



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudo da variação do perfil químico de citros com HLB e sadios, buscando informações sobre mecanismo de defesa.”

Barbara Sayuri Bellete*

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

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

*Bolsista Capes

SÃO CARLOS – SP

2014

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

B442ev Bellete, Barbara Sayuri.
Estudo da variação do perfil químico de citros com HLB e sadios, buscando informações sobre mecanismo de defesa / Barbara Sayuri Bellete. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
188 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Química orgânica. 2. Cítricos. 3. *Huanglongbing (HLB)*. 4. *Greening*. 5. Fitoquímica. 6. *Candidatus Liberibacter asiaticus*. I. Título.

CDD: 547 (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 **Barbara Sayuri Bellete**, realizada em 26 de março de 2014:*



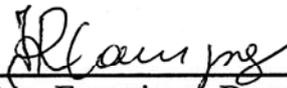
Prof. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



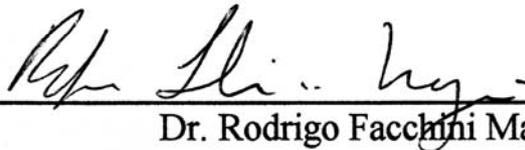
Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



Prof. Dr. José Daniel Figueroa Villar



Prof. Dra. Francinete Ramos Campos



Dr. Rodrigo Facchini Magnani

“Escolhe um trabalho de que gostes,
e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”

Confúcio

Dedico este trabalho aos meus pais,
Que sempre me apoiaram e nunca mediram
esforços para minha formação profissional e pessoal.

À toda minha família, por tanto carinho.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fátima, não só pela orientação e ensinamentos, mas por ter confiado em mim no início, e pela grande inspiração que ela é para nós;

À “família” do Laboratório de Produtos Naturais UFSCar, pela amizade, apoio, troca de experiências e maravilhoso convívio;

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Maria Fátima, João Batista, Paulo César e Moacir Forim, pelos ensinamentos, suporte, colaboração e amizade;

Aos meus professores de orgânica Quézia, Edinho, Moacir, João Batista, Giba Paulo César, Arlene, Timothy, Ursula, e Fátima, excelentes mestres, os quais me levaram à paixão pela química orgânica;

Aos demais professores do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação, desde a época da minha graduação. Sem eles eu não estaria escrevendo essa tese;

À Alany, meu braço direito, na época aluna de iniciação científica, por toda a ajuda no decorrer deste trabalho;

Ao laboratório de RMN UFSCar, em especial ao aluno Sergio Thomasi, sempre pronto a me ajudar;

À Waters, em especial ao Amadeu Iglesias, pela ajuda nos experimentos de LC-MS^E;

Ao corpo técnico do Departamento de Química da UFSCar pelo apoio e serviços prestados durante a execução do trabalho;

A todos os colegas do DQ-UFSCar pelo companheirismo;

À minha família, sempre;

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

A CAPES e ao INCT pela bolsa concedida;

Muito Obrigada!

Lista de Símbolos e Abreviações

δ	Deslocamento químico em partes por milhão
λ	Comprimento de onda
μm	micrômetro
J	Constante de acoplamento
m/z	Relação massa/carga
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
CAD	gás de colisão
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
CE	Energia de Colisão
CH_2Cl_2	Diclorometano
CUR	Gases de Cortina
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
d	Dubleto
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
dd	Duplo-dubleto
DP	Potencial de Desagrupamento
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EP	Potencial de Entrada
eV	<i>Electron volt</i>
FP	Potencial de Focalização
GC	<i>Gas Chromatography</i>

GS1	Gás Nebulizador
GS2	Gás de Aquecimento
HLB	<i>HuangLongBing (greening)</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>High Performance / Pressure Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IE	Impacto eletrônico
IS	Voltagem do TurboIonSpray®
MeOH	Metanol
MHz	Mega hertz
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMFs	<i>Polymethoxylated Flavones</i>
ppm	partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>

TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
u.m.a.	unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta

Lista de Fluxogramas

FLUXOGRAMA 3.1: Preparação do material vegetal referentes às mudas do IAC-Cordeirópolis.....	30
FLUXOGRAMA 3.2: Metodologia de extração das amostras referentes às mudas do IAC-Cordeirópolis.	31
FLUXOGRAMA 3.3: partição líquido-líquido dos extratos etanólicos.....	31
FLUXOGRAMA 3.4: Estudo da fração AcOEt das Raízes do citros estudado.	33
FLUXOGRAMA 3.5: Fracionamento do extrato etanólico do caule superior do citros estudado.....	34
FLUXOGRAMA 3.6: Estudo da fração AcOEt das Folhas do citros estudado.	35
FLUXOGRAMA 3.7: Preparação do material vegetal referentes às mudas do IAC-Cordeirópolis.....	38
FLUXOGRAMA 3.8: Metodologia de extração das amostras referentes às mudas do IAC-Cordeirópolis.	38

Lista de Figuras

FIGURA 1.1: Características que deram origem ao nome da doença. (A): ramos amarelados que deram origem ao nome HLB; (B): falta de coloração, originando o termo <i>greening</i> . Foto do site: American Phytopathological Society (http://www.apsnet.org).	2
FIGURA 1.2: Distribuição de HLB no mundo (fonte: Citrosuco).	3
FIGURA 1.3: Evolução de municípios com HLB no estado de São Paulo (Fonte: Fundecitrus).....	4
FIGURA 1.4: Micrografia eletrônica de varredura dos vasos de floema na seção transversal de uma folha de vinca (<i>Catharanthus roseus</i>) (A) experimentalmente infectados por “ <i>Ca. L. Americanus</i> ”, e (B) planta não infectada. (C) Um dos vasos preenchido pela bactéria (C) (barra = 2 μ m), e (D) zoom do vaso em	

destaque em C, mostrando as células bacterianas dentro do floema (barra = 1 μm). (TANAKA, 2007).....	6
FIGURA 1.5: Vetores do HLB, <i>Tryosa eritreae</i> (A) e <i>Diaphorina citri</i> (B). (Fonte: Citrus BR).....	7
FIGURA 1.6: Ciclo de vida (A) e alimentação (B) da <i>Diaphorina citri</i>	8
FIGURA 1.7: Principais sintomas nas folhas e nos frutos de citros, provocados pela doença HLB. (A): mosqueamento; (B): amarelecimento nas folhas novas; (C): engrossamento da nervura central; (D): sementes abortadas; (E): engrossamento da casca; (F): manchas amarelas na casca (Fonte Fundecitrus)...	9
FIGURA 1.8: Classificação geral de Metabolômica (adaptado de CEVALLOS-CEVALLOS, 2009)	11
FIGURA 1.9: Esquema dos diferentes tipos de acoplamento entre HLPC-NMR, e seus respectivos espectros (http://www.bruker.com/products/mr/nmr).....	14
FIGURA 3.1: Cromatograma da sub-fração C1-22-27, obtido por HPLC preparativo.....	33
FIGURA 3.2: Separação via HPLC-UV-SPE-NMR da fração V3-34-40 do extrato das folhas do citros estudado.	35
FIGURA 3.3 - Inoculação via processo de enxertia de borbulhas (Fonte: “Food and Agriculture Organization of the United Nations”: www.fao.org).	37
FIGURA 3.4: Esquema da técnica LC-UV-SPE-NMR (http://sermn.uab.cat/2012/03/hplc-	42
FIGURA 3.5: Analisador híbrido Q-TOF, operando no modo MS (acima) e no modo MS/MS (abaixo). Os módulos em cinza significam que estes estão ativos, enquanto os módulos em brancos significam que estão desativados (Fonte: http://www.astbury.leeds.ac.uk/).....	51
FIGURA 4.1 Biossíntese das cumarinas (adaptado de Dewick, 2002).	58
FIGURA 4.2: Estrutura da cumarina C1, Xantiletina.....	59
FIGURA 4.3: Espectro de RMN ^1H da cumarina C1 (CDCl_3 , 400 MHz).....	60
FIGURA 4.4: Espectro de RMN ^{13}C da cumarina C1 (CDCl_3 , 100 MHz).	61

FIGURA 4.5: Mapa de contorno HSQC da cumarina C1 (CDCl ₃).	62
FIGURA 4.6: Espectro de massa via GC-MS (IE = 70 eV) da cumarina C1.....	62
FIGURA 4.7: Estrutura da cumarina C2, seselina.	64
FIGURA 4.8: Espectro de RMN ¹ H da cumarina C2 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	65
FIGURA 4.9: Espectro de massa via GC-MS (IE = 70 eV) da cumarina C2.....	66
FIGURA 4.10: Estrutura da cumarina C3, Xantoxiletina.	67
FIGURA 4.11: Espectro de RMN ¹ H da cumarina C3 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	68
FIGURA 4.12: Espectro de RMN ¹³ C da cumarina C3 (CDCl ₃ , 100 MHz).	69
FIGURA 4.13: Mapa de contorno HSQC da cumarina C3 (CDCl ₃).	70
FIGURA 4.14: Espectro de massa via GC-MS (IE = 70 eV) da cumarina C3 . .	70
FIGURA 4.15: Estrutura da cumarina C4, metoxiseselina.	72
FIGURA 4.16: Espectro de RMN ¹ H da cumarina C4 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	73
FIGURA 4.17: Espectro de RMN ¹³ C da cumarina C4 (CDCl ₃ , 100 MHz).	74
FIGURA 4.18: Mapa de contorno HSQC da cumarina C4 (CDCl ₃).	75
FIGURA 4.19: Espectro de massa via GC-MS (IE = 70 eV) da cumarina C4...	75
FIGURA 4.20: Estrutura da cumarina C5, dentatina.	77
FIGURA 4.21: Espectro de RMN ¹ H da cumarina C5 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	78
FIGURA 4.22: Espectro de massa (IE = 70 eV) da cumarina C5.	79
FIGURA 4.23: Estrutura da cumarina C6, Clausarina.....	80
FIGURA 4.24: Espectro de RMN ¹ H da cumarina C6 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	81
FIGURA 4.25: Proposta para biossíntese de flavonoides (Dewick, 2002).	83
FIGURA 4.26: Estrutura dos flavonoides F1 e F2.....	85
FIGURA 4.27: Espectro de RMN ¹ H dos flavonoides F1 e F2 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	86
FIGURA 4.28: Estrutura molecular para os flavonoides F3, F4 e F5, onde grupos R podem ser grupos –OH ou –OCH ₃	89
FIGURA 4.29: Espectro de RMN ¹ H do flavonóide F3 (Metanol-d ₄ , 600 MHz).	90

FIGURA 4.30: Espectro de RMN ^1H do flavonóide F4 (Metanol- d_4 , 600 MHz).	91
.....	
FIGURA 4.31: Espectro de RMN ^1H do flavonóide F5 (Metanol- d_4 , 600 MHz).	92
.....	
FIGURA 4.32: Espectro de massas <i>full scan</i> para os flavonoides F3 (A: ESI, modo negativo), F4 (B: ESI, modo negativo) e F5 (C: ESI, modo positivo).	93
FIGURA 4.33: Estrutura molecular para o ácido abscísico.....	95
FIGURA 4.34: Espectro de RMN ^1H do ácido abscísico (Metanol- d_4 , 400 MHz).....	96
FIGURA 4.35: Espectro de RMN ^{13}C do ácido abscísico (Metanol- d_4 , 400 MHz).....	97
FIGURA 4.36: Mapa de contorno HSQC do ácido abscísico (Metanol- d_4).	98
FIGURA 4.37: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) da mistura dos esteróides E1, E2 e E3.....	100
FIGURA 4.38: Espectro de massas via GC-MS de E1 (A); E2 (B) e E3 (C) (IE = 70 eV).	101
FIGURA 4.39: Estrutura dos esteróides Sitosterol (E1), Estigmasterol (E2) e Campesterol (E3).	101
FIGURA 4.40: Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos: das raízes dos citros estudados (A), do caule do porta enxerto (B), do caule da copa (C), e das folhas (D). Amostras infectadas com HLB. Obtidos através da técnica LC-UV.	103
FIGURA 4.41: Cromatogramas obtidos dos diferentes órgão de citros, obtidos através da técnica LC-UV. Comparação de plantas sadias e infectadas com HLB. A: Raízes; B: Caule porta enxerto; C: Caule Copa; D: Folhas.....	104
FIGURA 4.42: Cromatograma de HPLC-UV-SPE-NMR das raízes, indicando as bandas cromatográficas aprisionadas.	106

FIGURA 4.43: Bandas aprisionadas do extrato das raízes do citros estudado através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR, e seus respectivos compostos identificados.	107
FIGURA 4.44: Espectro de RMN ¹ H do composto R1 (metanol-d4, 600 MHz).	108
FIGURA 4.45: Espectro de RMN ¹ H do composto R2 (metanol-d4, 600 MHz).	109
FIGURA 4.46: Espectro de RMN ¹ H do composto R3 (metanol-d4, 600 MHz).	110
FIGURA 4.47: Espectro de RMN ¹ H do composto R4 (metanol-d4, 600 MHz).	111
FIGURA 4.48: Espectro de RMN ¹ H do composto R5 (metanol-d4, 600 MHz).	112
FIGURA 4.49: Cromatograma de HPLC-UV-SPE-NMR do caule inferior, indicando as bandas cromatográficas aprisionadas.....	113
FIGURA 4.50: Bandas CI-3 à CI-5 aprisionadas dos extratos do caule inferior do citros estudado através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR, e seus respectivos compostos identificados.	115
FIGURA 4.51: Espectro de RMN ¹ H da banda CI-3 (metanol-d4, 600 MHz). 115	
FIGURA 4.52: Espectro de RMN ¹ H da banda CI-4 (metanol-d4, 600 MHz). 116	
FIGURA 4.53: Espectro de RMN ¹ H da banda CI-5 (metanol-d4, 600 MHz). 116	
FIGURA 4.54: Cromatograma de HPLC-UV-SPE-NMR do caule da copa, indicando as bandas cromatográficas aprisionadas.....	117
FIGURA 4.55: Cromatograma de HPLC-UV-SPE-NMR das folhas, indicando as bandas cromatográficas aprisionadas.....	118
FIGURA 4.56: Cromatograma de íons totais da raiz de citros (ESI, modo positivo) (A); Cromatograma com detector de DAD (B); Cromatograma monitorado à 254 nm (C).	120

FIGURA 4.57: Espectro de massa da banda em 15 minutos, do extrato das raízes do citros, referente às cumarinas xantiletina e seselina (ESI, modo positivo) (espectro do meio). Cromatograma de íons totais do extrato do citros (acima); Cromatograma com detector de DAD (abaixo).	120
FIGURA 4.58: Espectro de massa da banda em 16 minutos, do extrato das raízes do citros, referente à cumarina xantoxiletina (ESI, modo positivo) (espectro do meio). Cromatograma de íons totais do extrato do citros (acima); Cromatograma com detector de DAD (abaixo).	121
FIGURA 4.59: Espectro de massa da banda em 18 minutos, do extrato das raízes do citros, referente à cumarina metoxi-seselin (ESI, modo positivo) (espectro do meio). Cromatograma de íons totais do extrato do citros (acima); Cromatograma com detector de DAD (abaixo).	122
FIGURA 4.60: Espectro de massa da banda em 23 minutos, do extrato das raízes do citros, referente à cumarina Dentatina (ESI, modo positivo) (espectro do meio); Cromatograma de íons totais do extrato do citros (acima); Cromatograma com detector de DAD (abaixo).	123
FIGURA 4.61: Fragmentações características de Flavonoides C-glicosilados e O-glicosilados.....	124
FIGURA 4.62: Espectro de massa (<i>full scan</i>) para banda F1 (acima), e espectro de íons produtos para o íon de m/z 593 (abaixo) (ESI, negativo).	125
FIGURA 4.63: Estrutura do flavonoide C-glicosilado vicenina-2.	125
FIGURA 4.64: Proposta de fragmentação para molécula F1.	126
FIGURA 4.65: Mecanismo de fragmentação proposto para perda de 120 Da.	126
FIGURA 4.66: Espectro de massa (<i>full scan</i>) para banda F2 (acima), e espectro de íons produtos para o íon de m/z 623 (abaixo) (ESI, negativo).	127
FIGURA 4.67: Estrutura do flavonoide C-glicosilado 6,8-di-C-Glu-diosmetina.	128
FIGURA 4.68: Proposta de fragmentação para molécula F2.	128

FIGURA 4.69: Espectro de massa (full scan) para banda F3 (acima); espectro de íons produtos para o íon m/z 563 (meio); espectro de íons produtos para o íon m/z 413 (abaixo) (ESI, negativo).....	129
FIGURA 4.70: Estrutura do flavonoide C-glicosilado F3 ($C_{27}H_{32}O_{13}$).	130
FIGURA 4.71: Proposta de fragmentação para a molécula F3. Rota A: perdendo inicialmente 150 Da; Rota (B): perdendo inicialmente 120 Da.....	130
FIGURA 4.72: Espectro de massa (full scan) para banda F4 (acima), e espectro de íons produtos para o íons de m/z 593 (abaixo) (ESI, negativo).	131
FIGURA 4.73: Estruturas possíveis para o flavonoide O-glicosilado F4.....	132
FIGURA 4.74: : Propostas de fragmentação para a banda F4. A: Proposta para o flavonoide poncirina; B: Proposta para o flavonóide didymina (modo negativo de ionização).....	132
FIGURA 4.75: : Espectro de massa (full scan) para banda F5 (acima), e espectro de íons produtos para o íon m/z 607 (abaixo) (ESI, negativo).....	133
FIGURA 4.76: Estrutura para o Flavonoide O-Glicosilado diosmina.....	134
FIGURA 4.77: Propostas de fragmentação para a banda F5 (modo negativo). 134	
FIGURA 4.78: Espectro de massa (full scan) para banda F6 (acima), e espectro de íons produtos para o íon m/z 609 (abaixo) (ESI, negativo).....	135
FIGURA 4.79: Estruturas dos flavonoides O-glicosilados hesperidina (esquerda) e rutina (direita).	136
FIGURA 4.80: Espectro de massas de íons produtos do padrão comercial de hesperidina (acima) e rutina (abaixo) (modo negativo).	136
FIGURA 4.81: Proposta de fragmentação para a banda F6 (modo negativo)..	137
FIGURA 4.82: Espectro de massa (<i>full scan</i>) para banda CI-1 (acima), e espectro de íons produtos (MS2) para o íon m/z 539 (abaixo) (ESI, negativo).138	
FIGURA 4.83: Espectro de massa (<i>full scan</i>) para banda CI-2 (acima), e espectro de íons produtos (MS2) para o íon m/z 609 (abaixo) (ESI, negativo).139	
FIGURA 4.84: Espectro de massa (full scan) para banda CS-2 (acima), e espectro de íons produtos (MS2) para o íon m/z 609 (abaixo) (ESI, negativo).140	

FIGURA 4.85: Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada (ESI, negativo), infectadas com HLB (vermelho) e sadias (verde). A: Raízes; B: Caule inferior (ou caule do porta enxerto); C: Caule superior (ou caule da copa); D: folhas.....	141
FIGURA 4.86: Gráfico em 2D de PCA, com todas as partes do citros Valência (utilizando fonte de ESI operando no modo negativo).....	142
FIGURA 4.87: PCA para os diferentes órgãos de citrus, comparando entre o tratamento doente (azul escuro) e sadio (azul claro) (ESI, modo negativo)....	144
FIGURA 4.88: Gráfico de "Loadings Plot", com todos os órgãos da planta reunidos (ESI, modo negativo).....	145
FIGURA 4.89: Loadings Plot para cada órgão da planta, comparando os íons detectados entre os tratamentos doentes e sadios (ESI, modo negativo). A: folhas; B: caule superior; C: caule inferior; D: raiz.....	146
FIGURA 4.90: Gráfico de S-Plot do caule do porta enxerto de citros Valência (ESI, modo negativo).	147
FIGURA 4.91: Estruturas propostas para os íons m/z 315,0724 e 593,1513, com suas respectivas fórmulas moleculares e massa calculada teoricamente.....	148
FIGURA 4.92: Espectro de massas para o íon m/z 315,0708 encontrado no caule do porta enxerto (ESI, modo negativo). Acima: espectro de íons produtos. Abaixo: espectro do íon molecular.....	149
FIGURA 4.93: Espectro de massas para o íon m/z 593,1513 encontrado no caule do porta enxerto (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	149
FIGURA 4.94: Proposta de fragmentação para a orbicularina (Ácido 2,5-dihidroxibenzóico 2-O-C-1-glicopirranose), identificada nos caule do porta enxerto do citrus em estudo.....	150
FIGURA 4.95: Comparação da concentração do íon m/z 315,0708, referente à orbicularina, nas amostras do caule doente (acima) e sadio (abaixo) (ESI, modo negativo).....	150

FIGURA 4.96: Proposta de fragmentação para o flavonoide Vicenina-2, identificado no caule do porta enxerto do citrus em estudo.....	151
FIGURA 4.97: Comparação da concentração do íon 593, referente ao flavonoide vicenina-2, nas amostras do caule doente (acima) e do caule sadio (abaixo) (ESI, modo negativo).....	152
FIGURA 4.98: Gráfico de S-Plot das folhas de citros Valência (ESI, modo negativo).....	153
FIGURA 4.99: Espectro de massas para o íons m/z 593,1811 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	154
FIGURA 4.100: Espectro de massas para o íons m/z 609,1824 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	154
FIGURA 4.101: Espectro de massas para o íons m/z 391,1035 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	155
FIGURA 4.102: Espectro de massas para o íons m/z 191,0549 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	155
FIGURA 4.103: Gráfico de S-Plot das raízes de citros Valência (ESI, modo negativo).....	157
FIGURA 4.104: Espectro de massas para o íons m/z 469,1858 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	157
FIGURA 4.105: Comparação da concentração do íon m/z 469,1858, referente ao limonoide limonina, nas amostras do caule doente (acima) e do caule sadio (abaixo) (ESI, modo negativo).....	158

FIGURA 4.106: Espectro de massas para o íons m/z 523,1725 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	158
FIGURA 4.107: Espectro de massas para o íons m/z 633,3404 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	159
FIGURA 4.108: Espectro de massas para o íons m/z 247,0974 encontrado nas folhas (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).....	160
FIGURA 4.109: Gráfico de <i>S-Plot</i> do caule da copa de citros Valência (ESI, modo negativo).....	161
FIGURA 4.110: Espectro de massas para o íons m/z 793,4604 encontrado no caule da copa (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).	162
FIGURA 4.111: Espectro de massas para o íons m/z 633,3404 encontrado no caule da copa (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).	162
FIGURA 4.112: Espectro de massas para o íons m/z 427,0596 encontrado no caule da copa (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).	163
FIGURA 4.113: Espectro de massas para o íons m/z 265,0939 encontrado no caule da copa (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).	163
FIGURA 4.114: Curva de calibração via LC-UV para as cumarinas xantiletina (esquerda) e xantoxiletina (direita).	165
FIGURA 4.115: Variação da concentração das cumarinas xantiletina, xantoxiletina, seselina e dentatina no caule do porta enxerto de citros.	168
FIGURA 4.116: Experimento de MRM de flavonóides dos extratos das folhas do citros.	170

FIGURA 4.117: Variação dos flavonoides das folhas do citros analisados via experimento de MRM, e suas respectivas áreas das bandas.....	170
---	-----

Lista de Tabelas

TABELA 3.1: Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H ₂ O; linha B: ACN; linha C: MeOH).....	40
TABELA 3.2: Condições cromatográficas utilizadas durante análises das raízes de citrus via técnica de LC-UV-SPE-NMR (linha A: H ₂ O; linha B: ACN; linha C: MeOH).....	43
TABELA 3.3: Parâmetros espectrométricos utilizados na obtenção dos espectros de massas dos compostos das raízes.	44
TABELA 3.4: Parâmetros espectrométricos utilizados na obtenção dos espectros de massas dos compostos das folhas. F1: Vicenina; F2: Diosmetina; F3: Não Identificado; F4: Didymina; F5 Diosmina; F6: Hesperidina.	46
TABELA 3.5: Flavonóides analisados das folhas ods citros estudado, assim como suas respectidas transições monitaradas via experimento de MRM.	49
TABELA 3.6: : Parâmetros espectrométricos utilizados nos experimentos de MRM dos flavonóides das folhas.....	50
TABELA 3.7: Condições cromatográficas utilizadas na técnica LC-MS ^E (linha A: H ₂ O; linha B: ACN; linha C: MeOH).	52
TABELA 4.1: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para a cumarina C1 e comparação com a literatura (KHAN, 1985):	63
TABELA 4.2: Dados de RMN ¹ H para a cumarina C2, e comparação com a literatura(AHMAD, 1984):.....	66
TABELA 4.3: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para a cumarina C3 e comparação com a literatura (FURUKAWA, et. al., 1983):.....	71
TABELA 4.4: Dados de RMN ¹ H para a cumarina C4, e comparação com a literatura (Valderrama, 1992):.....	76

TABELA 4.5: Dados de RMN ^1H para a cumarina C5, e comparação com a literatura (SONGSIANG, 2012):.....	79
TABELA 4.6: Dados de RMN ^1H para a cumarina C6, e comparação com a literatura (ANWER, 1977):.....	82
TABELA 4.7: Dados de RMN ^1H para os flavonóides F1 e F2 e comparação com a literatura (LI, 2006):	87
TABELA 4.8: Dados de RMN ^1H para os flavonóides F3, F4 e F5 (600 mHz, metanol-d4).	89
TABELA 4.9: Dados de RMN ^1H para o ácido abscísico, e comparação com a literatura:.....	95
TABELA 4.10: Dados de RMN ^1H para o composto R1 (metanol-d4 e comparação com os dados obtidos em CDCl_3)......	108
TABELA 4.11: Dados de RMN ^1H para o composto R2 (metanol-d4 e comparação com os dados obtidos em CDCl_3)......	109
TABELA 4.12: Dados de RMN ^1H para o composto R3 (metanol-d4 e comparação com os dados obtidos em CDCl_3)......	110
TABELA 4.13: Dados de RMN ^1H para o composto R4 (metanol-d4 e comparação com os dados obtidos em CDCl_3)......	111
TABELA 4.14: Dados de RMN ^1H e para o composto R5 (metanol-d4 e comparação com o espectro obtido em CDCl_3).	112
TABELA 4.15: Dados de RMN ^1H e para os compostos CI-3, CI-4 e CI-5 (metanol-d4 e comparação com o espectro obtido em CDCl_3)......	117
TABELA 4.16: Variação dos metabólitos secundários do caule do porta enxerto do citros Valência. Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.....	152
TABELA 4.17: Variação dos metabólitos secundários das folhas do citros Valência. Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.	156

TABELA 4.18: Variação dos metabólitos secundários da raiz do citros Valência (ESI negativo). Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.	160
TABELA 4.19: Variação dos metabólitos secundários da raiz do citros Valência (ESI positivo). Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.	160
TABELA 4.20: Variação dos metabólitos secundários do caule da copa do citros Valência (ESI negativo). Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.	164
TABELA 4.21: Medidas das áreas das bandas para as concentrações usadas na construção da curva de calibração externa do padrão xantiletina.	165
TABELA 4.22: Medidas das áreas das bandas para as concentrações usadas na construção da curva de calibração externa do padrão xantoxiletina.	165
TABELA 4.23: Extratos do caule do porta enxerto analisados, e suas respectivas áreas das bandas (Cd: caule doente; Cs: caule sadio).	167
TABELA 4.24: Flavonóides analisados das folhas dos citros estudado, assim como suas respectivas transições monitoradas via experimento de MRM.	169
TABELA 5.1: Variação do perfil químico obtido via técnica de HPLC-UV-SPE-NMR, entre citros doente e sadios.	175
TABELA 5.2: Variação do perfil químico obtido via técnica de LC-MS ^E , entre citros doente e sadios.	176

RESUMO

“ESTUDO DA VARIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE CITRUS COM *HLB* E SADIOS, BUSCANDO INFORMAÇÕES SOBRE MECANISMO DE DEFESA”. O presente trabalho descreve o estudo da variação do perfil químico de citros após a inoculação da bactéria “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, responsável pelo Huanglongbing (ex-greening) que é uma das doenças mais sérias causadoras de prejuízos na citricultura brasileira. Para isso, inoculou-se a “*Ca. Liberibacter*” em mudas de a “Valência” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) enxertadas em “Swingle” (*Citrus paradisi* X *Poncirus trifoliata*) e avaliou-se a variação dos metabólitos secundários através do desenvolvimento de métodos analíticos como HPLC-UV, LC-MS/MS, LC-UV-SPE-NMR e de ferramentas quimiométricas. As ferramentas quimiométricas (PCA e S-PLOT) aplicadas aos dados obtidos nos estudos de LC-MS/MS permitiram discriminar as plantas infectadas daquelas sadias, e também permitiram a caracterização dos compostos que mais contribuem para essa diferenciação. Ao analisar a variação do perfil químico dos citros doentes e sadios através da HPLC-UV-SPE-NMR foi possível detectar a variação principalmente de algumas cumarinas nas raízes e caule do porta enxerto, e flavonoides glicosilados nas folhas, indicando que estes compostos podem estar envolvidos no mecanismo de defesa da planta, e podem estar atuando como uma fitoantecipina. Para melhor interpretar essa variação observada, realizou-se também a variação quantitativa de alguns metabólitos secundários, como cumarinas identificadas nas raízes, e flavonóides identificados nas folhas. A partir dessa técnica foi possível verificar o aumento das cumarinas nas plantas infectadas com a bactéria, enquanto nas folhas observou-se a diminuição de todos os flavonóides no tratamento infectado, indicando que a defesa da planta parece estar nas raízes. Por fim, foi realizado um estudo fitoquímico de citros com o objetivo de obter substâncias padrões, que resultou no isolamento de 13 metabólitos secundários de diversas classes.

