4.3 - Proposta biogenética para as substâncias C1-C5.....	115
ESQUEMA 4.4 - Propostas de fragmentação: a) Apigenina 7-O-rutinosídeo; b) Narirutina; c) Narigenina.....	179

FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1 – Obtenção dos extratos etanólicos de <i>Citrus</i>	36
FLUXOGRAMA 3.2 – Metodologia utilizada na partição do extrato etanólico.....	37
FLUXOGRAMA 3.3 – Metodologia utilizada no fracionamento da partição acetado de etila das folhas de Laranja Pêra.....	38
FLUXOGRAMA 3.4 – Fmetodologia utilizada no fracionamento da partição acetato de etila das folhas de Tangor “Murcott”.....	39
FLUXOGRAMA 3.5 - Fracionamento da partição TMFD.	40
FLUXOGRAMA 3.6 - Fracionamento do extrato TMFH.....	41
FLUXOGRAMA 3.7 - Fracionamento da partição TMFHid.	42
FLUXOGRAMA 3.8 - Fracionamento da partição LPFHid.	43
FLUXOGRAMA 3.9 – Fracionamento da partição LPFD.....	45
FLUXOGRAMA 3.10 – Fracionamento da partição LCRD.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 - A Citricultura Brasileira.....	3
FIGURA 1.1- Laranja Pêra (copa) enxertada sobre o Limão Cravo (porta- enxerto).....	4
1.2. - A Família Rutaceae	4
1.3. - Estudos fitoquímicos de tangor ‘Murcott’ (<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>) e laranja ‘Pêra’ (<i>Citrus sinensis</i>) sobre o porta-enxerto limão cravo (<i>Citrus limonia</i>).	6
1.4. - Mecanismo de defesa em plantas.	10
1.5. - Mancha Marrom de <i>Alternaria</i> (MMA).	14
1.6. - O patógeno <i>Alternaria alternata</i>	18
2 OBJETIVOS	31
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.1 - Materiais e Métodos.....	29
3.1.1 - Materiais Cromatográficos	29
3.2 - Equipamentos.....	30
3.3 - Obtenção do material vegetal controle e com <i>A. alternata</i>	32
3.3.1 - Obtenção do fungo <i>Alternaria alternata</i>	33
3.3.2 - Preparo das variedades de Citros estudadas.....	33
3.3.3 - Inoculação do fungo <i>Alternaria alternata</i>	33
3.3.4 - Avaliação da população fúngica nos citros após a inoculação de <i>A. alternata</i>	34
3.4 - Estudo fitoquímico dos extratos vegetais.....	35
3.4.2 - Fracionamento da partição acetato de etila das folhas de Laranja Pêra (LPFA) e Tangor Murcott (TMFA).	38

3.4.3 - Fracionamento da partição diclorometano das folhas de Tangor “Murcott” (TMFD).....	40
3.4.4 - Estudo químico da partição TMFH.	41
3.4.5 - Estudo químico da partição TMFHid.	42
3.4.6 - Estudo químico da partição LPFHid.....	43
3.4.7 - Estudo químico da partição LPFD.....	44
3.5 - Metodologia dos ensaios de inibição ao desenvolvimento de <i>A. alternata</i>	48
3.5.1 - Ensaio de inibição <i>in vitro</i> frente ao crescimento micelial.....	48
3.5.2 - Ensaio de inibição <i>in vitro</i> frente à germinação de esporo e formação de apressórios.....	49
3.6 - Análise dos componentes voláteis de mudas de Citros.....	50
3.6.1 - Análise dos componentes voláteis de mudas de Citros pela técnica de Headspace - SPME.....	50
3.6.2 - Análise dos componentes voláteis de mudas de Citros por hidrodestilação.....	52
3.7 - Metodologia para a obtenção das imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	53
3.8 - Análise da variação do perfil químico de citros via CLAE aliada à ferramenta quimiométrica.	54
3.9 - Análise da variação do perfil químico de folhas de T. ‘Murcott’ via RMN ¹ H.....	56
3.9.1 - Identificação da Substância 4 por LC-MS/MS.	58
3.10 - Análise da variação do perfil químico de folhas de T. ‘Murcott’ via RMN ¹ H aliada à ferramenta quimiométrica.....	59
3.11 - Análise da distribuição espacial de Apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas de T. ‘Murcott’ via MALDI IMS.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70

4.1 - Detecção da presença de <i>Alternaria alternata</i> em mudas de Citros via PCR.....	65
4.2 - Substâncias Isoladas.....	67
4.3 - Esteroides.....	72
4.3.1 - Identificação estrutural do sitosterol (E1), estigmasterol (E2) e campesterol (E3)	72
4.4 - Flavonoides.....	76
4.4.1 - Identificação estrutural dos flavonoides polimetoxilados F1-F5:...	76
4.4.2 - Identificação estrutural dos flavonoides glicosilados F6 e F7:.....	82
4.5 - Limonoides	96
4.5.1 - Determinação estrutural de L1	96
4.5.2 Determinação estrutural de L2.....	101
4.5.3 - Biogênese dos limonoides isolados.	106
4.6 - Cumarinas	107
4.6.1 - Determinação estrutural das cumarinas C1-C5:.....	107
4.6.2 - Biogênese de cumarinas	115
4.7 - Avaliação do efeito de compostos naturais frente ao crescimento de <i>Alternaria alternata</i>	116
4.7.1 - Efeito de compostos naturais frente ao crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	116
4.7.2 - Efeito de compostos naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de <i>Alternaria alternata</i>	120
4.8 - Análise dos componentes voláteis de Citros.....	121
4.8.1 - Análise dos componentes voláteis de Citros pela técnica de HS-SPME.....	123
4.9 - Microscopia Eletrônica de Varredura – Ambiental.....	141
4.9.1 - MEV – Ambiental da interação <i>Alternaria alternata</i> e variedades resistente e suscetível de Citros.	141

4.9.2 - Avaliação da forma de penetração e colonização de <i>Alternaria alternata</i> em folhas de T. ‘Murcott’	145
4.10 - Análise da variação do perfil químico de citros via CLAE aliada à ferramenta quimiométrica.	148
4.10.1 - Obtenção do perfil químico de citros via CLAE.	148
4.10.2 - Análise Quimiométrica.	154
4.11 - Análise da variação do perfil químico de folhas de T. ‘Murcott’ via RMN ¹ H.	159
4.11.3 - Análise estrutural da substância 5.	179
4.11.4 - Avaliação do acúmulo de Apigenina-7-O-rutinosídeo nas folhas de T. ‘Murcott’ por RMN ¹ H.	181
4.13 - Análise da distribuição espacial de Apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas de T. ‘Murcott’ via MALDI - IMS.	193
5 CONCLUSÃO	200
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	206

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 (RODRIGUEZ et al., 1991).

A citricultura brasileira atualmente tem seus esforços voltados nas frutas para a produção de suco, sendo o Brasil o maior exportador de sucos cítricos do mundo (LUZIA et al., 2009). O Estado de São Paulo é o principal produtor de laranja, tangerina e lima ácida no Brasil (BOTEON e NEVES, 2005) e, apesar de ter a laranja doce como principal espécie produzida, as tangerinas e alguns de seus híbridos, especialmente os híbridos com laranja doce (tangores), possuem grande importância especialmente no mercado nacional de frutos *in natura* (BASTIANEL et al., 2005).

As tangerinas são conhecidas por sua capacidade de produzir híbridos por cruzamento com outras tangerinas ou outras espécies de citros, tais como as laranjas obtendo-se ‘tangores’, ou com pomelos obtendo-se ‘tangelos’. As principais cultivares e híbridos de tangerinas cultivados no Brasil, por ordem de área plantada, são a tangerina ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata*) com 58%, o tangor ‘Murcott’ (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*) com 23%, a tangerina ‘Cravo’ (*Citrus reticulata*) com 11% e a tangerina ‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa*) com 8% (NUÑEZ, 2006).

Como pode ser observado na FIGURA 1.1, as plantas enxertadas são constituídas por duas partes: copa (parte superior) e porta-enxerto (parte inferior), os quais são provenientes de pé francos distintos. A maioria das laranjas e tangerinas de melhor qualidade são obtidas tendo-se o limão cravo como porta-enxerto, o qual é compatível com as principais copas comerciais, induzindo alto vigor a planta, com árvores de médio a grande porte, grandes

frutos, altas produções e suco de qualidade interna mediana. Talvez a característica mais importante deste porta-enxerto seja sua resistência à seca, já que mais de 90% de nossa citricultura depende das chuvas para o suprimento de água, e estiagens de 60 a 120 dias durante a florada são comuns. 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).

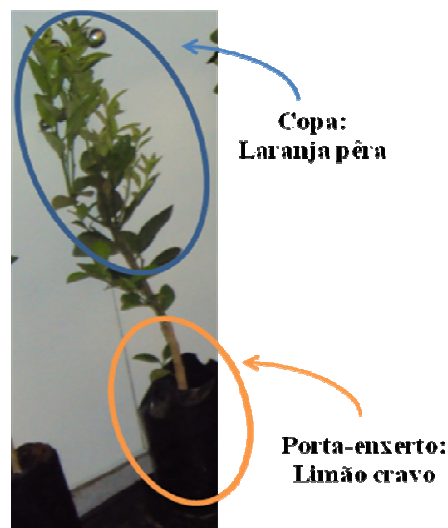


FIGURA 1.1- Laranja Pêra (copa) enxertada sobre o Limão Cravo (porta-enxerto).

1.2. - A Família Rutaceae

A família Rutaceae possui 156 gêneros e 1.800 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente em regiões tropicais quentes e temperadas (COSTA *et al.*, 2010). Os membros da família Rutaceae são fortemente aromáticos devido à presença de óleos essenciais e possuem importância considerável como fonte de frutas cítricas e algumas ornamentais.

A quimiosistemática desta família tem sido revisada por SILVA *et al.* (1988) baseando-se principalmente nos alcaloides derivados do ácido antranílico, cumarinas e limonoides. Os gêneros da família Rutaceae já foram

classificados de acordo com suas características morfológicas e químicas, mas ainda existem controvérsias sobre o posicionamento taxonômico de alguns gêneros, estimulando o estudo de espécies ainda não investigadas.

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, limonoides e flavonoides, mas escasso em quantidade e diversidade de alcaloides do ácido antranílico (GARCIA *et. al.*, 2005).

A origem do tangor ‘Murcott’ (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) não é bem conhecida. Seu nome é uma homenagem ao viveirista Charles Murcott Smith, que obteve as primeiras plantas enxertadas em Bayview, Flórida, Estados Unidos, em 1922. A variedade foi introduzida no Brasil pelo Instituto Agrônômico Nacional em 1948 (FIGUEIREDO, 1991).

As laranjeiras *Citrus sinensis*, conhecida popularmente como laranja pêra, são os citros de maior importância econômica e originaram-se provavelmente do cruzamento de *C. grandis* (toranja) com *C. reticulata* (tangerina) sendo que os dados citoplasmáticos sugerem a contribuição materna de *C. grandis* na formação desta espécie (ARAÚJO e ROQUE, 2005).

A espécie *C. limonia*, conhecida popularmente como limão Cravo possui três prováveis cruzamentos, entre eles: *C. medica* x *C. aurantifolia* x espécie não identificada; *C. medica* x *C. aurantifolia* e *C. medica* x *C. jambhiri*. Ainda para esta espécie os dados citoplasmáticos colocam-na na linhagem materna das tangerinas, junto a *C. reticulata* (tangerina), *C. jambhiri* (limão Rugoso) e *C. volkameriana* (limão Volkameriano), podendo ter, em qualquer um destes táxons, o seu parental materno (ARAÚJO e ROQUE, 2005).

1.3. - Estudos fitoquímicos de tangor ‘Murcott’ (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) e laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis*) sobre o porta-enxerto limão cravo (*Citrus limonia*).

O grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar vem estudando a interação de espécies de *Citrus* com patógenos responsáveis por doenças cítricas em plantas de grande importância econômica, com o objetivo de entender melhor a possível modificação do perfil metabólico de espécies suscetíveis e tolerantes, ampliando o conhecimento químico sobre os mecanismos de defesa de plantas. As espécies estudadas continham o limão cravo como porta-enxerto, por ser o mais utilizado em campo e permitir que as mudas estudadas atinjam o estágio adulto em um tempo bem menor, facilitando os estudos durante o desenvolvimento do mesmo. Já foram realizados por este grupo estudos da interação planta-inseto, o qual indicou que o enxerto *C. sinensis* sobre *C. limonia* apresenta uma alteração na composição química de seus óleos essenciais quando em contato com as cigarrinhas *Oncometopia facialis*, pertencentes à família Cicadellidae, as quais são transmissoras da *Xylella fastidiosa*, correspondendo a uma resposta da planta ao ataque deste inseto (ABDELNUR, 2006). O trabalho desenvolvido por SOARES (2011) descreveu o estudo da variação do perfil químico de *Citrus sinensis* sobre *C. limonia* após a inoculação da bactéria *X. fastidiosa*, responsável pela Clorose Variegada do Citros (CVC), indicando uma variação quantitativa de diversas cumarinas e flavonoides. O trabalho desenvolvido por RIBEIRO (2008) visou complementar o conhecimento químico no processo de enxertia de *Citrus sinensis* (laranja doce) sobre *C. limonia* (limão cravo), avaliando a translocação de cumarinas preniladas da parte inferior do enxerto para a superior, por meio da determinação da atividade da enzima preniltransferase.

Através dos estudos desenvolvidos pelo grupo foi possível analisar, separadamente, diversos constituintes da copa de *Citrus sinensis* (laranja doce), as folhas e o caule superior, e do porta-enxerto de *C. limonia* (limão cravo), a

raiz e o cavalo (caule inferior), identificando-se metabólitos secundários pertencentes às classes dos limonoides, alcaloides, cumarinas e flavonoides, como pode ser observado nas FIGURAS 1.2 e 1.3.

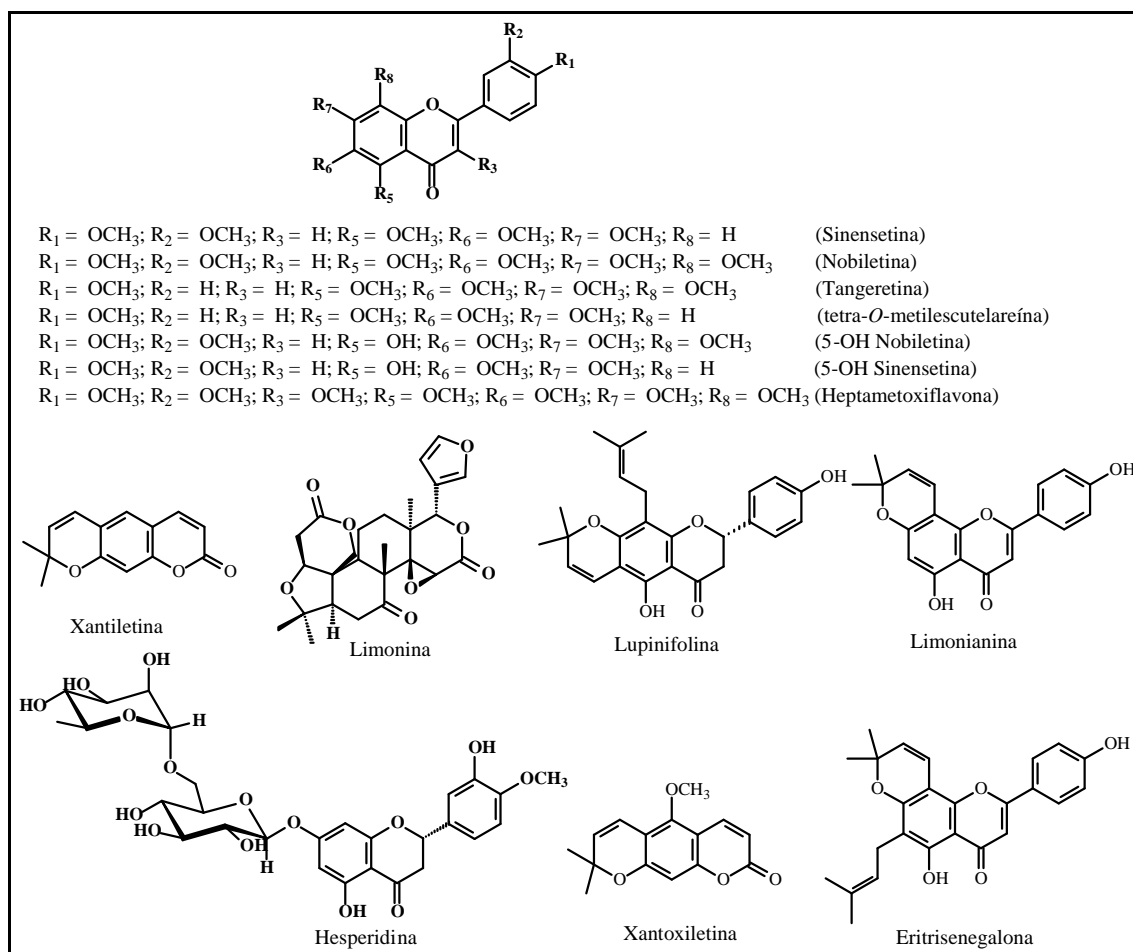


FIGURA 1.2 - Substâncias isoladas da copa de *Citrus sinensis* (laranja doce) pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar.

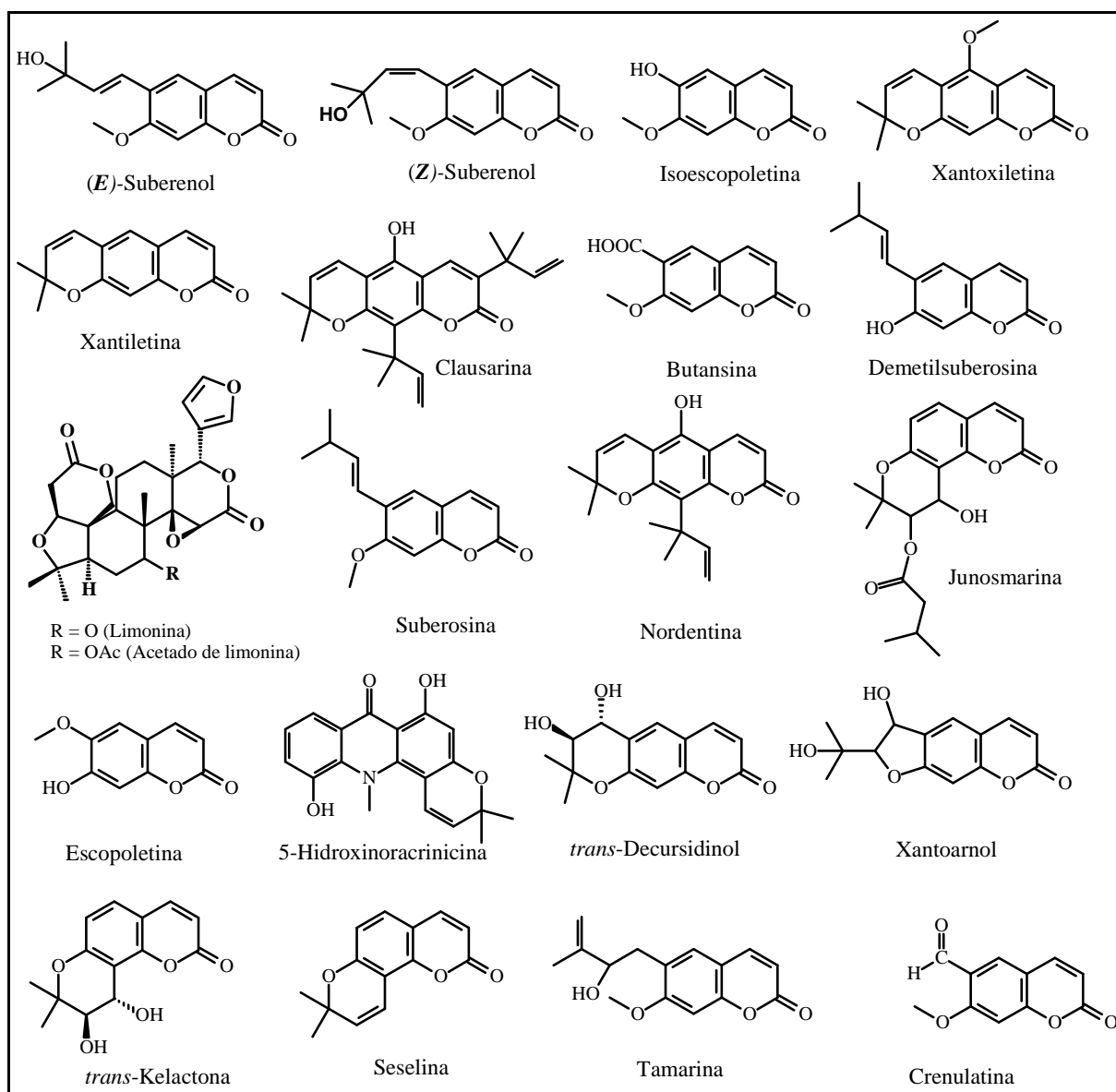


FIGURA 1.3 - Substâncias isoladas do porta-enxerto de *C. limonia* (limão cravo) pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar.

Poucos são os relatos na literatura do estudo fitoquímico de tangor ‘Murcott’ (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*), sendo descrito apenas o estudo dos componentes voláteis desta espécie (MIYAZAKI *et. al.*, 2012), (HAGENMEIER e SHAW, 2002), a investigação da composição química do flavedo, que corresponde a parte mais externa da casca do fruto (WANG *et. al.*, 2007) e a quantificação de alguns flavonoides polimetoxilados presentes no seu suco (LIN *et. al.*, 2012), como pode ser observado nas FIGURAS 1.4 e 1.5.

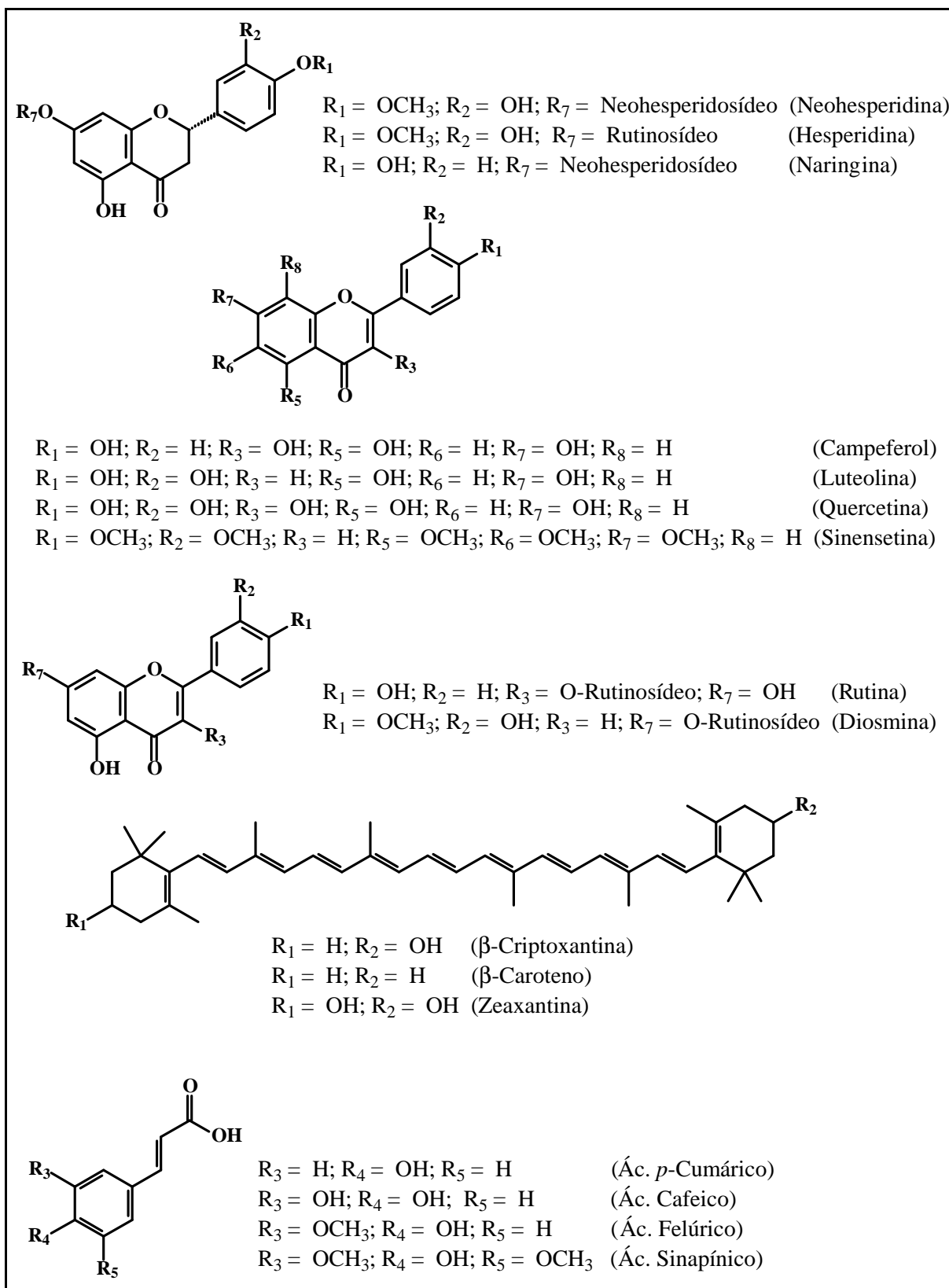


FIGURA 1.4 - Substâncias identificadas no flavedo de tangor ‘Murcott’ (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) (WANG et. al., 2007).

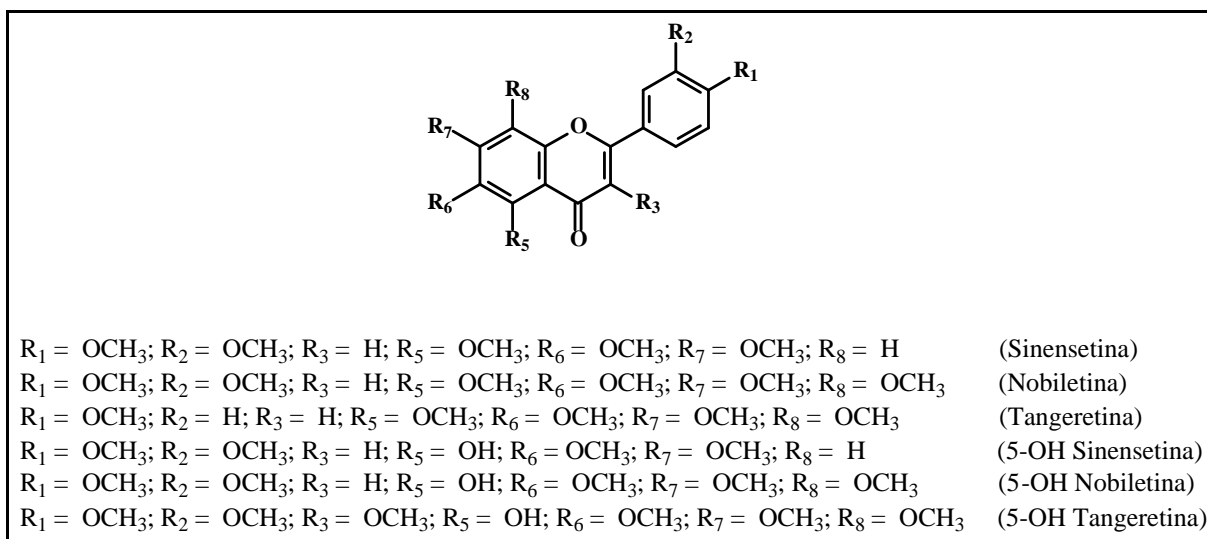


FIGURA 1.5 - Flavonoides identificados no suco de tanger 'Murcott' (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) (LIN et. al., 2012).

1.4. - Mecanismo de defesa em plantas.

Embora aparentemente indefesas frente ao ataque de agressores ou até mesmo em condições adversas, as plantas apresentam estratégias de defesa que permitem o retardamento ou até mesmo impedem a penetração de agentes fitopatogênicos, tais como, fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos. As plantas sintetizam uma grande variedade de compostos, já que não podem contar com a mobilidade física para escapar de seus predadores, e este arsenal de defesa é composto de resposta constitutiva, as quais já estão presentes nas plantas e a resposta induzida, a qual ocorre após o ataque do fitopatógenos ou o início do estresse abiótico (GOODMAN e WOOD 1986).

Em todos os habitats naturais, as plantas são cercadas por um enorme número de inimigos em potencial e expostas a vários tipos de estresse ambiental. A defesa das plantas pode ser dada através da produção de alguns compostos oriundos do seu metabolismo secundário. No entanto, existem vários outros modos de defesa que incluem a construção de barreiras poliméricas para a penetração do patógeno e a síntese de enzimas que degradam a parede celular do patógeno (HAMMOND e JONES, 2000). A ativação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de uma cascata de eventos e sinais que se iniciam no

reconhecimento pela planta do agente agressor com a expressão de genes específicos e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo (SCHALLER e RYAN, 1996).

Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser divididos em estruturais e bioquímicos, ambos pré ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro.

Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração ou colonização do patógeno. Estes mecanismos podem ser constitutivos (pré-formados) ou induzidos (pós-formados). O primeiro grupo refere-se a estruturas produzidas pela planta independente da ação de patógenos, tendo diversas funções na planta além da resistência. Neste grupo pode-se citar a presença de cutícula, forma e número de estômatos, vasos condutores de seiva, e etc. No segundo grupo estão os mecanismos de resistência cuja expressão é desencadeada após o início das atividades do patógeno na superfície do hospedeiro. Estes mecanismos podem ser a formação de halos, papilas, ou lignificação que são barreiras celulares.

Dentre os mecanismos estruturais constitutivos, a cutícula exerce uma resistência à saída de água da planta, funcionando como uma barreira eficiente contra a entrada da maioria dos patógenos que colonizam a superfície. A resistência à entrada de patógenos se dá pela complexidade dos polímeros de cutina, que os torna difíceis de serem degradados, sendo possível somente por microrganismos que apresentam como mecanismo de ataque, enzimas denominadas cutinases. Dependendo da espessura ou da densidade dessa camada cuticular, as plantas podem ser mais ou menos resistentes.

Dentre os mecanismos estruturais induzidos, tem-se a deposição de lignina que parece aumentar a resistência da parede celular, dificultando a penetração do invasor, já que é necessária expressão de enzimas específicas para degradar a lignina e continuar o avanço da colonização. Uma íntima relação entre lignificação e resistência fúngica foi demonstrado por ASCENSAO e

DUBERY (2003), onde através da utilização de elicitores induziram o aumento da lignificação em raízes de bananeira correlacionado com o aumento da resistência ao patógeno *Fusarium oxysporum* sp.

Os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sua sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, devendo estar presentes em concentração adequada nas partes invadidas e em forma acessível ao patógeno, de tal maneira que mudanças na concentração destas substâncias impliquem em mudanças na expressão da doença (STANGARLIN *et al.*, 2008). Estes mecanismos podem ser constitutivos (pré-formados) ou induzidos (pós-formados). O primeiro grupo refere-se às proteínas, enzimas e metabólitos secundários (fitoanticipinas) que já fazem parte dos constituintes químicos da planta e neste grupo pode-se citar quitinases e alguns inibidores proteicos. No segundo grupo estão as fitoalexinas, algumas proteínas estruturais e enzimas que são incorporadas à matriz celular na tentativa de confinamento do patógeno e neste grupo pode-se citar as proteínas relacionadas à patogênese (PRP), sendo as proteínas que se acumulam no tecido vegetal infectado, responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa (STINTIZI *et al.*, 1993).

Dentre os mecanismos estruturais constitutivos, destacam-se os inibidores de proteases, que são proteínas capazes de degradar proteínas animais e microbianas, mas não tem efeito sobre as enzimas vegetais. Já as Quitinases conseguem hidrolisar eficientemente a quitina, que é o principal componente do exoesqueleto de insetos e da parede celular de muitos fungos.

Dentre os mecanismos estruturais induzidos, a reação de hipersensibilidade (HR) é considerada um dos principais eventos de resposta defensiva da planta contra o ataque de patógenos, se caracterizando por ser uma resposta rápida e localizada, ocorrendo no sítio de infecção do patógeno. Dentre as principais características da resposta estão o rápido e localizado colapso do

tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, ocasionado pela liberação de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (AGRIOS, 2005). Embora essa reação tenha sido identificada há quase 100 anos, não está claro se a morte celular é uma causa direta da resistência ou conseqüência de mecanismos de sinalização que levariam aos eventos capazes de inibir a ação do patógeno.

Metabólitos secundários de defesa representam barreiras químicas ao ataque microbiano, apresentando baixo peso molecular e podendo ser divididos em fitoanticipinas (constitutivos) ou fitoalexinas (induzidos). Fitoanticipinas são compostos pré-existentes que aumentam em concentração após o contato com um micro-organismo, enquanto que as fitoalexinas são substâncias produzidas pela planta nas regiões invadidas e na sua vizinhança imediata, não sendo observáveis antes da infecção (VAN ETTEN et al, 1994.; GRAYER e HARBORNE, 1994). Estas definições são baseadas na dinâmica da síntese da molécula antimicrobiana, não na sua composição química, o que pode ser confusa uma vez que, por vezes, o mesmo composto químico pode ser fitoalexina em uma planta e fitoanticipina em outra e, além disso, a mesma molécula pode ser uma fitoalexina ou fitoanticipina em diferentes órgãos de uma mesma planta.

Estes compostos são produzidos como resposta a uma infecção bacteriana ou fúngica, ou outras formas de stress, ajudando a limitar a propagação de patógenos invasores por se acumularem em volta do local da infecção. É relatado na literatura que este é um mecanismo comum de resistência à patógenos em uma vasta gama de plantas (VAN ETTEN et al., 1994.; GRAYER e HARBORNE, 1994; BAILEY e MANSFIELD, 1982; DARVILL e ALBERSHEIM, 1984).

Uma forma da planta reduzir o gasto energético é sintetizar compostos de defesa somente após um dano inicial causado por um patógeno ou inseto. Esta estratégia pode ser arriscada, pois o ataque inicial pode ser muito

rápido ou muito grave para uma resposta de defesa efetiva. Além disso, alguns agentes patogênicos desenvolveram mecanismos para suprimir a resposta de defesa da planta hospedeira, fazendo com que a planta seja incapaz de perceber a entrada do patógeno.

1.5. - Mancha Marrom de Alternaria (MMA).

Nos pomares de tangerinas e seus híbridos, a mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata*, tem sido considerada a mais séria doença fúngica da atualidade. Sua severidade em regiões de clima úmido, onde o controle é muito difícil, tem ocasionado o abandono de plantios comerciais de variedades altamente suscetíveis (STUART et al., 2009).

Os sintomas da doença aparecem como manchas de coloração marrom, de tamanho variado, em folhas, ramos e frutos. Os sintomas podem aparecer até em 24 h após a infecção. Entretanto, as lesões usualmente continuam a expandir e grandes áreas da folha podem ser atingidas, como pode ser visto na FIGURA 1.6 (A), sendo que o tamanho das lesões depende da quantidade de inóculo, grau de suscetibilidade e idade dos órgãos vegetais (GARDNER et al., 1886; REIS et al., 2006).

Infecções severas resultam em intensa queda de folhas, frutos, seca e morte de ramos [FIGURA 1.6 (B)]. As lesões em frutos podem ocorrer de forma circular [FIGURA 1.6 (C)] e variam desde pequenas manchas necróticas de 2-3 mm até 10 mm de diâmetro. Em frutos que permanecem nas árvores, as lesões variam de pequenas a grandes, deprimidas de coloração negra, reduzindo seu valor no mercado de frutas frescas.

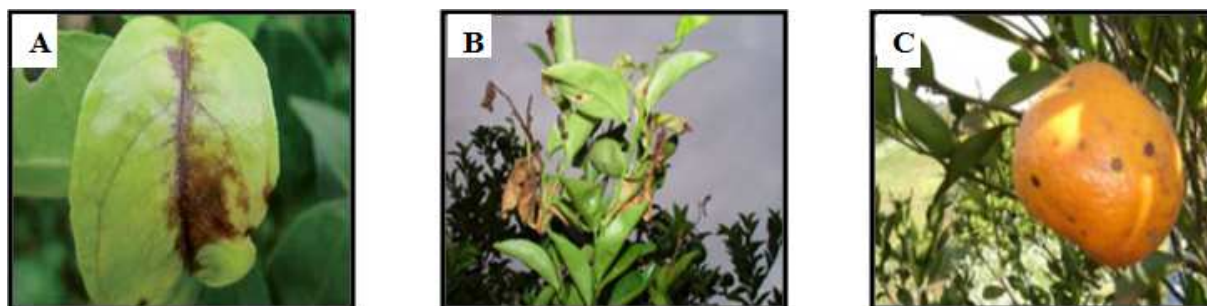


FIGURA 1.6 - Lesões características de mancha marrom de alternaria em tangor ‘Murcot’. (A) Lesões severas em folhas. (B) Lesões em ramos (C) Lesões em frutos. (BASTIANEL et al., 2005)

O primeiro relato da doença foi na Austrália, em 1903, afetando a tangerina Emperor (*Citrus reticulata*) (KIELY, 1964) e, posteriormente, na Flórida (EUA), em 1974, afetando a tangerina Dancy (WHITESIDE, 1976). Também foi relatado em Israel (SOLEIL, 1991), África do Sul (SWART et al., 1996), Espanha (VINCENT *et. al.*, 2000), Itália (BELLA et al., 2001) Cuba (HERRERA 1992), Colômbia (CASTRO-CAICEDO et al., 1994), Turquia (CANIHOS *et al.*, 1997), Peru (MARÍN et al., 2006) e Argentina (PERES *et. al.*, 2003). No Brasil a constatação da doença foi confirmada inicialmente em 2001, nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo afetando seriamente os pomares formados pela variedade de tangerina Ponkan, tangor ‘Murcott’ e tangerina Dancy (GOES et al, 2001.; PERES et al, 2003.; SPÓSITO et al., 2003). Em todos esses estados brasileiros a doença vem se constituindo em fator limitante à produção de tangerinas suscetíveis, principalmente em condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença.

A presença da doença vem inviabilizando a produção, principalmente de tangor ‘Murcott’ devido a sua elevada suscetibilidade, fazendo com que muitos citricultores erradiquem seus pomares. A suscetibilidade dessa variedade vem inviabilizando a produção e uma prova disso é a queda na produção de tangerinas no Brasil, em relação à outras frutas frescas. Em 2006, apresentava um volume aproximado de 1,3 milhão de toneladas e uma área próxima a 61 mil ha, decrescendo para pouco mais que 1,1

milhão de toneladas e 54 mil ha em 2008, redundando em perdas de 190,4 mil toneladas e quase 7 mil ha (IBGE, 2010).

Estudos de suscetibilidade e resistência de espécies e cultivares de tangerina à mancha marrom de alternaria têm sido realizados por vários pesquisadores (GARDNER et al., 1986; KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 2000). Algumas pesquisas relacionam a resistência de folhas, ramos e frutos ao patógeno, com o avanço da maturidade (PEGG, 1966; GARDNER et al., 1986; SOLEIL, 1991; REIS et al., 2006).

De acordo com WHITESIDE (1976), há uma relação entre idade e tamanho de frutos na suscetibilidade, como verificado em frutos de tangerina ‘Dancy’, os quais são mais suscetíveis até 4,0 cm de diâmetro. No entanto, esta suscetibilidade pode se estender até 6-7 cm de diâmetro em frutos de mandarina da variedade ‘Fortune’, como verificou VICENT *et al.* (2004). Frutos de tangerina ‘Dancy’, inoculados sob condições de casa de vegetação, mostraram suscetibilidade até 6 cm de diâmetro, e 4-5 cm em frutos de tangor ‘Murcott’ (REIS et al., 2006).

O mecanismo molecular envolvido na resistência ou suscetibilidade à doença ainda é obscuro. São espécies suscetíveis à mancha marrom de alternaria todos os híbridos diretos e indiretos da tangerina Dancy, como os tangores Ortanique e ‘Murcott’ (TIMMER *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2009). São consideradas espécies resistentes no campo a esta doença a tangerina Clementina (*Citrus clementina*), a tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*), a lima (*Citrus latifolia*), o limão (*Citrus limon*) e as laranjas doces (*Citrus sinensis*). No entanto, em inoculações artificiais de *A. alternata* alguns sintomas foram induzidos em laranjas Valencia e no limão ‘Volkameriano’ após a sua inoculação (SOLEIL e KIMCHI, 1997).

Tangerina Dancy é a parental da maior parte dos híbridos e tangelos que são suscetíveis à doença. Especula-se que a suscetibilidade seja herdada como uma característica dominante, ao passo que a resistência seja recessiva

(KOHMOTO et al., 1991), hipótese baseada em cruzamentos controlados. Entretanto, como existem diferentes níveis de resistência e suscetibilidade, sugere-se que outros genes possam estar envolvidos nessa interação. Dentro destes níveis de suscetibilidade, podemos destacar a laranja Pêra como apresentando alta resistência à doença e o tangor Murcott como uma das espécies mais susceptíveis.

Atualmente, em praticamente todas as regiões produtoras de tangerinas e seus híbridos, pesquisadores buscam formas mais adequadas e racionais no controle da mancha marrom de *Alternaria*. O uso de algumas práticas culturais pode contribuir para a redução da severidade da MMA, dentre elas destacam-se: evitar irrigação aérea; usar maiores espaçamentos entre as mudas, para que haja maior circulação de ar e, conseqüentemente, diminuindo a umidade relativa; podar as mudas com certa frequência, numa forma de eliminar a fonte de inoculo e evitar a adubação em excesso, principalmente quando se utiliza fertilizantes nitrogenados, de modo a não favorecer constantes brotações. Modificações nas práticas culturais ajudam a reduzir o impacto desta doença, mas o meio de controle mais utilizado é por aplicações de fungicidas; porém, a mancha marrom é uma doença de difícil controle, podendo ser necessárias de 7 a 10 aplicações, elevando o custo da produção.

Os fungicidas à base de cobre, iprodione[®], procimidone[®], mancozeb[®] e clorotalonil[®] têm sido eficientes no controle da doença (WHITESIDE, 1979; TIMMER e ZITKO, 1997; TIMMER et al., 2000). Entretanto, com o uso excessivo do fungicida iprodione[®] do grupo da dicarboximida, foi verificado resistência ao patógeno em Israel (SOLEIL et al., 1996). Normalmente as aplicações com fungicidas começam a partir de ¼ de brotações expandidas na primavera, e uma segunda ainda pode ser necessária antes da maturação dessas brotações. Após ¾ da queda de pétalas, aplicações são necessárias sempre com intervalo de 10-21 dias, até que os frutos tornem-se resistentes (SCHUTTE et al., 1992; SWART et al., 1996; TIMMER et al.,

2000). O modelo chamado de Alter-Rater tem auxiliado na decisão do melhor momento da aplicação de fungicida cúprico. Este modelo baseia-se na quantidade de chuva, duração da umidade foliar e temperatura média diária, além de levar em consideração o histórico da doença na área, fonte de inóculo e suscetibilidade da cultivar (TIMMER et al., 2000).

1.6. - O patógeno *Alternaria alternata*.

Na literatura existem relatos de quatro espécies de *Alternaria* causadoras de doenças em citros, sendo: *Alternaria* que causa a mancha marrom em tangerinas (*Citrus reticulata*) e em seus híbridos, *Alternaria* que causa a mancha em folha de limão ‘Rugoso’ (*Citrus jambhiri*) e limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia*), *Alternaria* que causa a podridão negra em vários cultivares de citros e a *Alternaria* que causa a mancha foliar em limão ‘Mexicano’ (*Citrus aurantifolia*) (PALM e CIVEROLO, 1994; AKIMITSU et al., 2003; TIMMER et al., 2003).

A distinção entre estes patógenos tem sido baseada em diferenças morfológicas e na especificidade da produção de toxina aos seus hospedeiros (KOHMOTO et al., 1979). O fungo produz uma toxina específica para cada hospedeiro, que é responsável pelas lesões necróticas, sendo que a mesma pode ser translocada no sistema vascular, produzindo clorose e necrose que se estendem ao longo das lesões, frequentemente resultando em queda de folhas, de frutos e seca de ponteiros.

O patótipo da tangerina lança as toxinas ACT-I e ACT-II que causam a necrose do tecido foliar em plantas suscetíveis. Estas toxinas matam as células vegetais para permitir a infecção e a colonização dos tecidos, uma vez que este micro-organismo é necrotrófico, consumindo matéria orgânica recentemente decomposta, possuindo papel fundamental na expressão dos sintomas (NISHIMURA e KOHMOTO, 1983; KOHMOTO et. al., 1991;

SOLEIL, 1991; PEEVER et. al., 2000). O modo de ação dessas toxinas ainda é desconhecido, mas a rápida perda de eletrólitos dos tecidos foliares e as mudanças estruturais das células tratadas com a toxina indicam que seu primeiro local de ação é a membrana plasmática (KOHMOTO et al., 1993).

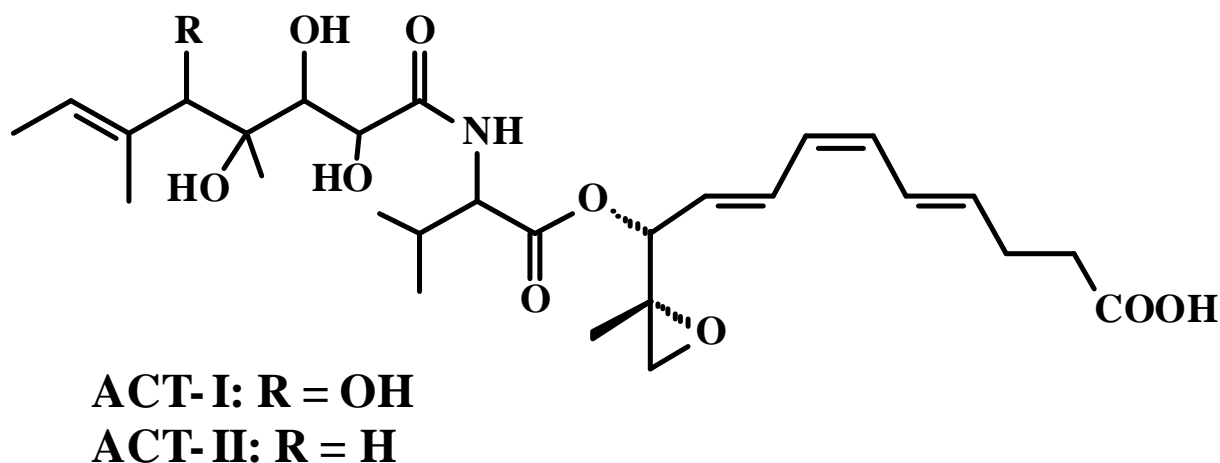


FIGURA 1.7 - Estrutura das toxinas ACT I e II.

O ciclo da mancha marrom de alternaria é relativamente simples (TIMMER et al., 2000; TIMMER et al., 2003). O fungo, causador da doença, se reproduz por meio de conídios, onde os mesmos são dispersos através do vento e depositados sobre material vegetal presente na árvore ou caído no solo. Os conídios germinam sobre o tecido suscetível, liberando uma toxina específica ao hospedeiro-tangerina (ACT I e II). A toxina difunde-se pela nervura central causando rápida necrose do tecido que entra em contato, sendo que o desenvolvimento do fungo ocorre sob a lesão. Os conídios são liberados através dos conidióforos, estruturas especializadas responsáveis por sua formação, depositando-se sobre a superfície dos frutos e folhas suscetíveis para que o ciclo da doença se inicie novamente, conforme apresentado na FIGURA 1.8. As condições ideais ocorrem com temperaturas em torno de 20-27°C, 10-12 horas de irrigação contínua (TIMMER et al., 2003). Os sintomas em ramos, frutos,

tecidos verdes imaturos ou em fase de crescimento, aparecem em média 24 horas após a infecção (KOHMOTO et al., 1993).

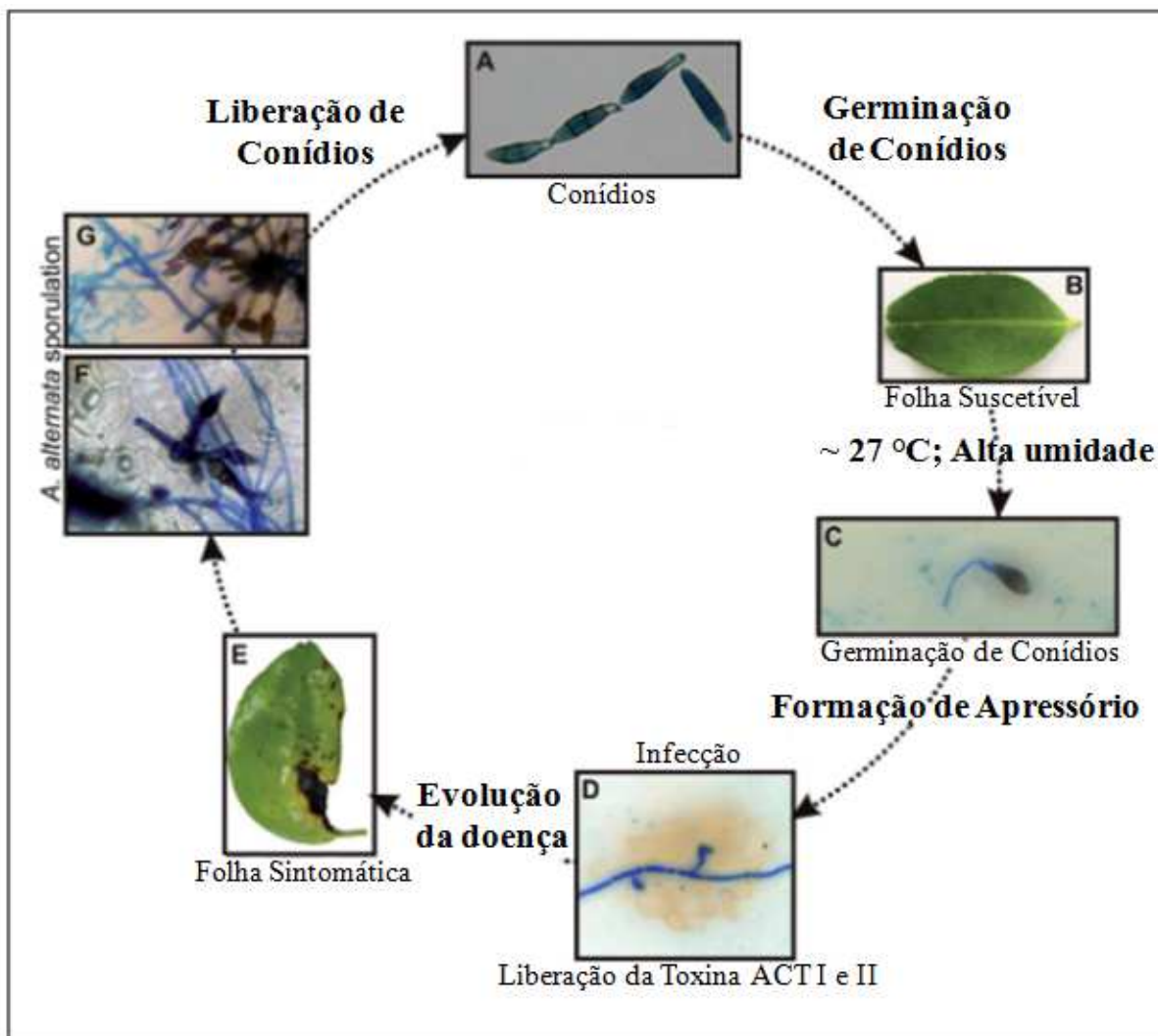


FIGURA 1.8 - Ciclo de *Alternaria alternata* em folhas de *Citrus* (STUART et al., 2009).

A forma como o fungo *Alternaria alternata* penetra na folha depende de cada hospedeiro. Poucos são os trabalhos na literatura relativos ao estudo histopatológico da interação *A. alternata*-tangor 'Murcott'. Estudos na Flórida relataram a penetração deste fungo apenas através dos estômatos na face adaxial, sem a formação de apressórios, resultados observados no trabalho de BHATIA, citado por AKIMITSU et al., (2003). Estudos em Israel mostraram a penetração apenas com a formação de apressórios em ambas as faces da folha (SOLEL e KIMCHI, 1997). É crescente o interesse na compreensão da interação

deste patógeno com importantes variedades de citros. No entanto, poucos são os trabalhos na literatura com esta abordagem.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a variação do perfil químico da laranja Pêra (*Citrus sinensis*) e tangor ‘Murcott’ (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*) após a inoculação do fungo *Alternaria alternata*, causador da Mancha Marrom de Alternaria (MMA), a qual é considerada a doença fúngica mais importante dos pomares de tangerinas do Brasil. Para a busca de uma possível resposta química, com o envolvimento de metabólitos secundários que apresentem potencial atividade fungida no mecanismo de defesa utilizado tanto pela espécie resistente à doença (laranja Pêra) quanto pela espécie suscetível (tangor ‘Murcott’) foram determinados, então, outros objetivos específicos:

- Estudo fitoquímico das folhas da laranja Pêra (*Citrus sinensis*) e tangor ‘Murcott’ (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*) e das raízes do porta-enxerto limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia*);
- Avaliação do efeito dos compostos isolados no estudo fitoquímico de espécies do gênero *Citrus* na inibição *in vitro* do desenvolvimento de *A. alternata*;
- Desenvolver metodologias para análises do perfil químico da laranja Pêra (*Citrus sinensis*) e tangor ‘Murcott’ (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*) após a inoculação do fungo *Alternaria alternata*.
- Identificar as substâncias do metabolismo secundário das plantas que estariam envolvidas no mecanismo de defesa das espécies de *Citrus* frente ao fungo *Alternaria alternata*.

- Analisar a variação da composição química dos voláteis em mudas de laranja Pêra (*Citrus sinensis*) e tangor 'Murcott' (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*) após inoculação do fungo *A. alternata*, via CG/EM.
- Estudar através de observações histopatológicas a penetração e colonização do fungo *Alternaria alternata*, utilizando como ferramenta a microscopia eletrônica de varredura.

3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos químicos foram realizados no laboratório de pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3.1 - Materiais e Métodos

3.1.1 - Materiais Cromatográficos

a) Suportes para cromatografia em coluna (CC):

- Sílica gel 60 (70-230 mesh e 230-400 mesh) da Merk
- Florisil da Merck
- Sephadex LH-20 da Amersham Pharmacia Biotech AB

Solventes utilizados no fracionamento e identificação dos compostos:

- Foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar.
- Solventes grau HPLC da J.T.Baker e Mallinckrodt.
- Água ultra-pura, obtida num sistema MILLI-Q, 18 Ohm (Milipore).
- Solventes deuterados da Merk e Aldrich.

Cromatografia em coluna:

Foram utilizadas colunas de vidro de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem cromatografadas.

Cromatografia em camada delgada analítica:

Utilizada para a monitoração dos fracionamentos efetuados. Para tanto, usaram-se folhas de alumínio (com sílica gel 60 F₂₅₄, $\phi = 0,2$ mm) da Merck. Os reveladores empregados foram: radiação UV (254 e 360 nm), reagente de Dragendorff e vanilina em ácido sulfúrico.

Cromatografia em camada delgada preparativa:

Foram utilizadas placas preparativas de sílica gel 60 (20 x 20 cm) com indicador UV₂₅₄.

b) Reagentes utilizados para obtenção de imagem por MALDI-IMS:

- Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)

- Ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)

3.2 - Equipamentos

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear:

- BRUKER DRX 9,8 T (400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C) – DQ/UFSCar;
- BRUKER Modelo AVANCE III 14,1 T (600 MHz para RMN ^1H e 150 MHz para RMN ^{13}C), equipado com sonda criogênica BFO – DQ/UFSCar;

Espectrômetros de Massas

- CG-EM: Shimadzu QP 5000 – DQ/UFSCar. Ionização por impacto eletrônico;
- APPLIED BIOSYSTEMS API-2000 Triplo quadrupolo – DQ/UFSCar. Ionização por Eletrospray;
- MALDI-TOF/TOF Ultraflexreme (Bruker Daltonics) – Pertence ao Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

Polarímetro

- PERKIN ELMER modelo 241 – UFSCar.

Câmara de análise de fluorescência por luz ultravioleta

- Cabine tipo SPECTROLINE modelo CM-10 com luz tipo SPECTROLINE modelo ENF-260C.

Balança analítica

- SARTORIUS modelo BP210S.

Câmara de Fluxo Laminar

- Veco VL modelo FS-12M.

Autoclave Vertical

- PHOENIX modelo AV 50.

Estufa Incubadora (B.O.D)

- FANEM modelo 347 CD.

Banho de Ultra-som

- BRANSON modelo 1510.

Microscópio Eletrônico de Varredura - Ambiental

- QUANTA 250 Modo ESEM (Pressão Ambiente) – Pertence ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCar

Centrífuga

- EPPENDORF modelo 5810R com sistema de refrigeração.

Homogeneizador

- Ultra-turrax IKA T 10 basic.

Evaporadores rotativos

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

Equipamentos de CLAE

- SHIMADZU LC-8A com válvula de reciclo;
- SHIMADZU SCL-10Avp com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, bomba Shimadzu LC-6AD.

Equipamento de CLMP

- GE AKTA – Armerstam Biosciences.

Equipamento de aplicação de matriz MALDI-TOF/TOF

- BRUKER – MALDI ImagePrep.

3.3 - Obtenção do material vegetal controle e com *A. alternata*

O material vegetal certificado foi obtido com o auxílio do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Cordeirópolis (IAC), material este adquirido no viveiro de plantas Mariplantas em Herculândia/SP. Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados com plantas de mesma idade (aproximadamente mudas de 6 meses) e que estiveram submetidas as mesmas condições, evitando assim resultados equivocados de quantificação e de variação do perfil químico devido a fatores como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica.



FIGURA 1.9 - Mudanças de Laranja pêra e Tangor “Murcott” utilizadas no experimento de inoculação de *Alternaria alternata*.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram estudadas as copas das variedades laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis*) e tangor ‘Murcott’ (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) e o porta-enxerto foi o limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia*) em ambas as espécies.

3.3.1 - Obtenção do fungo *Alternaria alternata*

Uma cepa do fungo *A. alternata* foi cedida pelo Dr. Marcos Machado do Centro de Citricultura APTA Citros “Sylvio Moreira”, Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, Estação de Cordeirópolis – SP. O isolado fornecido foi mantido em placas de Petri, conservadas em BOD no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, São Carlos, SP.

3.3.2 - Preparo das variedades de Citros estudadas

O preparo do material vegetal foi realizado com as plantas nas seguintes condições:

- **Condição 1:** laranja ‘Pêra’ e tangor ‘Murcott’ na ausência do fungo *A. alternata* (controle);
- **Condição 2:** laranja ‘Pêra’ e tangor ‘Murcott’ inoculada com o fungo *A. alternata*.

3.3.3 - Inoculação do fungo *Alternaria alternata*

A suspensão de esporos foi feita adicionando 5,0 mL de água destilada estéril sobre a superfície do fungo contido em placa de Petri e com o auxílio de uma Alça de Drigalski, previamente esterilizada com álcool 70%, os esporos da placa foram removidos. Essa solução foi filtrada com a assistência de um funil e gaze com a finalidade de reter fragmentos de micélio. A suspensão de esporos foi analisada em uma Câmara de Neubauer, encontrando-se a uma concentração de 1×10^5 esporos/mL. As inoculações foram feitas em mudas de citros consideradas tolerantes (laranja Pêra) e suscetíveis (tangor ‘Murcott’), com seis meses de idade, pulverizando-se a suspensão de esporos na face adaxial das folhas, com atomizador manual e a pulverização foi feita até que gotas fossem formadas e começassem a escorrer pelas extremidades das folhas.

A fim de garantir a manifestação da doença Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), as mudas foram envolvidas por sacos plásticos com a finalidade de aumentar a umidade, sendo que este procedimento também foi

adotado para as mudas separadas como controle (mudas que não foram inoculadas com *A. alternata*) para homogeneidade no tratamento das mudas. Após 48 h de inoculação era possível observar pontos necróticos nas folhas da variedade suscetível, característicos da doença, então, separadamente, as mudas foram divididas em raízes, caule inferior (cavalo), caule superior e folhas e conservadas em freezer à -80 °C até que as análises químicas pudessem ser feitas.

3.3.4 - Avaliação da população fúngica nos citros após a inoculação de *A. alternata*.

Após 48 horas de inoculação avaliou-se a presença de *A. alternata*, removendo as folhas, especificamente no local da lesão, das plantas inoculadas extraindo-se o DNA genômico total (planta + fungo) conforme MURRAY e 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 do micro-organismo. A revelação da PCR deu-se em gel de agarose realizado num sistema de eletroforese horizontal horizon com fonte modelo 200, da Gibco BRL Life Technologies, USA. A amplificação do DNA por PCR para a confirmação da identidade do isolado de *A. alternata* foi realizada em reações de 25µL contendo Taq Buffer [tampão de amplificação (1X)], 200µM de dNTP MIX (misturas de nucleotídeos), 0,02mM de MgCl₂, 50µM dos iniciadores citados na TABELA 3.1 1,25u Taq DNA polimerase (enzima) e 2µL de DNA (aproximadamente 200-250 ng). A amplificação por PCR foi realizada em termociclador inicializada com desnaturação a 95°C por cinco minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. A extensão final foi realizada a 72 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de

etídio (0,5 µg/mL de gel) à 80 V/cm. O peso molecular foi comparado ao padrão 1 Kb, e o gel foi fotografado após a corrida com foto-documentador.

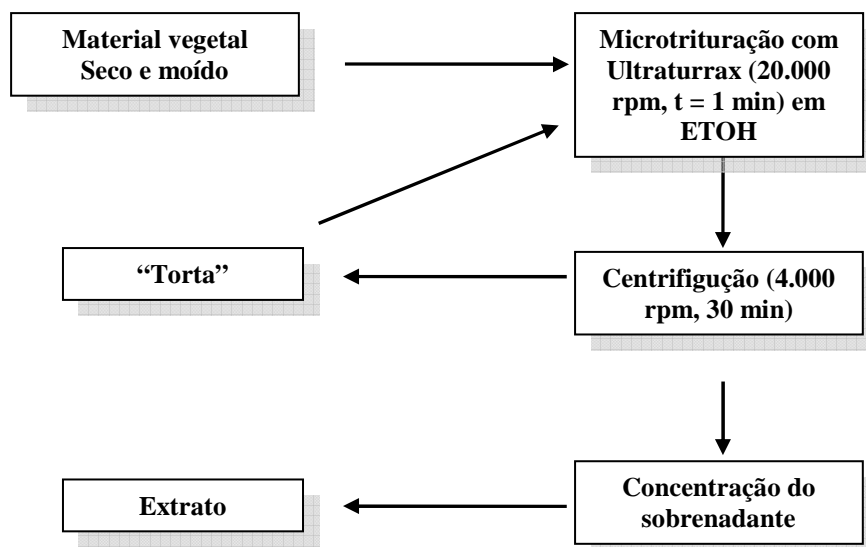
A identificação do micro-organismo foi realizada com o auxílio do mestrandos do laboratório do Departamento de Química da UFSCar Evandro Luis Prieto, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a coordenação da Prof. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza.

TABELA 3.1 - Iniciadores utilizados na reação de PCR para a identificação da espécie.

Forward Primer	
LinF	5'-TATCGCCTGGCCACCTACGC-3'
Reverse Primer	
LinR	5'-TGGCCACGACAACCCACATA-3'

3.4 - Estudo fitoquímico dos extratos vegetais.

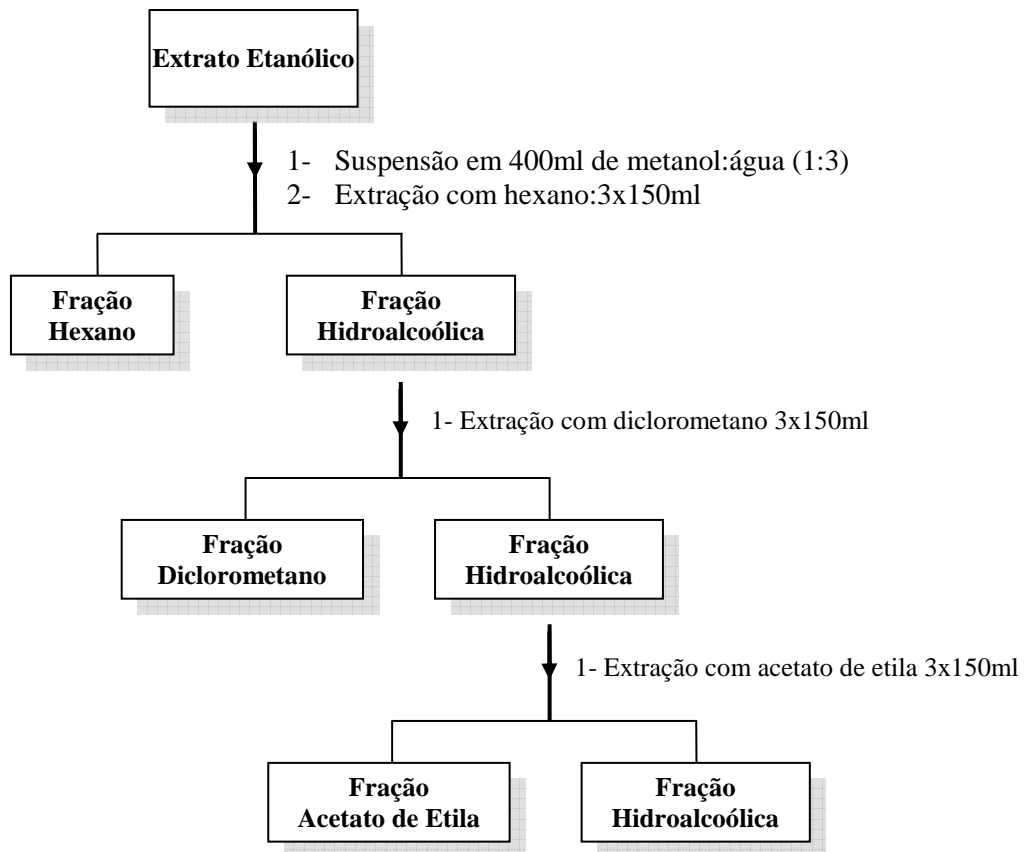
As folhas e raízes dos Citros escolhidos para o estudo foram secas, separadamente, em estufa de ar a 45° C e pulverizadas em moinho do tipo Willey. A extração do material moído foi feita à frio e com etanol, utilizando-se o ultraturrax a 2000 rpm por 1 min para a extração dos metabólitos, com posterior centrifugação a 4000 rpm por 15 min. Repetiu-se o procedimento de extração por mais duas vezes obtendo-se os extratos conforme representado no FLUXOGRAMA 3.1. As soluções resultantes foram concentradas à vácuo em evaporador rotativo e a completa secagem do material vegetal foi obtida através do seu armazenamento em vidros parcialmente tampados, para permitir a evaporação do solvente, à temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases. Vale ressaltar que para o estudo fitoquímico não houve diferença química entre os metabólitos isolados dos extratos inoculados com o fungo *A. alternata* (com sintoma) e o controle, portanto, estes extratos não serão diferenciados neste tópico.



FLUXOGRAMA 3.1 – Obtenção dos extratos etanólicos de *Citrus*.

3.4.1 - Fracionamento do extrato etanólico das folhas de Tangor Murcott e Laranja Pêra e das raízes de Limão Cravo.

Inicialmente o extrato etanólico das diferentes partes de todas as espécies estudadas foram fracionados, separadamente, através de uma partição líquido-líquido (FLUXOGRAMA 3.2). As frações obtidas e suas respectivas massas estão representadas na TABELA 3.2.



FLUXOGRAMA 3.2 – Metodologia utilizada na partição do extrato etanólico.

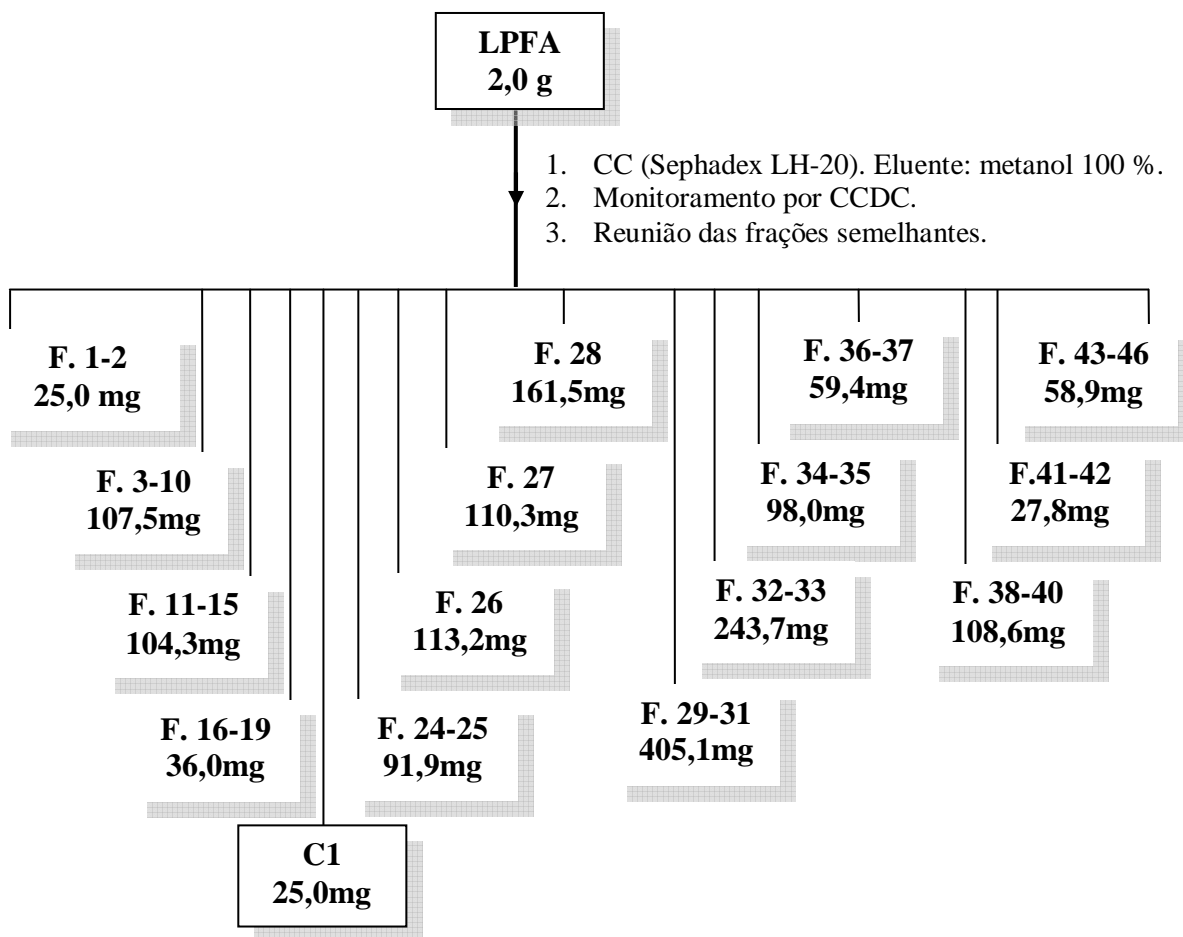
TABELA 3.2 - Massas das partições dos extratos etanólicos.

Espécie	Parte Vegetal	Massa dos Extratos	Código	Massa das Partições	Código
<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>	Folhas	65,0 g	TMFE	Hexânico = 3,7 g	TMFH
				Diclorometânico = 25,4 g	TMFD
				Acetato de etila = 10,3 g	TMFA
				Hidroalcoólico = 10,8 g	TMHid
<i>Citrus sinensis</i>	Folhas	58,5 g	LPFE	Hexânico = 4,9 g	LPFH
				Diclorometânico = 25,4 g	LPFD
				Acetato de etila = 2,3 g	LPFA
				Hidroalcoólico = 13,2 g	LPHid
<i>Citrus limonia</i>	Raiz	30,0 g	LCRE	Hexânico = 0,7 g	LCFH
				Diclorometânico = 12,6 g	LCFD
				Acetato de etila = 1,3 g	LCFA
				Hidroalcoólico = 4,2 g	LCHid

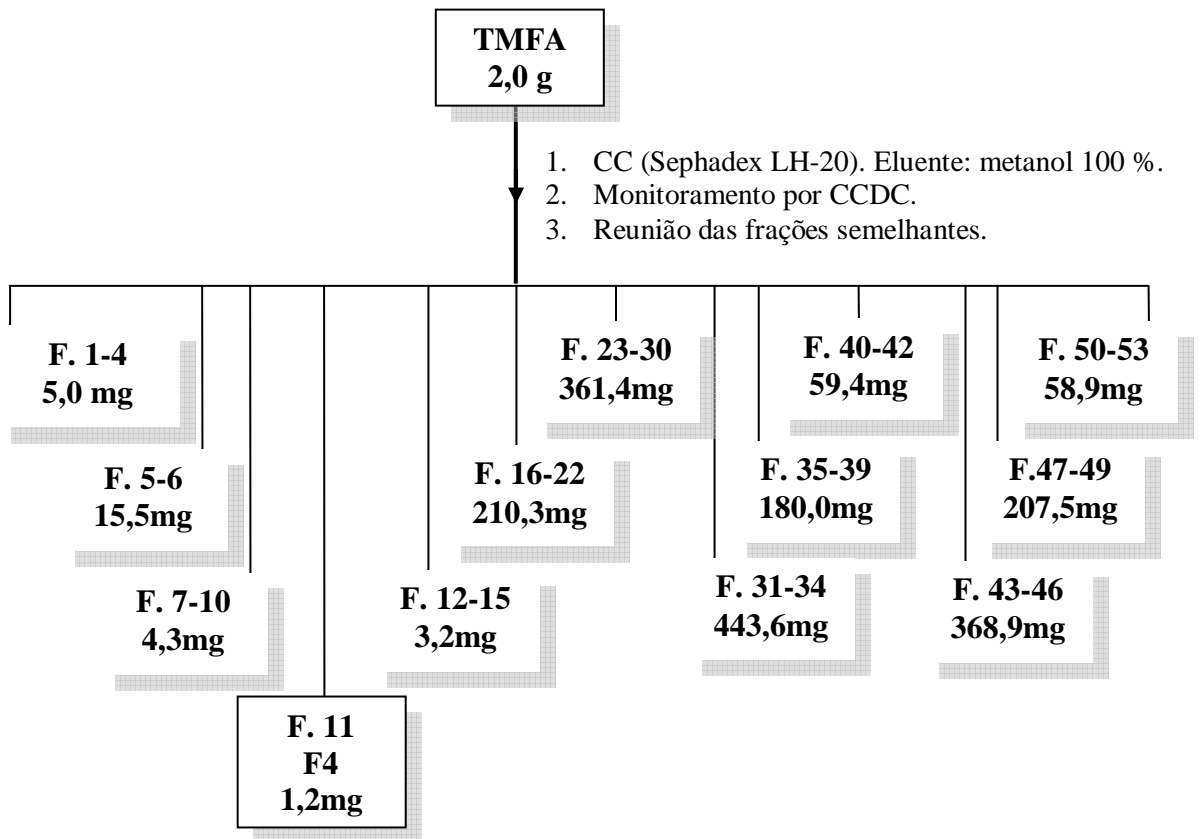
TM = Tangor murcott; LP = Laranja pêra; LC = Limão cravo; F = folhas; R = raiz; H = hexano; D = diclorometano; A = acetato de etila; Hid = Hidroalcoólico.

3.4.2 - Fracionamento da partição acetato de etila das folhas de Laranja Pêra (LPFA) e Tangor Murcott (TMFA).

Inicialmente, aproximadamente 2,0 g da partição acetato de etila das folhas de Tangor murcott (TMFE) e Laranja pêra (LPFE), separadamente, foram submetidas à cromatografia por exclusão em coluna Sephadex LH-20, eluída com metanol 100 %. Os grupos de frações foram obtidos após reunião das frações semelhantes por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). Este procedimento resultou no isolamento do composto **F4** de TMFA e de **C1** de LPFA. Os FLUXOGRAMA 3.3 e FLUXOGRAMA 3.4 resumem o fracionamento cromatográfico dos extratos LPFA e TMFA, respectivamente.



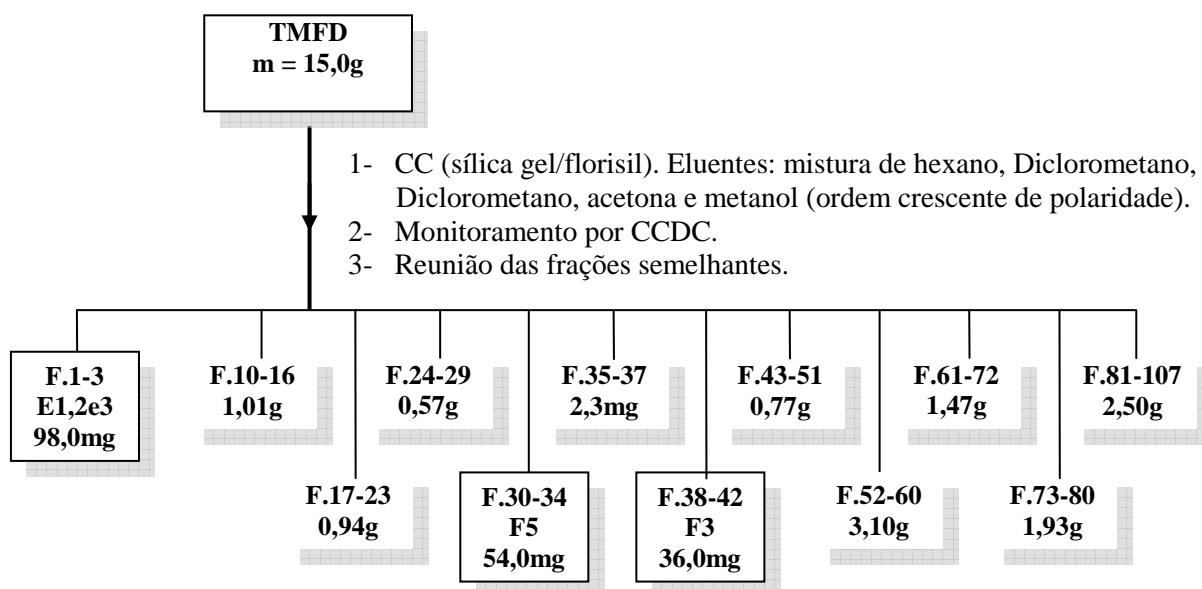
FLUXOGRAMA 3.3 – Metodologia utilizada no fracionamento da partição acetado de etila das folhas de Laranja Pêra.



FLUXOGRAMA 3.4 – Metodologia utilizada no fracionamento da partição acetato de etila das folhas de Tangor “Murcott”.

3.4.3 - Fracionamento da partição diclorometano das folhas de Tangor “Murcott” (TMFD).