ABSTRACT

“STUDY OF THE CHEMICAL PROFILE OF HEALTH AND INFECTED CITROS PLANTS WITH HUANGLONGBING, AIMING INFORMATION ON RESISTENCE MECHANISM”. This paper describes the variation of the chemical profile study of citros after inoculation of the bacterium "Candidatus *Liberibacter asiaticus*", responsible for Huanglongbing (ex greening), one of the most serious diseases causing several losses in the Brazilian citrus industry. The bacterium "Ca. *Liberibacter* " was inoculated in seedlings of the "Valencia" (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grafted on "Swingle" (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*) and was evaluated the change of secondary metabolites by the development of analytical methods such as HPLC-UV, LC-MS/MS, LC-UV-SPE-NMR and chemometric tools. The chemometric methods PCA and S-PLOT applied to data obtained in the studies by LC-MS^E allowed to discriminate infected plants from healthy plants, and also allowed the characterization of the compounds that most contribute to this differentiation. By analyzing the change in the chemical profile of citrus studied by HPLC-UV-SPE-NMR, it was able to detect the change of some coumarins in the roots and stem from rootstock, and glycosides flavonoid in leaves, indicating that these compounds may be involved in defense mechanism of the plant, and may be acting as a Phytoanticipins. Aiming to better interpret this change observed, also performed a quantitative variation of some secondary metabolites, as coumarin identified in the roots, and flavonoids identified in leaves. This technique showed an increase of coumarins in infected plants, while there was a decrease in all the flavonoids in the leaves in infected treatment, indicating that the plant defense is in the roots. Finally, a phytochemical study of citrus was performed aiming obtain patterns compounds, and this study resulted in the isolation of 13 substances, from several classes of secondary metabolites.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Citricultura no Brasil e no mundo	1
1.2	O Huanglongbing (HLB)	1
1.2.1	HISTÓRICO.....	2
1.2.2	O HLB NO BRASIL	3
1.2.3	O AGENTE CAUSAL.....	5
1.2.4	TRANSMISSÃO.....	7
1.2.5	SINTOMAS.....	8
1.2.6	CONTROLE.....	10
1.3	Metabolômica.....	11
1.4	HLPC-UV-SPE-NMR.....	12
1.5	LC-MS ^E e Massas de Alta Resolução	14
1.6	Quimiometria	15
1.6.1	Análise de Componentes Principais.....	17
1.7	Justificativas	17
2	Objetivos	21
3	Procedimento Experimental.....	25
3.1	Materiais.....	25
3.1.1	Suportes usados nos estudos cromatográficos	25
3.1.2	Solvente	25
3.1.3	Colunas.....	26
3.1.4	Reveladores	26

3.1.5	Filtros.....	26
3.1.6	Micropipetas	26
3.2	Equipamentos	27
3.2.1	Evaporadores	27
3.2.2	Balanças Analíticas	27
3.2.3	Câmara de UV	27
3.2.4	Cromatógrafos	27
3.2.5	Purificador de água.....	28
3.2.6	Espectrômetros de Massa.....	28
3.2.7	Ressonância Magnética Nuclear	29
3.2.8	Centrífuga.....	29
3.2.9	Dispersadores / Homogeneizadores	29
3.2.10	Unidade de Extração em Fase Sólida (SPE).....	29
3.2.11	Moinhos.....	29
3.3	Coleta do Material Vegetal	30
3.4	Metodologia utilizada para isolamento de padrões.....	30
3.4.1	Preparação das Amostras.....	30
3.4.2	Fracionamento dos Extratos	31
3.4.2.1	Fracionamento das raízes da variedade Valência	32
3.4.2.2	Fracionamento do caule da copa da variedade Valência.....	33
3.4.2.3	Fracionamento das folhas da variedade Valência.....	34
3.5	Metodologia utilizada para análise da variação do Perfil químico.....	35
3.5.1	Preparação e inoculação das mudas	35
3.5.2	Preparação dos Extratos	37

3.5.3	Avaliação dos perfis químicos via HPLC	39
3.5.4	Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-UV-SPE-NMR	40
3.5.4.1	Análise das folhas, caule da copa e caule do porta enxerto através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR	41
3.5.4.2	Análise das raízes através da técnica LC-UV-SPE-NMR	42
3.5.5	Identificação e Confirmação dos compostos via espectrometria de massas	43
3.5.5.1	Análise dos compostos das raízes do citros via espectrometria de massas	43
3.5.5.2	Análise dos compostos do caule do porta enxerto, caule da copa e folhas do citros via espectrometria de massas	45
3.5.6	Quantificação das cumarinas das raízes de citros via LC-UV	46
3.5.6.1	Preparação das amostras	47
3.5.6.2	Construção da Curva de Calibração	47
3.5.7	Análise semi-quantitativa das cumarinas do caule do porta enxerto de citros via LC-UV	48
3.5.8	Análise semi-quantitativa dos flavonoides das folhas de citros via LC-MS/MS	48
3.5.9	Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-MS ^E ..	50
3.5.10	Aplicação de análises Quimiométricas de dados de LC-MS ^E	53
4	Resultados	57
4.1	Substâncias isoladas	57
4.1.1	Cumarinas	57
4.1.1.1	Identificação da Cumarina C1	58

4.1.1.2	Identificação da Cumarina C2	63
4.1.1.3	Identificação da Cumarina C3	66
4.1.1.4	Identificação da Cumarina 4	71
4.1.1.5	Identificação da Cumarina C5	76
4.1.1.6	Identificação da Cumarina 6	79
4.1.2	Flavonoides.....	82
4.1.2.1	Identificação dos Flavonoides F1 e F2	84
4.1.2.2	Identificação dos Flavonoides F3-F5.....	87
4.1.3	Fito-hormônio.....	93
4.1.3.1	Identificação da Substância FH1	94
4.1.4	Esteróides	99
4.1.4.1	Identificação dos Esteróides E1, E2 e E3.	99
4.2	Separações cromatográficas obtidas dos diferentes extratos de citros por LC-UV.....	102
4.3	Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-UV-SPE-NMR.....	104
4.3.1	Análise das raízes via HPLC-UV-SPE-NMR	105
4.3.1.1	Identificação das bandas R1 à R5	106
4.3.2	Análise do caule do porta enxerto via HPLC-UV-SPE-NMR.....	113
4.3.2.1	Identificação das bandas CI-3 à CI-5.....	114
4.3.3	Análise do caule da copa via HPLC-UV-SPE-NMR.....	117
4.3.4	Análise das folhas via HPLC-UV-SPE-NMR.....	118
4.4	Identificação e confirmação dos compostos via espectrometria de massas	119
4.4.1	Confirmação dos compostos das raízes de <i>citrus</i>	119

4.4.2	Identificação dos compostos isolados do caule do porta enxerto, caule da copa e folhas de citros.....	123
4.4.2.1	Identificação da banda F1	124
4.4.2.2	Identificação da banda F2	126
4.4.2.3	Identificação da banda F3	128
4.4.2.4	Identificação da banda F4	131
4.4.2.5	Identificação da banda F5	133
4.4.2.6	Identificação da banda F6	134
4.4.2.7	Identificação da banda CI-1	137
4.4.2.8	Identificação da banda CI-2	138
4.4.2.9	Identificação da banda CS-2	139
4.5	Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-MS ^E	140
4.5.1	Análise de dados multivariados.....	142
4.5.1.1	Análise de componentes principais.....	142
4.5.1.2	Loadings plot.....	145
4.5.1.3	S-plot.....	146
4.6	Quantificação das cumarinas das raízes de citros via LC-UV.....	164
4.7	Análise semi-quantitativa das cumarinas do caule do porta enxerto de citros via LC-UV	166
4.8	Análise semi-quantitativa dos flavonoides das folhas de citros via LC-MS/MS	168
5	Conclusões e Perspectivas	173
6	Referências Bibliográficas	179

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Citricultura no Brasil e no mundo

O Brasil é um dos países que mais tem destaque no mercado mundial de suco de laranja. O sistema agroindustrial citrícola brasileiro movimentava anualmente R\$ 9 bilhões (UNIVERSOAGRO, 2013; BELASQUE JR, 2009). Cerca de 60% do suco que é consumido no mercado mundial é brasileiro, em particular de laranjas e demais cítricos cultivados em São Paulo. No Estado de São Paulo, a citricultura é a terceira atividade rural mais importante e gera cerca de 250 mil empregos diretos e indiretos. É em São Paulo, com quase 80% de participação na produção nacional, que quase toda a matéria-prima é processada e o suco, exportado (FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO, 2013).

A grande concentração dos pomares ainda se localiza ao norte de São Paulo, mas se estende pelo Triângulo Mineiro. Estados que também têm importante participação na citricultura brasileira são: Bahia (6,0%), Sergipe (4,2%), Paraná (2,8%) e Rio Grande do Sul (1,8%) (IBGE, 2009 e CITRUS BR, 2012).

A citricultura paulista vem sofrendo lentas modificações em função dos preços das frutas que não apresentam paridade com o suco exportado, do avanço da cana de açúcar sobre áreas tradicionalmente citrícolas, além da alta incidência de pragas e doenças. A cada ano a citricultura brasileira, principalmente a paulista sofre grandes prejuízos com as doenças que afetam as diversas variedades de citros. Depois do cancro cítrico, Clorose variegada dos citros e Morte Súbita dos Citros agora existe uma nova doença, o Huanglongbing, também chamado HLB, considerado pelos especialistas como a mais destrutiva e importante doença de citros. (BELASQUE, 2010)

1.2 O Huanglongbing (HLB)

O termo “Huanglongbing” (HLB) referindo-se a doença que ocorre no citros foi oficializado em 1995 durante a 13th IOCV (International Organization of Citrus Virologists), porém popularmente no Brasil, dada a facilidade, tem-se adotado a denominação “greening”. Originária na china, recebe esse nome devido aos primeiros sintomas que ela apresenta (ramos amarelados) sendo denominada então, em chinês, por doença do dragão amarelo (Huang = amarelo, long = ramo, bing = doença) (BOVÉ, 2006) (FIGURA 1.1 A). Já o nome

popularmente conhecido “greening” teve origem a partir de outra característica da doença, onde o fruto exibe o sintoma “falta de coloração” (FIGURA 1.1 B).

O HLB é considerado a pior doença dos citrus no mundo. O controle é difícil, de rápida disseminação e altamente destrutiva para os pomares, causando grandes prejuízos. Todas as espécies comerciais de citros e cultivares são sensíveis ao HLB, independentemente de porta-enxertos, não havendo nenhuma espécie resistente ou tolerante (BOVÉ, 2006). Acredita-se que essa doença está presente nos pomares cítricos da Ásia e África há centenas de anos, uma vez que a produção de laranja nestas áreas data de milênios atrás.

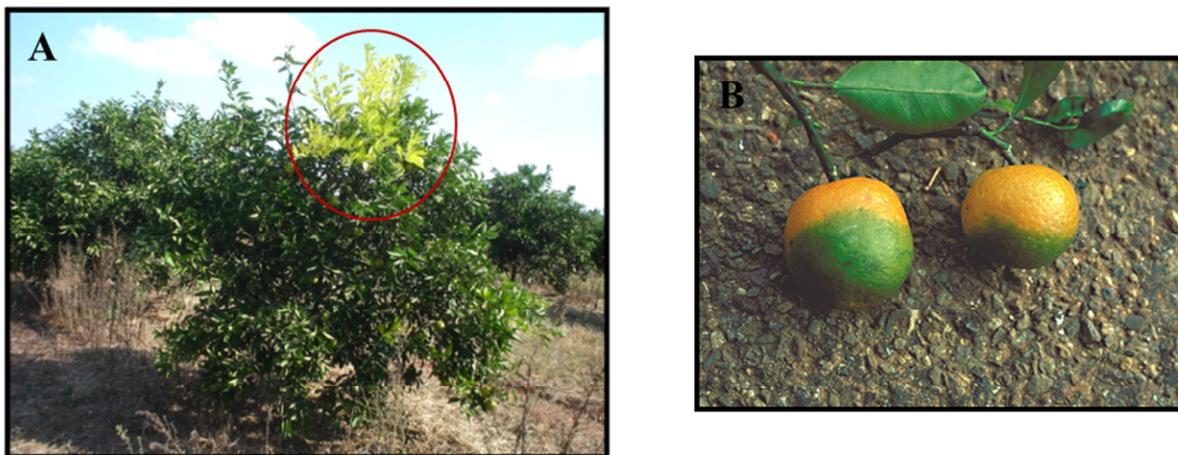


FIGURA 1.1: Características que deram origem ao nome da doença. (A): ramos amarelados que deram origem ao nome HLB; (B): falta de coloração, originando o termo *greening*. Foto do site: American Phytopathological Society (<http://www.apsnet.org>).

O HLB não provoca a morte das plantas, as quais, com o passar dos anos, ficam debilitadas e improdutivas. Observações de plantações afetadas em diferentes regiões citrícolas do mundo, inclusive em São Paulo, revelam que pomares inteiros podem tornar-se inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta sintomática, se medidas de controle não são adotadas. Esse tempo pode ser menor para pomares jovens, de até quatro anos, os quais se tornam economicamente inviáveis em até cinco anos (GOTTWALD, 2007).

1.2.1 HISTÓRICO

No mundo: Os primeiros relatos científicos sobre o HLB foi registrado em 1919, os quais descreveram na China a doença do ramo amarelo (“yellow shoot”) dos citros (GOTTWALD, 2010). A partir deste, outros se sucederam ao

logo do tempo, em vários países dos continentes Asiático e Africano, na Oceania. Apenas recentemente, no início do século 21, a doença chegou ao continente Americano, justamente nos dois principais centros produtores de citros, Brasil (São Paulo) e Estados Unidos (Flórida). Atualmente há ao todo aproximadamente 40 países onde a doença se faz presente (BOVÉ, 2006), como pode ser verificado na FIGURA 1.2.



FIGURA 1.2: Distribuição de HLB no mundo (fonte: Citrusuco).

1.2.2 O HLB NO BRASIL

O primeiro relato de HLB no Brasil data de junho de 2004, onde o Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (IAC) e o Fundecitrus relataram simultaneamente a ocorrência da doença em plantas localizadas próxima ao município de Araraquara, em São Paulo. Porém, relatos de produtores levam a crer que esta doença já estava em nossas culturas há pelo menos 10 anos sem ter-se dado atenção a sua existência. Em 2005 ocorreu a primeira detecção da doença em Minas Gerais e em 2007 no Paraná (COLLETTA FILHO, 2004; TEIXEIRA, 2005). Uma das grandes dificuldades ao lidar com esta doença é a sua rápida disseminação. Estudos científicos comprovam que cada planta

apresentando sintoma da doença infecta outras três saudáveis num período de até três meses. Uma única planta doente pode provocar um grande prejuízo para a plantação toda, pois ao final de um ano (12 meses) uma única planta contaminada pode ter transmitido a doença para mais de 250 plantas.

Para se ter uma ideia do avanço da doença, o primeiro levantamento amostral realizado em março de 2004 apontou a presença do HLB em dois municípios paulistas. Dois anos depois desse primeiro levantamento, esse número já chegava a 126 municípios. Em julho de 2010, já eram 253 em São Paulo, mais 4 em Minas Gerais e 54 no Paraná (FIGURA 1.3). Devido à rápida disseminação, quatro anos após a constatação da presença do HLB no Brasil, através da identificação dos sintomas nas plantas e testes moleculares específicos, foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) uma Instrução Normativa nº 53 (IN53), divulgada no Diário Oficial em 17 de Outubro de 2008. Anteriormente a Instrução Normativa nº 32, determinava a eliminação somente das plantas sintomáticas comprovadamente infectadas, já a IN 53 determina a eliminação das plantas sintomáticas e assintomáticas do mesmo talhão quando a incidência da doença é superior a 28%. Em outras palavras, se o talhão apresentar ao menos 28% das plantas doentes com sintomas, foi provado cientificamente que todas as plantas já estão infectadas (mesmo que muitas ainda não apresentem sintomas), e portanto, todo o talhão deve ser eliminado.

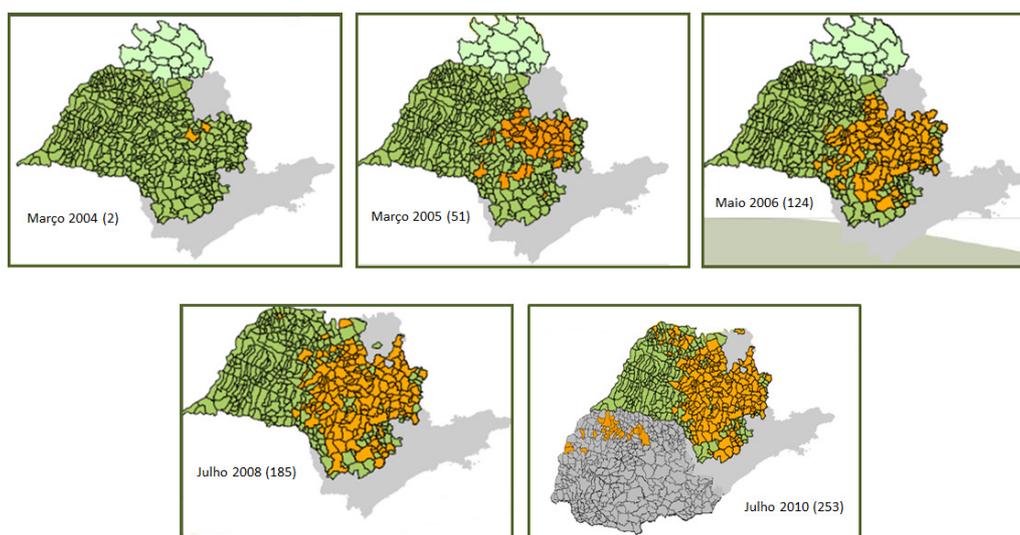


FIGURA 1.3: Evolução de municípios com HLB no estado de São Paulo (Fonte: Fundecitrus)

1.2.3 O AGENTE CAUSAL

Por muitos anos ficou desconhecida a causa da doença, pois acreditou-se que estaera causada por deficiências nutricionais, ou até mesmo falta de água, ao invés de um agente fitopatogênico. Um importante resultado obtido foi o de transmissão da doença por enxertia, em 1956, provando tratar-se de uma doença infecciosa. A partir do momento em se contatou que HLB era transmitido por enxertia e insetos vetores, houve a necessidade de se compreender mais sobre o assunto. Acreditava-se tratar de um vírus, por ser o único organismo conhecido até o momento que pudesse ser transmitido por tais meios, e essa natureza viral foi dada como verdadeira por muitos anos. Porém, em 1970 estudos mais avançados, equipamentos mais modernos e imagens mais precisas permitiram a confirmação de um agente bacteriano através de análises microscópicas de tecido vegetal, em vasos do floema de plantas doentes (LAFLECHE, 1970). Esses mesmos agentes não eram visualizados em floemas de plantas saudáveis. (FIGURA 1.4).

Muito embora o postulado de Koch não tenha sido concluído para o HLB, é consenso que o HLB é causado pela bactéria “*Candidatus Liberibacter*”, a qual é gram-negativa e restrita ao floema (JAGOUEIX, 1994). O nome trivial *Liberibacter* (do latim *liber* = casca e *bacter* = bactéria) foi dado para organismos neste novo subgrupo, enquanto “*Candidatus*” é um termo usado para organismos bem caracterizados, porém não cultivados *in vitro* (MURRAY, 1994).

Até meados de 2004, existiam apenas duas espécies de bactérias causadoras do greening: *Candidatus Liberibacter africanus*, associado à forma africana da doença, e *Candidatus Liberibacter asiaticus* associada à forma asiática. Através do uso de ferramentas da biologia molecular uma nova espécie de *Liberibacter* foi descoberta: “*Candidatus Liberibacter americanus*” (TEIXEIRA, 2005). Nos dias de hoje tem-se conhecimento de um fitoplasma associado com a doença (TEIXEIRA, 2008; CHEN, 2009).

Os nomes das espécies das bactérias estão relacionados ao respectivo continente de origem, porém existem algumas diferenças entre elas, como por exemplo, diferentes tolerâncias a temperaturas. No estado de São Paulo os principais agentes do HLB são “*Ca. L. americanus*” e “*Ca. L. asiaticus*” (BOVÉ, 2006).

Devido aos seus efeitos catastróficos em plantas de citrus, e devido à sua poderosa transmissão, “*Ca Liberibacter ssp.*” tem sido classificada pelo governo dos Estados Unidos como “agentes com potencial para bioterrorismo”. Para se

trabalhar com esses agentes no EUA é necessária a permissão do governo. Essas bactérias também são organismos quarentenários na Europa (BOVÉ, 2006).

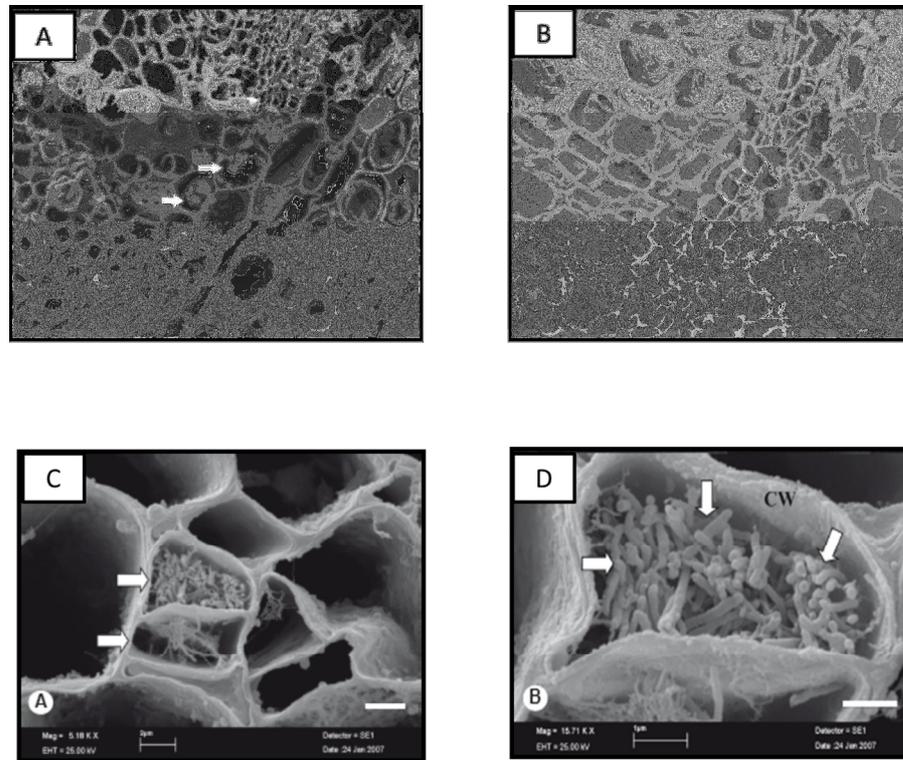


FIGURA 1.4: Micrografia eletrônica de varredura dos vasos de floema na seção transversal de uma folha de vinca (*Catharanthus roseus*) (A) experimentalmente infectados por “*Ca. L. Americanus*”, e (B) planta não infectada. (C) Um dos vasos preenchido pela bactéria (C) (barra = 2 μm), e (D) zoom do vaso em destaque em C, mostrando as células bacterianas dentro do floema (barra = 1 μm). (TANAKA, 2007).

Quando a bactéria penetra na planta, esta se espalha afetando a planta em sua totalidade. Os sintomas na extremidade dos galhos indicam que a bactéria pode estar alojada bem abaixo no tronco e raiz, pois esta encontra-se distribuída irregularmente pela planta. A bactéria no floema impede a condução da seiva elaborada, fazendo com que plantas novas contaminadas não produzam e plantas adultas tornam-se improdutivas em 2 a 5 anos (RIECKMANN, 2008).

Essa bactéria costuma alojar-se em plantas cítricas e em outros hospedeiros, como é o caso da *Murraya paniculata*, uma planta ornamental conhecida como murta, principal hospedeiro natural. Experimentalmente, “*Ca. Liberibacter* sp.” pode ser transmitida para Vinca (*Catharanthus roseus*), para tabaco (*Nicotiana tabacum*), e para uma planta parasitária conhecida como cuscuta (*Cuscuta campestris*) (Erro! Fonte de referência não encontrada.) (GARNEIR & BOVÉ, 1983).

1.2.4 TRANSMISSÃO

A bactéria causadora do greening não é disseminada pelo vento, pela água, instrumentos agrícolas, material contaminado, por contato, etc. A bactéria é transmitida apenas através do inseto vetor, por enxertia de mudas contaminadas, borbulhas e por meio da planta parasita *Cuscuta*. Outra forma de transmissão é por mudas contaminadas, que disseminam a doença a longas distâncias. A principal forma de transmissão é através dos insetos vetores *Triosa erytrae* e *Diaphorina citri* (FIGURA 1.5). O primeiro está associado à forma africana da doença e o segundo à forma asiática e americana (CAPOOR, 1967).

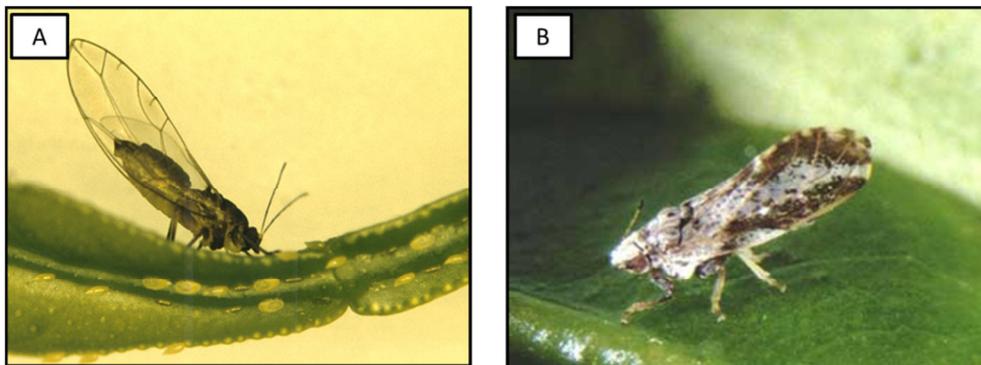


FIGURA 1.5: Vetores do HLB, *Tryosa erytrae* (A) e *Diaphorina citri* (B). (Fonte: Citrus BR).

No Brasil ela é transmitida pelo psíldeo *D. citri*, um inseto de coloração cinza e com manchas escuras nas asas que mede de 2 a 3 mm de comprimento. O inseto se hospeda também em todas as variedades cítricas e na murta. Encontrado nas folhas e ramos com uma inclinação de 45°, o que ajuda no seu reconhecimento. O inseto, devido ao seu metabolismo, só consegue voar a uma distância de 10 metros no máximo por vôo. Há ocorrência do inseto no ano inteiro, mas a sua população é maior durante o período de brotações da planta. *D. citri* é um membro da família Psyllidae que apresenta ciclo de vida curto e alta fertilidade (FIGURA 1.6 A). Os adultos do psíldeo se alimentam das folhas do citros, onde depositam seus ovos e então as ninfas se desenvolvem. O inseto não nasce com a bactéria, este se contamina quando suga plantas doentes e uma vez que adquire a bactéria nunca mais a perde. Como o patógeno é restrito ao floema, assume-se que a alimentação no floema seja essencial para a aquisição e inoculação. (FIGURA 1.6 B). Uma vez infectado, este irá disseminar a doença ao se alimentar novamente, dessa vez de uma planta sadia.

O psílídeo *D. citri* Kuwayama, é referido no Brasil desde 1942, porém mesmo com a presença constante do psílídeo em pomares de São Paulo e de outros estados brasileiros durante todos estes anos, o HLB só foi constatado 62 anos após a referência da ocorrência da praga (AUBERT, 1987).

Sob condições experimentais, ambas as espécies são capazes de transmitir o HLB asiático e africano. Porém, a sensibilidade e tolerância à temperaturas para essas duas espécies de psílídeo, diferem-se para os diferentes tipos de HLB. *D. citri* é tolerante ao calor, enquanto que *T. erytrae* é sensível às altas temperaturas (assim como a bactéria que este carrega, *Ca. L. Africanus*, que é sensível a temperaturas superiores a 25 °C) (BOVÉ, 2006).

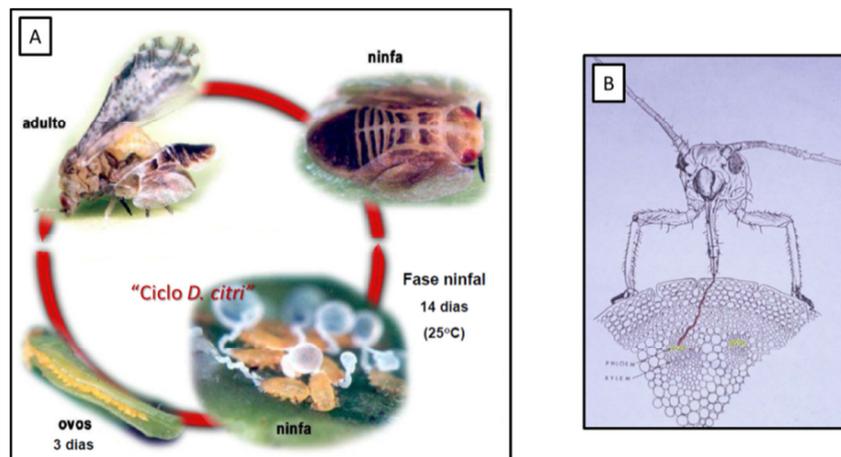


FIGURA 1.6: Ciclo de vida (A) e alimentação (B) da *Diaphorina citri*.

1.2.5 SINTOMAS

Como já mencionado anteriormente, O HLB não provoca de fato a morte da planta. Porém, com o passar dos anos esta se torna debilitada e improdutiva. Os frutos de citros infectados por HLB têm o seu desenvolvimento comprometido e apresentam gosto amargo. As plantas contaminadas produzem cada vez menos frutos, aqueles que se desenvolvem ficam menores, com menor teor de sólidos solúveis, maior acidez titulável, menor índice de maturação (“Ratio”), menor quantidade de suco e menor índice tecnológico (RIECKMANN, 2008). Dessa maneira a planta perde todo seu valor econômico, gerando assim sérios prejuízos aos seus produtores.

O sintoma inicial do HLB aparece, geralmente, em um ramo que se destaca pela presença de folhas de cor amarela em contraste com a coloração verde das folhas dos ramos não afetados (FIGURA 1.1, pág.2). Com a evolução da

doença, há intensa desfolha dos ramos afetados e os sintomas começam a aparecer em outros ramos da planta, tomando toda a copa. As folhas do ramo afetado apresentam forte mosqueamento (manchas de formas irregulares, verde claras ou amareladas, mescladas com o verde normal sem uma nítida divisão entre elas) ou clorose assimétrica (FIGURA 1.7 A). Em plantas novas afetadas pelo HLB, o sintoma se caracteriza pelo amarelecimento generalizado das folhas. Em ramos com sintoma avançado da doença podem surgir novos brotos, com folhas pequenas e de coloração amarelada, sem o mosqueado típico (FIGURA 1.7 B). Em alguns casos, observa-se o engrossamento e clareamento das nervuras da folha, que ficam com aspecto corticoso (FIGURA 1.7 C). Geralmente os sintomas podem ser confundidos com sintomas de deficiências de nutrientes.

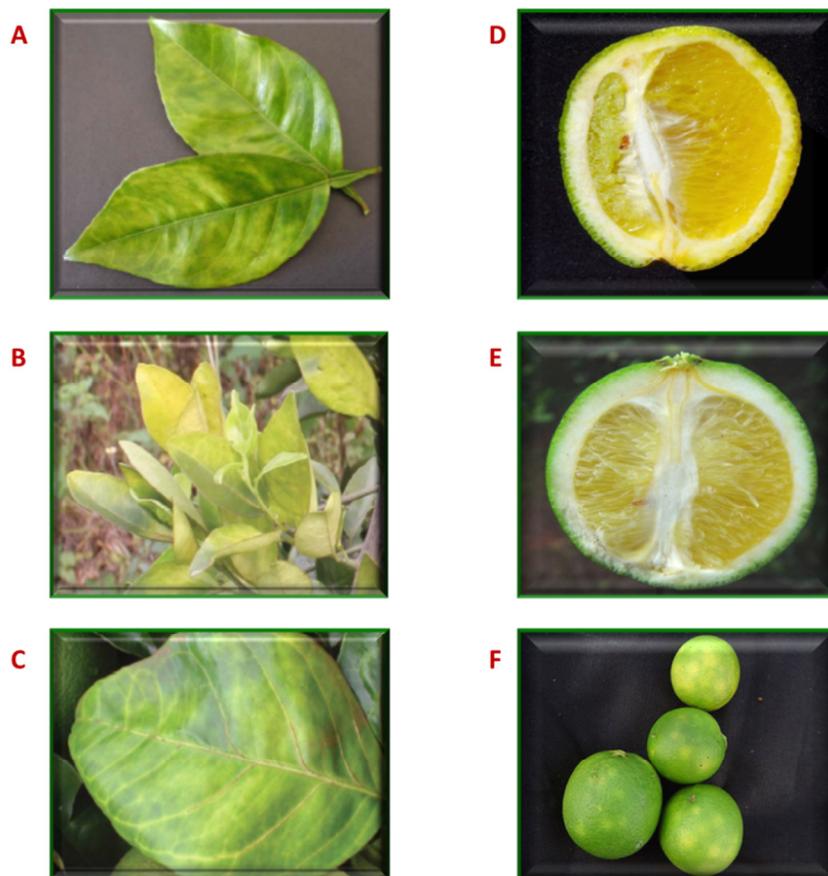


FIGURA 1.7: Principais sintomas nas folhas e nos frutos de citros, provocados pela doença HLB. (A): mosqueamento; (B): amarelecimento nas folhas novas; (C): engrossamento da nervura central; (D): sementes abortadas; (E): engrossamento da casca; (F): manchas amarelas na casca (Fonte Fundecitrus).

Os sintomas mais importantes ocorrem com os frutos, que é o real interesse do produtor. Nos frutos de plantas doentes com HLB pode ocorrer internamente diferença de maturação nas diferentes partes, ou seja, ter um dos lados maduro e o outro ainda verde, além de ficar deformado, pequeno e assimétrico. É comum também a ocorrência de sementes abortadas, que ficam pequenas, mal formadas (FIGURA 1.7 D). Cortando o fruto no sentido longitudinal, é possível verificar internamente que a parte branca da casca, em alguns casos, apresenta uma espessura maior que a de um fruto sadio (FIGURA 1.7 E). Nos frutos afetados podem surgir pequenas manchas circulares amareladas que contrastam com o verde normal do restante do fruto (FIGURA 1.7 F) (FUNDECITRUS, 2008).

1.2.6 CONTROLE

Todos os relatos na literatura apontam para a não existência de fontes de resistência ao HLB nos citros comerciais, dentro do gênero *Citrus* e até mesmo em outros gêneros da família Rutaceae (HALBERT, 2004). Absolutamente não existe um método curativo para o HLB. Tudo que se pode fazer é prevenir. Se instalado, combate-lo através da eliminação constante de fontes de inóculo (plantas doentes), assim como diminuir ao máximo possível a população do vetor, *D. citri*. O manejo da doença é baseado em cinco medidas fundamentais que devem ser adotadas por todos os citricultores de maneira coletiva. Estas medidas são inspeções frequentes de todas as plantas dos pomares, arranquio das árvores contaminadas, controle do vetor baseado no monitoramento de adultos e ninfas, e aquisição de mudas sadias com origem garantida (FUNDECITRUS 2008).

A poda é inútil e perigosa - A bactéria do Greening multiplica-se e é levada para toda a planta por meio do fluxo da seiva, que distribui nutrientes. Experimentos conduzidos com diferentes variedades de copa em diferentes idades e com plantas apresentando vários níveis de sintomas comprovaram que a poda não funciona para o HLB. Ela não cura a planta, a maioria das plantas podadas desenvolveram sintomas da doença entre 4 a 5 meses depois da poda. Além de não curar a planta, as brotações que surgem após a poda servem como fonte para novas infecções (FUNDECITRUS 2009).

1.3 Metabolômica

Metabolômica é o estudo do perfil metabólico total de um dado sistema (célula, tecido, organismo) sob um dado conjunto de condições. A análise do metaboloma é particularmente difícil devido à diversidade química dos metabólitos, com as mais diferentes propriedades. Metabólitos são consequência da interação do genoma do sistema com o seu meio ambiente, e não são meramente o produto final da expressão do gene. A metabolômica tem sua origem nos primeiros estudos de perfil metabólito, porém atualmente é uma área em rápida expansão de pesquisa científica. Metabolômica foi rotulada como uma das novas "ômica", juntando-se à genômica, transcriptômica e proteômica (ROCHFORD, 2005).

Análises metabolômicas têm sido classificadas como “alvo” ou “não alvo” (do inglês “target” e “untarget”) (FIGURA 1.8). Análises “alvos” destinam-se a um grupo específico de metabólitos de interesse, com o propósito na maioria dos casos de identificar e quantificar o maior número de metabólitos dentro dessa classe (RAMAUTAR, 2006). Análises “alvo” são importantes para avaliar o comportamento de um grupo específico de compostos na amostra nas condições determinadas. Metabolômica “alvo” normalmente exige maior nível de purificação e também uma metodologia de extração de metabólitos mais seletiva. Em contraste, a metabolômica “não alvo” destina-se à detecção de metabólitos de classes mais diversas possíveis, para obter padrões ou impressões digitais, sem a necessidade de identificação ou quantificação de um composto específico (MONTON, 2007).

Baseando-se no objetivo específico da análise e na manipulação de dados, a maioria dos estudos metabolômicos também podem ser classificados como discriminativo, informativo ou preditivo.

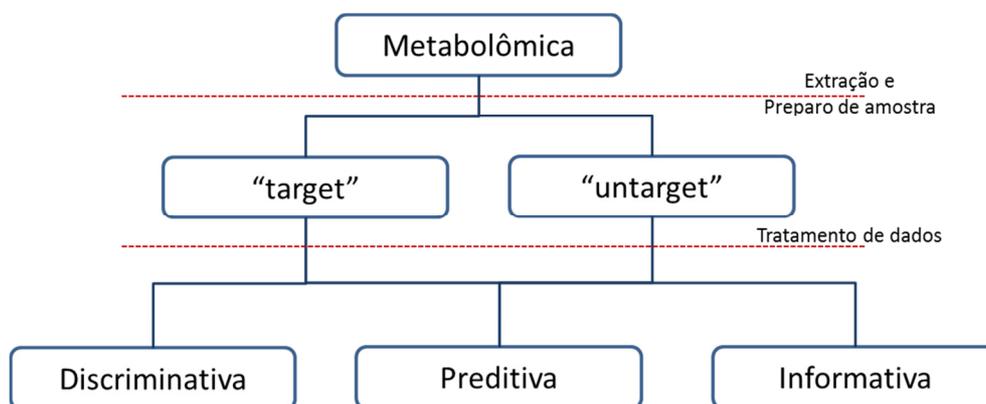


FIGURA 1.8: Classificação geral de Metabolômica (adaptado de CEVALLOS-CEVALLOS, 2009).

Análises **discriminativas** são destinadas a encontrar diferenças entre populações de amostras sem necessariamente criar modelos estatísticos ou avaliar possíveis caminhos que possam elucidar tais diferenças. Essas análises são geralmente obtidas através da utilização de análise multivariada de dados, técnicas destinadas a maximizar a classificação. Em contraste, as análises metabolômicas **informativas** concentraram-se na identificação e quantificação de metabólitos “alvos” ou “não alvos” para obter informações intrínsecas da amostra. Possíveis rotas metabólicas, descoberta de novos compostos bioativos, descoberta de marcadores, e criação de bancos de dados específicos também podem ser obtidos fazendo-se uso de análises metabolômicas informativas. Por fim, existe também o tipo de análise metabolômica **preditiva**. Neste caso, modelos estatísticos baseados no perfil metabólito e na sua abundância são criados para prever uma variável que é difícil de quantificar por outros meios (CEVALLOS-CEVALLOS, 2009).

Análises metabolômicas exigem uma seqüência de etapas, incluindo a preparação de amostras, extração de metabólitos, separação e detecção destes, e tratamento de dados. No entanto, nem todas as etapas são sempre necessárias. Somente a detecção e a análise de dados são realmente passos essenciais em todos os estudos metabolômicos relatados. A escolha das etapas depende do tipo de estudo (“alvo” ou “não alvo”), o tipo de amostra, a instrumentação a ser usada na separação (como por exemplo, GC ou LC) e método de detecção (MS ou NMR, por exemplo) (CEVALLOS-CEVALLOS, 2009).

Técnicas como espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR, do inglês “Nuclear Magnetic Resonance”) e Espectrometria de Massas (MS, do inglês “Mass Spectrometry”) são as ferramentas analíticas usadas com maior frequência em análises metabolômicas, embora outras técnicas analíticas também sejam aplicadas (ROCHFORT, 2005). A análise dos dados de metabolômica é em grande parte realizada por diversas ferramentas de quimiometria. (NICHOLSON, 1999)

1.4 HLPC-UV-SPE-NMR

Durante as duas últimas décadas, uma atenção considerável tem sido voltada para o desenvolvimento de separações à base de LC combinados a NMR. NMR é uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas, uma vez que este é capaz de fornecer grande quantidade de informação estrutural de uma molécula, por ser uma técnica não destrutiva, e poder ser usada para

quantificação. Entretanto, essa técnica é menos sensível, requerendo grande quantidade de amostra, quando comparada à técnica de Espectrometria de Massas, por exemplo. Porém esta menor sensibilidade está sendo sanada com o uso de altos campos magnéticos, criosondas e hiperpolarização.

Geralmente utilizam-se duas técnicas diferentes de interfaceamento entre HPLC e NMR: o modo de “fluxo contínuo” (do inglês “on flow”) e o modo de “fluxo interrompido” (do inglês “stoped flow”) (KLAUS, 1999).

No primeiro modo, de “fluxo contínuo”, a amostra é transferida para a sonda de NMR durante a separação cromatográfica (continuamente, enquanto a separação cromatográfica está em andamento) e o espectro é então adquirido. No segundo modo, de “fluxo interrompido”, quando a banda de interesse adentra a sonda de NMR, a corrida cromatográfica é pausada para a aquisição dos espectros de interesse. Entretanto, a principal desvantagem do modo “fluxo contínuo” é o pequeno tempo de análise disponível, sendo permitida a aquisição de espectros de NMR com poucos scans, somente de ^1H . Já no modo “fluxo interrompido”, como a corrida cromatográfica é interrompida, a banda cromatográfica pode permanecer dentro da sonda de NMR por tempo indeterminado, sendo possível obter espectros com maior número de pulsos e também experimentos bidimensionais. A desvantagem dessa técnica é que, como a corrida cromatográfica é interrompida, pode haver alargamento das demais bandas da amostra, dificultando a análises dos compostos posteriores (KLAUS, 2002).

Para solucionar os problemas citados acima, têm-se desenvolvido o acoplamento envolvendo o HPLC, com a técnica “loop storage” e também a extração em fase sólida (SPE, do inglês “Solid Phase Extraction”), onde nestes arranjos as diferentes bandas cromatográficas são “trapeadas” ou “aprisionadas”, para análise posterior.

Na técnica denominada “loop storage” (armazenamento em loop) os compostos de interesse são aprisionadas em “loops”, separadamente e durante a corrida e, somente após o final da separação cromatográfica é que são transferidas para o NMR. Dessa maneira elimina-se o problema de alargamento de bandas.

Um procedimento mais sofisticado é a técnica de SPE (extração em fase sólida), onde as bandas são aprisionadas em cartuchos de SPE. A principal vantagem dessa técnica é a possibilidade de acúmulo das substâncias até a saturação dos cartuchos, em repetidas corridas cromatográficas, aumentando significativamente sua concentração e a sensibilidade da técnica. Outra vantagem é que a corrida cromatográfica pode ser realizada com qualquer composição de

fase móvel, não havendo a necessidade do uso de solventes deuterados, uma vez que somente na transferência dos analitos traçados dos cartuchos para o magneto é que se utiliza solventes deuterados (EXARCHOU, 2005).

Todos os modos de hifenação aqui mencionados, assim como o tipo de espectro possível de ser obtido com cada método, podem ser visualizados na FIGURA 1.9. Essa figura ilustra não somente o número de compostos que podem ser analisados por corrida, mas também a qualidade de cada espectro em cada diferente método.

O aumento da sensibilidade da técnica também foi possível devido ao desenvolvimento de sondas criogênicas, eliminando dessa maneira o ruído térmico dos experimentos e melhorando assim a sensibilidade do experimento. Dessa maneira surge a técnica de LC-UV-SPE-NMR, tornando-se bastante utilizada atualmente.

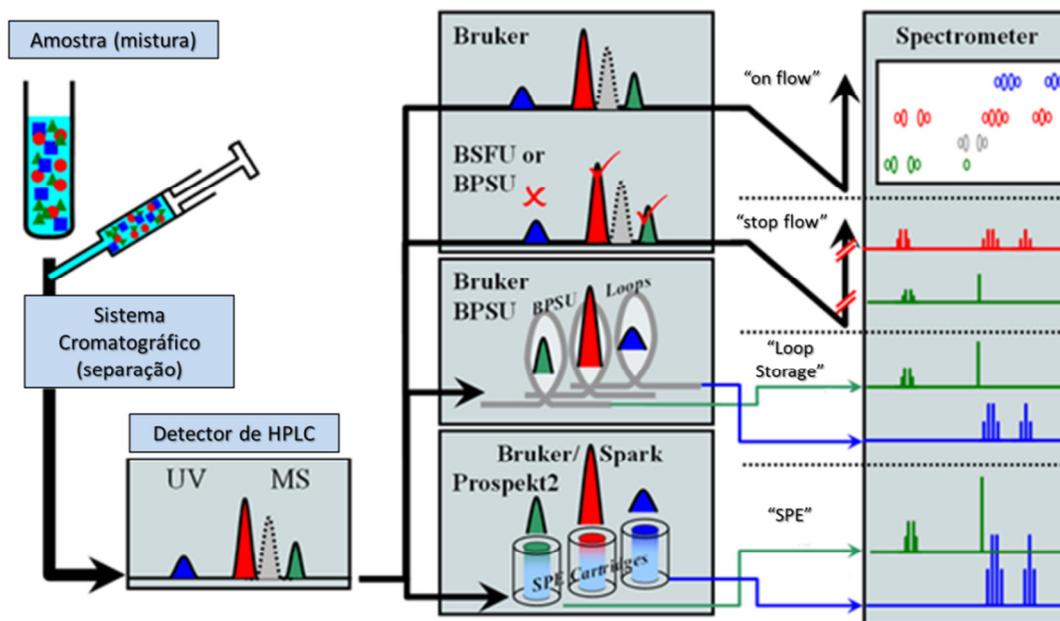


FIGURA 1.9: Esquema dos diferentes tipos de acoplamento entre HPLC-NMR, e seus respectivos espectros (<http://www.bruker.com/products/mr/nmr>).

1.5 LC-MS^E e Massas de Alta Resolução

A Espectrometria de Massas é uma técnica de altíssima sensibilidade. O modo de aquisição do tipo MS^E tem mostrado uma estratégia fundamental para estudos de metabolômica. Esse modo de aquisição permite que se extraia do experimento, em uma única corrida, tanto a massa exata de cada composto detectável, assim como também seus respectivos fragmentos. Esse modo de

aquisição MS^E registra dados sem discriminação ou seleção, e dessa maneira tem-se uma amostra muito bem explorada em uma única análise. Esse método alterna rapidamente entre duas funções. A primeira adquire dados utilizando baixas energias, obtendo assim um espectro do íon molecular precursor de massa exata. A segunda função adquire dados utilizando energias mais elevadas, obtendo dessa maneira espectro dos íons fragmentos, também com massa exata (ARCHER, 2013; WATERS, sem informação de data).

O aumento de resolução e exatidão de massa medida tem se tornado uma ferramenta dominante para a caracterização estrutural em diversas aplicações, além de descoberta mais rápida de novos fármacos. A principal vantagem e característica para a espectrometria de massas de alta resolução é a identificação ou confirmação das fórmulas moleculares de novos compostos. Nestes experimentos, as medições de alta resolução são utilizadas para determinar com precisão a massa do íon molecular e, a partir desta informação, atribuir uma fórmula molecular inequívoca (RUSSELL, 1997). Trabalhando-se com massas de alta resolução, os diferentes átomos podem ser identificados, pois os pesos atômicos monoisotópicos não são números inteiros exatos, sendo o $^{12}\text{C} = 12,00000000$, então $^1\text{H} = 1,007825035$, $^{14}\text{N} = 14,00307400$, e $^{16}\text{O} = 15,99491463$. Dessa maneira, cada isótopo tem um único e característico “defeito de massa”, e a massa do íon, o qual mostra o defeito de massa total, identifica sua composição isotópica e elementar.

Essa alta resolução é possível através de analisadores do tipo TOF (time of flight), FT-ICR (Fourier transform ion cyclotron resonance), e orbitraps, por exemplo. Além de alta resolução, estes equipamentos costumam ser também ainda mais sensíveis, quando comparados a outros equipamentos do gênero. Os analisadores híbridos Quadrupolo-Time-Of-Flight (QTof), estão substituindo outras tecnologias LC-MS. O desenvolvimento de equipamentos híbridos teve início no final da década de 1970 e visava combinar diferentes características de desempenho oferecidas pelos vários tipos de analisadores em um único espectrômetro de massas (CASS, 2011).

1.6 Quimiometria

Uma das características mais interessantes dos modernos instrumentos é o número de variáveis que podem ser medidas em uma única amostra. De posse de tal quantidade de dados, a necessidade de ferramentas novas e mais sofisticadas para trata-los e extrair informações relevantes cresceu muito

rapidamente, dando origem à quimiometria, que é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada.