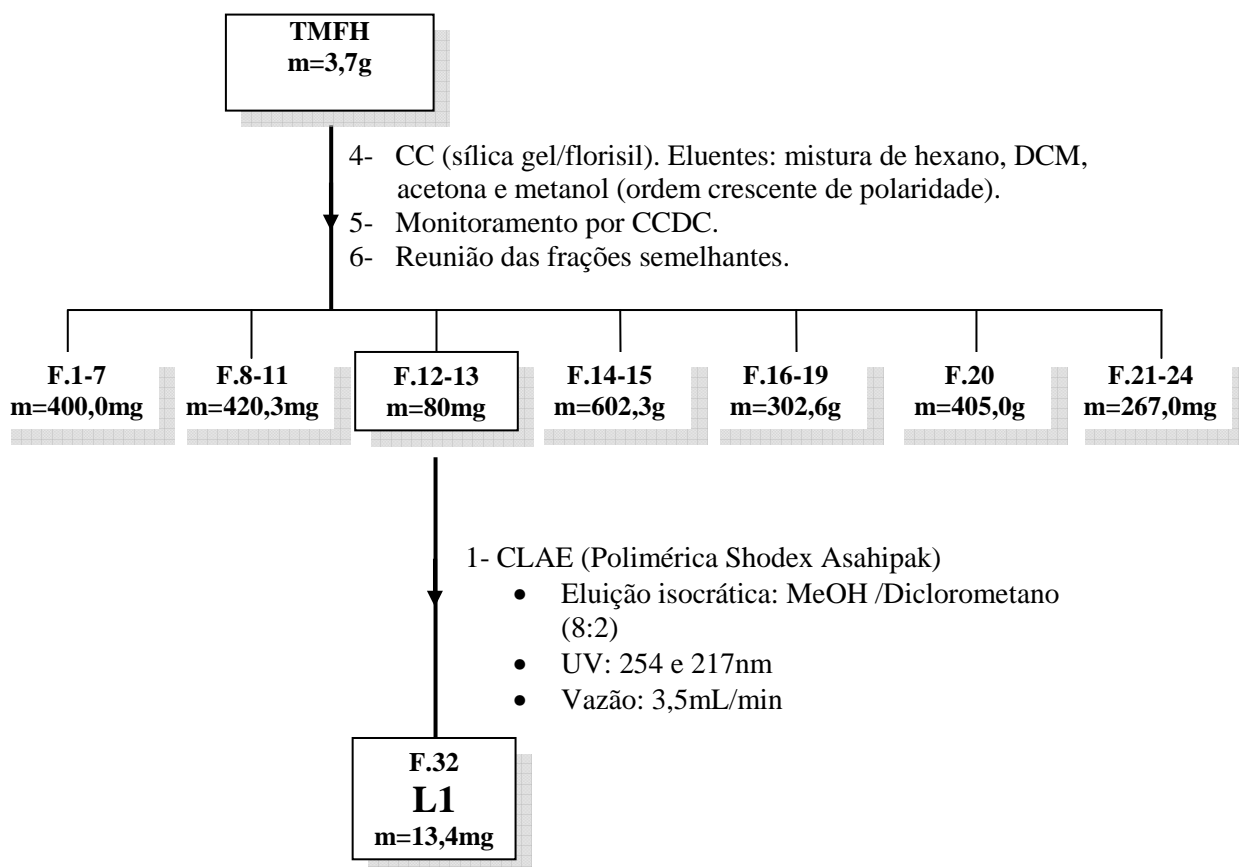
O estudo da fração diclorometano das folhas de Tangor murcott permitiu o isolamento da mistura das substâncias **E1**, **E2** e **E3** e das substâncias **F3** e **F5**. Foi utilizada a cromatografia em coluna, tendo-se como fase estacionária sílica gel 230-400 mesh e uma pequena camada de florisil em coluna de vidro ($\phi \times h = 5,0 \times 60,0$ cm), utilizando eluição gradiente com os seguintes solventes: hexano/diclorometano/acetona/metanol. Após reunião das frações semelhantes 12 grupos de frações foram obtidos. O FLUXOGRAMA 3.5 mostra resumidamente como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.5 - Fracionamento da partição TMFD.

3.4.4 - Estudo químico da partição TMFH.

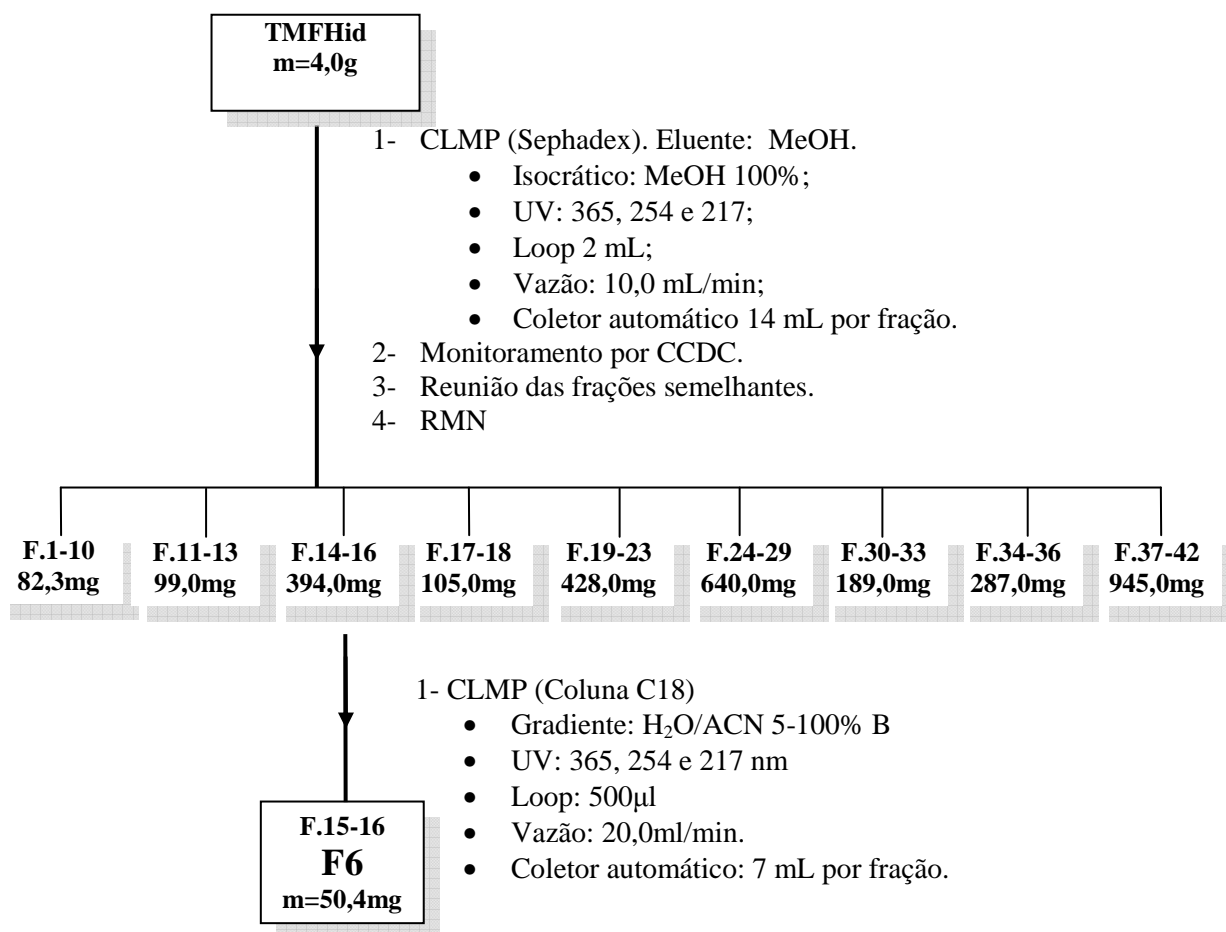
O estudo da fração hexânica das folhas de Tangor “Murcott” permitiu o isolamento da substância L1. Primeiramente o extrato TMFH foi submetido a cromatografia em coluna de sílica 230-400 mesh e uma pequena camada de florisil, utilizando coluna de vidro ($\phi \times h = 5,0 \times 60,0$ cm) com eluição gradiente dos seguintes solventes: hexano/ diclorometano/ acetona/ metanol, obtendo-se 7 grupos de frações após reunião das frações semelhantes. A fração (F. 12-13) foi recromatografada por CLAE tendo como fase estacionária a coluna Polimérica Shodex Asahipak ($\phi \times h = 2,5 \times 40,0$ cm; $10\mu\text{m}$), Para a obtenção de 13,4 mg da substância L1 e, foram necessárias diversas injeções em um loop de $500 \mu\text{L}$ as condições cromatográficas utilizadas encontram-se resumidamente no FLUXOGRAMA 3.6.



FLUXOGRAMA 3.6 - Fracionamento do extrato TMFH.

3.4.5 - Estudo químico da partição TMFHid.

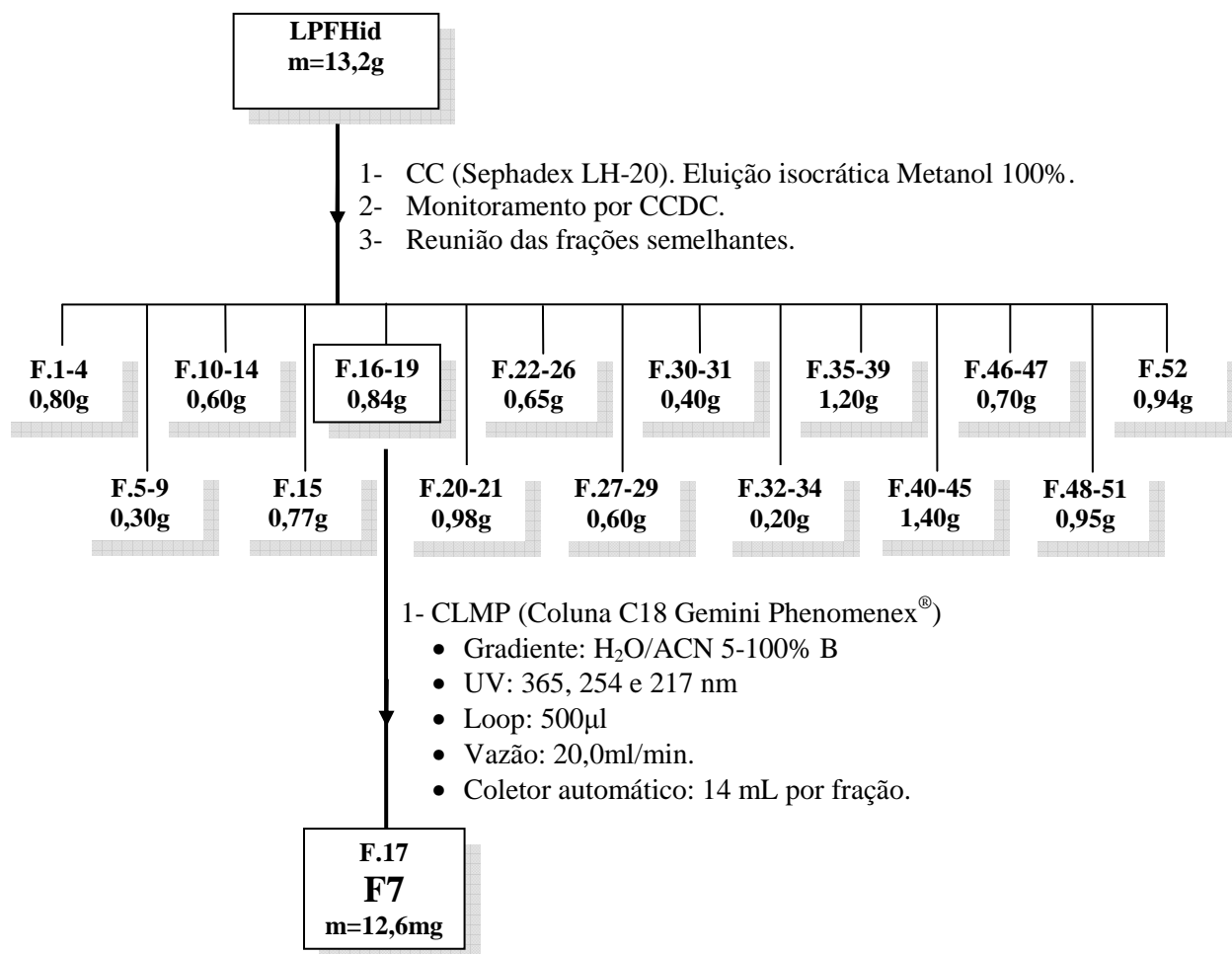
O estudo da partição hidroalcoólica das folhas de Tangor ‘Murcott’ permitiu o isolamento da substância **F6**. O extrato EPFHid foi submetido a cromatografia líquida de média pressão (CLMP) por exclusão em coluna de vidro ($\phi \times h = 4,0 \times 70,0$ cm), tendo como fase estacionária Sephadex LH-20. Com a reunião das frações semelhantes, foram obtidas 9 frações e o refraçãoamento da fração F.14-16 permitiu o isolamento da substância **F6**, através de CLMP utilizando coluna preparativa C-18 Gemini Phenomenex[®] ($\phi \times h = 2,1 \times 25,0$ cm; 10 μ m) como fase estacionária, com as condições cromatográficas relatadas no FLUXOGRAMA 3.7.



FLUXOGRAMA 3.7 - Fracionamento da partição TMFHid.

3.4.6 - Estudo químico da partição LPFHid.

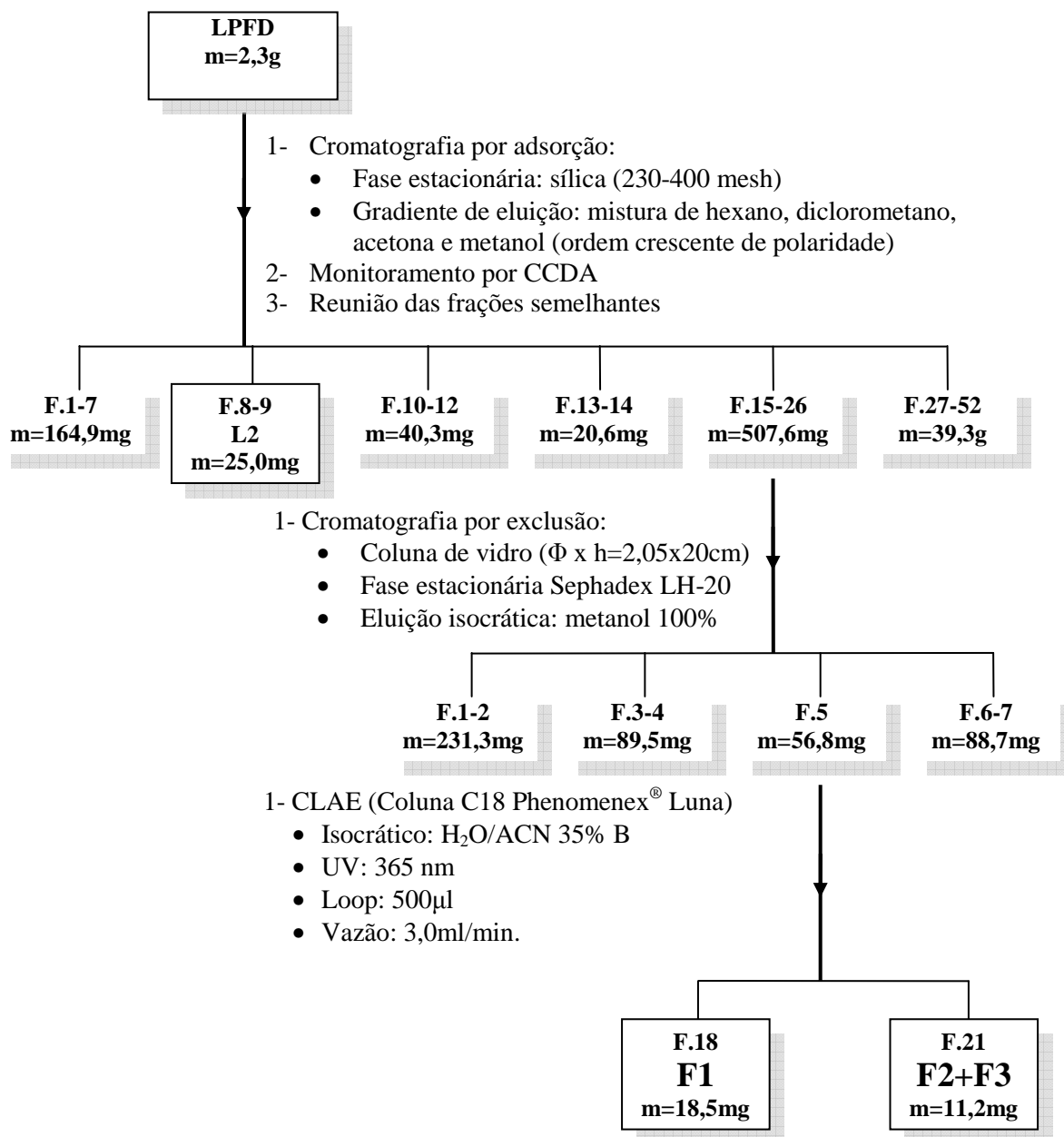
O estudo da partição hidroalcoólica das folhas de Laranja pêra permitiu o isolamento da substância **F7**. O extrato EPFHid foi submetido a cromatografia por exclusão em coluna de vidro ($\phi \times h = 4,0 \times 70,0$ cm), tendo como fase estacionária Sephadex LH-20. Com a reunião das frações semelhantes, foram obtidas 7 frações e o refracionamento da fração (F.16-19) permitiu o isolamento da substância **F7**, através de CLMP utilizando coluna preparativa C-18 Gemini Phenomenex[®] ($\phi \times h = 2,1 \times 25,0$ cm; 10 μ m) como fase estacionária, com as condições cromatográficas relatadas no FLUXOGRAMA 3.8.



FLUXOGRAMA 3.8 - Fracionamento da partição LPFHid.

3.4.7 - Estudo químico da partição LPFD

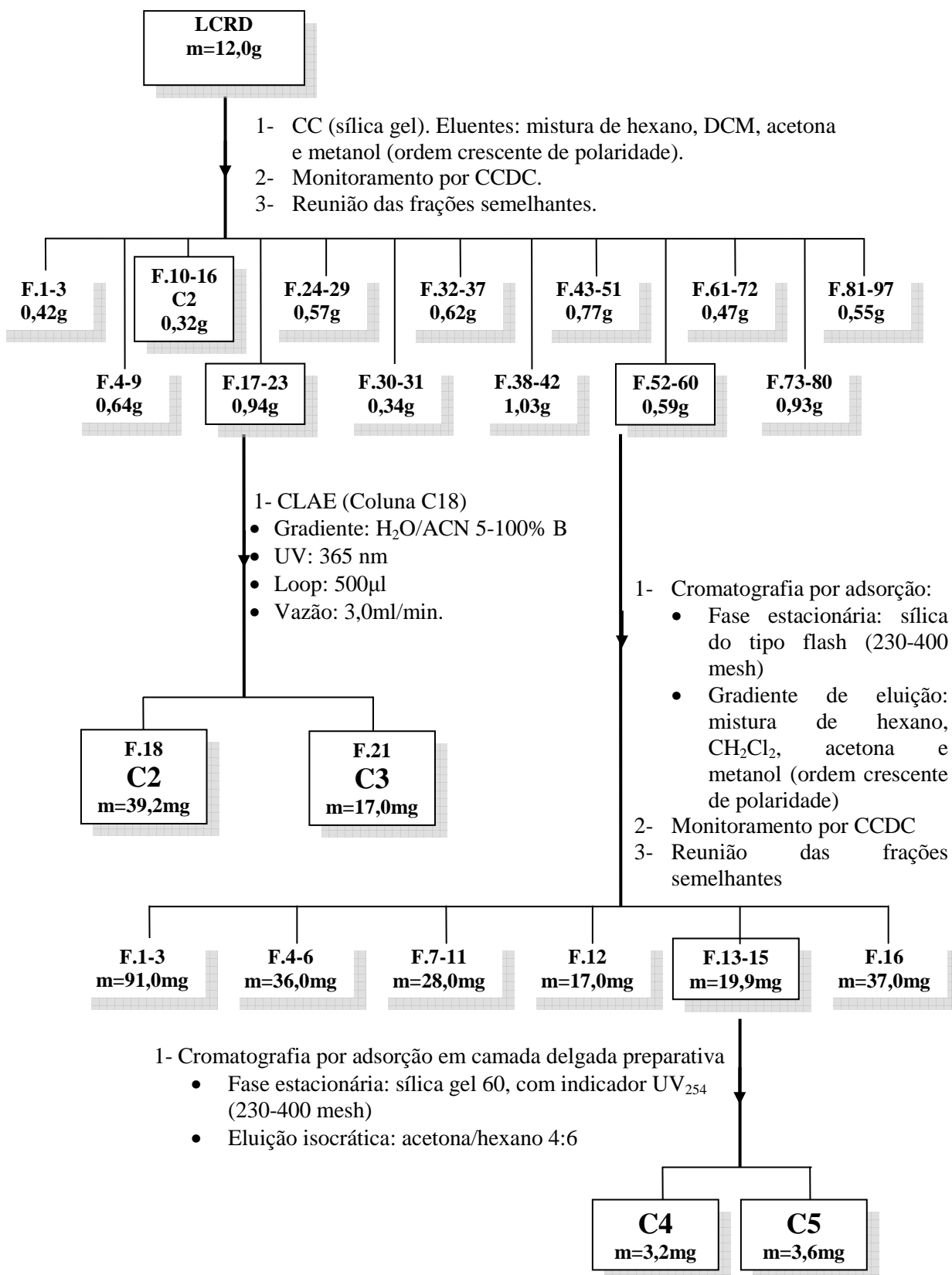
A fração LPFD foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro ($\phi \times h = 5,0 \times 60,0$ cm), tendo como fase estacionária sílica (230-400 mesh) com gradiente de eluição hexano/ diclorometano/ acetona/ metanol. Após a reunião das frações semelhantes, a subfração (F. 8-9) continha a substância **L2** pura e a subfração (F. 15-26) foi posteriormente refracionada. Este refracionamento foi feito através de cromatografia em coluna, utilizando como fase móvel Sephadex LH-20 em coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \times 25,0$ cm), fornecendo a subfração 5 que foi recromatografada por CLAE em coluna C18 Phenomenex Luna ($\phi \times h = 1,0 \times 29,0$ cm; 10 μ m) e com a utilização de reciclo, permitindo a obtenção das substâncias **F1** e da mistura **F2 + F3**, com as condições cromatográficas apresentadas no FLUXOGRAMA 3.9.



FLUXOGRAMA 3.9 – Fracionamento da partição LPFD.

3.4.8 - Estudo químico da partição LCRD

O estudo da fração diclorometano das raízes do Limão cravo (*C. limonia*) permitiu o isolamento das substâncias **C2**, **C3**, **C4**, e **C5**. Primeiramente o extrato LCRD foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel (230-400 mesh), utilizando coluna de vidro ($\phi \times h = 5,0 \times 60,0$ cm), com gradiente hexano/diclorometano/acetona/metanol e com o auxílio de CCDA 13 grupos de frações foram obtidos, após reunião das frações semelhantes. A fração (F. 10-16) continha 0,32 g da substância **C2** pura, composto majoritário neste extrato. As frações (F. 17-23) e (F. 52-60) foram recromatografadas. A fração (F. 17-23) foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna C18 Phenomenex Luna ($\phi \times h = 1,0 \times 29,0$ cm; $10\mu\text{m}$), e com a utilização de reciclo permitiu a separação das substâncias **C2** e **C3**. A fração (F. 52-60) foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \times 25,0$ cm), tendo como fase estacionária sílica gel (230-400 mesh) com gradiente de eluição hexano/diclorometano/acetona/metanol. A análise da subfração F. 13-15, através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), mostrou a presença de duas manchas bem separadas na placa analítica que absorvem intensamente a luz ultravioleta com comprimento de onda 254 nm então, optou-se pela sua separação através de cromatografia por adsorção em camada delgada preparativa (CCDP) em placa de vidro ($h \times h = 25,0 \times 25,0$ cm) com eluição isocrática em acetona/hexano 4:6. O FLUXOGRAMA 3.10 mostra resumidamente como este estudo foi realizado.



FLUXOGRAMA 3.10 – Fracionamento da partição LCRD.

3.5 - Metodologia dos ensaios de inibição ao desenvolvimento de *A. alternata*.

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, sob orientação do Dr. Leonardo Toffano.

3.5.1 - Ensaio de inibição *in vitro* frente ao crescimento micelial.

Para este teste foram pesados 2,43 gramas de meio BDA sólido com posterior adição e homogeneização em 100 mL de água destilada para posterior autoclavagem a 120°C (1 atm) por 20 minutos. Após este período esperou-se o meio líquido atingir uma temperatura próxima de 60°C e foram adicionadas 10 mg de cada substância, previamente dissolvida em 250 µl de DMSO, obtendo assim uma concentração final de 100 µg/mL (substância pura/solução). Após a completa homogeneização, o meio de cultura juntamente com a substância incorporada foi vertido em placas de Petri ($\varphi = 9$ cm), sendo este procedimento realizado em capela de fluxo laminar para evitar qualquer tipo de contaminação das placas.

Após a solidificação do meio de cultura nas placas de petri, foram adicionados discos de micélio ($\varphi = 0,5$ cm) no centro de cada placa. Estas foram então fechadas e identificadas e mantidas em BOD (25°C, fotoperíodo de 12 horas). Foi realizado o experimento em quintuplicada para cada substância, inclusive para o controle positivo (Cercobin 700 WP) e controle negativo (DMSO).

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada 2 dias, onde se baseou no centro de aplicação do inóculo como referencial. Dessa forma, realizaram-se a medidas radiais em centímetros, e subtraiu em cada medida o diâmetro do inóculo aplicado inicialmente, de acordo com a FIGURA 3.1.

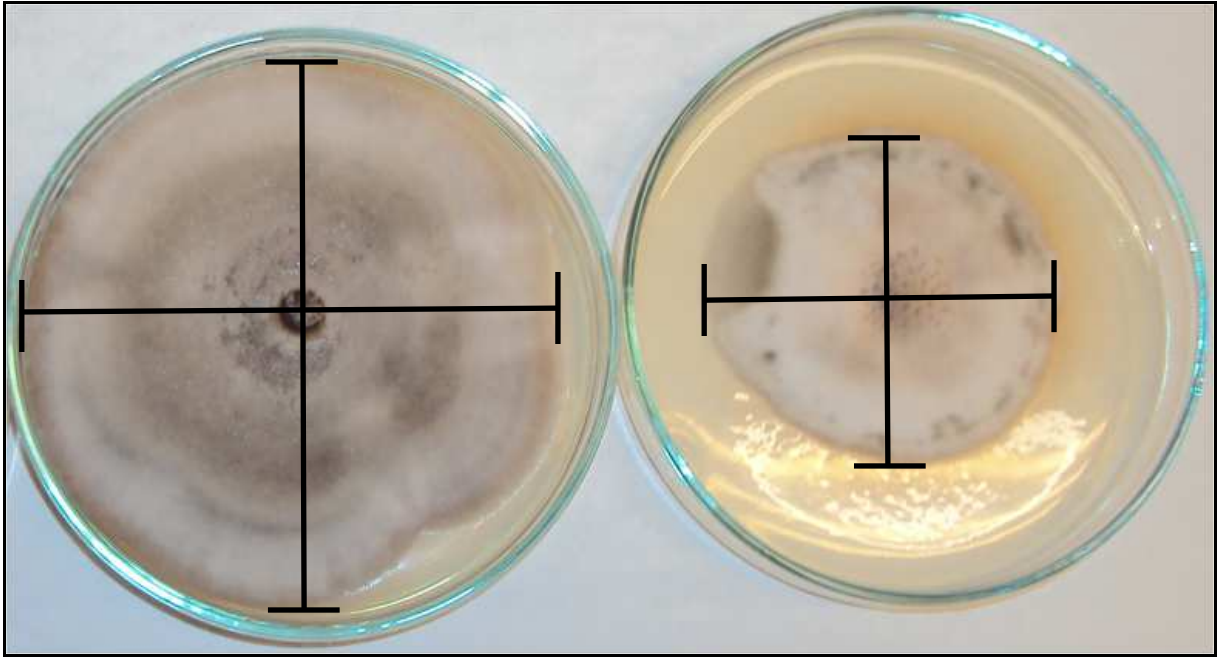


FIGURA 3.1 - Metodologia utilizada na medida do crescimento micelial do fungo *A. alternata*.

3.5.2 - Ensaio de inibição *in vitro* frente à germinação de esporo e formação de apressórios.

Para a obtenção da suspensão de esporo utilizou-se um cultivo de *A. alternata* em meio de carbonato de cálcio. A metodologia para a obtenção da suspensão de esporo está descrita no ITEM 3.3.3. Para os ensaios foram utilizadas placas de Poliestireno ($\phi = 9$ cm). Foi utilizado 1 mg de cada substância pura, a qual foi solubilizada em 500 μ L de DMSO. Ao atingir a total solubilização, foi acrescentada a essa solução água destilada estéril, obtendo assim uma concentração final de 100 μ g/mL (substância pura/água). Depois da completa homogeneização, foram colocadas nas placas gotas de 40 μ L de cada solução das substâncias e 40 μ L suspensão de esporo na concentração de 10^5 esporos/mL, totalizando por placa quatro repetições. Como testemunha foi preparada uma solução de 10 mL de água destilada estéril com 500 μ L de DMSO como controle negativo e para o controle positivo foi utilizado o fungicida comercial Cercobin 700 WP. As placas foram vedadas com filme PVC com a finalidade de manter a umidade e conservada em BOD sob fotoperíodo de

12 horas a 25°C por 24 horas de experimento. Após esse período a porcentagem da germinação e formação de apressório foi avaliada através da observação em microscópio óptico (aumento de 100 vezes). Foram considerados como germinados os esporos com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao crescimento dos esporos não germinados.

3.6 - Análise dos componentes voláteis de mudas de Citros

O experimento consistiu na análise dos óleos essenciais e dos constituintes voláteis de mudas de Citros com e sem a inoculação do fungo *A. alternata*, para verificar se haveria uma resposta química destas mudas frente a este patógeno. Foram avaliados os voláteis de uma espécie considerada tolerante ao patógeno (laranja ‘Pêra’) e outra espécie considerada suscetível (tangor ‘Murcott’), obtidos pelas técnicas de HS-SPME e Hidrodestilação, utilizando mudas sadias (controle) e infectadas com *A. alternata*. Realizou-se o experimento em triplicata, para maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

3.6.1 - Análise dos componentes voláteis de mudas de Citros pela técnica de Headspace - SPME

Para a realização da extração dos voláteis foi necessário, inicialmente, determinar a condição ideal de análise, como a fibra ideal para a extração dos voláteis (ITEM 3.6.1.2) e o tempo ideal de exposição da mesma (ITEM 3.6.1.3). Os parâmetros otimizados no Cromatógrafo à Gas acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) estão apresentados no ITEM 3.6.1.1 e para a posterior identificação dos compostos, mostrou-se necessária a injeção de hidrocarbonetos conhecidos, apresentado no ITEM 3.6.1.4.

3.6.1.1 - Determinação dos parâmetros do CG – EM para análise dos voláteis obtidos por HS – SPME

Os analitos foram separados em uma coluna capilar PDMS/DVB (30 m x 0,25 mm). A temperatura da interface foi de 280 °C e foi utilizado hélio (99,999%) como gás de arraste, com fluxo constante de 1,7 mL/min. O programa de temperatura para aquecimento do forno foi temperatura inicial de 40°C, durante 5 min, programado para 70 °C em uma razão de 4 °C/min e de 70 a 260 °C na razão de 10 °C/min, mantendo a temperatura de 260 °C por 10 min. A tensão da eletromultiplicadora empregada no modo “full scan” foi de 1,60 kV. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas entre os intervalos de 40 a 540 Da.

3.6.1.2 - Determinação da Fibra Ideal

Foram testados dois tipos de fibra: fibra preta (CAR/PDMS – Carboxen/Polidimetilsiloxano 75 µm) e fibra azul (PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno 65 µm). Condicionou-as antes de iniciar o experimento em um cromatógrafo a gás utilizando condições específicas catalogadas para cada fibra (TABELA 3.3).

TABELA 3.3 - Massas das partições dos extratos etanólicos.

Fibra*	T. Injetor (°C)	T. Coluna (°C)	T. Detector (°C)	T. Condicionamento (min)
CAR/PDMS	250	250	280	60
PDMS/DVB	250	250	280	30

*Supelco

As fibras foram inseridas em um sistema fechado contendo 50 g de folhas da Laranja ‘Pêra’ e tangor ‘Murcott’, separadamente, sendo realizadas exposições em 30, 45 e 60 min. Após os períodos estipulados, as fibras foram diretamente injetadas em um Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM), aparelho Shimadzu QP 5000, sob as condições citadas no ITEM 3.6.1.1. Os cromatogramas foram obtidos para as duas fibras, estes estão apresentados no ITEM 4.8.1.1.

3.6.1.3 - Determinação do Tempo de Exposição Ideal.

Utilizando-se a fibra ideal, CAR/PMDS, variou-se o tempo de exposição da mesma, em um sistema fechado contendo 50 g de folhas jovens de cada uma das espécies estudadas, para a verificação do tempo ideal de exposição da fibra. Os tempos de exposição testados para a fibra foram 30, 45 e 60 minutos. Os cromatogramas obtidos estão indicados no ITEM 4.8.1.2. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6.1.4 - Determinação do Tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos.

Injetou-se uma série de hidrocarbonetos conhecidos, C7/9/14/16/18/20/22 no CG-EM, para posterior identificação dos compostos, a partir do cálculo do Índice de retenção. A identificação dos componentes voláteis foi feita através da comparação de seus espectros de massas com a biblioteca (NIST, 2008) e cálculos de seus índices de retenção com aqueles encontrados na literatura (ADAMS, 2001). O índice de retenção (IR) foi calculado para cada componente detectado, segundo a equação de Van Den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963).

3.6.2 - Análise dos componentes voláteis de mudas de Citros por hidrodestilação

Extraiu-se os óleos essenciais das folhas jovens de laranja 'Pêra' e tangor 'Murcott', ambas inoculadas com o fungo *A. alternata* e também as folhas controle (sem a inoculação do patógeno), a partir da técnica de extração por arraste a vapor d'água. Inicialmente, montou-se o sistema de extração com o aparato de Clevenger, uma manta de aquecimento e um balão de 1L e ao condensador foi conectado o sistema de refrigeração. Em seguida, foi ligada a manta aquecedora, regulada à temperatura de ebulição da água. Adicionou-se água destilada até a metade do balão, ou seja, até o nível da manta, e 30 g de folhas. Antes de começar a aquecer o sistema, adicionou-se éter de petróleo no

extrator para que todo composto volatilizado permanecesse miscível ao óleo e não retornasse ao balão e nem saísse do sistema, para evitar a perda do mesmo. O sistema foi mantido em refluxo por três horas. Após este período, o óleo essencial, por ser mais denso que a água, foi facilmente coletado por se concentrar próximo à torneira de saída, sendo posteriormente mantido a -20 °C para que não houvesse evaporação do mesmo. Extraídos os óleos, injetou-se cada um separadamente no CG-EM, sob as condições apresentadas na TABELA 3.4. Injetou-se, também, uma série de hidrocarbonetos conhecidos. A partir do cálculo do Índice de retenção de cada pico presente em cada cromatograma e da comparação dos espectros de massas dos mesmos com a literatura, determinou-se os constituintes químicos de cada óleo essencial extraído nas diferentes condições realizadas.

TABELA 3.4 - Método utilizado na análise dos voláteis obtidos por hidrodestilação em CG-EM.

Temperatura do Injetor	180 °C
Temperatura de Interface	280 °C
Temperatura da Fonte de Ionização	180 °C
Volume da Injeção	2 µL
Modo de Ionização	EI ⁺
Faixa de Detecção de Massas	<i>m/z</i> 50 a 750 Da
Rampa	50/3-5/150/7/290/5

3.7 - Metodologia para a obtenção das imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Para observar o mecanismo de penetração e colonização do fungo *A. alternata* na superfície da folha da espécie suscetível, tangor ‘Murcott’ e da espécie tolerante, laranja ‘Pêra’, à doença Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), foi adotada neste trabalho a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no modo ESEM, ou seja, realizado a pressão atmosférica.

Para a análise das folhas contaminadas, foi feita a inoculação através de suspensão de esporos, de acordo com o ITEM 3.3.3 e as folhas sem a presença do patógeno também foram observadas e consideradas o controle (folhas saudáveis).

As mudas tinham em média seis meses de idade e ficaram em ambiente com controle de temperatura 25°C e umidade de 80%, condições necessárias para o desenvolvimento do micro-organismo. Após 48 horas os sintomas da doença eram visíveis nas folhas de tangor ‘Murcott’, iniciando-se pelas nervuras e progredindo por toda superfície da folha. Nesse momento as folhas eram destacadas das plantas e preparadas para a realização das imagens.

Para observações no microscópio eletrônico de varredura, foram separadas em quintuplicata amostras de tecidos de laranja ‘Pêra’ e tangor ‘Murcott’ infectados e o controle, as quais mediam aproximadamente 16 mm² (4 x 4 mm). Os fragmentos foram montados sobre suporte de metal e levados ao microscópio. O material foi examinado ao microscópio eletrônico de varredura (QUANTA - 250), o qual não necessita de metalização das amostras, operando em pressão ambiente e podendo ampliar as amostras em até dez mil vezes. A análise dos materiais processados para MEV foi apenas morfológica, não havendo quantificação de eventos.

3.8 - Análise da variação do perfil químico de citros via CLAE aliada à ferramenta quimiométrica.

Mudas de L. Pêra e T. ‘Murcott’ foram inoculadas com *A. alternata*, de acordo com o procedimento descrito no ITEM 3.3.3 e foram selecionadas em triplicata mudas controle, com e sem sintoma de Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), em ambas as espécies, para obtenção de um método “fingerprint” (“impressão digital”), que diferencie os extratos estudados.

As partes vegetais de citros (raízes, caules inferiores, caules superiores e folhas) depois de coletadas 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 erros experimentais de extração. Pesou-se 30 mg de material seco, adicionou-se 1,0 mL de uma solução de metanol: água (7:3), triturou-se e extraiu-se os metabólitos por 90s 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. Para uma extração mais eficiente, foram feitas três extrações de 1,0 mL de MeOH, repetindo-se as etapas anteriores. Secou-se o produto de extração num SpeedVac, re-suspendeu novamente em 6,0 mL na solução de metanol:água (7:3) e retirou-se uma alíquota de 20,0 µL para análise por CLAE-DAD.

As análises por CLAE foram feitas utilizando uma coluna com fase estacionária C18 Phenomenex Luna® (5 µm, 15,0 x 0,46 cm) acoplada a uma pré-coluna com a mesma fase. A eluição foi feita utilizando um gradiente exploratório, empregando-se ACN (B) e solução de ácido fórmico 0,5% (v/v) (A) nas seguintes condições: 10 a 95 % de (B) em 40 min, permanecendo isocrático em 95% de (B) por 10 min. Ao término da corrida cromatográfica foi feito um gradiente inverso de 95 a 10% em 5 min e o tempo de recondicionamento da coluna foi de 5 min. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min e a alça de amostragem foi de 20 µL da solução, sendo cada amostra, 24 no total, analisada em triplicata. Os cromatogramas foram registrados em 254 nm, enquanto que os espectros UV foram registrados entre 190 e 600 nm.

As análises quimiométricas foram realizadas pelo Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Foram analisados simultaneamente todos os cromatogramas obtidos por CLAE, onde os dados foram arranjados na forma de uma matriz, na qual as linhas correspondem às 72 amostras (todos os órgãos das plantas estudadas, com as

suas respectivas réplicas) e as colunas correspondem aos tempos de retenção de 0 a 47 min. Foi aplicado a análise de componentes principais (ACP) a esta matriz de dados, empregando o software PIROUETTE ®, versão 4.0 (Informetrix).

3.9 - Análise da variação do perfil químico de folhas de T. ‘Murcott’ via RMN ¹H.

Após a inoculação de *A. alternata* em mudas de tangor ‘Murcott’, as plantas foram umedecidas e cobertas com sacos pretos, com a finalidade de manter a umidade. Após 24 horas de espera de sintoma, algumas folhas foram coletadas para análise por RMN 600 MHz. Mudas sem a inoculação do fungo mantidas em outro ambiente foram separadas como controle, as quais também foram umedecidas, cobertas com sacos e coletadas no mesmo período.

Com a utilização de um furador de 0,5 cm de diâmetro foram cortados círculos de folha sobre a lesão e também em um ponto próximo a ela, visando analisar variação dos metabólitos existentes nestas regiões. Folhas sem sintomas e o branco também foram analisadas nestas mesmas regiões, para que as possíveis variações químicas observadas possam ser posteriormente atribuídas a uma resposta da planta e não a variações de composição devido a diferença de região analisada. Foram observadas folhas de tangor ‘Murcott’ de três tamanhos diferentes (estágios de evolução): 2,0, 3,5 e 5cm.

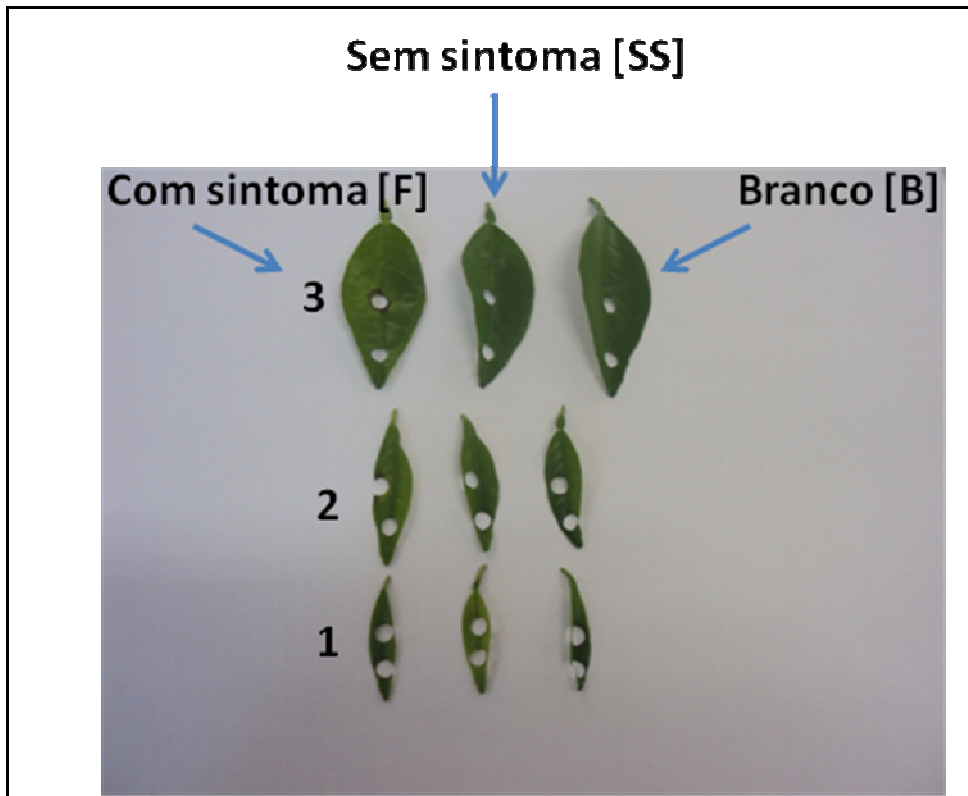


FIGURA 3.2 - Metodologia para análise da resposta química de T. 'Murcott' ao fungo *A. alternata*.

Os discos de 0,5 cm de diâmetro foram mergulhados em Nitrogênio líquido por 30 segundos e em seguida transferidos para eppendorf, onde foram armazenados em freezer -80 °C até o estudo por RMN ^1H . Para análise, foram adicionados 100 μL de metanol deuterado (MeOD) aos discos contidos em eppendorf e em seguida sonicados por 10 min a uma temperatura de 40 °C e a solução obtida foi homogeneizada em um vórtex por 1 minuto e levada em tubo capilar 0,3 cm para análise por RMN 600 MHz. Foi utilizado (trimetilsilil)-tetradeuterosódio propionato (TSP- D_4) como referência e padrão interno.

A TABELA 3.5 apresenta os códigos utilizados para a identificação de cada uma das amostras analisadas, sendo que o experimento foi feito em triplicata para avaliação da estabilidade das amostras avaliadas e também do equipamento.

TABELA 3.5 - Códigos utilizados na avaliação da variação do perfil químico por RMN 600 MHz.

Folhas de Tangor ‘Murcott’			
Tamanho	Com sintomas	Sem sintomas	Controle
1 (2,0 cm)	1TFF	1TSS	1TB
2 (3,5 cm)	2TFF	2TSS	2TB
3 (5,0 cm)	3TFF	3TSS	3TB
Região analisada: a (Exatamente sobre a lesão) Ex: 1TFa			
Região analisada: b (Próximo a lesão) Ex: 1TFb			

T = Tangor murcott; FF = Folhas com sintoma; SS = Folhas sem sintoma; B = folhas controle.

3.9.1 - Identificação da Substância 4 por LC-MS/MS.

A substância codificada como 4 que foi observada no estudo por RMN 600 MHz não foi obtida pura no estudo fitoquímico das folhas de tangor ‘Murcott’, sendo obtida como a substância minoritária em uma mistura com Apigenina-7-O-rutinosídeo e sua determinação estrutural foi feita por RMN em uma e duas dimensões e por LC-MS.

Para o estudo por LC-MS, inicialmente foram otimizadas as condições cromatográficas, sendo que a fase móvel empregada foi composta por água ultrapura e acetonitrila na proporção (75:25, v/v), com vazão de 0,8 mL/min em coluna analítica com fase estacionária C18 Phenomenex Luna® (5 µm, 15,0 x 0,46 cm,). Para otimização dos parâmetros para a análise por LC-MS e LC-MS/MS foram realizadas infusões diretas no espectrômetro de massas com solução analítica do padrão de Apigenina 7-O-rutinosídeo na concentração de 1,0 µg/mL, com a finalidade de selecionar as melhores condições de ionização e de fragmentação dos compostos de interesse. Após a otimização dos parâmetros com o padrão, foram injetados 20 µL da mistura dos flavonoides na concentração de 0,5 mg/mL.

As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados, obtidas com infusões diretas no espectrômetro de massas na vazão de 10,0 $\mu\text{L}/\text{min}$, foram: temperatura de 400 °C na fonte; temperatura do gás N_2 (gás de dessolvatação) de 400 °C, mantida a uma pressão para a dessolvatação da amostra de 45 psi e para o gás nebulizador uma pressão de 20 psi; a voltagem aplicada entre a agulha capilar e orifício de entrada da amostra foi de -3500 V; potencial de entrada na cela de colisão foi de 32,43 eV, a energia de colisão 15 eV, potencial de saída na cela de colisão de -5,50 eV.

3.10 - Análise da variação do perfil químico de folhas de T. 'Murcott' via RMN ^1H aliada à ferramenta quimiométrica.

Mudas de L. Pêra e T. 'Murcott' foram inoculadas com *A. alternata* de acordo com o procedimento descrito no ITEM 3.3.3 e foram selecionadas folhas controle, com e sem sintoma de Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA) em triplicata, sendo que o preparo de amostra foi análogo ao ITEM 3.9. No entanto, folhas inteiras foram utilizadas no experimento e não apenas discos em regiões específicas, como utilizado no ITEM 3.9.

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance® III, sob um campo magnético de 9,4 Tesla, cuja frequência do hidrogênio é de 400 MHz.

As análises foram feitas em quintuplicata e processadas com um fator de multiplicação exponencial ($\text{lb} = 0,3$) para posterior análise quimiométrica.

Os espectros de RMN ^1H foram utilizados como variáveis de entrada para o programa quimiométrico Amix® 3.9.11, onde foi gerado um arquivo para a matriz das folhas da tangerina e avaliados através de Análise de Componentes Principais (PCA). Nos espectros foi selecionada a região referente aos sinais dos hidrogênios de compostos aromáticos (entre δ 6,0 e 8,5).

3.11 - Análise da distribuição espacial de Apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas de T. 'Murcott' via MALDI IMS.

Este experimento foi realizado em colaboração com a pesquisadora Dra. Denise Brentan da Silva e o Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

Imagens da distribuição de Apigenina 7-O-rutinosídeo diretamente em folhas de 5,0 cm de T. 'Murcott' controle e com sintomas de MMA podem ser criadas através da representação gráfica da intensidade dos seus íons na área irradiada, obtida como uma função das suas coordenadas x, y.

Para realizar o experimento a folha intacta foi analisada ao longo da nervura central, as secções obtidas foram montadas em uma lâmina de vidro e a sua aderência foi feita através do uso de fita dupla face.

A secagem à vácuo, utilizando um dessecador, foi necessária considerando que altos teores de água nas secções podem causar uma aderência não uniforme da matriz à superfície da folha.

Para a aquisição de imagens do tecido foliar foi realizada a deposição automatizada de matriz que consistiu em uma mistura 1:3 (v/v) de Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e 2,6 dihidroxiacetofenona (DHB), utilizando o sistema comercial ImagePrep (da Bruker®), sendo possível aplicar a solução da matriz simultaneamente em todas as amostras, reduzindo os erros devido à diferença de lote.

As análises foram realizadas no MALDI-TOF/TOF Ultraflexreme (Bruker Daltonics), no modo positivo. Para otimização dos parâmetros para a análise foi utilizada solução analítica do padrão de Apigenina 7-O-rutinosídeo, com a finalidade de selecionar as melhores condições de ionização e de fragmentação deste composto na superfície da folha. As imagens obtidas foram geradas a partir dos dados de MS/MS, sendo esta confeccionada a partir da

extração de íons específicos. O conjunto de dados dos espectros de massas foram analisados por toda a seção utilizando o software FlexImaging (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), com uma resolução de 250 μm . Os parâmetros utilizados para a obtenção dos espectros foram: 100 laser shots por espectro, PIE (*Pulsed ion extraction*) de 110 ns, modo positivo, frequência de laser de 1000 Hz e modo refletor. Depois da aquisição dos dados, as imagens foram construídas utilizando o software FlexImaging. Abaixo está ilustrada a metodologia utilizada para a obtenção do imageamento relativo a distribuição de Apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas de T. ‘Murcott’ (FIGURA 3.3).

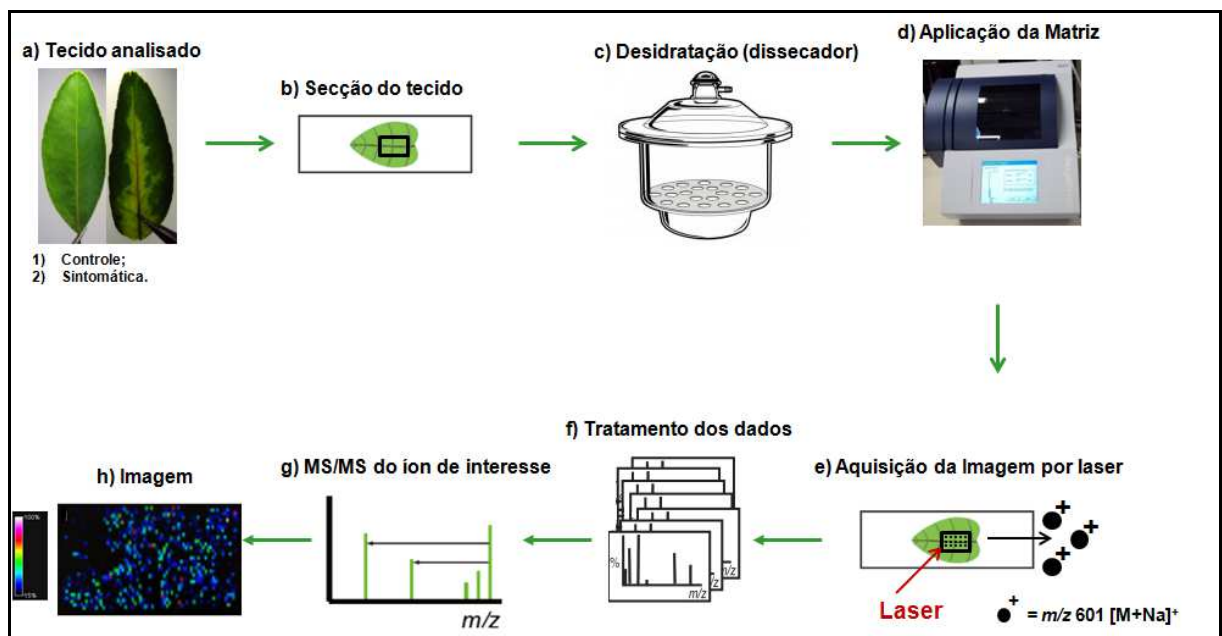


FIGURA 3.3 - Metodologia para análise da distribuição de Apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas de T. ‘Murcott’ através de MALDI-IMS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Detecção da presença de *Alternaria alternata* em mudas de Citros via PCR.

Após a constatação visual dos sintomas característicos de Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA) em folhas de tangor ‘Murcott’ 48 horas após a inoculação de *A. alternata*, foi utilizada a reação da polimerase em cadeia (PCR), um dos métodos mais seguros para a detecção deste patógeno. A PCR amplifica uma determinada sequência do DNA (criação de múltiplas cópias), onde utilizou-se primers específicos os quais foram mencionados no ITEM 3.3.4. Também foi avaliado, por este método, a ausência do fungo em mudas selecionadas como controle. Na reação foi utilizado os primers para a confirmação da espécie (550pb).

Para visualizar a amplificação foi feito um gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, fazendo com que quando exposto à luz UV o mesmo fluoresça, facilitando observar as bandas de amplificação.

Na FIGURA 4.1 pode-se analisar a imagem do gel obtida através de um foto-documentador. Através desta imagem pode-se observar o marcador de peso molecular (**M**) e a identificação do micro-organismo em **1** (Folhas de laranja inoculadas) e **2** (Folhas de tangerina inoculadas), comprovando a presença de *A. alternata* em folhas que foram inoculadas com o patógeno devido a observação da amplificação do fragmento de 550 pares de base (pb). Também foi feita a análise em folhas do controle de L. Pêra e T. ‘Murcott’ **3** e **4**, respectivamente o qual comprovou a ausência do micro-organismo nestas mudas.

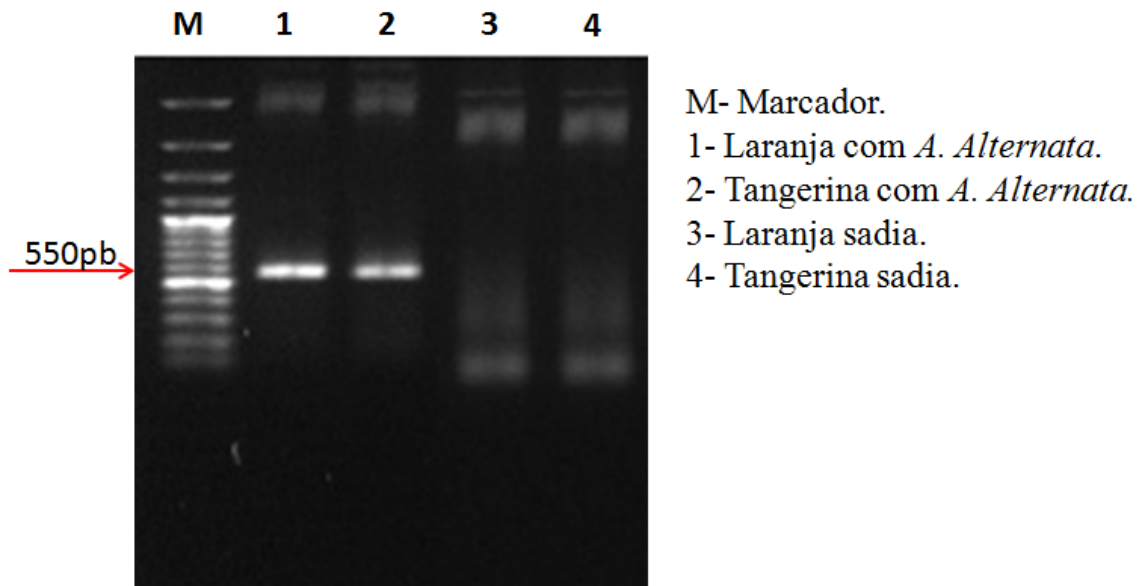
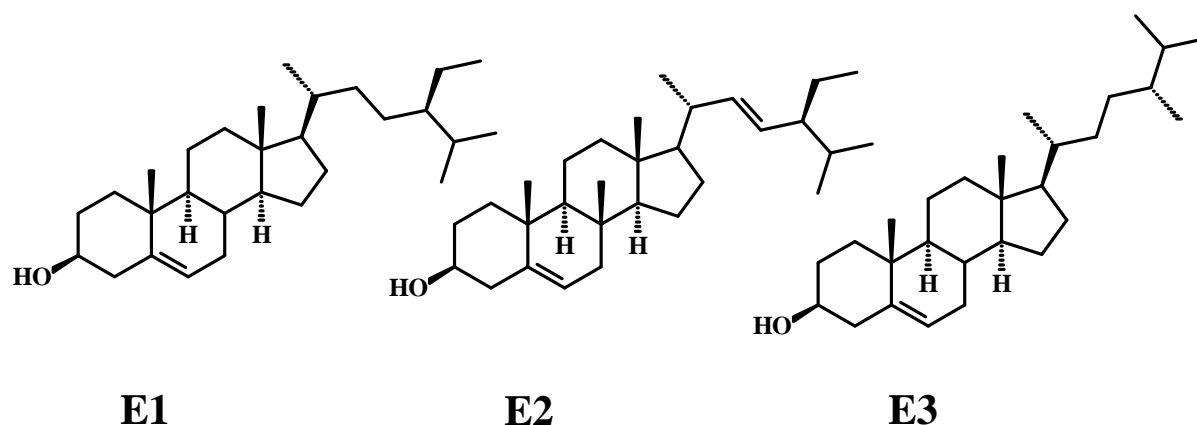


FIGURA 4.1 - Gel de agarose 1% corado com brometo de Etídio. M - Marcador de peso molecular 1kb plus NEOBIO; 1 e 2 - Presença de *A. alternata*; 3 e 4 - Controle (550pb-espécie).

4.2 - Substâncias Isoladas

O estudo fitoquímico de Laranja Pêra e Tangor Murcott neste trabalho visou a busca de padrões para os estudos da interação planta-patógeno, tendo a sua importância na identificação de compostos que possam estar envolvidos no mecanismo de defesa das espécies estudadas e também na avaliação da potencial atividade fungicida dos compostos isolados. Este estudo permitiu o isolamento de substâncias pertencentes a diferentes classes: esteroides, limonoides, cumarinas e flavonoides. Para facilitar a determinação estrutural dos metabólitos isolados, estes serão discutidos por classes.

Esteróides



Sitosterol (E1), Stigmasterol (E2) e Campesterol (E3) (em mistura)

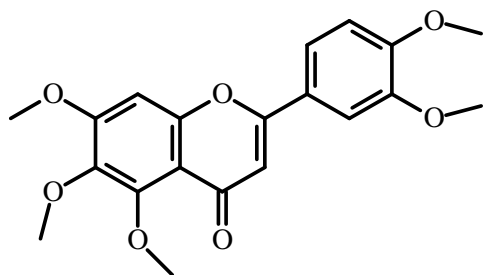
m = 98,0 mg

procedência: folhas de Tangor Murcott

isolamento: p. 40

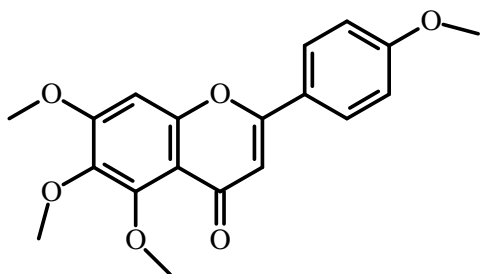
identificação: p.72-74

Flavonoides



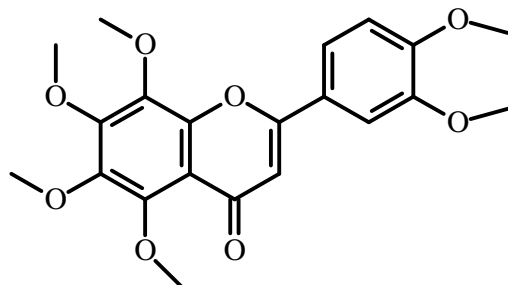
Sinensetina (F1)

m = 18,5 mg
 procedência: folhas de L. Pêra
 isolamento: p. 45
 identificação: p.73-81



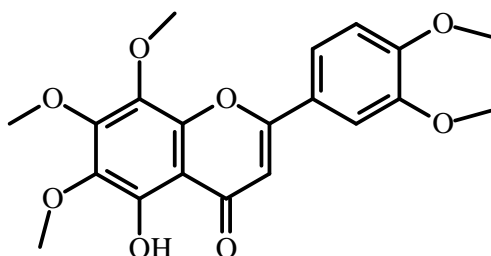
Escutelareína (F2)

m = 11,2 mg (mistura)
 procedência: folhas de L. Pêra
 isolamento: p. 45
 identificação: p.73-81



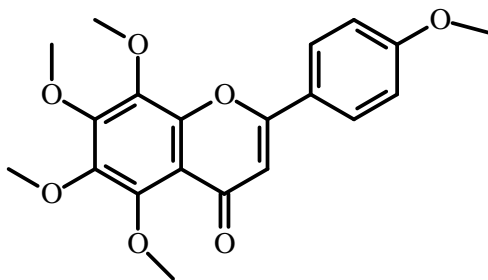
Nobiletina (F3)

m = 25,0 mg
 procedência: folhas de T. Murcott
 isolamento: p. 40
 identificação: p.73-81



**5-Hidroxi 6,7,8,3',4'-
 pentametoxiflavona (F4)**

m = 1,2 mg
 procedência: folhas de T. Murcott
 isolamento: p. 39
 identificação: p.73-81



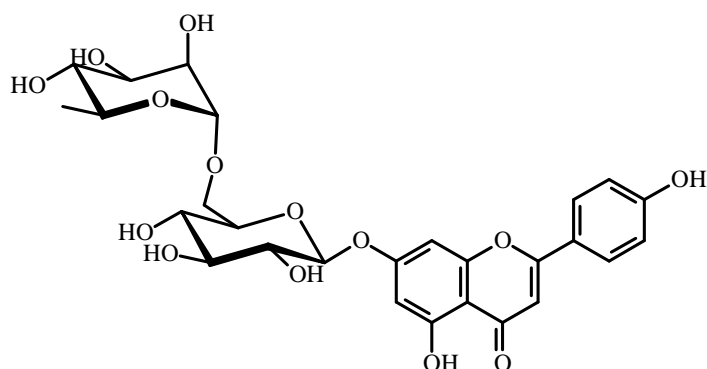
Tangeretina (F5)

m = 54,0 mg

procedência: folhas de
T. Murcott

isolamento: p. 40

identificação: p.73-81



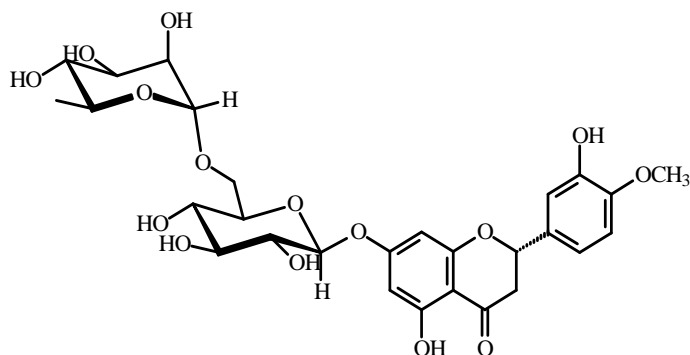
Apigenina-7- α -O-rutinosídeo (F6)

m = 50,4 mg

procedência: folhas de T.
Murcott

isolamento: p. 42

identificação: p. 82-90



Hesperidina (F7)

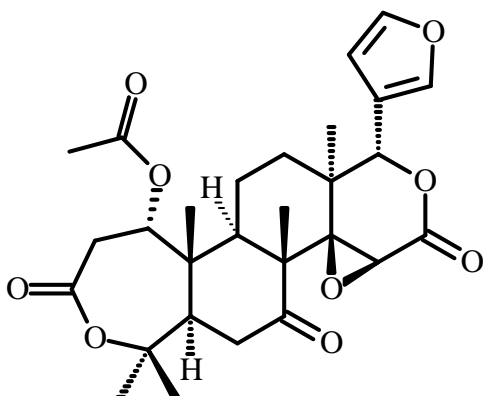
m = 12,6 mg

procedência: folhas de L. Pêra

isolamento: p. 43

identificação: p.91-95

Limonoide



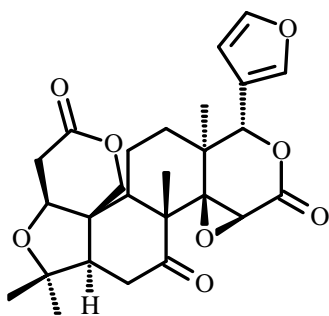
Nomilina (L1)

m = 13,4 mg

procedência: folhas de T. Murcott

isolamento: p. 41

identificação: p. 96-100



Limonina (L2)

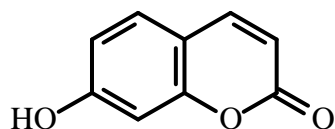
m = 25,0 mg

procedência: folhas de L. Pêra e T. Murcott

isolamento: p. 44

identificação: p. 101-105

Cumarinas



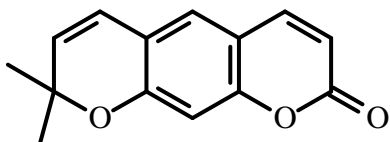
Umbeliferona (C1)

m = 25,0 mg

procedência: folhas de L. Pêra

isolamento: p. 38

identificação: p. 107-114



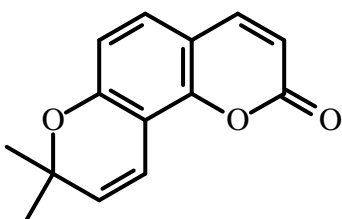
Xantiletina (C2)

m = 359,2 mg

procedência: raízes de L. Cravo

isolamento: p. 46

identificação: p. 107-114



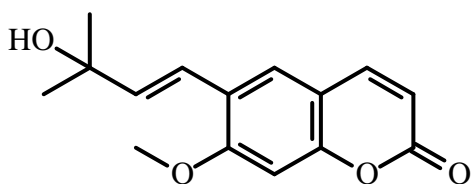
Seselina (C3)

m = 17,0 mg

procedência: raízes de L. Cravo

isolamento: p. 46

identificação: p. 107-114



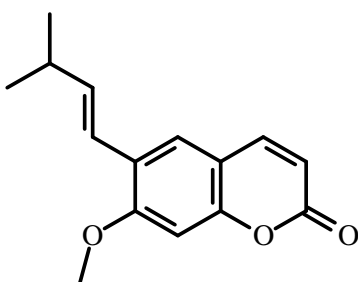
Suberenol (C4)

m = 3,2 mg

procedência: raízes de L. Cravo

isolamento: p. 46

identificação: p. 107-114



Suberosina (C5)

m = 3,6 mg

procedência: raízes de L. Cravo

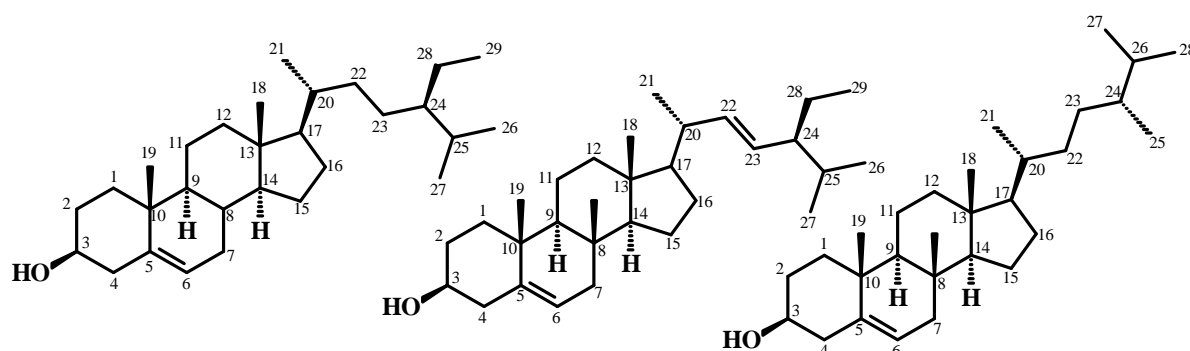
isolamento: p. 46

identificação: p. 107-114

4.3 - Esteroides

Os esteroides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol, mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14. Originados das frações lipídicas de vegetais e animais o sitosterol, estigmasterol e campesterol são os esteróides mais frequentemente encontrados no reino vegetal (DEWICK, 2001). Quase sempre estes esteroides encontram-se em mistura devido às suas semelhanças estruturais ocasionando dificuldades em suas separações então, na maioria das vezes, suas identificações são realizadas em mistura através de CG/EM.

4.3.1 - Identificação estrutural do sitosterol (E1), estigmasterol (E2) e campesterol (E3)



Estes esteroides foram obtidos da partição diclorometânica do extrato etanólico das folhas de Tangor ‘Murcott’. Através do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.2), pode-se observar a presença de um duplete largo em δ 5,33 ($J = 5,0$ Hz) e um múltiplo em δ 3,52 característicos dos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente dos esqueletos esteroidais do sitosterol, estigmasterol e campesterol; foi observado também sinais de hidrogênios vinílicos em δ_{H} 5,07 *dd* ($J = 8,1$ e $15,1$ Hz) e δ_{H} 5,12 *dd* ($J = 8,1$ e $15,1$ Hz) atribuídos aos da cadeia lateral do estigmasterol, e ainda, um grande número de sinais congestionados na região de δ_{H} 0,68 – 2,31 referentes a vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que caracterizam o esqueleto esteroidal. O sitosterol e o

campesterol possuem cadeias laterais praticamente idênticas, portanto, não há como diferencia-los com um simples espectro de hidrogênio.

Na análise por CG/EM, foram observados três picos no cromatograma (FIGURA 4.3 a) que indicaram a presença de três substâncias. A presença da mistura sitosterol (**E1**), estigmasterol (**E2**) e campesterol (**E3**) foi confirmada através dos picos referentes ao íon molecular em m/z 414, 412 e 400 (FIGURAS 4.3 b, c e d) que conferiram com as fórmulas moleculares das três substâncias $C_{29}H_{50}O$, $C_{29}H_{48}O$ e $C_{28}H_{48}O$, respectivamente. O ESQUEMA 4.1 apresenta propostas de fragmentação do sitosterol.

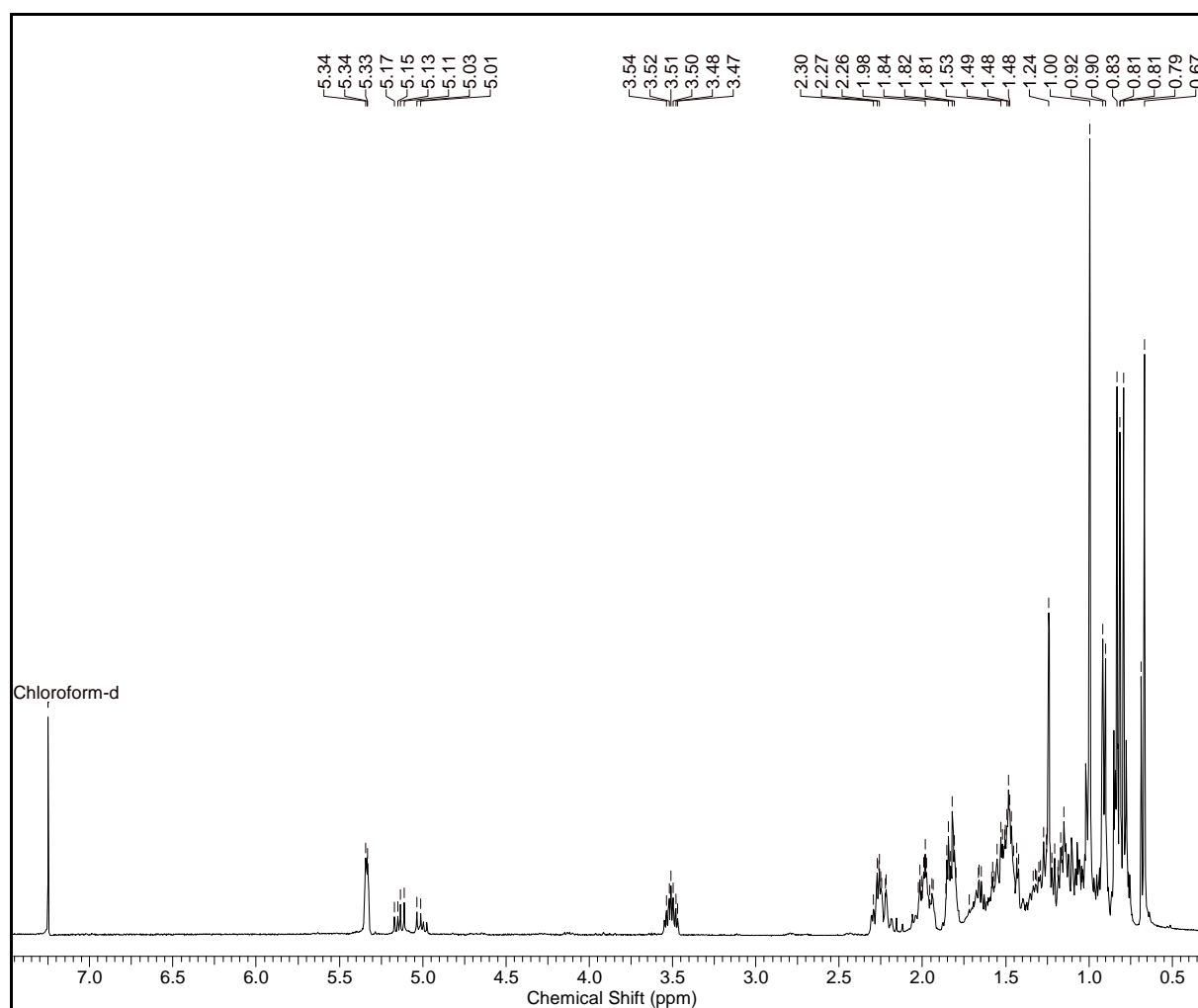


FIGURA 4.2 - Espectro de RMN 1H da mistura E1 + E2 + E3. ($CDCl_3$, 400 MHz)

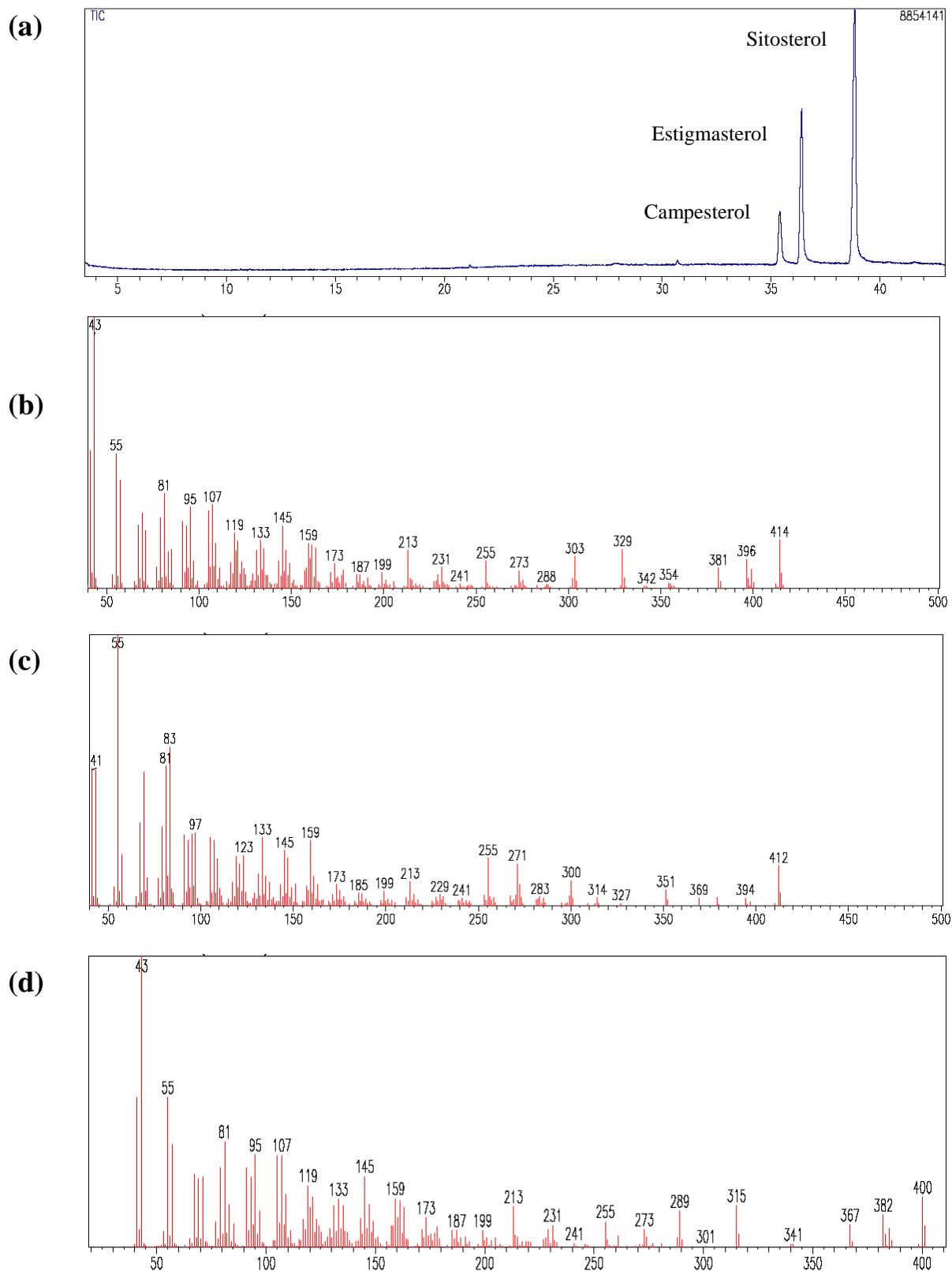
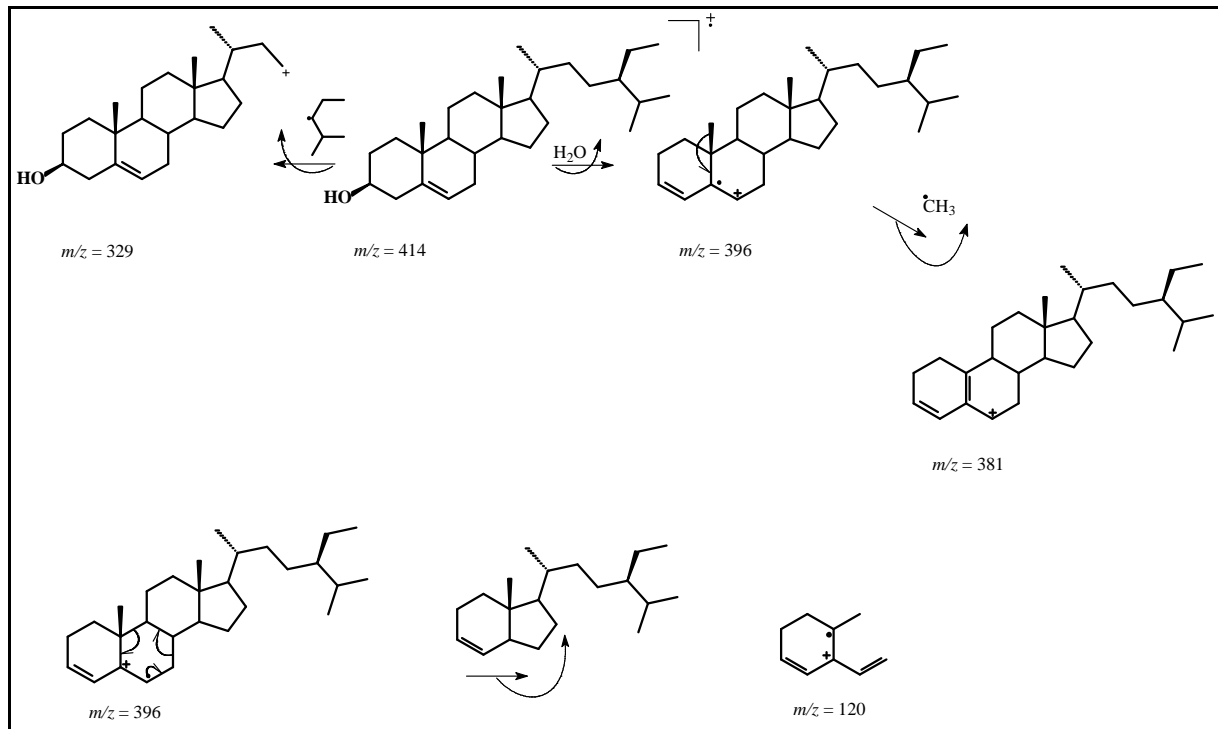


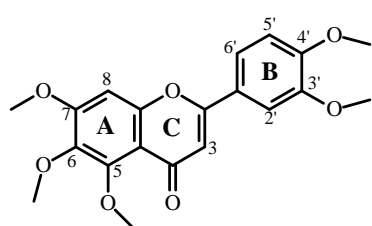
FIGURA 4.3 - (a) Cromatograma da mistura E1 + E2 + E3; (b) Espectro de massas do sitosterol; (c) Espectro de massas do estigmasterol; (d) Espectro de massas do campesterol.



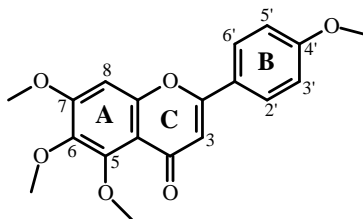
ESQUEMA 4.1 - Proposta de fragmentação do Sitosterol (E1).

4.4 - Flavonoides

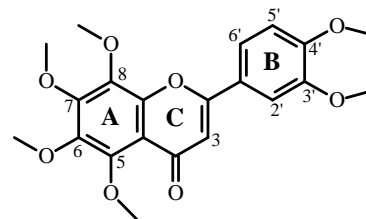
4.4.1 - Identificação estrutural dos flavonoides polimetoxilados F1-F5:



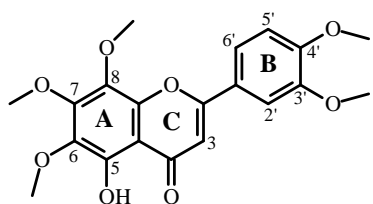
(F1) Sinensetina



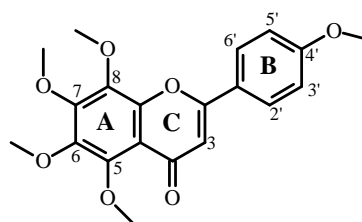
(F2) Escutelareina



(F3) Nobiletina



(F4) 5-Hidroxi-6,7,8,3',4' pentametoxiflavona



(F5) Tangeretina

Os flavonoides isolados são substâncias comumente obtidas em Citros (TRIPOLI, et. al., 2007), portanto sua identificação estrutural foi feita baseando-se apenas nos deslocamentos de hidrogênios, que estão de acordo com os dados da literatura (LI et al, 2006). Os flavonoides polimetoxilados apresentam características bastante peculiares em seus espectros de RMN ^1H facilitando sua caracterização, como a presença de diversos singletos em aproximadamente δ 4,00 relativo a metoxilas e hidrogênios aromáticos relativos aos hidrogênios do anel B, os quais foram observados com os seguintes padrões de substituição: Nos compostos **F2** e **F5** é observado uma equivalência química dos hidrogênios 2' e 6' e dos hidrogênios 3' e 5' devido a livre rotação do anel B e eles apresentam deslocamento em torno de δ 8,0 e δ 6,9, respectivamente. Neste caso os sinais apresentam-se como dois dubletos, com constante de acoplamento *orto* ($J = 8,0$ Hz). O dubleto correspondente aos hidrogênios H-3' e H-5' aparece mais blindado com relação àquele correspondente a H-2' e H-6' devido ao efeito de blindagem da metoxila em C-4'.

Para os compostos **F1**, **F3** e **F4** têm-se sinais para três hidrogênios no anel B, pois neste caso não há uma simetria no anel. O sinal de H-2' surge como um dubleto com constante de acoplamento meta ($J = 2,5$ Hz) devido ao

acoplamento deste hidrogênio com H-6', que aparece em torno de δ 7,6 ppm. O sinal do H-5', em torno de δ 6,9 ppm, também surge como um dubleto devido ao acoplamento *orto* ($J = 8,5$ Hz) com H-6'. Finalmente, o sinal do H-6' surge como duplo dubleto devido ao acoplamento em meta ($J = 2,5$ Hz) com H-2' e orto ($J = 8,5$ Hz) com H-5' próximo a δ 7,4 ppm.

O Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **F1-F5** (FIGURAS 4.4 – 4.8) apresentaram um singlete em $\delta_{\text{H}} \sim 6,60$ que foram atribuídos ao H-3 do anel C de uma flavona, pois este é o seu deslocamento característico (WANG et. al., 2007). Os compostos **F3** e **F5** apresentaram o anel A completamente substituído por metoxilas, pois uma vez determinados os substituintes dos anéis B e C e a ausência de outros hidrogênios aromáticos, assim as quatro metoxilas restantes estariam presentes neste anel. Os compostos **F1** e **F2** apresentaram, além dos sinais já relatados para o anel B e C, três metoxilas no anel A e um singlete em torno de δ 6,80, deslocamento este característico de H-8, pois quando temos a posição 8 metoxilada, o sinal de H-6 aparece como singlete em δ 6,4 ppm, região mais blindada do espectro devido ao efeito de proteção das metoxilas em C-5 e C-7. O composto **F4** apresenta sinal em δ 12,35, característico de hidroxila quelatogênica em C-5. As posições C-6, C-7 e C-8 são as únicas localizações possíveis para as três metoxilas restantes, observadas no espectro de RMN ^1H desta substância.

TABELA 4.1 - Dados de RMN 1H dos flavonoides F1-F5 juntamente com os dados encontrados na literatura (LI et al, 2006).

H	F1 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F1 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F2 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F2 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F3 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F3 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F4 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F4 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F5 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	F5 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$
3	6,65 s	6,60 s	6,60 s	6,59 s	6,63 s	6,63 s	6,61 s	6,62 s	6,57 s	6,61 s
8	6,80 s	6,80 s	6,79 s	6,80 s	-	-	-	-	-	-
2'	7,32 d (2,0)	7,33 d (2,0)	7,82 d (9,0)	7,83 d (9,0)	7,42 d (2,0)	7,42 d (2,0)	7,42 d (2,0)	7,42 d (1,8)	7,85 d (9,0)	7,87 d (9,0)
3'	-	-	7,00 d (9,0)	7,01 d (9,0)	-	-	-	-	7,00 d (9,0)	7,02 d (9,0)
5'	6,96 d (8,0)	6,97 d (9,0)	7,00 d (9,0)	7,01 d (9,0)	7,00 d (8,8)	7,00 d (9,0)	7,00 d (8,4)	7,00 d (8,0)	7,00 d (9,0)	7,02 d (9,0)
6'	7,51 dd (8,0 e 2,0)	7,52 dd (9,0 e 2,0)	7,82 d (9,0)	7,83 d (9,0)	7,58 dd (8,8 e 2,0)	7,57 dd (9,0 e 2,0)	7,59 dd (8,4 e 2,0)	7,58 dd (8,0 e 1,8)	7,85 d (9,0)	7,87 d (9,0)
5-OH	-	-	-	-	-	-	12,53 s	-	-	-
-OCH ₃	3,91 s, 3H 3,95 s, 3H 3,97 s, 3H 3,98 s, 6H	3,93 s, 3H 3,97 s, 3H 3,98 s, 3H 3,99 s, 6H	3,88 s, 3H 3,91 s, 3H 3,97 s, 3H 3,98 s, 3H	3,89 s, 3H 3,92 s, 3H 3,98 s, 3H 3,99 s, 3H	3,97 s, 9H 3,99 s, 3H 4,05 s, 3H 4,12 s, 3H	3,95 s, 6H 3,97 s, 3H 3,98 s, 3H 4,03 s, 3H 4,11 s, 3H	3,96 s, 3H 3,97 s, 3H 3,98 s, 6H 4,11 s, 3H	3,96 s, 3H 3,97 s, 3H 3,98 s, 6H 4,12 s, 3H	3,85 s, 3H 3,91 s, 6H 3,99 s, 3H 4,07 s, 3H	3,89 s, 3H 3,95 s, 6H 4,02 s, 3H 4,10 s, 3H

^aCDCl₃, 400 MHz.

Valores de *J*, entre parênteses, em Hz.

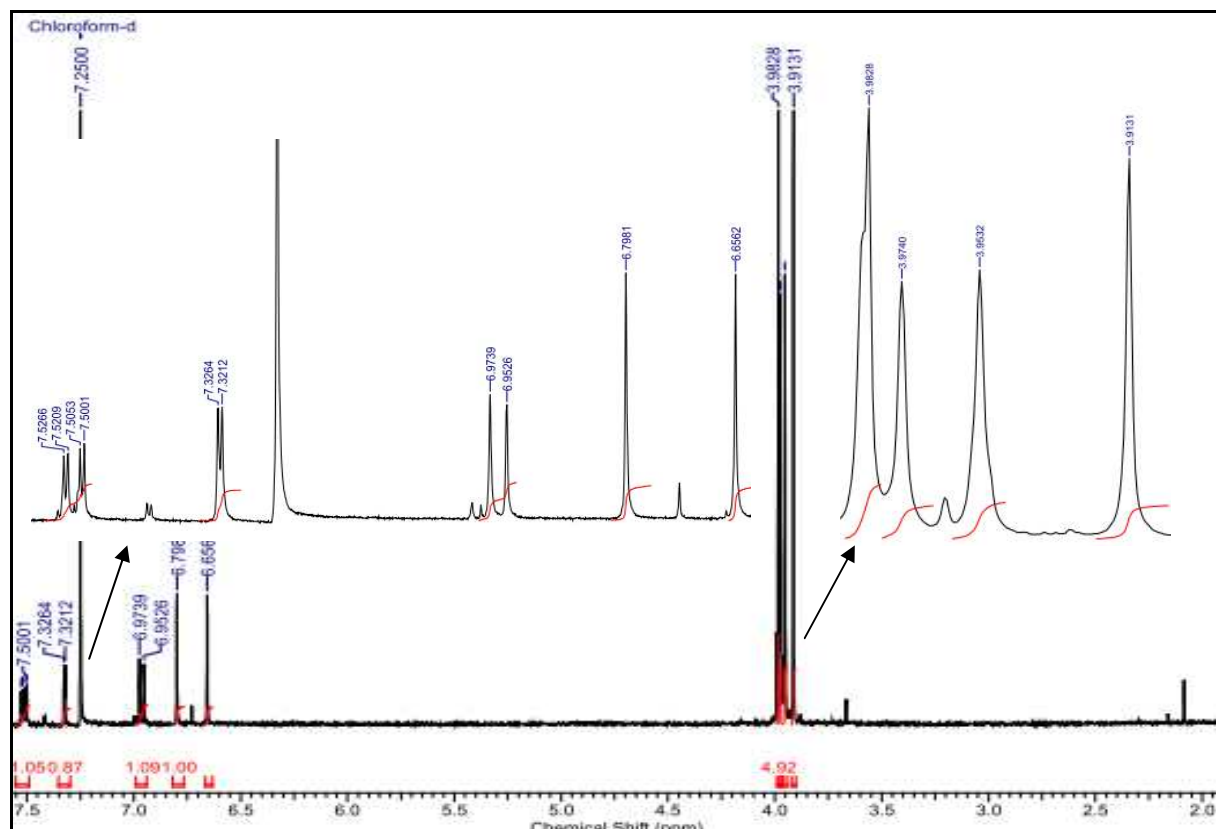


FIGURA 4.4 - Espectro de RMN ^1H da Sinensetina (F1). (CDCl_3 , 400 MHz)

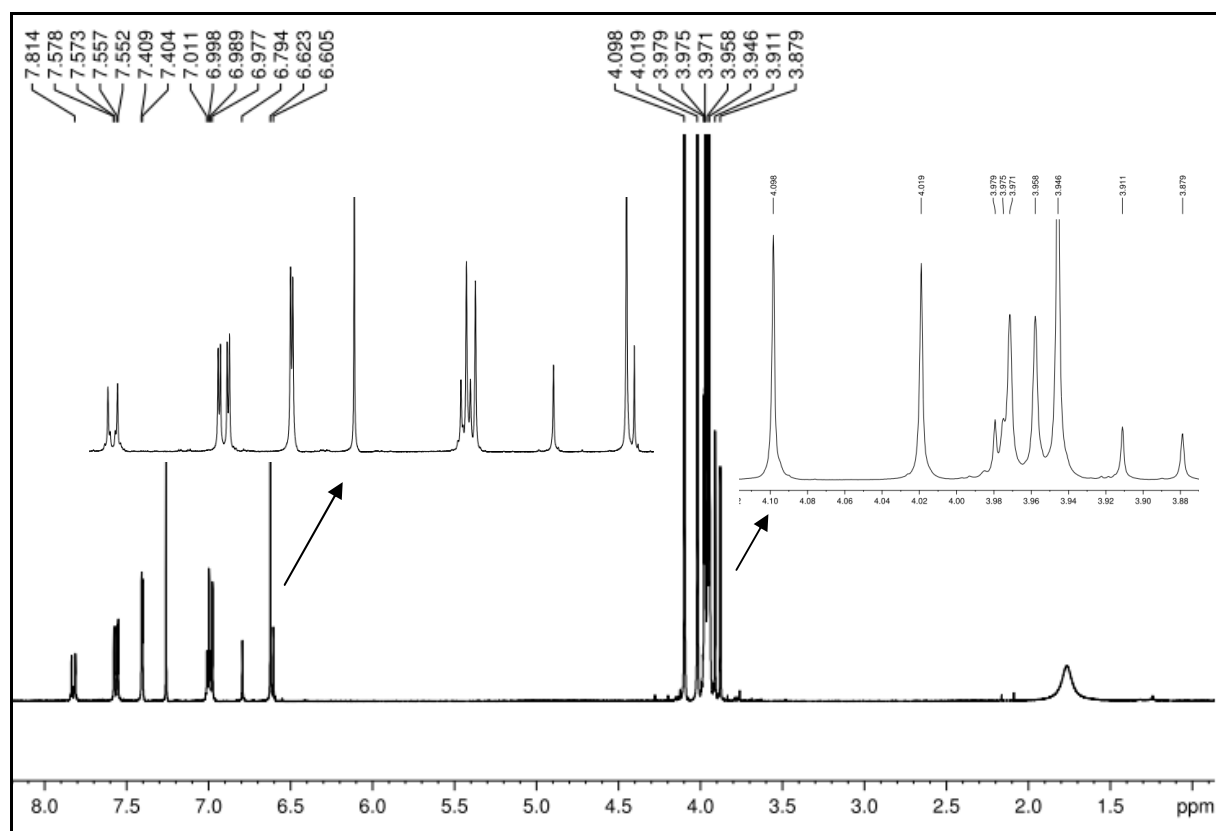


FIGURA 4.5 - Espectro de RMN ^1H da mistura Escutelareína (F2) e Nobiletina (F3). (CDCl_3 , 400 MHz)

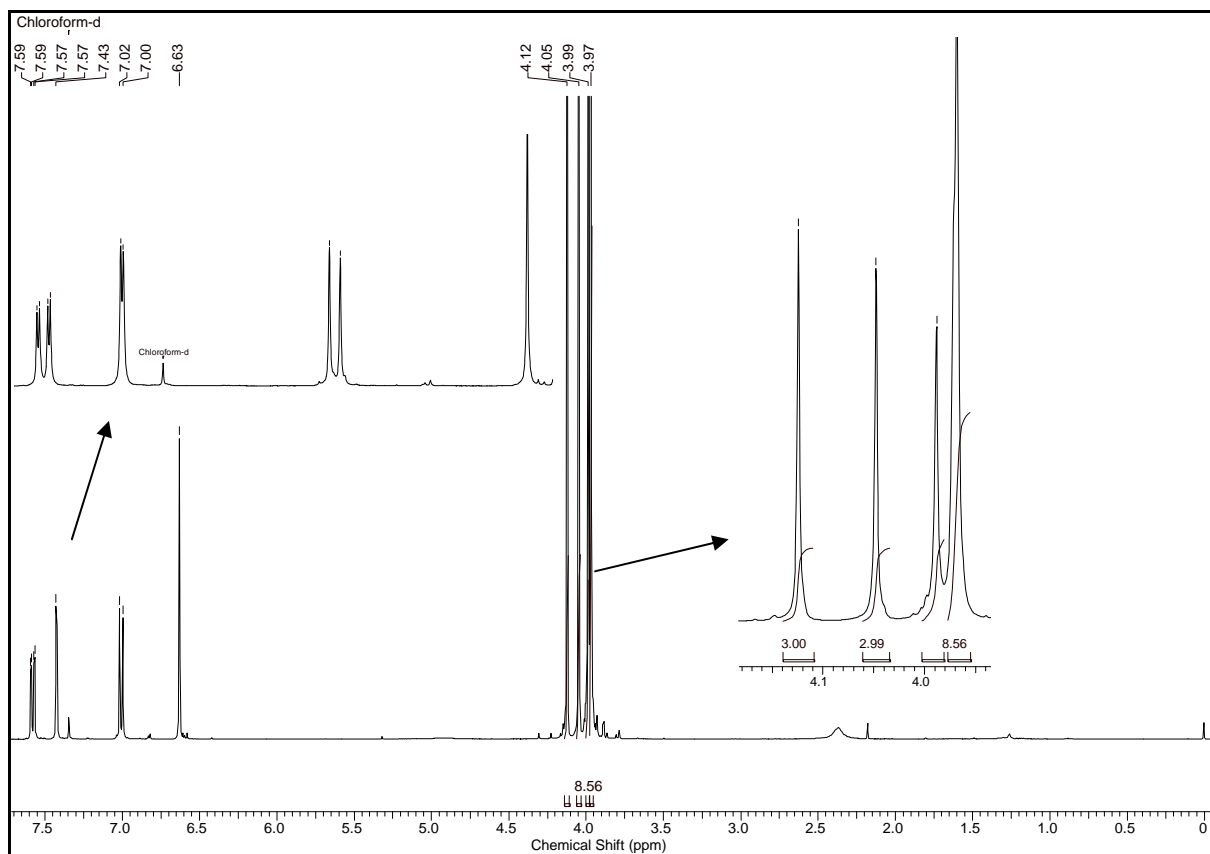


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN ^1H da Nobiletina (F3). (CDCl_3 , 400 MHz)

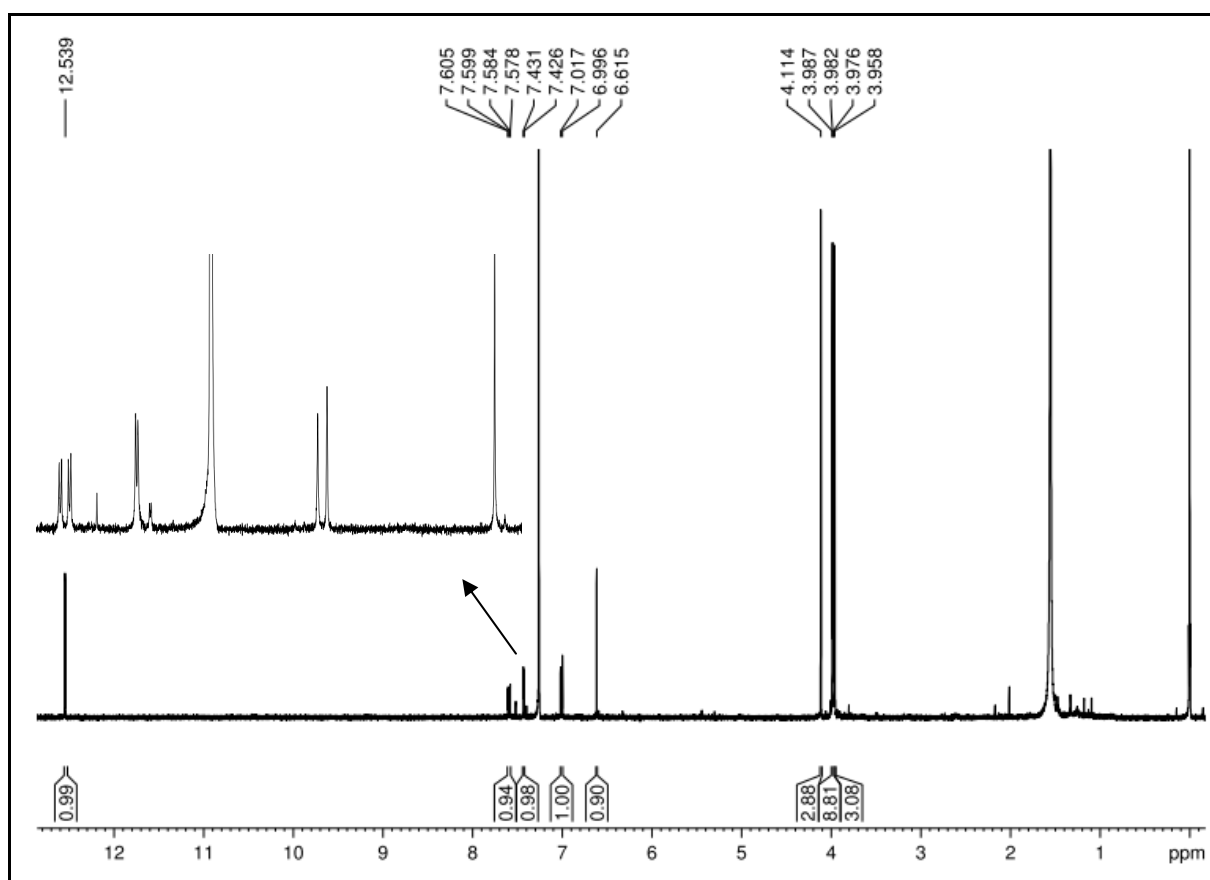


FIGURA 4.7 - Espectro de RMN ^1H de 5-Hidroxi 6,7,8,3',4' - pentametoxyflavona (F4). (CDCl_3 , 400 MHz)

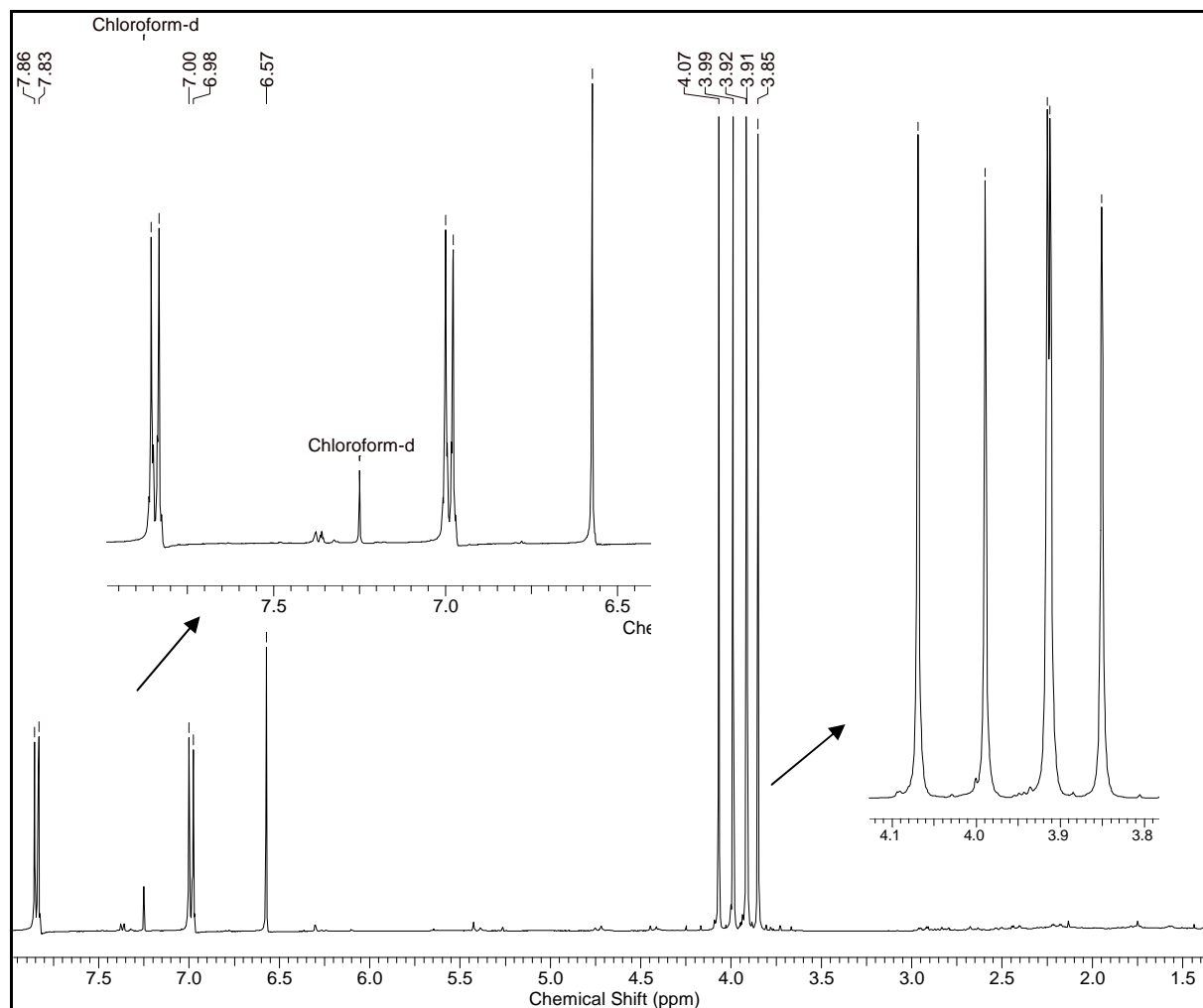


FIGURA 4.8 - Espectro de RMN ^1H da Tangeretina (F5). (CDCl_3 , 400 MHz)

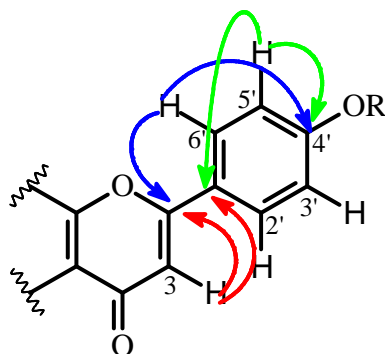
4.4.2 - Identificação estrutural dos flavonoides glicosilados F6 e F7:

4.4.2.1 - Identificação estrutural de F6:

No espectro de RMN ^1H de **F6** (FIGURA 4.9) foram observados dois dubletos intensos na região característica de hidrogênios aromáticos, sinais estes em δ 7,95 (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6' e em δ 6,96 (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-3' e H-5' do anel B de um flavonoide. Este padrão de substituição do anel B é caracterizado por apresentar sinais com equivalência química, devido a simetria do anel e sua livre rotação.

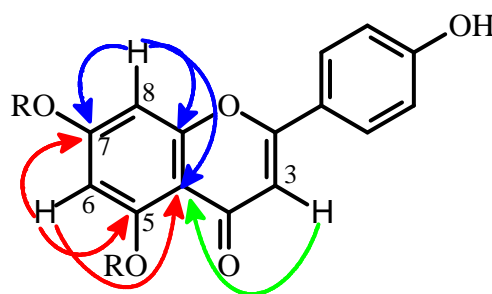
O mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.14) mostra a correlação dos hidrogênios em δ 7,95 com o carbono em δ 129,0 (C-2', C-6') e os hidrogênios em δ 6,96 com δ 116,5 (C-3', C-5'). A análise do mapa de contorno HMBC (FIGURA 4.15) mostra a correlação dos hidrogênios em δ 7,95 a 3J e δ 6,96 a 2J com o carbono em δ_{C} 161,0 e este sinal foi atribuído ao carbono C-4' que, pelo seu deslocamento trata-se de um carbono oxigenado, o que permitiu atribuir um substituinte hidroxila ao C-4'.

Foi observado no espectro de RMN ^1H um sinal em δ 6,85 (1H, *s*) atribuído ao H-3 de uma flavona auxiliado pelas as seguintes correlações observadas no mapa de contorno HMBC: H-3', H-5' e H-3 correlacionam-se com δ_{C} 121,3, atribuído ao C-1'; H-2', H-6' e H-3 correlacionam-se com δ_{C} 164,5, atribuído ao C-2; deslocamento este característico do carbono- β de um sistema carbonila α , β - insaturada, podendo-se afirmar, então, que estes são os hidrogênios 2', 5' e 6' de uma flavona.



Ainda, no espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.9), tem-se um par de dubletos com $J = 2,0$ Hz em δ 6,76 e δ 6,44. O espectro de HSQC (FIGURA 4.14) mostrou a correlação do hidrogênio em δ_{H} 6,76 com o carbono em δ_{C} 95,3 e também mostrou a correlação do hidrogênio em δ_{H} 6,44 com o carbono em δ_{C} 99,8.

Através do mapa de contorno HMBC (FIGURA 4.15) pode-se verificar a correlação dos hidrogênios em δ_{H} 6,76 e δ_{H} 6,44 com o carbono em δ_{C} 163,2 atribuído ao carbono oxigenado C-7; correlação do sinal em δ_{H} 6,44 com δ_{C} 161,6 (C-5); correlação do sinal em δ_{H} 6,76 com δ_{C} 157,2 (C-9); e a correlação dos sinais em δ_{H} 6,76, δ_{H} 6,44 e do H-3 com δ_{C} 105,9. A observação destas correlações permitiu atribuir os sinais em δ_{H} 6,76 e δ_{H} 6,44 aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente do anel A de uma flavona.



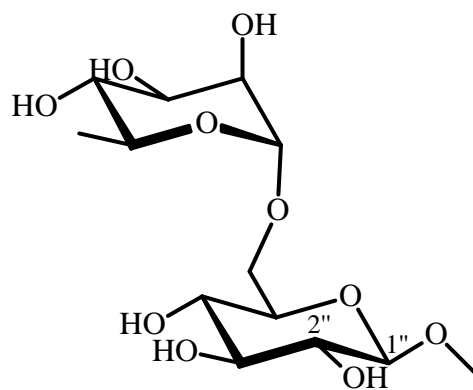
Voltando ao espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.9), a observação de sinais entre δ 3,0-4,4 sugerem a presença de unidade de açúcar, onde o dubleto em δ 0,94 (3H, H-6'', $J = 5,6$ Hz) é característico da metila de uma unidade de raminose e o dubleto em δ 4,55 (H-1'', $J = 1,6$ Hz) corresponde ao sinal do hidrogênio anomérico, cuja constante de acoplamento de 1,6 inferiu na

configuração α (-OR axial) para a unidade de raminose. Também é possível observar a presença de outro hidrogênio anomérico em δ 5,06, ($J = 7,2$) característico de glicose β (-OR equatorial), indicando também a presença desta unidade de açúcar na estrutura da molécula.

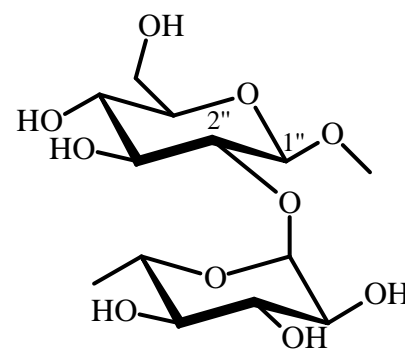
Os mapas de contorno COSY (FIGURAS 4.11 e 4.12) foram usados para confirmação das interações spin-spin dos átomos de hidrogênios presentes nos anéis da raminose e da glicose. Os acoplamentos observados neste espectro permitiram identificar o deslocamento químico de cada um dos hidrogênios da glicose e da raminose e, com isto, através do mapa de contorno HSQC foi possível observar a correlação dos mesmos com o carbono diretamente ligado a eles, fechando a estrutura dos açúcares, como pode ser observado na FIGURA 4.13.

Para se determinar a posição na qual o glicosídeo está ligado na aglicona, utilizou-se a correlação no mapa de contorno HMBC (FIGURA 4.15) do hidrogênio anomérico H-1'' a 3J com um carbono em δ 163,2, sendo atribuído anteriormente ao C-7 do anel C da flavona.

Os flavonoides O-di-glicosilados encontrados em *Citrus* geralmente apresentam-se como 7-O-rutinosídeo ou 7-O-neohesperidosídeo (GATTUSO, et al., 2007) e a diferença entre eles encontra-se na ligação de junção das unidades de açúcar. Para diferenciá-los é utilizado o valor do deslocamento químico de H-1'', que se encontra em torno de δ 5,00 em 7-O-rutinosídeo e em torno de δ 5,30 para 7-O-neohesperidosídeo em DMSO. Esta diferença pode ser justificada devido ao efeito indutivo retirador de elétrons da raminose em C-2'' neste último, tornando o hidrogênio anomérico da glicose mais desblindado. Em **F6**, como H-1'' está em δ 5,06, foi considerada a presença de 7-O-rutinosídeo na estrutura desta molécula.

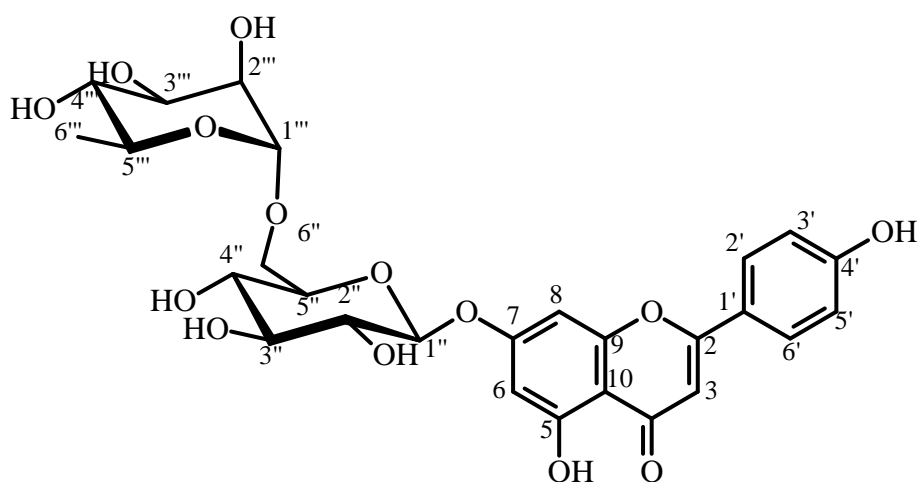


Rutinosídeo



Neohesperidosídeo

Os substituintes nos carbonos C-5 e C-4' da flavona são hidroxilas, devido a ausência de sinais característicos de metoxilas na região entre 3,5-4,5 ppm no espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.9) e a substância é conhecida como Apigenina-7-O-rutinosídeo.



Apigenina-7-O- β -rutinosídeo (**F6**)

TABELA 4.2 - Dados de RMN 1H e 13C de Apigenina-7-O-rutinosídeo (F6) juntamente com os dados descritos na literatura (WANG et al., 1998) para F6.

C	F6		F6 (Lit.)	
	δ_H^a <i>mult</i>	δ_C^b	δ_H^a <i>mult</i>	δ_C^b
2	-	164,5	-	164,6
3	6,85 <i>s</i>	103,4	6,87 <i>s</i>	103,4
4	-	182,2	-	182,3
10	-	105,6	-	105,7
5	-	161,6	-	161,6
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	100,1	6,46 <i>d</i> (1,8)	100,1
7	-	163,2	-	163,1
8	6,37 <i>d</i> (2,0)	95,1	6,79 <i>d</i> (1,8)	95,1
9	-	157,2	-	157,2
1'	-	121,3	-	121,3
2'	7,95 <i>d</i> (8,8)	129,0	7,96 <i>d</i> (8,4)	128,9
3'	6,96 <i>d</i> (8,8)	116,5	6,96 <i>d</i> (8,4)	116,4
4'	-	161,0	-	161,4
5'	6,96 <i>d</i> (8,8)	116,5	6,96 <i>d</i> (8,4)	116,4
6'	7,95 <i>d</i> (8,8)	129,0	7,96 <i>d</i> (8,4)	128,9
1''	5,06 <i>d</i> (7,2)	100,7	5,08 <i>d</i> (6,6)	100,8
2''	3,31 <i>m</i>	73,4	3,00-3,84 <i>m</i>	73,4
3''	3,50 <i>m</i>	76,6	3,00-3,84 <i>m</i>	76,6
4''	3,16 <i>m</i>	69,8	3,00-3,84 <i>m</i>	69,8
5''	3,62 <i>m</i>	75,9	3,00-3,84 <i>m</i>	75,9
6''	3,30-3,84 <i>m</i>	66,2	3,00-3,84 <i>m</i>	66,2
1'''	4,55 <i>d</i> (1,6)	100,0	4,56 <i>sl</i>	99,8
2'''	3,65 <i>m</i>	70,5	3,00-3,84 <i>m</i>	70,6
3'''	3,45 <i>m</i>	71,0	3,00-3,84 <i>m</i>	71,0
4'''	3,13 <i>m</i>	72,3	3,00-3,84 <i>m</i>	72,3
5'''	3,45 <i>m</i>	68,8	3,00-3,84 <i>m</i>	68,6
6'''	0,94 <i>d</i> (5,6)	18,0	1,10 <i>d</i> (6,0)	18,1

^a DMSO, 400MHz^b DMSO, 200MHzValores de *J*, entre parênteses, em Hz

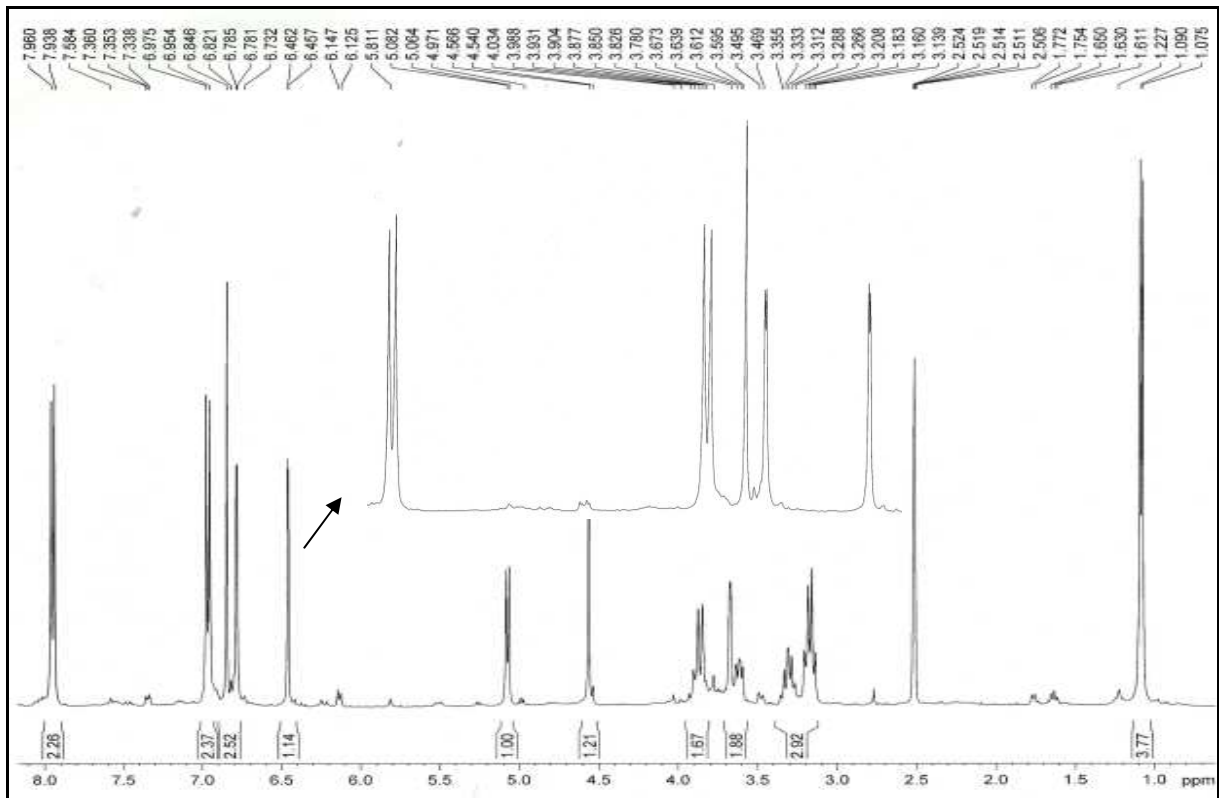


FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ^1H da Apigenina 7-O-rutinosídeo (F6). (DMSO, 400 MHz)

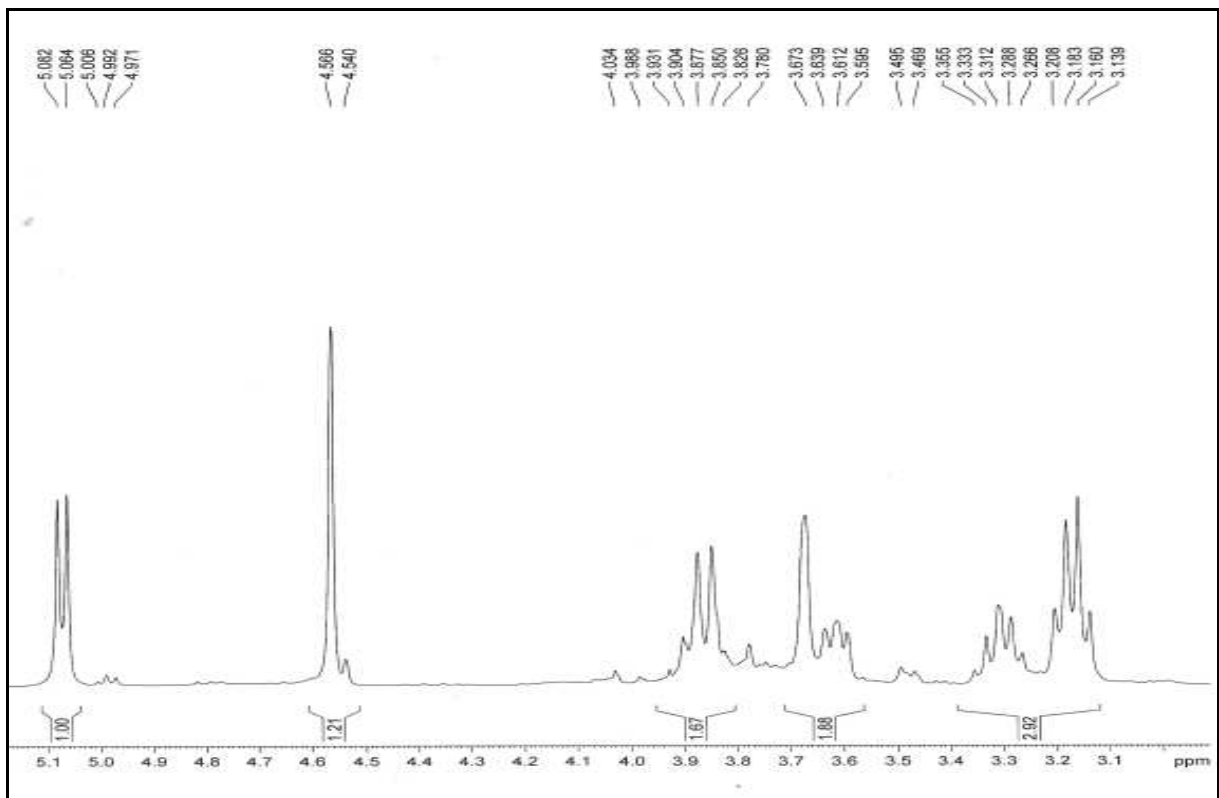


FIGURA 4.10 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da Apigenina 7-O-rutinosídeo na região dos açúcares (F6). (DMSO, 400 MHz)

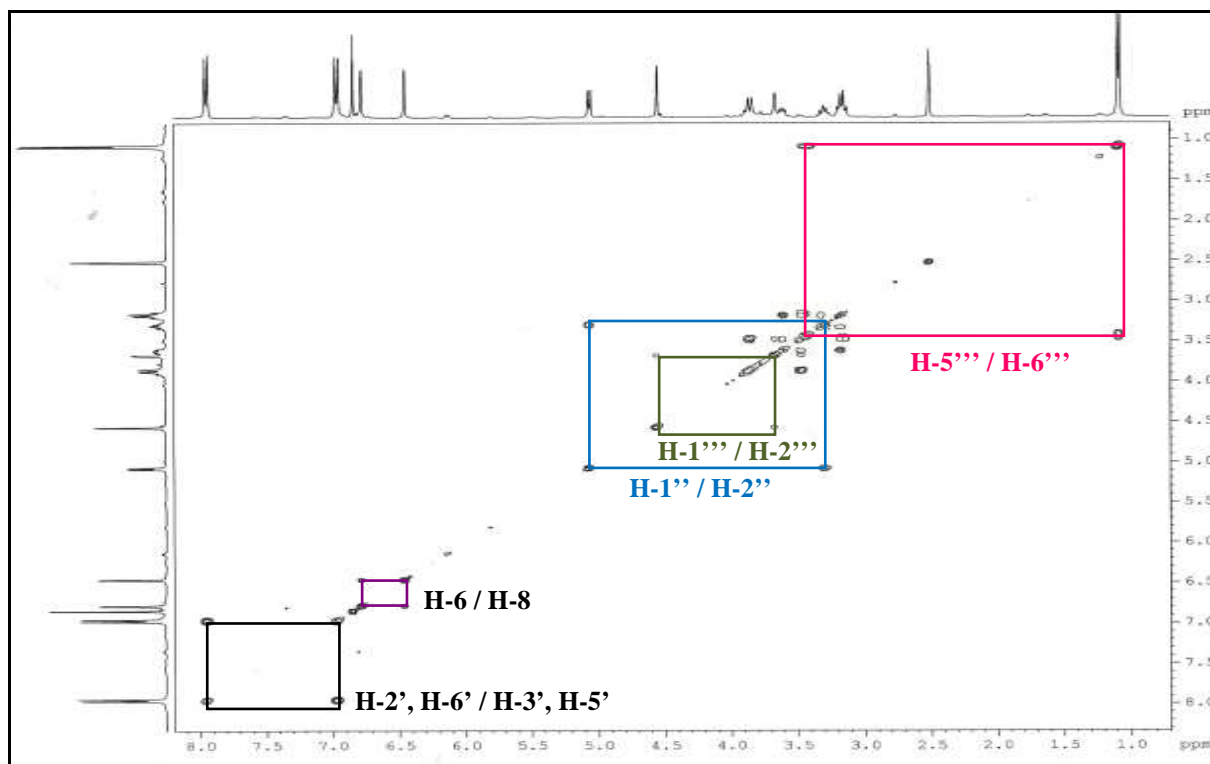


FIGURA 4.11 - Mapa de contorno COSY da Apigenina-7-O-rutinosídeo (F6) (DMSO, 400 MHz).

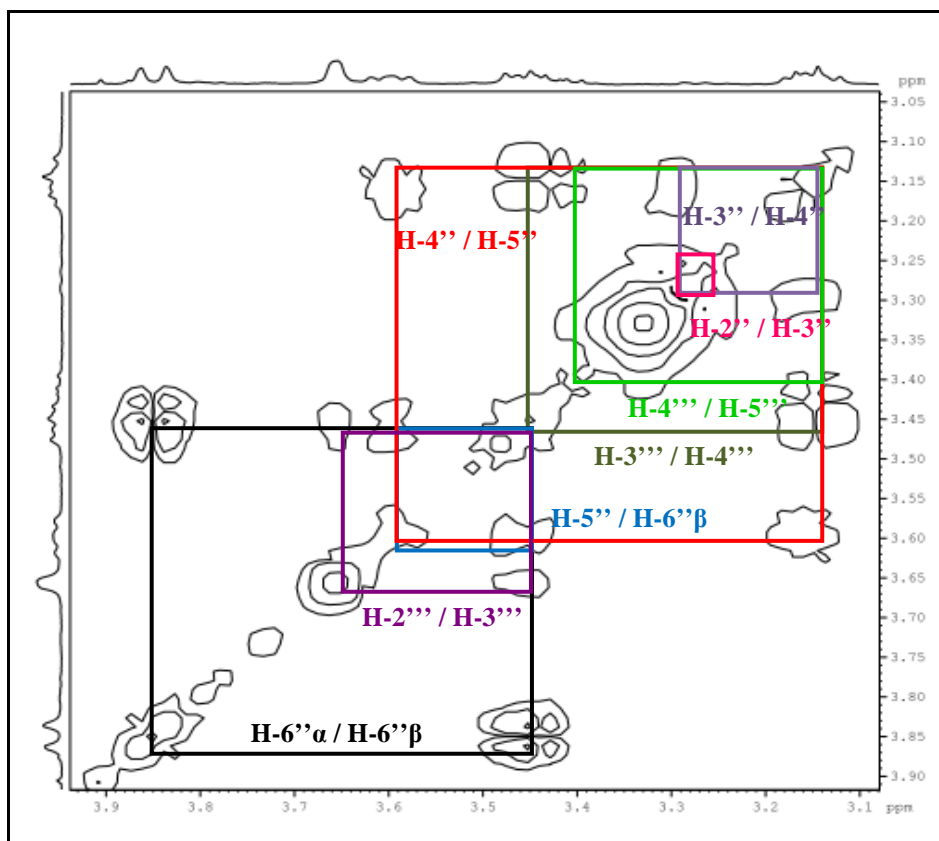


FIGURA 4.12 - Ampliação do mapa de contorno COSY da Apigenina-7-O-rutinosídeo (11) (DMSO, 400 MHz).

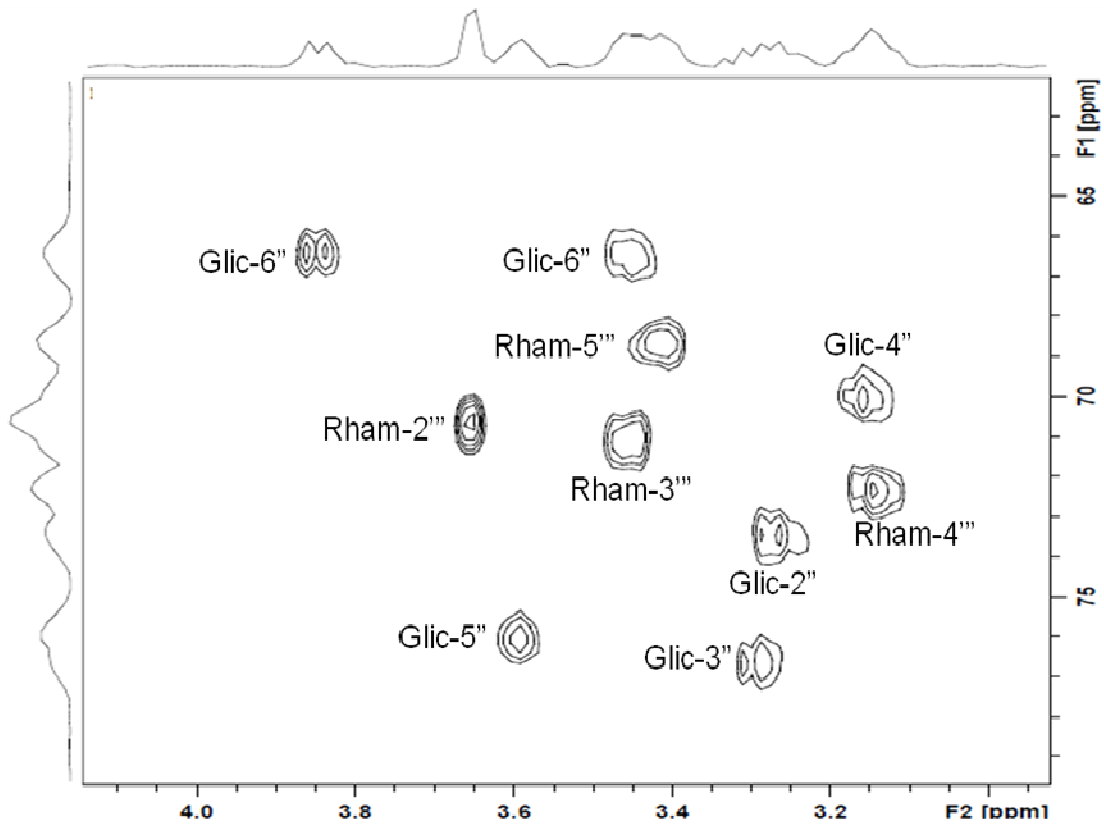


FIGURA 4.13 – Mapa de contorno HSQC da Apigenina-7-O-rutinosídeo (11) (400 MHz)

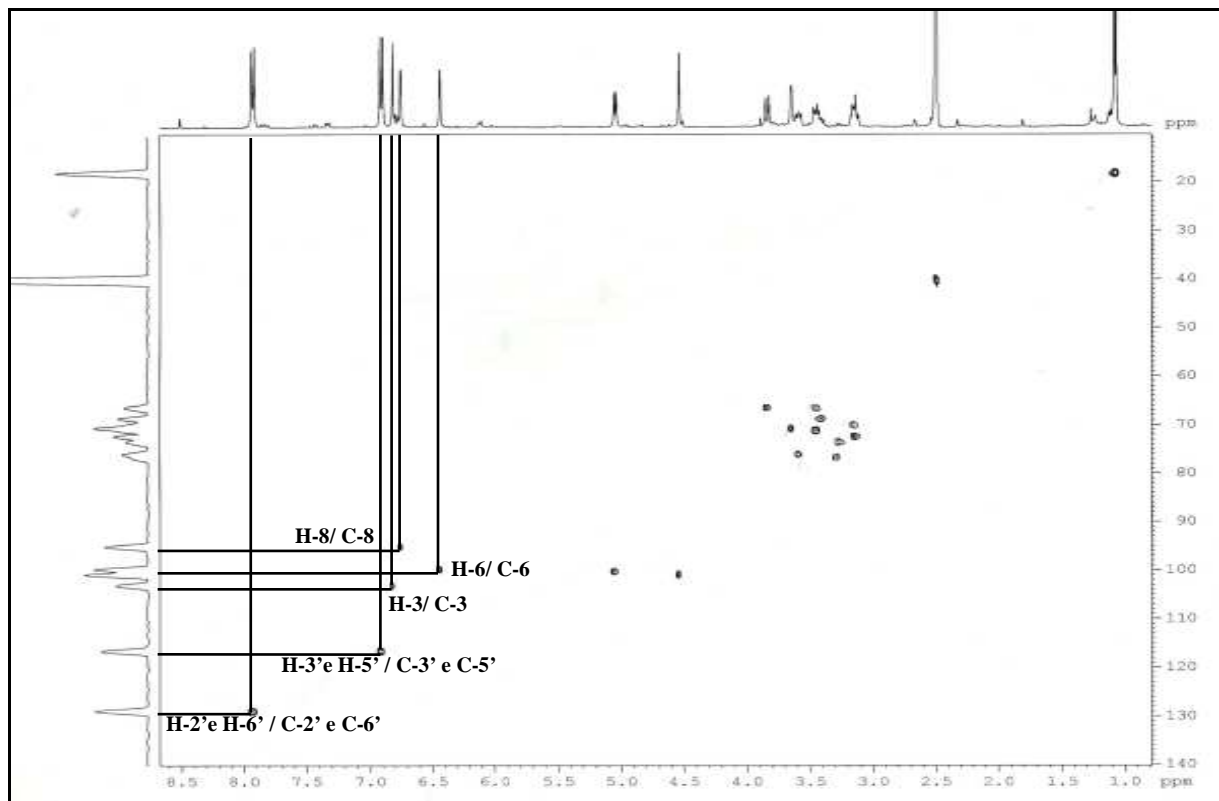


FIGURA 4.14 - Espectro de HSQC da Apigenina-7-O-rutinosídeo (F6) (DMSO, 400 MHz).

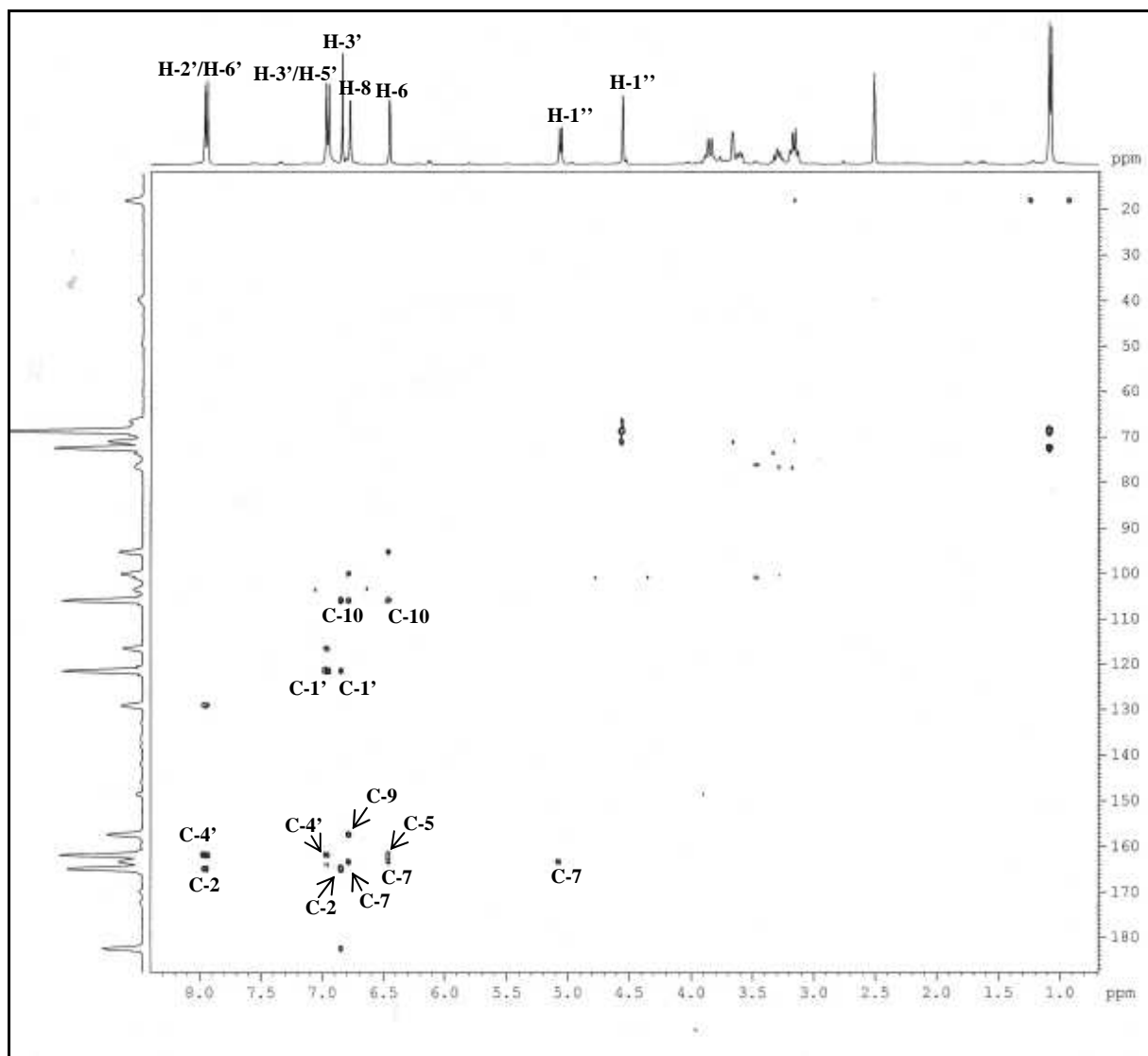
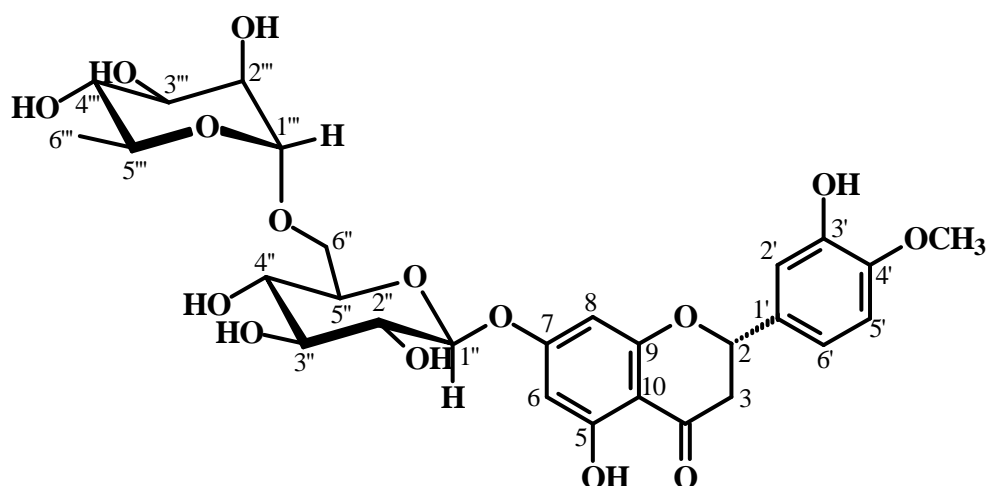


FIGURA 4.15 - Espectro de HMBC da Apigenina-7-O-rutinosídeo (**F6**) (DMSO, 400 MHz).

4.4.2.2 - Determinação estrutural de F7:



Hesperidina

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C permitiu caracterizar a substância **F7** como a flavanona Hesperidina. A confirmação desta estrutura foi obtida através de comparação dos deslocamentos químicos com valores descritos na literatura (PIZZOLATTI, et al., 2003).

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.16) apresenta os seguintes sinais na região de hidrogênios alifáticos: δ 3,24 (dd, $J=14,0$ e $12,6$ Hz), δ 2,72 (dd, $J=14,0$ e $3,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ 5,20, ($J=12,6$ e $3,0$ Hz), que acoplam entre si, atribuídos aos hidrogênios H-3 α , H-3 β e H-2, respectivamente. O acoplamento geminal entre os hidrogênios alifáticos H-3 α e H-3 β e o acoplamento deles com o hidrogênio H-2 é observado no mapa de contorno COSY (FIGURA 4.18). O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.19) corrobora com o exposto anteriormente, uma vez que apresenta sinais de uma carbonila referente ao C-4 em δ 197,0 e o Csp 3 (CH $_2$) em δ 42,0, referente ao C-3 da flavanona.

A presença de anel A 5,7-dioxigenado foi reconhecida pelos dois dubletos em δ 6,12 (H-6) e 6,14 (H-8) com $J=1,8$ Hz, revelados pelo espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.16). O sinal observado em δ 3,86 com integração para três hidrogênios indica a presença de um grupamento metoxilíco. A presença de dois resíduos de açúcar na estrutura desta substância foi confirmada devido a

observação dos sinais em δ 4,52 (*s*) e δ 4,97 (*d*, $J = 7,2$ Hz) que são característicos de hidrogênios anoméricos atribuídos a H-1''' e H-1'', respectivamente. Os demais hidrogênios carbinólicos da unidade glucosídica estão entre δ 3,20-3,90 e o dubleto em δ 0,96 (3H, H-6'', $J = 6,0$ Hz) é correlacionado a metila de uma unidade de ramnose. A ligação de junção das duas unidades de açúcar foi confirmada como sendo 7-O-rutinosídeo (1''' \rightarrow 6'') devido ao deslocamento químico de CH₂-6'' (δ 66,4), característico desta união (DE CARVALHO, et al. 1999).

O multipletto centrado em δ 6,95 observado no espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.16) foi correlacionado com os hidrogênios aromáticos H-2', H-5' e H-6', sugerindo a presença no anel B de 3'-hidroxi-4'-metoxi- ou 4'-hidroxi-3'-metoxi-. Outros sinais observados no espectro foram atribuídos aos hidrogênios HO-3' (δ 9,14), HO-5 (δ 12,02, hidroxila quelatogênica). A principal dificuldade enfrentada para caracterizar a estrutura deste flavonoide glicosilado, utilizando principalmente os dados de RMN ¹³C (FIGURA 4.19), envolveu a confirmação dos grupos hidroxílicos e metoxílicos nos átomos de carbono C-3' e C-4', podendo a aglicona correspondente ser caracterizada como hesperidina (3',5,7-triidroxi-4'-metoxiflavanona) ou seu isômero homoeriodictiol (4',5,7-triidroxi-3'-metoxiflavanona). A comparação dos δ_C (em DMSO) dos átomos de carbono totalmente substituídos C-1' (δ 130,9), C-3' (δ 146,4), C-4' (δ 147,9) e metínicos CH-2' (δ 114,1), CH-5' (δ 112,0), CH-6' (δ 118,0) da flavanona glucosídica isolada com dados descritos na literatura para a hesperidina revelou dados praticamente idênticos, evidenciando ser a mesma substância (PIZZOLATTI, et. al., 2003).

TABELA 4.3 - Dados de RMN 1H e 13C de Hesperidina (F7) juntamente com os dados descritos na literatura (PIZZOLATTI, et al., 2003) para F7.

C	13		13 (Lit.)	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
4	-	197,0	-	197,1
5	-	165,1	-	165,3
7	-	163,0	-	163,2
9	-	162,5	-	162,6
10	-	103,3	-	103,5
1'	-	130,9	-	131,0
3'	-	146,4	-	146,2
4'	-	147,9	-	148,1
CH				
2	5,50 <i>dd</i> (12,6 e 3,0)	78,4	5,50 <i>d</i> (12,1 e 3,3)	78,6
6	6,12 <i>d</i> (1,8)	96,4	6,12 <i>d</i> (2,1)	96,8
8	6,14 <i>d</i> (1,8)	95,5	6,14 <i>d</i> (2,1)	95,7
2'	6,91 <i>m</i>	114,1	6,75-6,95 <i>m</i>	114,3
5'	6,91 <i>m</i>	112,0	6,75-6,95 <i>m</i>	112,0
6'	6,91 <i>m</i>	118,0	6,75-6,95 <i>m</i>	118,1
1''	4,97 <i>d</i> (7,2)	100,6	4,98 <i>d</i> (7,3)	100,7
2''	3,20-4,90 <i>m</i>	73,0	3,20-3,90 <i>m</i>	73,1
3''	3,20-4,90 <i>m</i>	76,3	3,20-3,90 <i>m</i>	76,4
4''	3,20-4,90 <i>m</i>	69,6	3,20-3,90 <i>m</i>	69,9
5''	3,20-4,90 <i>m</i>	75,5	3,20-3,90 <i>m</i>	75,6
1'''	4,52 <i>s</i>	99,4	4,50 <i>s</i>	99,8
2'''	3,20-4,90 <i>m</i>	70,3	4,50 <i>s</i>	70,6
3'''	3,20-4,90 <i>m</i>	70,7	3,20-3,90 <i>m</i>	70,9
4'''	3,20-4,90 <i>m</i>	72,1	3,20-3,90 <i>m</i>	72,3
5'''	3,20-4,90 <i>m</i>	68,3	3,20-3,90 <i>m</i>	68,4
CH₂				
3 α	3,24 <i>dd</i> (14,0 e 12,6)	42,0	3,25 <i>m</i>	42,1
3 β	2,72 <i>dd</i> (14,0 e 3,0)		2,78 <i>dd</i> (17,1 e 3,3)	
6''	3,20-4,90 <i>m</i>	66,4	3,20-3,90 <i>m</i>	66,5
CH₃				
6'''	0,96 <i>d</i> (6,0)	17,8	1,10 <i>d</i> (6,8)	17,9
MeO-4'	3,86 <i>s</i>	55,7	3,85 <i>s</i>	55,9
HO-5	12,02 <i>s</i>	-	12,00 <i>s</i>	-
HO-3'	9,14 <i>s</i>	-	9,10 <i>s</i>	-

^a DMSO, 400 MHz^b DMSO, 200 MHzValores de *J*, entre parênteses, em Hz

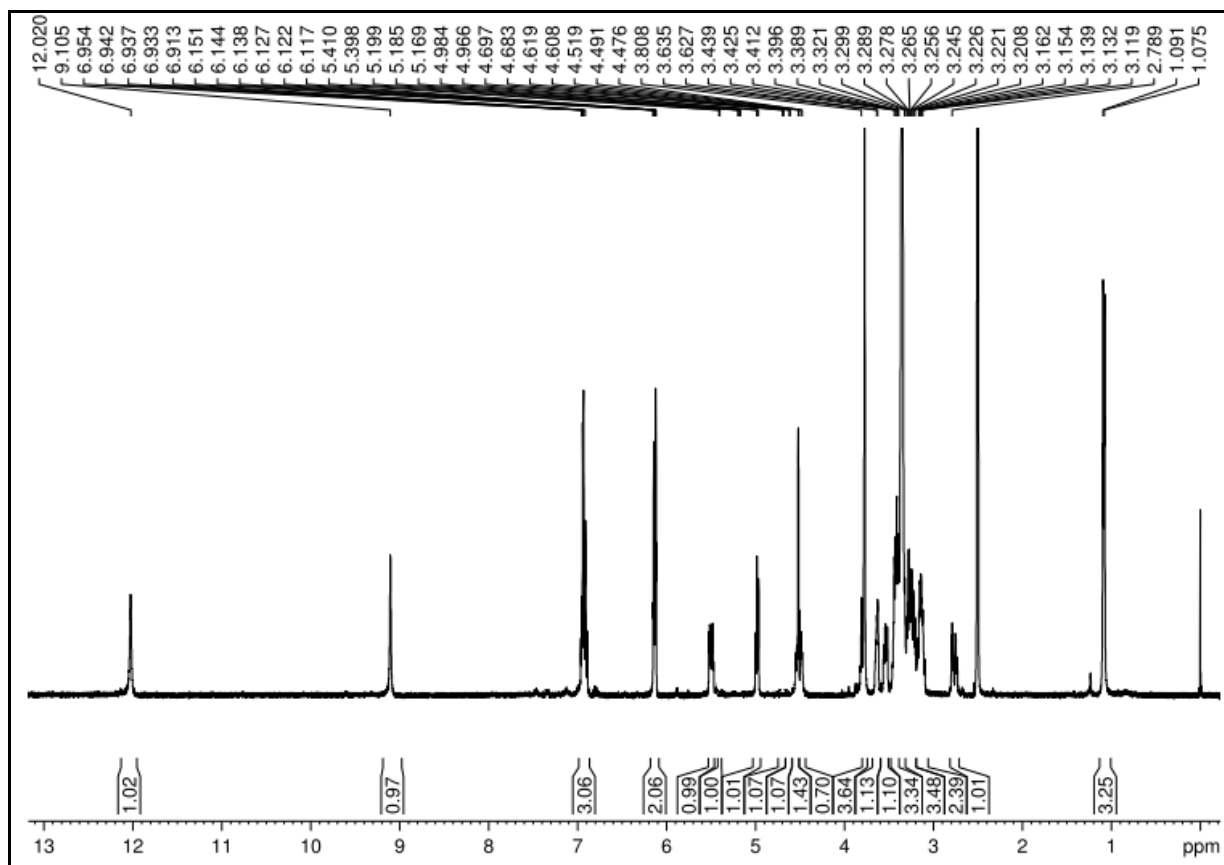


FIGURA 4.16 - Espectro de RMN ^1H da hesperidina (F7) (400 MHz, DMSO)

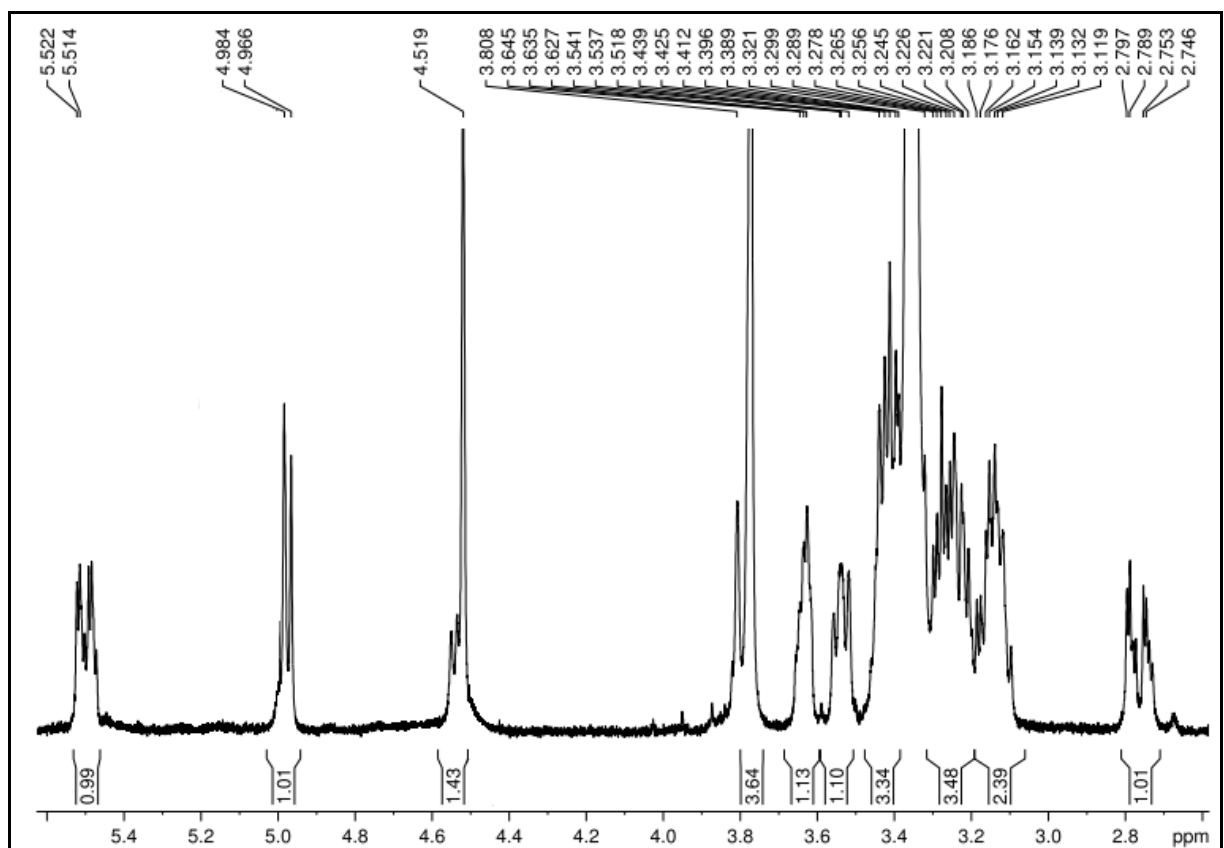


FIGURA 4.17- Ampliação do espectro de RMN ^1H de F7 (400 MHz, DMSO).

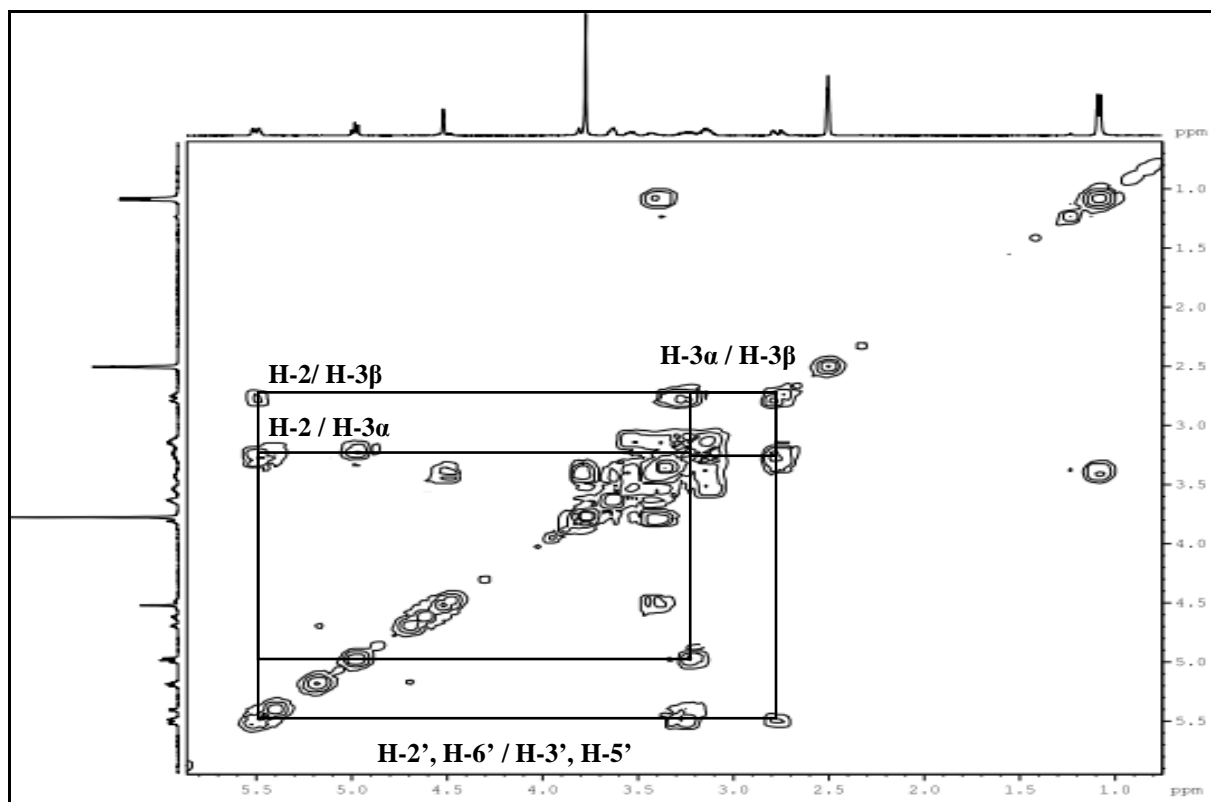


FIGURA 4.18 - Ampliação do mapa de contorno COSY da Hesperidina (F7) (400 MHz, DMSO).