A Quimiometria não é uma disciplina da matemática, mas sim da química, isto é, os problemas que ela se propõe a resolver são de interesse e originado na química, ainda que as ferramentas de trabalho provenham principalmente da matemática, estatística e computação (FERREIRA, 1999).

A Quimiometria foi definida por KOWALSKI (1991), um dos pioneiros na área: “... uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos”.

Assim, ao se unir a Quimiometria e técnicas analíticas modernas consegue-se classificar amostras em categorias ou grupos conforme suas semelhanças, ou ainda identificar variáveis que apresentem propriedades particulares para as amostras de interesse.

Ao analisar quimiometricamente um conjunto de dados, organiza-se estes dados experimentais obtidos em uma matriz. Dessa forma, os cromatogramas de íon totais obtidos das diferentes partes de citros foram transformados em dados numéricos e organizados como deveriam em uma matriz de dados, onde os experimentos ou amostras correspondem às linhas e as variáveis dos experimentos correspondem às colunas. Dessa maneira, a extração de informações dos resultados de um experimento químico envolve a análise de grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno número destas variáveis contém as informações químicas mais relevantes, enquanto que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos. A decisão sobre quais variáveis são importantes é feita, geralmente, com base na intuição química ou na experiência, ou seja, baseado em critérios que são mais subjetivos que objetivos. A redução de variáveis através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística, pode ser conseguida através da análise de componentes principais (PCA, do inglês “Principal Component Analysis”). Também é possível construir agrupamentos entre as amostras de acordo com suas similaridades, utilizando todas as variáveis disponíveis, e representá-los de maneira bidimensional através de um dendrograma, através da técnica de análise de agrupamento hierárquico (HCA, do inglês “Hierarchical Cluster Analysis”). A análise de componentes principais e de agrupamento hierárquico são técnicas de estatística multivariada

complementares de destaque e que têm grande aceitação na análise de dados químicos (MOITA NETO, 1998).

1.6.1 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais é classificada como exploratória ou não supervisionada, visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração (CORREIA, 2007). A análise exploratória é utilizada primeiramente para fazer uma avaliação inicial dos dados e revelar quais amostras são semelhantes ou diferentes entre si através da visualização de agrupamentos (BRERETON, 2002).

Dentre as diferentes técnicas quimiométricas exploratórias descritas na literatura, a escolhida para este trabalho foi a análise de componentes principais (PCA). A PCA permite a visualização gráfica de todo o conjunto de dados, mesmo quando o número de amostras e variáveis é elevado, e tem como objetivo principal aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou a ausência de agrupamentos naturais entre as amostras (CORREIA, 2007).

Os dados obtidos através de alguma técnica analítica são organizados numa matriz de variáveis independentes, onde cada linha dessa matriz representa uma amostra, e cada coluna representa uma variável. A análise de componentes principais consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. O objetivo principal é expressar as principais informações contidas nas variáveis em um menor número de variáveis possíveis, descrevendo as principais variações da matriz de dados.

1.7 Justificativas

Nas áreas de biologia e química de microrganismos, principalmente de produtos naturais, os trabalhos visando entender e manipular as interações de plantas com sua microbiota associada vem adquirindo cada vez mais atenção e importância. Neste contexto as fitopatogenias são responsáveis por grandes prejuízos anuais na agricultura, principalmente no que se remete a comercialização de citros, uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas e conseqüentemente acometido por diversas doenças em seus laranjais. Como já foi mencionado neste capítulo, o HLB é considerado como a doença mais

destrutiva de citros no mundo, devido à severidade dos sintomas, a queda de produção de frutos, aos elevados custos de inseticidas, o potencial de progressão da doença e por afetar todas as variedades comerciais de citros (AYRES, 2006). Trata-se também de uma doença que não tem cura, e que está trazendo sérios prejuízos à citricultura mundial, principalmente à paulista. Dessa forma, fazem-se necessários estudos que tragam uma melhor compreensão das interações envolvidas entre citros com os seus respectivos fitopatógenos. Conhecer as substâncias que estariam variando quantitativa ou qualitativamente entre a planta sadia e infectada poderá mostrar qual ou quais constituintes estão envolvidos no mecanismo de defesa da planta. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho é o de desenvolver metodologias analíticas que possibilitem estudar essa patogenia de citros, proporcionando assim o combate ao desenvolvimento dessa doença.

Objetivos

2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver ferramentas analíticas que possibilite avaliar a variação do perfil químico entre exemplares doentes e sadios da laranja Valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) enxertadas em “Swingle” (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), para a busca de uma possível resposta química, possibilitando assim a busca de metabólitos que possam combater a doença.

Os objetivos Gerais foram:

- Determinar a variação de perfil químico de *Citrus* sadios e doentes;
- Busca de futuros inibidores frente ao desenvolvimento da doença.

Para alcançar os objetivos gerais mencionados, os objetivos específicos foram:

- Desenvolver métodos analíticos (HPLC-UV-MS/MS e HPLC-UV-SPE-NMR) para o estudo desse perfil químico;
- Analisar os metabólitos secundários envolvidos na interação entre patógeno x hospedeiro;
- Identificar as substâncias do metabolismo secundário das plantas que estariam envolvidas no mecanismo de defesa das espécies de *Citrus* frente à bactéria “*Ca. Liberibacter*”.

Procedimento Experimental

3 Procedimento Experimental

Os procedimentos químicos, como a preparação dos extratos vegetais, isolamento e identificação das substâncias, e estudos analíticos da variação do perfil químico foram realizados no laboratório de pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

A preparação das mudas utilizadas neste trabalho, assim como as devidas inoculações e análises de PCR, foram realizadas no Centro de Citricultura do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizado no município de Cordeirópolis-SP.

3.1 Materiais

3.1.1 Suportes usados nos estudos cromatográficos

- Sílica gel 60 (70-230 mesh e 230-400 mesh) da Merck, para cromatografia por adsorção em coluna aberta;
- Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB), para cromatografia por exclusão em coluna aberta;
- Sílica gel 60 F254, usando folhas de alumínio com 0,2mm de diâmetro (Merck), para cromatografia em camada delgada analítica.

3.1.2 Solvente

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

3.1.3 Colunas

Colunas para HPLC:

- Coluna polimérica Shodex GS-310 2G – Asahipak (45,0 x 2,5cm; partículas de 5 μ m);
- Coluna Gemini C18 Phenomenex (250 x 4,60mm, partículas de 10 μ m) e (25,0 x 2,1 cm, partículas de 10 μ m);
- ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, com partículas de 5 μ m, da marca Agilent, acoplado com uma coluna de segurança C18 (4x3 mm)

Coluna para GC:

- coluna RTx®-5ms, L=30m, DI- 0,25 mm e file = 0,25 μ m, da marca Restek, de sílica fundida.

Colunas de vidro para coluna de bancada de diversos tamanhos e alturas.

3.1.4 Reveladores

Os reveladores empregados em CCDA foram:

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

3.1.5 Filtros

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

3.1.6 Micropipetas

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

3.2 Equipamentos

3.2.1 Evaporadores

- Evaporador de solvente a vácuo (SPEEDVAC) da Savant Speedvac Plus SC 10 A acoplado com um refrigerador Vapor Trap RVT-400 Savant, bomba a vácuo Savant VLP-200 e registrador Digital Vacuum Gauge DVG 50 Savant.

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 B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°.

3.2.2 Balanças Analíticas

- Sartorius modelo BP210S
- Bel Engineering modelo Mark 210A
- Shimadzu Corporation modelo AUW220D

3.2.3 Câmara de UV

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

3.2.4 Cromatógrafos

Cromatógrafos Líquidos de Alta Eficiência:

- Shimadzu Corporation, modelo SCL-10Avp com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, bomba Shimadzu LC-6AD, detector UV-Visível SPD-10AVvp, modo analítico e preparativo.
- Shimadzu Corporation, modelo LC-6AD, detector UV-Visível SPD-6AV, Injeção manual, modo analítico e preparativo.
- Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Amostrador automático G1329A, e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B, forno de

coluna G1316A. Software utilizado para processamento dos dados: EZCrom Ellite;

- Agilent 1200 acoplado ao NMR, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Amostrador automático G1329A e detector de ultravioleta G1314B, forno de coluna G1316A. Software utilizado para processamento dos dados: HyStar v. 3.2 (Bruker BioSpin GmbH);
- Agilent Technologies 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, degaseificador interno no módulo da bomba, amostrador automático G1329B e detector de ultravioleta G1314B, forno de coluna G1316A. Software utilizado para processamento dos dados: EZCrom Ellite – Open Lab;
- Agilent 1260 acoplado ao espectrômetro de massas, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, injetor automático G1367B e detector de arranjo de diodos (DAD) G1315D, forno de coluna G1316A. Software utilizado para processamento dos dados: Analyst 1.5.1;
- Acquity UPLC I-Class (Waters Technologies).

Cromatógrafo Gasoso:

- Shimadzu GC-17A. Software utilizado para processamento dos dados: GCMS *Real Time Analysis*;

3.2.5 Purificador de água

- Ultrapurificadores de Água Master System MS2000 (Gehaka);

3.2.6 Espectrômetros de Massa

- GC-MS Shimadzu QP 5000, equipado com coluna RTx®-5ms, L=30m, DI-0,25 mm e file = 0,25 µm. Fonte de ionização por impacto eletrônico.
- API 2000 (APPLIED BIOSYSTEMS). Fonte de ionização: ESI e APCI. Analisador “triplo quadrupolo”.
- Synapt G2-S (Waters Technologies). Fonte de ionização ESI. Analisador híbrido Q-TOF (Quadropole - Time of Fligth).

3.2.7 Ressonância Magnética Nuclear

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

3.2.8 Centrífuga

- Centrífuga marca Eppendorf modelo 5810R com sistema de refrigeração

3.2.9 Dispersadores / Homogeneizadores

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

3.2.10 Unidade de Extração em Fase Sólida (SPE)

- Bruker/Spark Prospect II unit (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany; Spark, Emmen, The Netherlands) para aprisionar automaticamente as bandas cromatográficas, para a concentração dos analitos. Os cartuchos de SPE empregados foram do tipo HySphere C-18 end capped sílica (2mm i.d., 10 μm)

3.2.11 Moinhos

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

3.3 Coleta do Material Vegetal

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas duas coletas de material vegetal. A primeira coleta foi realizada na Fazenda da Citrusuco, localizada no município de Matão em São Paulo, em novembro de 2009. Nesta visita foi coletada a variedade “Valência” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) enxertadas em “Swingle” (*Citrus paradisi* X *Poncirus trifoliata*). Tratava-se de planta adulta (7 anos), plantada no campo, que seria erradicada, pois havia sido diagnosticada com sintomas de HLB. Essa planta foi utilizada neste trabalho na etapa de identificação de padrões.

A segunda coleta foi realizada no Centro de Citricultura do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizado no município de Cordeirópolis-SP, em janeiro de 2012. A planta coletada foi a “Valência” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) enxertadas em “Swingle” (*Citrus paradisi* X *Poncirus trifoliata*), mudas sadias e infectadas com HLB, com 2 anos de idade. Essas mudas foram utilizadas neste trabalho na etapa de avaliação da variação do perfil químico de citrus na presença do HLB. Por questões de praticidade, essas mudas serão denominadas nessa tese como “citros Valência” apenas.

3.4 Metodologia utilizada para isolamento de padrões

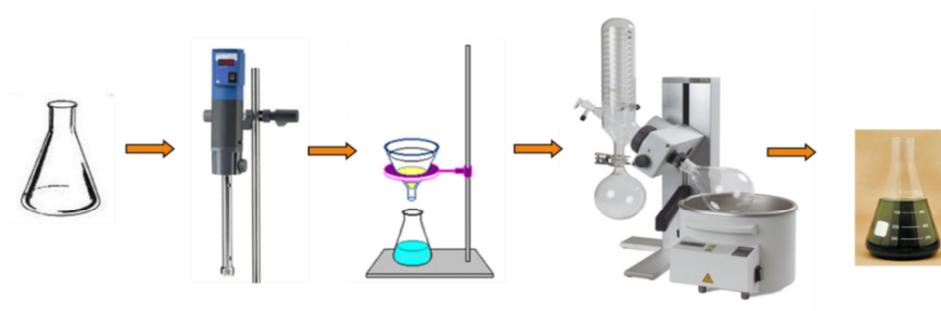
3.4.1 Preparação das Amostras

Primeiramente as plantas (tanto as sadias quanto as infectadas) foram separadas em raiz, caule inferior (caule referente ao porta enxerto ou “cavalo”), caule superior (caule referente à copa) e folhas. Estas foram secas em estufa de circulação a 40°C durante aproximadamente 5 dias e posteriormente trituradas em moinho de facas (FLUXOGRAMA 3.1). O material seco foi em seguida submetido a extrações a frio com o auxílio de um homogeneizador/dispersor (10.000 rpm durante 90 segundos), utilizando-se como solvente o etanol.



FLUXOGRAMA 3.1: Preparação do material vegetal referentes às mudas do IAC-Cordeirópolis.

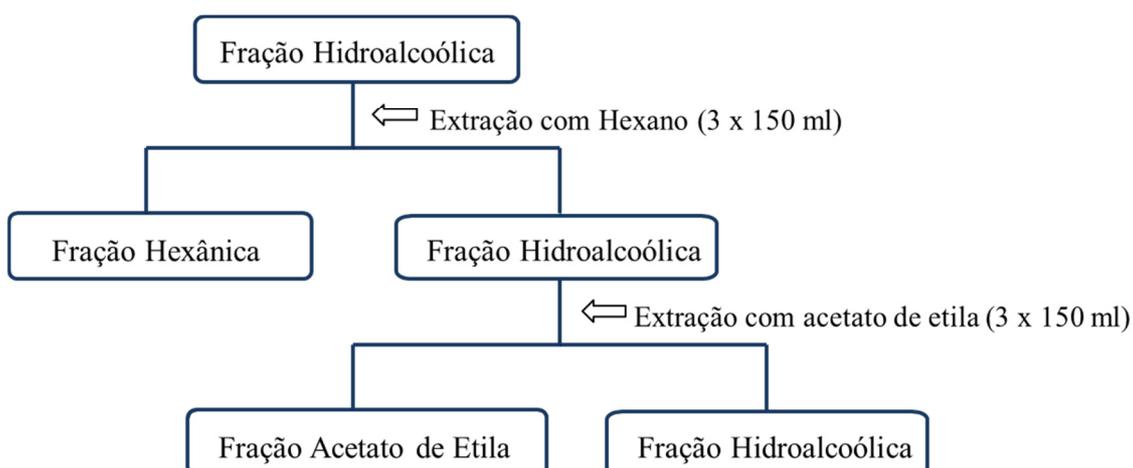
O sobrenadante foi então filtrado, em papel de filtro comum, e ao adicionava-se mais solvente. Esse último processo foi repetido algumas vezes, a fim de extrair ao máximo os compostos presentes. Por fim, os extratos foram concentrados à vácuo em evaporador rotativo (FLUXOGRAMA 3.2), e armazenados à temperatura ambiente em recipientes fechados.



FLUXOGRAMA 3.2: Metodologia de extração das amostras referentes às mudas do IAC-Cordeirópolis.

3.4.2 Fracionamento dos Extratos

Inicialmente os extratos etanólicos das diferentes partes da espécie estudada foram fracionados, separadamente, através de uma partição líquido-líquido. Para isso, o extrato etanólico seco foi ressuspensionado em MeOH:H₂O (1:3), em um volume total de 400 ml. A partição foi realizada de acordo com o FLUXOGRAMA 3.3.



FLUXOGRAMA 3.3: partição líquido-líquido dos extratos etanólicos.

3.4.2.1 Fracionamento das raízes da variedade Valência

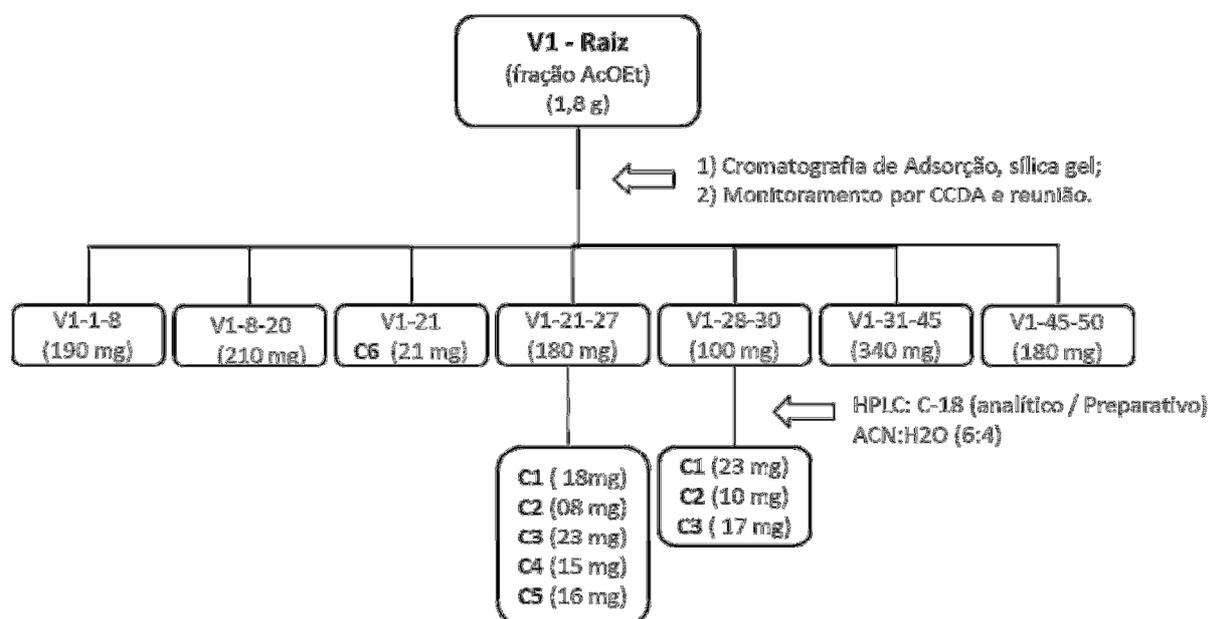
Primeiramente a fração acetato de etila das raízes foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 Mesh), com gradiente de eluição hexano/diclorometano/acetato de etila/metanol. As frações foram coletadas e monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), sendo reunidas aquelas com os mesmos fatores de retenção (RF, do inglês “Retention Factor”) (FLUXOGRAMA 3.4). As frações V1-22-27 e V1-28-30 permitiram a identificação de algumas cumarinas em mistura. Para a purificação dessas frações, recorreu-se à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), utilizando uma coluna C-18 (250 x 4,60 mm, 10 µm), empacotada no laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química da UFSCar. A corrida cromatográfica foi realizada no modo isocrático de eluição usando H₂O:ACN (2:3) como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min. O acompanhamento cromatográfico foi feito com detector de UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

Após confirmação de separação das bandas de interesse, esse método foi transferido para o modo preparativo, utilizando uma coluna de mesma fase, C-18 (250 x 21 mm, 10 µm), também empacotada no laboratório de Síntese Orgânica e CLAE. O fator escalonamento pôde ser calculado através da razão entre o volume da coluna preparativa e o volume da coluna analítica (equação 1). O escalonamento de colunas analíticas e preparativas pode ser realizado de maneira confiável e reprodutível (CASS, 2001).

$$S = \frac{R_p^2 \times L_p}{R_a^2 \times L_a} \quad (1)$$

Onde S é o fator de escalonamento, R_p e R_a os diâmetros das colunas e L_p e L_a os comprimentos das colunas preparativas e analíticas, respectivamente. Para a cromatografia em escala preparativa foi utilizada uma coluna com a mesma fase estacionária da separação analítica, diferenciando-se desta pelo tamanho. O valor S foi multiplicado pela vazão utilizada no sistema analítico (no caso, 1 mL/min). Para a purificação das bandas cromatográficas o volume de injeção utilizado foi de 500 µl, e as frações foram solubilizadas com o mesmo solvente utilizado na fase móvel, de maneira que a concentração final se aproximasse de 15 mg de extrato por injeção. Essa metodologia foi aplicada para ambas frações, sendo igualmente eficiente. Dessa maneira foi possível

isolar em grande quantidade as cumarinas C1, C2, C3, C4 e C5 (FIGURA 3.1), cuja identificação pode ser verificada mais adiante no item 4.1.1.



FLUXOGRAMA 3.4: Estudo da fração AcOEt das Raízes do citros estudado.

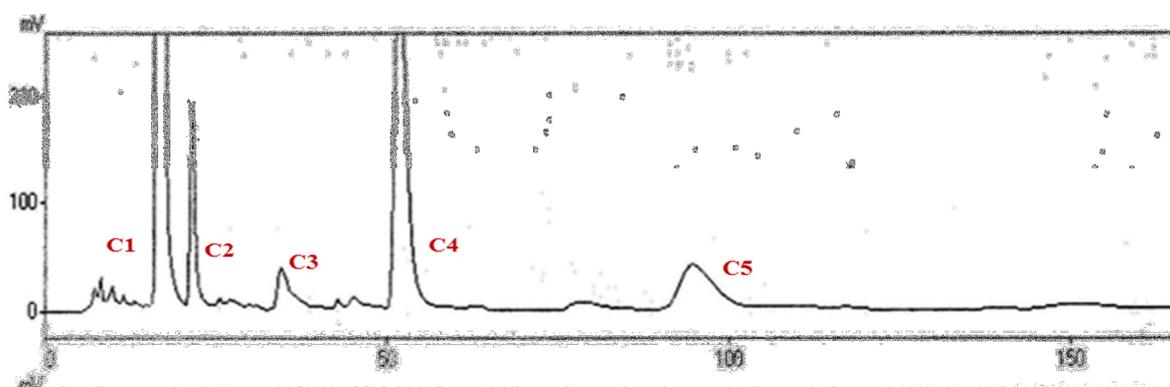
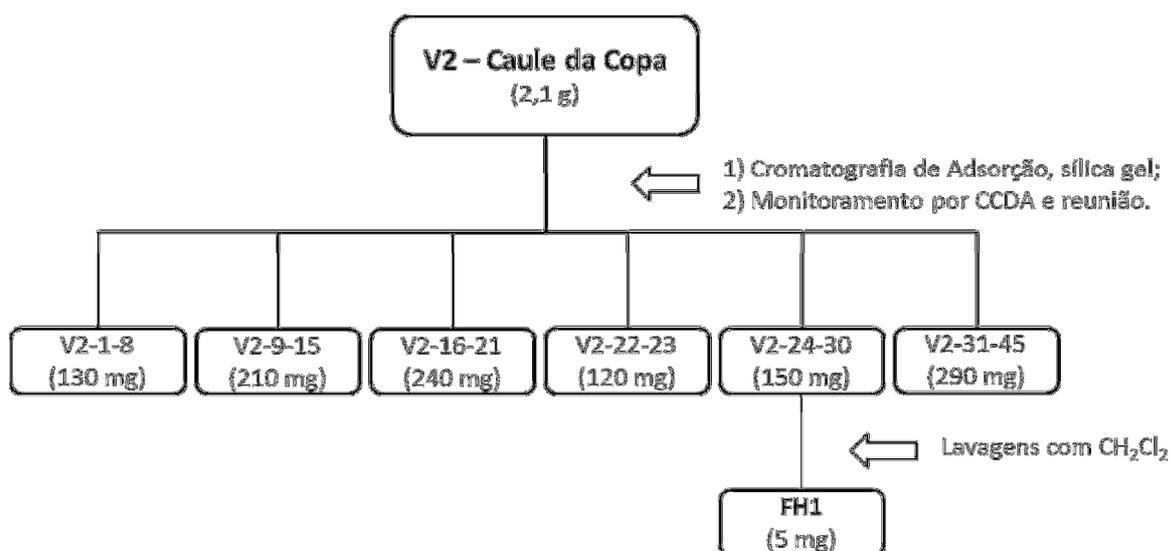


FIGURA 3.1: Cromatograma da sub-fração C1-22-27, obtido por HPLC preparativo.

3.4.2.2 Fracionamento do caule da copa da variedade Valência

Para o fracionamento do extrato etanólico do caule superior, utilizou-se cromatografia de adsorção em coluna, tendo-se como fase estacionária sílica gel 230-400 mesh e modo gradiente de eluição, utilizando como fase móvel os solventes n-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Utilizou-se o extrato etanólico bruto. O FLUXOGRAMA 3.5 mostra como este estudo foi

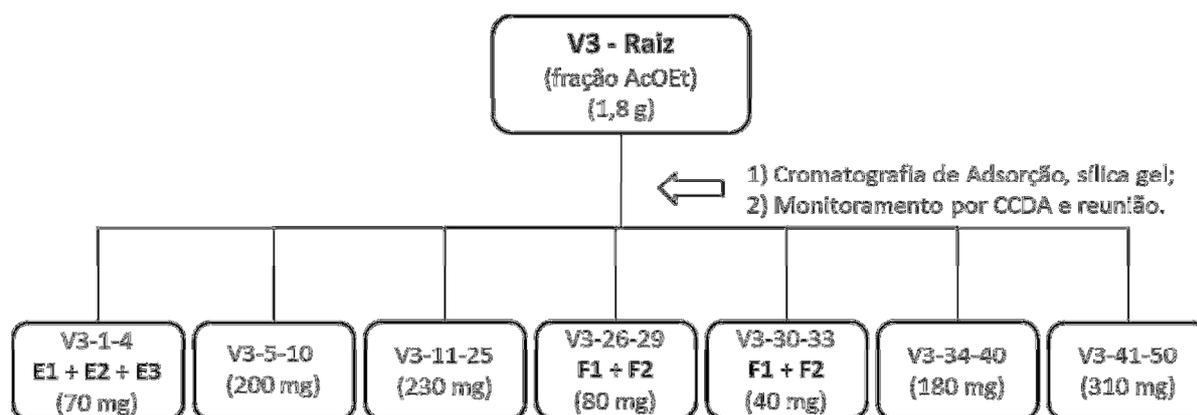
realizado. Foram coletadas frações que, após analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foram reunidas de acordo com seus RFs. O estudo da fração V2-16-18 permitiu o isolamento da substância **FH 1**. A substância foi purificada por sucessivas lavagens da fração com diclorometano, filtrando-se com algodão, até eliminação total da coloração, restando apenas um sólido branco. Sua identificação pode ser encontrada no item 4.1.3.1.



FLUXOGRAMA 3.5: Fracionamento do extrato etanólico do caule superior do citros estudado.