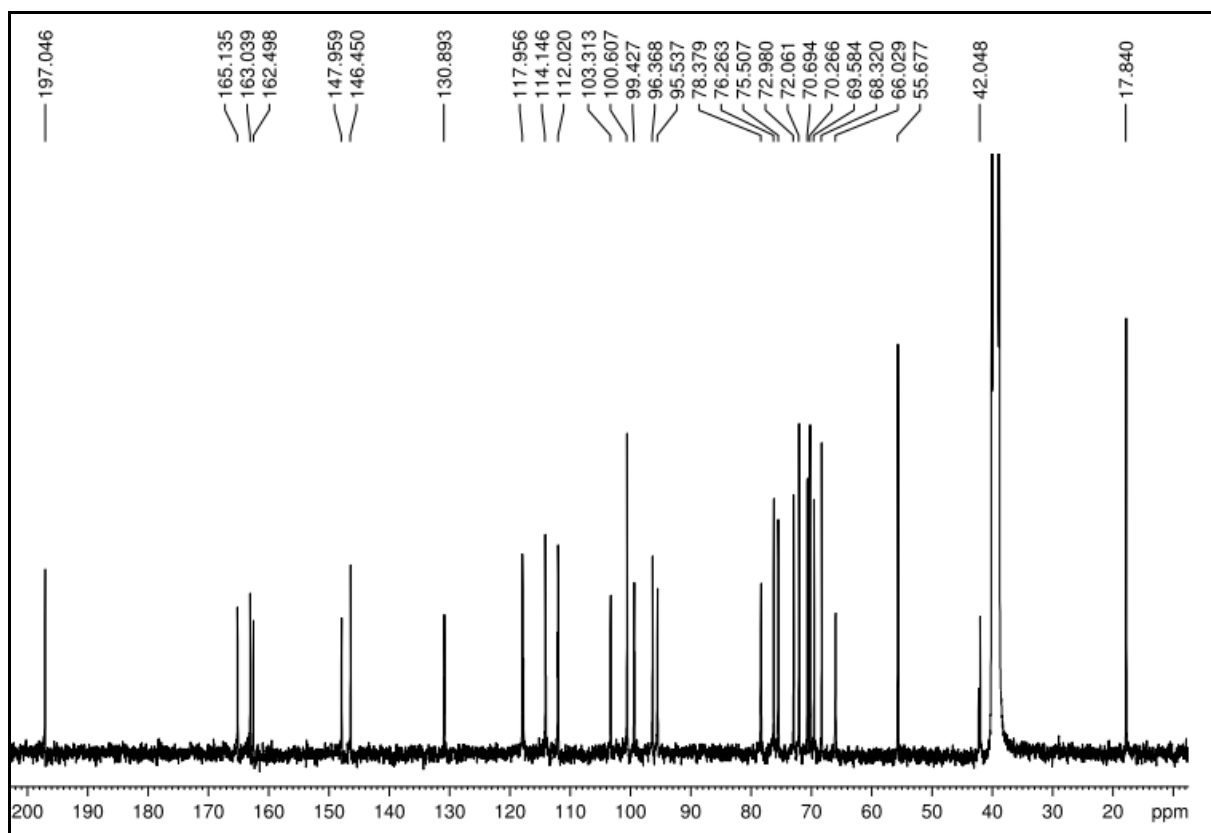


FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ¹³C da hesperidina (F7) (100 MHz, DMSO).

4.5 - Limonoides

Os limonoides foram descritos pela 1^o vez em 1864 (Emerson, 1947), são triterpenos modificados altamente oxigenados, observados nas famílias Rutaceae, Meliaceae e outras famílias relacionadas (BENNETT, e HASEGAWA, 1982; HASHINAGA, et. al., 1990), onde se incluem frutos comestíveis, tais como as laranjas, as tangerinas, os limões e as limas. A limonina e a nomilina são os limonoides mais abundantes dentro de Citros (KELLY, 2003). Muitos estudos têm mostrado que limonoides observados em citros são biologicamente ativos, exibindo atividade anticarcinogênica (HASEGAWA, et al., 1994). Limonina e Nomilina *in vitro* provaram ter uma significativa capacidade para inibir a proliferação de câncer de mama (SUN, 2005; KELLY, 2003).

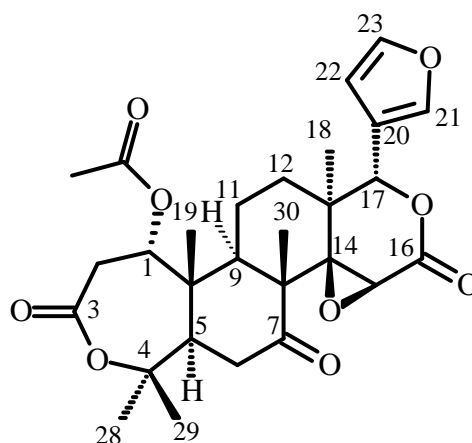
4.5.1 - Determinação estrutural de L1

Os espectros de RMN ^1H (FIGURA 4.20) e ^{13}C (FIGURA 4.21) da substância **L1** mostraram sinais característicos do anel furano β -substituído, δ 7,42 (*tl*, $J = 1,7$ Hz, H-21), 7,40 (*tl*, $J = 1,7$ Hz, H-23), 6,34 (*dd*, $J = 1,7$ e 0,7 Hz, H-22), δ 120,0 (C-20), 141,0 (C-21), 109,6 (C-22) e 143,2 (C-23). O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.20) ainda mostrou cinco singletos intensos com integração para três hidrogênios em δ 1,08 (Me-18), 1,32 (Me-19), 1,16 (Me-28), 1,46 (Me-29) e 1,54 (Me-30) referentes a grupos metila ligados a carbono sp^3 e uma metila em δ 1,99, característica da metila de um grupo acetato. O anel 14,15 epóxi *D*-lactona foi caracterizado pelos sinais singletos em δ 5,43 (H-17) e δ 3,79 (H-15). A presença de uma carbonila em C-7 (δ 206,1) foi sugerida devido a presença dos hidrogênios com deslocamento característico do anel B em δ 2,55 (1H, *dd*, $J = 15,0$ e 3,6, H-5), δ 2,59 (1H, *dd*, $J = 15,0$ e 3,6, H-6_{eq}) e δ 2,76 (1H, *t*, $J = 15,0$, H-6_{ax}) e como não foi observado nenhum outro acoplamento para estes hidrogênios, isto sugere um carbono completamente substituído vizinho aos hidrogênios em C-6.

Os sinais dos hidrogênios não equivalentes em H-11 aparecem como um multipeto em δ 1,77 e através do mapa de contorno COSY (FIGURA 4.22) foi possível observar o seu acoplamento com H-9 em δ 2,47 (1H, *dd*, $J = 9,0$ e $4,2$) e com H-12 em δ 1,61 (2H, *m*).

A análise do espectro de RMN ^{13}C mostra a presença de duas outras carboxilas que ainda não foram atribuídas, uma delas trata-se de um grupo acetato em C-1, evidenciado pela metila em δ 1,99 e a presença da outra indica a expansão do anel A através de uma reação de Baeyer-Villiger, reação bastante comum nos tetranortriterpenos (FANG, et al., 2011). O acoplamento dos hidrogênios em δ 3,10 (1H, *dd*, $J = 15,6$ e $7,2$, H-2_{eq}), δ 3,21 (1H, *dd*, $J = 15,6$ e $1,2$, H-2_{ax}) e destes com um hidrogênio em δ 5,00 (1H, *d*, $J = 7,2$, H-1) foram observados no mapa de contorno COSY (FIGURA 4.22), sendo atribuídos aos hidrogênios do anel A-seco.

Com base nestes dados e comparação com a literatura, esta substância foi identificada como o limonoide nomilina, através de comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , que estão ilustrados na TABELA 4.4, com os encontrados na literatura para esta substância (POULOSE, et al., 2007) e também a partir da comparação da rotação específica deste composto ($[\alpha_D]^{25} - 123,02$) com o descrito na literatura para Nomilina (ZHANG, et al., 2006).



Nomilina (L1)

TABELA 4.4 - Dados de RMN 1H e 13C da Nomilina (L1) juntamente com os dados encontrados na literatura (POULOSE, et al., 2007).

C	L1		L1 (Lit)	
	δ_H^a <i>mult</i>	δ_C^b	δ_H^c <i>mult</i>	δ_C^d
1	5,00 <i>d</i> (7,2)	70,7	4,99 <i>d</i> (7,2)	70,6
2 ax	3,10 <i>dd</i> (15,6 e 7,2)	35,3	3,07 <i>dd</i> (15,6 e 7,2)	35,2
2 eq	3,21 <i>dd</i> (15,6 e 1,2)		3,20 <i>dd</i> (15,6 e 1,2)	
3	-	169,1	-	169,1
4	-	84,4	-	84,3
5	2,55 <i>dd</i> (15,0 e 3,6)	51,0	2,56 <i>dd</i> (15,0 e 3,6)	50,9
6 ax	2,76 <i>t</i> (15,0)	38,8	2,71 <i>t</i> (15,0)	38,2
6 eq	2,59 <i>dd</i> (15,0 e 3,6)		2,57 <i>dd</i> (15,0 e 3,6)	
7	-	206,7	-	206,7
8	-	52,8	-	52,7
9	2,47 <i>dd</i> (9,0 e 4,2)	44,3	2,45 <i>dd</i> (9,0 e 4,2)	44,3
10	-	44,1	-	44,0
11	1,77 <i>m</i>	17,1	1,77 <i>m</i>	17,0
12	1,62 <i>m</i>	32,3	1,61 <i>m</i>	32,1
13	-	37,4	-	37,3
14	-	65,4	-	65,3
15	3,79 <i>s</i>	53,3	3,77 <i>s</i>	53,2
16	-	166,7	-	166,7
17	5,44 <i>s</i>	78,0	5,43 <i>s</i>	77,9
18	1,08 <i>s</i>	20,7*	1,07 <i>s</i>	20,7
19	1,32 <i>s</i>	16,5	1,31 <i>s</i>	16,4
20	-	120,0	-	119,6
21	7,42 <i>tl</i> (0,7)	143,2	7,39 <i>m</i>	143,1
22	6,34 <i>dd</i> (1,7 e 0,7)	109,6	6,31 <i>t</i> (1,2)	109,5
23	7,40 <i>tl</i> (1,7)	140,9	7,39 <i>m</i>	140,9
28	1,16 <i>s</i>	17,0	1,16 <i>s</i>	16,9
29	1,46 <i>s</i>	33,4*	1,44 <i>s</i>	33,3
30	1,54 <i>s</i>	23,3	1,54 <i>s</i>	23,2
C=O	-	169,2	-	169,1
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$	1,99 <i>s</i>	20,8	1,99 <i>s</i>	20,7

^a CDCl₃, 400 MHz^b CDCl₃, 100 MHz^c CDCl₃, 200 MHz^d CDCl₃, 50 MHzValores de *J*, entre parênteses, em Hz.

* Intercambiáveis.

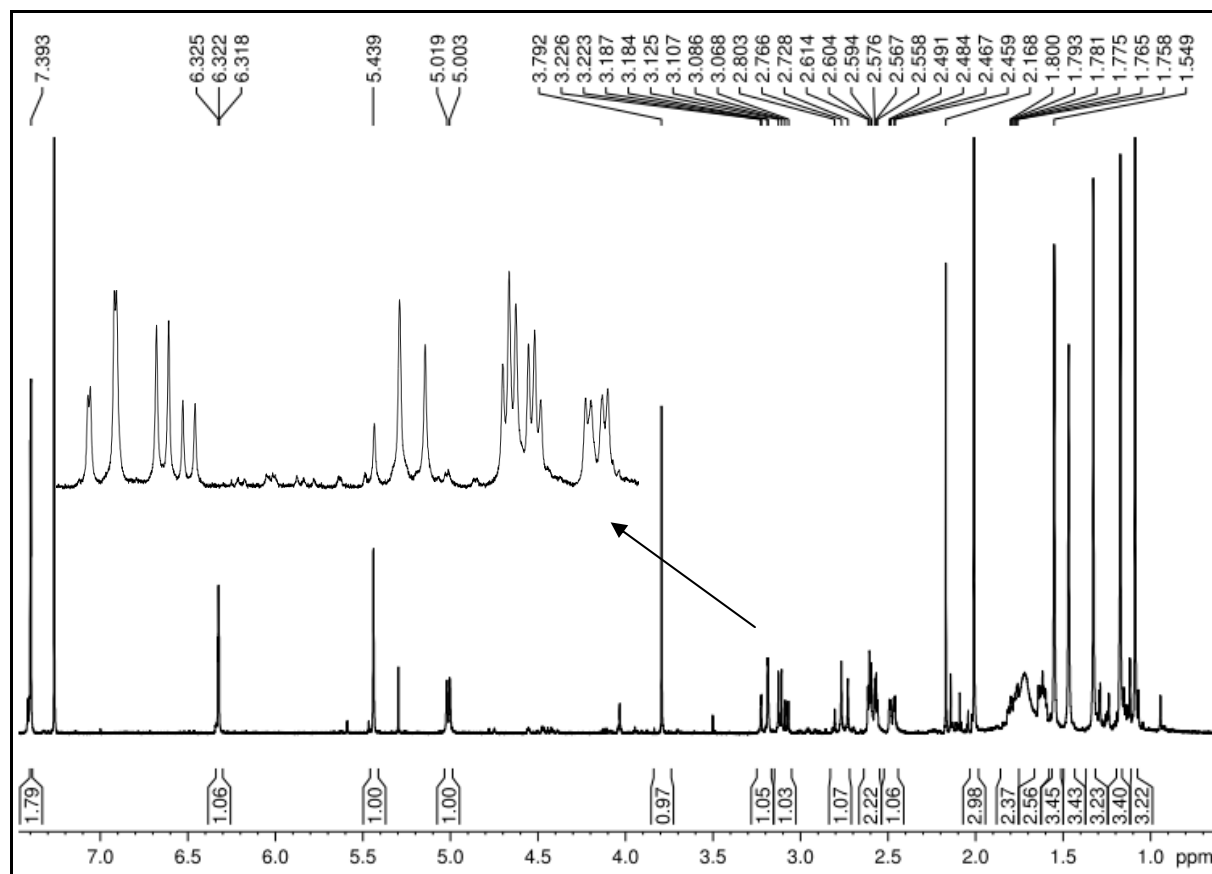


FIGURA 4.20 - Espectro de RMN ^1H da Nomilina (L1) (400 MHz).

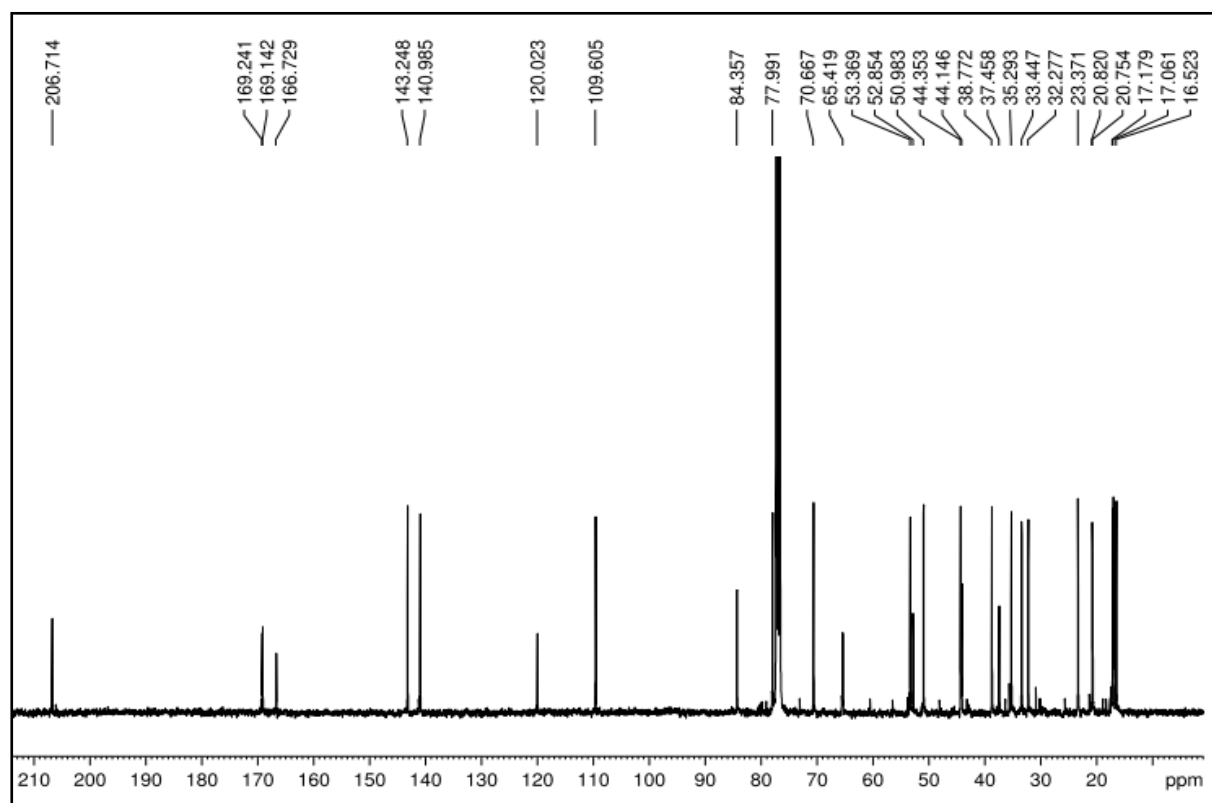


FIGURA 4.21 - Espectro de RMN ^{13}C da Nomilina (L1) (100 MHz).

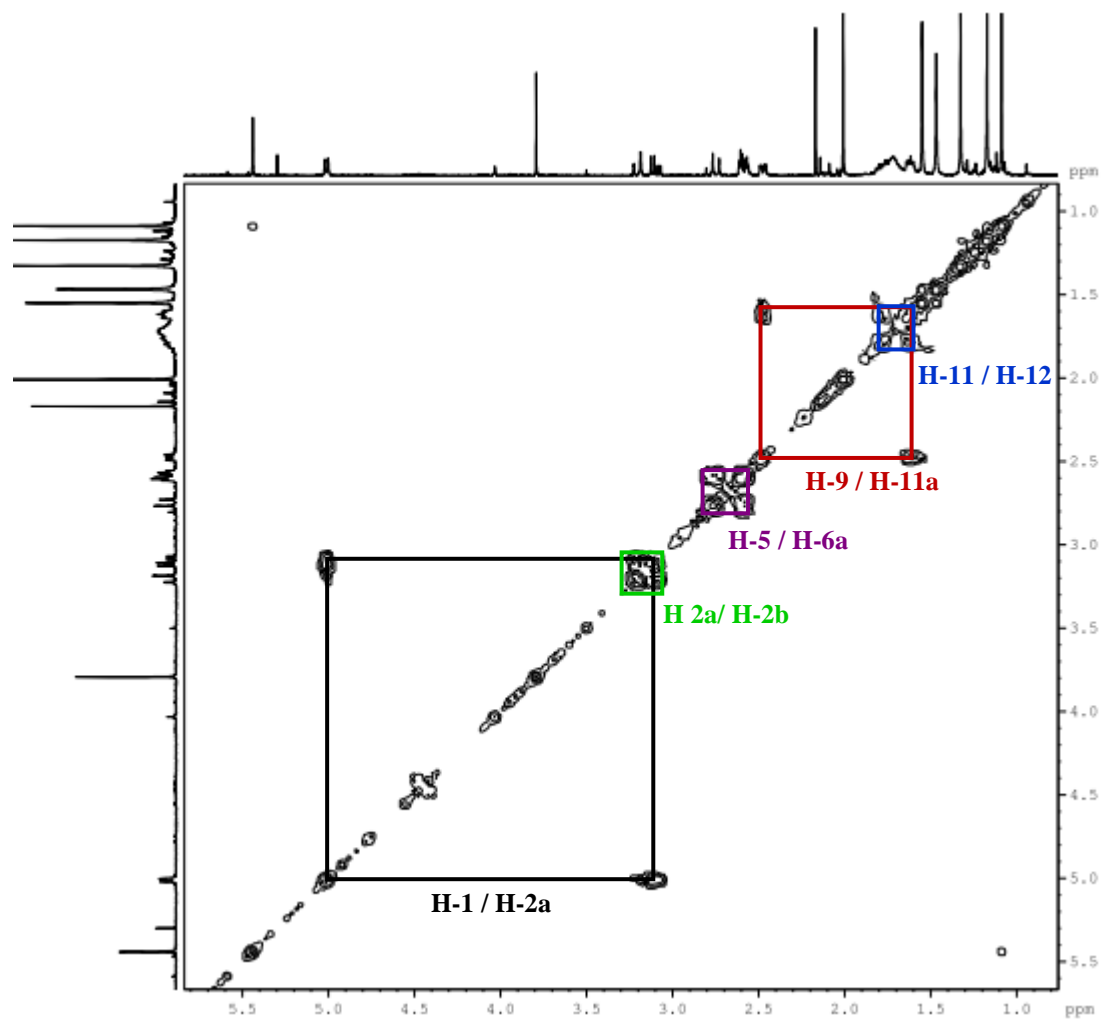


FIGURA 4.22 - Mapa de contorno COSY da Nomilina (L1) (400 MHz).

4.5.2 Determinação estrutural de L2

O composto **L2**, segundo limonóide isolado, apresenta propriedades espectroscópicas semelhantes a Nomilina. Na análise do espectro de RMN ^1H de **L2** (FIGURA 4.23) também foram observados os sinais característicos de hidrogênios do anel furano, os sinais em δ 7,40 (*tl*, $J = 0,7$ Hz, H-21) e 7,38 (*tl*, $J = 1,7$ Hz, H-23), relativos os hidrogênios H-21 e H-23 e um dubleto em δ 6,33 ($J = 0,7$ e 1,7 Hz) assinalado para H-22. No espectro de RMN ^{13}C de **L2** (FIGURA 4.26) o anel furano foi caracterizado pelos sinais em δ 109,6 (C-22), δ 120,0 (C-20), δ 141,1 (C-21) e δ 143,2 (C-23). O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.23) evidenciou a presença de singletos em δ 1,06 (Me-30); δ 1,16 (Me-29); δ 1,17 (Me-18) e δ 1,28 (Me-28), relativos a metilas ligadas a carbono terciário. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.23) mostrou ainda a presença de dois singletos em δ 4,02 e δ 5,55 atribuídos a H-15 e H-17, respectivamente caracterizando o anel 14,15 epóxi *D*-lactona.

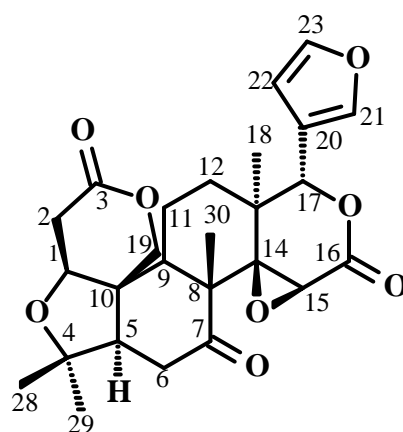
Outra semelhança espectroscópica com a Nomilina refere-se a uma carbonila em C-7 (δ 206,1), atribuição devido ao acoplamento observado no mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (FIGURA 4.25) dos hidrogênios em δ 2,56 (1H, *dd*, $J = 15,0$ e 3,6, H-5), δ 2,57 (1H, *dd*, $J = 15,0$ e 3,6, H-6_{eq}) e δ 2,71 (1H, *t*, $J = 15,0$, H-6_{ax}), indicando carbono completamente substituído vizinho aos hidrogênios no C-6.

Os hidrogênios metilênicos em C-11 ressonam em δ 1,78 e δ 1,90 e o mapa de contorno COSY (FIGURA 4.25) mostrou acoplamentos do sinal δ 1,90 com o sinal de H-9 (δ 2,55, *dd*, $J = 12,2$ e 2,8) e do sinal em δ 1,78 com o sinal de H-12 (δ 1,51), sendo que os hidrogênios metilênicos H-12 foram observados em δ 1,51 e δ 1,84.

A presença de sinais em δ 4,77 (*dd*, $J = 13,0$ e 0,6 Hz) e δ 4,47 (*d*, $J = 13,0$ Hz), atribuídos aos hidrogênios geminais do C-19, sugerem tratar-se de um limonóide com o anel A-seco. O sinal de carbono em δ 169,1, observado no espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.26), foi uma boa indicação da presença de um

grupo carboxil em C-19. Os sinais atribuídos aos hidrogênios presentes em C-2 foram observados em δ 2,66 (1H, *dd*, $J = 16,8, 1,5$, H-2, a) e δ 2,97 (1H, *dd*, $J = 16,8, 3,3$, H-2 b) e através da análise do mapa de contorno COSY (FIGURA 4.24) foi possível observar o acoplamento destes com H-1 em δ 4,03 *sl* e a multiplicidade dos hidrogênios em C-2 indica a presença de um centro quiral em C-1, que foi atribuído a presença do anel lactônico geminado ao anel A oxigenado, pois para o fechamento da estrutura é necessário a atribuição das metilas Me-28 e Me-29 em C-4.

A estrutura da substância **L2** foi definida como sendo o limonóide Limonina, característico do gênero *Citrus* (Rutaceae) (ROY e SARAF, 2006). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C estão listados na TABELA 4.5, juntamente com os dados descritos na literatura para a Limonina (RIBEIRO et al., 2005).



Limonina (**L2**)

TABELA 4.5 - Dados de RMN 1H e 13C da limonina (L2) juntamente com os dados encontrados na literatura (RIBEIRO et. al., 2005).

C	L2		L2 (Lit)	
	δ_H^a <i>mult</i>	δ_C^b	δ_H^c <i>mult</i>	δ_C^d
1	4,04 <i>s</i>	79,1	4,03 <i>sl</i>	79,1
2	2,66 <i>dd</i> (16,8 e 1,5)	35,6	2,66 <i>dd</i> (16,8 e 1,8)	35,7
2	2,97 <i>dd</i> (16,8 e 3,3)		2,98 <i>dd</i> (16,8 e 3,8)	
3	-	169,1	-	169,1
4	-	80,3	-	80,4
5	2,21 <i>dd</i> (15,8 e 3,2)	60,5	2,23 <i>dd</i> (15,8 e 3,2)	60,4
6 ax	2,84 <i>dd</i> (15,8 e 14,5)	36,4	2,85 <i>d</i> (15,8)	36,3
6 eq	2,48 <i>dd</i> (14,5 e 3,2)		2,46 <i>dd</i> (15,8 e 3,2)	
7	-	206,1	-	206,1
8	-	51,3	-	51,3
9	2,55 <i>dd</i> (12,2 e 2,8)	48,1	2,56 <i>m</i>	48,1
10	-	46,0	-	45,9
11	1,84 <i>m</i>	19,0	1,81 <i>m</i>	18,8
12 ax	1,84 <i>m</i>	30,2	-	30,1
12 eq	1,51 <i>m</i>		1,50 <i>m</i>	
13	-	38,0	-	37,9
14	-	65,6	-	65,6
15	4,03 <i>sl</i>	53,8	4,03 <i>s</i>	53,8
16	-	166,6	-	167,0
17	5,55 <i>s</i>	77,8	5,47 <i>s</i>	77,7
18	1,17 <i>s</i>	20,7*	1,17* <i>s</i>	21,3
19 ax	4,47 <i>d</i> (13,0)	65,3	4,46 <i>d</i> (13,0)	65,3
19 eq	4,77 <i>dd</i> (13,0 e 0,6)		4,47 <i>d</i> (13,0)	
20	-	120,0	-	119,9
21	7,40 <i>tl</i> (0,7)	141,1	7,40 <i>m</i>	141,1
22	6,33 <i>dd</i> (1,7 e 0,7)	109,6	6,35 <i>m</i>	109,8
23	7,38 <i>tl</i> (1,7)	143,2	7,40 <i>m</i>	143,2
28	1,28 <i>s</i>	30,8*	1,33 <i>s</i>	30,8*
29	1,16 <i>s</i>	20,7*	1,17 <i>s</i>	20,7*
30	1,06 <i>s</i>	17,7	1,07* <i>s</i>	17,6

^a CDCl₃, 400 MHz

^b CDCl₃, 100 MHz

^c CDCl₃, 200 MHz

^d CDCl₃, 50 MHz

Valores de *J*, entre parênteses, em Hz.

* Intercambiáveis.

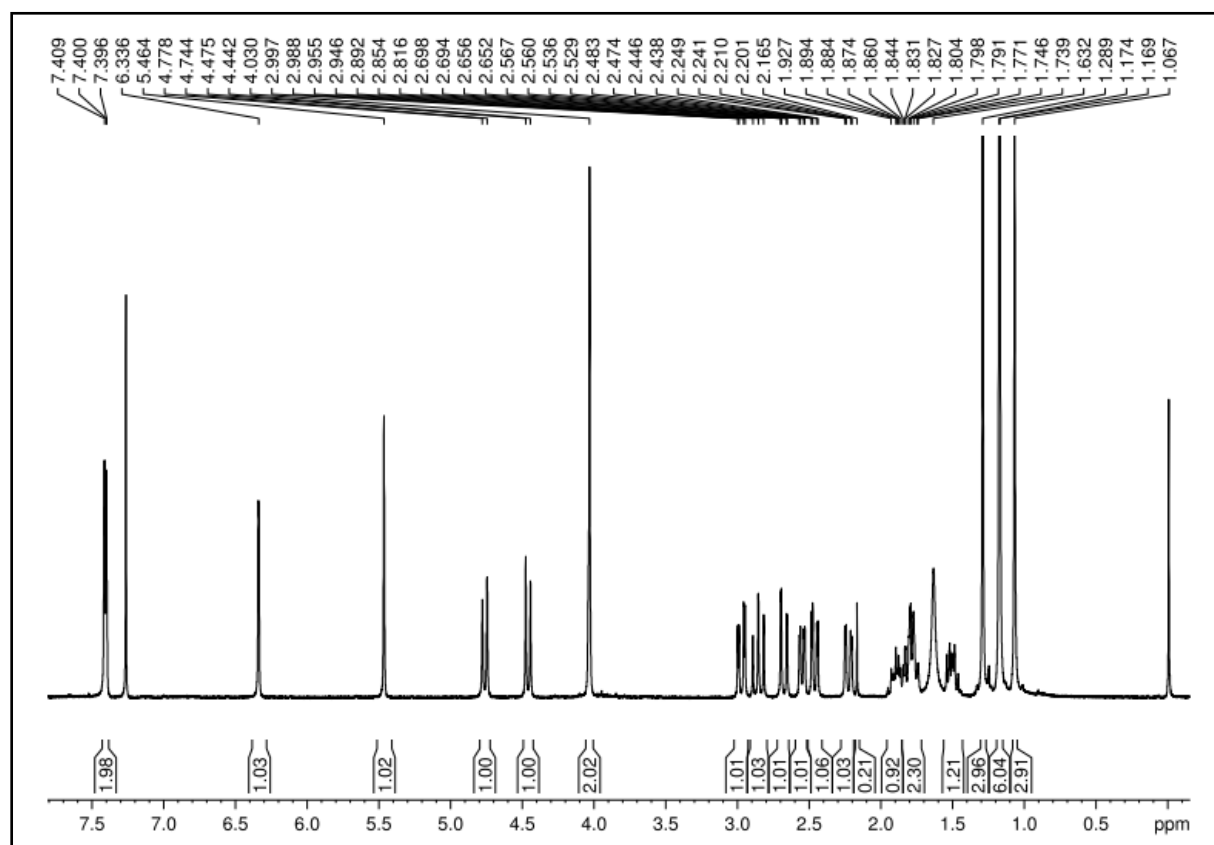


FIGURA 4.23 - Espectro de RMN ^1H da Limonina (**L2**) (400 MHz).

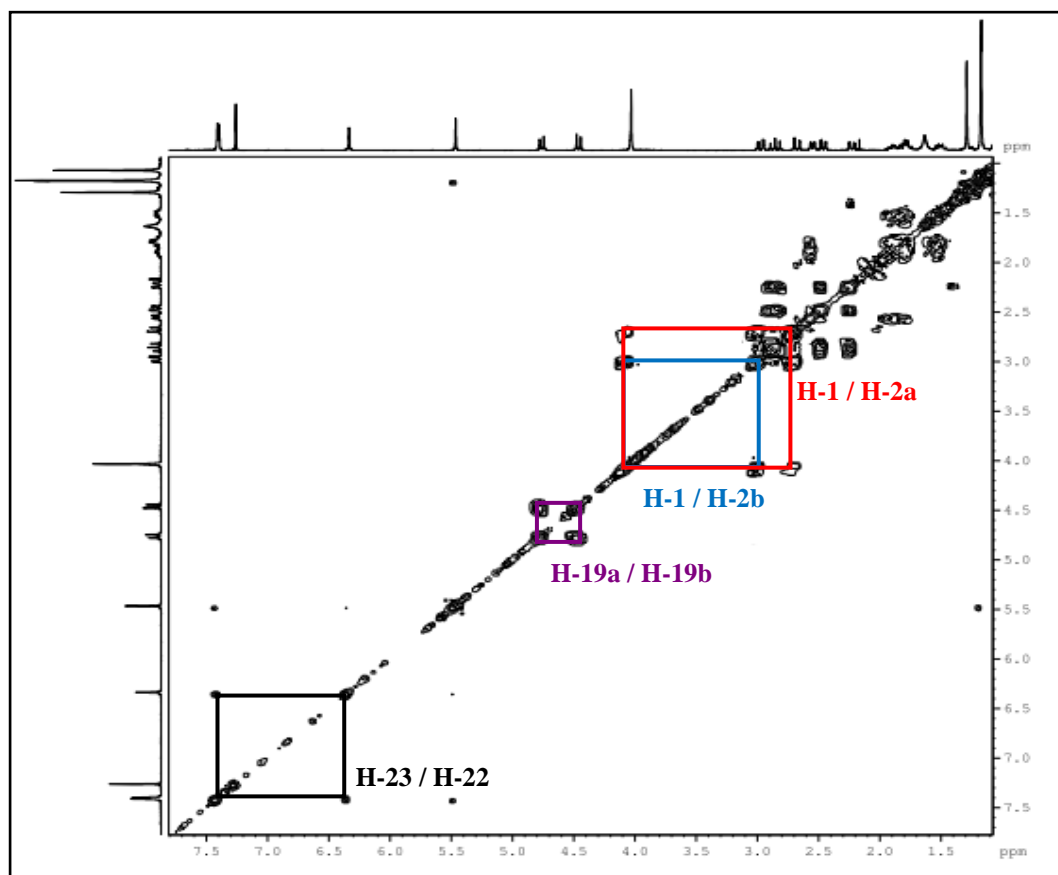


FIGURA 4.24 - Mapa de contorno COSY da Limonina (**L2**) (400 MHz).

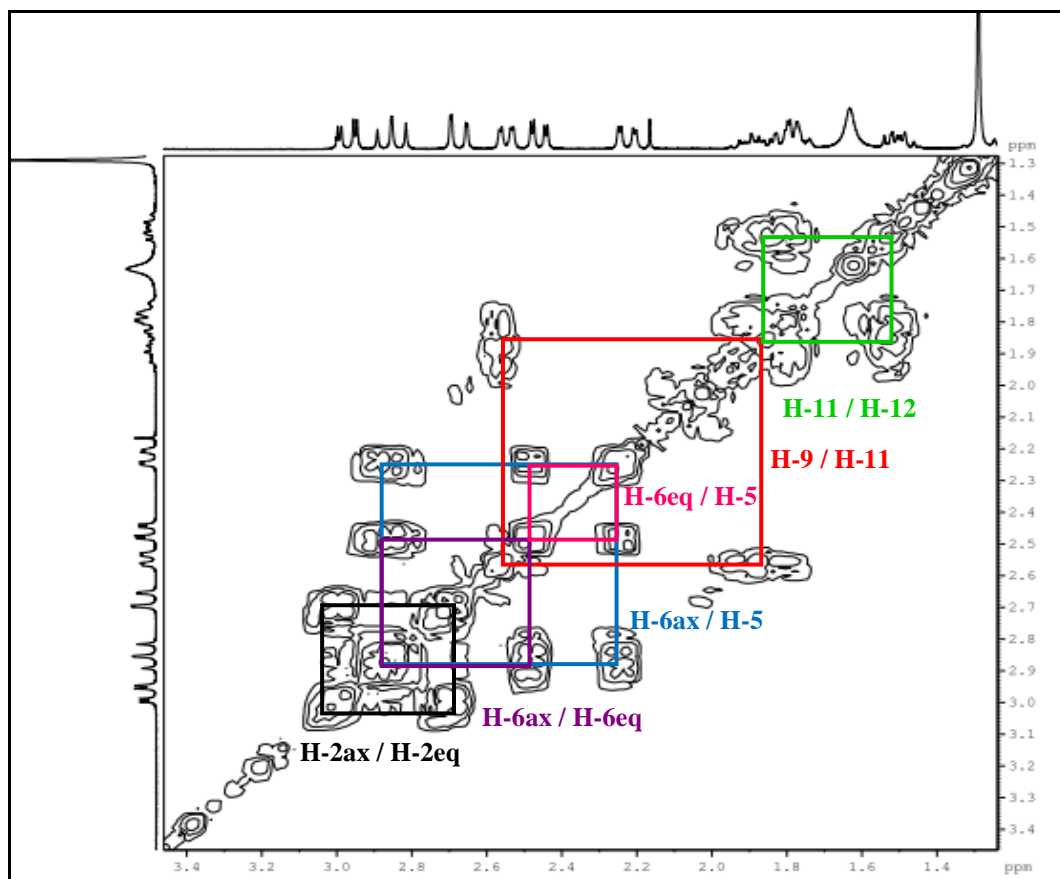


FIGURA 4.25 - Ampliação do mapa de contorno de COSY da Limonina (L2) (400 MHz, CDCl₃)

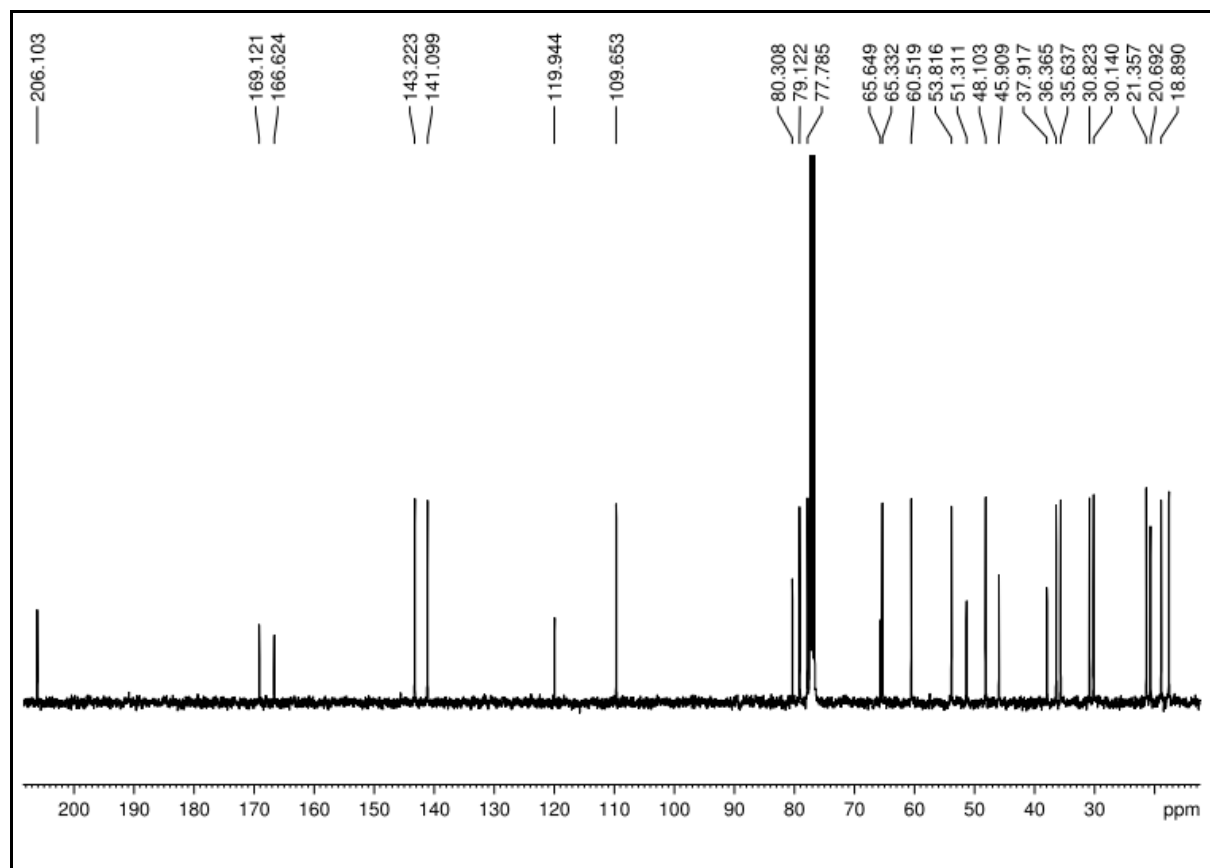
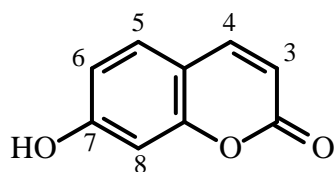


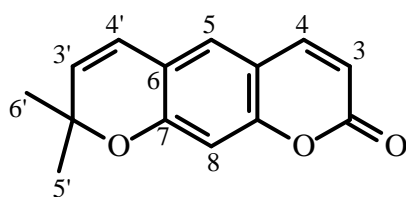
FIGURA 4.26 - Espectro de RMN ¹³C da Limonina (L2) (100 MHz).

4.6 - Cumarinas

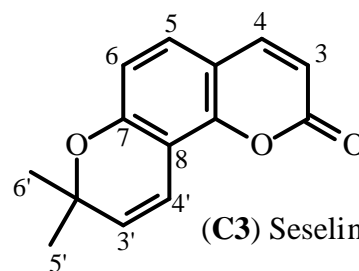
4.6.1 - Determinação estrutural das cumarinas C1-C5:



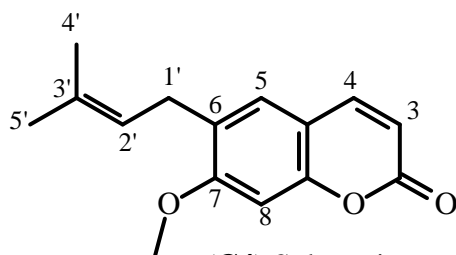
(C1) Umbeliferona



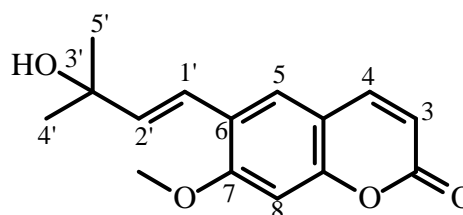
(C2) Xantiletina



(C3) Seselina



(C4) Suberosina



(C5) Suberenol

As cumarinas isoladas são substâncias comumente obtidas em *Citrus* (STANLEY e JURD, 1971), portanto sua identificação estrutural foi feita baseando-se apenas nos deslocamentos de hidrogênios, que estão de acordo com os dados da literatura (DE MELO et al., 2009). As cumarinas apresentam uma fluorescência azulada quando expostas à luz ultravioleta (254 nm) e analisadas por CCDA, tornando-se uma forte característica dessa classe de compostos. Elas apresentam características bastante comuns em seus espectros de RMN ^1H , facilitando sua caracterização. Quando não estão substituídas nas posições C-3 e C-4 apresentam dois dubletos em aproximadamente δ 6,30 e δ 7,60 ($J = 9,5 - 10$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente. Sinais característicos de hidrogênios de ligação dupla conjugada com grupo lactônico e com o anel aromático. O hidrogênio H-4 encontra-se sempre mais desblindado que o H-3 devido à contribuição da estrutura de ressonância na qual se verifica uma deficiência eletrônica sobre o carbono a que este se encontra ligado. Quando há substituintes oxigenados na posição C-5, o sinal do dubleto

correspondente ao hidrogênio H-4, que normalmente aparece em δ 7,60, encontra-se desblindado acima de δ 8,00. Este fato deve-se ao efeito de anisotropia da ligação C-O da posição C-5 e do efeito de compressão estérica. Das cumarinas isoladas neste trabalho nenhuma apresentou substituição em C-5. Outra característica comum a todas cumarinas é a presença de um oxigênio em C-7, uma característica bem comum as cumarinas em geral, devido a sua origem biogenética (p-120).

A cumarina **C1** apresentou em seu espectro de RMN¹H (FIGURA 4.27) sinais característicos dos hidrogênios H-4 e H-3 em δ 7,85 (*d*, $J = 9,4$ Hz), e 6,19 (*d*, $J = 9,4$ Hz), respectivamente. Também foi observado no espectro de RMN¹H um dubleto em δ 6,71 ($J = 2,0$ Hz) acoplado com um duplo dubleto em δ 6,79 ($J = 8,4$ e 2,0 Hz) e que por sua vez acopla com outro dubleto em δ 7,46 ($J = 8,4$ Hz) o que evidencia um acoplamento *meta* entre os hidrogênios em δ 7,46 e δ 6,79, além deste último apresentar um acoplamento *orto* com o hidrogênio em δ 6,71, que foram atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6 e H-8, do esqueleto cumarínico. A ausência de outros sinais no espectro indica a presença de uma hidroxila em C-7 e a comparação com a literatura mostrou total similaridade com a cumarina Umbeliferona.

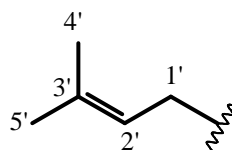
Também foi observado no espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.28) da cumarina **C2** os sinais referentes aos hidrogênios H-4 em δ 7,60 (*d*, $J = 9,4$ Hz), e H-3 em 6,20 (*d*, $J = 9,4$ Hz). A presença de dois dubletos em δ 6,34 ($J = 10,0$ Hz, 1H) e δ 5,69 ($J = 10,0$ Hz, 1H), e de um singleto em δ 1,46 (6H), são característicos de um anel pirano. O sinal do H-3' em δ 5,69 apresenta-se mais blindado, pois há conjugação dos pares de elétrons do sistema aromático com a ligação dupla do anel pirano. Pode-se dizer que este anel encontra-se nas posições 6 e 7, devido à presença de dois singletos em δ 6,68 (1H) e δ 7,05 (1H), referentes aos sinais dos hidrogênios H-8 e H-5, respectivamente. O sinal do H-8 é o mais blindado, pois encontra-se vizinho a dois carbonos contendo oxigênio como substituinte. Os sinais observados no espectro de

hidrogênio foram comparados com a literatura (STECK, 1971), conforme ilustrado na TABELA 4.6, sendo definida como a cumarina Xantiletina.

A partir do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.29) da cumarina **C3** verificou-se os sinais de dois dubletos em δ 7,60 ($J = 9,6$ Hz, 1H) e δ 6,22 ($J = 9,6$ Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. Observaram-se também os sinais característicos do anel pirano, dois dubletos em δ 6,88 ($J = 10,0$ Hz, 1H) e δ 5,73 ($J = 10,0$ Hz, 1H); e um singlete em δ 1,47 (6H). A presença de dois dubletos em δ 7,20 (H-5, 1H) e δ 6,72 (H-6, 1H) com constante *orto* $J = 8,4$ Hz, sugerem que o anel pirano encontra-se na posição 7 e 8. Os sinais observados no espectro de hidrogênio foram comparados com a literatura (AHMAD, 1984), os quais encontram-se ilustrados na TABELA 4.6, estes dados levaram a cumarina pirano angular Seselina.

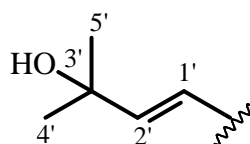
Analisando-se o espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.30) de **C4** observam-se os dois dubletos em δ 7,61 ($J = 9,5$ Hz, 1H) e δ 6,23 ($J = 9,5$ Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente.

A presença de um tripleto em δ 5,29 ($J = 7,4$ Hz, 1H), característico de um hidrogênio olefínico, de um dubleto em δ 3,31 ($J = 7,4$ Hz, 2H), e dois singletos em δ 1,77 (3H) e δ 1,70 (3H), sugere que a molécula contém uma unidade isoprênica (prenila) em alguma posição, substituinte muito comum em estruturas de cumarinas isoladas do gênero *Citrus*. Também foi observado dois singletos em δ 6,78 (1H) e δ 7,18 (1H), referentes aos sinais dos hidrogênios H-8 e H-5, respectivamente, pois, para serem observados dois singletos em um esqueleto cumarínico com H-3 e H-4 não substituídos, estas são as únicas posições aceitáveis. Com isto, pode-se afirmar que o grupo prenila encontra-se na posição 6.



O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.30) desta substância também apresentou sinal em δ 3,90 (3H), característico de metoxila que foi atribuída a posição C-7, por ser esta posição naturalmente oxigenada de acordo com a biogênese das cumarinas ESQUEMA 4.3. Assim, baseados nos dados apresentados e em comparação com os dados de RMN desta substância já mencionados na literatura, confirmou-se a estrutura de **C4** como sendo a cumarina suberosina.

A cumarina **C5** apresentou os sinais característicos de H-4 em δ 7,64 (*d*, $J = 9,4$ Hz) e de H-3 em 6,27 (*d*, $J = 9,4$ Hz); Os sinais de dois singletos em δ 7,49 (1H) e δ 6,79 (1H) correspondem aos hidrogênios 5 e 8, respectivamente. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.31) desta substância também apresentou sinal em δ 3,92 (3H), característico de metoxila que foi atribuída a posição C-7. Foi atribuído um substituinte na posição C-6, restante para o fechamento da estrutura, devido a observação de um singlete intenso em δ 1,45 (6H) e a presença de hidrogênios em δ 6,89 (*d*, $J = 16,1$ Hz) e em 6,37 (*d*, $J = 16,1$ Hz), referentes a hidrogênios olefínicos com orientação *trans* da ligação dupla, devido ao valor da constante de acoplamento, os quais correspondem as posições 1' e 2', respectivamente, de um grupo prenila modificado.



A estrutura da substância **C5** foi definida como sendo a cumarina Suberenol, comumente isodado no gênero *Citrus* (Rutaceae) (NAYAR e BHAN, 1972). Os dados de RMN ^1H estão listados na TABELA 4.6 juntamente com os dados descritos na literatura para esta substância (WU et al., 1983)

TABELA 4.6 - Dados de RMN 1H das cumarinas C1-C5 juntamente com os dados encontrados na literatura (DE MELO et al., 2009); (WU et al., 1983); (AHMAD, 1984).

H	C1 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	C1 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	C2 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	C2 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{b mult}}$	C3 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	C3 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{b mult}}$	C4 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	C4 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	C5 $\delta_{\text{H}}^{\text{a mult}}$	C5 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{b mult}}$
3	6,19 <i>d</i> (9,4)	6,20 <i>d</i> (9,4)	6,20 <i>d</i> (9,2)	6,22 <i>d</i> (9,2)	6,22 <i>d</i> (9,5)	6,23 <i>d</i> (9,6)	6,23 <i>d</i> (9,6)	6,22 <i>d</i> (9,6)	6,27 <i>d</i> (9,4)	6,24 <i>d</i> (9,5)
4	7,85 <i>d</i> (9,4)	7,83 <i>d</i> (9,4)	7,60 <i>d</i> (9,2)	7,59 <i>d</i> (9,2)	7,60 <i>d</i> (9,5)	7,60 <i>d</i> (9,6)	7,61 <i>d</i> (9,6)	7,60 <i>d</i> (9,6)	7,64 <i>d</i> (9,4)	7,62 <i>d</i> (9,5)
5	7,46 <i>d</i> (8,4)	7,50 <i>d</i> (8,5)	7,05 <i>s</i>	7,05 <i>s</i>	7,20 <i>d</i> (8,4)	7,21 <i>d</i> (8,4)	7,18 <i>s</i>	7,19 <i>s</i>	7,49 <i>s</i>	7,49 <i>s</i>
6	6,79 <i>dd</i> (8,4 e 2,0)	6,78 <i>dd</i> (8,4 e 2,3)	-	-	6,72 <i>dd</i> (8,4 e 0,5)	6,72 <i>d</i> (8,4)	-	-	-	-
8	6,71 <i>d</i> (2,0)	6,71 <i>d</i> (2,3)	6,68 <i>s</i>	6,72 <i>s</i>	-	-	6,78 <i>s</i>	6,80 <i>s</i>	6,79 <i>s</i>	6,80 <i>s</i>
7-OCH ₃	-	-	-	-	-	-	3,90 <i>s</i>	3,92 <i>s</i>	3,92 <i>s</i>	3,95 <i>s</i>
1'	-	-	-	-	-	-	3,31 <i>d</i> (7,4)	3,30 <i>d</i> (8,0)	6,89 <i>d</i> (16,1)	6,89 <i>d</i> (16,0)
2'	-	-	-	-	-	-	5,29 <i>t</i> (7,4)	5,30 <i>d</i> (8,0)	6,37 <i>d</i> (16,1)	6,37 <i>d</i> (16,0)
3'	-	-	5,69 <i>d</i> (10,0)	5,69 <i>d</i> (9,6)	5,73 <i>d</i> (10,0)	5,73 <i>d</i> (10,0)	-	-	-	-
4'	-	-	6,34 <i>d</i> (10,0)	6,34 <i>d</i> (9,6)	6,88 <i>dd</i> (10,0 e 0,5)	6,89 <i>d</i> (10,0)	1,77* <i>s</i>	1,80* <i>s</i>	1,45 <i>s</i>	1,53 <i>s</i>
5'	-	-	1,46* <i>s</i>	1,46* <i>s</i>	1,47* <i>s</i>	1,48 <i>s</i>	1,70* <i>s</i>	1,70* <i>s</i>	1,45 <i>s</i>	1,53 <i>s</i>
6'	-	-	1,46* <i>s</i>	1,46* <i>s</i>	1,47* <i>s</i>	1,48 <i>s</i>	-	-	-	-

^a CDCl₃, 400 MHz

^b CDCl₃, 200 MHz

Valores de *J*, entre parênteses, em Hz.

*Valores intercambiáveis.

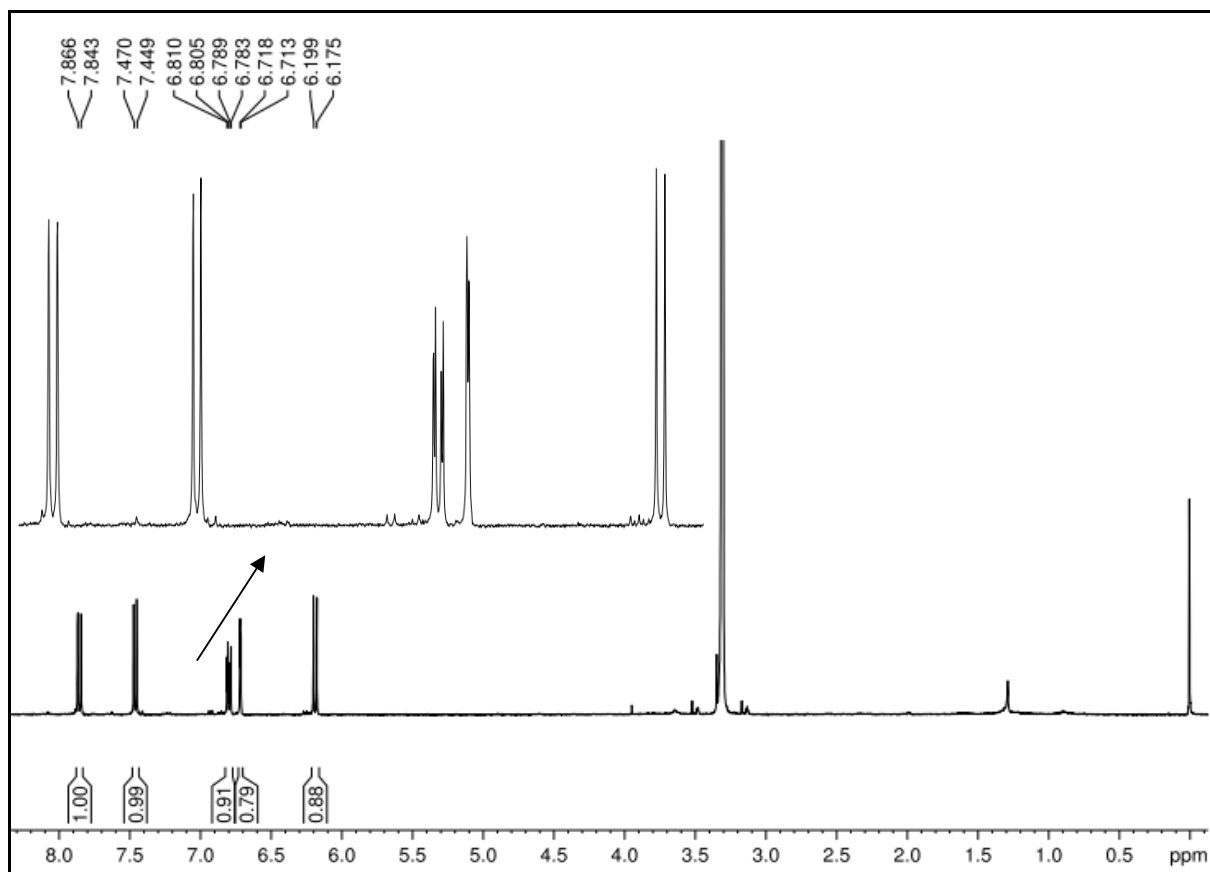


FIGURA 4.27 - Espectro de RMN ¹H da Umbeliferona (C1) (400 MHz, CDCl₃).

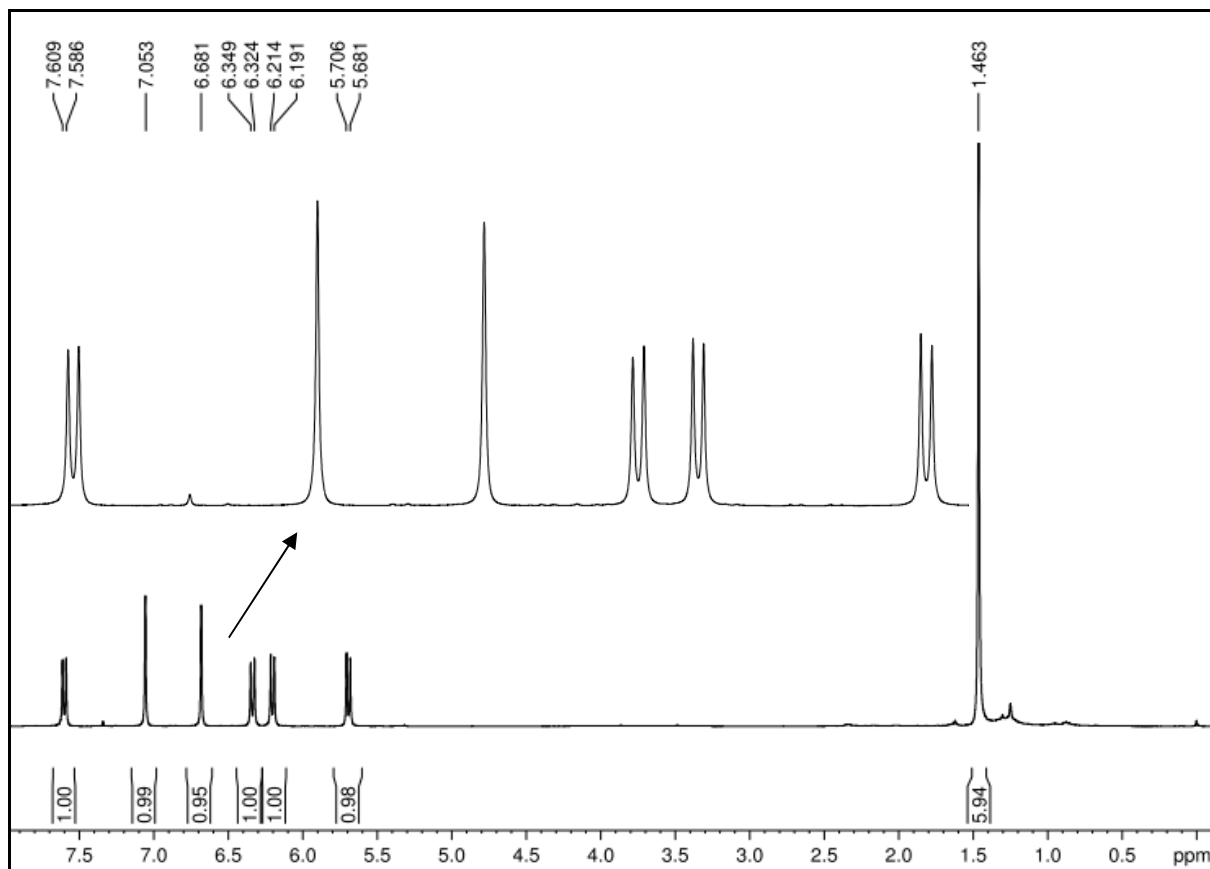


FIGURA 4.28 - Espectro de RMN ¹H da Xantiletina (C2) (400 MHz).

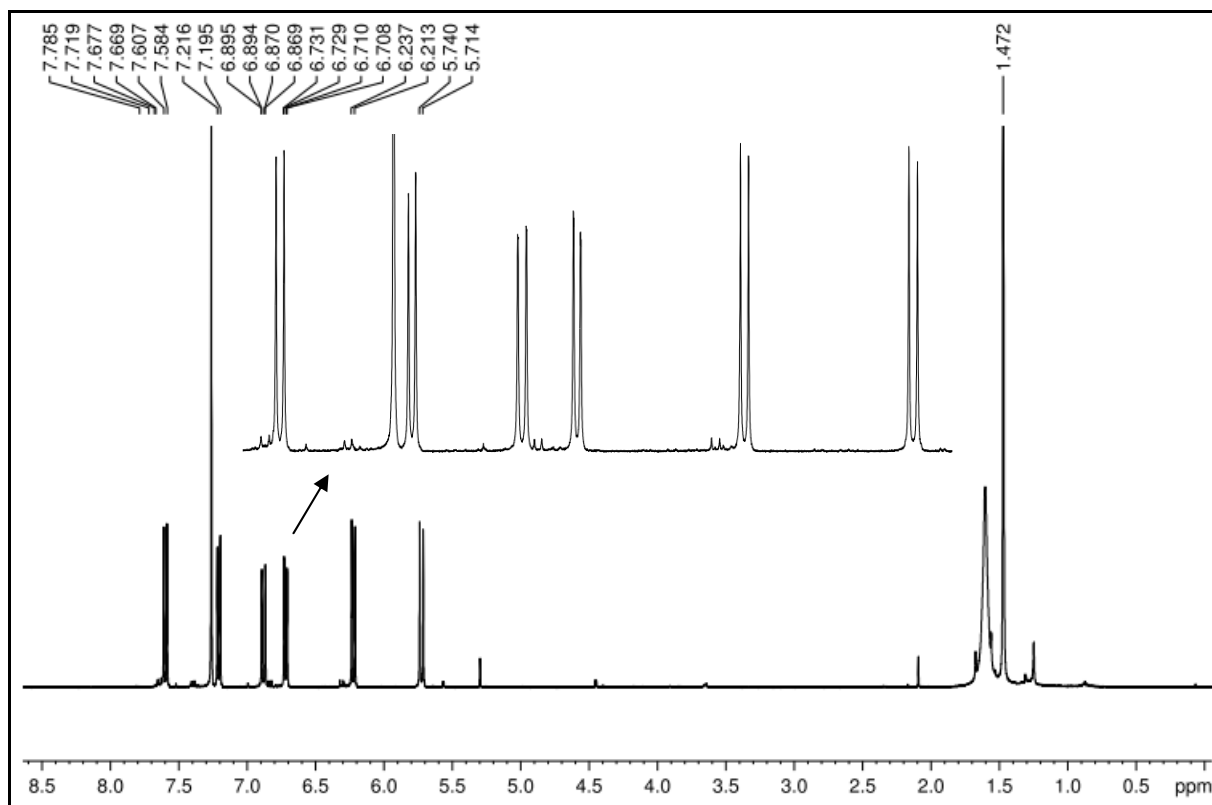


FIGURA 4.29 - Espectro de RMN ^1H da Seselina (C3) (400 MHz).

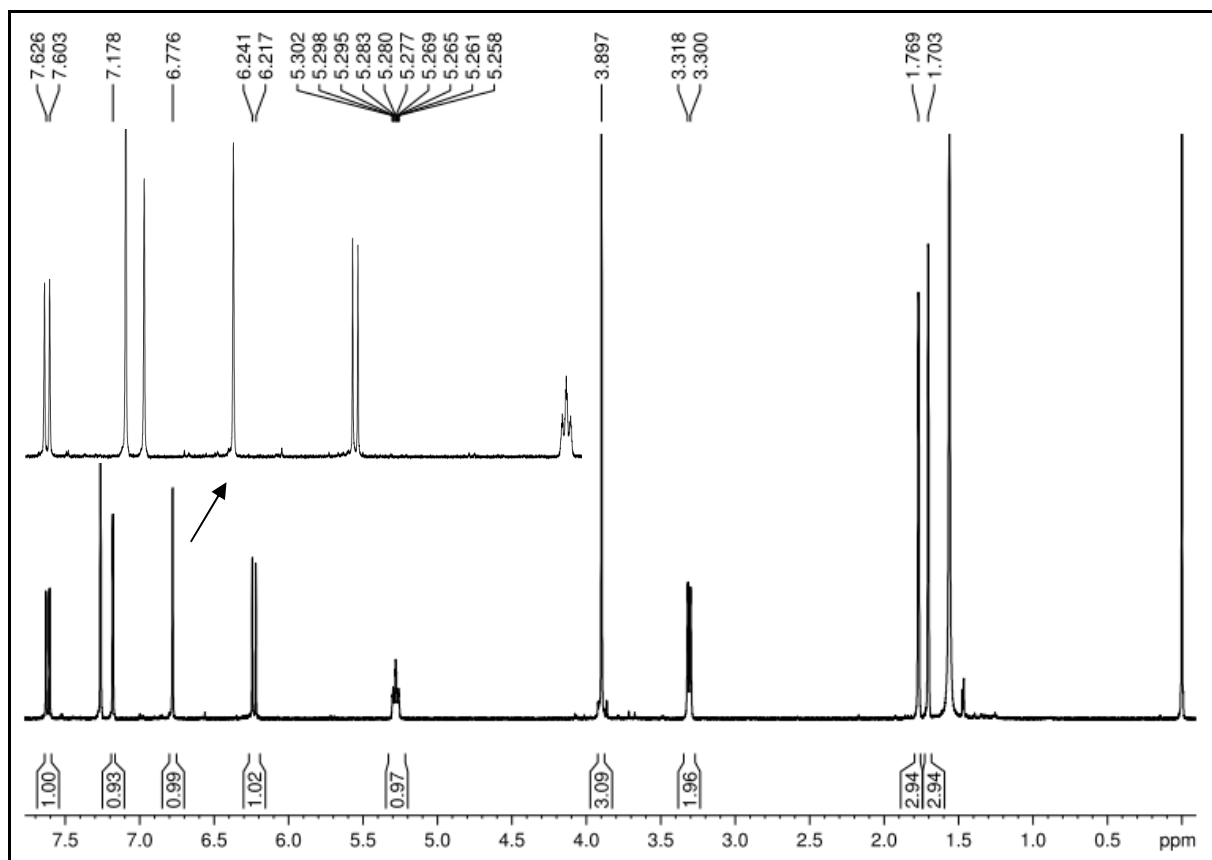


FIGURA 4.30 - Espectro de RMN ^1H da Suberosina (C4) (400 MHz, CDCl_3).

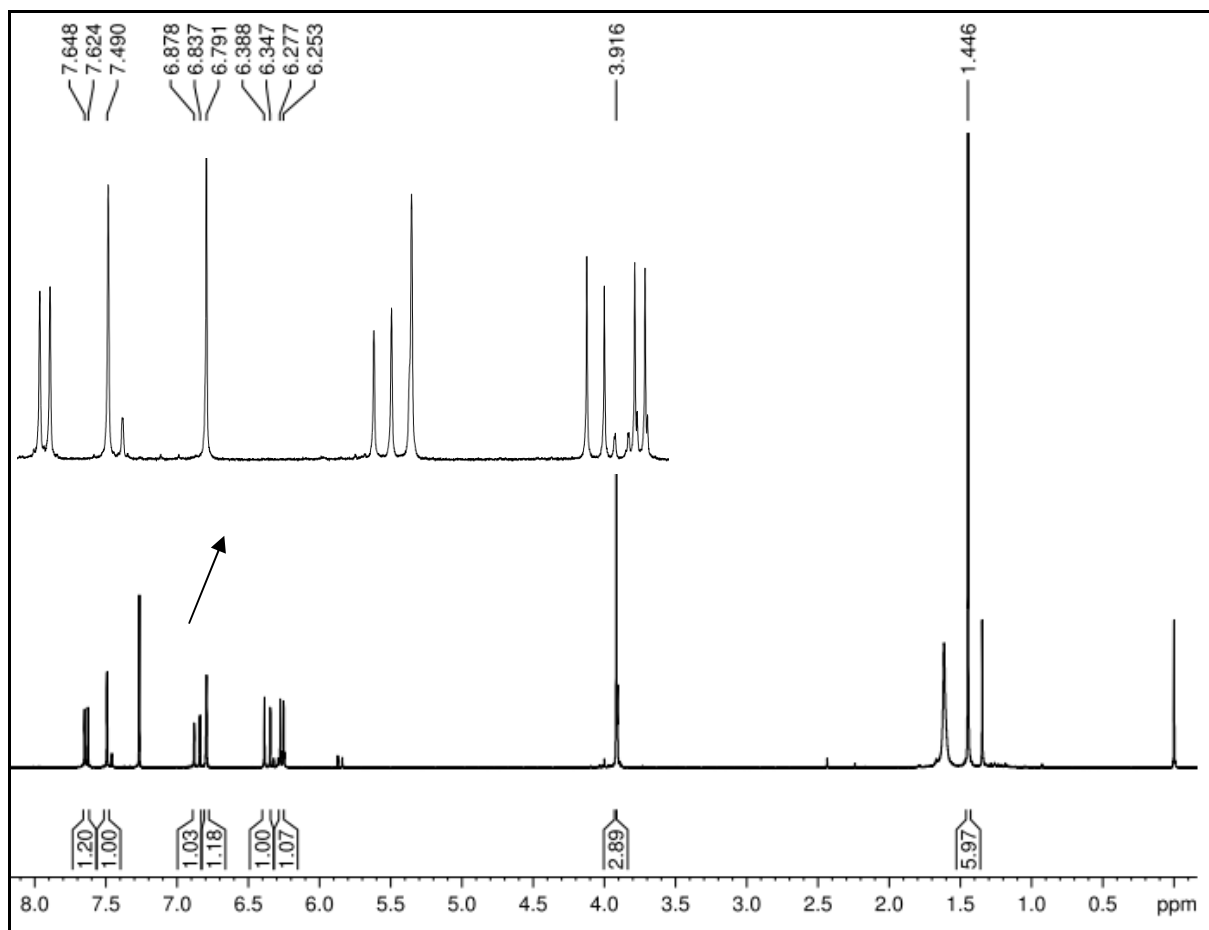
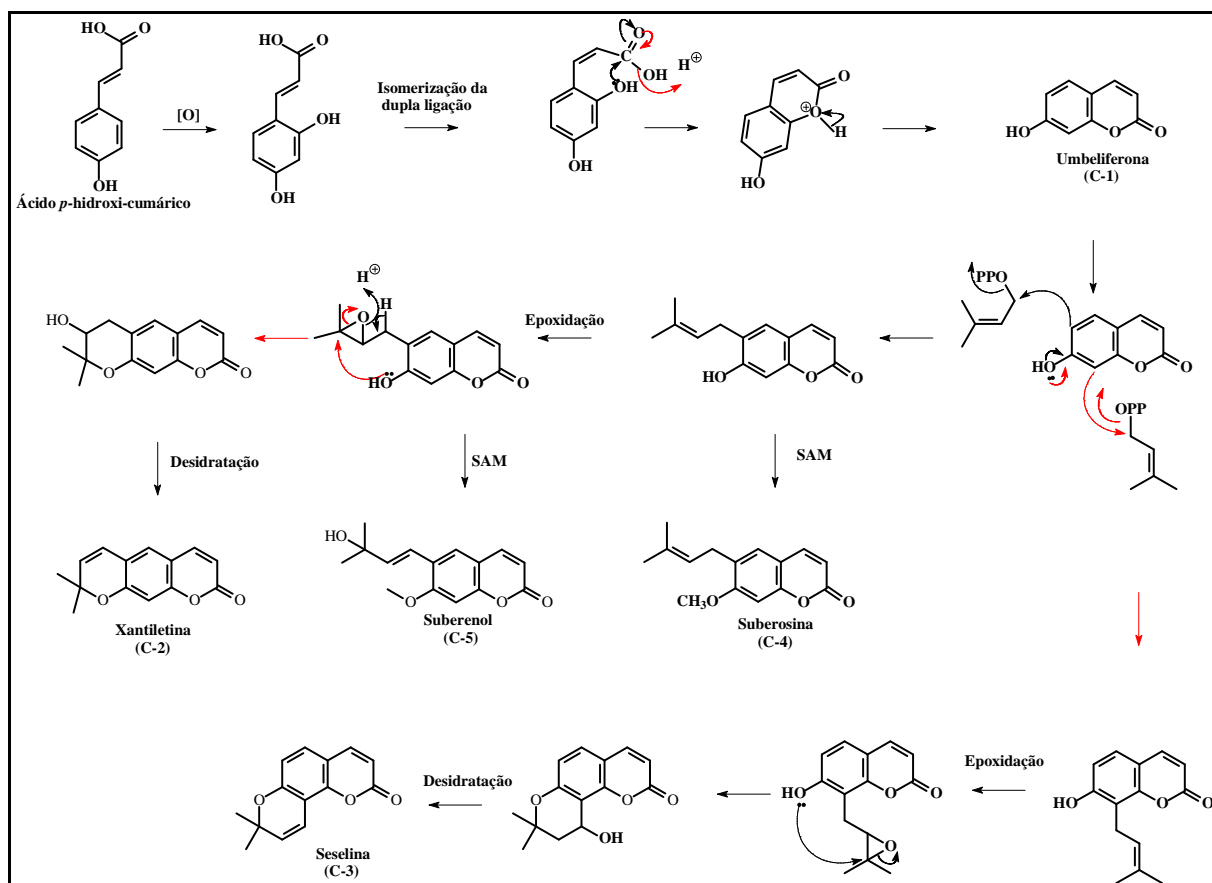


FIGURA 4.31- Espectro de RMN ^1H de Suberenol (C5) (400 MHz, CDCl_3).

4.6.2 - Biogênese de cumarinas

As cumarinas têm origem biossintética no ácido *p*-hidróxi-cinâmico (*p*-cumárico). Sua grande diversidade estrutural é devido principalmente a incorporação de unidades prenila. As prenilações nas posições 6 e 8 são comuns devido a presença da hidroxila na posição 7, que é um grupo orientador *orto*. Uma vez incorporado ao esqueleto cumarínico o grupo prenila pode sofrer um grande número de modificações secundárias, geralmente iniciadas com a epoxidação da dupla ligação da unidade prenila (MIKOLAJCZAK, et al., 1988).



ESQUEMA 4.3 - Proposta biogênica para as substâncias C1-C5.

4.7 - Avaliação do efeito de compostos naturais frente ao crescimento de *Alternaria alternata*.

As substâncias ensaiadas foram isoladas das espécies tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, a partir do estudo fitoquímico realizado neste trabalho, no entanto, apenas algumas delas foram ensaiadas, pois algumas substâncias apresentaram contaminação e insuficiência de massa para a realização dos ensaios. As substâncias submetidas aos ensaios foram solubilizadas em DMSO, já que o mesmo, em pequena quantidade, não tem efeito no desenvolvimento de *A. alternata* e devido a grande dificuldade em solubilizar os compostos em uma solução aquosa, ideal para o ensaio. Foram realizados ensaios preliminares sob o efeito do DMSO e possível interferência nos resultados e em quantidade mínima foi possível sua utilização.

4.7.1 - Efeito de compostos naturais frente ao crescimento micelial de *Alternaria alternata*.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada 2 dias, onde se baseou no centro de aplicação do inóculo como referencial para as medidas, conforme descrito no ITEM 3.5.1.

As estruturas das substâncias isoladas de citros que foram ensaiadas estão apresentadas na FIGURA 4.32, bem como a estrutura do fungicida comercial utilizado como controle negativo.

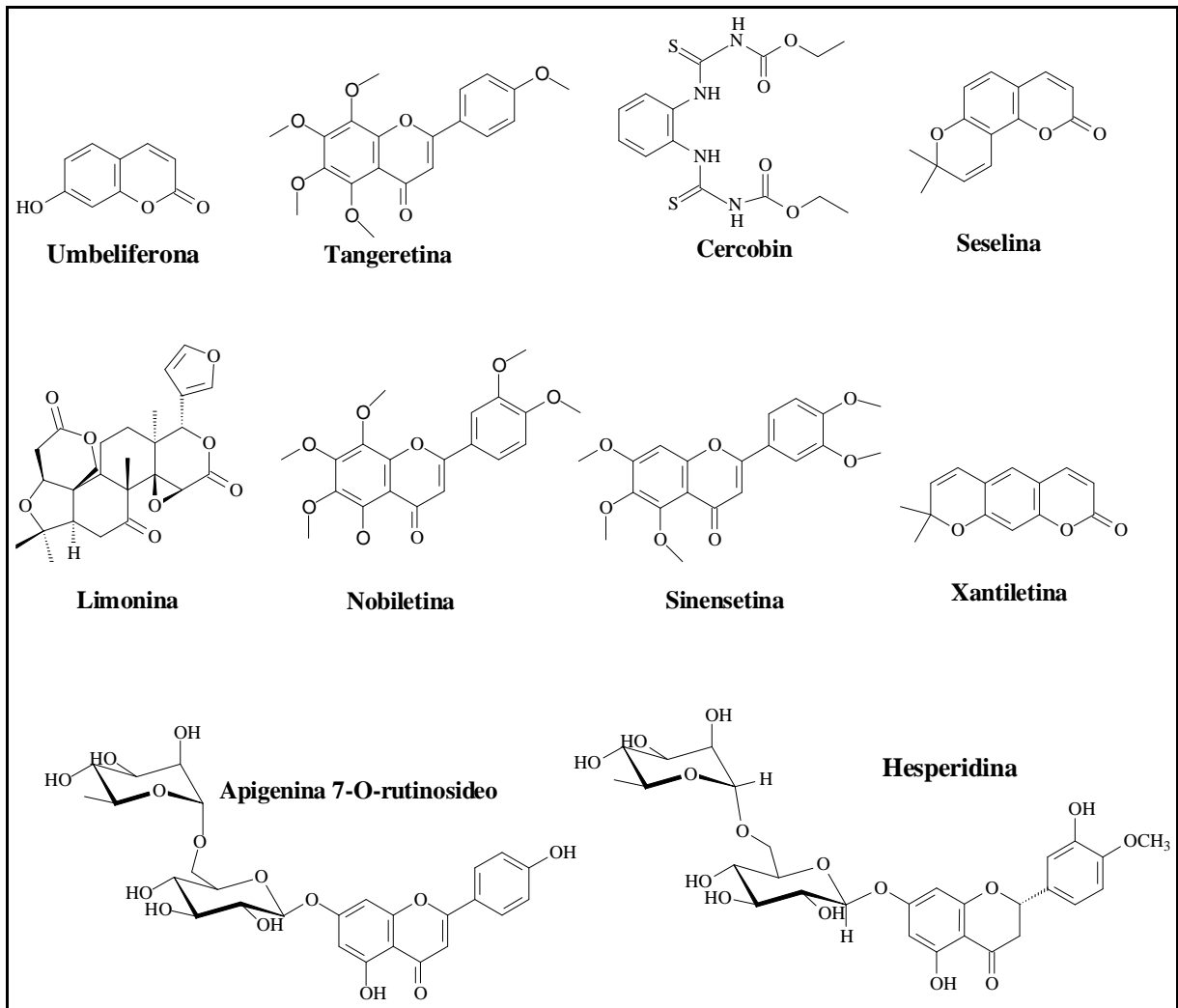


FIGURA 4.32 - Substâncias ensaiadas frente ao fungo *A. alternata*.

Por não haver fungicida no mercado recomendado para o controle desta doença, a atividade das substâncias isoladas de citros foram comparadas com a do fungicida comercial Cercobin 700 WP (princípio ativo: Tiofanato Metílico), por se tratar de um fungicida sistêmico, empregado no controle de inúmeras doenças fúngicas em diversas culturas, na forma de pulverizações da parte aérea e em tratamento de sementes. Na TABELA 4.7 estão apresentadas as principais indicações para a utilização deste fungicida em mudas de citros, sendo que o mesmo é utilizado em uma concentração de 7 mg/mL com a necessidade de duas aplicações durante a safra da cultura.

TABELA 4.7 - Principais doenças fúngicas em citros onde se recomenda utilização de Cercobin.