3.4.2.3 Fracionamento das folhas da variedade Valência

Para o fracionamento da fração acetato de etila das folhas utilizou-se cromatografia de adsorção em coluna, tendo-se como fase estacionária sílica gel 230-400 mesh e modo gradiente de eluição, utilizando como fase móvel, os solventes n-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. O FLUXOGRAMA 3.6 mostra como este estudo foi realizado. Foram coletadas frações que, após analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foram reunidas segundo seus RFs. As frações V3-26-29 e V3-30-33 possibilitaram a identificação em mistura das substâncias **F1** e **F2**. A fração V3-26-29 era majoritária em F2, enquanto em V3-30-33 foi a F1, e a determinação de suas estruturas foram discutidas no item 4.1.2.1. A fração V3-34-40, foi submetida à análises por LC-UV-SPE-NMR (FIGURA 3.2). Essa técnica permitiu o isolamento de 4 substâncias (representadas pelas 4 bandas em destaque na FIGURA 3.2), discutidas no item 4.1.2.2.



FLUXOGRAMA 3.6: Estudo da fração AcOEt das Folhas do citros estudado.

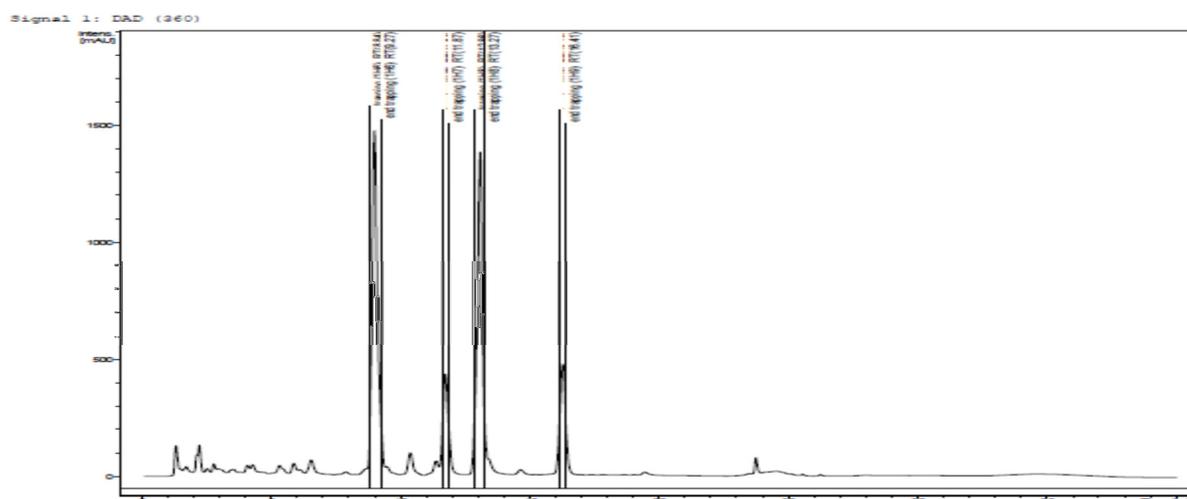


FIGURA 3.2: Separação via HPLC-UV-SPE-NMR da fração V3-34-40 do extrato das folhas do citros estudado.

3.5 Metodologia utilizada para análise da variação do Perfil químico

3.5.1 Preparação e inoculação das mudas

A fim de avaliar a variação na composição química de citrus com HLB através das técnicas já mencionadas, foi montado um experimento de um conjunto de mudas, incluindo tanto espécimes sadios quanto inoculados com a bactéria. O conjunto consistiu de mudas de laranja Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas sobre citrumeleiro Swingle [*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. A escolha da copa e do porta-enxerto foi feita com

base na elevada importância comercial dessa combinação em escala mundial e crescente utilização por citricultores brasileiros [POMPEU JÚNIOR, 2008]. A estufa que abrigou as mudas utilizadas neste trabalho situa-se no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo (IAC), localizado no município de Cordeirópolis-SP. Esse experimento foi montado para um trabalho de mestrado da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (VENÂNCIO, 2010), onde exemplares foram fornecidos (três mudas de cada tipo tratamento) para o desenvolvimento deste presente trabalho.

Metade das mudas foi conservada sadia, enquanto as outras sofreram a inoculação artificial da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* pelo processo de enxertia de borbulha. Essa variedade da bactéria foi escolhida por ser o tipo predominante atualmente nos pomares paulistas, e também por não ser sensível a altas temperaturas, ao contrário do que ocorre com as *africanus* e *americanus* [GRAÇA, 1991; PARRA, 2010]. A FIGURA 3.3 mostra os tipos de borbulhas e o procedimento utilizados para transmissão da infecção. Essas borbulhas são cortadas a partir da porção entre as gemas do caule da planta infectada (FIGURA 3.3 A), e são utilizadas principalmente para fins de inoculação. Usando uma faca bem afiada, um corte é feito no caule com um movimento contínuo e suave. A borbulha deve ser retirada cuidadosamente do caule. Um corte em “T” é então feito no caule da planta a ser inoculada (FIGURA 3.3 B). A porção superior desse corte é aberta e o inóculo (borbulha) é então inserido, sendo este um excelente tecido para inoculação (FIGURA 3.3 C). Após a inserção, os inóculos são fixados ao caule da planta inoculada por envolvimento com filme plástico (FIGURA 3.3 E). Essa fita deve ser mantida esticada e apertada. Após duas a três semanas, a fita plástica é removida (FIGURA 3.3 F), e a confirmação da infecção se dá por análises de PCR.

Outro procedimento adotado durante a fase de preparação das mudas foi a poda, efetuada anteriormente à inoculação. A poda visa estimular um novo fluxo vegetativo com novas brotações, favorecendo a manifestação dos sintomas. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e receberam tratamento idêntico ao longo de todo o experimento no que diz respeito a temperatura, irrigação, adubação, podas e outros procedimentos de manejo. Além disso, essa condição garantiu que as plantas não inoculadas permanecessem sadias ao longo de todo o experimento, uma vez que não tiveram contato com o psilídeo *Diaphorina citri*.

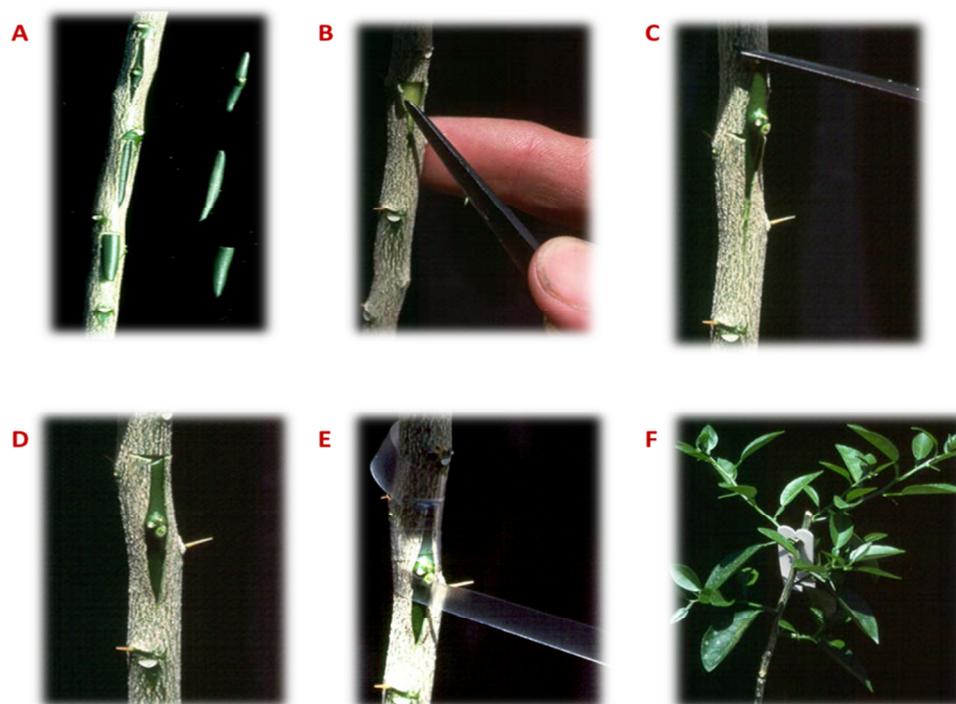


FIGURA 3.3 - Inoculação via processo de enxertia de borbulhas (Fonte: “Food and Agriculture Organization of the United Nations”: www.fao.org).

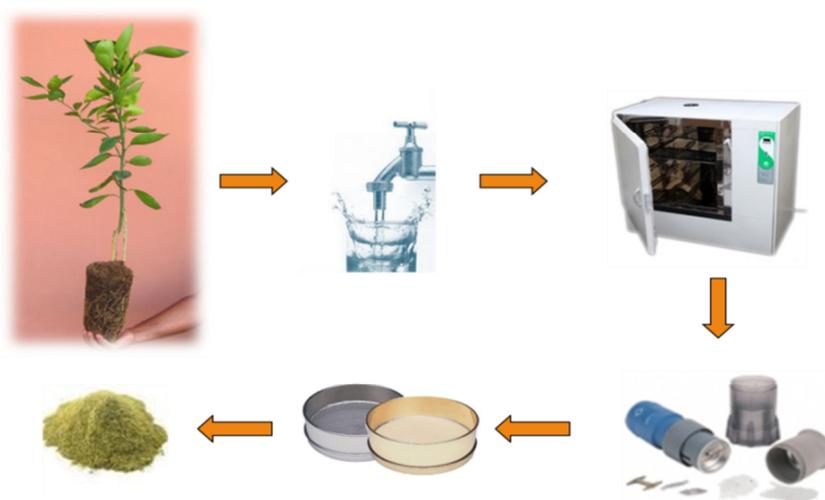
3.5.2 Preparação dos Extratos

A primeira etapa em uma análise metabolômica de plantas é geralmente a preparação da amostra. Para esta parte do trabalho, cujo objetivo é o estudo da variação do perfil químico das plantas nos diferentes tratamentos, foram utilizadas as mudas coletadas no Centro de Citricultura Sylvio Moreira (IAC – Cordeirópolis), como mencionado anteriormente no item 3.5.1.

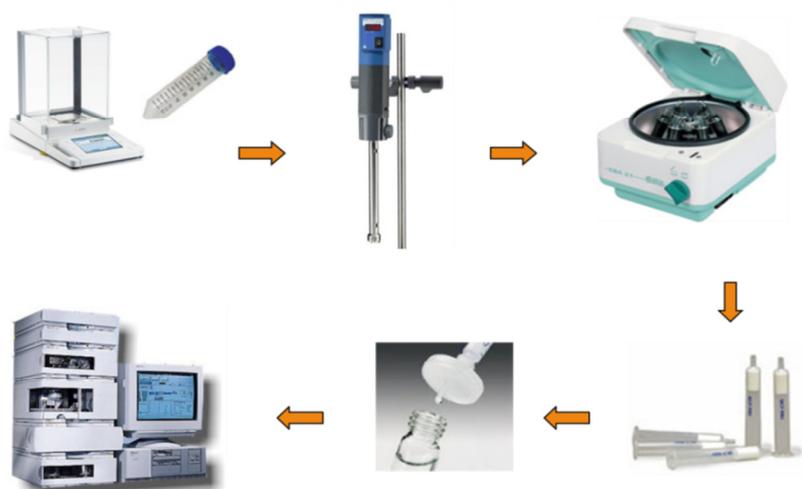
Foram transportadas para o Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos três mudas saudáveis e três mudas infectadas com HLB, onde foram então trabalhadas. Primeiramente as plantas foram separadas em raiz, caule inferior (caule do porta enxerto ou “cavalo”), caule superior (caule da copa) e folhas. Estas foram secas em estufa de circulação a 37°C durante aproximadamente 5 dias, com exceção das folhas, e posteriormente trituradas em moinho analítico. O material moído foi peneirado em peneira molecular, a fim de se homogeneizar o tamanho de partícula e minimizar dessa maneira erros experimentais. Esse material seco foi estocado em temperatura ambiente (FLUXOGRAMA 3.7). As folhas foram trabalhadas à fresco, como mencionado acima. Estas foram congeladas à -80 °C, e então moídas no moinho com auxílio

de Nitrogênio líquido. Em seguida foram acondicionadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde foram estocadas até o momento de sua utilização.

Para a extração, pesou-se 50 mg do material já moído, transferiu-se para um tubo falcon e adicionou-se 2 mL de uma mistura de solvente contendo MeOH:H₂O (1:1). Este foi em seguida submetido a extrações com o auxílio de um homogeneizador/dispersor (Turax), à 6000 rpm/min, durante 90 segundos. A fim de maximizar o número e também a quantidade de metabólitos extraídos da matriz de interesse, além de reduzir o tempo de extração, métodos de rompimento celular como o dispersor mencionado acima tem sido bastante utilizado.



FLUXOGRAMA 3.7: Preparação do material vegetal referentes às mudas do IAC-Cordeirópolis.



FLUXOGRAMA 3.8: Metodologia de extração das amostras referentes às mudas do IAC-Cordeirópolis.

Trabalhos na literatura também sugerem melhores resultados fazendo-se uso de extratos hidrofílicos para a análise de metabólitos discriminatórios, justificando-se assim a escolha do solvente (CEVALLOS-CEVALLOS, 2009) (MAGNANI 2007). Após a extração em turrax, o material foi centrifugado à temperatura de 25 °C por 10 minutos à 10000 rpm. O sobrenadante foi então filtrado, em filtro de seringa (PTFE MILLIPORE; 0,45µm poro; Ø = 13 mm), e ao precipitado foi adicionado mais 2 ml da mesma proporção de solvente, repetindo-se por mais uma vez o processo mencionado. O sobrenadante foi por fim seco em evaporador de solvente à vácuo (SpeedVac) e ressuspendido em 2 ml de MeOH:H₂O para posterior análise cromatográfica em HPLC (ver análises em 3.5.3) (FLUXOGRAMA 3.8).

3.5.3 Avaliação dos perfis químicos via HPLC

Para se avaliar possíveis diferenças no perfil químico de mudas de citros sadias e infectadas com HLB, procurou-se obter cromatogramas “fingerprint” (do inglês, “impressão digital”). Para tal, houve a necessidade de se obter cromatogramas que fossem representativos, apresentando boa separação entre os picos, em um intervalo de análise de tempo razoável, e principalmente que fosse reprodutível. Nesse trabalho, foram feitas extrações em triplicatas de cada parte vegetal e comparou-se visualmente a repetibilidade de injeção através da sobreposição das bandas cromatográficas e dos tempos de retenção.

Nesse trabalho, foram feitas extrações em triplicatas de cada parte vegetal e comparou-se visualmente a repetibilidade de injeção através da sobreposição das bandas cromatográficas e dos tempos de retenção. Para a análise da variação do perfil químico de *Citrus* utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Agilent 1260 (equipamento descrito no item 4.2.4). As análises foram realizadas no modo reverso e gradiente de eluição, utilizando H₂O (sistema A) (acidificada com 0,1 % de ácido acético) e ACN (sistema B) e MeOH (sistema C) como fase orgânica. As condições cromatográficas utilizadas podem ser verificada na TABELA 3.1. Entre as corridas foi utilizado um tempo para reequilibrar a coluna. Normalmente utiliza-se um volume de fase móvel de 5 a 10 vezes o volume interno da coluna. Caso esse intervalo não seja observado, podem ocorrer modificações nos tempos de retenção e separação das bandas cromatográficas em análises subsequentes (SNYDER, 1997).

O detector utilizado foi UV de comprimento de onda variável, sendo as corridas monitoradas em 260 nm, por ser este valor universal e por se tratar de

um estudo metabolômico “não alvo”, não se sabendo quais os compostos de interesse, assim como suas respectivas características. A quantidade de amostra injetada foi de 15 µl e a vazão foi de 1,0 ml/min. A coluna utilizada para todas as separações cromatográficas foi a ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, com partículas de 5µm, da marca Agilent. Foi usada uma coluna de segurança ligada à entrada principal, sendo esta do tipo C18 (4x3 mm), também da Agilent.

TABELA 3.1: Condições cromatográficas utilizadas durante análises de HPLC (linha A: H₂O; linha B: ACN; linha C: MeOH).

Tempo (min)	Linha A (%)	Linha B (%)	Linha C (%)
0	90	5	5
30	10	45	45
35	0	50	50
40	0	50	50

3.5.4 Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-UV-SPE-NMR

Essa parte do trabalho discute sobre diferenças do perfil metabólito de plantas infectadas com HLB e sadias, através de técnicas de HPLC. Essa ideia baseia-se na hipótese de que, mudanças no perfil metabólito devido à infecção por HLB podem ser observadas e identificadas, a fim de se determinar os principais compostos que estão sendo produzidos ou consumidos, tanto na planta sadia quanto na planta infectada pela bactéria. A identificação desses compostos permitirá entender o comportamento químico da planta frente à bactéria.

GLAUSER e colaboradores (2008) obtiveram sucesso ao usar HPLC acoplado à técnica de RMN como uma ferramenta para análise metabolômica com o objetivo de detectar marcadores de stress em extratos de plantas. Entretanto, nenhum trabalho foi realizado até o momento para avaliar os efeitos do HLB no metabolismo dos citrus utilizando a técnica de HPLC-UV-SPE-NMR.

3.5.4.1 Análise das folhas, caule da copa e caule do porta enxerto através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR

A análise cromatográfica foi executada no cromatógrafo da Agilent Technologies modelo 1200 descrito no item 3.2.4. A coluna utilizada foi a ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, com partículas de 5 μ m, da marca Agilent, acoplado com uma coluna de segurança C18 (4x3 mm), também da Agilent.

Para o preparo da amostra pesou-se 100 mg de material seco, adicionou-se 4,0 mL de uma solução de MeOH:H₂O (1:1), triturou-se e extraiu-se os metabólitos utilizando-se um ultraturrax (90 segundos, 6000 rpm) e centrifugou (10000 rpm por 5 minutos). Filtrou-se o sobrenadante em filtros de seringa (PTFE; 0,45 μ m poro; \varnothing = 13 mm). Repetiu-se o procedimento de extração por mais uma vez. Esse procedimento foi realizado em quintuplicata, a fim de se obter um extrato em alta concentração. Secou-se o produto de extração num equipamento SpeedVac, que foi ressuspensionado no menor volume possível de solução MeOH:H₂O (1:1). Esse material foi então reunido e levado novamente ao speedVac para secagem. Dessa vez o material foi ressuspensionado em 2 ml de solução de metanol:água (1:1), o qual foi analisado por HPLC-UV-SPE-NMR. Esta amostra encontrava-se em uma concentração aproximada de 15 mg/mL. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas do item 3.5.3. A quantidade de amostra injetada foi de 15 μ L, o fluxo foi de 1,0 mL/min, e os cromatogramas foram monitorados nos comprimentos de onda de 200-600 nm.

Os cartuchos utilizados para trapear as bandas de interesse foram cartuchos de SPE de uso geral, cuja fase é de polidivinil benzeno. Estes foram condicionados com ACN e equilibrados com água. Antes de serem trapeadas, o fluxo de saída da coluna foi combinado com um fluxo de água (deionizada) três vezes maior, com o objetivo de diminuir a força da fase móvel para melhorar a retenção dos compostos nos cartuchos de SPE, usando uma bomba Knauer K100 (Berlin, Germany) (FIGURA 3.4). Foram realizadas aproximadamente 30 corridas em sequência, todas com as mesmas condições estabelecidas nesta metodologia. As moléculas em análise foram aprisionadas usando para a seleção dos mesmos o modo “threshold” em 260 nm, para indicar o início e final de cada banda a ser aprisionada. Ao final das corridas cromatográficas, os cartuchos foram secos com fluxo de nitrogênio por aproximadamente 30 minutos, e o material adsorvido foi eluído com 250 μ L de metanol deuterado e transferidos para tubos de NMR de 3mm. O equipamento de HPLC foi controlado pelo

software HYSTAR v. 3.2 (Bruker BioSpin GmbH), que foi usado tanto para a aquisição dos dados quanto para os respectivos processamentos.

As amostras eluídas foram analisadas no equipamento de RMN da Bruker Advance III, de 600 MHz, descrito no item 3.2.7. Os espectros foram obtidos utilizando sequências de pulsos com supressão do sinal do solvente e do sinal da água residual. A maioria dos espectros foram adquiridos pela acumulação de 128 varreduras.

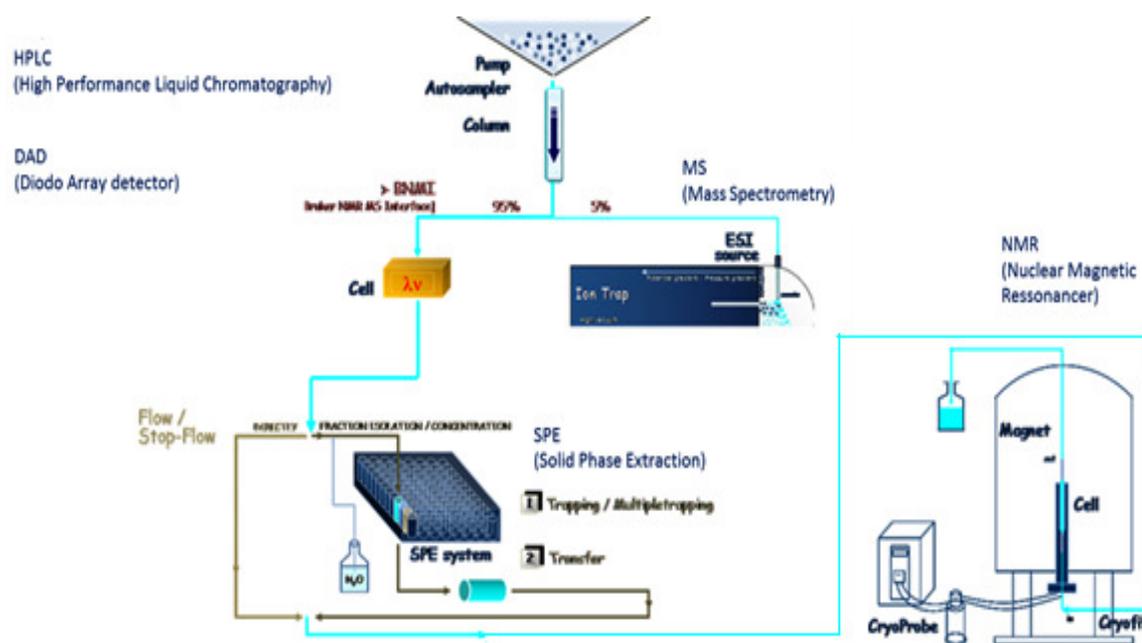


FIGURA 3.4: Esquema da técnica LC-UV-SPE-NMR (<http://sermn.uab.cat/2012/03/hplc-dad-spe-nmrms-ii-fundamentals-and-working-modes>).

3.5.4.2 Análise das raízes através da técnica LC-UV-SPE-NMR

O procedimento utilizado para a análise das raízes através desta técnica foi o mesmo utilizado no item anterior, exceto pela rampa cromatográfica, uma vez que as bandas mais significativas das raízes apresentaram tempo de retenção maiores. Esse fato sugere tratar-se de compostos de média polaridade e, portanto, a força da fase móvel foi alterada para se obter melhores resultados. A corrida também foi realizada no modo reverso de eluição, onde a TABELA 3.2 resume a rampa utilizada (as duas últimas linhas da tabela refere-se ao recondicionamento da coluna). Todo o restante da metodologia foi o mesmo do item 3.5.4.1.

TABELA 3.2: Condições cromatográficas utilizadas durante análises das raízes de citrus via técnica de LC-UV-SPE-NMR (linha A: H₂O; linha B: ACN; linha C: MeOH).

Tempo (min)	Linha A (%)	Linha B (%)	Linha C (%)
0	60	20	20
25	0	50	50
30	0	50	50
33	60	20	20
50	60	20	20

3.5.5 Identificação e Confirmação dos compostos via espectrometria de massas

Todos os compostos isolados no item anterior tiveram suas respectivas massas moleculares confirmadas através da técnica de espectrometria de massas, utilizando para isso o Espectrômetro de Massa da Applied Biosystems® modelo API 2000, descrito no item 3.2.6.

Os compostos isolados das raízes foram analisados utilizando a técnica acoplada LC-MS, selecionando o experimento de *full scan*. Optou-se por trabalhar com a técnica acoplada para este órgão para fins de aprendizado. Já os compostos dos demais órgãos (caule inferior, caule superior e folhas) foram analisados através da técnica de inserção direta, dos compostos previamente isolados na técnica de LC-UV-SPE-NMR. Para essas análises, os experimentos utilizados foram do tipo *full scan*, “íons produtos” e “íons precursores”, e foram fundamentais na identificação de algumas das estruturas

3.5.5.1 Análise dos compostos das raízes do citros via espectrometria de massas

Para a análise das raízes, fez-se uso da técnica LC-MS, como já mencionado anteriormente. O equipamento utilizado para as análises do extrato das raízes de citrus sadias e infectadas com HLB consistiu de um HPLC da Agilent Technologies, modelo 1260 (especificado no item 3.2.4) acoplado a um espectrômetro de massa da Applied Biosystems modelo APITM 2000 (especificado no item 3.2.6). O equipamento apresentava uma fonte de ionização do tipo ESI (TurboIonSpray®) e analisador do tipo triplo-quadrupolo.

Os parâmetros utilizados para a espectrometria de massas foram ajustados através da técnica de inserção direta de padrões, isolados previamente neste presente trabalho. Para a otimização das condições experimentais no espectrômetro de massas foram avaliados parâmetros dependentes do analito, como os potenciais de desagrupamento (DP), de focalização (FP), de entrada (EP) e voltagem do TurboIonSpray® (IS). Quando necessário, otimizou-se também energias para experimentos do tipo MS/MS, como energias do gás de colisão (CAD), energia de colisão (CE) e potenciais de entrada da célula (CEP) e de saída da célula (CXP). As condições utilizadas podem ser verificadas na TABELA 3.3. Também foram avaliados parâmetros dependentes da fonte, como os gases de cortina (CUR), nebulizador (GS1), de aquecimento (GS2) e temperatura da fonte (TEM). Para os parâmetros DP, FP e EP foi utilizado um recurso do software que possibilita a otimização automática destes, para cada parâmetro individualmente, fazendo uma varredura completa dentro de uma faixa de energia determinada. As energias foram selecionadas para aquelas onde o sinal de interesse fosse o mais intenso possível. Para os demais parâmetros a calibração foi realizada manualmente.

O experimento utilizado na espectrometria de massa foi o experimento de *full scan*, varrendo uma faixa de 200 a 600 Da. A fonte de ionização operou no modo positivo, devido às características químicas das moléculas esperadas.

TABELA 3.3: Parâmetros espectrométricos utilizados na obtenção dos espectros de massas dos compostos das raízes.