Doença Fúngica	Agente causal
Melanose	<i>Diaporthe citri</i>
Rubelose	<i>Corticium salmonicolor</i>
Antracnose	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Verrugose	<i>Elsinoe australlis; Elsinoe fawcetti</i>
Mofocinzeno	<i>Botrytis cinérea</i>
Bolor-verde	<i>Penicillium digitatum</i>
Bolor-azul	<i>Penicillium italicum</i>

Através do gráfico de Crescimento micelial (cm) x dias ilustrado na FIGURA 4.33, que representa a média do crescimento micelial calculada para cada amostra, obtida a partir da média das cinco repetições em relação ao controle positivo, pode-se ver que todos os compostos ensaiados, com exceção do limonóide limonina apresentaram inibição frente ao crescimento micelial de *A. alternata*. Os flavonoides nobiletina e sinensetina mostraram uma inibição insignificante quando comparados com o controle.

Comparando os demais compostos, é possível observar que as cumarinas xantiletina e seselina merecem destaque. Esses compostos, de acordo com o gráfico da FIGURA 4.33, inibiram aproximadamente 50% do crescimento micelial do micro-organismo quando comparado com o controle positivo e apresentaram atividade similar ao fungicida comercial Cercobin (controle negativo). Essas cumarinas apresentaram apenas um potencial fungistático, isto é, apenas diminuíram o crescimento do micro-organismo.

A cumarina xantiletina é uma substância majoritária na raiz de tangor 'Murcott', e vale salientar que o estudo da atividade antifúngica dessa substância já é de conhecimento no grupo de Produtos Naturais da UFSCar (DE MELO et. 259 al., 2009; RIBEIRO, 2006) e uma busca na literatura comprova sua ação anti-cancerígena (ANAYA et. al., 2005; GUNATILAKA, et. al., 1994), contra pragas agrícolas (LUTHRIA, et. al., 1989) e sua ação fungicida

(SARDARI et. al. 2000; e KHAN et. al. 1985). Visto que ainda não há relatos na literatura de ensaios *in vitro* desta cumarina frente a *Alternaria alternata* esse resultado é de extrema relevância.

Os flavonoides apigenina 7-O-rutinosídeo e tangeritina, os quais inibiram aproximadamente 30% em relação à testemunha, mostraram fraca atividade frente ao fungo.

Vale ressaltar que esse ensaio avalia apenas o crescimento micelial, e não está envolvido diretamente com o processo de infecção nas plantas, porém está relacionado ao processo de colonização. Desta forma, é de extrema relevância a avaliação das amostras também frente à germinação de esporos e formação de apressórios de *A. alternata*, o qual será descrito a seguir no ITEM 4.7.2.

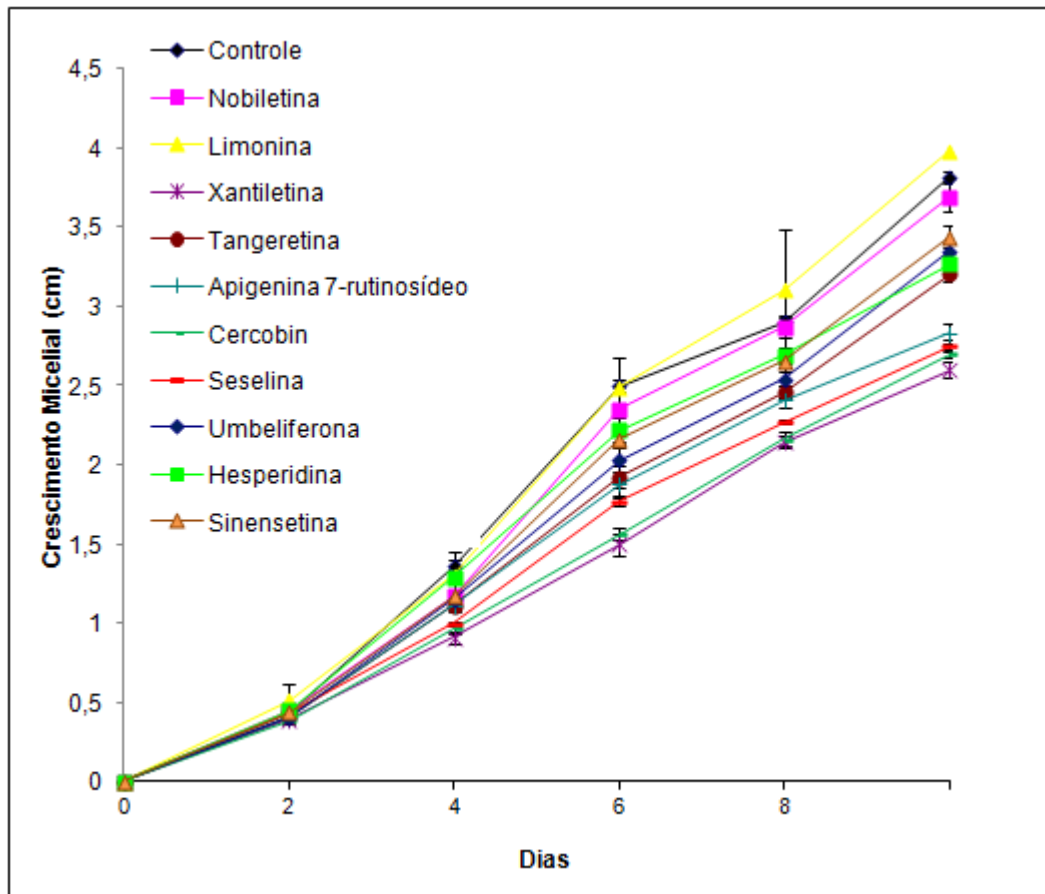


FIGURA 4.33: Efeito dos compostos naturais isolados de espécies de Citrus no crescimento micelial de *A. alternata*. As barras representam a média \pm desvio padrão.

4.7.2 - Efeito de compostos naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *Alternaria alternata*.

A partir dos resultados obtidos para os compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial, pretendia-se ter uma resposta mais direcionada para as estruturas reprodutivas do microrganismo em que se dá a infecção nas plantas. Sendo assim, foi realizado o ensaio de inibição frente à germinação de esporos e formação de apressórios. As substâncias ensaiadas foram às mesmas utilizadas no ensaio de inibição do crescimento micelial (FIGURA 4.32) e na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (concentração utilizada no ensaio de crescimento micelial) com o intuito de se ter um resultado complementar e mais preciso. Assim, observou-se a partir da FIGURA 4.34, que a xantiletina apresentou atividade muito relevante, a qual inibiu 88,75% da germinação de esporos e 92,25 % a formação de apressórios, um resultado muito similar ao do fungicida Cercobin (91,5% da germinação de esporos e 94,0 % a formação de apressórios). A literatura mostra inúmeros trabalhos, onde frutos cítricos têm mecanismos de resistência ativados, como as fitoalexinas (escoparona e escopoletina), em resposta a diferentes tipos de indutores bióticos e abióticos (ARRAS, 1996; RODOV et al., 1994; ALI et al., 1991), levando a uma redução nos sintomas das doenças. Assim esta cumarina se torna uma substância promissora, uma vez que ela reduz a formação de tubos germinativos, e conseqüentemente a formação de apressórios que são unidades responsáveis pelo início do processo de infecção, os quais provocam os sintomas da mancha marrom de alternaria.

A cumarina seselina (84,0 % da germinação de esporos e 89,5 % a formação de apressórios) e o flavonóide apigenina 7-O-rutinosídeo (82,25 % da germinação de esporos e 87,75 % a formação de apressórios) também apresentaram uma atividade considerável, demonstrando serem substâncias ativas frente ao desenvolvimento germinativo de *A. alternata*. Já as substâncias como o limonina, tangeritina, nobiletina, umbeliferona, hesperidina e sinensetina

não mostraram efeito significativo sob o desenvolvimento germinativo de *A. alternata*, quando comparados com o controle.

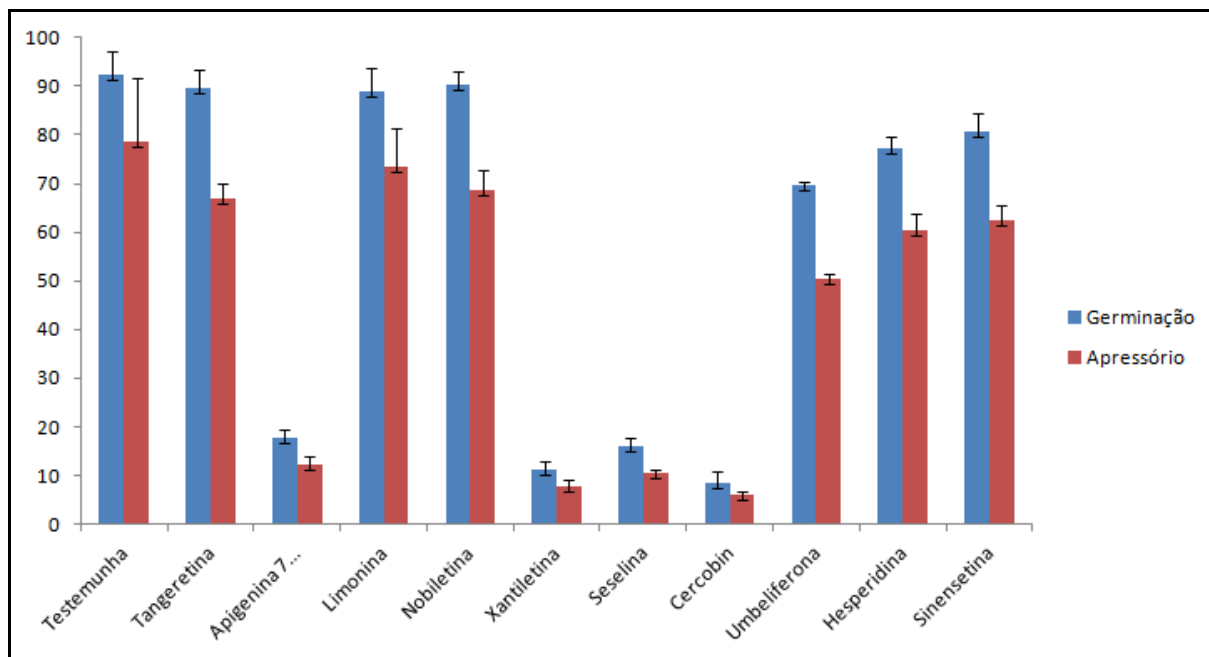


FIGURA 4.34 - Efeito dos compostos naturais isolados de espécies de *Citrus* na inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *A. alternata*. As barras representam a média \pm desvio padrão.

4.8 - Análise dos componentes voláteis de Citros

A técnica de microextração em fase sólida (SPME) tem como função analisar voláteis em diversos tipos de amostras. As vantagens desta técnica em relação aos métodos tradicionais de amostragem são o baixo custo de análise, a reutilização da fibra, a facilidade de operação, a mínima perda e contaminação da amostra durante o transporte e armazenamento e, finalmente, existência de grande diversidade de fases para serem aplicadas em diferentes classes de compostos. Esta técnica associada tem sido cada vez mais utilizada, pois se mostrou rápida, prática e eficiente para amostras com componentes em baixas concentrações, devido a sua sensibilidade (BARRIONUEVO et al., 2001; GALLARDO et al., 2009). Além disso, a ausência de solvente se torna uma vantagem, uma vez que os picos das amostras não são encobertas por este (VIEIRA et al., 2001). A SPME (Solid Phase Micro-Extraction) é um

procedimento de amostragem simples, rápido, no qual as amostras presentes na fase líquida (amostragem por imersão direta) ou fase gasosa (amostragem Headspace) são absorvidas por uma fibra com sílica fundida. O Headspace SPME (HS-SPME) em combinação com cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) tem sido amplamente utilizado na análise de aromas (KIM et al., 2010).

A extração por arraste a vapor é a técnica mais utilizada para a obtenção dos óleos essenciais de plantas aromáticas, por ser um método simples e barato. O processo consiste em submeter o material vegetal à ação do vapor d'água que extrai o óleo por arraste de vapor. Inicialmente o vapor d'água atravessa os tecidos da biomassa, levando consigo o óleo contido no interior de suas glândulas. O óleo liberado, então, vaporiza-se com o choque térmico, sendo arrastado pelo vapor até atingir o condensador. A diferença de solubilidade entre a água e o óleo essencial permite a separação destes em duas fases líquidas (CASSEL e VARGAS, 2006).

O processo de extração por arraste a vapor apresenta o inconveniente da possibilidade de ocorrer degradação térmica dos compostos ou hidrólise (BANDONI, 2002). No entanto, apresenta a vantagem da possibilidade de obtenção dos analitos menos voláteis presentes no óleo essencial.

Foi realizada a investigação dos voláteis com a finalidade de comparação qualitativa e quantitativa entre o perfil volátil de uma espécie considerada tolerante (laranja Pêra) e outra suscetível (tangor “Murcott”) a MMA, que foram inoculadas com *A. alternata*, com o perfil destas espécies saudáveis (sem a presença do patógeno), para avaliar se existe modificação química deste perfil como resposta a presença do patógeno e, se as duas espécies de *Citrus* estudadas, que apresentam comportamento tão distinto frente ao fungo, possuem perfil volátil com diferenças significativas. Os componentes voláteis foram extraídos por Headspace SPME (HS-SPME) e também por Hidrodestilação, utilizando-se folhas jovens destas espécies, sendo que os

constituintes voláteis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada e espectrometria de massas (CG-EM).

4.8.1 - Análise dos componentes voláteis de Citros pela técnica de HS-SPME.

4.8.1.1 - Determinação da fibra ideal.

Os cromatogramas obtidos através das condições descritas no ITEM 3.6.1 para as diferentes fibras (preta e azul) estão apresentados a seguir, onde estas foram testadas frente aos voláteis produzidos por T. 'Murcott' (FIGURA 4.35) e L. Pêra (FIGURA 4.36).

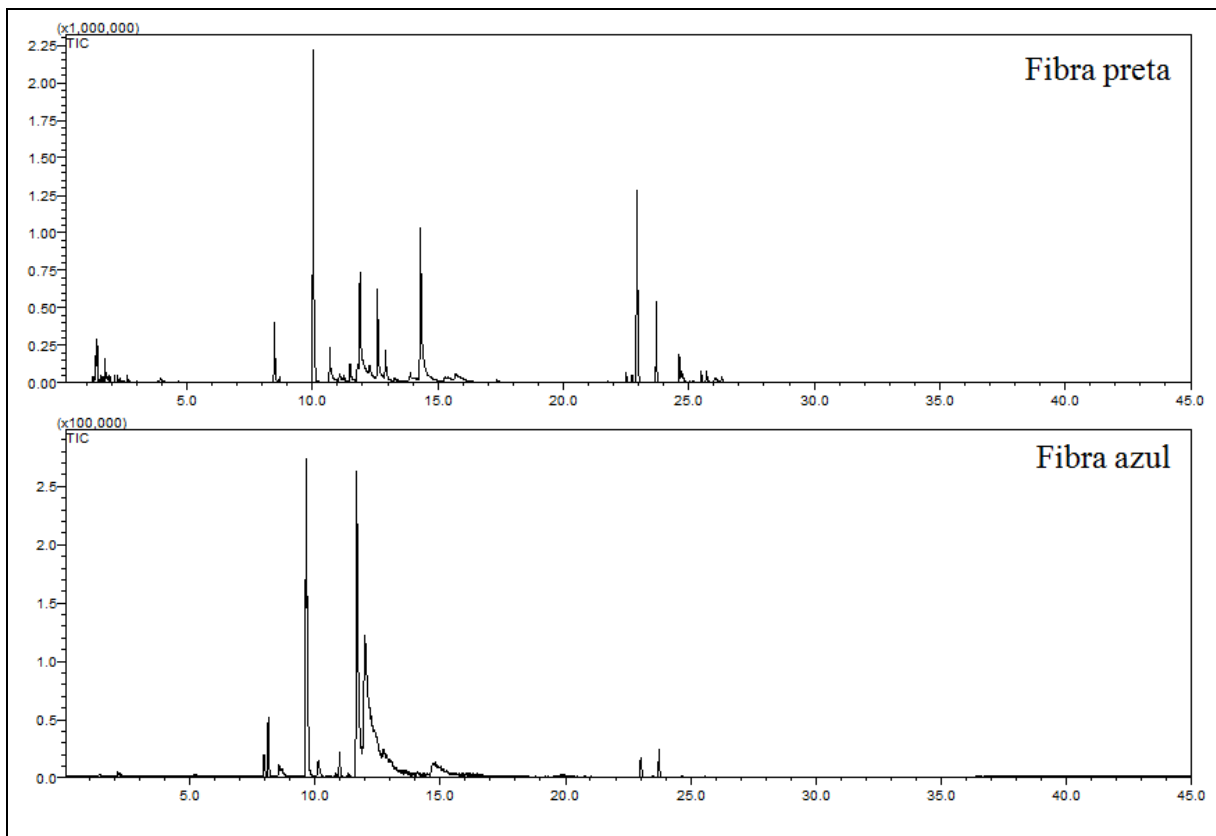


FIGURA 4.35 - Cromatogramas das fibras CAR/PDMS (Fibra Preta) e PDMS/DVB (Fibra Azul) quando expostas durante 45 min a folhas de T. 'Murcott'.

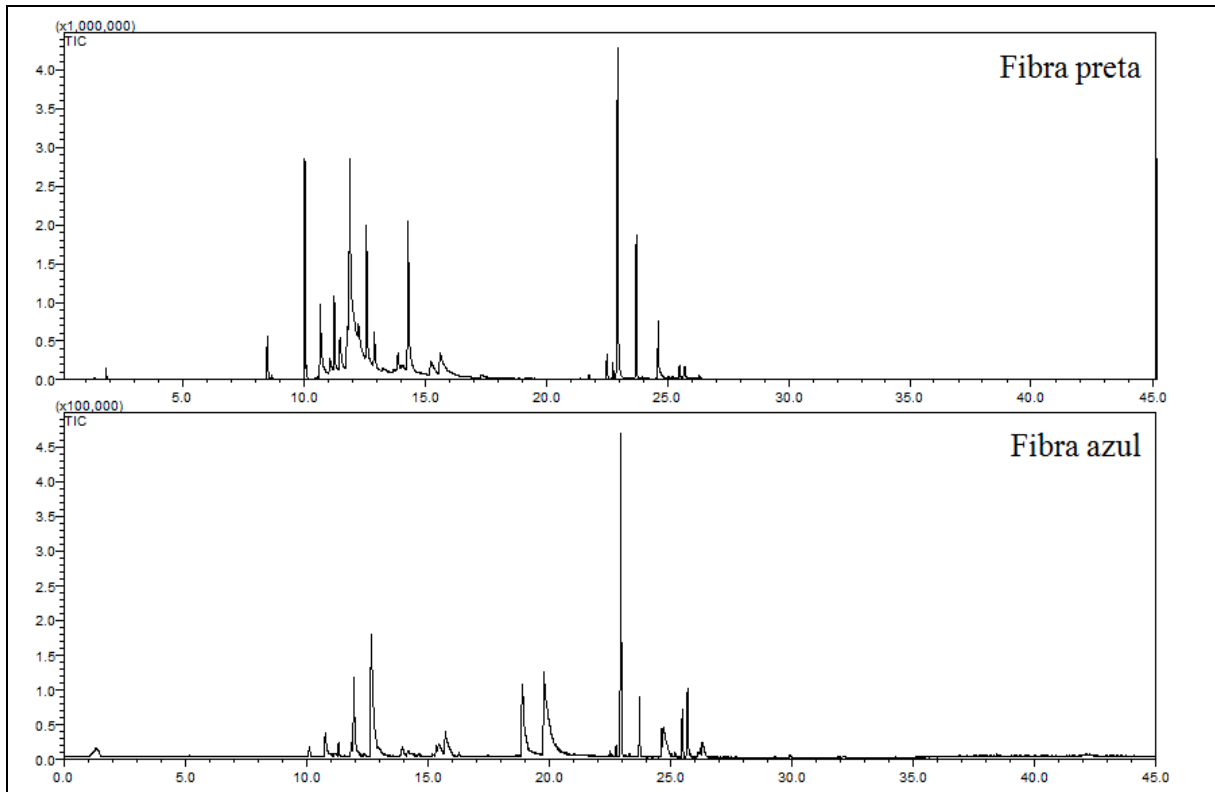


FIGURA 4.36 - Cromatogramas das fibras CAR/PDMS (Fibra Preta) e PDMS/DVB (Fibra Azul) quando expostas durante 45 min a folhas de L. Pêra.

Observando-se os cromatogramas da FIGURA 4.35, verifica-se que a fibra preta foi a que apresentou melhor adsorção dos compostos de T. ‘Murcott’ e também melhor resolução entre os picos com o método proposto. Para os voláteis de L. Pêra as fibras analisadas apresentaram compostos que adsorveram melhor em regiões distintas do cromatograma (fibra preta: maior adsorção entre 10-15 min e fibra azul com maior adsorção com $t_r \approx 19,0$ min). No entanto, com a finalidade de comparação dos voláteis produzidos pelas espécies estudadas, estas devem estar nas mesmas condições, portanto, optou-se pela escolha da fibra preta (CAR/PDMS), pois esta adsorveu um número maior de compostos voláteis de T. ‘Murcott’, quando comparada à outra fibra nas mesmas condições.

4.8.1.2 - Determinação do tempo de exposição ideal.

Utilizando-se a fibra ideal, CAR/PDMS, variou-se o tempo de exposição da mesma, em um sistema fechado contendo 50 g de folhas para verificação do tempo ideal para o experimento. Os tempos de exposição testados para a fibra foram 30, 45 e 60 min. As fibras foram injetadas diretamente em um CG-EM sob as mesmas condições utilizadas anteriormente (ITEM 3.6.1). Os cromatogramas obtidos são apresentados abaixo (FIGURAS 4.37 e 4.38).

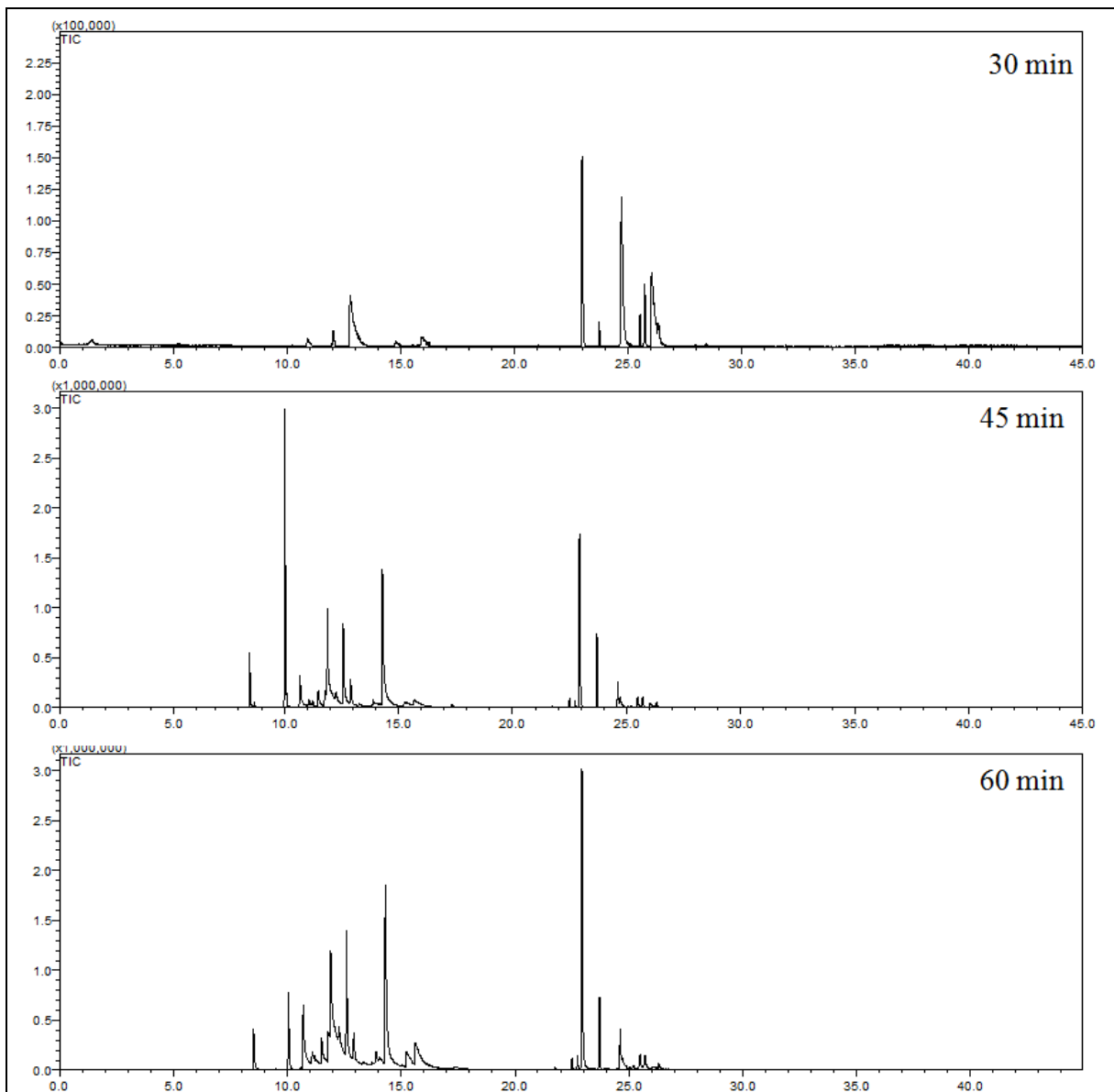


FIGURA 4.37 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis das folhas de T. 'Murcott' com utilização da fibra preta (CAR/PDMS) em 30, 45 e 60 minutos.

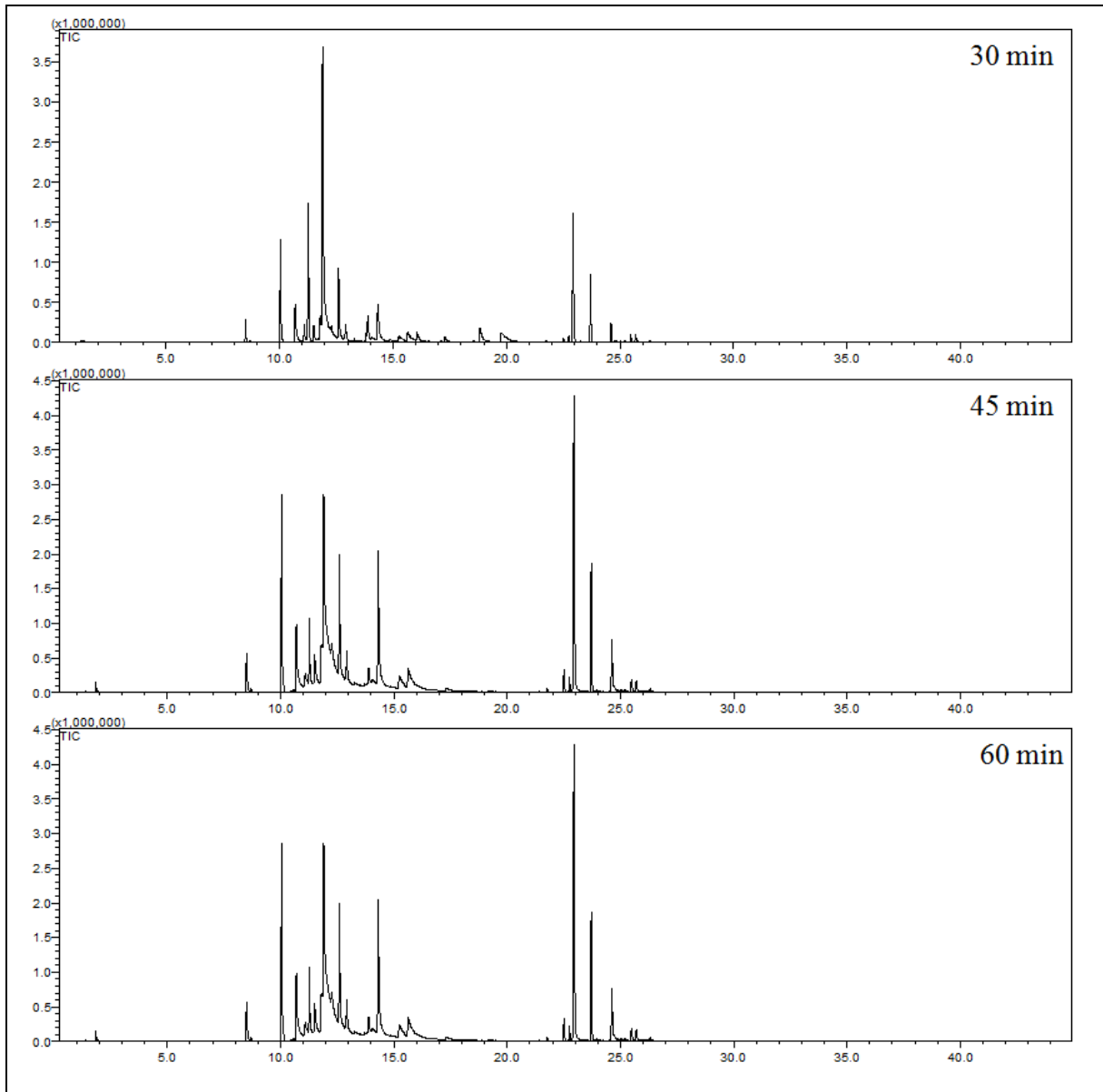


FIGURA 4.38 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis das folhas de L. 'Pêra' com utilização da fibra preta (CAR/PDMS) em 30, 45 e 60 minutos.

Idealmente espera-se que haja um equilíbrio, ou seja, que tenha um tempo de exposição a partir do qual ocorra saturação da fibra e a concentração de analito adsorvido seja constante. A partir deste tempo, pode-se considerar que o analito tenha atingido o equilíbrio e, portanto, pode-se considerar que aquele seja o tempo adequado de exposição. Verificou-se que para as condições empregadas, o tempo de exposição de 45 min é o tempo ideal, uma vez que a partir deste a fibra começa a ficar saturada, não apresentando uma grande alteração nos constituintes adsorvidos e detectados. Além disto, o interesse é

identificar os compostos mais voláteis, sendo, portanto, os que são liberados primeiramente pela planta, já que os voláteis também serão analisados por hidrodestilação, com isto muitas horas de adsorção não são interessantes para o experimento.

4.8.1.3 - Compostos voláteis identificados em Citros por HS-SPME

Realizou-se o experimento de extração dos voláteis das folhas de laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis*) e tangor ‘Murcott’ (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*), separadamente por HS-SPME, e comparou-se com os voláteis produzidos por estas espécies após serem submetidas à inoculação do fungo *A. alternaria*. A identificação dos compostos voláteis foi feita por CG-EM através de seus índices de Kovats e comparação com a literatura (ADAMS, 2001). No total detectou-se 33 compostos, mas foram identificados 28 deles, uma vez que alguns destes não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura. Os compostos estão listados na TABELA 4.8 para T. ‘Murcott’ e na TABELA 4.9 para L. Pêra. Nos casos onde a identificação não foi possível, o componente foi considerado “não identificado” (ni). Nas FIGURAS 4.39 e 4.40 estão apresentados os histogramas das substâncias que apresentaram as maiores variações quantitativas, quando se compara o perfil químico dos voláteis das folhas sadias com as folhas infectadas de L. Pêra e T. ‘Murcott’, respectivamente. A estrutura dos compostos majoritários identificados para as espécies estudadas encontram-se nas FIGURAS 4.41 e 4.42.

TABELA 4.8 - Compostos voláteis obtidos por SPME e identificados em T. ‘Murcott’ controle e após a inoculação de *A. alternata*.

Picos		TR		Composto	% CG-EM		IR*		IR**
Controle	Com sintoma	Controle	Com sintoma		Controle	Com sintoma	Controle	Com sintoma	
1	1	8.490	8.510	α - Tujeno	3.72	0.35	918	920	930
2	2	10.035	10.052	Sabineno	19.68	0.46	952	953	975
3	3	10.694	10.686	β - Mirceno	3.19	5.46	985	984	991
4	4	11.091	11.084	α - Felandreno	0.43	0.60	998	987	999
5	-	11.099	-	β - Pinenos	0.32	-	1002	-	1003
-	5	-	11.164	δ - 2 - Careno	-	0.45	-	1004	1008
6	6	11.501	11.497	δ -3- Careno	1.57	0.95	1011	1010	1015
7	7	11.796	11.779	ρ - Cimeno	1.54	1.72	1020	1016	1025
8	8	11.896	11.899	Limoneno	13.31	11.66	1029	1029	1029
9	9	12.275	12.252	(Z)- β - Ocimeno	1.49	2.40	1032	1034	1037
10	10	12.593	12.596	(E)- β - Ocimeno	7.61	14.72	1041	1041	1050
11	11	12.917	12.850	α - Terpineno	2.65	0.45	1051	1048	1060
-	12	-	12.911	ni	-	0.83	-	1057	-
-	13	-	13.876	α - Terpinoleno	-	0.95	-	1070	1089
-	14	-	14.017	ni	-	1.58	-	1078	-
12	15	14.301	14.313	Linalol	17.35	14.68	1081	1083	1095
-	16	-	15.207	ni	-	3.85	-	1119	-
-	17	-	15.594	(4E,6Z) 2,6 dimetil 2,4,6 Octatrieno	-	7.62	-	1160	1147
13	18	22.508	22.503	α - Copaeno	0.59	0.57	1335	1335	1353
14	19	22.747	22.745	ni	0.44	0.97	1347	1347	-
15	20	22.940	22.964	β - Elemeno	14.24	20.01	1369	1371	1391
16	21	23.710	23.713	β -(E) - Cariofileno	5.20	2.63	1380	1381	1419
17	22	24.623	24.617	α - Humuleno	1.91	3.66	1420	1419	1455
18	-	24.710	-	β - Fernaseno	1.39	-	1429	-	1460
19	23	25.496	25.474	ni	0.93	1.20	1455	1450	-
20	24	25.713	25.683	β - Azuleno	0.92	1.20	1462	1458	1469
21	25	26.033	25.915	ni	1.04	0.29	1467	1464	-
22	26	26.310	26.284	δ - Cadineno	0.48	0.74	1470	1469	1482

TR = tempo de retenção; IR = índice de retenção.

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007)

TABELA 4.9 - Compostos voláteis obtidos por SPME e identificados em L. Pêra controle e após a inoculação de *A. alternata*.

Picos		TR		Composto	% CG-EM		IR*		IR**
Controle	Com sintoma	Controle	Com sintoma		Controle	Com sintoma	Controle	Com sintoma	
1	1	8.498	8.479	α - Tujeno	2.00	0.47	922	920	930
2	2	10.045	10.027	Sabineno	8.77	4.84	956	955	975
3	3	10.690	10.666	β - Mirceno	4.43	5.73	985	982	991
4	4	11.091	11.064	α - Felandreno	0.79	1.46	998	998	999
5	5	11.267	11.250	δ - 2 - Careno	3.64	4.56	1005	1006	1008
6	6	11.503	11.490	δ - 3 - Careno	2.82	0.72	1012	1010	1015
7	7	11.804	11.781	ρ - Cimeno	1.01	1.76	1018	1018	1025
8	8	11.903	11.900	Limoneno	25.50	31.53	1024	1024	1029
9	9	12.592	12.250	(Z)- β - Ocimeno	8.75	0.60	1032	1031	1037
-	10	-	12.581	(E)- β - Ocimeno	-	13.38	-	1039	1050
10	11	12.918	12.905	α - Terpineno	2.41	0.38	1045	1045	1060
-	12	-	13.803	ni	-	0.59	-	1072	-
11	13	13.888	13.869	Terpinoleno	0.88	2.95	1080	1077	1089
12	14	14.303	14.290	Linalol	9.63	4.84	1094	1094	1095
13	15	15.239	15.210	ni	0.37	0.37	1110	1110	-
14	16	15.634	15.602	(4E,6Z) 2,6 dimetil 2,4,6 Octatrieno	1.07	1.97	1127	1125	1147
-	17	-	15.999	Citronelal	-	1.11	-	1150	1153
-	18	-	17.209	α - Terpineol	-	0.85	-	1190	1189
-	19	-	18.373	Neral	-	0.66	-	1210	1238
-	20	-	18.717	β - Citral	-	2.07	-	1240	1267
-	21	-	19.635	α - Citral	-	1.34	-	1290	1325
15	22	22.510	22.492	α - Copaeno	1.05	0.24	1339	1335	1353
16	23	22.751	22.744	ni	0.73	0.44	1365	1364	-
17	24	22.949	22.942	β - Elemeno	16.43	9.62	1375	1375	1391
18	25	23.718	23.712	β -E-Cariofileno	6.15	3.91	1390	1389	1419
19	26	24.625	24.620	α - Humuleno	2.31	1.66	1420	1420	1455
20	27	25.491	25.476	ni	0.66	0.75	1424	1434	-
21	28	25.706	25.687	Azuleno	0.60	1.00	1445	1445	1469
-	29	-	26.291	δ - Cadineno	-	0.20	-	1470	1482

TR = tempo de retenção; IR = índice de retenção.

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007)

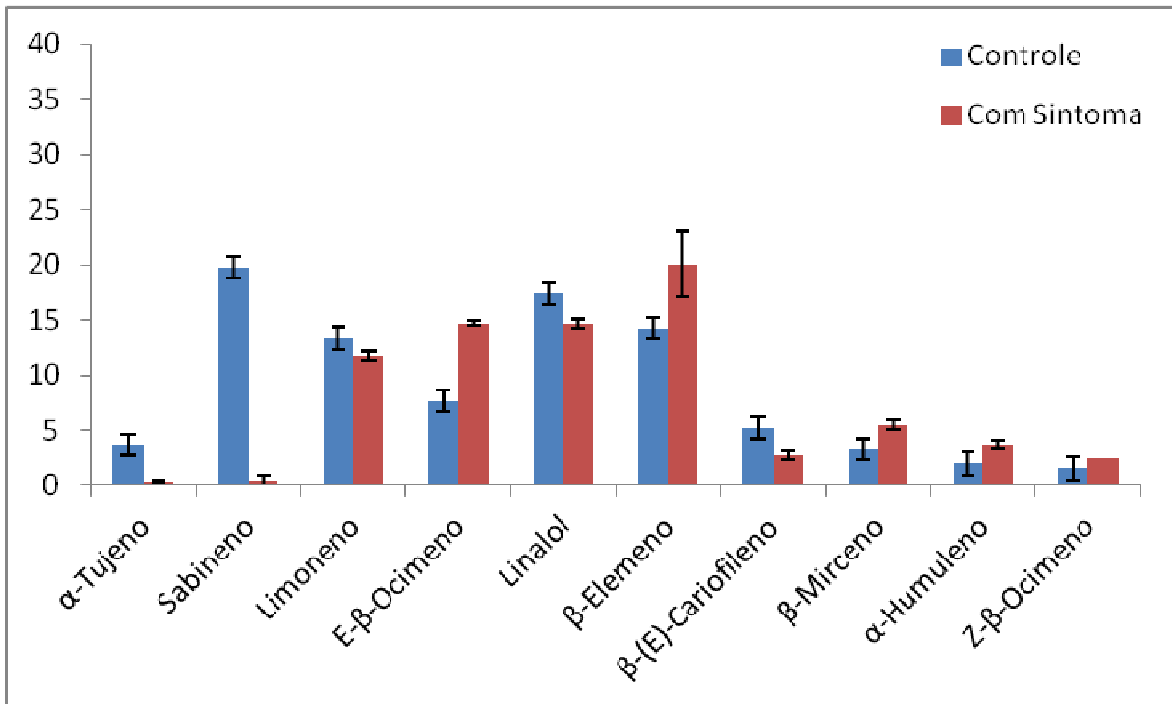


FIGURA 4.39 - Histograma dos compostos voláteis que apresentaram maior variação quantitativa na análise comparativa por HS-SPME de folhas de T. 'Murcott' controle com folhas com sintomas de MMA.

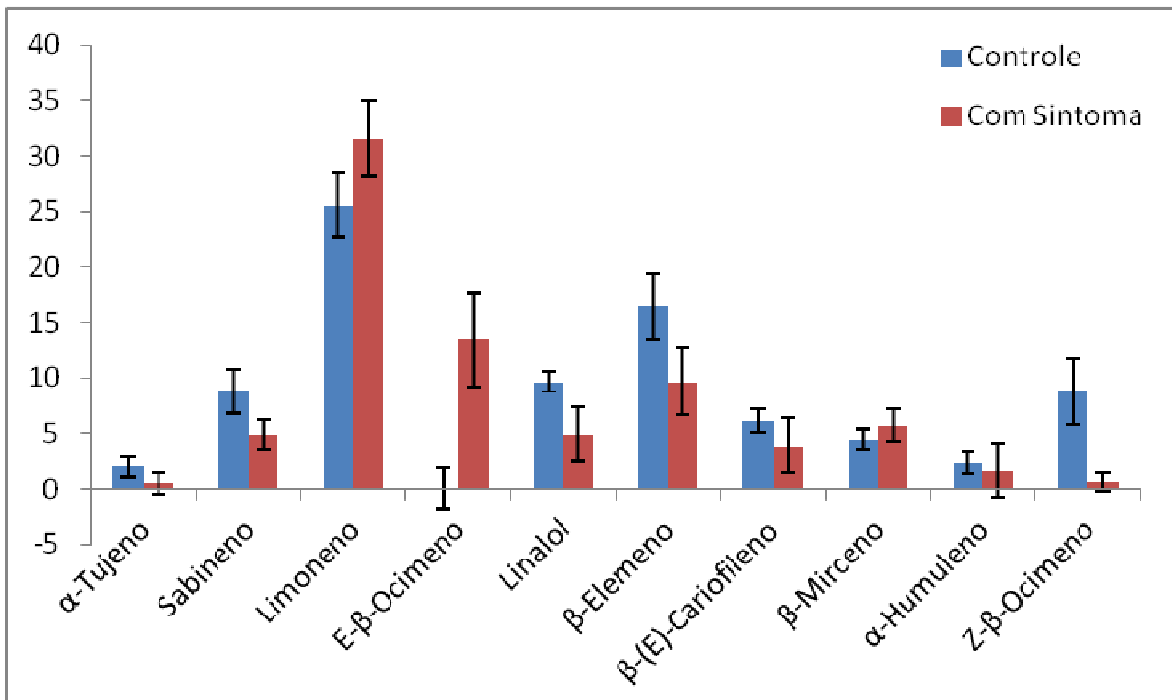


FIGURA 4.40 - Histograma dos compostos voláteis que apresentaram maior variação quantitativa na análise comparativa por HS-SPME de folhas de L. Pêra controle com folhas com sintomas de MMA.

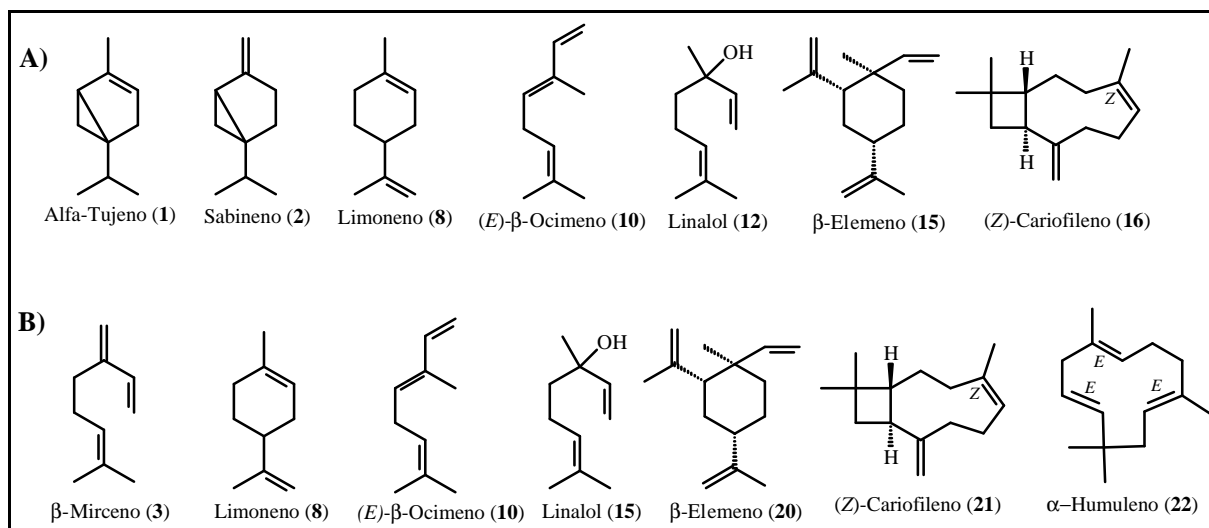


FIGURA 4.41 - Estrutura dos compostos voláteis majoritários identificados de T. 'Murcott' por HS-SPME. A) Voláteis majoritários das folhas controle; B) Voláteis majoritários das folhas com *A. alternata*.

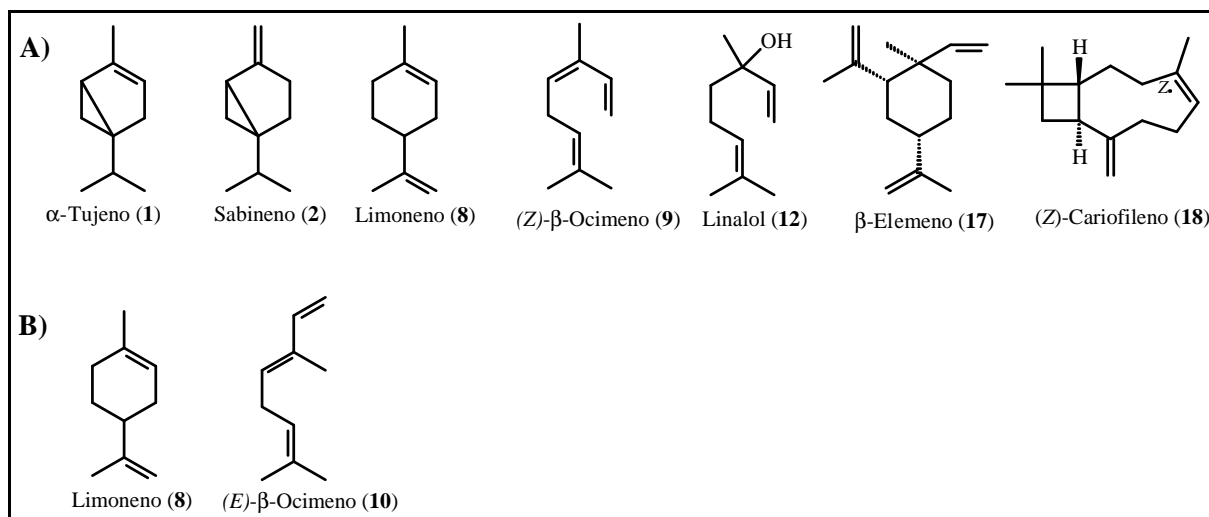


FIGURA 4.42 - Estrutura dos compostos voláteis majoritários identificados de L. Pêra por HS-SPME. A) Voláteis majoritários das folhas controle; B) Voláteis majoritários das folhas com *A. alternata*.

A comparação dos voláteis extraídos das folhas de T. 'Murcott' controle e com *A. alternata* mostrou que não há uma variação qualitativa significativa no perfil químico desta espécie, o mesmo foi observado com a comparação dos voláteis produzidos por L. Pêra nas folhas controle e infectada. No entanto, com uma análise nos cromatogramas obtidos (FIGURA 4.43), é possível observar um maior acúmulo de compostos voláteis, principalmente de sesquiterpenos, nas folhas de T. 'Murcott' infectadas por *A. alternata*.

Comparando-se os voláteis produzidos pelas plantas T. 'Murcott' e L. Pêra não foram observadas diferenças significativas no perfil químico das folhas controle destas espécies, contendo praticamente os mesmos compostos majoritários, como pode ser visto na FIGURA 4.43. No entanto, pode ser observado nos Histogramas contidos nas FIGURAS 4.39 e 4.40 que apenas a planta suscetível apresentou um acúmulo de sesquiterpenos em folhas infectadas por *A. alternata*, como exemplo podemos citar β -Elemeno, β -Mirceno e α -Humuleno. É reportado na literatura estudos envolvendo Jasmonato de metila (MeJa) como elicitador na interação planta-fungo, onde foi observado um acúmulo de diferentes sesquiterpenos na espécie estudada (SINGH, et al., 1998). Também é relatado a avaliação da atividade de sesquiterpenos presentes no óleo essencial da semente da cenoura frente ao fungo *A. alternata*, onde foi observado uma atividade citotóxica destes compostos, inibindo 65% do seu crescimento micelial, indicando que o acúmulo destes compostos nas espécie suscetível estudada poderia sugerir uma resposta defensiva da mesma (SABATER-JARA, et al., 2010).

É importante salientar que mesmo a L. Pêra sendo uma variedade com elevada resistência ao fungo no campo, uma inoculação artificial com excesso de inóculo aplicado também pode possibilitar uma resposta química como, por exemplo, o substancial aumento em concentração de E- β -Ocimeno, reação que também foi observada na planta suscetível, como pode ser observado nas FIGURAS 4.39 e 4.40.

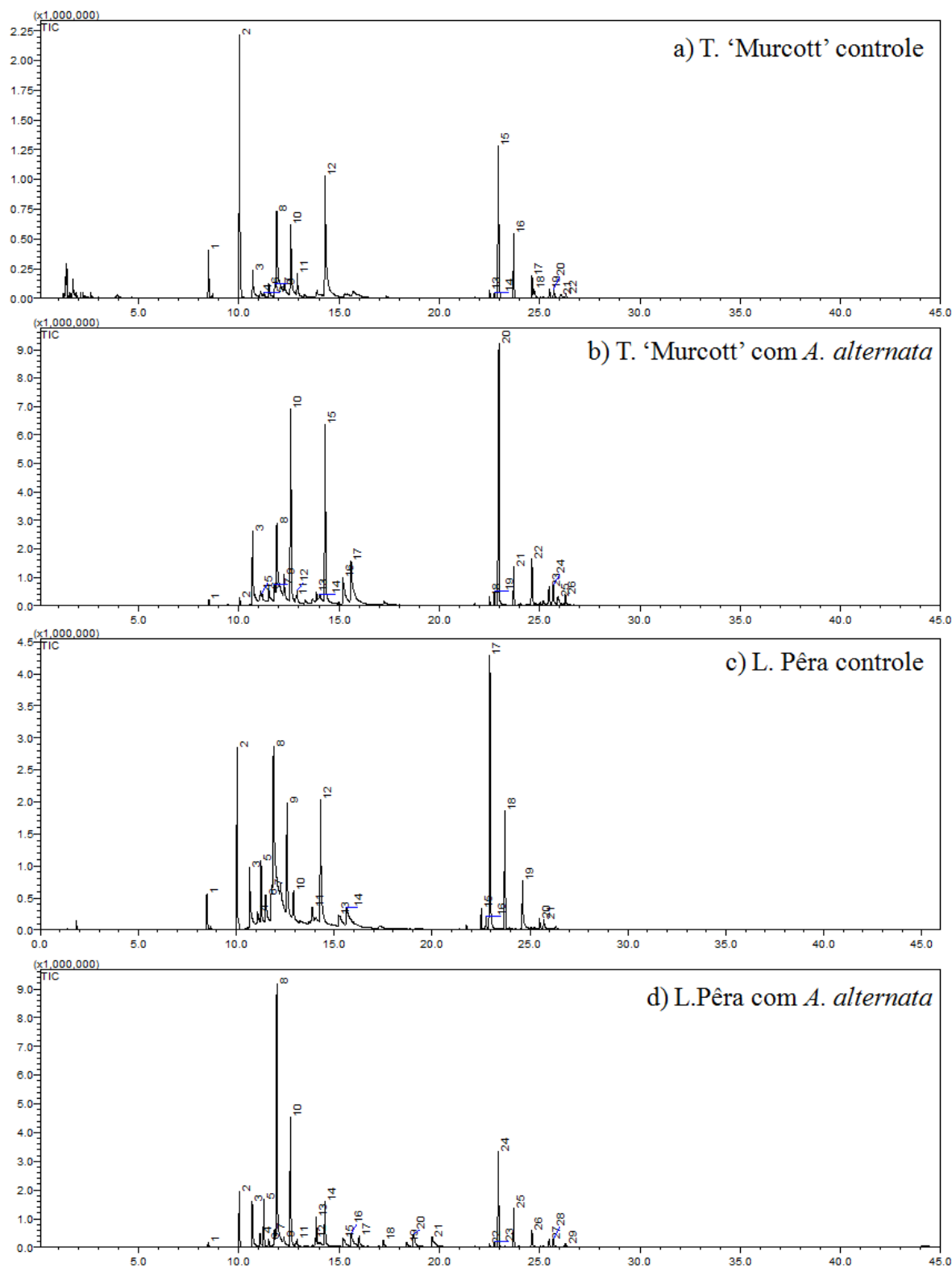


FIGURA 4.43 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis de Citros por HS-SPME.

4.8.2 - Compostos voláteis identificados em Citros por Hidrodestilação.

As hidrodestilações de folhas secas e frescas foram realizadas com a finalidade de comparação do perfil químico de folhas controle de laranja ‘Pêra’ e tangor ‘Murcott’, separadamente, com o perfil químico obtido das mesmas após a inoculação de *A. alternata* e também para fins de comparação com os compostos voláteis obtidos por HS-SPME. No total detectou-se 81 compostos, mas foram identificados 64 deles, uma vez que alguns destes não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura. A identificação dos compostos voláteis foi feita por CG-EM através de seus índices de retenção e por comparação com a literatura (ADAMS, 2001) e estão listados na TABELA 4.10 para T. ‘Murcott’ e na TABELA 4.11 para L. Pêra. Nos casos onde a identificação não foi possível, o componente foi considerado “não identificado” (ni). Nas FIGURAS 4.44 e 4.45 estão apresentados os histogramas das substâncias que apresentaram as maiores variações quantitativas, quando se compara o perfil químico dos voláteis das folhas sadias com as folhas infectadas de L. Pêra e T. ‘Murcott’, respectivamente. A estrutura dos compostos majoritários identificados para as espécies estudadas encontram-se nas FIGURAS 4.46 e 4.47.

TABELA 4.10 - Compostos voláteis obtidos por hidrodestilação e identificados em T. ‘Murcott’ controle e após a inoculação de *A. alternata*.

Picos	TR		Composto	% CG-EM		IR [*]		IR ^{**}	Literatura
	Controle	Com sintoma		Controle	Com sintoma	Controle	Com sintoma		
1	-	7.568	-	ni	3.50	-	1012	-	-
2	-	7.902	-	orto-Cimeno	2.42	-	1023	-	1022
3	-	8.017	-	para-Cimeno	1.02	-	1027	-	1024
4	-	9.375	-	trans-arbusculone	5.13	-	1072	-	1070
5	-	9.877	-	trans-óxido de linalol	5.11	-	1089	-	1084
6	-	10.146	-	ni	0.25	-	1099	-	-
7	-	10.292	-	Linalol	40.37	-	1103	-	1095
8	-	12.593	-	cis-óxido de linalool piranoide	1.05	-	1174	-	1170
9	-	12.834	-	Terpinen-4-ol	23.19	-	1181	-	1174
10	-	14.059	-	trans-Pulegol	1.74	-	1218	-	1213
11	-	14.649	-	1,3 Dioxolano	0.34	-	1236	-	1248
12	-	15.619	-	cis-Acetato de crisantenil	0.40	-	1265	-	1261
13	-	19.576	-	trans-Acetato de Mirtanol	0.25	-	1388	-	1385
14	1	19.801	19.810	β-Elemeno	6.97	16.62	1395	-	1391
	2	-	20.563	α-cis-Bergamoteno	-	0.26	-	1420	1411
15	3	20.688	20.695	β-E-Cariofileno	0.28	1.43	1424	1424	1419
16	4	21.755	21.774	α-Humuleno	0.38	1.36	1458	1459	1455
17	5	22.423	22.466	γ-Gurjuneno	0.43	0.31	1480	1481	1475
18	6	22.786	22.835	β-Selinene	0.54	0.77	1492	1493	1489
19	7	23.062	-	α-Selinene	0.34	-	1500	-	1498
	8	-	23.107	cis-β Guaineno	-	0.46	-	1502	1492
	9	-	23.391	α-Bulneseno	-	0.22	-	1512	1509
	10	-	23.919	γ-Cupreneno	-	0.15	-	1531	1532
	11	-	24.675	cis-Muroi-5-en-4-β-ol	-	0.04	-	1557	1550
20	-	24.758	-	Elemol	0.62	-	1560	-	1548
	12	-	24.837	7-dieno-trans-Dauca 4,11	-	1.26	-	1563	1556
	13	-	25.115	Epi-Longipinanol	-	1.24	-	1572	1562
	14	-	25.475	trans-Sesquisabineno Hidratado	-	1.12	-	1585	1595
21	15	25.704	25.707	Óxido de Cariofileno	1.21	8.70	1593	1593	1582
	16	-	26.199	ledol	-	0.47	-	1610	1602
22	17	26.484	26.484	Epóxido de Humuleno II	0.44	3.31	1620	1620	1608
23	-	26.621	-	5epi-7epi-α-Eudesmol	0.43	-	1625	-	1607
	18	-	27.430	α-Muroiol	-	0.44	-	1653	1644
	19	-	27.553	β-Eudesmene	-	0.27	-	1658	1655
24	20	27.806	27.830	neo-Intermedeol	2.64	5.61	1667	1667	1658
	21	-	28.083	ni	-	2.54	-	1676	-
25	-	28.258	-	7(11) Selinen-4-α-ol	0.24	-	1682	-	1647
	22	-	28.346	Espatuleno	-	4.82	-	1685	1577
	23	-	29.329	14-hidroxi-α-Humuleno	-	5.04	-	1721	1713
26	24	29.362	29.517	γ-z-Curcumen-12-ol	0.36	1.43	1722	1728	1728
	25	-	29.657	ni	-	1.92	-	1733	-
	26	-	29.772	Vetiselinenol	-	8.09	-	1738	1730
27	-	29.823	-	ni	0.20	-	1739	-	-
	27	-	30.417	β-Acoradienol	-	1.28	-	1762	1762
	28	-	32.132	ni	-	0.58	-	1827	-
	29	-	32.333	ni	-	0.26	-	1835	-
	30	-	32.434	ni	-	5.99	-	1839	-
28	-	32.489	-	ni	0.15	-	1841	-	-
	31	-	32.751	Hexahidro Farnesil acetona	-	4.61	-	1852	1754
	32	-	33.072	3,7,11,15 Tetrametil 2-hexadecen-1-ol	-	2.58	-	1864	2045
	33	-	33.520	ni	-	3.64	-	1882	-
	34	-	34.462	2-Pentadecanona	-	3.11	-	1913	1754
	35	-	34.679	1-Heptatriacontanol	-	1.52	-	1919	1942
	36	-	35.229	Isofitol	-	3.51	-	1933	1946
	-	-	36.559	trans-Fitol	-	0.30	-	1969	2045
	-	-	-	(6E,10E) 3,7,11,15 Tetrametil	-	-	-	1988	-
	37	-	37.285	Hexadecatetraen-3-ol	-	4.38	-	-	2046

TR = tempo de retenção; IR = índice de retenção.

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007)

TABELA 4.11 - Compostos voláteis obtidos por hidrodestilação e identificados em *L. Pêra* controle e após a inoculação de *A. alternata*.

Picos	TR		Composto	% CG-EM		IR*		IR**	
	Controle	Com sintoma		Controle	Com sintoma	Controle	Com sintoma		Literatura
1	-	9.270	-	<i>cis</i> - Sabineno hidratado	0.67	-	1069	-	1064
2	-	9.410	-	<i>cis</i> - Óxido de linolol (furanóide)	0.51	-	1074	-	1067
3	1	9.916	9.845	<i>trans</i> - Óxido de linolol (furanóide)	1.12	2.55	1091	1089	1084
4	2	10.307	10.243	Linalol	15.72	4.42	1104	1101	1095
-	3	-	10.556	<i>cis</i> - Óxido de rosa	-	1.75	-	1111	1114
-	4	-	11.111	<i>trans</i> - Óxido de rosa	-	0.95	-	1128	1125
5	5	11.650	11.624	<i>trans</i> - <i>p</i> -Mento-2-en-1-ol	0.39	0.41	1145	1144	1136
6	-	11.825	-	Isopulegol	1.02	-	1150	-	1145
7	6	11.982	11.976	Citronelal	11.37	2.89	1155	1155	1148
8	7	12.850	12.828	Terpinen-4-ol	7.82	11.59	1182	1181	1174
9	-	13.379	-	ni	3.67	-	1198	-	-
10	-	14.582	-	Citronelol	9.07	-	1234	-	1223
11	-	14.983	-	Neral	9.17	-	1246	-	1235
12	-	15.972	-	Formiato de Citronelila	10.88	-	1276	-	1271
13	8	19.571	19.550	<i>trans</i> -Acetato de Mirtanol	0.39	0.43	1388	1387	1385
14	9	19.816	19.829	β -Elemeno	7.01	12.20	1396	1396	1391
15	10	20.686	20.696	β -E-Cariofileno	2.01	8.75	1424	1424	1419
-	11	-	20.973	ni	-	1.17	-	1433	-
16	12	21.751	21.740	α -Humuleno	1.31	7.27	1458	1458	1455
17	-	21.833	-	ni	0.75	-	1461	-	-
18	13	22.422	22.399	β -Charmigreno	0.79	1.23	1480	1479	1476
-	14	-	22.750	Etil, 4-metil Octanoato	-	0.53	-	1490	1484
19	-	22.784	-	β -Selineno	0.40	-	1492	-	1489
20	15	23.057	23.031	α -Selineno	0.33	1.55	1500	1499	1498
21	16	23.348	23.340	ni	0.70	4.34	1511	1510	-
22	-	23.441	-	α -Bulneseno	1.12	-	1514	-	1509
-	17	-	23.853	Maliol	-	1.07	-	1528	1566
-	18	-	24.773	<i>cis</i> -Murolo-5-en-4- β -ol	-	0.52	-	1560	1550
23	19	25.685	25.669	Óxido de Cariofileno	2.49	4.28	1592	1592	1582
24	20	26.461	26.434	Epóxido de humuleno II	1.18	1.59	1620	1619	1608
-	21	-	27.125	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5- α -ol	-	0.76	-	1643	1639
-	22	-	27.233	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5- β -ol	-	1.93	-	1647	1640
-	23	-	27.459	α -Murolo	-	1.16	-	1654	1644
25	24	27.792	27.807	Selin-11-en-4- α -ol	2.45	3.83	1666	1667	1658
26	25	28.033	28.115	ni	1.07	2.21	1674	1677	-
27	26	28.306	28.233	Espatuleno	1.42	1.43	1684	1682	1536
28	27	29.050	28.975	ni	1.71	1.04	1710	1708	-
29	28	29.305	29.224	Cedren-13-ol	1.41	3.13	1720	1717	1688
-	29	-	29.414	ni	-	0.54	-	1724	-
-	30	-	29.508	ni	-	1.19	-	1728	-
-	31	-	29.622	ni	-	1.98	-	1732	-
30	-	32.424	-	3,7,11,15 Tetrametil 2-hexadecen-1-ol	1.15	-	1838	-	2045
-	32	-	32.616	Hexahidro Farnesil acetona	-	11.31	-	1846	1754
31	-	33.073	-	ni	0.33	-	1864	-	-
32	-	33.522	-	(8Z,10Z) Hexadecadien-1-ol	0.57	-	1882	-	2060

TR = tempo de retenção; IR = índice de retenção.

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007).

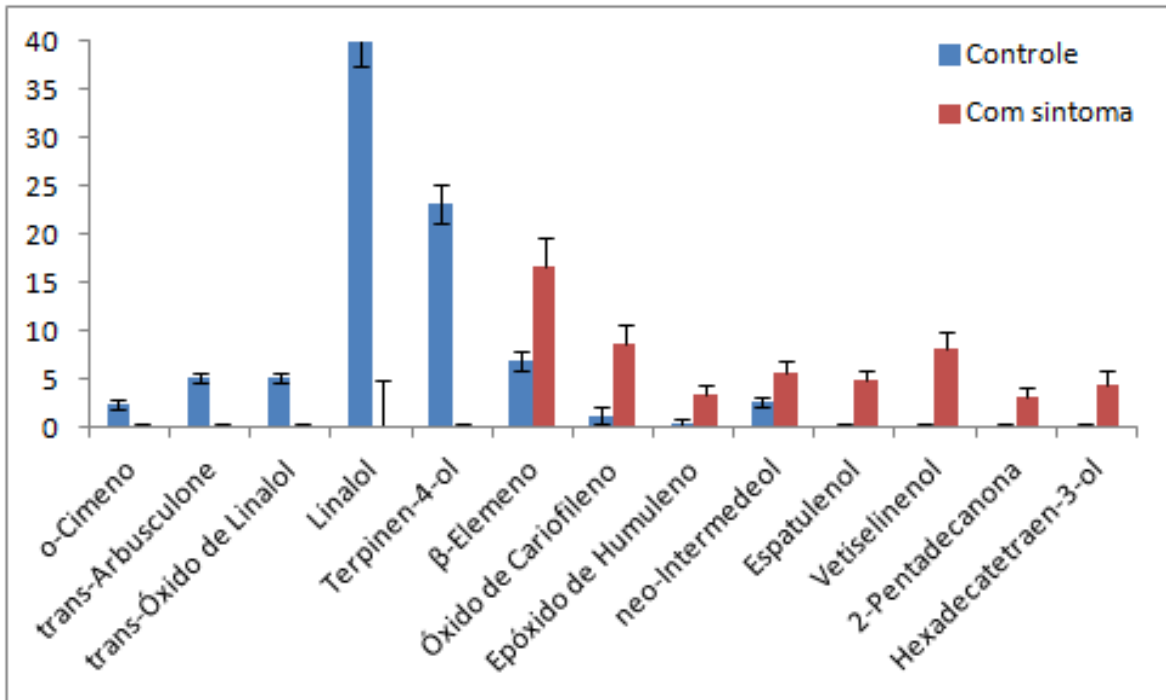


FIGURA 4.44 - Histograma dos compostos voláteis que apresentaram maior variação quantitativa na análise comparativa por Hidrodestilação de folhas de T. 'Murcott' controle com folhas com sintomas de MMA.

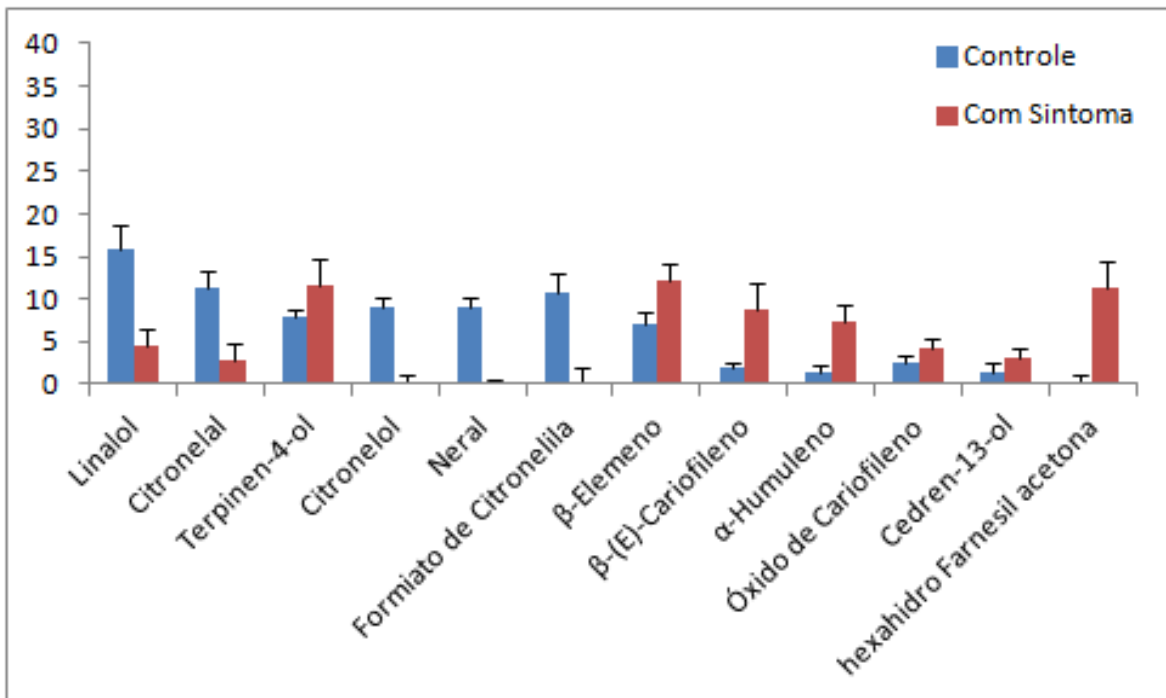


FIGURA 4.45 - Histograma dos compostos voláteis que apresentaram maior variação quantitativa na análise comparativa por Hidrodestilação de folhas de L. Pêra controle com folhas com sintomas de MMA.

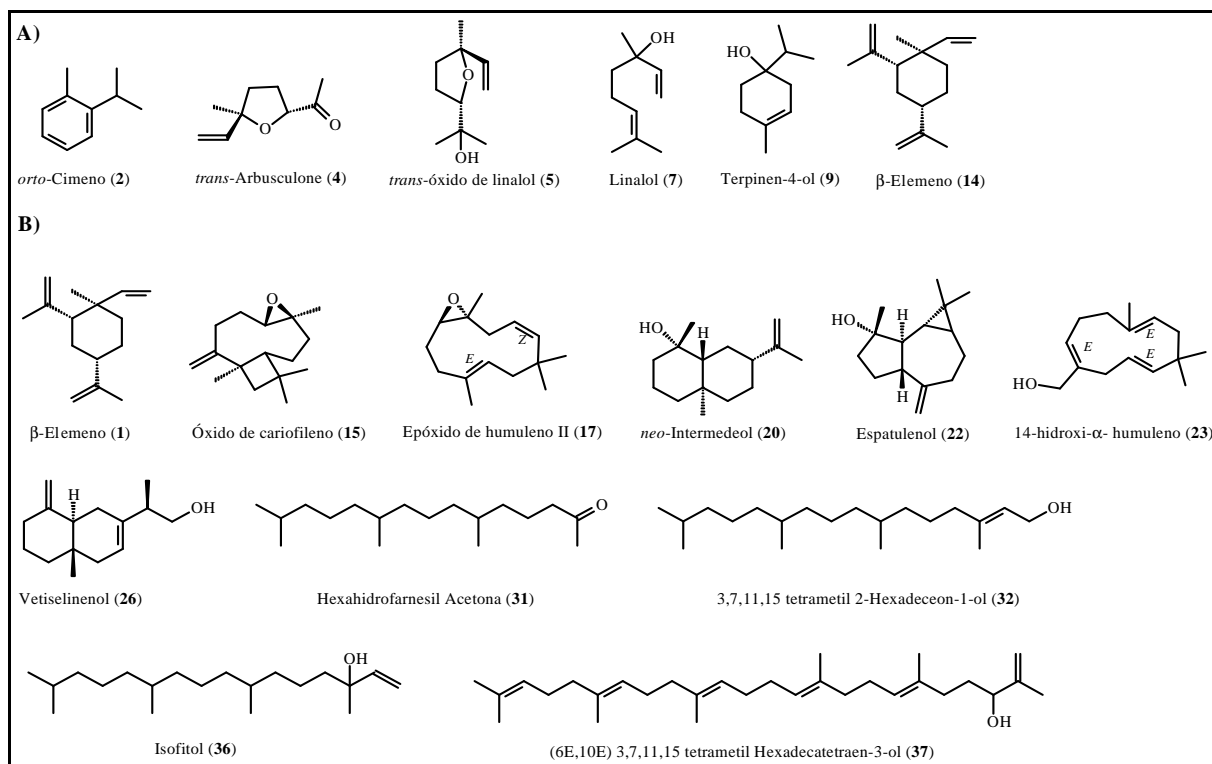


FIGURA 4.46 - Estrutura dos compostos voláteis majoritários identificados de T. 'Murcott' por Hidrodestilação. A) Voláteis majoritários das folhas controle; B) Voláteis majoritários das folhas com *A. alternata*.

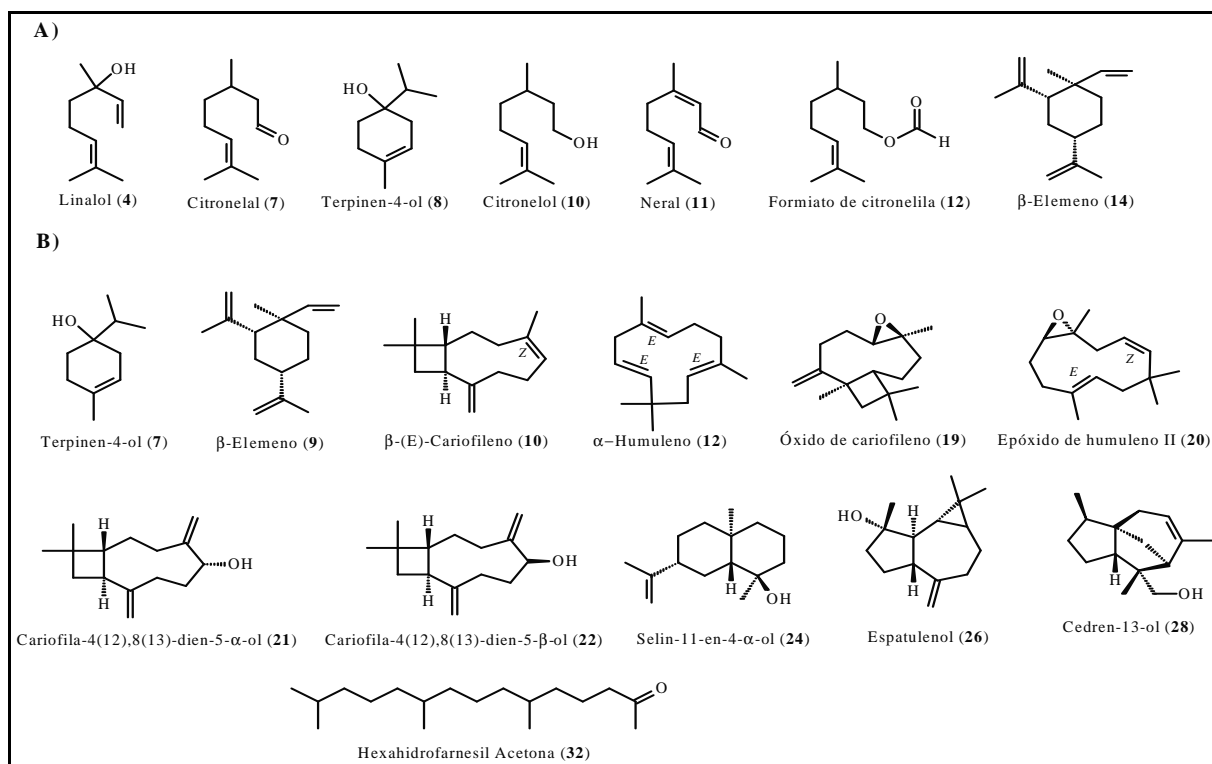


FIGURA 4.47 - Estrutura dos compostos voláteis majoritários identificados de L. Pêra por Hidrodestilação. A) Voláteis majoritários das folhas controle; B) Voláteis majoritários das folhas com *A. alternata*.

É possível observar, através da TABELA 4.11, que há uma predominância de monoterpenos oxigenados nas folhas controle T. 'Murcott', no qual o composto majoritário foi o monoterpeno Linalol. No entanto, não foi identificado monoterpenos nas folhas de T. 'Murcott' infectadas com *A. alternata*, onde foi observado um grande acúmulo de sesquiterpenos e o composto majoritário foi o sesquiterpeno β -Elemeno, composto este também majoritário na extração por HS-SPME. O componente majoritário das folhas controle de T. 'Murcott', analisadas por SPME, foi o Sabineno e este não foi observado por hidrodestilação, no entanto, está descrito na literatura que este composto transforma-se em Terpinen-4-ol e α -Terpineol com temperatura superior a 50 °C, então, sugere-se que este fato possa ter ocorrido, uma vez que temperaturas superiores a esta foram necessárias para a obtenção do óleo essencial. É importante ressaltar, que a hidrodestilação e a HS-SPME fornecem resultados complementares, onde na primeira técnica são detectados majoritariamente os analitos menos voláteis e os compostos mais voláteis são extraídos mais eficientemente por HS-SPME.

O maior número de compostos obtidos por hidrodestilação deve-se a injeção direta dos óleos essenciais, já a extração por SPME os analitos devem ter uma interação com o material polimérico da fibra para serem adsorvidos.

Nas folhas de L. Pêra foi observado comportamento similar ao observado para T. 'Murcott' na extração dos analitos por hidrodestilação. Nas folhas controle de L. Pêra também foi observado uma predominância de monoterpenos oxigenados, no qual o composto majoritário foi o monoterpeno Linalol. Nas folhas infectadas de L. Pêra também foi observado um grande acúmulo de sesquiterpenos e o composto majoritário foi o sesquiterpeno β -Elemeno, composto este também majoritário na extração por HS-SPME.

Pode-se observar, através da análise dos histogramas contidos nas FIGURAS 4.46 e 4.47, que a principal diferença no perfil químico de folhas infectadas e o controle é devido ao acúmulo de sesquiterpenos nas folhas

inoculadas com *A. alternata*, então, dentre as técnicas de extração utilizadas neste trabalho, recomenda-se a Hidrodestilação para a visualização da alteração do perfil químico das espécies estudadas, visto que os analitos de interesse apresentam cadeia carbônica longa, sendo melhor extraídos por este processo.

Simultaneamente a este trabalho, foi desenvolvido o estudo fitoquímico do fungo *A. alternata*, no laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela Dra Kátia Roberta Prieto, onde foi avaliado o perfil químico dos voláteis deste patógeno por hidrodestilação, nas mesmas condições experimentais utilizadas para a avaliação do perfil químico das plantas deste trabalho, já que uma possibilidade seria que estes sesquiterpenos fossem oriundos do próprio fungo, no entanto, não foram observados compostos semelhantes nesta análise e os analitos obtidos para o fungo encontram-se publicados em tese (PRIETO, et al., 2012). Os resultados obtidos sugerem uma resposta defensiva das plantas de *Citrus* estudadas, no entanto, a fim de realizar uma interpretação mais adequada destes resultados, tornam-se necessários estudos mais detalhados da atividade destes compostos frente ao fungo *A. alternata*.