Parâmetros da Fonte		Parâmetros da Amostra	
CUR	20	DP	110
IS	4500	FP	300
GS1	10	EP	9
GS2	10		
TEM	100		

A amostra a ser analisada foi preparada diluindo a amostra utilizada na análise de HPLC-UV-SPE-NMR (item 3.5.4.1) para uma concentração de 500 µg/mL, e a alça de amostragem foi de 15 µL. A fase móvel utilizada foi acidificada com ácido acético (0,1%) a fim de auxiliar a ionização dos analitos de interesse. Os parâmetros cromatográficos já haviam sido ajustados e foram os

mesmos daqueles utilizados no item 3.5.4.2. A vazão utilizada foi de 1 mL/min, porém utilizou-se um divisor de fluxo para ajustar o volume de amostra na entrada do espectrômetro de massas, ajustada na proporção 2:1 (descarte: MS).

3.5.5.2 Análise dos compostos do caule do porta enxerto, caule da copa e folhas do citros via espectrometria de massas

Para a análise das folhas, caule superior e inferior dos citros via espectrometria de massas, foi utilizada a técnica de inserção direta. Antes de iniciar o estudo de identificação das bandas cromatográficas isoladas, foram analisados alguns padrões comerciais de flavonoides, para se ajustar os parâmetros a serem utilizados. Optou-se por calibrar as energias com alguns flavonoides, pois através de dados da literatura e também das informações obtidas através dos respectivos espectros de RMN, suspeitava-se tratar dessa classe de compostos.

Os parâmetros avaliados foram os mesmos do item anterior (item 3.5.5.1). Esses parâmetros foram calibrados através da técnica de inserção direta de soluções de flavonoides comerciais nas concentrações de 1-10 µg/mL, com uma seringa (Ø: 4,6 mm) num fluxo de 10 µL/min. A posição horizontal e vertical da sonda do TurboIonSpray[®] era de 0 e 2, respectivamente.

Os espectros de massas foram obtidos utilizando os parâmetros espectrométricos da tabela TABELA 3.4. Os espectros foram obtidos no modo de aquisição *full scan* (Q1 MS), varrendo massas de 100 a 800 Da. A partir desses espectros foram construídos espectros de íons produtos (MS²) e de íons precursores, quando necessário, para devida confirmação da procedência do íon.

As amostras analisadas foram exatamente àquelas isoladas na técnica de HPLC-UV-SPE-NMR, já descrita no item 3.5.4.1. Após as bandas de interesse de um determinado extrato serem aprisionadas em cartucho de SPE, estas eram posteriormente analisadas via RMN, e eram então transferidas para um frasco de Eppendorf (2 mL) para secagem. Após secas, pesava-se sua massa, ressuspensava-se em MeOH:H₂O (1:1) com solvente grau massas, e diluía-se até as concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL, iniciando-se sempre as análises pela menor concentração possível.

TABELA 3.4: Parâmetros espectrométricos utilizados na obtenção dos espectros de massas dos compostos das folhas. F1: Vicenina; F2: Diosmetina; F3: Não Identificado; F4: Didymina; F5 Diosmina; F6: Hesperidina.

F1		F2		F3	
Parâmetros Fonte		Parâmetros Fonte		Parâmetros Fonte	
CUR	30	CUR	30	CUR	30
IS	-4500	IS	-4500	IS	-4500
GS1	20	GS1	20	GS1	50
GS2	40	GS2	40	GS2	50
TEM	0	TEM	0	TEM	0
Parâmetros amostra		Parâmetros amostra		Parâmetros amostra	
DP	-160	DP	-160	DP	-160
FP	-220	FP	-220	FP	-390
EP	-10	EP	-10	EP	-10
CAD	4	CAD	4	CAD	4
CEP	-26	CEP	-34	CEP	-27
CE	-50	CE	-50	CE	-50
CXP	-2,4	CXP	-12,4	CXP	-8,4

F4		F5		F6	
Parâmetros Fonte		Parâmetros Fonte		Parâmetros Fonte	
CUR	30	CUR	30	CUR	30
IS	-4500	IS	-4500	IS	-4500
GS1	20	GS1	50	GS1	20
GS2	40	GS2	50	GS2	40
TEM	0	TEM	0	TEM	0
Parâmetros amostra		Parâmetros amostra		Parâmetros amostra	
DP	-160	DP	-140	DP	-85
FP	-220	FP	-390	FP	-220
EP	-10	EP	-10	EP	-10
CAD	4	CAD	4	CAD	4
CEP	-33	CEP	-33	CEP	-33
CE	-50	CE	-40	CE	-50
CXP	-2,4	CXP	-8,4	CXP	-12,4

3.5.6 Quantificação das cumarinas das raízes de citros via LC-UV

O objetivo desse estudo foi avaliar comparativamente a concentração dessas cumarinas nas raízes de citrus sadias e infectadas com HLB. O Método de quantificação seguiu as normas estabelecidas pelo guia da ANVISA 2003.

3.5.6.1 Preparação das amostras

As cumarinas xantiletina e xantoxiletina foram isoladas das raízes. Foram isoladas após trabalho de separação cromatográfica preparativa, como descrito no item 3.4.2.1. Essas cumarinas foram usadas como padrões nas análises de quantificação, após confirmação do grau de pureza das mesmas. As amostras das raízes de citrus sadias e infectadas com HLB, e quantificadas neste trabalho foram preparadas de acordo com o item 3.5.2.

3.5.6.2 Construção da Curva de Calibração

Para este trabalho foi escolhida a curva de calibração por padronização externa. A padronização externa é utilizada em amostras que não precisam de extenso tratamento (CASS, 2001). Neste caso, a construção da curva de calibração foi feita através de padrões de calibração, que são soluções de concentrações conhecidas das moléculas em análise.

Para a preparação das soluções estoques pesou-se exatamente uma massa de 10 mg da cumarina e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida este padrão foi solubilizado em MeOH grau HPLC e armazenado a -20 °C. Sua concentração nominal foi de 1000 ppm (ou 1000 µg/mL). Para ambas as cumarinas foi utilizada esta mesma metodologia.

Em seguida preparou-se as soluções de trabalho, tanto da xantiletina quanto da xantoxiletina, também em MeOH grau HPLC. As concentrações escolhidas foram de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 ppm para a construção da curva, que foram preparados a partir da diluição da solução estoque.

Todos os pontos da curva foram preparados e analisados em triplicata, utilizando as mesmas condições cromatográficas mencionadas a seguir.

Para este trabalho de quantificação utilizou-se o Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Agilent Technologies 1260 (equipamento descrito no item 4.2.4). A separação foi realizada no modo reverso de eluição, com um sistema gradiente de solvente consistindo em H₂O (A), ACN (B) e MeOH (C), com um fluxo de 1 ml/min e alça de amostragem de 15 µL. A coluna utilizada foi a ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, com partículas de 5µm, da marca Agilent Technologies, acoplada com uma coluna de segurança C18 (4x3 mm), também da Agilent Technologies. O gradiente teve início com 60% A, 20% B, e 20 % C, aumentando para 10% A, 45 % B, and 45 % C em 30 min, aumentando novamente para 50% B e 50% C em 5 min. Essa proporção foi mantida por 5

min e então retornou às condições iniciais em 2 min. A coluna foi então reequilibrada por 20 minutos nas condições iniciais, antes de nova análise. Os cromatogramas foram registrados com detector de ultravioleta em 260 nm.

As bandas cromatográficas referentes às cumarinas xantiletina e xantoxiletina foram determinadas através da comparação do tempo de retenção obtido analisando a solução dos padrões.

3.5.7 Análise semi-quantitativa das cumarinas do caule do porta enxerto de citros via LC-UV

Para a quantificação das cumarinas encontradas no caule inferior de citros não foram construídas curvas de calibração, sendo realizada apenas uma análise comparativa. Para comprovar se houve um aumento ou diminuição de quantidade, obteve-se, a partir do software do equipamento, a área de cada pico referente à substância de interesse em cada fração e calculou-se a área relativa entre elas. Como os experimentos foram realizados em triplicatas, calculou-se a média dos tempos de retenção e das áreas dos picos dos extratos semelhantes. As amostras do caule inferior de citros sadias e infectadas com HLB foram preparadas de acordo com o item 3.5.2 e analisadas de acordo com o item 3.5.3.

3.5.8 Análise semi-quantitativa dos flavonoides das folhas de citros via LC-MS/MS

O interesse nessa parte do trabalho foi a avaliação quantitativa e aplicação de um método analítico utilizando HPLC-MS/MS no modo MRM (do inglês “*Multiple Reaction Monitoring*”). O método MRM é o mais utilizado para a realização de quantificações por espectrometria de massa, por ser um método extremamente sensível e seletivo.

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram os mesmos do item 3.5.3, já os parâmetros espectrométricos foram os utilizados no item 3.5.5.2.

Foram avaliados para os experimentos de *Full Scan* os parâmetros: potenciais de desagrupamento (DP), de focalização (FP), de entrada (EP) e voltagem do TurboIonSpray[®] (IS), gases de cortina (CUR), nebulizador (GS1), gás de aquecimento (GS2) e temperatura da fonte (TEM). Para os experimentos de MS/MS otimizou-se também as energias do gás de colisão (CAD), de colisão (CE) e potenciais de entrada da célula (CEP) e de saída da célula (CXP). A

otimização da temperatura da fonte (TEM) foi feita manualmente, a qual garantisse total vaporização da fase móvel na entrada do espectrômetro de massas. Como o modo de eluição utilizado foi o modo gradiente, otimizou-se a temperatura da fonte (TEM) na maior proporção de fase aquosa (condições iniciais, onde se trabalha com 90% de água). Se a fase móvel fosse totalmente evaporada nessas condições, o restante da corrida também seria, pois a proporção do solvente orgânico aumenta gradativamente com o avanço da corrida cromatográfica, sendo este mais volátil. Do contrário, poderia comprometer o desempenho do método através da formação de agregados de moléculas de solvente, não sendo então transferidas para o interior do espectrômetro. Também foram usadas condições de fluxo que simulassem as condições reais, sendo necessário, portanto o uso do HPLC para as infusões. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, porém foi utilizado um divisor de fluxo na interface entre o cromatógrafo e o espectrômetro permitindo a entrada de apenas ¼ do volume total da fase móvel na entrada da fonte de ionização. Nesse momento também foram selecionadas as melhores posições, horizontal e vertical, para o capilar de entrada da amostra, de modo que auxiliasse a evaporação do solvente ao mesmo tempo em que gerasse sinais intensos para os íons de interesse. Essas posições foram estabelecidas a uma distância de 2 mm na vertical e também 2 mm na horizontal. As energias e transições utilizadas neste experimento podem ser verificadas na TABELA 3.6.

Os flavonóides analisados, assim como suas respectivas transições selecionadas, podem ser verificadas na TABELA 3.5.

TABELA 3.5: Flavonóides analisados das folhas dos citros estudado, assim como suas respectivas transições monitoradas via experimento de MRM.

Código	Nome do Flavonóide	Íon Pseudo molecular [M-H] ⁻ o	Transição monitorada
F1	Vicenina-2	593	593/353
F2	Diosmetina	623	623/383
F3	Não Identificado	563	563/293
F4	Didymina	593	593/285
F5	Diosmina	607	607/299
F6	Hesperidina	609	609/301

TABELA 3.6: : Parâmetros espectrométricos utilizados nos experimentos de MRM dos flavonóides das folhas.

Parâmetros da Fonte		Parâmetros da Amostra	
CUR	30	DP	-160
IS	-4500	FP	-220
GS1	20	EP	-10
GS2	40	CAD	4
TEM	350	CE	-50
		CXP	-12,4

A fonte de ionização operou no modo negativo, devido às características químicas da molécula e relatos da literatura (CUYCKENS, 2001; ANDERESN, 2006; STOBIECKI, 2000). A amostra a ser analisada foi preparada diluindo a amostra utilizada na análise de HPLC-UV-SPE-NMR (item 3.5.4.1) para uma concentração de 500 µg/mL, e alça de amostragem foi de 10 µL. A vazão utilizada foi de 1 mL/min, porém um divisor de fluxo foi adaptado na interface entre o HPLC e o espectrômetro de massas permitindo que apenas um quarto desse fluxo chegasse até a entrada do espectrômetro. Todos os experimentos foram preparados em triplicata.

3.5.9 Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-MS^E

Essa parte do trabalho visou caracterizar diferenças no perfil metabolômico entre plantas infectadas com HLB e plantas sadias, através da técnica acoplada LC-MS. Utilizou-se para isso o cromatógrafo ACQUITY UPLC I-Class (Waters Technologies[®]), acoplado a um espectrômetro de massas SYNAPT G2-S (Waters Technologies[®]), ambos descritos no item 3.2.4 e item 3.2.6, respectivamente. O analisador utilizado neste trabalho foi o híbrido Quadrupolo – Tempo de Vôo (Q-TOF), combinando diferentes características de desempenho oferecidas por esses diferentes analisadores. O espectrômetro de massas foi operado tanto no modo "MS" quanto no modo "MS/MS". No modo "MS" o quadrupolo não é utilizado como um analisador, trabalhando somente com radio frequência. Se comporta meramente como uma lente para focar o

feixe de íons para o segundo analisador. Em seguida, o espectrômetro de massa Q-TOF é ligado no modo "MS/MS". Nesse modo os íons moleculares podem ser seleccionados e transmitidos através do analisador quadrupolar, que desta vez é de fato utilizado como um analisador, transmitindo apenas os íons de interesse para dentro da célula de colisão que fica entre o primeiro e segundo analisador. Um gás inerte é introduzido na câmara de colisão e os íons são bombardeados com as moléculas de gás de colisão, produzindo os fragmentos (FIGURA 3.5). Esses fragmentos gerados são em seguida analisados pelo segundo analisador (tempo-de-voo). Desta forma, um espectro de MS/MS é produzido mostrando todos os íons fragmentos que surgem diretamente de um íon precursor escolhido.

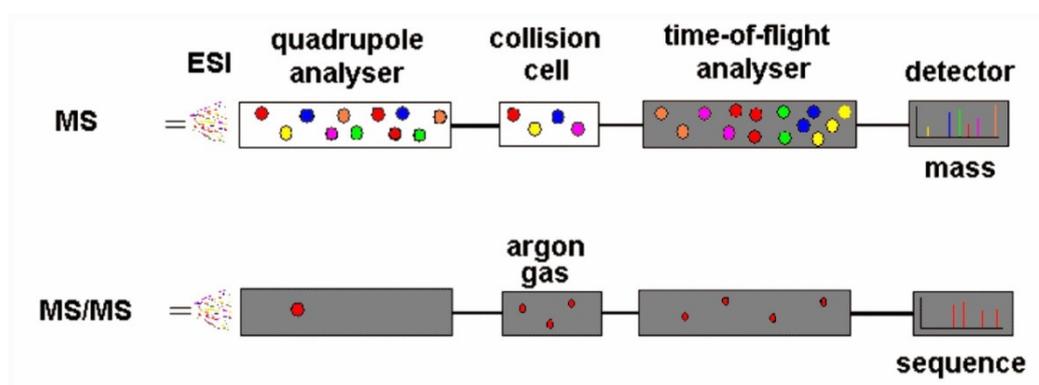


FIGURA 3.5: Analisador híbrido Q-TOF, operando no modo MS (acima) e no modo MS/MS (abaixo). Os módulos em cinza significam que estes estão ativos, enquanto os módulos em brancos significam que estão desativados (Fonte: <http://www.astbury.leeds.ac.uk/>).

A coluna utilizada para este estudo foi a Acquity HSS T3 (C-18) (2.1 x 100 mm), com tamanho de partículas de 1.8 μm . A corrida cromatográfica foi realizada no modo reverso gradiente de eluição, e usou-se fase aquosa tamponada com 10 mM Formiato de Amônio (pH 4.0), e como fase orgânica metanol. Iniciou-se a corrida com 95% de fase aquosa, descendo para 50% em 12 minutos, e dos 12 aos 13 minutos aumentou-se a composição da fase orgânica para 90%, iniciando a limpeza, e permanecendo isocrático nessa proporção por 1,5 minutos. Retornou-se em seguida às condições iniciais da corrida, onde a coluna foi equilibrada por 3 minutos nessas condições antes de nova injeção. Essas condições podem ser facilmente visualizadas na TABELA 3.7. O fluxo utilizado foi de 0,6 mL/min, a temperatura da coluna foi mantida 40 $^{\circ}\text{C}$ durante toda a corrida, e o volume de injeção foi de 1,0 μL . As amostras analisadas foram preparadas de maneira semelhante ao item 3.5.2, porem pesou-

se uma menor massa por estar trabalhando com uma técnica bastante sensível como a espectrometria de massas. Pesou-se apenas 25 mg do material já moído, e a este material adicionou-se 2 ml de uma mistura de solvente contendo MeOH:H₂O (1:1). Este foi em seguida submetido a extrações com o auxílio de um homogeneizador/dispersor (Turax), à 6000 rpm/min, durante 90 segundos. Após a extração o material foi centrifugado (21°C; 10 minutos; 10000 rpm). O sobrenadante foi então filtrado, utilizando um filtro de seringa (PTFE MILLIPORE; 0,45 µm poro; Ø = 13 mm), e foi por fim seco em evaporador de solvente à vácuo (SpeedVac). Este foi ressuspensionado em 1 ml de MeOH:H₂O (1:9) no momento da análise cromatográfica em UPLC.

TABELA 3.7: Condições cromatográficas utilizadas na técnica LC-MS^E (linha A: H₂O; linha B: ACN; linha C: MeOH).

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0.00	95	5
12.00	50	50
13.00	10	90
14.50	10	90
15.00	95	5
18.00	95	5

Uma vez otimizada a metodologia cromatográfica, foi necessário otimizar também os parâmetros do espectrômetro de massas. Nesta etapa do trabalho, optou-se por trabalhar tanto no modo positivo quanto no modo negativo, numa tentativa de ionizar o maior número possível de compostos, uma vez que o objetivo deste trabalho é a metabolômica “não alvo”. Dessa maneira, a voltagem do capilar utilizada foi de +0.5 e -0.5 kV (para o modo positivo e negativo, respectivamente). A voltagem do Cone foi de 40 V, a temperatura de dessolvatação foi mantida em 550 ° C, o fluxo do gás de dessolvatação em 900 L/h e, energia de colisão variando de 25-40V. A faixa de massa trabalhada foi de 100 à 1500 Da. O modo de aquisição foi do tipo MS^E, que se tem mostrado uma estratégia fundamental para estudos de metabolômica. Esse modo de aquisição permite que se extraia do experimento, em uma única corrida, tanto a massa exata de cada composto detectável, assim como também seus respectivos fragmentos. Esse modo de aquisição MS^E registra dados sem discriminação ou seleção, e dessa maneira tem-se uma amostra muito bem explorada em uma

única análise. Esse método alterna rapidamente entre duas funções. A primeira adquire dados utilizando baixas energias, obtendo assim um espectro do íon molecular precursor de massa exata. A segunda função adquire dados utilizando energias mais elevadas, obtendo dessa maneira espectro dos íons fragmentos, também com massa exata (WATERS, I).

Todas as amostras foram preparadas em triplicata, e cada replicada de amostra foi também analisada em triplicata, totalizando 9 experimentos para cada amostra.

3.5.10 Aplicação de análises Quimiométricas de dados de LC-MS^E

Como os espectros obtidos na técnica de LC-MS^E são na maioria das vezes bastante semelhantes e ricos em informação, 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. O uso de programas estatísticos permite distinguir com clareza as sutilezas tanto em relação à variação dos constituintes químicos quanto a sua quantidade.

Para o presente estudo, onde trabalhou-se com espectrometria de massas, considerou-se as variáveis como sendo o tempo de retenção dos picos cromatográficos obtidos nos experimentos. Inicialmente foram analisados em conjunto todos os espectros de massas obtidos para as amostras estudadas, os quais geraram uma matriz. A matriz gerada continha 72 linhas, onde essas linhas eram referentes às amostras analisadas, uma vez que foram analisadas 4 diferentes órgãos da planta, no tratamento doente e sadio, e em triplicata experimental e de análise (totalizando 9 replicatas). Foi necessário eliminar algumas regiões do espectro não informativas como, por exemplo, regiões que não apresentam diferenças entre as amostras avaliadas, uma vez que essas regiões não contribuíram para a diferenciação das amostras. Para essas análises utilizou-se o software MarkerLynx® de análise quimiométrica, fazendo-se uso de técnicas como PCA (análise de componentes principais), *Loadings Plot* e *S-Plot*.

Resultados e Discussões

4 Resultados

4.1 Substâncias isoladas

O estudo fitoquímico dos citros foi realizado com o objetivo de isolar padrões que pudessem auxiliar, posteriormente na identificação dos compostos que pudessem estar envolvidos no mecanismo de defesa da planta. Nesta parte do trabalho estudou-se a planta infectada, sendo possível caracterizar principalmente cumarinas prenilhadas, flavonoides polimetoxilados e esteroides, que serão discutidos a seguir.

4.1.1 Cumarinas

As cumarinas são uma classe de metabólitos secundários que estão distribuídas por todas as espécies de *Citrus* (STANLEY, 1971). Essas substâncias já foram relatadas na literatura apresentando atividades antioxidantes (YU, 2005), efeito quimiopreventivo (NABEKURA, 2008), e também um importante papel no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos (KHAN, 1985), entre outras.

As cumarinas, como outros fenilpropanóides, têm origem biossintética no ácido *p*-hidróxi-cinâmico (*p*-cumárico). Sua grande diversidade estrutural é devido principalmente a incorporação de unidades prenilha. As prenilhações nas posições 6 e 8 são comuns devido a presença da hidroxila na posição 7, que é um grupo orientador *orto* (FIGURA 4.1). Uma vez incorporado ao esqueleto cumarínico o grupo prenilha pode sofrer um grande número de modificações secundárias, geralmente iniciadas com a epoxidação da ligação dupla da unidade prenilha (DEWICK, 2002). As prenilhações do anel benzênico nas posições 6 ou 8 da mesma é o passo inicial na biogênese das furano e pirano cumarinas. A biossíntese de pirano ou furano depende da orientação do ataque nucleofílico. A prenilhação na posição 6 origina furano e pirano cumarinas lineares e na posição 8 leva-se a homólogos angulares.

As cumarinas são substâncias que apresentam características bastante específicas, que auxiliam sua caracterização. Essas substâncias costumam existir como sólidos brancos amorfos, e absorvem luz ultravioleta devido às suas características químicas, fluorescendo intensamente quando exposta a tal radiação. Em CCDA exibem uma coloração azulada, facilitando assim sua detecção.

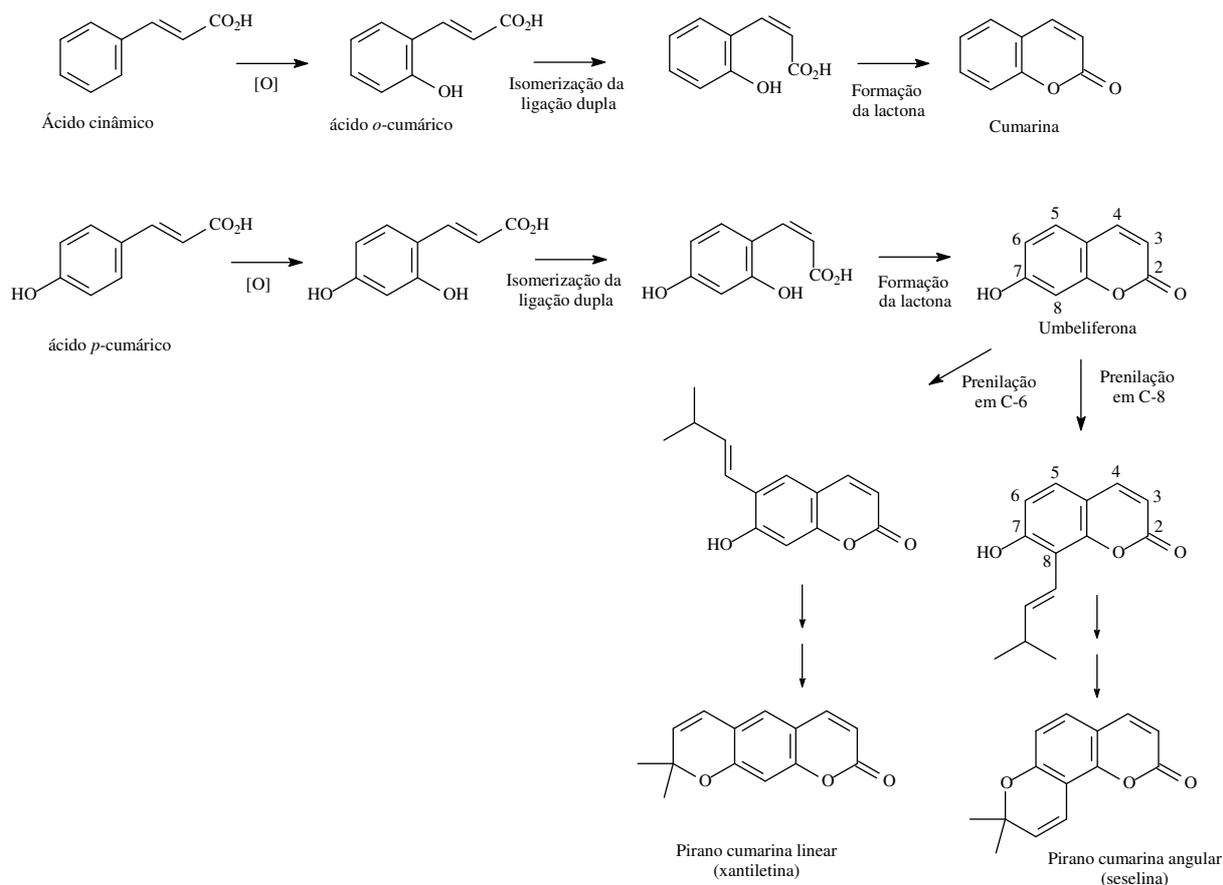


FIGURA 4.1 Biossíntese das cumarinas (adaptado de Dewick, 2002).

Em RMN ^1H , seu esqueleto básico se identifica principalmente pela presença de dois dubletos na região de δ_{H} 7,5 e 6,5, com constante de acoplamento em torno de 9,5 Hz, referente aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico, respectivamente. Eventualmente a posição C-5 do esqueleto da cumarina pode estar oxigenada, alterando o deslocamento químico do H-4 para a região de δ_{H} 8,0, devido ao efeito anisotrópico existente. Muitas vezes o anel lactônico pode encontrar-se substituído, não sendo possível, portanto, a observação desses dubletos. De acordo com a origem biossintética, a posição C-7 é oxigenada, sendo um dado importante na determinação estrutural.

4.1.1.1 Identificação da Cumarina C1

O estudo de vários extratos das raízes da planta estudada levou ao isolamento e identificação da substância **C1** (FIGURA 4.2). Esta se apresentou-se como um sólido cristalino de coloração branca, que fluoresce sob radiação ultravioleta em 254 e 365 nm, e também revela em vanilina. Esta foi identificada

através da análise dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D (em CDCl_3) e também por análise de GC-MS. Este alcalóide foi isolado de diversas frações da planta.

O espectro de RMN ^1H da substância C1 apresentou sinais característicos para cumarinas (FIGURA 4.3). Os dubletos com sinais em δ_{H} 7,57 (1H, *d*) e 6,21 (1H, *d*), cuja constante de acoplamento entre eles é de 9,4 Hz, foram associados respectivamente aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico, sendo estes hidrogênios pertencentes a uma ligação dupla que está conjugada com a carboxila da lactona. O deslocamento químico em δ_{H} 7,57 para o H-4 indica a ausência de oxigenação na posição C-5 da molécula. No espectro de RMN ^1H também foi possível verificar a presença de mais dois dubletos em δ_{H} 6,33 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz) e 5,68 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz) e um singlete em δ_{H} 1,47 integrando para 6 hidrogênios (equivalente a duas metilas de C sp^3), indicando dessa maneira a presença de um anel pirano. A presença de dois simpletos em δ_{H} 7,04 (1H, *s*) e 6,71 (1H, *s*), referentes ao C-5 e C-8 respectivamente, indicam que o anel pirano é linear, estando ligado às posições C6 e C-7 do anel aromático do esqueleto cumarínico.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 13 sinais (FIGURA 4.4), sendo que o sinal δ_{C} 28,3 é equivalente a dois carbonos, 5' e 6', totalizando 14 carbonos. Aquele em δ_{H} 161,15 δ foi relacionado à carboxila da lactona. Também foi realizado o experimento de HSQC, e analisando seu espectro (FIGURA 4.5) foi possível atribuir para cada hidrogênio da molécula, o carbono ao qual este está diretamente ligado.

Foi realizado um experimento de espectrometria de massas de *full scan*, cujo equipamento está acoplado a um cromatógrafo gasoso descrito no item 3.2.6. O espectro de massas da substância 1 (FIGURA 4.6) apresentou o pico do íon molecular em m/z 228 Da, confirmando a fórmula molecular da cumarina proposta, $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$.

Os dados discutidos através dos espectros de RMN, juntamente com a comparação desses valores obtidos com os encontrados na literatura (KHAN, 1985), permitiu a identificação estrutural da cumarina xantiletina (TABELA 4.1).

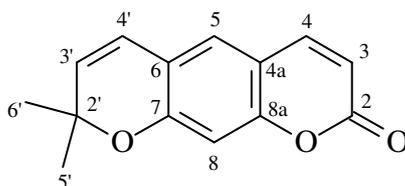


FIGURA 4.2: Estrutura da cumarina C1, Xantiletina.

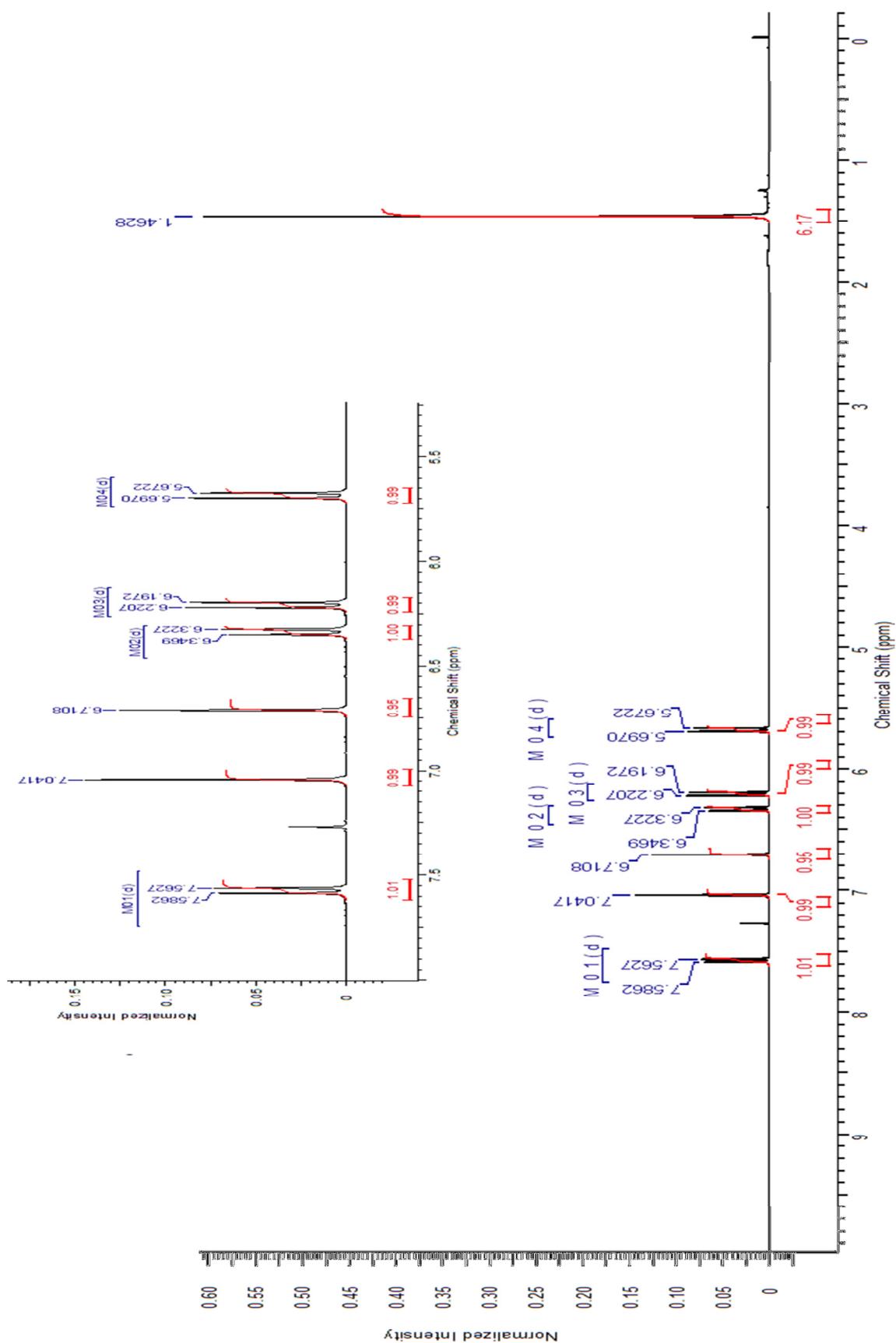


FIGURA 4.3: Espectro de RMN ^1H da cumarina C1 (CDCl_3 , 400 MHz).

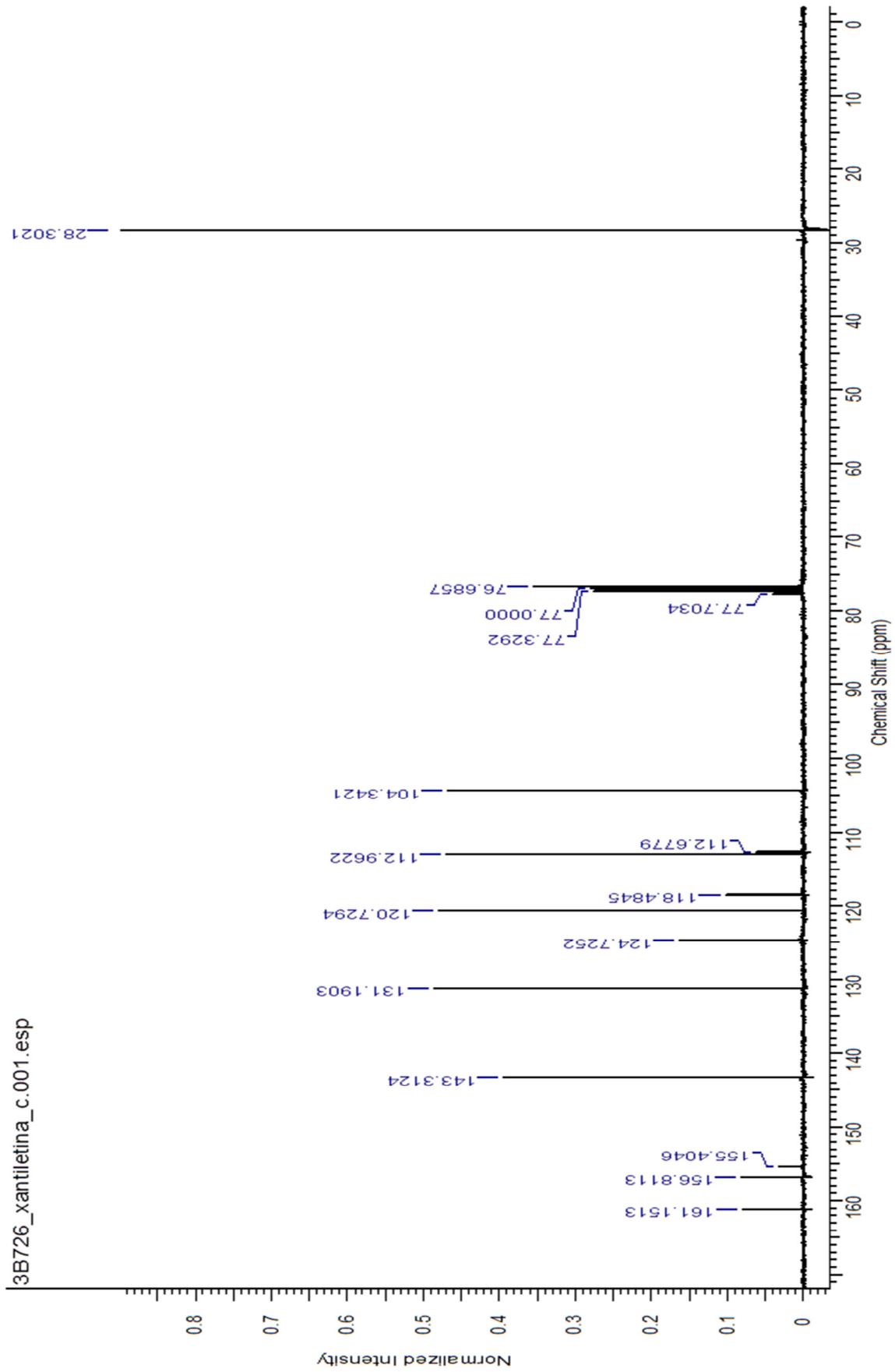


FIGURA 4.4: Espectro de RMN ^{13}C da cumarina C1 (CDCl_3 , 100 MHz).

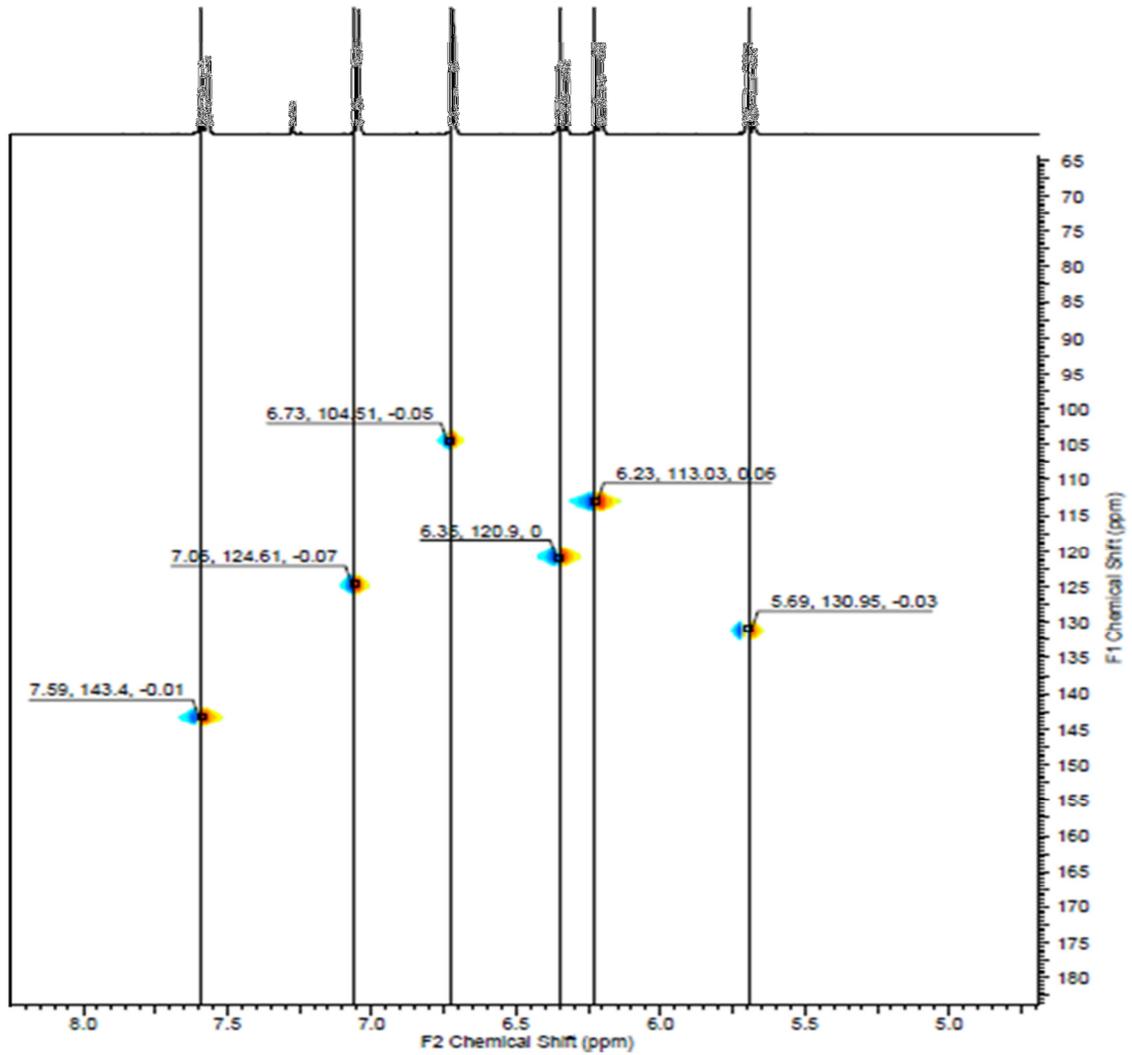


FIGURA 4.5: Mapa de contorno HSQC da cumarina **C1** (CDCl_3).

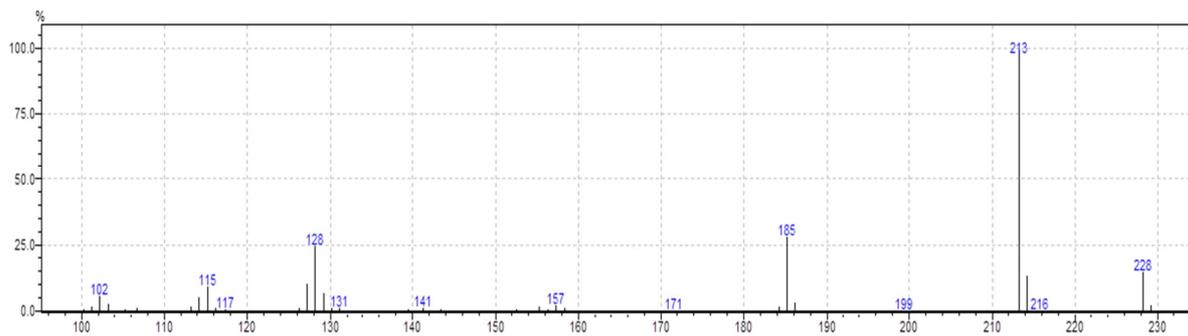


FIGURA 4.6: Espectro de massa via GC-MS ($\text{IE} = 70 \text{ eV}$) da cumarina **C1**.

TABELA 4.1: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a cumarina **C1** e comparação com a literatura (KHAN, 1985):

N ^o C	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
			Literatura ^(a)	Literatura ^(a)
2	-	161,15	-	161
3	6,21 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	113,03	6,21 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	113
4	7,57 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	143,4	7,57 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	143
4a	-	112,68	-	112
5	7,04 (1H, <i>s</i>)	124,61	7,04 (1H, <i>s</i>)	124
6	-	118,48	-	118
7	-	156,81	-	156
8	6,71 (1H, <i>s</i>)	104,51	6,71 (1H, <i>s</i>)	104
8a	-	155,41	-	155
2'	-	77,7	-	77
3'	5,68 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	130,95	5,68 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	131
4'	6,33 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	120,9	6,33 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	120
5'	1,47 (1H, <i>s</i>)	28,3	1,47 (1H, <i>s</i>)	28
6'	1,47 (1H, <i>s</i>)	28,3	1,47 (1H, <i>s</i>)	28

4.1.1.2 Identificação da Cumarina C2

A substância **C2** foi isolada dos extratos das raízes da planta estudada, porém sua purificação não foi possível devido à sua coeluição com uma segunda banda majoritária, sendo identificada mesmo em mistura. Esta se apresentou como um sólido amorfo de coloração branca. Quando submetido à radiação UV em CCDA apresentou intensa fluorescência nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, de coloração azulada, sugerindo tratar-se de uma cumarina. Foi identificada através da análise dos experimentos RMN ^1H (em CDCl_3), por análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, e comparação com a literatura (AHMAD, 1984), uma vez que se trata de uma substância bastante conhecida e comum no gênero (FIGURA 4.7).

O espectro de RMN ^1H da substância **C2** apresentou sinais característicos de cumarinas (FIGURA 4.8). Os sinais em δ_{H} 7,60 (1H, *d*, $J = 9,4$ Hz) e 6,24 (1H, *dd*, $J = 9,4$ Hz) foram associados aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico. Para essa substância também foi possível identificar os sinais

referentes a um anel pirano, proveniente da ciclização de uma prenila. Estes eram mais um par de dubletos em δ_H 5,74 (1H, *d*, 10,2 Hz) e 6,89 (1H, *d*, 10,2 Hz), que foram relacionados aos hidrogênios H-3' e H-4', respectivamente, mais um simpleto em δ_H 1,47 (6H, *s*), sendo referente a duas metilas, H-5' e H-6'. No mesmo espectro ainda foi possível verificar a presença de mais dois dubletos, com sinais em δ_H 7,22 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz) e 6,73 (1H, *dd*, $J = 8,5$ Hz), apresentando dessa vez uma constante de acoplamento característico de grupos “orto” de anel aromático. Sugere-se dessa maneira que o anel pirano encontra-se dessa vez nas posições C-7 e C-8 do anel aromático do esqueleto da cumarina, levando a uma pirano cumarina angular.

O espectro de massa da substância **C2** (FIGURA 4.9) mostrou pico íon molecular em m/z 228 Da, confirmando a fórmula molecular da cumarina proposta, $C_{14}H_{12}O_3$.

Através das análises dos resultados discutidos acima, juntamente com a comparação dos valores de referência da literatura, foi possível confirmar para a substância **C2** a estrutura da cumarina seselina, bastante comum em *Citrus* (TABELA 4.2).

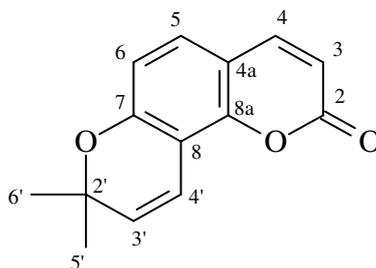


FIGURA 4.7: Estrutura da cumarina **C2**, seselina.

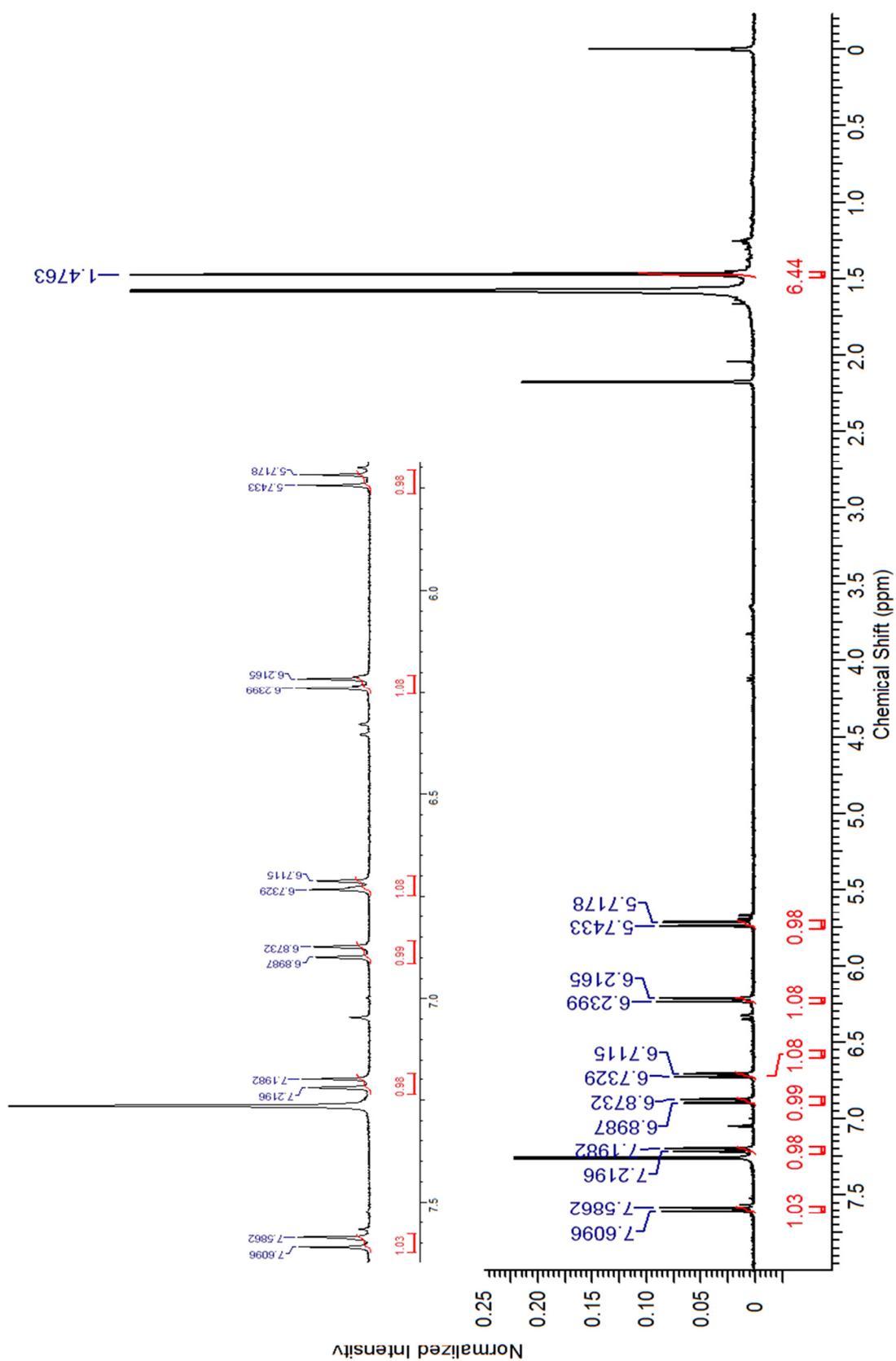


FIGURA 4.8: Espectro de RMN ^1H da cumarina C2 (CDCl_3 , 400 MHz).

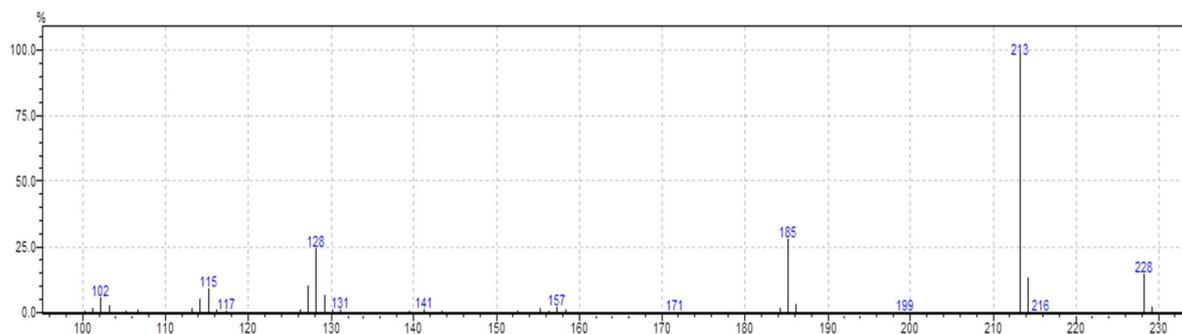


FIGURA 4.9: Espectro de massa via GC-MS (IE = 70 eV) da cumarina **C2**.

TABELA 4.2: Dados de RMN ^1H para a cumarina **C2**, e comparação com a literatura(AHMAD, 1984):

Nº C	^1H (δ)	Literatura ^(a) (δ)
3	6,24 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	6,23 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)
4	7,60 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	7,6 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)
5	7,22 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	7,21 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)
6	6,73 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	6,72 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)
3'	5,74 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)	5,73 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)
4'	6,89 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)	6,89 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)
5'	1,48 (<i>s</i>)	1,48 (<i>s</i>)
6'	1,48 (<i>s</i>)	1,48 (<i>s</i>)

4.1.1.3 Identificação da Cumarina **C3**

A substância **C3** foi isolada de várias frações dos extratos das raízes de *Citrus*. Esta também se apresentou como um sólido branco amorfo. Assim como nos exemplos anteriores, esta exibiu intensa fluorescência nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, ao ser analisada via CCDA de coloração azulada, sugerindo tratar-se de uma cumarina. Esta substância foi identificada através da realização dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D (em CDCl_3), por análise de GC-MS e também por comparação com dados da literatura. Apesar de bastante comum no gênero e já conhecida na literatura, optou-se por realizar experimentos de RMN ^{13}C e de 2D devido à forte similaridade dos deslocamentos químicos de ^1H com a próxima substância a ser discutida, a substância **C4**.