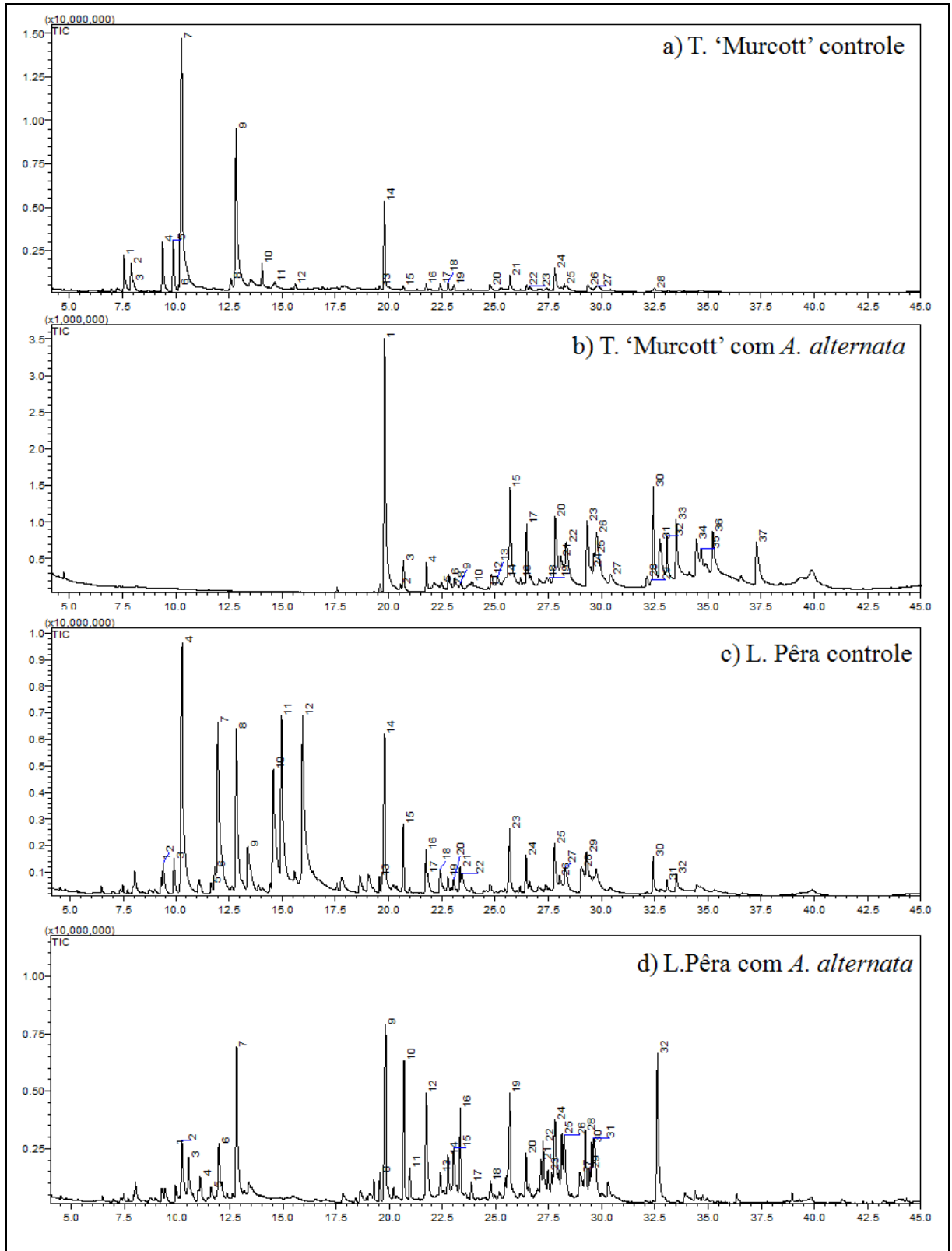


FIGURA 4.48 - Cromatogramas obtidos da extração de voláteis de Citros por Hidrodestilação.

4.9 - Microscopia Eletrônica de Varredura – Ambiental.

4.9.1 - MEV – Ambiental da interação *Alternaria alternata* e variedades resistente e suscetível de Citros.

A introdução do microscópio eletrônico de varredura ambiental (ESEM), trabalhando a pressão ambiente, representa uma nova perspectiva na pesquisa biológica. Em resumo, este sistema permite a análise de materiais condutores ou isolantes, sem a necessidade de recobrimentos, bem como materiais hidratados ou com voláteis nas pressões de operação do equipamento de MEV ambiental, capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 20.000 x) e resolução. Este equipamento possibilita uma excelente ferramenta para análise de biomateriais e sistemas biológicos, sem a necessidade de preparação da amostra, requerida pela técnica convencional, resultando em menores custos e tempo de análise e também reduzindo a possibilidade de introdução de artefatos, devido a mínima manipulação da amostra. Outra vantagem é a facilidade com que uma determinada região de interesse na amostra pode ser selecionada e localizada. Desta maneira, por exemplo, seleciona-se no material vegetal a exata região de interesse, que pode ser fotografado primordialmente em um microscópio ótico, e identificados posteriormente no microscópio eletrônico para um estudo mais detalhado de sua estrutura (DANILATOS, 1993).

Apesar da conveniência e das muitas aplicações biológicas associadas ao MEV – Ambiental, as potencialidades desta tecnologia ainda estão sob investigação e a sua escolha depende do objetivo do estudo. O MEV convencional utiliza superior ampliação e a visualização mais exata dos contornos, enquanto que o MEV – Ambiental respeita a estrutura tridimensional da célula e previne a perda das características superficiais mais finas e, portanto, as características originais do material vegetal analisado podem ser preservadas (GILBERT e DOHERTY, 1993).

Para esclarecer a natureza da resistência à mancha marrom (*Alternaria alternata*) em citros resistente (*Citrus sinensis*) e suscetível (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*), avaliou-se o processo de infecção, através da histopatologia. Às 16, 24, e 48 h após as inoculações de suspensões de esporos, coletaram-se amostras de tecidos foliares destas espécies e estas foram avaliadas. As folhas sadias também foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura – Ambiental.

Avaliou-se qualitativamente nas espécies de citros estudadas, germinação de conídios, formação de apressórios, penetrações, lesões, e colonização. Para efeito de comparação, as imagens obtidas em cada estágio do processo de infecção (16, 24 e 48 h), apresentam a mesma ampliação, de acordo com o detalhamento exigido.

Nas folhas utilizadas como controle (FIGURA 4.49 A1 e A2), ou seja, aquelas onde não foi aspergida a suspensão de esporos, foram obtidas as imagens ao longo da nervura central na face abaxial de ambas as espécies, sendo possível observar uma homogeneidade na estrutura foliar e a presença dos estômatos, estruturas responsáveis pelas trocas gasosas com o ambiente.

Na folha 16 h após a inoculação (FIGURA 4.49, B1 e B2) observa-se o processo de pré-infecção sobre a face adaxial, com a germinação dos esporos assexuais do fungo (conídios) e alongamento de seus tubos germinativos sem a formação de apressório, sendo observado na superfície foliar de ambas as espécies estudadas.

A análise dos materiais 24h após inoculação (FIGURA 4.49 C1 e C2), mostrou que a severidade das lesões na amostra de L. Pêra foram sempre inferiores em relação às observadas em T. 'Murcott', quanto ao tamanho e irregularidades observadas na superfície foliar. Verifica-se uma elevada formação de hifas e um aumento do número de conídios na espécie suscetível, ocasionando assim o desenvolvimento do processo de infecção, fato que não foi observado na superfície foliar de L. Pêra (FIGURA 4.49 C1), onde ainda é

possível observar a presença de conídios não germinados. Estes dados estão de acordo com os obtidos por SOLEIL e KIMCHI (1997), os quais classificaram a Laranja Pêra como uma das mais estáveis fenotipicamente e uma das mais resistentes dentre os genótipos de citros estudados.

Nas imagens 48 h após a inoculação foi possível observar uma colonização abundante por meio dos micélios na superfície de T. ‘Murcott’ (FIGURA 4.49 D2), com ampla colonização por conídios impedindo a visualização do tecido vegetal. Comparando-se com a superfície da L. Pêra (FIGURA 4.49 D1), observa-se a diferença de susceptibilidade existente entre as mesmas, ocorrendo na superfície foliar desta espécie apenas uma pequena colonização observando poucas hifas na sua superfície.

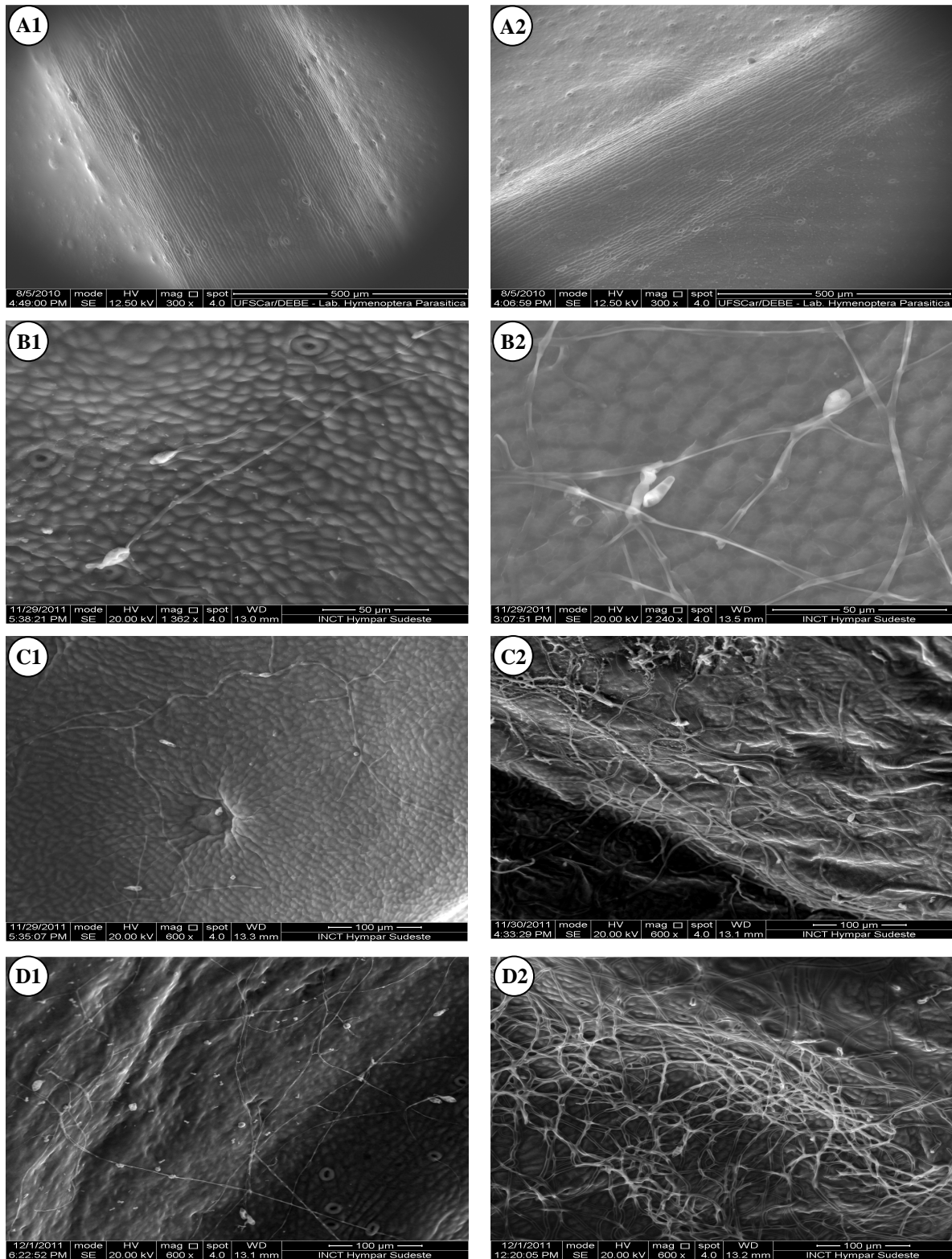


FIGURA 4.49 - Eletrofotomicrografias de varredura da superfície foliar adaxial de L. Pêra (1) e T. 'Murcott' (2), sendo: (A) controles e colonizadas por *Alternaria alternata* (B) 16 h, (C) 24 h e (D) 48 h após a inoculação.

4.9.2 - Avaliação da forma de penetração e colonização de *Alternaria alternata* em folhas de T. ‘Murcott’.

Os fungos pertencentes ao gênero *Alternaria* mostram-se bastante variáveis com relação a forma de penetração nos tecidos dos seus diversos hospedeiros, existem estudos avaliando se esta característica, que difere de outros fungos patógenos, aumenta a patogenicidade. É importante salientar que estudos sobre o processo infeccioso de *A. alternata* em mudas de tangerinas são escassos e várias indagações sobre a patogênese desse fungo precisam ser elucidadas. Segundo AKIMITSU e colaboradores (2003) foi verificado a penetração deste fungo apenas pelo estômato sem a formação de apressório, enquanto SOLEL e KIMCHI (1997) observaram a penetração apenas através da formação de apressório. Assim, esse trabalho teve como objetivo estudar a forma de colonização de *A. alternata* em folhas de T. ‘Murcott’ utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura – Ambiental. Este estudo foi feito apenas nas folhas T. ‘Murcott’, pois somente nesta variedade foi possível observar a penetração do fungo no tecido vegetal.

A esporulação de *A. alternata* ocorreu nas faces adaxial e abaxial das folhas (FIGURA 4.50). Apenas na face adaxial de T. ‘Murcott’ foi possível observar os apressórios (FIGURA 4.50 A), estrutura que fixa o patógeno no hospedeiro, os quais caracterizam-se como dilatações predominantemente formadas lateralmente na hifa para invadir o tecido do hospedeiro. A penetração direta pelos estômatos se deu com a formação de apressórios (FIGURA 4.50 A) e sem a sua formação (FIGURA 4.50 B), indicando que apressórios nem sempre são necessários para a penetração de espécies deste gênero. Diversos autores afirmam que a penetração estomatal é a via preferencial para os fungos ingressarem nos tecidos dos seus hospedeiros (RUEHLE, 1964; MOSCOW e LINDOW, 1989).

Na FIGURA 4.50 C observa-se a orientação do crescimento dos tubos germinativos para locais específicos da superfície foliar, as extremidades

dos tubos germinativos direcionaram-se para estômatos próximos. Nesta imagem também é observado que a forma preferencial de penetração do fungo na face abaxial se dá através dos estômatos com a formação de apressórios, estes eventos estão indicados na FIGURA 4.50 C por seta azul. Segundo WYNN (1976), a orientação do crescimento de tubos germinativos pode ser influenciada por características físicas da superfície do hospedeiro. Entretanto, neste trabalho não foram percebidas diferenças morfológicas entre as superfícies foliares das duas espécies de citros estudadas, as quais pareceram essencialmente similares ao microscópio eletrônico de varredura (FIGURA 4.49 A1 e A2).

A análise da FIGURA 4.50 C também permitiu observar a penetração direta no tecido foliar sem a formação de apressórios, evento este indicado por uma seta vermelha. Desse modo, foi observado neste trabalho a habilidade de *Alternaria alternata* em penetrar nos tecidos suscetíveis de T. ‘Murcott’ tanto diretamente (tecido foliar intacto) quanto indiretamente (abertura estomática com e sem apressório), fato este que ainda não havia sido relatado na literatura em um único trabalho.

Na FIGURA 4.50 C também foi observado a formação de uma matriz amorfa recobrando o tubo germinativo, parte dos conídios e estendendo-se até o tecido foliar. É possível observar que os tubos germinativos ficaram mais aderidos à superfície foliar na presença desta mucilagem. A presença de matriz extracelular semelhante à encontrada neste trabalho tem sido relatada em diversas interações planta-fungo (MIMS et al., 1995; KROPP et al., 1999; VAN DE GRAAF et al., 2002), sendo-lhe atribuída vários papéis na patogênese. Trabalhos correlacionaram a presença de uma fina camada de mucilagem extracelular à adesão de conídios de *Uncinuliella australiana* na superfície de *Lagerstroemia indica* (MIMS et al., 1995) e de *Erysiphe graminis* em folhas de aveia (CARVER et al., 1995). BENSCH, M.J. e VAN STADEN (1992) especularam que a presença de densa mucilagem recobrando os apressórios de *S. maydis* no ponto de infecção de fragmentos de colmo de milho, poderia estar

associada à proteção dos mesmos contra a desidratação. Embora a literatura aponte que tal secreção possa desempenhar um papel vital na patogênese, mais estudos são necessários para elucidar o papel da matriz no ciclo de vida do patógeno. Este é o primeiro relato da presença de mucilagem associada aos conídios de *A. alternata*.

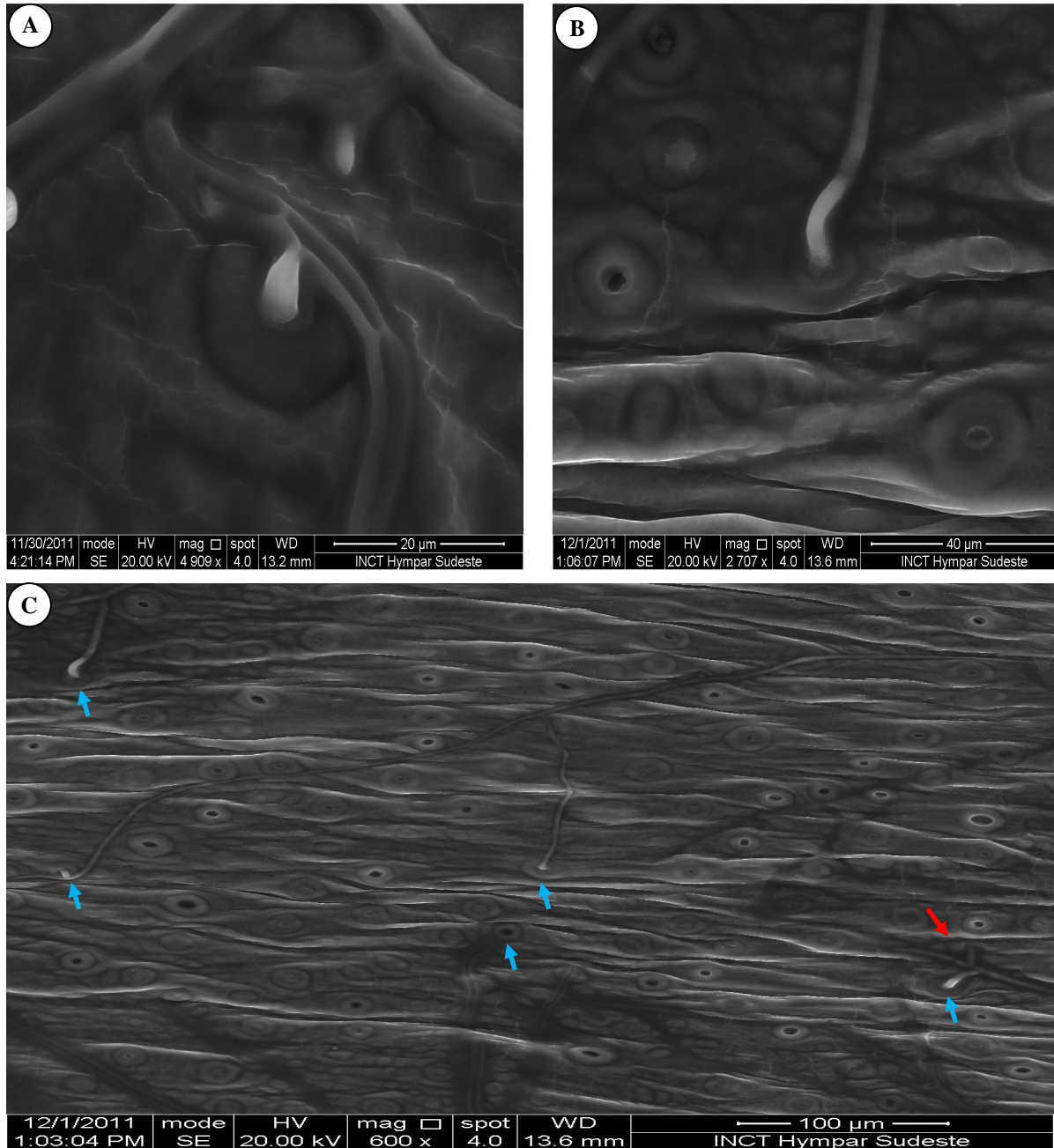


FIGURA 4.50 - Eletrofotomicrografias de varredura da superfície foliar de T. 'Murcott', sendo: (A) Face adaxial 24 h após a inoculação de *A. alternata*; (B) Face abaxial 48 h após a inoculação de *A. alternata*; (C) Face abaxial 48 h após a inoculação de *A. alternata*.

4.10 - Análise da variação do perfil químico de citros via CLAE aliada à ferramenta quimiométrica.

4.10.1 - Obtenção do perfil químico de citros via CLAE.

Para o desenvolvimento deste trabalho, inicialmente foram selecionadas mudas, em triplicata, de tangor ‘Murcott’ e de laranja ‘Pêra’ para representar as categorias controle (sem a inoculação do fungo) com sintomas e sem sintomas. Para a obtenção de cromatogramas “fingerprint” (“impressão digital”), com o objetivo de se avaliar possíveis diferenças no perfil químico de mudas de citros resistentes e tolerantes à Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), foi necessário obter um perfil cromatográfico representativo que apresentasse uma boa separação dos picos, tanto quanto possível, dentro de um tempo de análise razoável, sendo necessário otimizar a composição da fase móvel (tipo de solvente e a sua concentração inicial), o gradiente de eluição, vazão, fases estacionárias e volume de injeção, permitindo alcançar a melhor condição de análise e a condição escolhida está mencionada no ITEM 3.8. O uso da eluição gradiente em condições de ampla faixa de força da fase móvel é tido como exploratório e pode ser usado de modo a fornecer um cromatograma fingerprint (impressão digital) da amostra em análise. SYNDER e DOLAN (1996) relatam que a mistura ACN:H₂O como fase móvel é menos viscosa e permite a utilização de valores baixos de comprimento de onda no UV para detecção de compostos.

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. Apesar de se ter realizado o experimento utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD) numa faixa espectral de 190 a 600 nm, o comprimento de onda selecionado para detecção foi de 254 nm. Foram avaliados

outros comprimentos de onda como 220, 280, 300, 365, 400, 450 nm, e o escolhido foi onde se observou o maior número de picos detectáveis com uma intensidade razoável da maioria das bandas cromatográficas. 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 4.51 a 4.54 mostram os cromatogramas obtidos com as replicatas (n=3) de todas as partes vegetais das espécies estudadas no comprimento de onda de 254 nm.

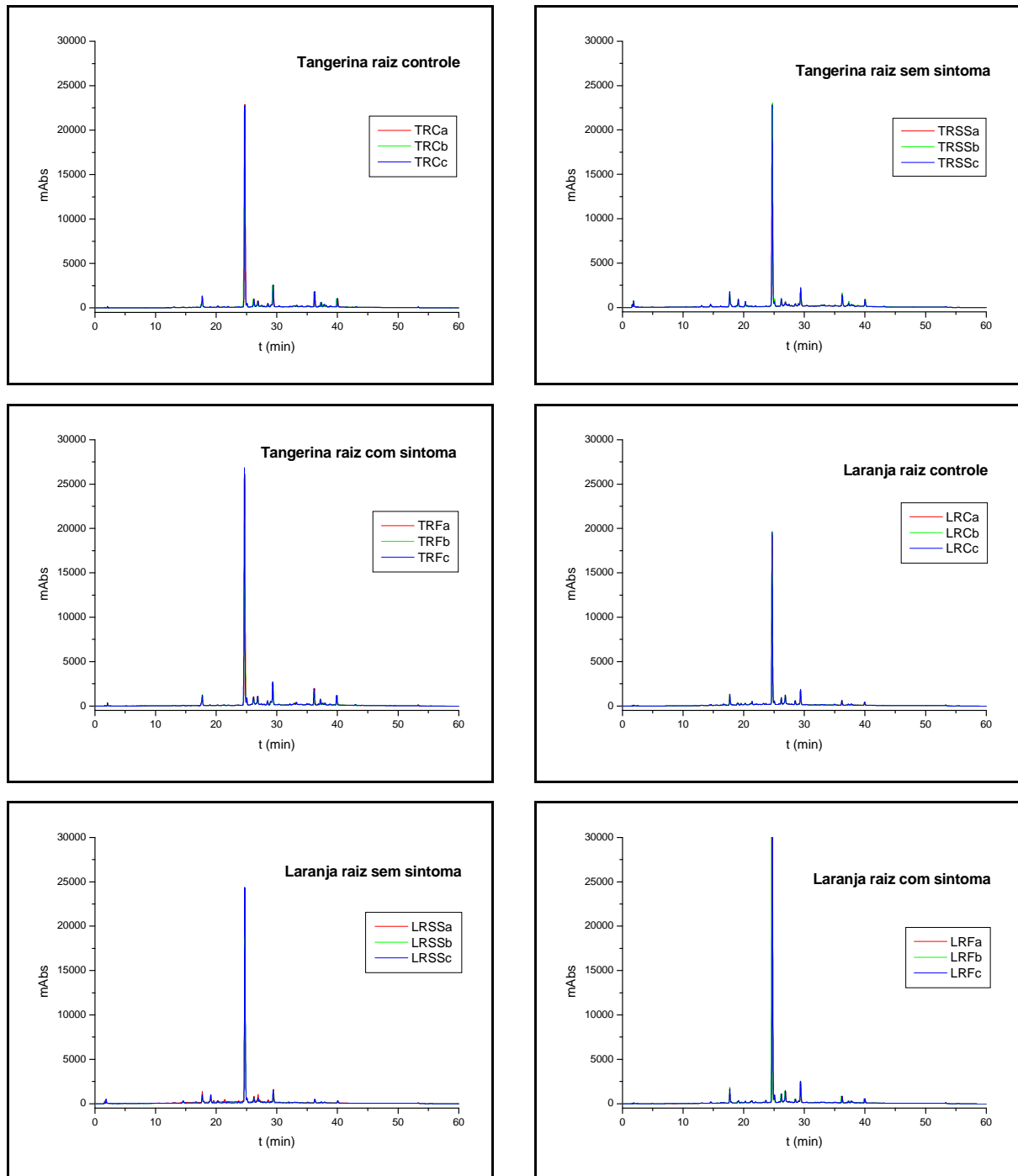


FIGURA 4.51 - Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos das raízes dos citros estudados. (T): T. ‘Murcott; (L): L. Pêra; (TRC e LRC): amostras controle, sem inocular o fungo; (TRSS e LRSS): raízes de amostras sem sintoma; (TRF e LRF): raízes de amostras com sintoma. ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

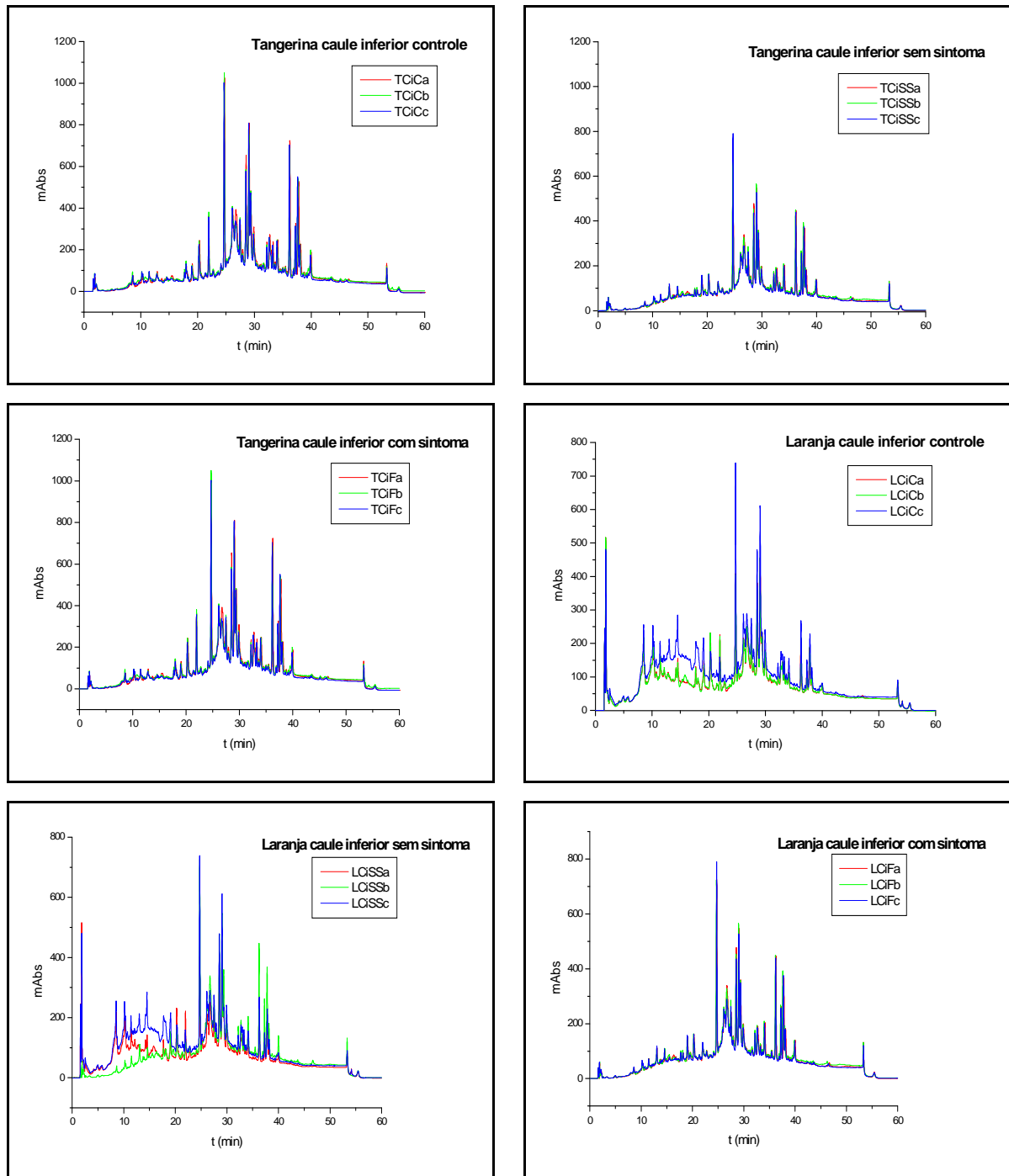


FIGURA 4.52 - Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos dos caules do porta-enxerto dos citros estudados. (T): T. ‘Murcott; (L): L. Pêra; (TCiC e LCiC): amostras controle, sem inocular o fungo; (TCiSS e LCiSS): amostras sem sintoma; (TCiF e LCiF): amostras com sintoma. ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

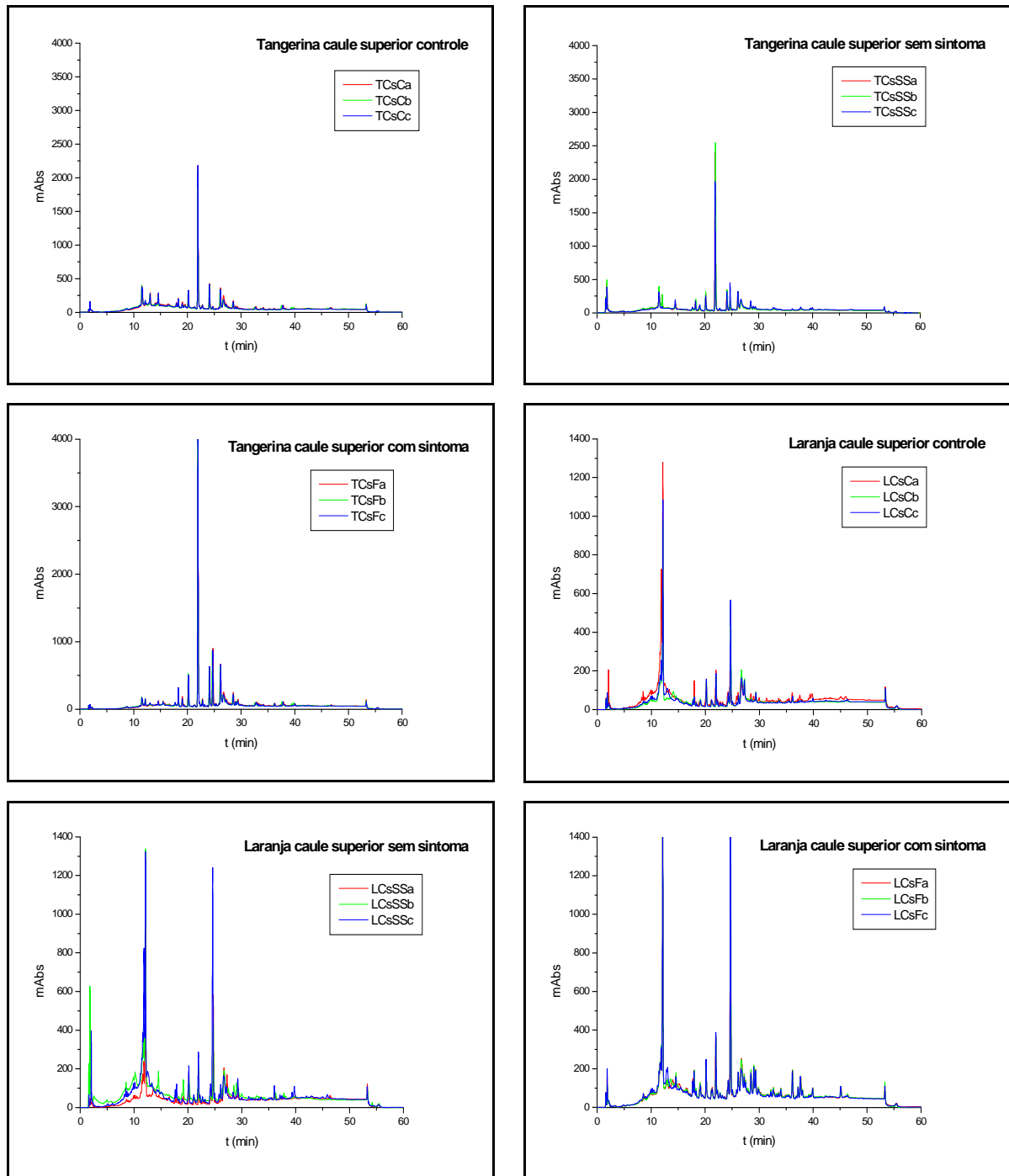


FIGURA 4.53 - Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos dos caules superiores dos citros estudados. (T): T. ‘Murcott; (L): L. Pêra; (TCsC e LCsC): amostras controle, sem inocular o fungo; (TCsSS e LCsSS): amostras sem sintoma; (TCsF e LCsF): amostras com sintoma. ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

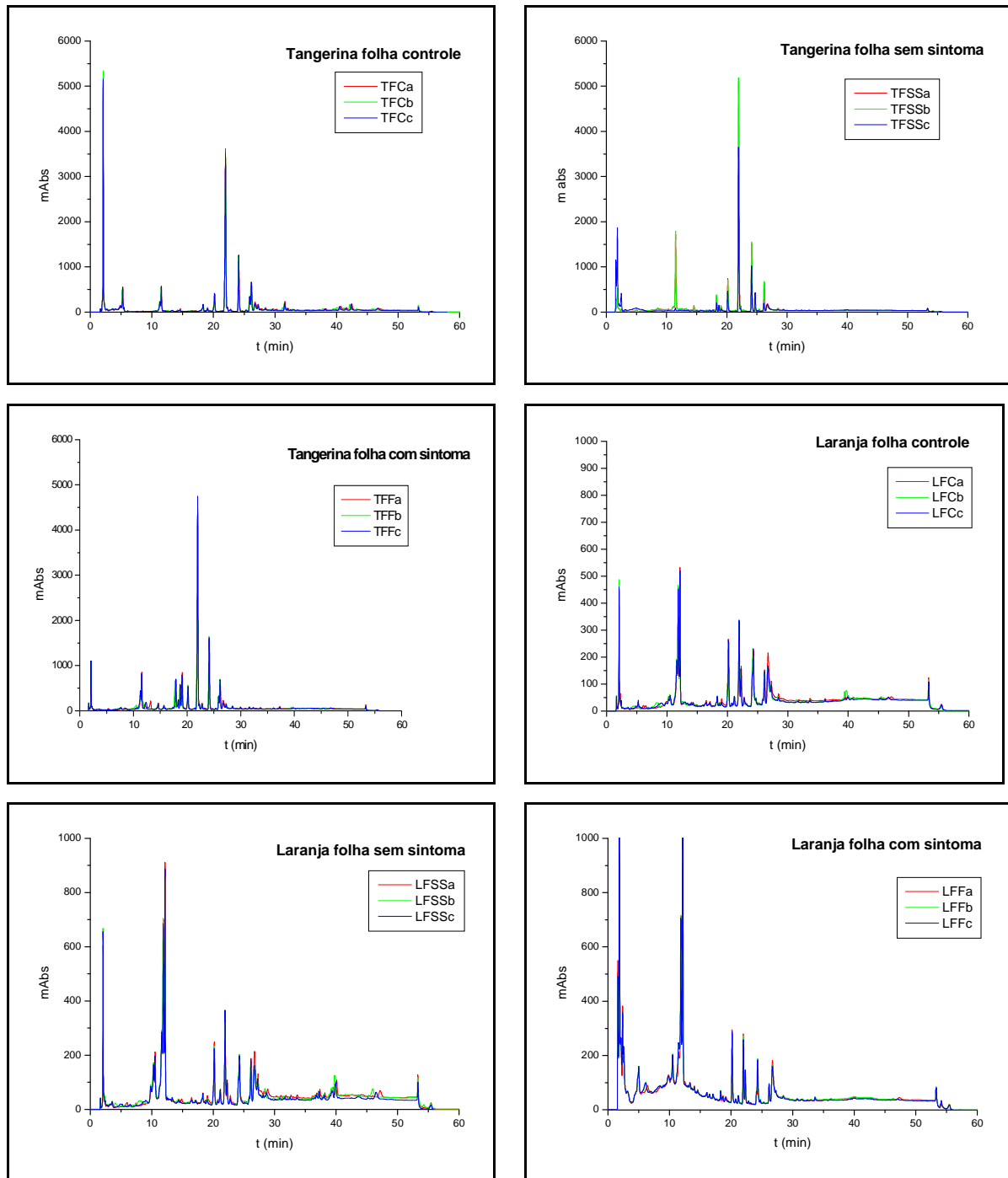


FIGURA 4.54 - Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos das folhas dos citros estudados. (T): T. ‘Murcott; (L): L. Pêra; (TFC e LFC): amostras controle, sem inocular o fungo; (TFSS e LFSS): folhas de amostras sem sintoma; (TFF e LFF): folhas de amostras com sintoma. ($\lambda = 254$ nm).

4.10.2 - Análise Quimiométrica.

Como os cromatogramas obtidos no item anterior são muito semelhantes, é difícil identificar diferenças entre as amostras baseando-se em uma simples análise visual. Desta forma, o emprego de técnicas quimiométricas de análise multivariada tem auxiliado na interpretação de resultados químicos.

A análise de componentes principais (do inglês, Principal Component Analysis, PCA) é um dos métodos mais importantes utilizados na Quimiometria e é a base para diversos métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada. O conjunto de dados analisado é organizado na forma de uma matriz (dados bidimensionais), onde as linhas podem ser amostras e as colunas variáveis. Esta análise consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante. Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, pois embora a informação estatística presente nas n-variáveis originais seja a mesma das n-componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 90% desta informação (MOITA NETO, et al., 1998).

O gráfico da componente principal 1 (CP1) *versus* a componente principal 2 (CP2) fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para a observação dos pontos no espaço n-dimensional, permitindo a visualização da dispersão dos pontos (amostras analisadas) em relação a todas as variáveis analisadas simultaneamente, facilitando a interpretação por permitir analisar a similaridade entre duas substâncias como função da distância entre ambas.

Foi realizada a análise de componentes principais (ACP), usando a informação química dada pelo perfil cromatográfico, para identificar semelhanças e diferenças entre as amostras analisadas. Os cromatogramas obtidos das diferentes partes de citros (ITEM 4.10.1) foram transformados em dados numéricos e organizados em uma matriz, onde as linhas representavam as amostras e as colunas representavam as variáveis, ou seja, os tempos de retenção de cada banda cromatográfica.

A matriz gerada apresentou 72 linhas (amostras) e 9785 colunas (tempo de retenção no intervalo de 0 a 47 minutos do cromatograma). A estratégia inicial foi eliminar algumas regiões cromatográficas não informativas (FIGURA 4.55) como, por exemplo, as que estavam como linha de base ou não apresentavam modificações químicas entre as amostras avaliadas, visto que estas regiões não iriam contribuir no agrupamento ou diferenciação das mesmas, reduzindo o número de variáveis e deixando os cálculos computacionais mais rápidos, uma vez que o conjunto de dados é menor. Então, a matriz gerada após as exclusões foi formada por 1826 variáveis (correspondentes ao tempo de retenção) e o mesmo número de linhas (72), correspondendo as amostras.

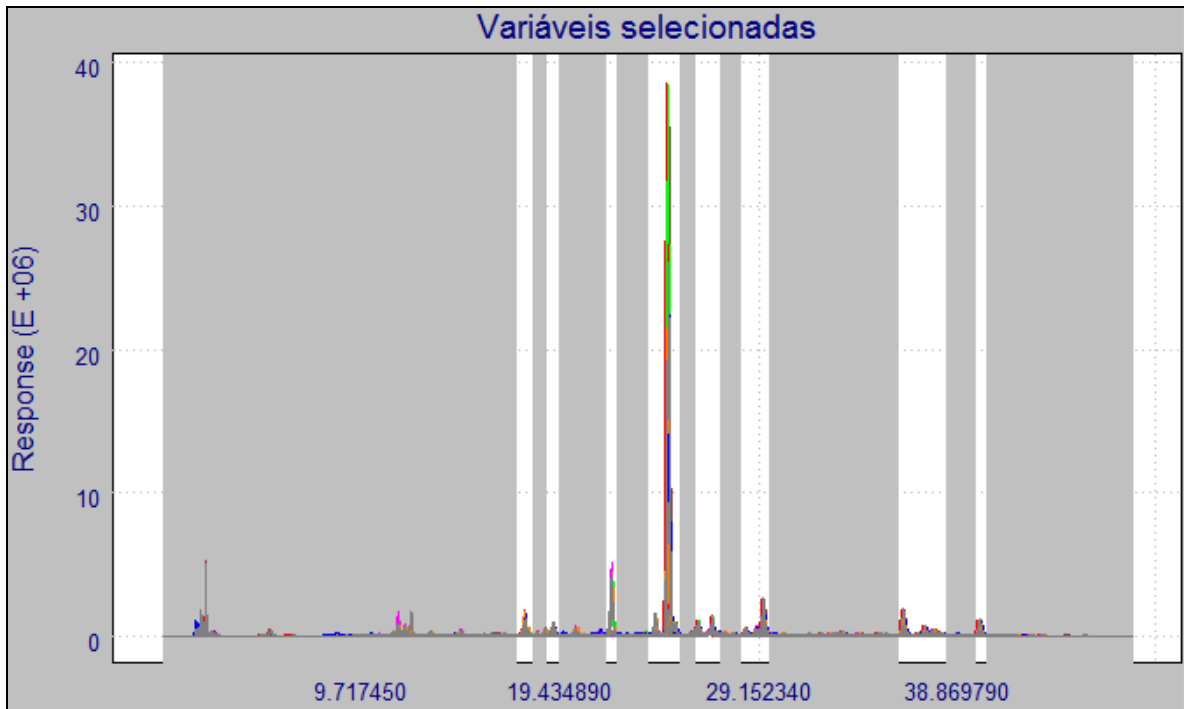


FIGURA 4.55 - Sobreposição de todos os cromatogramas analisados. Em branco: regiões selecionadas ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

A análise de PCA foi realizada utilizando-se 67% de informações dos dados originais descritos pelas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2). A diferenciação foi obtida conforme descrito nos gráficos de scores representados nas FIGURAS 4.56 e 4.57.

Observa-se nitidamente na FIGURA 4.56 quatro tipos de agrupamentos distintos, referentes as matrizes das raízes, folhas, caules superiores e inferiores, havendo separação entre as matrizes de cada órgão. Para facilitar a visualização dos dados, estes foram divididos em classes, portanto, cada órgão apresenta uma cor específica, independente de pertencer a laranja ou ao tangor. Na região do gráfico de *scores* onde são encontrados os extratos das raízes (dados em marrom), é possível observar que não há uma tendência de diferenciação entre os extratos da raiz de laranja e do tangor, por mais que se tenha uma grande dispersão dos dados. Também não foi verificado uma distribuição uniforme dos extratos nas classes controle, com e sem sintomas, não sendo possível diferenciá-los. O mesmo comportamento foi observado para as matrizes dos caules superior e inferior, por mais que seja possível diferenciar as

matrizes destes órgãos, não se observa uma discriminação entre os cromatogramas relativos a laranja e o tangor, sendo observado um agrupamento entre as diferentes amostras independente se as informações cromatográficas são obtidas de plantas controle, com ou sem sintomas e isto se deve a similaridade entre as amostras, pois amostras próximas neste espaço bidimensional irão apresentar tendências similares nas características cromatográficas. No entanto, para análise das folhas (dados em rosa) é possível observar uma diferenciação entre os extratos.

A FIGURA 4.57 apresenta o gráfico de *scores* relativo às folhas de citros analisadas, reduzindo o número de amostras para 18 e mantendo o número de variáveis (1826). Os dados foram divididos nas classes controle, com e sem sintoma, independente de pertencer a laranja ou ao tangor, sendo que cada classe apresenta uma cor específica. É possível observar que as folhas com sintoma de T. ‘Murcott’ (dados em verde) se diferenciaram dos demais extratos em valores positivos de PC1, com formação de um grupo coeso sem variações entre si. Observa-se também um agrupamento das matrizes das folhas de T. ‘Murcott’ controle e sem sintomas (TFC, TFSS), indicando que as mesmas apresentam uma similaridade no perfil cromatográfico. As matrizes das folhas de laranja pêra não apresentaram distinção entre si, independente se as mesmas eram do controle ou dos grupos com e sem sintomas, indicando não ser observado, pela técnica utilizada neste trabalho, variação do perfil químico desta espécie. No entanto, os extratos das folhas de L. Pêra se diferenciaram dos demais extratos, formando um grupo coeso entre si.

A análise quimiométrica mostrou haver diferenças relevantes entre as matrizes estudadas das folhas de T. ‘Murcott’, indicando que uma investigação mais detalhada deste órgão seria necessária para aumentar o entendimento da interação de T. ‘Murcott’ com o patógeno *Alternaria alternata*.

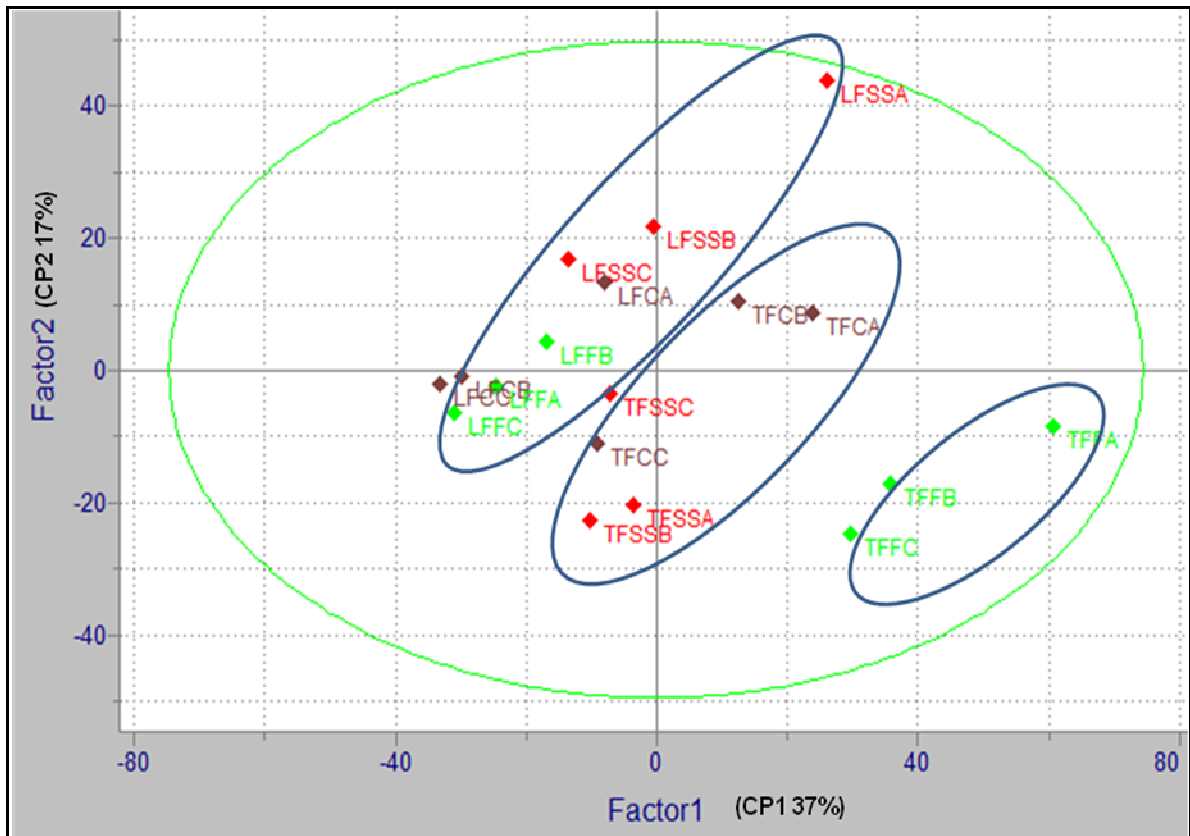


FIGURA 4.57 - Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos cromatogramas das amostras de citros estudados (T): T. 'Murcott'; (L): L. Pêra. (TFC e LFC): amostras de folhas controle; (TFSS e LFSS): amostras de folhas sem sintoma; (TFF e LFF): amostras de folhas com sintoma. ($\lambda = 254$ nm).

4.11 - Análise da variação do perfil químico de folhas de T. 'Murcott' via RMN ^1H .

Acredita-se que a maioria das plantas são capazes de sintetizar compostos com atividade antimicrobiana, mas algumas o fazem de maneira muito lenta, permitindo que o micro-organismo complete a infecção antes que haja o acúmulo destas substâncias em quantidades suficientes para inibi-lo. Para diversas interações fungo-patógeno foi demonstrado que a velocidade de acúmulo de fitoalexinas é um dos fatores decisivos para o estabelecimento ou não da infecção (PAXTON,1991; MODOLO et al. 2002). Algumas espécies expressam fitoanticipinas, como é o caso do café arábica, que acumula

compostos fenólicos como os flavonoides e derivados do ácido cinâmico, defendendo a planta da invasão de micro-organismos (WALLER, et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi analisar quais substâncias estariam envolvidas em uma resposta química da planta suscetível (T. 'Murcott') a Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), visto que resultados anteriores (ITEM 4.10.2) sugerem esta possibilidade. O experimento consistiu na avaliação de folhas de T. 'Murcott' com sintomas de MMA em uma região exatamente em cima da lesão causada pelo fungo *A. alternata* e em outro ponto próximo da lesão (na mesma folha), para a observação de uma resposta química localizada do hospedeiro. Folhas controle (sem a inoculação do fungo) e folhas sem sintomas também foram analisadas nestas mesmas regiões, para permitir a comparação entre as amostras, sendo que a metodologia utilizada está descrita no ITEM 3.9.

Em experimentos de RMN são utilizados padrões internos para fornecer um deslocamento químico de referência e também com o objetivo de quantificação relativa. Em teoria, qualquer composto pode ser usado como padrão em RMN, sendo necessário este composto ser quimicamente estável, não interagir com os componentes da amostra e não produzir sinais que se sobreponham com os da amostra de interesse. Por causa da complexidade dos extratos de plantas, o último requerimento torna a escolha de compostos de referência bem limitada. Neste experimento foi utilizado o TSP-d₄ (Tetrametilsilil Propionato de sódio) como padrão interno, pois este apresenta um singlete bem resolvido em uma região separada dos sinais produzidos pela maioria dos compostos orgânicos e apresenta maior estabilidade físico-química e solubilidade em água do que o TMS, referência anteriormente utilizada neste trabalho (PAULI, 2007). Foi feita a sobreposição dos espectros de RMN ¹H obtidos utilizando a intensidade do sinal do TSP-d₄ para quantificação relativa, como pode ser observado na FIGURA 4.58.

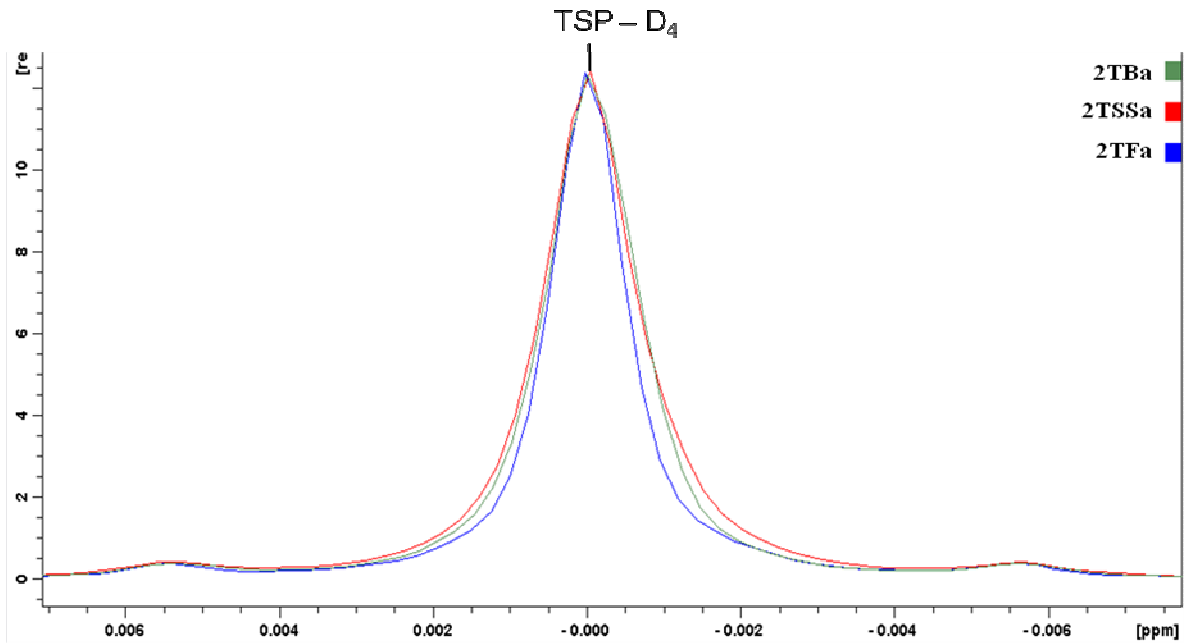


FIGURA 4.58 - Calibração dos sinais de referência (TSP-d₄) do espectro de RMN ¹H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA.

Na FIGURA 4.59 está apresentada a sobreposição dos espectros controle, com e sem sintomas, referentes ao tamanho de folha de 3,5 cm e o ponto de observação foi exatamente em cima da lesão observada em folhas com sintoma. Na FIGURA 4.60 observa-se a ampliação do mesmo espectro na região característica dos hidrogênios aromáticos (6,0 – 8,5 ppm).

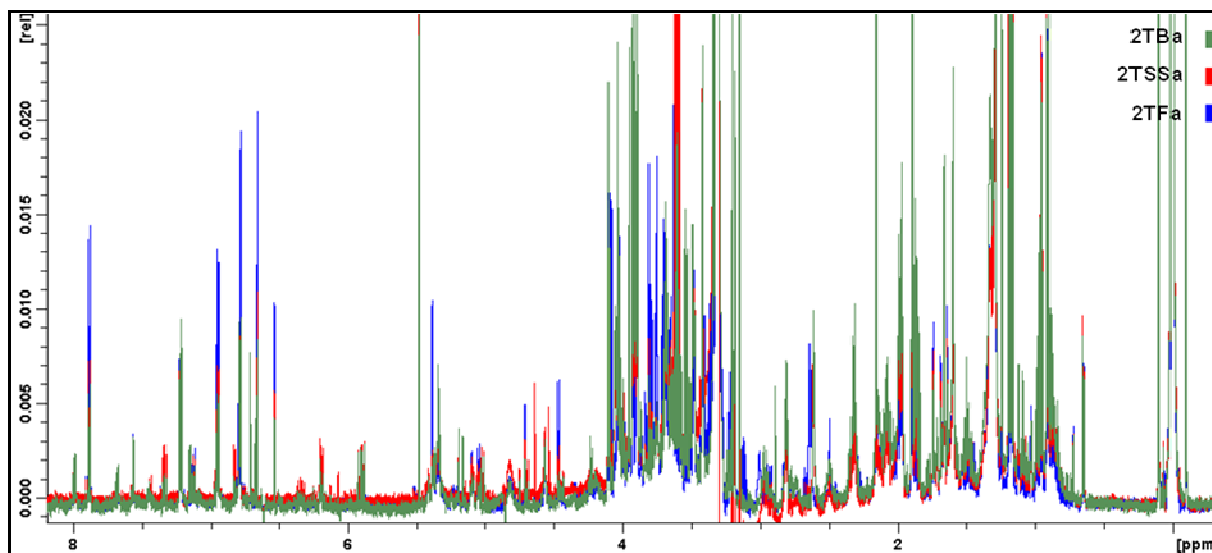


FIGURA 4.59 - Espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA.

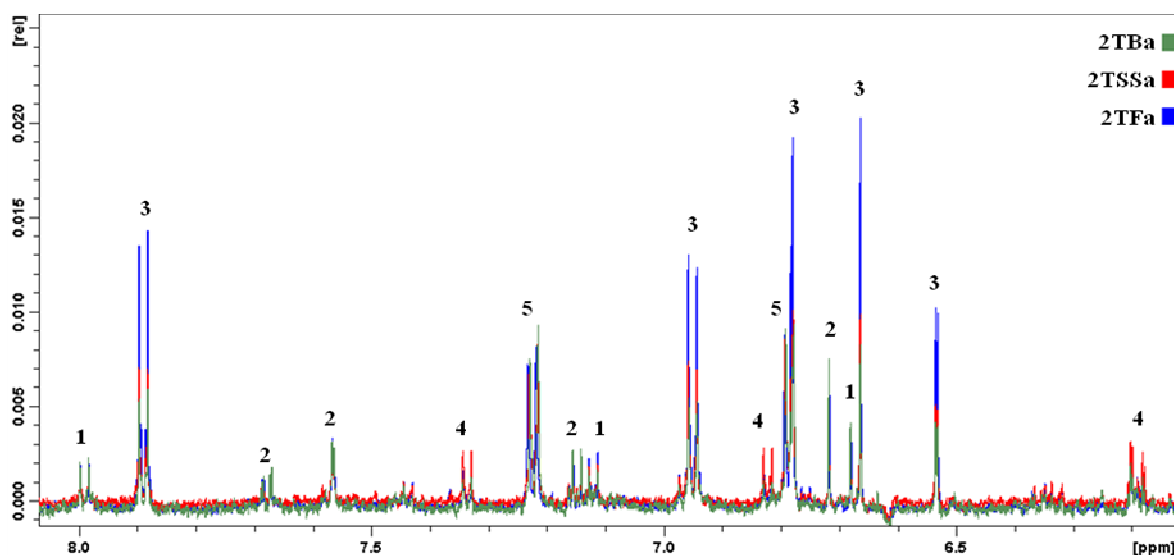
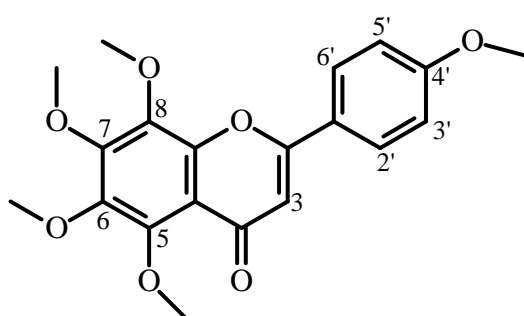


FIGURA 4.60 - Ampliação do espectro de RMN ^1H na região característica dos hidrogênios aromáticos de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA.

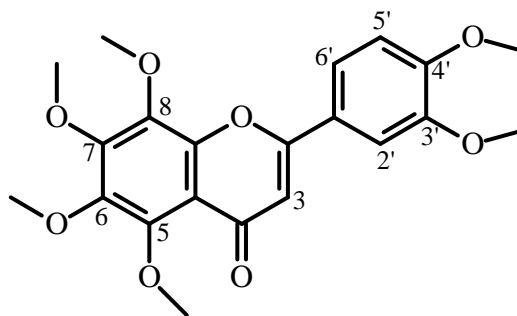
Analisando a região característica dos hidrogênios aromáticos, foi possível observar que houve boa resolução dos sinais observados, facilitando a sua identificação. A identificação estrutural foi feita principalmente baseando-se na comparação com os espectros de RMN ^1H das substâncias previamente isoladas das folhas de Tangor Murcott, conforme será descrito nos próximos itens. O espectro de RMN ^1H , representativo de 24 horas após a inoculação de *A.*

alternata, da espécie suscetível na região exatamente em cima da lesão, revelou um acúmulo apenas da substância identificada na FIGURA 4.60 como (3), quando comparam-se com as folhas sem sintomas e o controle. Outros hidrogênios aromáticos permanecem com a mesma área ou são observados apenas em folha controle e sem sintoma, como pode ser observado na FIGURA 4.60.

4.11.1 - Identificação estrutural das substâncias 1 e 2.



(1) Tangeretina



(2) Nobiletina

As substâncias **1** e **2** foram isoladas no estudo fitoquímico das folhas de T. 'Murcott', conforme descrito no ITEM 3.4. No entanto, quando estas substâncias foram identificadas neste estudo, o espectro das mesmas foram feitos em CDCl_3 por apresentarem maior solubilidade e por existirem relatos na literatura utilizando apenas este solvente, portanto, para efeito de comparação, foi feito o espectro de RMN ^1H dos padrões isolados em tubo capilar (5 mm d.i.), com MeOD como solvente em equipamento de 600 MHz de frequência para o hidrogênio, pois foram as mesmas condições em que foram realizados os experimentos nas folhas de T. 'Murcott' por RMN ^1H .

A substância **1** foi identificada como Tangeretina por apresentar os mesmos deslocamentos químicos do padrão analisado, como pode ser observado nas FIGURAS 4.61-4.63, que mostram a comparação entre o espectro de RMN ^1H da tangeretina e o espectro de 2TBa (Folha controle de T. 'Murcott' de 3,5 cm), onde foi observado que a Tangeretina encontra-se presente em 2TBa.

A substância **2** foi identificada como Nobiletina por apresentar deslocamentos químicos idênticos ao padrão analisado, sua comprovação foi feita mediante comparação do espectro do padrão ao espectro de 2TBa (Folha controle de T. 'Murcott' de 3,5 cm), como pode ser observado nas FIGURAS 4.64-4.66. O deslocamento químico das substâncias Tangeretina e Nobiletina em MeOD encontram-se na TABELA 4.12 bem como os deslocamentos de RMN ^1H em CDCl_3 descritos na Literatura.

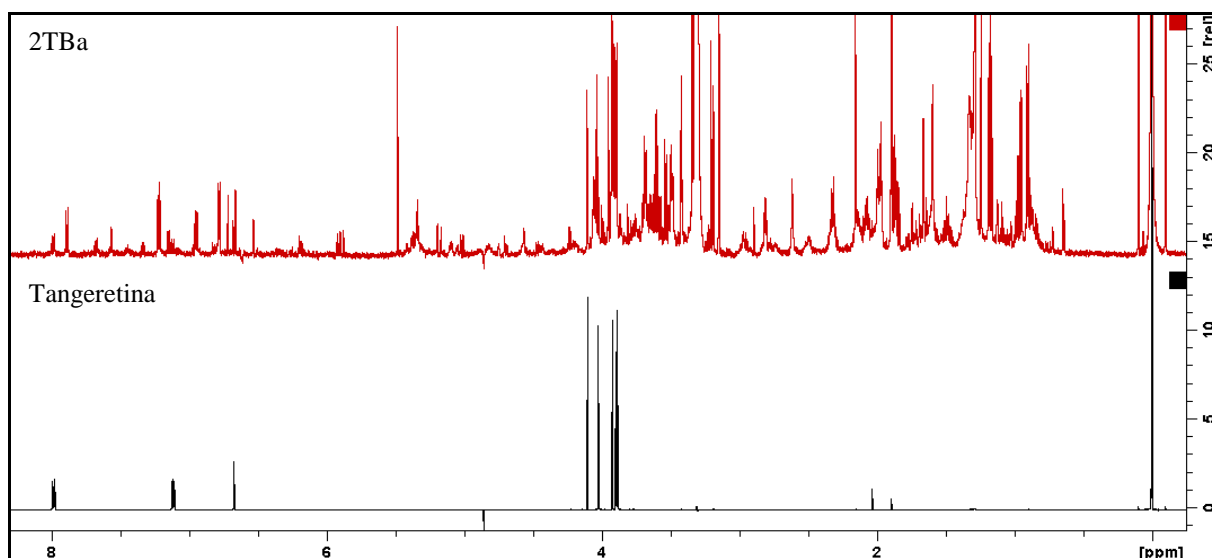


FIGURA 4.61 - Identificação da Substância **1** por comparação entre os Espectros de RMN ^1H de 2TBa: Controle da folha de T. 'Murcott' de 2,5 cm e Padrão de Tangeretina.

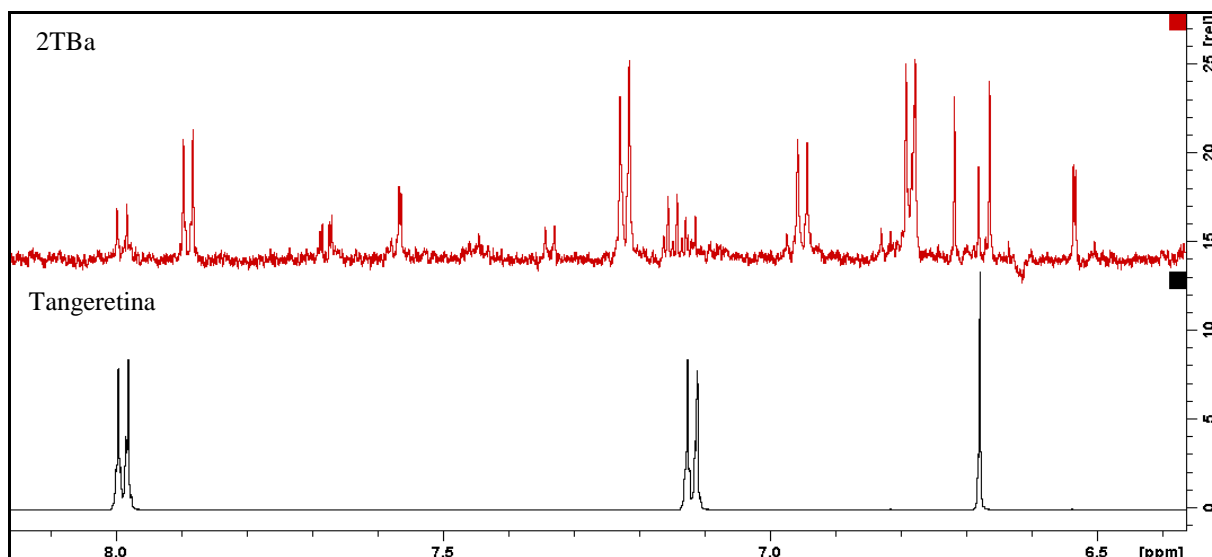


FIGURA 4.62 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TBa: Controle da folha de T. 'Murcott' de 2,5 cm e padrão de Tangeretina.

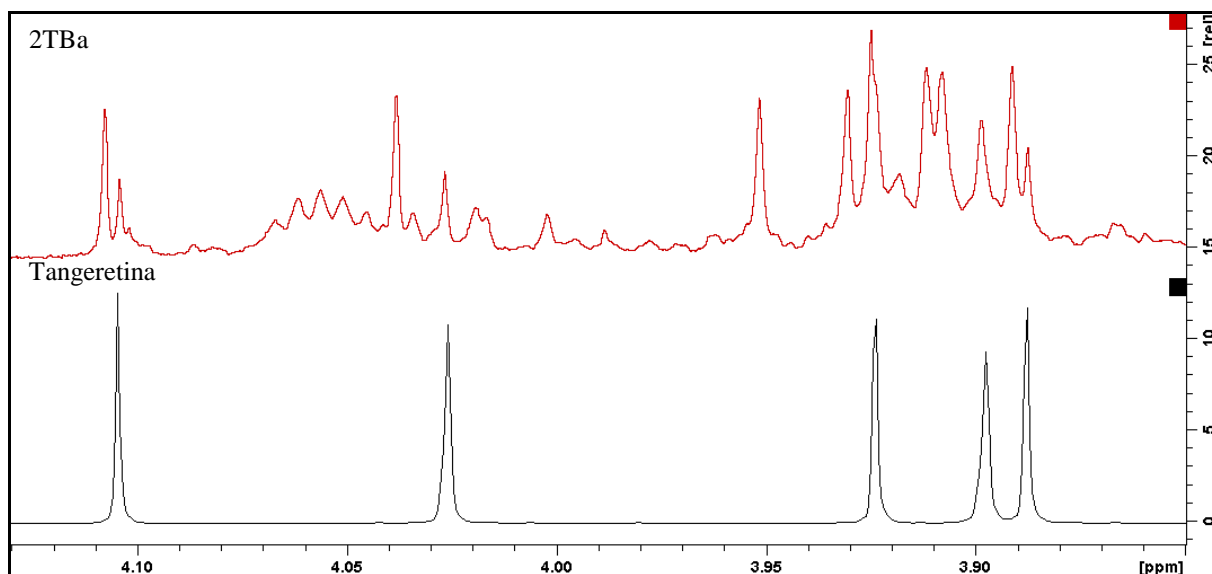


FIGURA 4.63 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TBa: Controle da folha de T. 'Murcott' de 2,5 cm e padrão de Tangeretina.

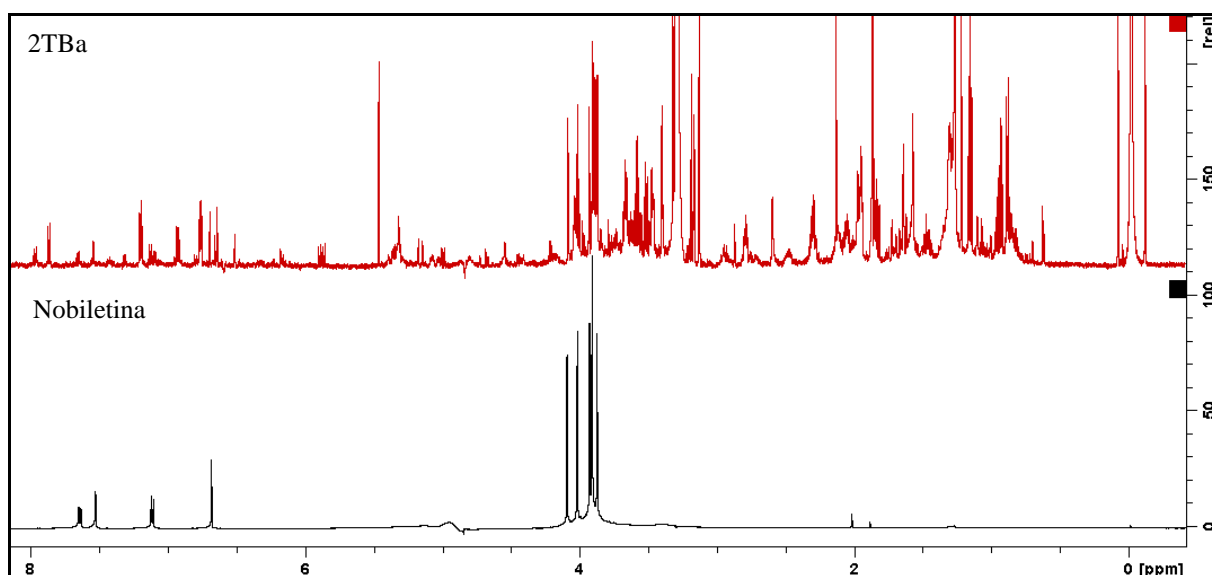


FIGURA 4.64 - Identificação da Substância 2 por comparação entre os Espectros de RMN ^1H de 2TBa: Controle da folha de T. 'Murcott' de 2,5 cm e Padrão de Nobiletina.

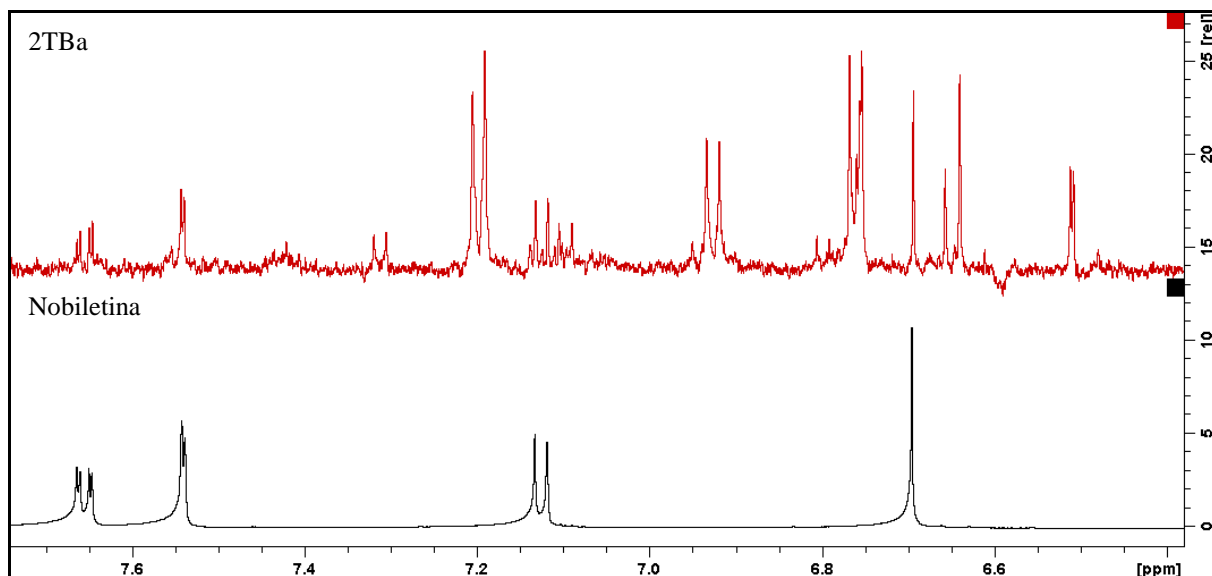


FIGURA 4.65 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TBa: Controle da folha de T. 'Murcott' de 2,5 cm e padrão de Nobiletina.

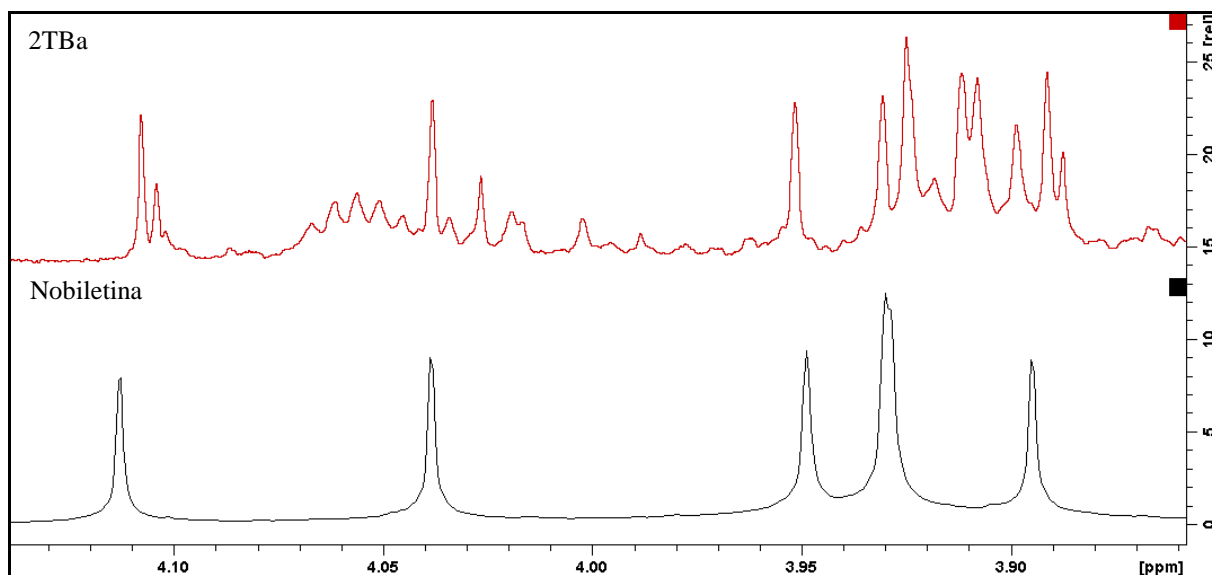


FIGURA 4.66 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TBa: Controle da folha de T. 'Murcott' de 2,5 cm e padrão de Nobiletina.

TABELA 4.12 - Dados de RMN ^1H de Tangeretina (1) e Nobiletina (2) juntamente com os dados descritos na literatura para estas substâncias (LI et al., 2006).

H	1 $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	1 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ <i>mult</i>	2 $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	2 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ <i>mult</i>
3	6,67 <i>s</i>	6,61 <i>s</i>	6,70 <i>s</i>	6,63 <i>s</i>
8	-	-	-	-
2'	7,98 <i>d</i> (9,0)	7,87 <i>d</i> (9,0)	7,54 <i>d</i> (1,8)	7,42 <i>d</i> (2,0)
3'	7,11 <i>d</i> (9,0)	7,02 <i>d</i> (9,0)	-	-
5'	7,11 <i>d</i> (9,0)	7,02 <i>d</i> (9,0)	7,13 <i>d</i> (8,4)	7,00 <i>d</i> (9,0)
6'	7,98 <i>d</i> (9,0)	7,87 <i>d</i> (9,0)	7,65 <i>dd</i> (8,4 e 1,8)	7,57 <i>dd</i> (9,0 e 2,0)
-OCH ₃	3,88 <i>s</i> , 3H	3,89 <i>s</i> , 3H	3,89 <i>s</i> , 3H	3,95 <i>s</i> , 6H
	3,90 <i>s</i> , 3H	3,95 <i>s</i> , 6H	3,92 <i>s</i> , 6H	3,97 <i>s</i> , 3H
	3,92 <i>s</i> , 3H	4,02 <i>s</i> , 3H	3,94 <i>s</i> , 3H	3,98 <i>s</i> , 3H
	4,02 <i>s</i> , 3H	4,10 <i>s</i> , 3H	4,02 <i>s</i> , 3H	4,03 <i>s</i> , 3H
	4,10 <i>s</i> , 3H		4,11 <i>s</i> , 3H	4,11 <i>s</i> , 3H

^a MeOD, 600 MHz

^b CDCl₃, 400 MHz

Valores de *J*, entre parênteses, em Hz.

4.11.2 - Identificação estrutural das substâncias 3 e 4.

A substância **3** foi isolada no estudo fitoquímico das folhas de T. 'Murcott', conforme descrito no ITEM 3.4.5. No entanto, seu espectro de RMN ^1H foi feito em DMSO por apresentar maior solubilidade e por existirem relatos na literatura utilizando este solvente, portanto, para efeito de comparação, foi refeito o espectro do padrão em RMN ^1H (600 MHz), desta vez utilizando MeOD como solvente em tubo capilar (5 mm d.i.).

A substância **3** foi identificada como sendo a Apigenina-7-O-rutinosídeo por apresentar deslocamentos químicos idênticos ao padrão analisado, sua comprovação foi feita mediante comparação do espectro do padrão ao espectro de 2TFa (Folha com sintomas de T. 'Murcott' de 3,5 cm), como pode ser observado nas FIGURAS 4.67-4.69.

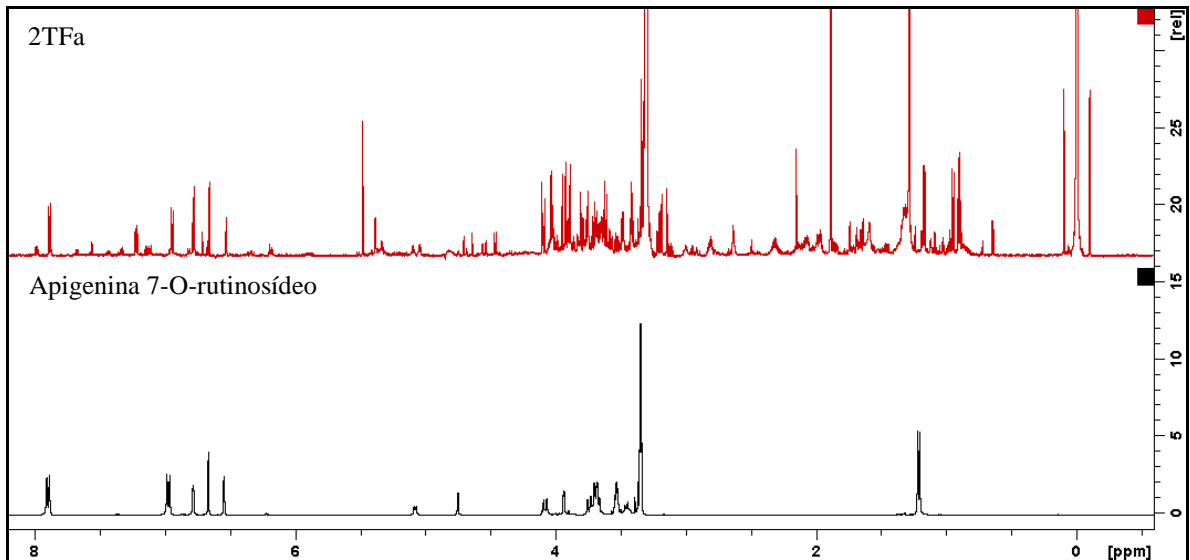


FIGURA 4.67 - Identificação da Substância 3 por comparação entre os Espectros de RMN ^1H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. 'Murcott' de 2,5 cm e Padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.

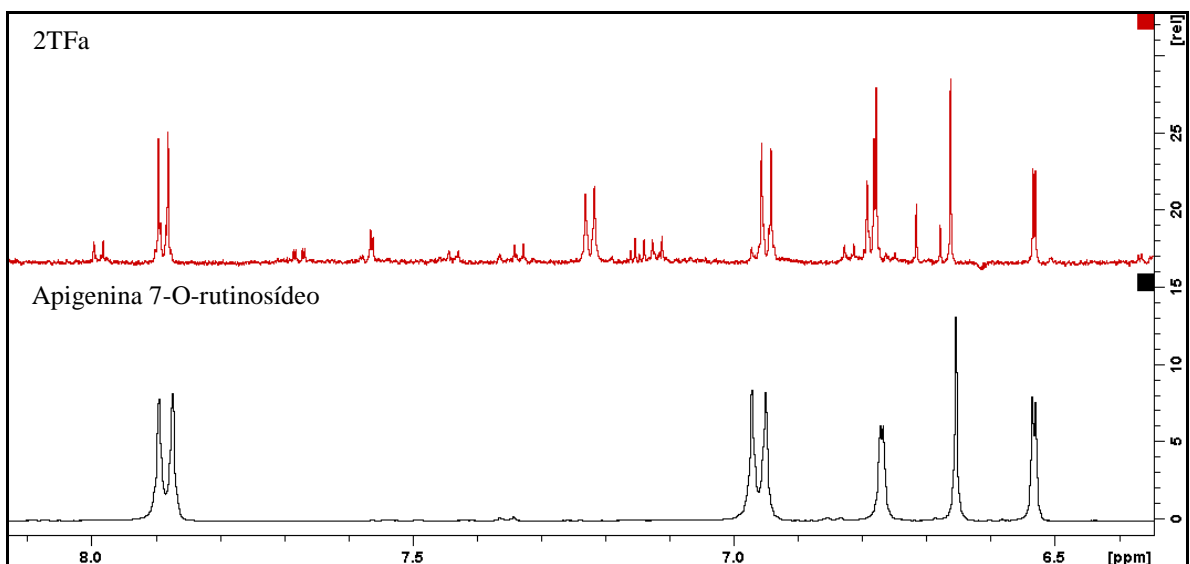


FIGURA 4.68 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. 'Murcott' de 3,5 cm e padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.

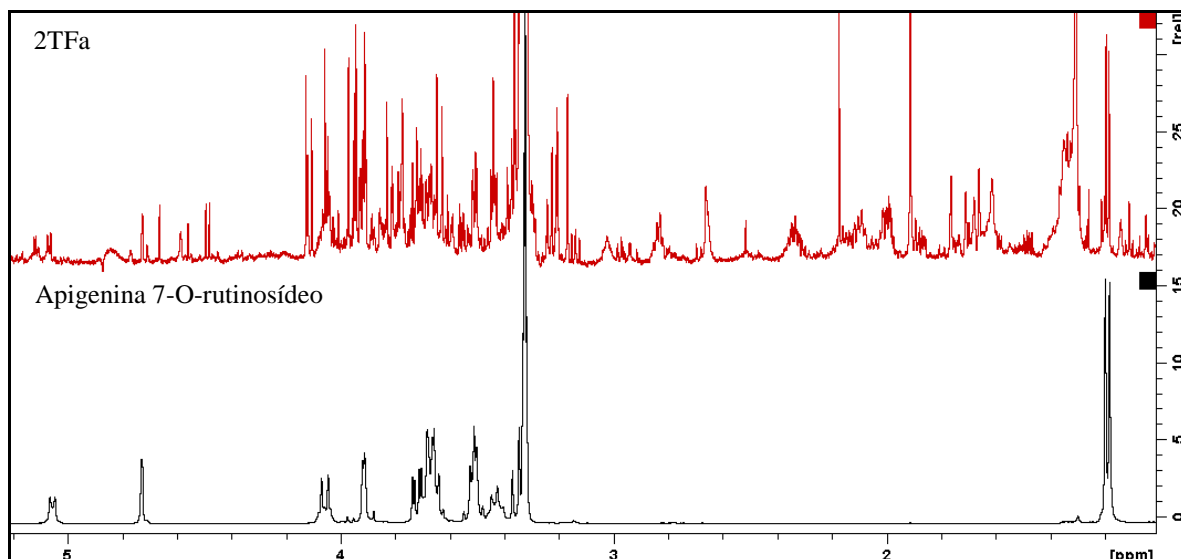


FIGURA 4.69: Ampliação dos Espectros de RMN ¹H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.

A substância **4** não foi isolada pura no estudo fitoquímico, sendo obtida como minoritária em uma mistura com Apigenina-7-O-rutinosídeo e sua determinação estrutural foi feita por RMN em uma e duas dimensões e por LC-MS. A comparação dos espectros da mistura das substâncias **3** e **4** feito em MEOD com o espectro de 2TFa encontra-se nas FIGURAS 4.70-4.72.

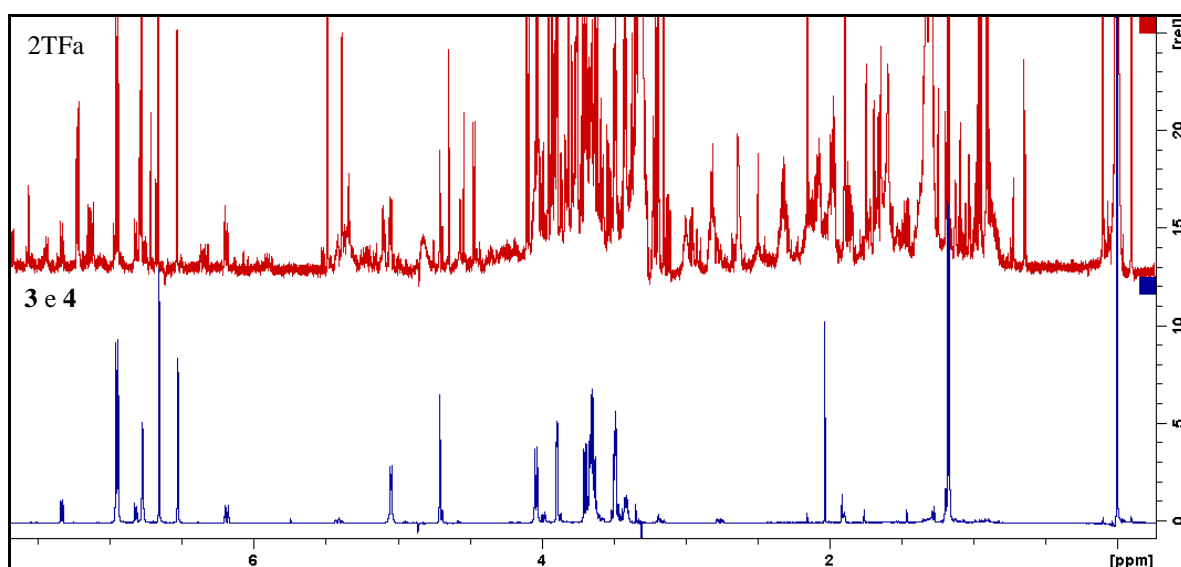


FIGURA 4.70 - Espectros de RMN ¹H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e da mistura de Apigenina-7-O-rutinosídeo com **4**.

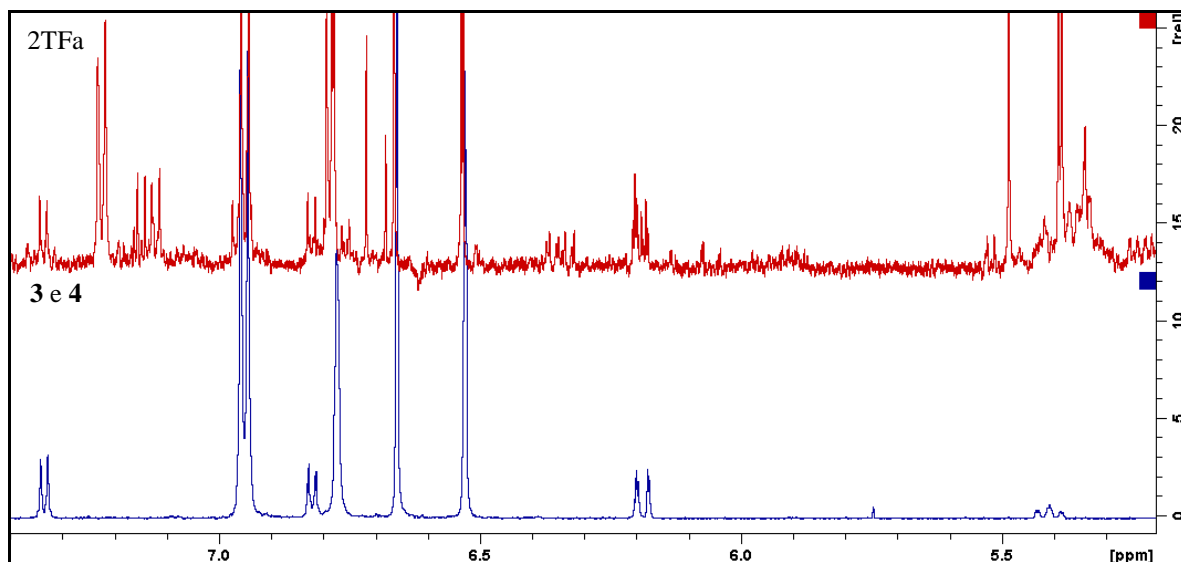


FIGURA 4.71 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. 'Murcott' de 3,5 cm e padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.

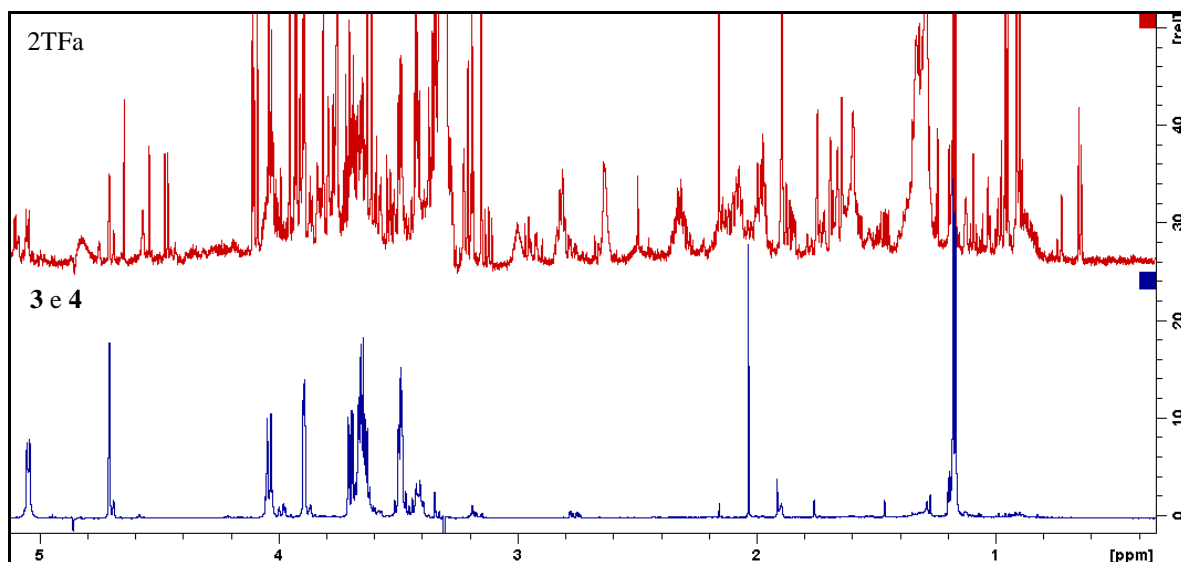


FIGURA 4.72 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. 'Murcott' de 3,5 cm e padrão de Apigenina-7-O-rutinosídeo.

A análise inicial do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.73) da mistura sugeriu-se que a substância minoritária apresentava dois dubletos em 7,33 (2H, $J= 8,4$) e δ 6,82 (2H, $J= 8,4$) e um possível duplo dubleto em 6,18 (2H), na região característica dos hidrogênios aromáticos. No entanto, a partir da análise do Mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.75) desta mistura foi possível identificar que a substância minoritária tratava-se de um flavonoide com o

mesmo padrão de substituição da Apigenina no anel B, visto que os carbonos diretamente ligados aos hidrogênios (H-2', H-6') e (H-3', H-5') da majoritária apresentam deslocamento químico similar aos carbonos diretamente ligados aos hidrogênios em δ 7,33 e δ 6,82, respectivamente, sugerindo que estes hidrogênios tratavam-se de H-2', H-6' e H-3', H-5' da minoritária. Outra informação importante fornecida pelo espectro de HSQC (FIGURA 4.76) foi que o sinal em δ 6,18 (2H) apresentava correlação com dois carbonos com deslocamento químico diferentes, indicando que aquele sinal sugerido anteriormente como um duplo dubleto tratava-se, na verdade, de dois dubletos em δ 6,17 e δ 6,19 ($J = 1,8$), que foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente do anel A. Esta informação indica que a substância **4** e a Apigenina apresentam o anel A com o mesmo padrão de substituição, no entanto, com deslocamento químico bem distintos, que pode ser justificada pela possível diferença no anel C destas duas moléculas.

O esqueleto do anel C de uma flavanona para o composto minoritário foi confirmado no espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.73) pela presença de sinais característicos na região de hidrogênios alifáticos: δ 3,17 (*dd*, $J = 17,2$ e $12,4$ Hz), δ 2,77 (*dd*, $J = 17,2$ e $2,4$ Hz) e um duplo dubleto em δ 5,41 ($J = 12,4$ e $2,4$ Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios H-3 α , H-3 β e H-2, respectivamente. O acoplamento geminal entre os hidrogênios alifáticos (H-3 α e H-3 β) e o acoplamento entre os hidrogênios H-3 α e H-3 β com o hidrogênio H-2 é observado no mapa de contorno COSY (FIGURA 4.78).

O mapa de contorno COSY (FIGURA 4.78) também apresentou correlações para a substância minoritária que indicam a presença de unidades de açúcar na estrutura da molécula. Por esta substância se apresentar em pequena quantidade, nem todas as correlações para os hidrogênios glicosídicos foram observadas. No entanto, algumas correlações relatadas na FIGURA 4.78 indicam a presença das unidades glicose e raminose, com acoplamentos semelhantes aos observados para a Apigenina 7-O-rutinosídeo. Mesmo não

sendo observado o hidrogênio anomérico da glicose, provavelmente por ter sido suprimido juntamente com o sinal da água, é possível sugerir a presença desta unidade de açúcar devido as correlações características da mesma observadas no mapa de contorno COSY (FIGURA 4.78). O mapa de contorno HMBC (FIGURA 4.79) somente apresentou correlações para a substância majoritária, deixando algumas dúvidas sobre a estrutura da molécula. Diante desta dificuldade, foi utilizada a Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS) para a determinação estrutural da substância minoritária.

Através do experimento por HPLC-UV/MS adquirido no modo Full Scan negativo foi possível observar no tempo de retenção de 4,06 min a substância Apigenina-7-O-rutinosídeo, que deu origem ao íon pseudo-molecular $[M - H]^- = 577$ (FIGURA 4.81). No experimento de íons fragmentos de $m/z = 577$ constatou-se a perda de 308 u.m.a (glicona) com o surgimento de um fragmento de m/z 269 (aglicona), indicando a perda simultânea de uma glicose e de uma raminose (FIGURA 4.82).

A FIGURA 4.83 apresenta o cromatograma de íons extraídos para os analitos de interesse. Foi possível identificar o composto minoritário no tempo de retenção de 4,24 min que deu origem ao íon pseudo-molecular $[M - H]^- = 579$. No experimento de íons fragmentos (FIGURA 4.84) de $m/z = 579$ constatou-se a perda de 308 u.m.a (glicona) com o surgimento de um fragmento de m/z 271 (aglicona), sendo possível observar semelhanças no perfil de fragmentação destas duas substâncias, indicando similaridades nas estruturas dos flavonoides, sendo sugerido que a única diferença entre ambas seria a ausência da ligação dupla entre C-2 e C-3 no composto minoritário e o composto em questão seria a flavanona Narirutina. No entanto, existe a possibilidade de ser o seu isômero, conhecido como Narigenina, onde a única diferença entre ambos é a presença no C-7 do grupo O-rutinosídeo na Narirutina e do grupo O-neohesperidosídeo na Narigenina. Uma busca na literatura mostrou que estes compostos apresentam perfis de fragmentação distintos

(ZHANG e BRODBELT, 2004), uma vez que a Narirutina apresenta um único fragmento de m/z 271 referente a perda simultânea de duas unidades de açúcar, e a Narigenina apresenta como fragmento majoritário o íon de m/z 459, referente a uma fragmentação da glicose, conforme é apresentado no ESQUEMA 4.4. A comparação do perfil de fragmentação do composto minoritário com a fragmentação da Narirutina mostrou que trata-se da mesma substância.

TABELA 4.13 - Dados de RMN ^1H de Apigenina 7-O-rutinosídeo (3) Narirutina (4) juntamente com os dados descritos na literatura para estas substâncias.

H	3 $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	3 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ <i>mult</i>	4 $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	4 (Lit.) $\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ <i>mult</i>
2	-	-	5,41 <i>dd</i> (12,4; 2,4)	5,39 <i>dd</i> (12,0; 3,0)
3 α	6,66 <i>s</i>	6,87 <i>s</i>	3,17 <i>dd</i> (17,2; 12,4)	3,13 <i>dd</i> (17,0; 12,0)
3 β			2,77 <i>dd</i> (17,2; 2,4)	2,73 <i>dd</i> (17,0; 3,0)
4	-	-	-	-
10	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	6,46 <i>d</i> (1,8)	6,17 <i>d</i> (2,0)	6,17 <i>d</i> (2,0)
7	-	-	-	-
8	6,37 <i>d</i> (2,0)	6,79 <i>d</i> (1,8)	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,19 <i>d</i> (2,0)
9	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
2'	7,88 <i>d</i> (9,0)	7,96 <i>d</i> (8,4)	7,33 <i>d</i> (8,4)	7,32 <i>d</i> (8,4)
3'	6,95 <i>d</i> (9,0)	6,96 <i>d</i> (8,4)	6,82 <i>d</i> (8,4)	6,81 <i>d</i> (8,4)
4'	-	-	-	-
5'	6,95 <i>d</i> (9,0)	6,96 <i>d</i> (8,4)	6,82 <i>d</i> (8,4)	6,81 <i>d</i> (8,4)
6'	7,88 <i>d</i> (9,0)	7,96 <i>d</i> (8,4)	7,33 <i>d</i> (8,4)	7,32 <i>d</i> (8,4)
1''	4,71 <i>d</i> (1,8)	4,56 <i>sl</i>	-	4,98 <i>d</i> (7,4)
1'''	5,05 <i>d</i> (7,2)	5,08 <i>d</i> (6,6)	4,69 <i>sl</i>	4,62 <i>d</i> (0,8)
6'''	1,17 <i>d</i> (6,0)	1,10 <i>d</i> (6,0)	-	1,08 <i>d</i> (6,2)
Prótons glicosídicos	3,30-4,00 <i>m</i>	3,30-3,84 <i>m</i>	3,15-3,50 <i>m</i>	3,16-3,43 <i>m</i>

^a MeOD, 600MHz

^b DMSO, 200MHz

^c MeOD, 500MHz

Valores de *J*, entre parênteses, em Hz.

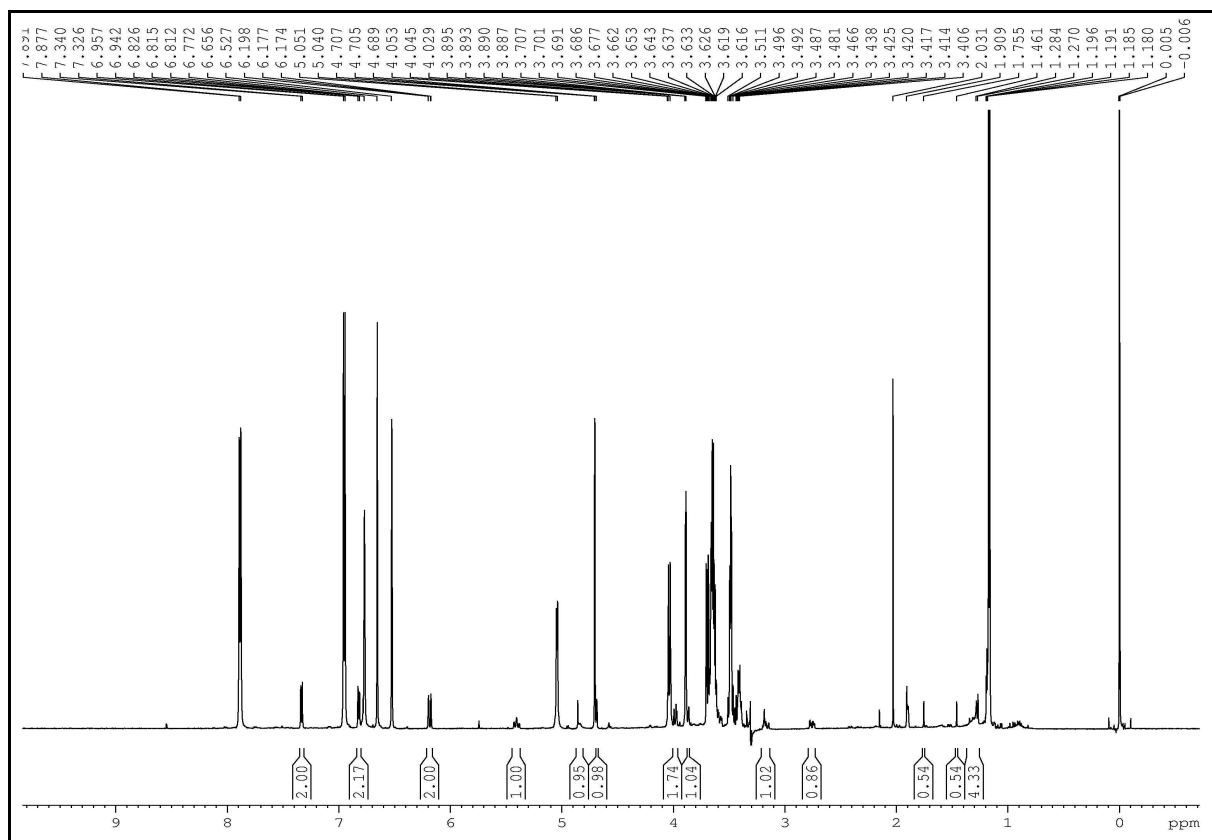


FIGURA 4.73 - Espectro de RMN ^1H da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD)

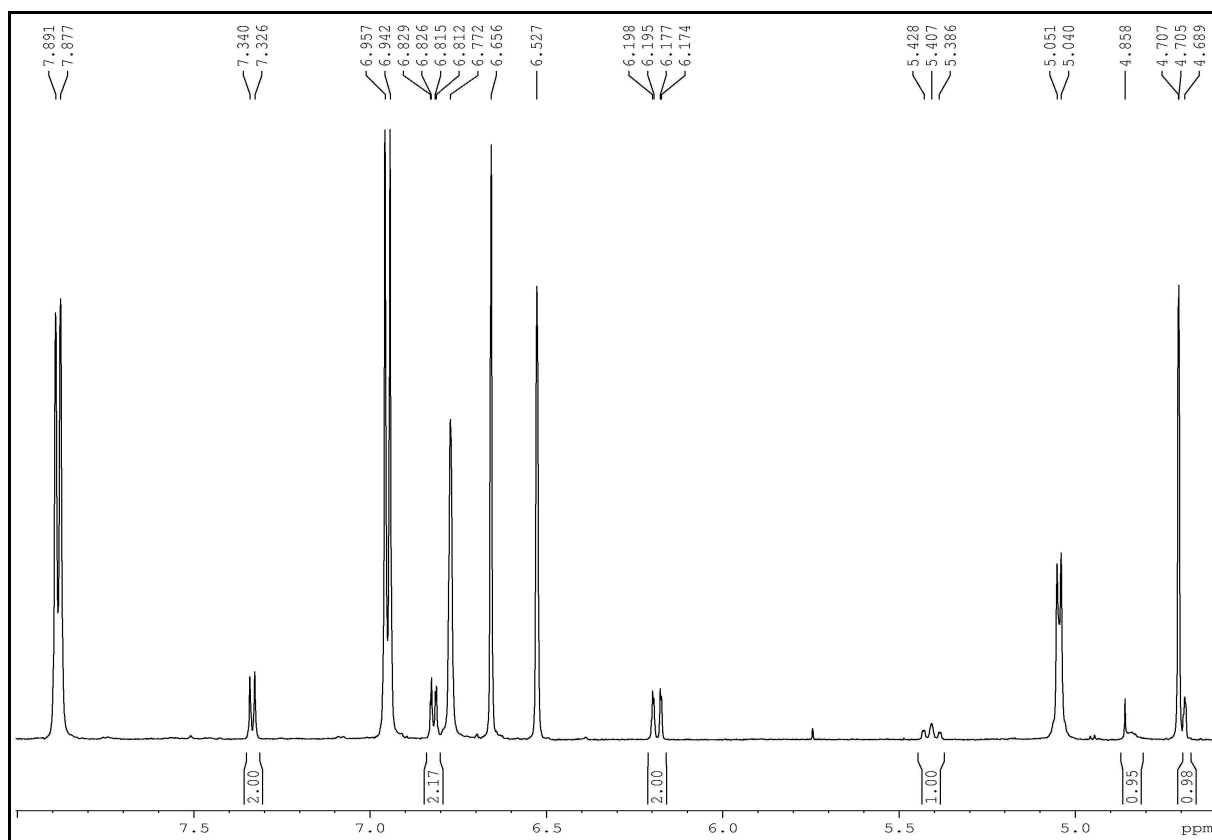


FIGURA 4.74 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD).

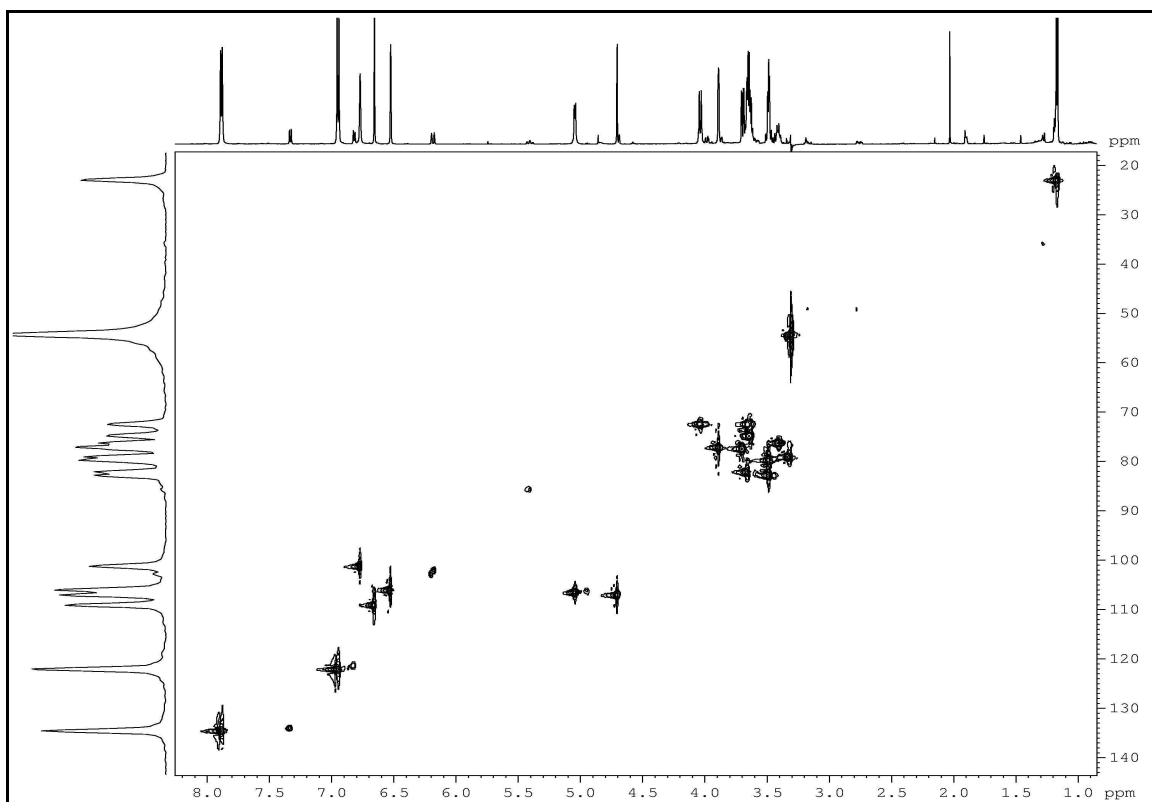


FIGURA 4.75 - Mapa de contorno HSQC da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD).

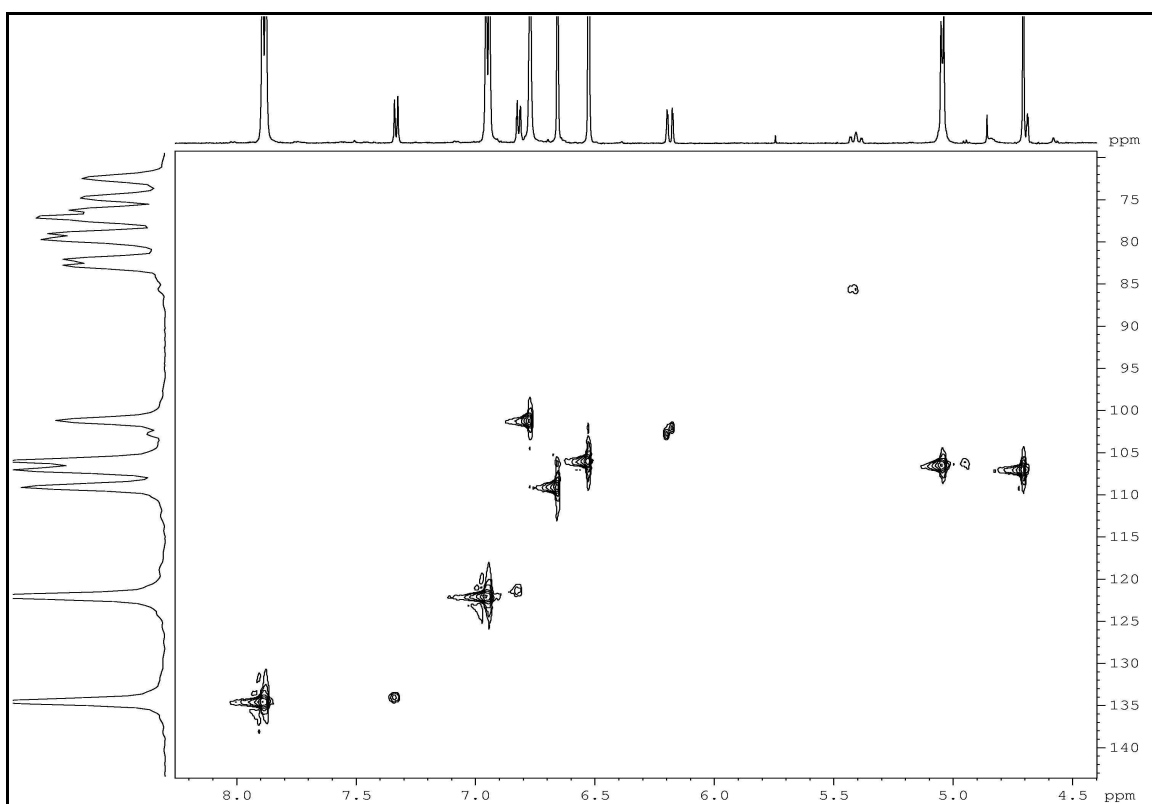


FIGURA 4.76 - Ampliação do mapa de contorno HSQC da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD).

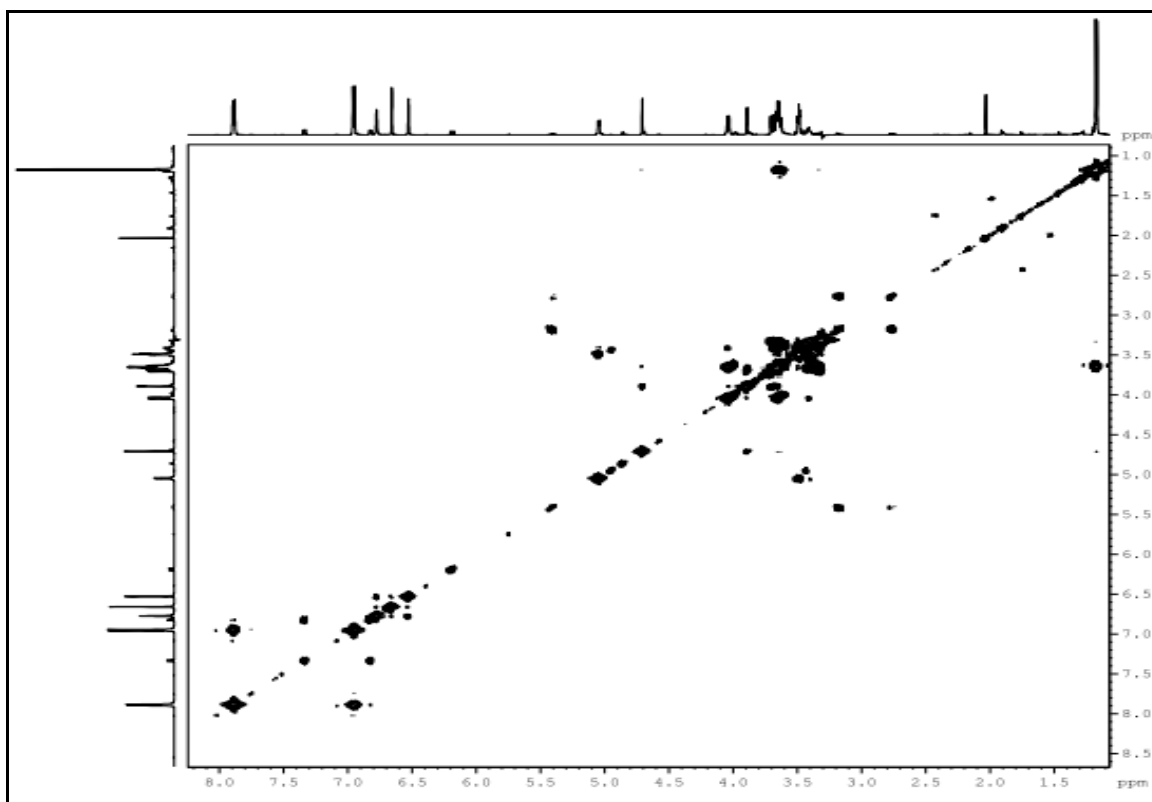


FIGURA 4.77 - Mapa de contorno COSY da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD).

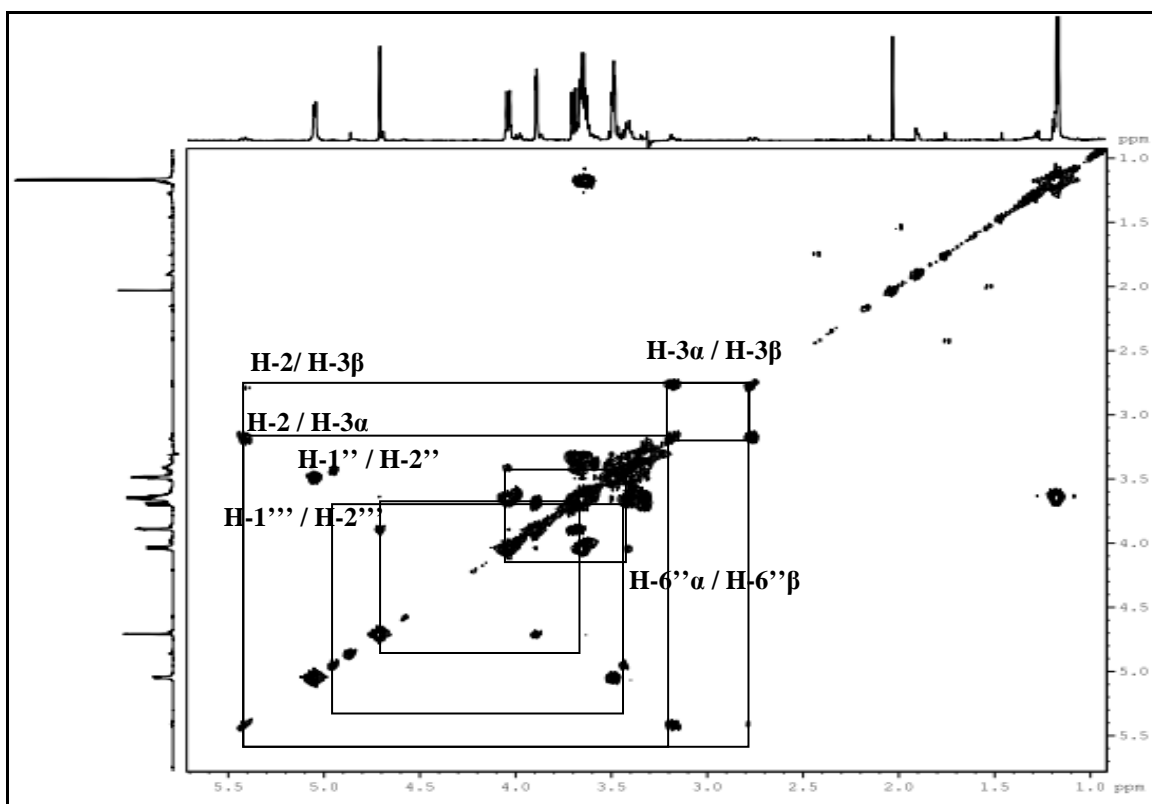


FIGURA 4.78 - Correções observadas no Mapa de contorno COSY para a substância minoritária (4) (600 MHz, MeOD).

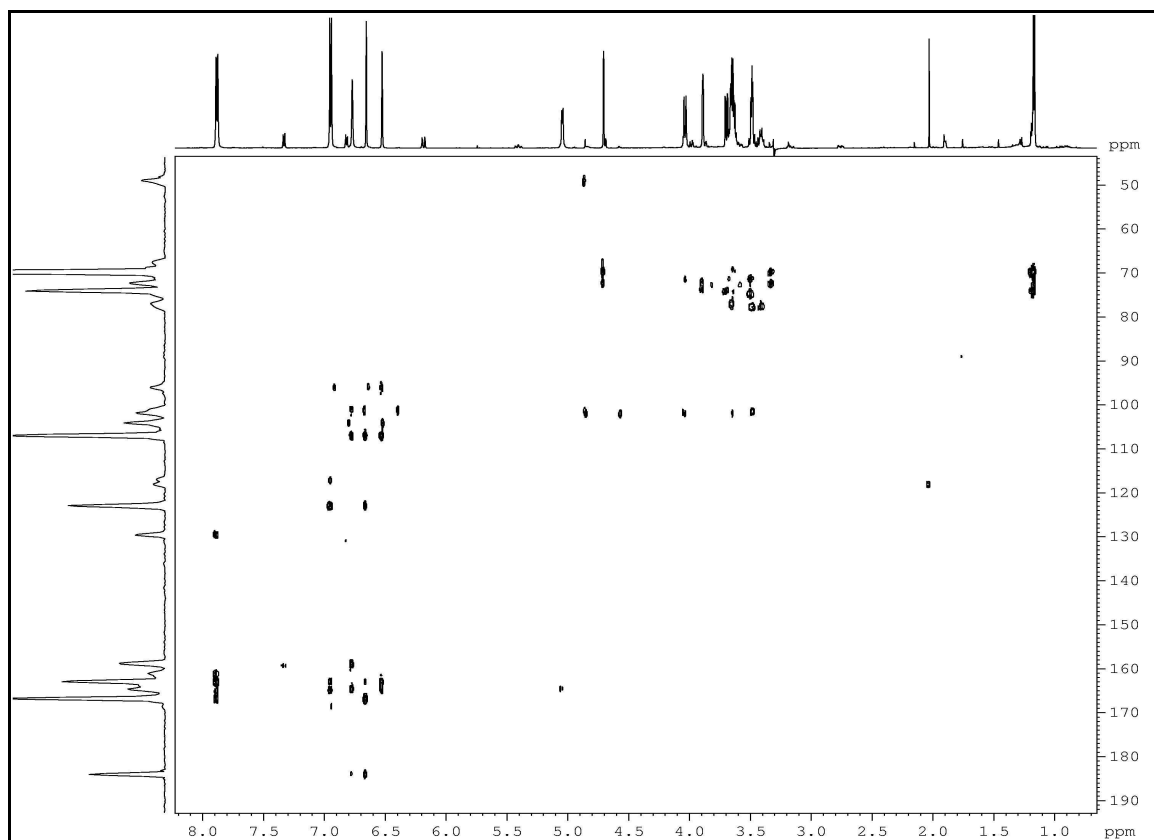


FIGURA 4.79 - Mapa de contorno HMBC da mistura das substâncias (3) e (4). (600 MHz, MeOD)

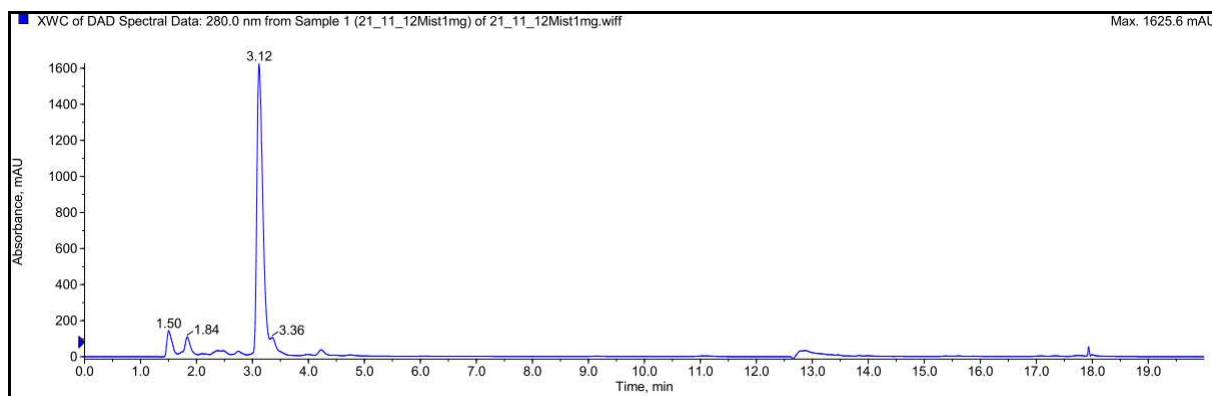


FIGURA 4.80 - Cromatograma da mistura das substâncias (3) e (4) ($\lambda = 280$ nm).

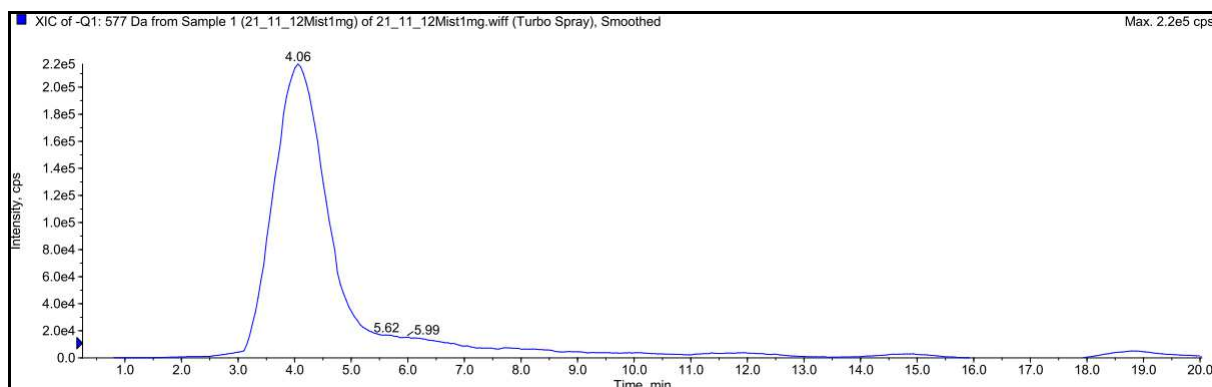


FIGURA 4.81 - Cromatograma de íon selecionado para a substância (3).

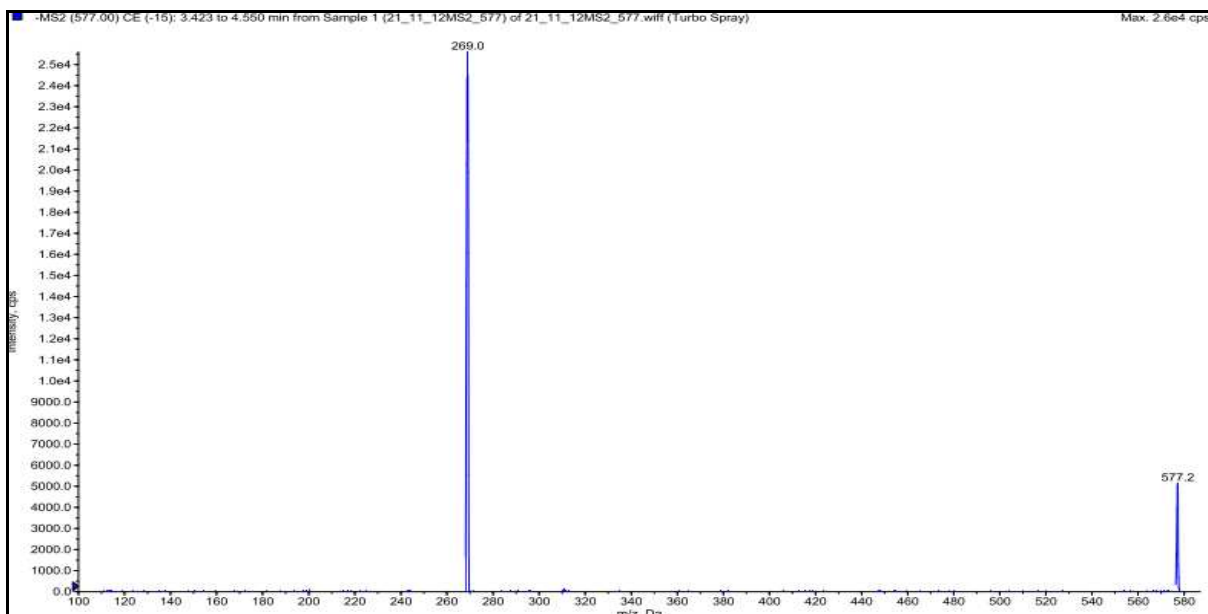


FIGURA 4.82 - Espectro do íon produto $[M - H]^- = 577$ para a substância (3).

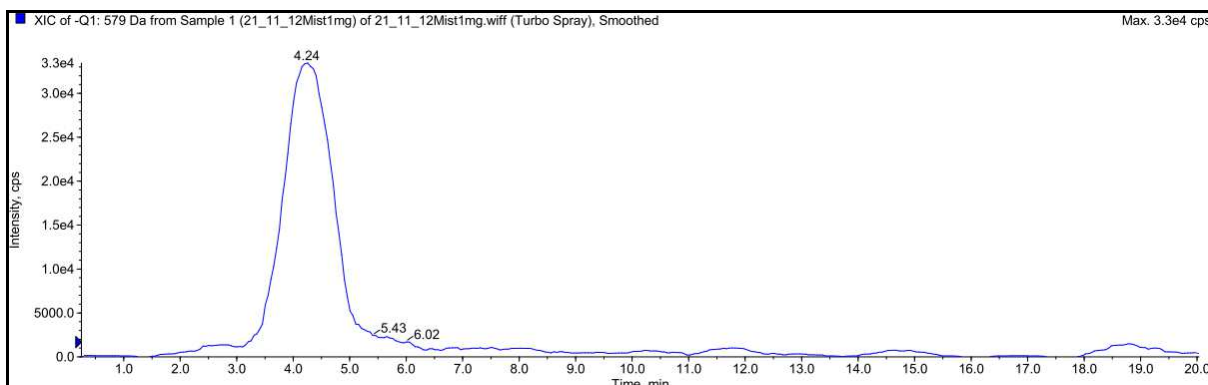


FIGURA 4.83 - Cromatograma de íon selecionado para a substância (4).

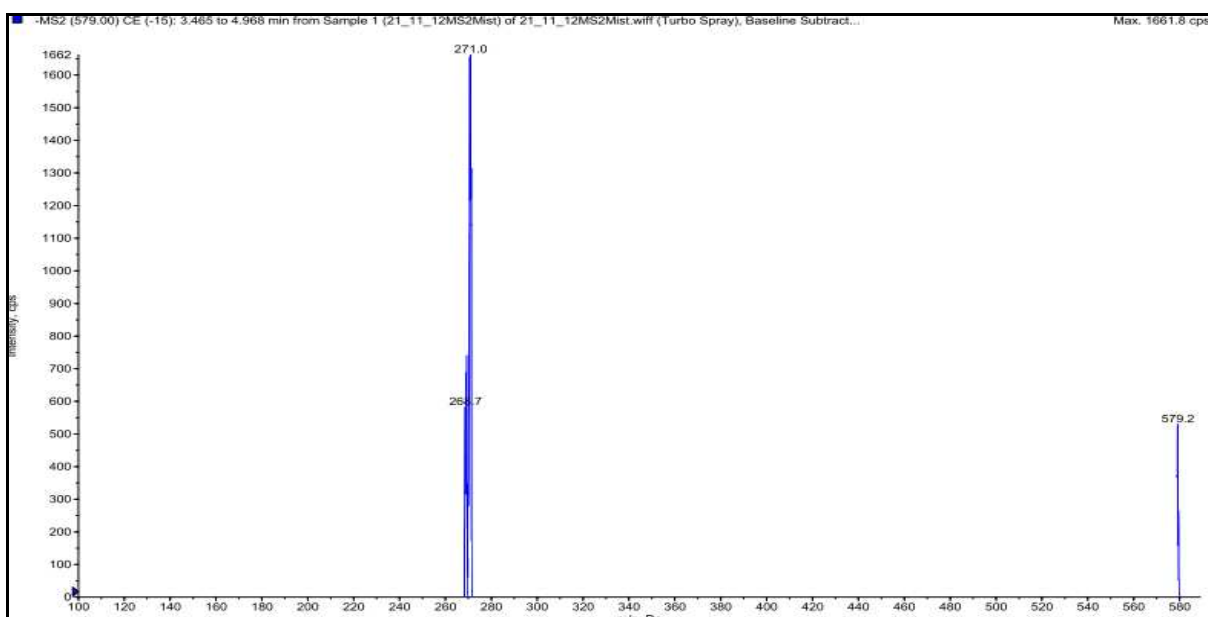
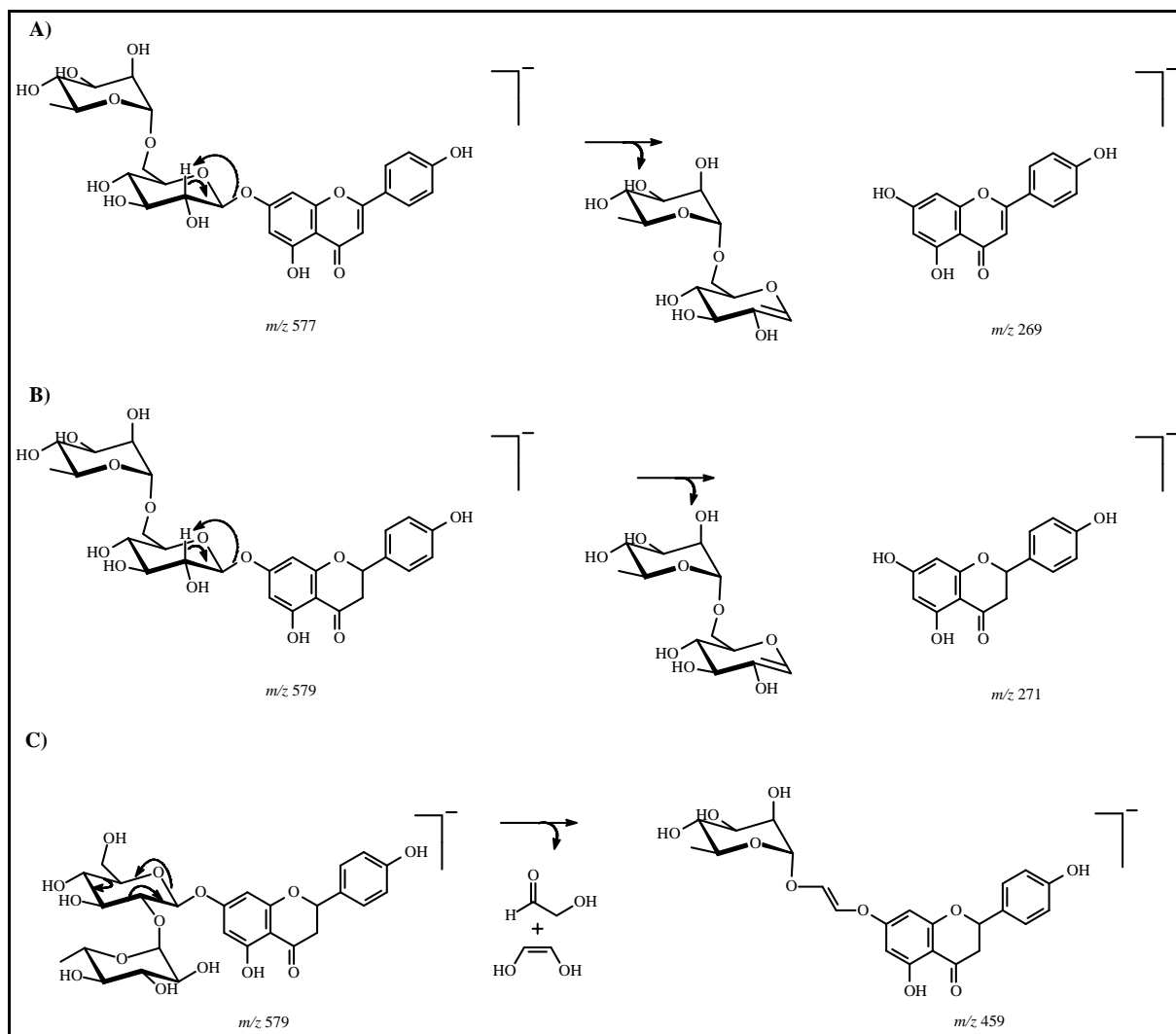


FIGURA 4.84 - Espectro do íon produto $[M - H]^- = 579$ para a substância (4).



ESQUEMA 4.4 - Propostas de fragmentação: a) Apigenina 7-O-rutinosídeo; b) Narirutina; c) Narigenina.

4.11.3 - Análise estrutural da substância 5.

A substância **5** não foi identificada neste trabalho, visto que a mesma não foi isolada no estudo fitoquímico das folhas de T. 'Murcott', sendo observada apenas em extratos. A única semelhança entre os extratos 2TBa e LBa (FIGURA 4.85) é a presença da substância 5. Então, observando os sinais similares presentes nestes extratos é possível observar que a substância em análise provavelmente apresenta baixo peso molecular com um único anel aromático. Foram realizados experimentos de RMN em duas dimensões dos extratos, no entanto, não foram observadas correlações para a substância em

análise. A comparação entre o espectro de 2TBa (Folha controle de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm) com o espectro do extrato de LBa (Extrato obtido da folha da laranja) é apresentado nas FIGURAS 4.85 - 4.87.

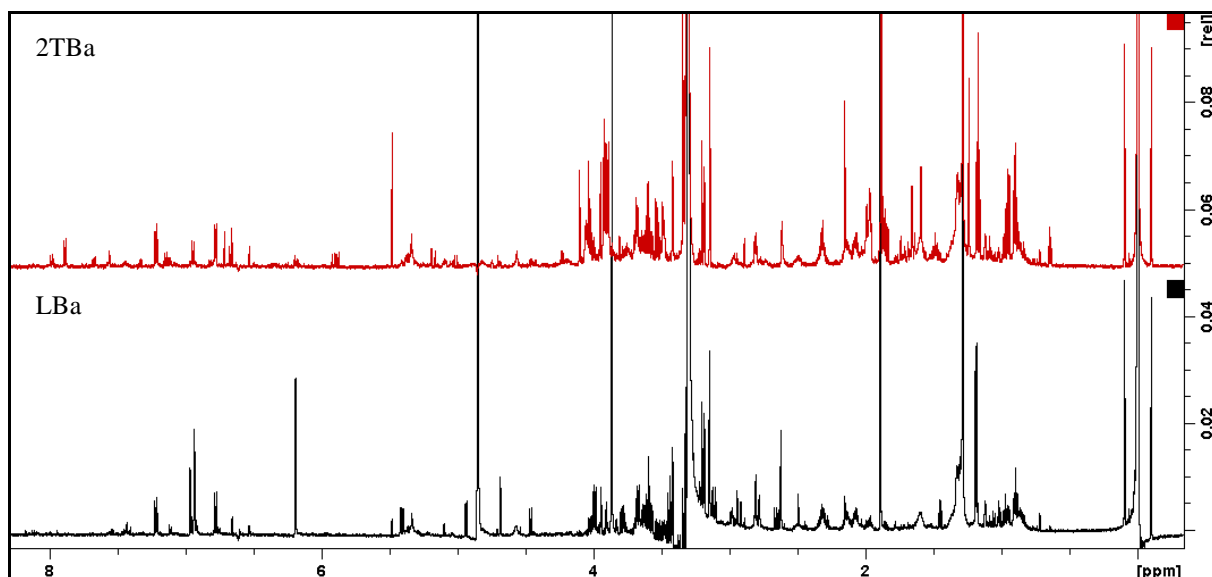


FIGURA 4.85 - Análise da Substância 5 por comparação entre os Espectros de RMN ^1H de 2TBa: Folhas controle de T. ‘Murcott’ de 2,5 cm e LBa: Extrato obtido de folhas de laranja pêra.

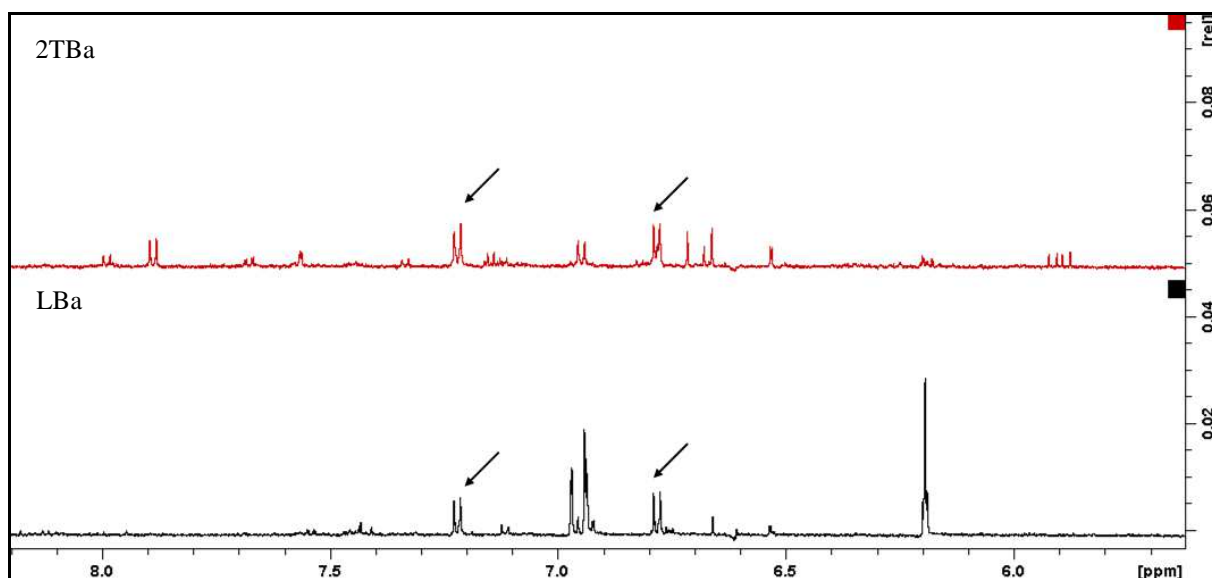


FIGURA 4.86 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e LBa: Extrato obtido de folhas de laranja pêra.

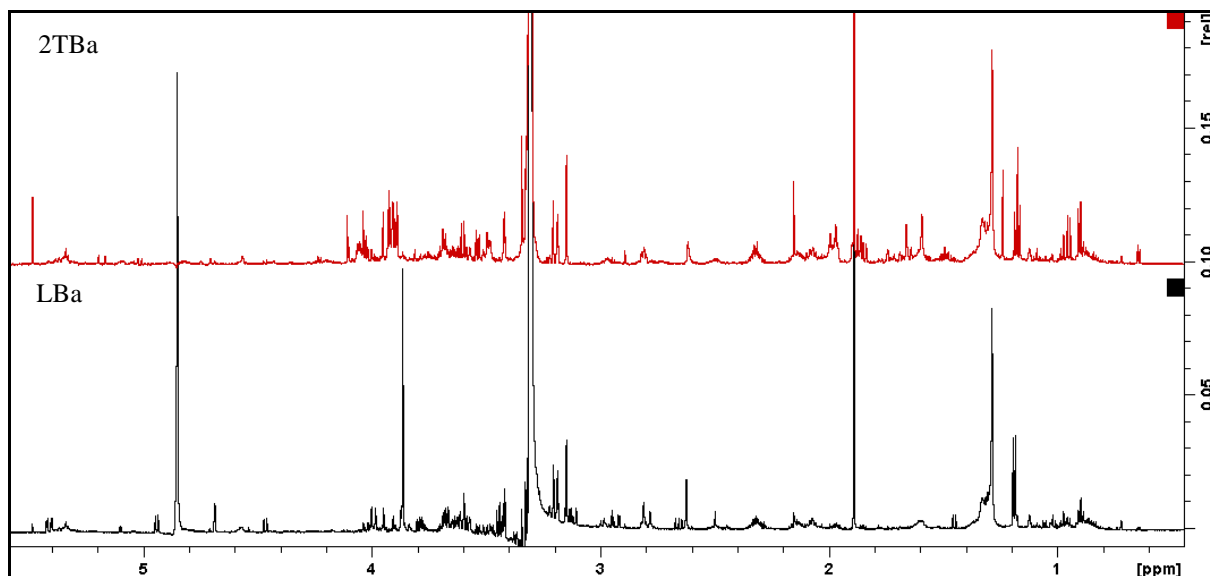


FIGURA 4.87 - Ampliação dos Espectros de RMN ^1H de 2TFa: Folhas com sintomas de T. ‘Murcott’ de 3,5 cm e LBa: Extrato obtido de folhas de laranja pêra.

4.11.4 - Avaliação do acúmulo de Apigenina-7-O-rutinosídeo nas folhas de T. ‘Murcott’ por RMN ^1H .

Sabe-se que as plantas podem se defender do ataque de micro-organismos pela produção de compostos químicos de defesa após a planta ter sido atacada. Estas respostas das plantas ocorrem em um nível local quando são enviadas para o local exato do ataque (SCHOONHOVEN et al., 2005), ou em um nível sistêmico quando fornecem proteção a outras partes da planta que não foram afetadas. No item anterior foi observado através da análise de folhas de tangor ‘Murcott’ de 3,5 cm, um acúmulo de Apigenina 7-O-rutinosídeo exatamente em cima da lesão causada pelo patógeno *Alternaria alternata* em folhas com sintoma. Com a finalidade de avaliar se esta resposta é sistêmica ou localizada também foram avaliados os metabólitos presentes em outro ponto próximo à lesão (na mesma folha). Foram avaliadas folhas de tangor ‘Murcott’ de três tamanhos diferentes, sendo os códigos descritos no ITEM 3.9.

Folhas de T. ‘Murcott’ de 2,0 cm de comprimento (tamanho 1) com sintomas de MMA, sem sintomas de MMA e o controle (sem inoculação de *A. alternata*) foram avaliadas quanto ao acúmulo de Apigenina-7-O-rutinosídeo no

ponto a (em cima da lesão) e no ponto b (ponto próximo da lesão), com o objetivo de compreender o mecanismo de defesa desta espécie. As FIGURAS 4.88-4.91 apresentam a comparação das respostas obtidas neste estudo.

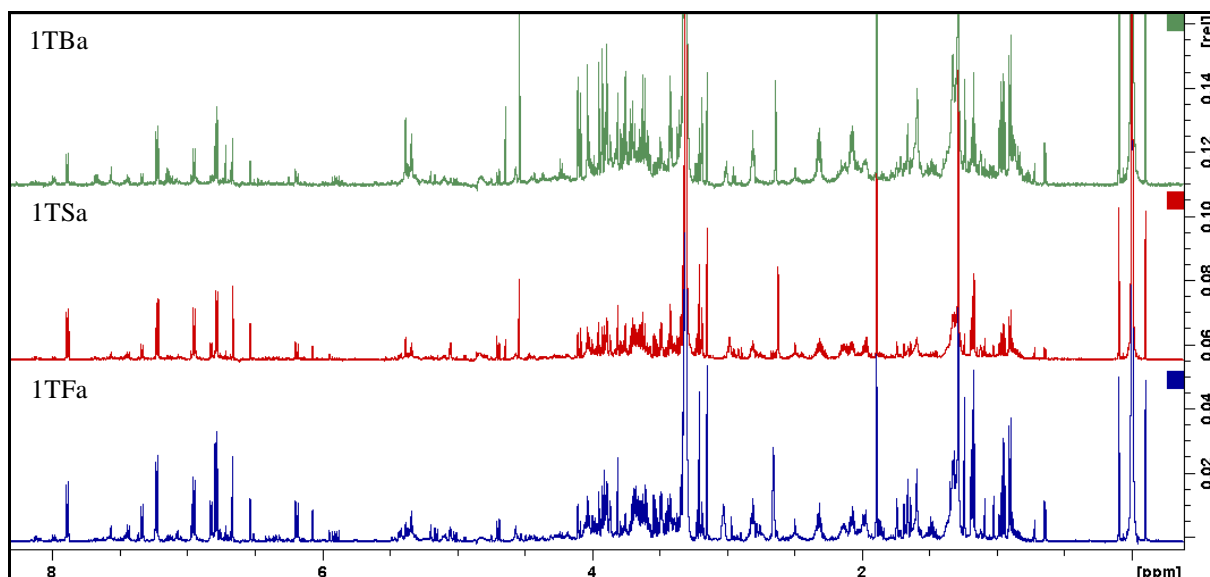


FIGURA 4.88 - Espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 2,0 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 1TBa: Controle; 1TSa: Sem sintoma; 1TFa: Com sintoma de MMA.

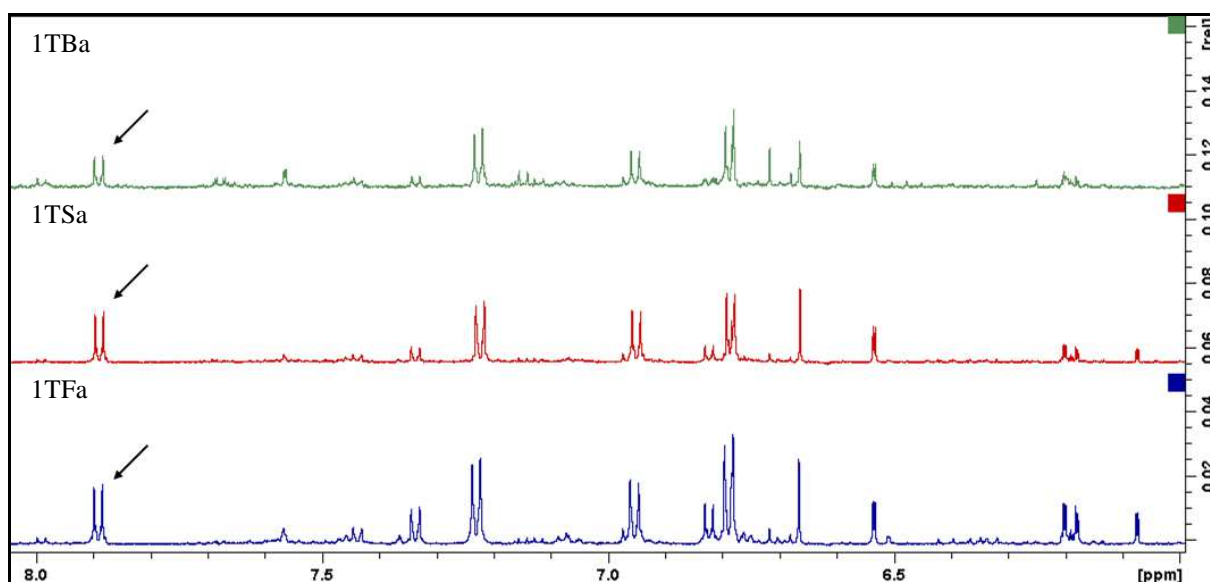


FIGURA 4.89 - Ampliação do espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 2,0 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 1TBa: Controle; 1TSa: Sem sintoma; 1TFa: Com sintoma de MMA.

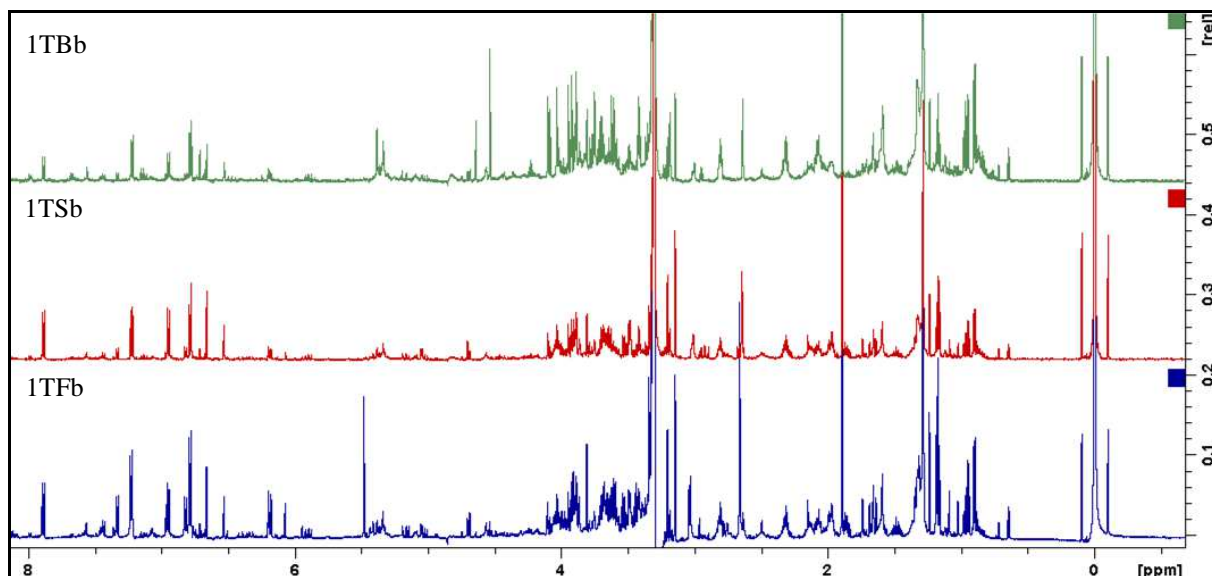


FIGURA 4.90 - Espectro de RMN ^1H das Folhas de Tanger de 2,0 cm com análise na região próxima à lesão (b): 1TBb: Controle; 1TSb: Sem sintoma; 1TFb: Com sintoma de MMA.

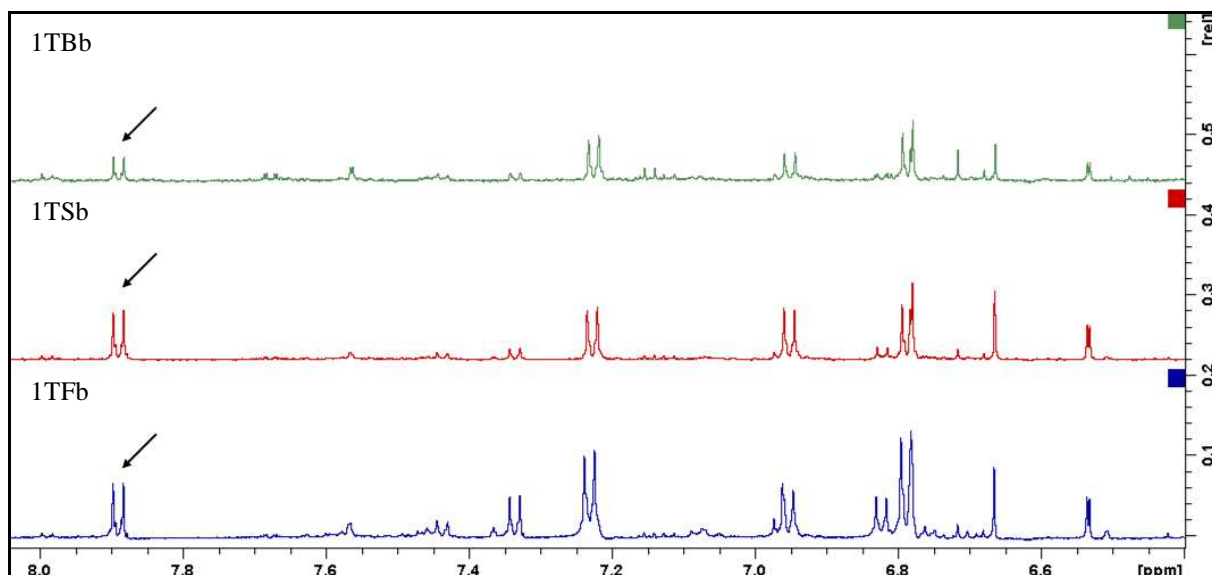


FIGURA 4.91 - Ampliação do espectro de RMN ^1H de Folhas de Tanger de 2,0 cm com análise na região próxima à lesão (a): 1TBb: Controle; 1TSb: Sem sintoma; 1TFb: Com sintoma de MMA.

Através da análise da intensidade do sinal referente aos hidrogênios H-2' e H-6' da Apigenina 7-O-rutinosídeo nas folhas de 2,0 cm de T. 'Murcott', em destaque nas FIGURAS 4.89 e 4.91, foi possível observar um maior acúmulo desta substância em folhas sintomáticas. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na concentração deste metabólito nos dois pontos de análise na mesma folha.

Folhas de T. 'Murcott' de 3,5 cm de comprimento (tamanho 2) também foram analisadas quanto ao acúmulo de Apigenina-7-O-rutinosídeo no ponto a (em cima da lesão) e no ponto b (ponto próximo da lesão). As FIGURAS 4.92-4.95 apresentam a comparação das respostas obtidas neste estudo.

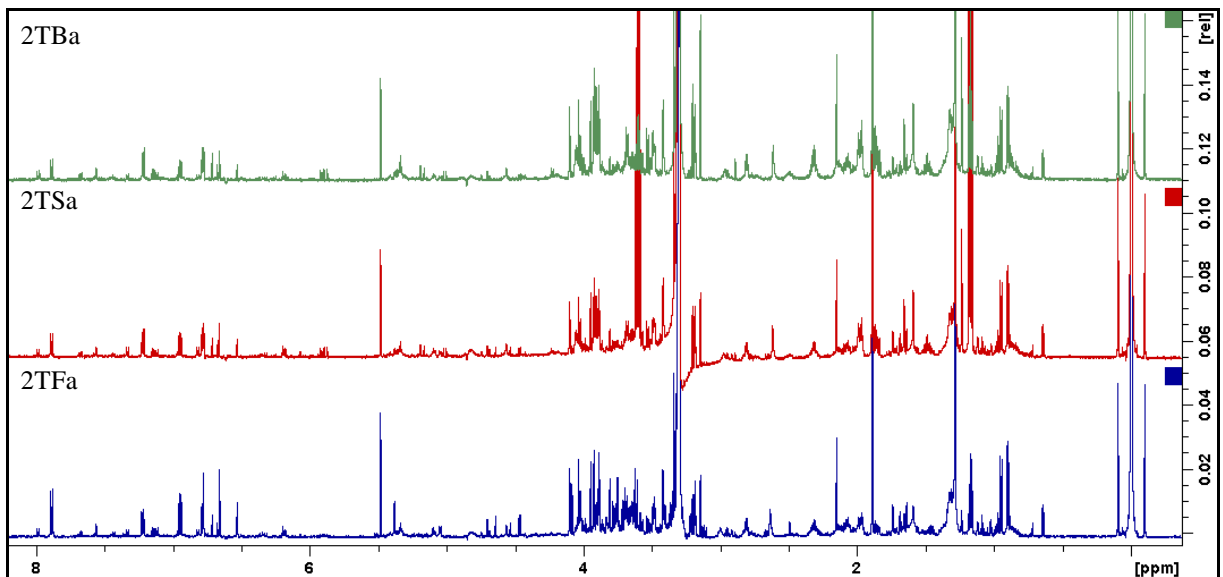


FIGURA 4.92 - Espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA.

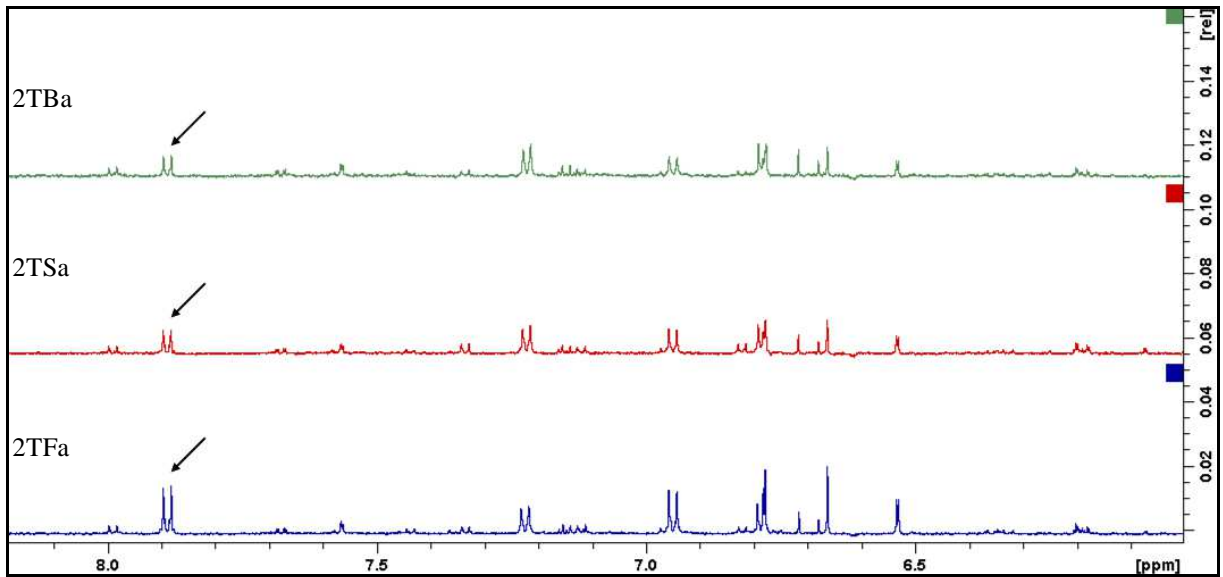


FIGURA 4.93 - Ampliação do espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 2TBa: Controle; 2TSa: Sem sintoma; 2TFa: Com sintoma de MMA.

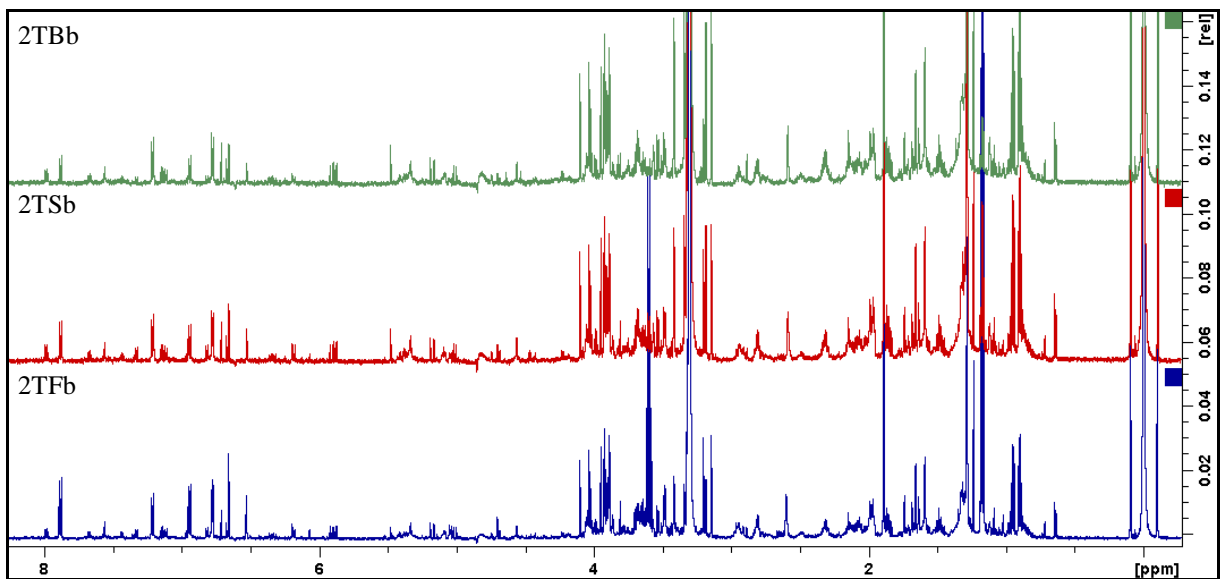


FIGURA 4.94 - Espectro de RMN ^1H das Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise na região próxima à lesão (b): 2TBb: Controle; 2TSb: Sem sintoma; 2TFb: Com sintoma de MMA.

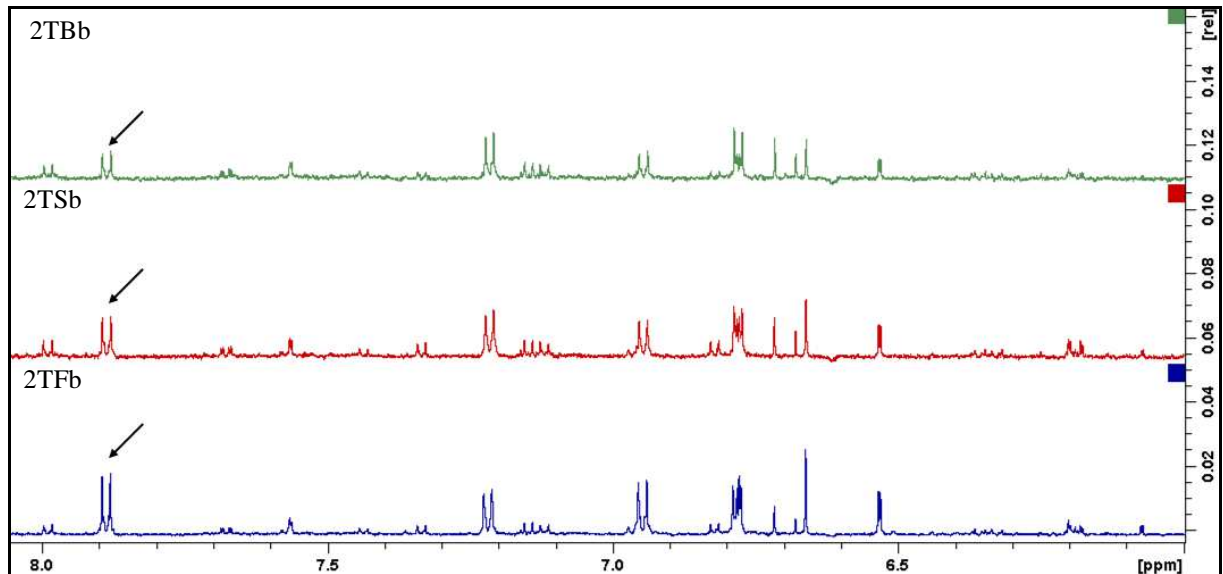


FIGURA 4.95 - Ampliação do espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 3,5 cm com análise na região próxima à lesão (a): 2TBb: Controle; 2TSb: Sem sintoma; 2TFb: Com sintoma de MMA.

Como pode ser observado nas FIGURAS 4.93 e 4.95 houve um maior acúmulo de Apigenina 7-O-rutinosídeo nas folhas sintomáticas de T. ‘Murcott’, independente do ponto de análise nesta folha.

Folhas de T. ‘Murcott’ de 5,0 cm de comprimento (tamanho 3) também foram analisadas quanto ao acúmulo de Apigenina-7-O-rutinosídeo. As FIGURAS 4.96 - 4.99 apresentam os espectros de RMN ^1H obtidos neste estudo.

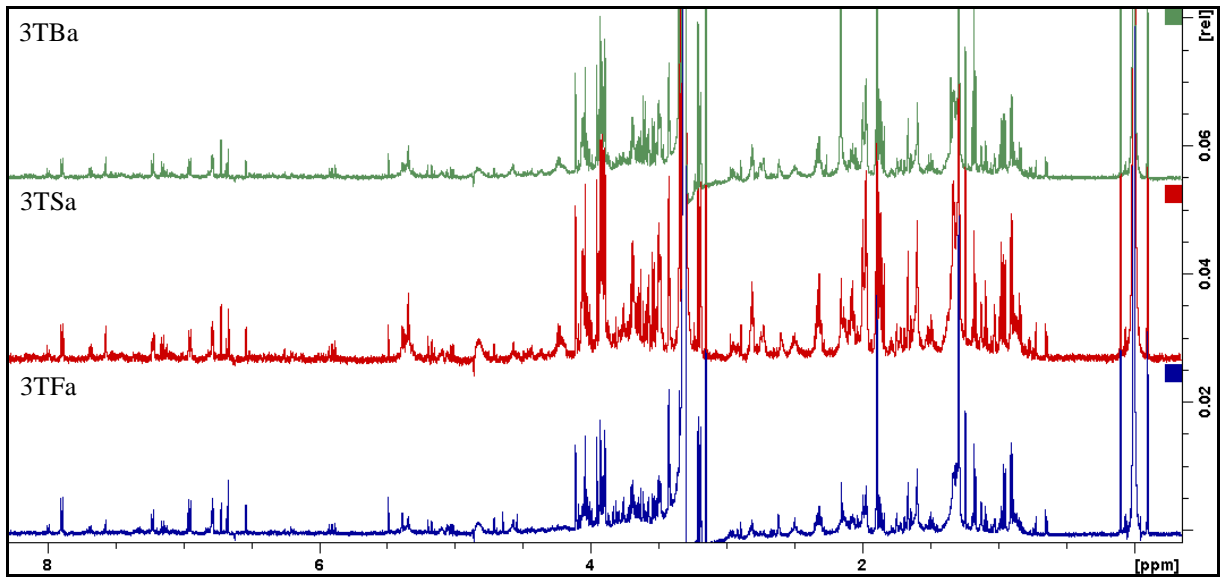


FIGURA 4.96 - Espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 5,0 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 3TBa: Controle; 3TSa: Sem sintoma; 3TFa: Com sintoma de MMA.

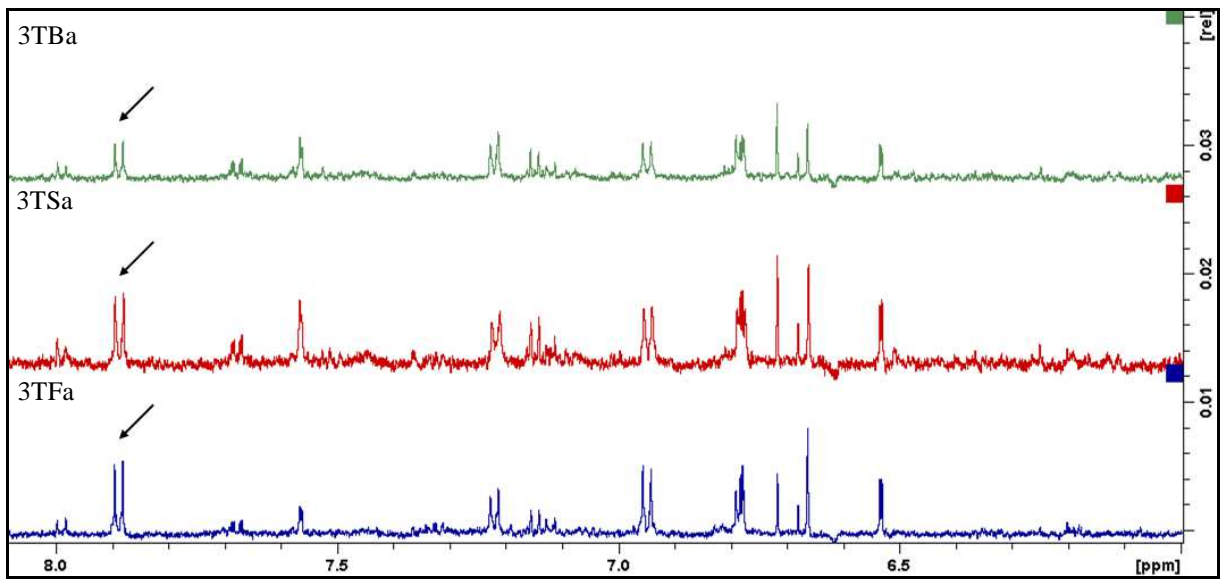


FIGURA 4.97 - Ampliação do espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 5,0 cm com análise exatamente na região da lesão (a): 3TBa: Controle; 3TSa: Sem sintoma; 3TFa: Com sintoma de MMA.

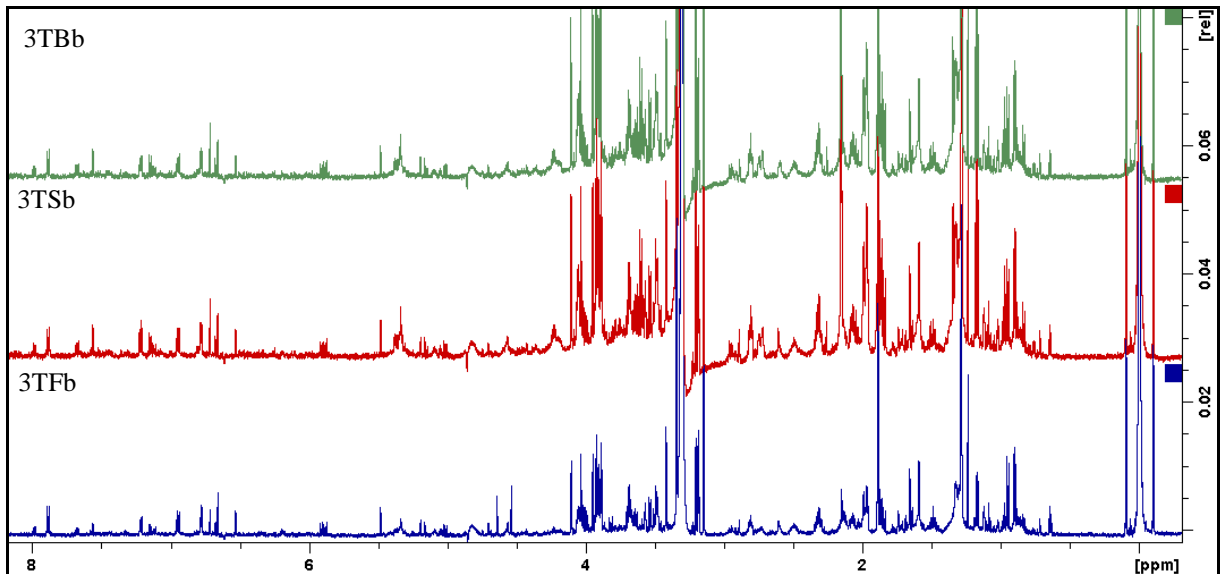


FIGURA 4.98 - Espectro de RMN ^1H das Folhas de Tangor de 5,0 cm com análise na região próxima à lesão (b): 3TBb: Controle; 3TSb: Sem sintoma; 3TFb: Com sintoma de MMA.

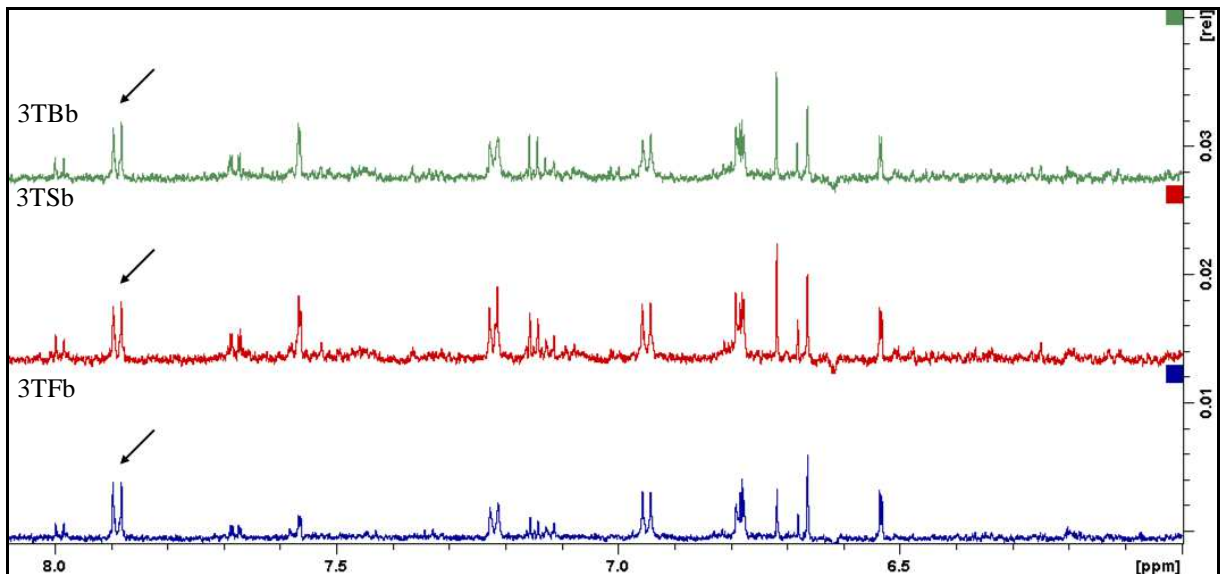


FIGURA 4.99 - Ampliação do espectro de RMN ^1H de Folhas de Tangor de 5,0 cm com análise na região próxima à lesão (a): 3TBb: Controle; 3TSb: Sem sintoma; 3TFb: Com sintoma de MMA.

Através da análise da intensidade do sinal referente aos hidrogênios H-2' e H-6' da Apigenina 7-O-rutinosídeo nas folhas de 3,5 cm de T. 'Murcott', em destaque na FIGURA 4.97, foi possível observar um maior acúmulo desta substância em folhas sintomáticas no local da lesão. No entanto, não foi observado variação na concentração deste flavonóide no ponto próximo à lesão

quando se compara os extratos controle, com sintoma e sem sintoma (FIGURA 4.99). Este resultado pode indicar uma distribuição não homogênea deste flavonóide na superfície da folha, com acúmulo desta substância em torno da lesão e não necessariamente somente no local com sintoma. A análise da folha de maior tamanho permitiu uma maior distância entre os pontos avaliados, sugerindo que houve uma resposta química pontual da planta. Sabendo desta possibilidade, julgou-se oportuno avaliar a distribuição deste flavonoide na superfície intacta de folhas de 5,0 cm de comprimento de T. ‘Murcott’ sintomáticas e o controle (sem a inoculação do fungo), experimento este que foi feito no MALDI-Imaging, sendo discutido no ITEM 4.13.

4.12 - Análise da variação do perfil químico de folhas de T. ‘Murcott’ via RMN ¹H aliada à ferramenta quimiométrica.

A análise da variação do perfil químico de folhas de T. ‘Murcott’, discutido no item anterior, considerou apenas as substâncias que apresentam sinais na região característica dos hidrogênios aromáticos para identificar compostos que poderiam diferenciar os extratos controle, com sintoma e sem sintoma. Esta parte do trabalho investiga se esta região do espectro de RMN ¹H, que compreende a faixa de 6,0-8,5 ppm, pode ser utilizada para caracterizar os extratos analisados. Para isso, os dados espectroscópicos obtidos para estes extratos foram submetidos á análise de componentes principais (PCA).

As folhas de T. ‘Murcott’ controle, com sintomas e sem sintomas de MMA foram preparadas em triplicata, sendo que o espectro de RMN ¹H de cada réplica foi refeito em quintuplicata, para avaliação da estabilidade do equipamento. Eliminou-se algumas regiões espectrais, concentrando-se a análise na região característica dos hidrogênios aromáticos, então, foi feito o auto-escalamento dos espectros. Foram analisados simultaneamente todos os espectros de RMN ¹H, como pode ser observado nas FIGURAS 4.100 e 4.101, onde foi aplicada a análise de PCA na matriz formada por 45 linhas

correspondentes as réplicas das folhas avaliadas e 53 colunas correspondentes aos deslocamentos químicos.

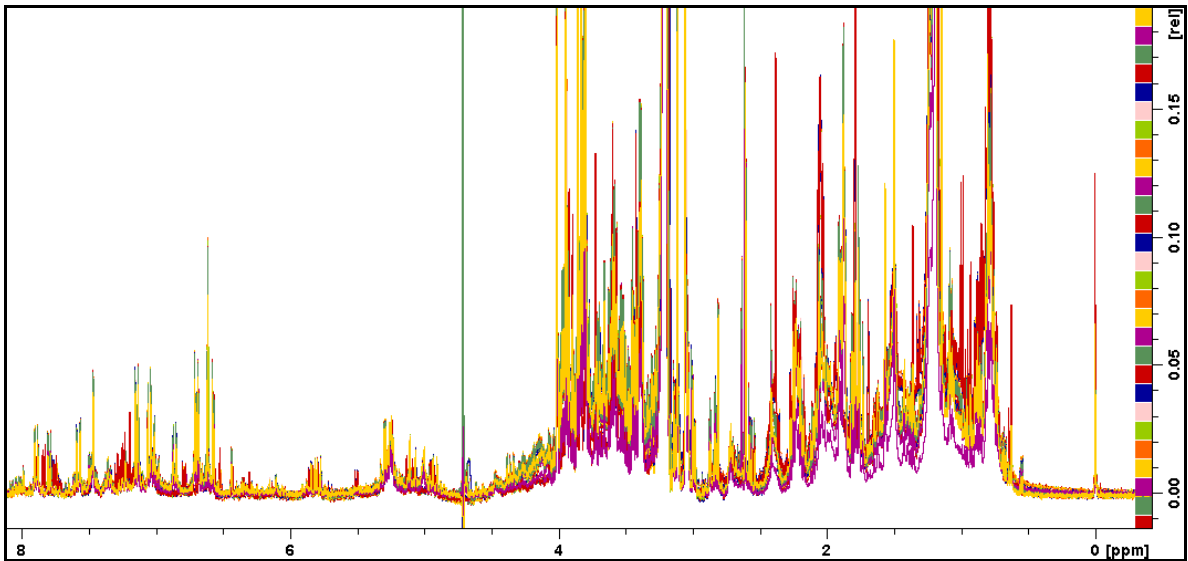


FIGURA 4.100 - Sobreposição de todos os espectros analisados por PCA das folhas de T. 'Murcott' controle, sem sintomas e com sintoma de MMA.

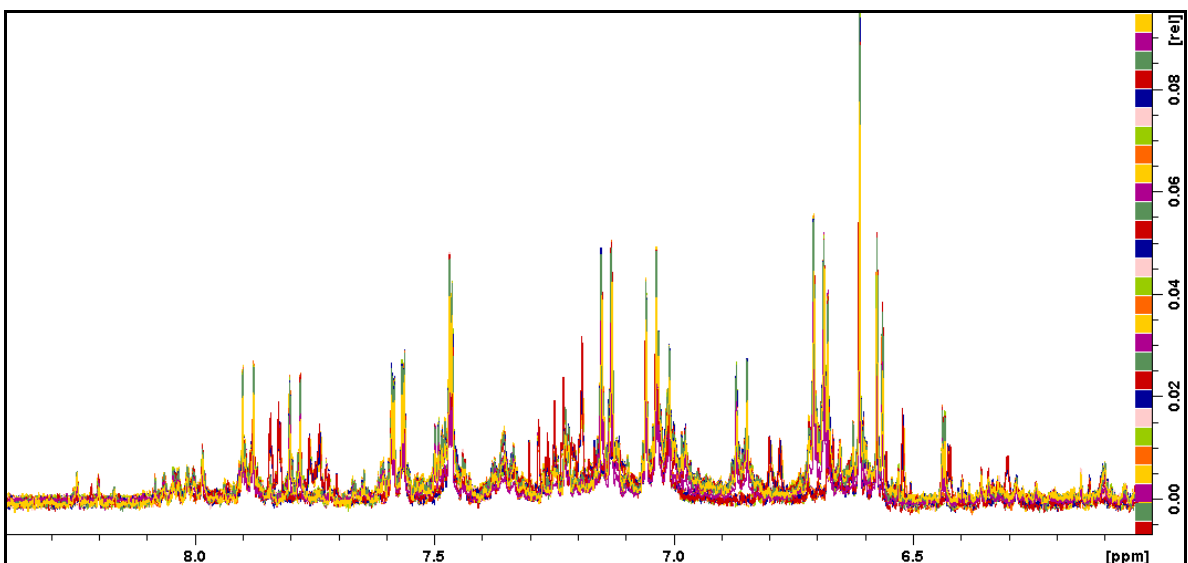


FIGURA 4.101 - Sobreposição dos espectros de RMN ^1H na região selecionada para análise por PCA dos extratos representativos das folhas de T. 'Murcott' controle, sem sintomas e com sintoma de MMA.

A análise de PCA foi realizada utilizando-se 92,1% de informações dos dados originais descritos por 2 componentes principais. As informações citadas acima podem também ser verificadas através do gráfico da percentagem da variância *versus* o número de PCs (FIGURA 4.102), 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. Analisando a FIGURA 4.102 conclui-se que após a segunda PC têm-se uma pequena variação de dados.

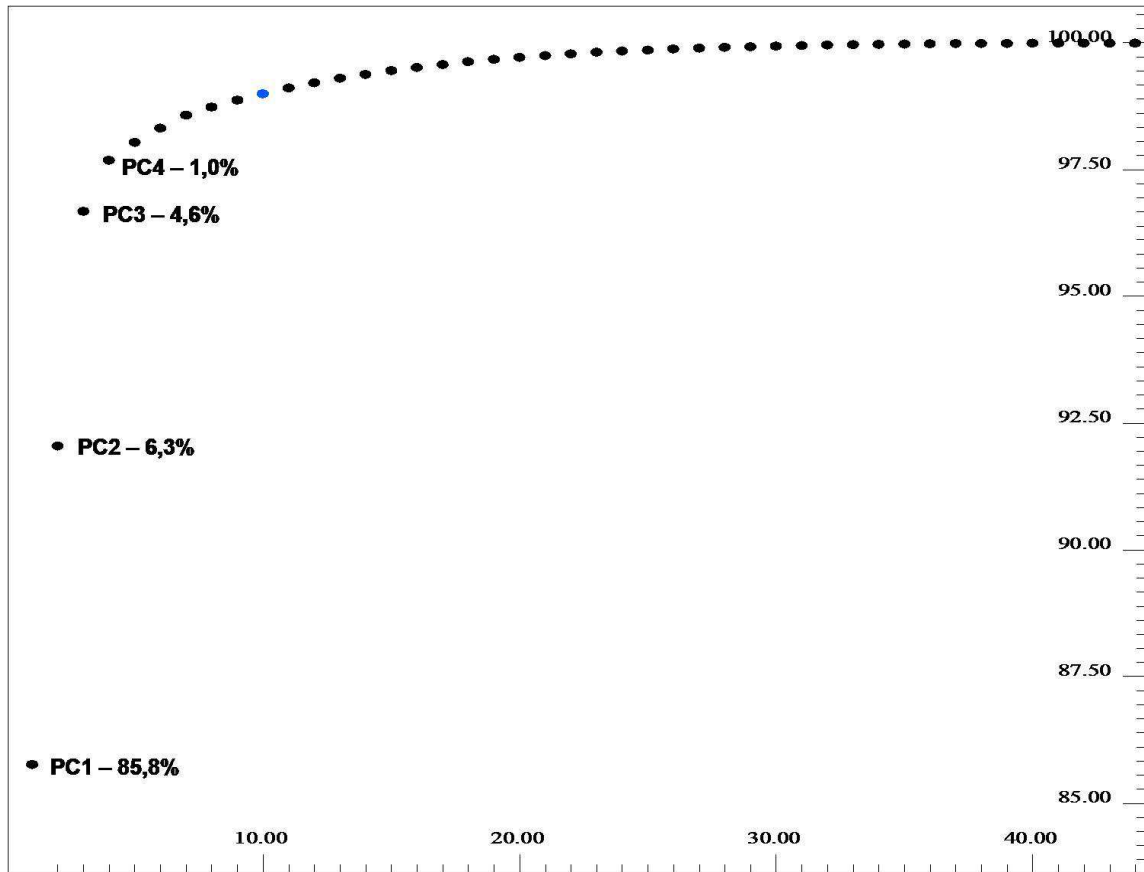


FIGURA 4.102 - Curva de variância versus componentes principais, extraída da análise de PCA das amostras de folha de tangerina.

A diferenciação entre as matrizes foi obtida conforme descrito nos gráficos de escores representado na FIGURA 4.103.

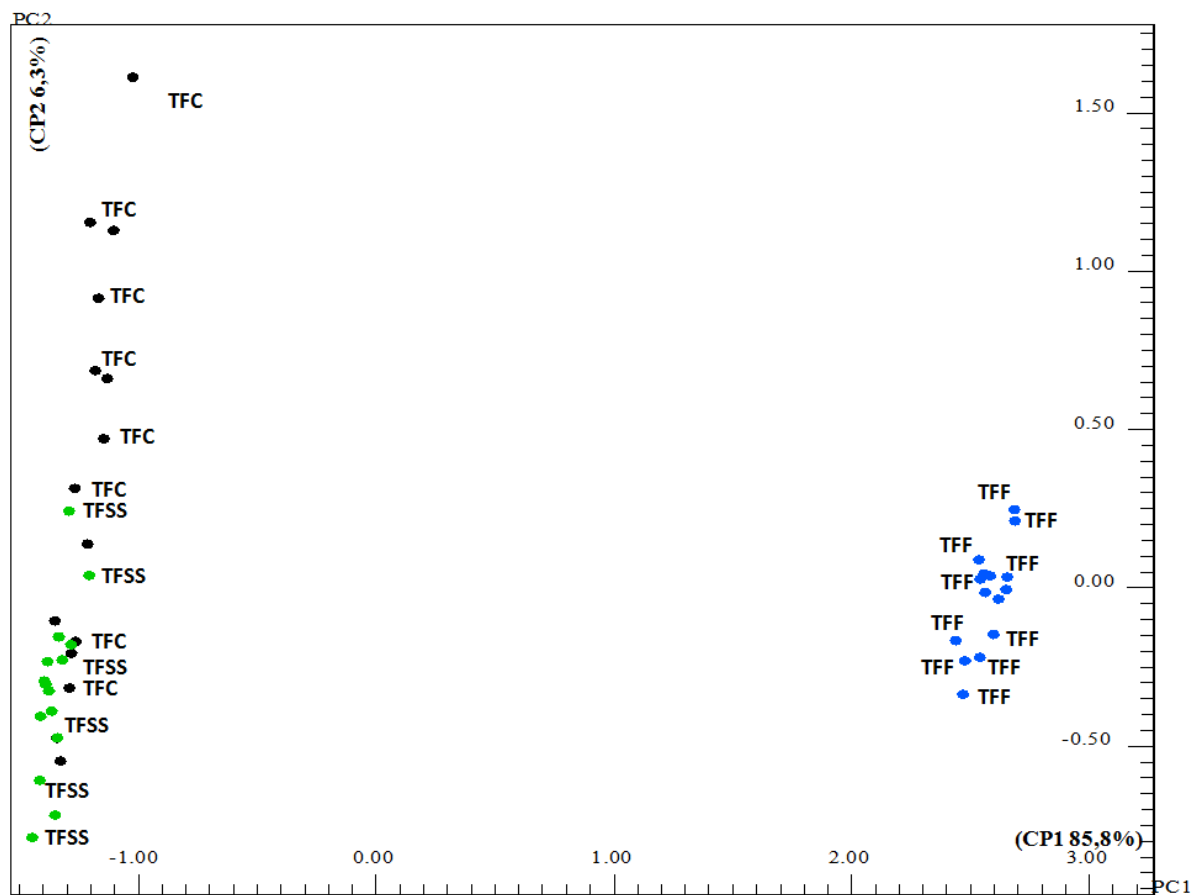


FIGURA 4.103 - Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos espectros de RMN ^1H na região de 6,0-8,5 ppm das folhas de Tangor 'Murcott'. TFC (em preto) folhas controle; TFSS (em verde) folhas sem sintomas de MMA e TFF (em azul) folhas com sintoma de MMA.

Observa-se que a seleção no espectro de RMN ^1H apenas da região de 6,0-8,5 ppm foi possível obter resultado semelhante ao da análise quimiométrica por CLAE (ITEM 4.10.2), tendo-se uma separação bem significativa dos extratos representativos de folhas com sintomas de MMA do grupamento dos extratos das folhas controle e sem sintoma, indicando que a observação dos sinais na região característica dos hidrogênios aromáticos pode ser utilizada para caracterizar e diferenciar tais extratos. Os valores positivos da CP1 foram responsáveis pela separação entre as matrizes das folhas com sintomas das demais.

4.13 - Análise da distribuição espacial de Apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas de T. 'Murcott' via MALDI - IMS.

Um exemplo dos recentes avanços em espectrometria de massas foi o desenvolvimento da técnica denominada MALDI imaging (IMS). Essa técnica utiliza a especificidade e a sensibilidade da MS para mapear e para produzir imagens de biomoléculas em cortes histológicos, permitindo a visualização de moléculas em superfícies complexas (STOECKLI et al., 2001; CHAURAND et al., 2004). CAPRIOLI et al. (1997) foram os pioneiros no imageamento químico em tecidos utilizando MALDI como fonte de ionização e esta técnica fornece informação específica da composição molecular local, abundância relativa e distribuição espacial na secção analisada, sendo uma técnica voltada para a análise química de tecidos intactos.

Uma das vantagens mais atrativas do imageamento por MALDI é a observação da distribuição de moléculas presentes nas superfícies de seções de tecidos, sem a necessidade de qualquer separação cromatográfica, mantendo a orientação espacial do analito. Portanto, esta técnica fornece a análise pontual das moléculas, não é necessária a homogeneização do tecido e quanto maior o número de pontos analisados, maior é a resolução da imagem (ESQUENAZI et al. 2009). Esta combinação única, acoplando excelente sensibilidade e rápido tempo de análise, apresenta vantagens para uma ampla variedade de aplicações nos diversos campos biológicos.

Conhecer a distribuição dos metabólitos secundários é importante para a compreensão de sua função em processos fisiológicos e mecanismos de defesa utilizados pelas plantas, bem como é possível avaliar a sua translocação dentro de seus órgãos. As enzimas envolvidas na biossíntese destes metabólitos podem ser facilmente localizadas no tecido vegetal utilizando MALDI - IMS, (SAUER, et al., 2010) enquanto que para moléculas pequenas, como metabólitos secundários, a aquisição de imagem não é muito específica, pois os íons gerados por estes compostos encontram-se na mesma região de baixo valor de razão

massa/carga (m/z) do espectro do que os íons oriundos da matriz, tornando esta região congestionada principalmente quando pequenas quantidades de material são analisadas. No entanto, os recentes avanços na espectrometria de massas torna possível a obtenção de imagens destas moléculas em uma grande variedade de biomateriais.

Nos últimos anos vários exemplos de imagens de tecido animal por MALDI - IMS foram apresentadas e revelando, por exemplo, a distribuição de lipídios em tecido do cérebro de rato (WISEMAN, et al., 2006), distribuição de neuropeptídeos da glândula pituitária de ratos (ROMPP, et al., 2010), ou a distribuição de um medicamento administrado a um rato (KERTESZ, et al., 2008). No entanto, até agora, pouco tem sido relatado sobre o imageamento por MALDI do tecido vegetal, por mais que se tenha conhecimento da sua importância, uma vez que os metabólitos naturais constituem a base de toda a área de medicamentos naturais e serve como fonte de grande inspiração no desenvolvimento de novas drogas. No entanto, tem sido relatado na literatura dificuldades na aquisição destas imagens, uma vez que o laser se mostrou capaz de penetrar a cutícula da folha (ESQUENAZI, et al., 2009; CHA et al., 2008). Um exemplo da dificuldade para a obtenção do imageamento de substâncias pequenas foi constatado por CHA e colaboradores em 2008, onde só foram detectados íons característicos de flavonoides, através de MALDI-IMS, nas folhas de *Arabidopsis* em regiões que foram danificadas durante a fixação na placa de MS ou após a remoção das ceras cuticulares por clorofórmio.

Nesta parte do trabalho nos propomos a obter imagens em espectrometria de massas que permitiram a observação da distribuição da apigenina-7-O-rutinosídeo em folhas intactas de tangor murcott. Esta substância foi detectada e identificada por MS/MS utilizando laser de baixa potência para evitar a fragmentação na fonte de ionização, uma vez que existe uma facilidade muito grande da perda do grupamento glicosídico no processo de desorção com o laser.

Imagens de alta resolução necessitam de aplicadores de matriz que forneçam a cobertura mais homogênea possível. ImagePrep da Bruker® lança um fino spray da solução da matriz sobre toda a superfície do tecido, minimizando o umedecimento excessivo das amostras, uma vez que isso resultaria em distribuição desigual da matriz com a possível obtenção de dados errôneos, pois regiões mais úmidas poderiam acusar maior acúmulo do analito devido simplesmente a maior quantidade de matriz. A escolha apropriada da matriz também é fundamental para a obtenção de espectros de alta resolução, uma vez que a mesma é utilizada para proteger as biomoléculas de serem destruídas pela incidência direta do feixe de laser e também para facilitar a sua vaporização e ionização.

Esta técnica baseia-se no fato de que a intensidade dos íons (nas coordenadas x,y do tecido analisado) pode ser correlacionada com uma escala de cor, onde a cor vermelha indica elevada concentração do analito no spot analisado, revelando, com isso, a quantidade de analito presente em uma determinada região. A distribuição desta substância na face adaxial das folhas intactas de T. 'Murcott', ao longo da nervura central, em folhas controle e com sintomas foi confirmada através da imagem obtida pela extração dos fragmentos característicos do íon m/z 601,014 $[M + Na]^+$, onde o seu espectro de MS/MS é encontrado na FIGURA 4.104. Imagens de dois fragmentos característicos da Apigenina 7-O-rutinosídeo, com m/z 292,967, relativo a ionização do aduto da glicona e m/z 331,025, que corresponde ao aduto das duas unidades de açúcar são observadas na FIGURA 4.105.

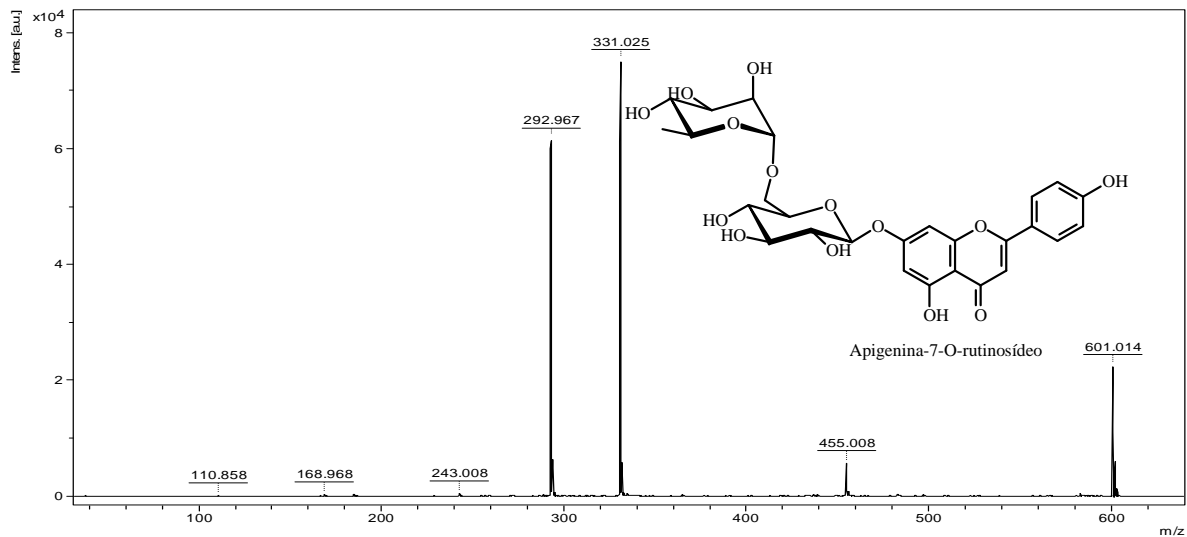


FIGURA 4.104 - Espectro MS/MS do íon de m/z 601,014 $[M + Na]^+$.

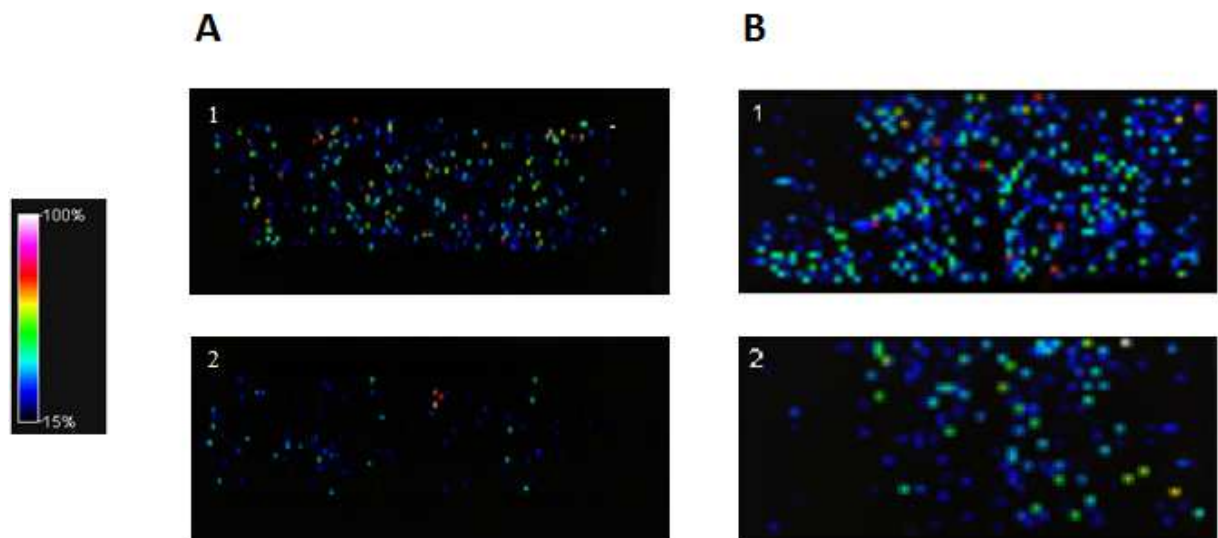


FIGURA 4.105 - **A**: Imagem referente a extração do íon de m/z 292,967; **B**: Imagem referente a extração do íon de m/z 331,025. Onde **1**: Face adaxial de folhas de T. ‘Murcott’ com sintomas e **2**: Face adaxial de folhas de T. ‘Murcott’ controle.

Através da correlação da escala de cor com a intensidade do sinal, é possível verificar nas imagens acima um maior acúmulo de Apigenina-7-O-rutinosídeo em folhas sintomáticas de T. ‘Murcott’, quando comparada às folhas controle (sem a inoculação do fungo) e este fato não pode ser atribuído a uma prensagem desigual da folha na placa de MS, tampouco a uma extração incompleta, uma vez que as imagens foram obtidas a partir da aplicação de uma camada uniforme de matriz e mostrou uma distribuição bastante homogênea em toda a superfície dos tecidos analisados, indicando que a presença do fungo

Alternaria alternata pode induzir uma resposta da planta, aumentando a concentração deste composto.

Do ponto de vista biológico, flavonoides glicosilados são responsáveis pelo crescimento e proteção da planta, sendo que o acúmulo destes metabólitos na camada superficial da folha a protege da radiação UV (ANDERSEN, 2006). Existem relatos na literatura (CHEN, et al., 2003) demonstrando que flavonas como a Apigenina-7-O-rutinosídeo, com o grupamento rutinosídeo em C-7, impede a indução da apoptose, definida como sendo a morte celular programada pela planta após o aparecimento de sinais que indicam, por exemplo, a presença de organismos patogênicos (CARSON e RIBEIRO, 1993; MARTIN, 1993; BARR e TOMEI, 1994; TOMEI e COPE, 1994) ou de toxinas (CORCORAN et al., 1994). Este mecanismo pode ser utilizado com sucesso para controlar doenças de plantas causadas por agentes patogênicos biotróficos (SHLEZINGER et al., 2011). No entanto, em patógenos necrotróficos isto facilita a infecção das plantas. Existe a possibilidade que o aumento da concentração deste composto em específico com a finalidade de retardar o processo de infecção ocasionado pelo patógeno, já que o mesmo não sobrevive em tecidos vegetais vivos, desfavorecendo com isso a sua sobrevivência no tecido da planta. Estudos anteriores mostram que a expressão de genes anti-apoptose aumenta a tolerância de plantas suscetíveis a fungos necrotróficos (TIAN J, 2010; KHURANA, 2005; SHLEZINGER ET AL, 2011). Outros trabalhos mostram que a morte do tecido da planta hospedeira requer a participação tanto do patógeno quanto da planta infectada (VAN KAN, 2006). A concentração deste flavonoide pode não ter sido suficiente para impedir o processo de infecção, mas o acúmulo deste composto no local da lesão sugere um possível mecanismo de defesa do hospedeiro suscetível.

A capacidade de gerar imagens do tecido vegetal por MALDI-IMS de um modo simples e robusto abre caminho para o interesse na análise de um grande número de compostos. A observação *in situ* da distribuição de um

metabólito secundário na superfície de uma folha é relevante para o entendimento de sua função na planta. Além disso, as imagens de metabólitos secundários em plantas podem fornecer novas informações sobre seu transporte nelas, bem como sua função pode ser revelada pela correlação da sua distribuição em um tecido com, por exemplo, a alimentação de insetos (SHROFF, et al., 2008).

Imagiologia de espectrometria de massas também pode ser utilizada como uma ferramenta adicional na busca de compostos bioativos. Espectrometria de massas convencional requer a separação e purificação de moléculas alvo, o que resulta na perda de informações posicionais importantes. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho são de natureza semi-quantitativa, servindo como um método importante na avaliação da distribuição de um composto diretamente no tecido foliar, proporcionando um bom entendimento da localização dos constituintes analisados.

5 CONCLUSÃO



Nos pomares de tangerinas e seus híbridos a mancha marrom de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata* tem sido considerada a mais séria doença fúngica. Sua alta severidade em regiões de clima úmido, onde o controle é muito difícil, tem ocasionado o abandono de plantios comerciais de variedades altamente suscetíveis. O presente trabalho teve como finalidade a verificação de uma resposta química, através da utilização de metabólitos secundários, como possível mecanismo de defesa utilizado por espécies de *Citrus* que foram inoculadas com o fitopatógeno *A. alternata*.

Inicialmente foi feito o estudo químico das variedades laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis*) e tangor 'Murcott' (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*), com o objetivo de se buscar padrões para outros estudos que foram desenvolvidos, assim como substâncias com potencial atividade fungicida. Este trabalho proporcionou o isolamento de 17 substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários como esteróides, cumarinas, limonoides e flavonoides.

Os ensaios biológicos frente à *Alternaria alternata*, fitopatógeno responsável pela MMA, permitiu a avaliação da inibição de *A. alternata in vitro* frente ao crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios. Foram avaliadas as substâncias obtidas das plantas estudadas, entre elas, flavonoides, limonoides e cumarinas. As substâncias testadas frente à inibição do crescimento micelial não apresentaram atividades muito relevantes, sendo a cumarina Xantiletina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a que apresentou o melhor resultado, inibindo cerca de 50% o crescimento do micélio. No entanto, vale ressaltar que este ensaio trata-se de um dado importante, porém não direcionado as estruturas reprodutivas do microrganismo, responsável pela infecção nas plantas citrícolas. As substâncias ensaiadas mais promissoras no ensaio de inibição da germinação de esporos e formação de apressórios foram as cumarinas Xantiletina e Seselina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), que apresentaram mais de 85% de inibição frente a germinação dos esporos e 90% de inibição frente à formação

de apressórios, apresentando atividade similar a do fungicida comercial Cercobin, indicando que as piranocumarinas são uma classe de substâncias com considerável atividade antifúngica.

A partir dos resultados obtidos com os ensaios de inibição frente ao desenvolvimento de *A. alternata*, observa-se que fitopatógenos são alvos bastante resistentes, um problema de elevada significância, principalmente por não se ter um controle químico eficaz para a doença. No entanto, as substâncias naturais ensaiadas frente à germinação de esporos e formação de apressórios foram bastante promissoras. É importante ressaltar que não há relatos na literatura de ensaios biológicos que testam a atividade de compostos isolados do gênero *Citrus* sobre estruturas reprodutivas do fungo *A. alternata*, reforçando assim a importância deste estudo.

O estudo da interação *Citrus* / *A. alternata* mostrou que tanto plantas de elevada tolerância (L. Pêra) quanto plantas suscetíveis (T. 'Murcott'), alteraram a composição química dos voláteis emitidos, quando em contato com o patógeno causador de MMA, sendo que, no geral, 24 horas após a inoculação de *A. alternata* houve uma considerável liberação de sesquiterpenos em ambas as espécies, indicando que a planta libera-os em resposta a presença do fungo, alterando seu metabolismo. Pode-se dizer também que a técnica de HS-SPME além de muito rápida, prática, livre de solventes e não destrutiva é altamente aplicável ao estudo, fornecendo resultados muito interessantes do ponto de vista ecológico e econômico. A análise dos voláteis por hidrodestilação mostrou ser uma técnica bastante reprodutível para experimentos com plantas, e permitiu avaliar a modificação do perfil químico de compostos menos voláteis, sendo uma importante técnica complementar para a visualização da maior quantidade de compostos presentes nos óleos essenciais estudados.

A análise do processo de infecção através de MEV-Ambiental evidenciou a alta tolerância de L. Pêra e a elevada suscetibilidade de T. 'Murcott' frente a *A. alternata* com a avaliação às 0, 16, 24 e 48h após a

inoculação de suspensão de esporos. A avaliação qualitativa quanto à germinação de conídios, formação de apressórios e intensidade das lesões nas espécies de citros estudadas mostrou a grande diferença de suscetibilidade entre elas. A aparente similaridade entre as superfícies foliares das duas espécies, observada ao MEV-Ambiental, sugere que a não formação de apressórios na espécie resistente pode ser causada por uma característica particular, possivelmente química.

A forma de penetração de *Alternaria alternata* nos tecidos dos seus diversos hospedeiros apresenta-se bastante variável e poucos são os trabalhos na literatura relativos ao estudo da interação deste patógeno com o hospedeiro tangor ‘Murcott’, existindo contradições nos resultados descritos na literatura para esta interação. Foi observado neste trabalho a habilidade de *Alternaria alternata* em penetrar nos tecidos suscetíveis de T. ‘Murcott’ tanto diretamente (tecido foliar intacto) quanto indiretamente (abertura estomática com e sem apressório), fato este que ainda não havia sido relatado na literatura em um único trabalho.

A aplicação de quimiometria à dados cromatográficos obtidos por CLAE foi utilizada com o propósito de se estabelecer sua utilidade como ferramenta para a discriminação rápida dos extratos de laranja e tangor, bem como uma diferenciação de plantas sem a inoculação do fungo (controle) com aquelas que foram inoculadas com *A. alternata*, com e sem sintoma. A utilização dos dados obtidos por CLAE para diferenciar tais extratos, com apenas um comprimento de onda (254 nm), mostrou-se bastante promissora e com eficiência similar à utilização de dados obtidos por RMN ¹H na análise quimiométrica das folhas de T. ‘Murcott’. Embora os espectros de RMN ¹H apresentem os resultados de forma mais ampla, não dependente da absorção do composto no comprimento de onda utilizado, como no caso da utilização dos dados oriundos da CLAE, os resultados quimiométricos obtidos por RMN ¹H na análise de folhas de T. ‘Murcott’ apresentaram resultados similares aos obtidos

por CLAE, indicando que esta técnica poder ser aplicada para o estudo de diferenciação dos extratos analisados, apresentando resultados confiáveis e reprodutíveis.

Não há relatos na literatura da utilização de análise por RMN ^1H na busca por resposta local em folhas de plantas doentes, o que torna ainda mais importante o estudo desenvolvido neste trabalho, que teve como objetivo a comparação do perfil químico de folhas de T. 'Murcott' com sintomas de MMA, analisando a região exatamente sob a lesão de folhas sintomáticas, com folhas sadias de mesmo tamanho e na mesma região. Este estudo indicou um maior acúmulo do flavonóide Apigenina 7-O-rutinosídeo em folhas sintomáticas de T. 'Murcott'. O resultado obtido estimulou a investigação da distribuição espacial deste composto sobre folhas sadias e sintomáticas desta espécie. A análise foi feita com o mínimo tratamento de amostra, sendo gerada uma imagem química relativa à distribuição do flavonóide Apigenina 7-O-rutinosídeo em tecidos intactos de folhas desta espécie, utilizando MALDI-IMS. Foi utilizada esta técnica, uma vez que o método tradicional de LC-MS determina apenas a concentração média na amostra após a extração vegetal com água ou solventes orgânicos, não dando informações sobre a distribuição espacial dos compostos analisados. Os resultados obtidos com este estudo corroboraram com os obtidos por RMN ^1H .

Os resultados alcançados com RMN ^1H 600MHz e MALDI-IMS fornecem uma boa indicação do aumento em concentração deste flavonóide em folhas de T. 'Murcott' infectadas pelo fungo *A. alternata*. No entanto, este foi um estudo preliminar que identificou um composto que parece estar envolvido no mecanismo de defesa da planta, merecendo outros estudos, como o relativo à sua quantificação via LC-MS em todos os órgãos de T. 'Murcott', não tendo tempo hábil para ser desenvolvido neste trabalho.

Por fim, concluiu-se que os objetivos do projeto foram alcançados, o estudo do perfil químico permitiu diferenciar, através de análise

quimiométrica, plantas doentes daquelas sadias; também foi possível identificar uma classe de substâncias (piranocumarinas) que apresentam potencial atividade fungicida, para futuros estudos frente à *A. alternata*. Os dados obtidos também abriram as portas para novos estudos, entre eles, a melhor compreensão dos mecanismos de defesa utilizados pela planta, como a verificação sobre o tecido vegetal intacto da distribuição de um composto do metabolismo secundário, através de MALDI-IMS, com a finalidade de se obter maior entendimento sobre a sua função e importância para a planta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p.275.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, 2001.

AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 5ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, p.922, 2005.

AHMAD, J.; SHAMSUDDIN, K.M.; ZAMAN, A. A pyranocoumarin from *Atlantia Ceylanica*. *Phytochemistry*, 23 (9), p. 2098, 1984.

AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Molecular Plant Pathology*, Oxford, v. 4, n. 6, p. 435-446, 2003.

ALI, M. K.; LEPOIVRE, P.; SEMAL, J. Fosetyl-Al treatment of *Phytophthora citrophthora* releases a high scoparone elicitor activity from Fosetyl-Al sensitive strain mutant than from an insensitive mutant. *Fruits* v. 46, p. 51-55, 1991.

ANAYA AL; MACIAS-RUBALCAVA M; CRUZ-ORTEGA R; GARCIA SANTANA C; SANCHEZ-MONTEERRUBIO PN; HERNANDEZ BAUTISTA BE; MATA R. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry* 66:487-494, 2005.

ANDERSEN O. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Boca Raton, FL: CRC Taylor and Francis, 2006.

ARAÚJO, E. F., ROQUE, N. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. Citros. Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005, p. 126 – 143.

ARRAS, G. Mode of action of an isolate of *Canidida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology*, v. 8, p. 191-198, 1996.

ASCENSÃO, A. R. F. D. C.; DUBERY, I. A. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Phytochemistry*. v.63 p.679-686, 2003.

BAILEY, J.A.; MANSFIELD, J.W. (Eds) Phytoalexins, Halsted, Wiley, New York, 1982.

BANDONI, A. L. Los recursos vegetales aromáticos em Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1. ed. Buenos Aires: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, 2002.

BARR, P.J., TOMEI, L.D. Apoptosis and its role in human disease. *BioTechnology* 12, 487-493, 1994.

BARRIONUEVO, W.R. & LANÇAS, F.M. “Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água”. *Quim. Nova*, 24: 172-175, 2001.

BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F.A.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. 2005. Mancha marrom de alternária: uma interação fungo, toxina, tangerina. *Laranja*, 25(2): 323-336.

BELLA, P.; GUARINO, C.; LA ROSA, R.; CATARA, A. Severe infections of *Alternaria* spp on a mandarin hybrid. *Journal of Plant Pathology*, Bari, v.83. p.231, 2001.

BENNETT, R.D. e HASEGAWA, S. 7a - Oxygenated limonoids from the rutaceae. *Phytochemistry*. 21: 2349–2354, 1982.

BENSCH, M.J.; VAN STADEN, J. Ultrastructural histopathology of infection and colonization of maize by *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*). *Journal of Phytopathology* 136:312-318, 1992.

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D. *et al.* (Org.). Citros. Campinas: Instituto Agrônomo / FUNDAG, p.19-36, 2005.

BURREL, M. M.; EARNSHAW, C. J.; CLENCH, M. R. Imaging Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: a technique to map plant metabolites within tissues at high special resolution. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 58, n. 4, p. 757-763, 2007.

CANIHOS, Y.; ERKILIC, A.; TIMMER, L.W. First reporter of *Alternaria* Brown spot of *Minneola tangelo* in Turkey. *Plant disease*. St. Paul, v. 81, n. 10, p. 1214, 1997.

- CAPRIOLI, R. M., FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF/MS. *Anal Chem* 69, 4751–60, 1997.
- CARSON, D.A., RIBEIRO, J.M. Apoptosis and disease. *Lancei* 341, p.1251-1254, 1993.
- CARVER, T.L.W.; THOMAS, B.J.; INGERSON-MORRIS, S.M. The surface of *Erysiphe graminis* and the production of extracellular material at the fungus-host interface during germinating and colony development. *Canadian Journal of Botany* 79:272-287, 1995.
- CASSEL, E., VARGAS, R.M.F. Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation. *J. Mex. Chem. Soc.*, v. 50(3), p. 126-129, 2006.
- CASTRO-CAICEDO, B.L.; LEGUIZAMON-C., LOPEZ-R, J.A. La mancha foliar de los cítricos em la zona cafetera. *Avances Técnicos Cenicafé, Chinchiná*, n. 198, p.26, 1994.
- CHA, S. W.; ZHANG, H.; ILARSLAN, H. I.; WURTELE, E. S.; BRACHOVA, L.; NIKOLAU, B. J.; YEUNG, E. S. *The Plant Journal*. 55, 348 – 360, 2008.
- CHAMPAGNE, D. E.; ISMAN, M. B.; TOWERS, G. H. N.; Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 31(2), p. 377-394, 1992.
- CHAURAND, P., SCHWARTZ, S. A., BILLHEIMER, D., XU, B. J., CRECELIUS, A., CAPRIOLI, R. M. Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 76, 1145–55, 2004.
- CHEN, J.; LU, Y.-H.; WEI, D.-Z.; ZHOU, X.-L.; *Chromatographia*, 70, 981, 2009.
- CHEN, Y.C. SHEN, S.C. LIN, H.Y. Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids, *Biochem. Pharmacol.* 66 1139–1150, 2003.
- CORCORAN, G.B., FIX, L., JONES, D.P., TRIENEN MOSLEN, M., NICORTERA, P., OBERHAMMER, F.A., AND BUTTYAN, R. Contemporary issues in toxicology. Apoptosis: Molecular control point in toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, p. 169-181, 1994.

CORNETT DS, REYZER ML, CHAURAND P, CAPRIOLI RM. MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nature Methods* 2007;4(10):828–833.

COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; SÃO PEDRO, A.; DAVID, J. P. L.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F. S. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. *Revista brasileira de farmacognosia*, Curitiba, v. 20, n. 4, p.502-505, ago-set, 2010.

DANILATOS, G. D. Environmental scanning electron microscope : Some critical issues. *Scanning Microscopy Supplement*, 7, 57–80, 1993.

DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. *Annual Review of Plant Biology*. 35, 243, 1984.

DE CARVALHO, M. G.; DA COSTA, P. M.; ABREU H. S. Flavanones from *Vernonia diffusa*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 10, No. 2, 163-166, 1999.

DE MELO C. C.; DOMINGUES V.C.; BATALHÃO J. R.; BUENO O. C.; FILHO E. R.; DA SILVA, MFG, VIEIRA P. C.; FERNANDES J. B.: Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1216:4307-4312, 2009.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2 ed. England: John Wiley & Sons, LTD, 2001.

DODDAREDDY, M. R.; CHA, J. H. CHO, Y. S.; KOH, H. Y.; YOO, K. Y.; KIM, D. J.; PAE, A. N. "Volsurf analysis of carbapenem antibiotics" *Bio. & Med. Chem.*, 13, 3339-3349, 2005.

EGERTON, R. F. *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer, p.202, 2005.

EMERSON, O. H. *The bitter principles of citrus fruit*. *Journal of the American Chemical Society*, 70, 545–549, 1948.

ESQUENAZI E, DORRESTEIN PC, GERWICK WH. Probing marine natural product defenses with DESI-imaging mass spectrometry. *Proc Nat Acad Sci* 106: 7269–7270, 2009.

FANG, X.; DI, Y. T.; HAO, X. J. The Advances in the Limonoid Chemistry of the Meliaceae Family *Current Organic Chemistry*, v. 15(29), p. 1363-1391, 2011.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. Química Nova, 22(5), p.724-731, 1999.

FIGUEIREDO, J. O. Variedades comerciais. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. S. (Ed.). Citricultura brasileira. 2 ed. Campinas, SP. Fundação Cargill, v.1, p. 228-264, 1991.

FRANCK J, ARAFAH K, ELAYED M, BONNEL D, VERGARA D. MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. Mol Cell Proteomics 8: 2023–2033, 2009.

GALLARDO, E.; COSTA,S.; BARROSO,M.. “A microextração em fase sólida como técnica de preparação de amostras em química analítica e toxicologia: Teoria e aplicações”. Rev. Lusófona de C&T Saúde, 1: 105-124, 2009

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.

GARDNER, J. M.; KONO, Y.; CHANDLER, J. L. Biossay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 29, p. 293-304, 1986.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoid Composition of Citrus Juices. Molecules 12, 1641-1673, 2007.

GILBERT LC, DOHERTY RE. Using ESEM and SEM to compare the performance of dentin conditioners. Microscopy Research and Technique 25, 419–23,1993.

GRAYER, R.J.; HARBORNE, J.B. Phytochemistry 37 (1), 19, 1994.

GOES, A.; MONTES de OCA, A.G.; REIS, R.F. Ocurrence de la mancha de *Alternaria* em mandarina “Dancy” em el estado de Rio de Janeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 26, supl., p. 386, 2001.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. The biochemistry and physiology of plant disease. Columbia, University of Missouri Press. p.433, 1986.

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. *J. Nat. Prod.* 57, 518-520, 1994.

HAGENMEIER, R. D., SHAW, P. E. Changes in volatile components of stored tangerines and other speciality citrus fruits with different coatings. *Journal of Food Science*, 67, 1742–1745, 2002.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W., JONES, R. (Ed.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists. cap. 21, p. 1102-1157, 2000.

HASEGAWA, S.; MIYAKE, M.; OZAKI, Y. Biochemistry of Citrus Limonoids and Their Anticarcinogenic Activity. in *Food Phytochemicals for Cancer Prevention*. v. 15, p. 198-208, 1994.

HASHINAGA, F., FONG, C. H., HASEGAWA, S. *Biosynthesis of limonoids in citrus sudachi*. *Agricultural Biology Chemistry*, 54, 3019–3020, 1990.

HELLER M, MATTOU H, MENZEL C, YAO X. Trypsin Catalyzed 16O-to-18O Exchange for Comparative Proteomics: Tandem Mass Spectrometry Comparison Using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-IonTrap Mass Spectrometers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2003;14:704–718.

HERRERA, L. La mancha parda de los cítricos en Cuba. *Levante Agrícola, Valência*, v. 31, n. 229, p. 49-50, 1992.

KARAS M, BAHR, U. Matrix-assisted laser desorption–ionization (MALDI) mass spectrometry: principles and applications. *Selected Topics Mass Spectrom Biomolecular Sciences*, NATO ASI Series C 504:33–53, 1997.

KARAS M,; HILLENKAMP F, 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons. *Anal Chem* 60:2299–2301, 1988.

KARIM, M. R., HASHINAGA, F. *Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue*. *Food Chemistry*, 76, 431–436, 2002.

KELLY, C., JEWELL, C.; O'BRIEN, N. M. The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic

metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat. *Nutr. Res.* 23: 681–690, 2003.

KERTESZ, V.; VAN BERKEL, G. J.; VAVREK, M.; KOEPLINGER, K. A.; SCHNEIDER, B. B.; COVEY, T. R. *Anal. Chem.* 80, p. 5168 – 5177, 2008.

KHAN, A. J.; KUNESCH, G.; CHUILON, S.; RAVISE, A. Structure and biological activity of xanthyletin, a new phytoalexin of citrus. *Fruits* 40, 807-811, 1985.

KHURANA SMP, PANDEY SK, SARKAR D. Chanemougasoundharam A Apoptosis in plant disease response: a close encounter of the pathogen kind. *Curr Sci* 88:740–752, 2005.

KIELY, T.B. Brown spot of Emperor mandarin. *Agricultural Gazette*, February, p.854-856, 1964.

KIM,J.; KWON,Y.; CHUN,W.; KIM,T.; SUN,J.; YU,C.; KIM,M. “Rhus verniciflua Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, anti-microbial and a-glucosidase inhibitory effect”. *Food Chem.*, 120: 539–543, 2010.

KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, n. 7, p. 719-722, 1991.

KOHMOTO, K.; ITOH, Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.; NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 495-502, 1993.

KOHMOTO, K.; SCHEFFER, R. P.; WHITESIDE, J. O. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 69, n. 6, p. 667-671, 1979.

KROPP, B.R., HOOPER, G.R., HANSEN, T.R., BINNS, M.; THOMSON, S.V. Initial events in the colonization of dryer’s woad by *Puccinia thlaspeos*. *Canadian Journal of Botany* 77:843-849,1999.

LAM, L. K. T., LI, Y., HASEGAWA, S. *Effects of citrus limonoids on glutathione S-transferase activity in mice*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 878–880, 1989.

- LI, S. LO, C.; HO, C. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4176–4185, 2006.
- LIN YS, LI S, HO CT, LO CY. Simultaneous Analysis of Six Polymethoxyflavones and Six 5-Hydroxy-polymethoxyflavones by High Performance Liquid Chromatography Combined with Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.*, 60, 12082-12087, 2012.
- LUTHRIA, D. L.; RAMAKRISHNAN, V; VERMA, G. S.; Prabhu, B. R.; Banerji, A. Insect Antifeedants from *Atalantia racemosa*. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1435-1437, 1989.
- LUZIA, D. M. M. L.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. *Quimica Nova*, v.32, n.4 p. 1-4, 2009.
- MARÍN, J.E.; FERNÁNDEZ, H.S.; PERES, N.A; ANDREW, M.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. First report of *Alternaria* Brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. *Phytopathology*, St. Paul, v. 90, n. 5, p. 686, 2006.
- MARTIN, S.J. Apoptosis: Suicide, execution or murder? *Trends Cell Biol.* 3, 141-144, 1993.
- MARTINS, L. R. R.; PEREIRA, E. R. F.; CASS, Q. B.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 400, 469, 2011.
- MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J.; Citros, Cordeirópolis, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, cap.21, p.449-482, 2005.
- MCDONNELL LA, HEEREN RMA. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*; 26(4): 606–643, 2007.
- MIKOLAJCZAK, K. L.; WEISLEDER, D.; PARKANYL, L.; CLARDY, J. *Journal of Natural Products* 51 (3), 606, 1988.
- MIMS, C.W., LILJBKELKE, K.A.; RICHARDSON, E.A. Surface morphology, wall structure, and initial adhesion of conidia of the powdery mildew fungus *Uncinuliella australiana*. *Phytopathology* 85:352-358, 1995.
- MIYAZAKI, T.; PLOTTO, A.; BALDWIN, E. A.; REYES-DE-CORCUERA, J.; GMITTER, F. G., JR. Aroma characterization of tangerine hybrids by gas-

chromatography–olfactometry and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 727–735, 2012.

MODOLO, L.V., CUNHA, F. Q., BRAGA, M. R. & SALGADO, I. 2002. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiology* 130: 1288-1297, 2002.

MOSCOW, D; LINDOW, S. E. Infection of milk thistle (*Silybum marianum*) leaves by *Septoria silybi*. *Phytopathology* 79:1085-1090, 1989.

MULLEN, A. K.; CLENCH, M. R.; CROSLAND, S.; SHARPLES, K. R. Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Chichester, v. 19, p. 2507-2516, 2005.

MUSCARIELLO, L., ROSSO, F., MARINO, G., GIORDANO, A., BARBARISI, M., CAFIERO, G., BARBARISI, A. A critical overview of ESEM applications in the biological field. *Journal of Cellular Physiology* 205, 328–334, 2005.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G.C. “Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados”. *Química Nova* 21, (4), 1998.

NISHIMURA, S.; KOHMOTO, K. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. In: GROGAN, R. G.; ZENTMYER, G. A.; COWLING, E. B. *Annual Reviews Phytopathology*, Palo Alto, v. 21, p. 87-116, 1983.

NUÑEZ, E. E. Desenvolvimento e produtividade de oito cultivares de tangerinas sobre quatro porta-enxertos. 2006. 75Pp. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2006.

PALM, M. E.; CIVEROLO, E. L. Isolation, pathogenicity, and partial host range of *Alternaria limicola*, causal agent of mancha foliar de los cítricos in Mexico. *Plant Disease*, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 879-883, 1994.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. A Routine Experimental Protocol for qHNMR Illustrated with Taxol *Journal Natural Products*. 70:589-595 2007.

PAXTON JD. Biosynthesis and accumulation of legume phytoalexins, in *Mycotoxins and Phytoalexins*, R.P. Sharma and D.K Salunkhe editors, CRC Press, Boca Raton, FL. 1991.

PEEVER, T. L.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A.; TIMMER, L. W. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathology*, St. Paul, v. 90, n. 4, p. 407-414, 2000.

PEGG, K. G. Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal agent of brown spot of Emperor mandarin. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, Brisbane, v. 23, n. 1, p. 15-28, 1966.

PENN SG, CANCELLA MT, GREEN MK, LEBRILLA CB. 1997. Direct comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization in the analysis of gangliosides by Fourier transform mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* 3:67–79, 1997.

PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P. & TIMMER, L.W. Outbreaks of *Aternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. *Plant Disease* v.87, p.750, 2003.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *bauhinia forficata* (Leguminosae). *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 4, 466-469, 2003.

POULOSE, S. M.; JAYAPRAKASHA, G. K.; MAYER, R. T.; GIRENNAVAR, B.; PATI, B. S. Purification of citrus limonoids and their differential inhibitory effects on human cytochrome P450 enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 1699-1709, 2007.

PRIETO, K. R. Estudo químico do fungo *Alternaria alternata* obtido do citros tangor ‘Murcot’”. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, p. 60, 2012.

REIMER, L. Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. Springer, p.527, 1998.

REIS, R. F.; GOES, A. de; MONDAL, S. N.; SHILTS, T.; BRENTU, F. C.; TIMMER L. W. Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. *Plant Disease*, v. 90, n. 8, p. 1051-1054, 2006.

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, p.262.

RIBEIRO, T. A. N.; NDIAYE, E. A. da S.; VELOZO, E. da S.; VIEIRA, P. C.; ELLENA, J.; JÚNIOR SOUSA, P. T. de. "Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil". *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16** (6B), 1347-1352, 2005.

RODOV, S; BEN-YEHOSHUA, D.; D'HALLEWIN, G.; CASTIA, T. Accumulation of phytoalexins scaparonone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. *Acta horticulture*, n. 381, p. 517-523, 1994.

RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU Jr., J.; AMARO, A. A.; SEMPIONATO, O. R.; *Citricultura Brasileira*, 2ª ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991.

ROMPP, A.; GUENTHER, S.; SCHOBER, Y.; SCHULZ, O.; TAKATS, Z.; KUMMER, W.; SPENGLER, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* 49, p. 3834 – 3838, 2010.

ROY, A., SARAF, S. *Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(2), 191-201, 2006.

RUEHLE, G.D. A strain of *Alternaria citri* Ellis and Pierce causing a leaf spot of rough lemon in Florida. *Phytopathology* 27:863-865, 1964.

SARDARI, S.; NISHIBE, S.; DANESHTALAB, M. Coumarins the bioactive structures with antifungal property. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 23, 335-393, 2000.

SAUER, M.; FRIML, J.; HENNIG, L.; KÖHLER, C., EDS.; *In Plant Developmental Biology*. Humana Press: New York, v. 655, p. 253-263, 2010.

SCHALLER A, RYAN CA. Systemin - a polypeptide signal in plants. *Bioessays*, 18, p.27-33, 1996.

SCHOONHOVEN, L.M.; VAN LOON J. J. A.; DICKE, M. *Insect-Plant Biology*. Oxford, University Press, Oxford, 2005.

SCHUTTE, G. C.; LESAR, K. H.; PELSER, P. T.; SWART, S. H. The use of tebuconazole for the control of *Alternaria alternata* on 'Minneola' tangelos and its potential to control postharvest decay when applied as a preharvest spray. *Acireale: Proceedings*. Acireale: International Society of Citriculture, 1992. v. 3, p. 1070-1074.

SHLEZINGER N, MINZ A, GUR Y, HATAMI I, DAGDAS YF. Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathog* 7:e1002185. doi:10.1371/journal.ppat.1002185, 2011.

SHROFF , R.; VERGARA, F.; MUCK, A.; SVATOS, A.; GERSHENZON, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6196 – 6201, 2008.

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, 1998.

SIMMONS, T.L.; COATES, R.C.; CLARK, B.R.; ENGENE, N.; GONZALEZ, D.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P.C.; GERWICK, W.H. Biosynthetic Origin of Natural Products Isolated from Marine Microorganism-Invertebrate Assemblages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 4587–4594, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 387-415, 2000.

SINGH, G.; GAVRIELI, J.; OAKEY, J.S.; CURTIS, W. R. Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. *Plant Cell Reports* 17: 391–395, 1998.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; Initial experiments in high performance liquid chromatography method development – use of starting gradient run *journal of chromatography A*. 721, 9-14, 1996.

SOARES, M. S. Estudo da variação do perfil químico de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia* após a inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2011. Tese de doutorado, p.275.

SOLEIL, Z. *Alternaria* brown spot on *Minneola* tangelos in Israel. *Plant Pathology*, v.40, p.145-147, 1991.

SOLEIL, Z.; KIMCHI, M. Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. *Journal Phytopathology*, v.145, p.389-391, 1997.

SOUZA, M.C.; STUCHI, E.S. & GOES, A. de. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. *Scientia Horticulturae*, v.123, n.1, p.1-138, 2009.

SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L; RENAUD, M.S.A . Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, v.28. p.231, 2003.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.16, p.265-304, 2008.

STANLEY, W. L.; JURD, L. *Citrus coumarins* *J. Agric. Food Chemistry*. 19 (6), p. 1106–1110, 1971.

STECK, W. New syntheses of demethylsuberosin, xanthyletin, (+/-)-decursidinol, (+)-marmesin, (-)-nodakenetin, (+/-)-decursin and (+/-)-prantschimgin. *Canadian Journal of Chemistry*, 49, p.2297, 1971.

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, v.75, p.687-706, 1993.

STOECKLI, M.; CHAURAND, P.; HALLAHAN, D. E.; CAPRIOLI, R. M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* 7, 493–6, 2001.

STOECKLI, M., FARMER, T. B., AND CAPRIOLI, R. M. Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument. *J Am Soc Mass Spectrom* 10, 67–71, 1999.

STOECKLI M, STAAB D, SCHWEITZER A, GARDINER J, SEEBACH D. Imaging of a b-Peptide Distribution in Whole-Body Mice Sections by MALDI Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*;18(11):1921–1924, 2007.

STUART, R.M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F.A.; MACHADO, M.A. *Alternaria* brown spot. *Laranja*, v.30, p. 29-44, 2009.

SUN, C.; CHEN, K.; CHEN, Y.; CHEN, Q. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. v. 93 (4), p. 599–605, 2005.

SWART, S.H.; WINGFIELD, M.J.; SWART, W.J. & SCHUTTE, G.C. Brown spot of *Minneola* tangelo and efficacy of fungicidal sprays programmes for disease control in South Africa. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, v.1, p.379-384, 1996.

TIAN J, ZHANG X, LIANG B, LI S, WU Z. Expression of Baculovirus Anti-Apoptotic Genes p35 and op-iap in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Enhances Tolerance to *Verticillium* Wilt. *PLoS ONE* 5(12), p.35, 2010.

TIMMER, L. W.; DARHOWER, H. M.; ZITKO, S. E.; PEEVER, T. L.; IBÁÑEZ, A. M.; BUSHONG, P. M. Environmental factors affecting the severity of *Alternaria* brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. *Plant Disease*, v. 84, n. 6, p. 638-643, 2000.

TIMMER, L. W.; PEEVER, T. L.; SOLEL, Z.; AKIMITSU, K. *Alternaria* diseases of citrus-novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*, Firenze, v. 42, n. 2, p. 99-112, 2003.

TIMMER, L. W.; ZITKO, E. Evaluation of fungicides for control of *Alternaria* brown spot and citrus scab. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Winter Haven, v. 110, p. 71-76, 1997.

TOMEL, L.D., COPE, F.O., EDS. *Apoptosis: The Molecular Basis of Apoptosis in Disease*, *Current Communications in Cell and Molecular Biology*. (Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1994.

TRIPOLI, E.; GUARDIA, M.L.; GIAMMANCO, S.; MAJO, D.D.; GIAMMANCO, M. Citrus Flavonoids: Molecular Structure, Biological Activity and Nutritional Properties: A Review. *Food Chem.* 104, 466-479, 2007.

VAN KAN, J.A.L. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plantpathogen. *Trends Plant Sci.* 11, p. 247–253, 2006.

VAN DE GRAAF, P.; JOSEPH, M.E.; CHARTIER-HOLLIS, J.M.; O'NEILL, T.M. Prepenetration stages in infection of clematis by *Phoma clematidina*. *Plant Pathology* 51:331-337, 2002

VANETTEN, H.D., MATTHEWS, D.E., AND MATTHEWS, P.S. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 143, 1989.

VICENT, A.; ARMENGOL, J.; SALLES, R.; ALFARO-LASSALA, F.; GARCIA- JIMÉNEZ, J. First report of *Alternaria* Brown Spot of citrus in Spain. *Plant Disease*, St Paul, v.84, p.1044, 2000.

VIEIRA,P.C.; MAFEZOLI,J.; BIAVATTI,M.W. “Inseticidas de Origem Vegetal” IN: FERREIRA, J. T.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. *Produtos Naturais no controle de insetos*. São Carlos. Editora UFSCar, p 23, 2001.

WALLER, J. M.; BIGGER, M. HILLOCKS, R. J. *Coffee Pests, Diseases and their Management*. p.235, 2007.

WANG, D.; WANG, J.; HUANG, X.; TU, Y.; NI, K. Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 63–69, 2007.

WANG, M.; LI, J.; HO, G. S.; PENG, X.; HO, C.-T. Isolation and Identification of Antioxidative Flavonoid Glycosides from Thyme (*Thymus Vulgaris L*). *J. Food Lipids*. 5(4): 313-321, 1998.

WANG, Y.C., CHUANG, Y.C., KU, Y.H. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 102, 1163–1171, 2007.

WHITESIDE, J.O. A newly recorded *Alternaria* induced Brown Spot disease on Dancy tangerines in Florida. *Plant Disease Reporter*, v.60, p.326-329, 1976.

WHITESIDE, J. O. *Alternaria* brown spot of Dancy tangerines and its control. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Winter Haven, v. 93, p. 34-37, 1979.

WISEMAN, J. M.; IFA, D. R.; SONG, Q. Y.; COOKS, R. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* 45, p. 7188 – 7192, 2006.

WYNN, W.K. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: response to a surface contact stimulus. *Phytopathology* 66:136-146, 1976.

XAVIER, V. B. Investigação sobre compostos voláteis de espécies de *Baccharis* nativas do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Faculdade de Engenharia, PUCRS, Porto Alegre, 2011.

ZHANG, J. E BRODBELT, J. S. Screening flavonoid metabolites of naringin and narirutin in urine after human consumption of grapefruit juice by LC-MS and LC-MS/MS. *The analyst*, 129, 1227-1233, 2004.

ZHANG, Y.; WANG, X. B; KONG, L. Y. (-)-Nomilin chloroform solvate. *acta crystallographica*. 62, p-2502-2504, 2006.

ZHENG, C.-J.; RAHMAN, K.; QIN, L. P.; *Chromatographia*, 70, 143, 2009.