Foi realizada uma análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.11) onde novamente apareceram os sinais característicos de cumarinas com anel pirano. Os hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico apareceram em δ_{H} 7,85 (1H, *d*, $J = 9,7$ Hz) e 6,20 (1H, *dd*, $J = 9,7$ Hz), exibindo um deslocamento químico mais desblindado para o H-4, sugerindo dessa maneira uma oxigenação no C-5. Já para o anel pirano foi possível verificar o par de dubletos em δ_{H} 6,33 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz) e 5,68 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz), um simpleto em δ_{H} 1,47 integrando para 6 hidrogênios, confirmando esta parte da molécula. Verificaram-se ainda mais dois simpletos: um deles em δ_{H} 6,55 (1H, *s*) e o outro em δ_{H} 3,86 (3H, *s*), este último característico de metoxilas ligadas a anel aromático. Este singletto foi portanto atribuído à posição C-5 da cumarina, pois já era esperado uma oxigenação nessa posição. Além disso, o simpleto que integra para 1 hidrogênio foi atribuído ao C-8, devido à sua maior blindagem quando comparado com a posição C-5.

Por sua vez, analisando o espectro de RMN ^{13}C foi possível verificar a presença de 14 sinais, sendo aquele em δ_{C} 28,3 equivalente a dois Carbonos, totalizando assim 15 Carbonos para a molécula (FIGURA 4.12).

A atribuição de algumas posições foi possível analisando os mapas de correlações HSQC (FIGURA 4.13), o qual mostra que o sinal de singletto em δ_{H} 3,86 correlaciona-se com δ_{C} 63,45, sugerindo com esse valor de deslocamento químico que a metoxila está ligada a um carbono *orto* dissubstituído (FURUKAWA, et. al., 1983). Conclui-se, portanto, que se trata de uma pirano cumarina linear.

A confirmação da massa molecular foi obtida através do espectro de massas (IE, 70Ev) que apresentou o pico do íon molecular com m/z 258 Da (FIGURA 4.14), confirmando a fórmula proposta $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

A análise dos dados experimentais, juntamente com a comparação destes com aqueles da literatura (WU, 1983) (TABELA 4.3), pôde-se concluir que a substância em questão é a cumarina xantoxiletina.

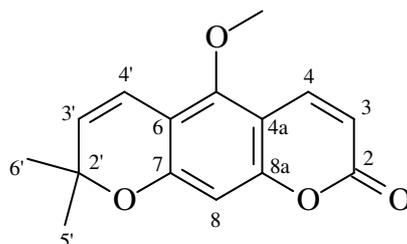


FIGURA 4.10: Estrutura da cumarina **C3**, Xantoxiletina.

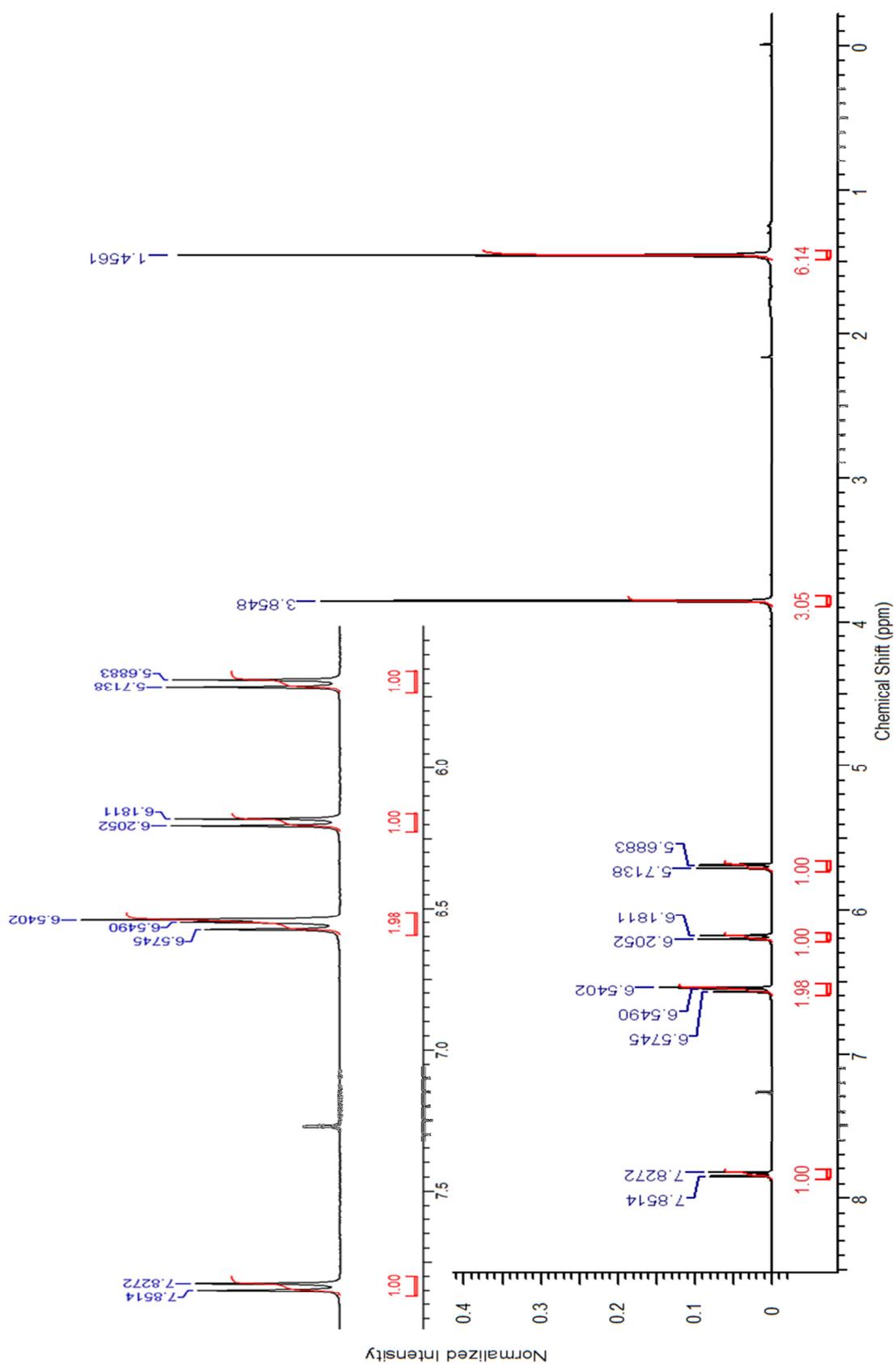


FIGURA 4.11: Espectro de RMN ^1H da cumarina C3 (CDCl_3 , 400 MHz).

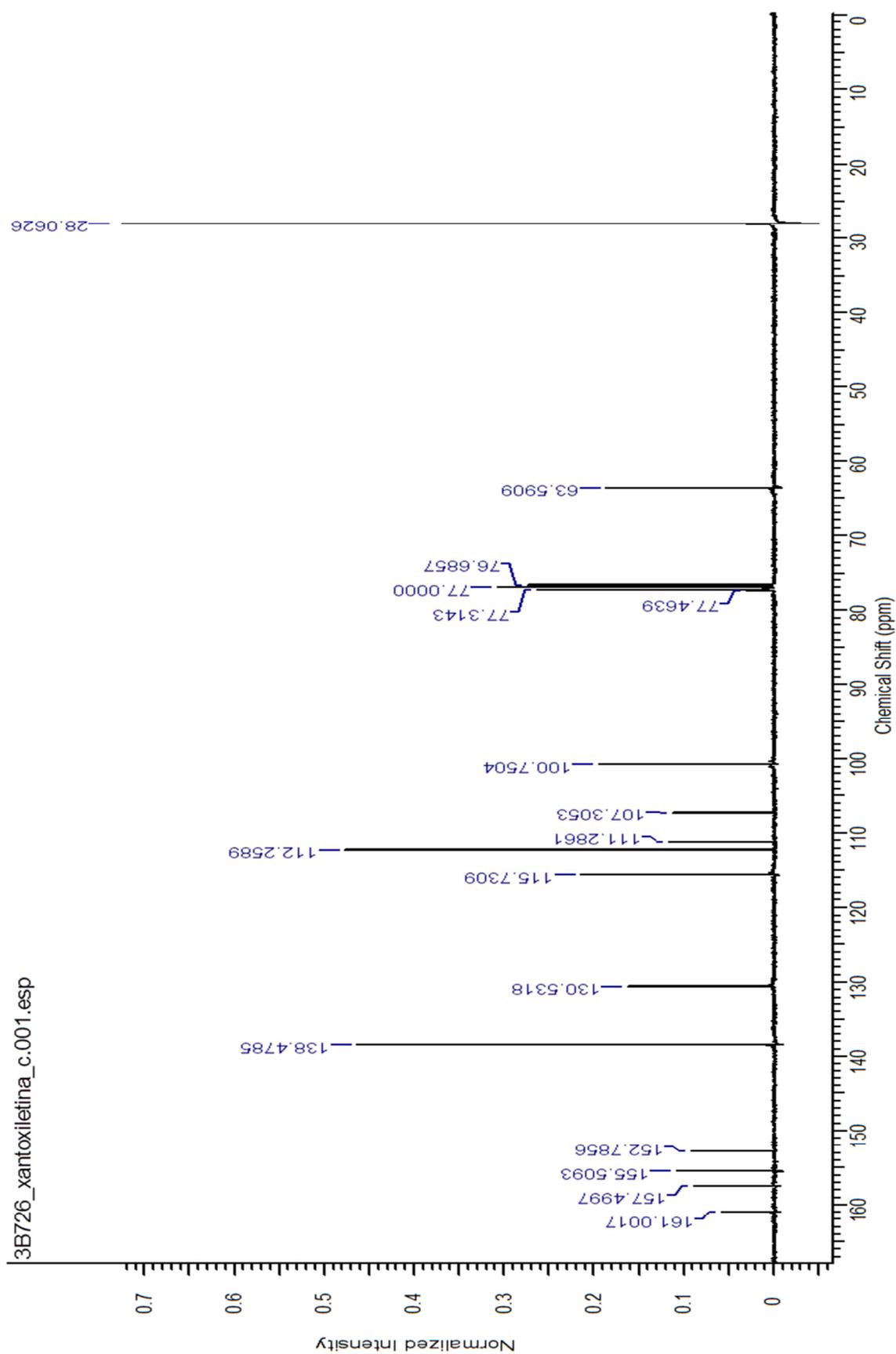


FIGURA 4.12: Espectro de RMN ^{13}C da cumarina **C3** (CDCl_3 , 100 MHz).

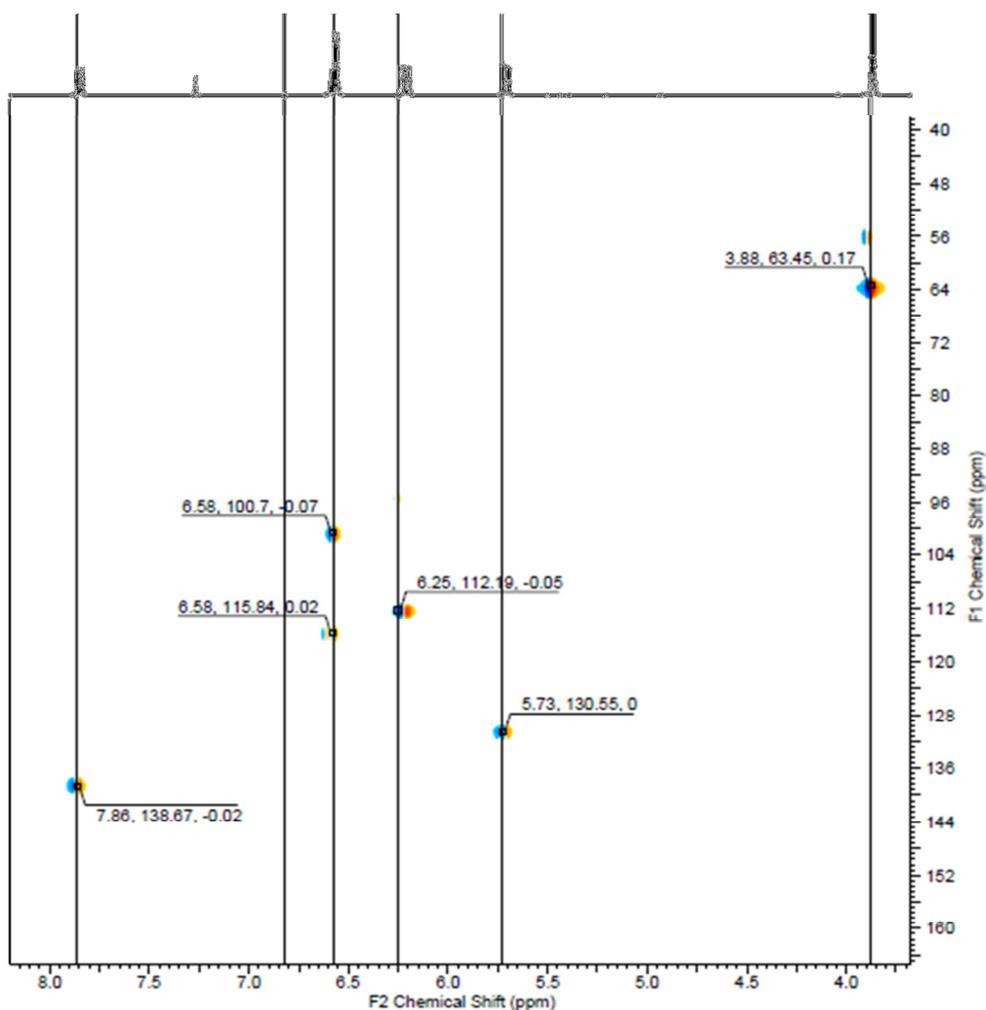


FIGURA 4.13: Mapa de contorno HSQC da cumarina **C3** (CDCl₃).

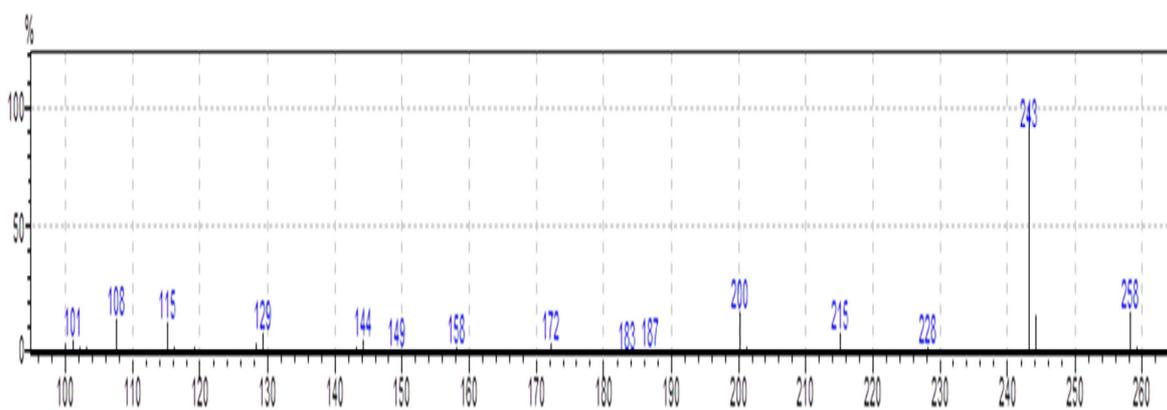


FIGURA 4.14: Espectro de massa via GC-MS (IE = 70 eV) da cumarina **C3**.

TABELA 4.3: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a cumarina **C3** e comparação com a literatura (FURUKAWA, et. al., 1983):

Nº C	^1H (δ)	^{13}C (δ)	Literatura ^(a) (δ)
2	-	161,06	-
3	6,20 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	112,19	6,13 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)
4	7,85 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	138,67	7,97 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)
4a	-	111,29	-
5	-	155,51	-
6	-	107,31	-
7	-	157,49	-
8	6,55 (1H, <i>s</i>)	100,7	6,47 (1H, <i>s</i>)
8a	-	152,78	-
2'	-	77,46	-
3'	5,71 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)	130,55	5,65 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)
4'	6,57 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)	115,84	6,52 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)
5'	1,47 (3H, <i>s</i>)	27,94	1,45 (3H, <i>s</i>)
6'	1,47 (3H, <i>s</i>)	27,94	1,45 (3H, <i>s</i>)
OMe	3,86 (3H, <i>s</i>)	63,45	3,82 (3H, <i>s</i>)

4.1.1.4 Identificação da Cumarina 4

A partir das frações dos extratos das raízes de *Citrus* foi possível isolar a substância **C4**. Esta apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca, que fluorescia intensamente de coloração azulada ao ser submetido à radiação UV em CCDA. Esta substância foi identificada através da análise dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D (em CDCl_3) e por análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Assim como para a substância **3**, a substância 4 também é bastante comum no gênero *Citrus*, porém optou-se por apresentar os espectros de RMN ^{13}C e de 2D devido à similaridade do espectro de RMN ^1H com a substância anterior, a cumarina **C3**.

O espectro de RMN ^1H da substância **4** apresentou sinais já conhecidos de cumarinas (FIGURA 4.16), onde aqueles em δ_{H} 7,96 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz) e 6,13 (1H, *dd*, $J = 9,6$ Hz) foram associados aos hidrogênios H-4 e H-3 de um anel

lactônico; os sinais em δ_H 5,58 (1H, *d*, 10,0 Hz), 6,8 (1H, *d*, 10,0 Hz) e 1,49 (6H, *s*) foram associados ao anel pirano da cumarina.

O sinal em δ_H 6,23 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio de anel aromático pentassubstituído, e o sinal em δ_H 3,85 (3H, *s*) foi associado a uma metoxila de anel aromático.

Pôde-se observar pelo espectro de RMN ^{13}C a presença de 14 sinais, sendo que o sinal em δ_C 28,2 é equivalente a dois carbonos, totalizando assim 15 Carbonos para a molécula (FIGURA 4.17).

O mapa de correlações de HSQC (FIGURA 4.18) mostra o sinal de uma metoxila correlacionado a um carbono com deslocamento químico δ_H 56,0, sugerindo ela estar ligada ao anel aromático com pelo menos uma das posições “orto” livre, não substituída (FURUKAWA et. Al.; 1983). Sugere-se dessa maneira que essa cumarina não seja linear como a anterior, mas sim angular, com o anel pirano ligado aos C-7 e C-8, referindo-se o singlete em δ_H 6,23 (1H, *s*) ao H-6.

O espectro de massas da substância C4 (FIGURA 4.19) mostrou o pico do íon molecular em m/z 258 Da, sugerindo a fórmula molecular da cumarina $C_{14}H_{12}O_3$. Através da análise dos dados discutidos acima, juntamente com comparação destes com a literatura (Valderrama, 1992), confirmou-se para a substância **4** a estrutura da cumarina metoxiseselina (TABELA 4.4).

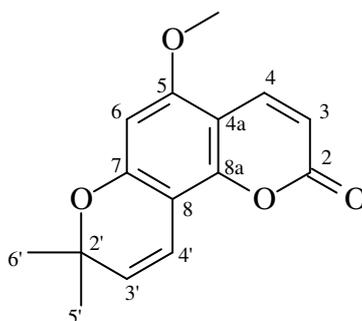


FIGURA 4.15: Estrutura da cumarina **C4**, metoxiseselina.

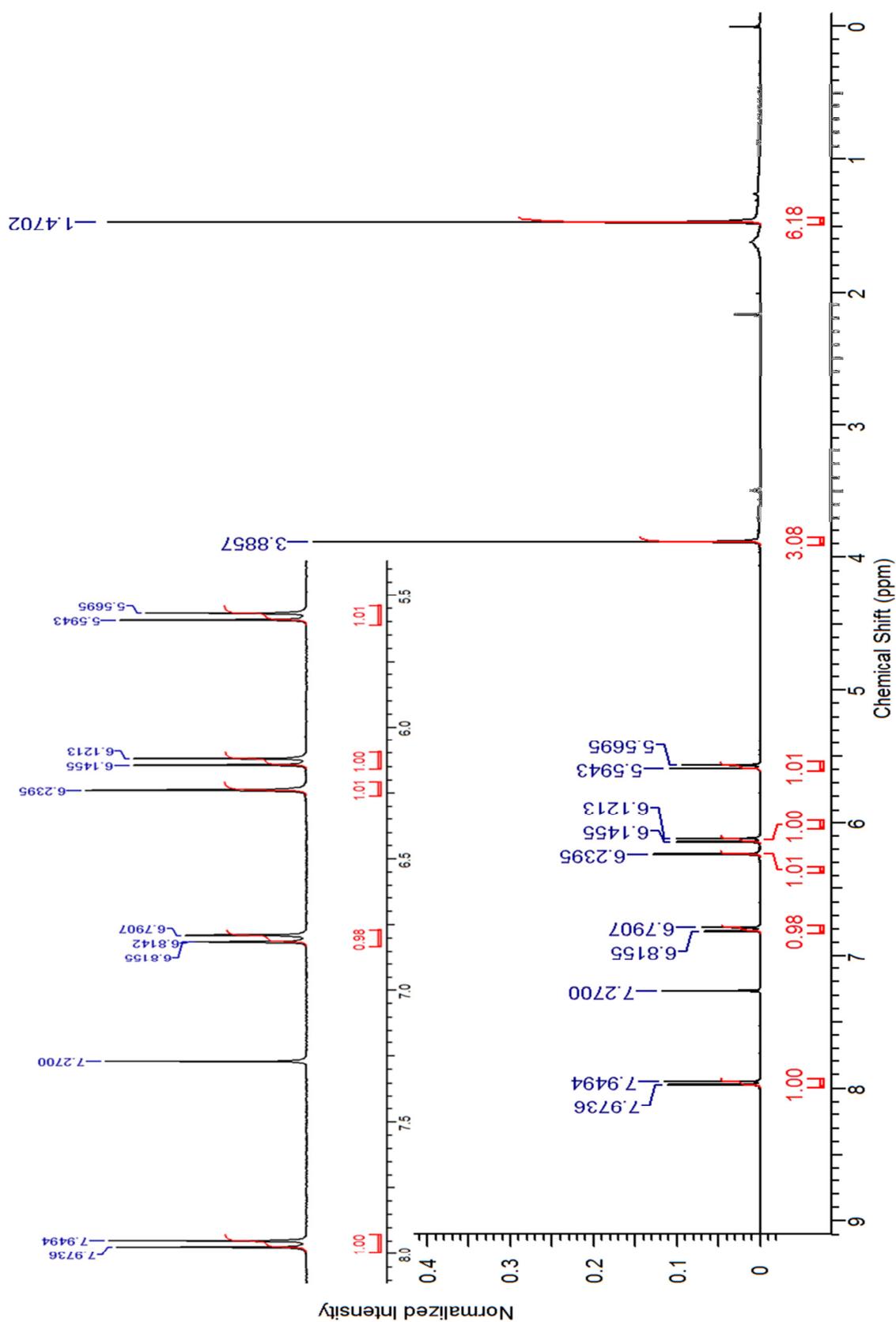


FIGURA 4.16: Espectro de RMN ^1H da cumarina **C4** (CDCl_3 , 400 MHz).

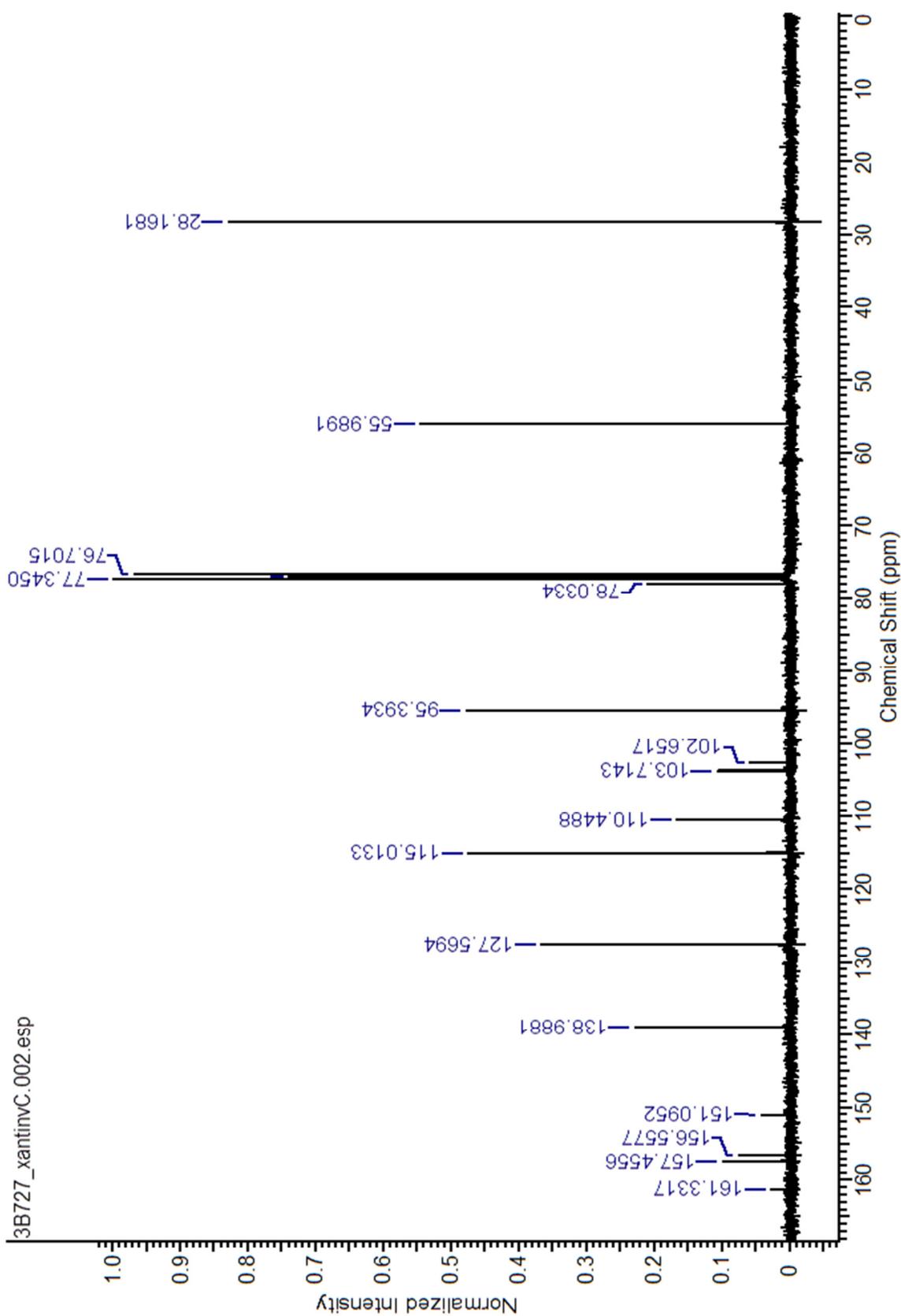


FIGURA 4.17: Espectro de RMN ^{13}C da cumarina **C4** (CDCl_3 , 100 MHz).

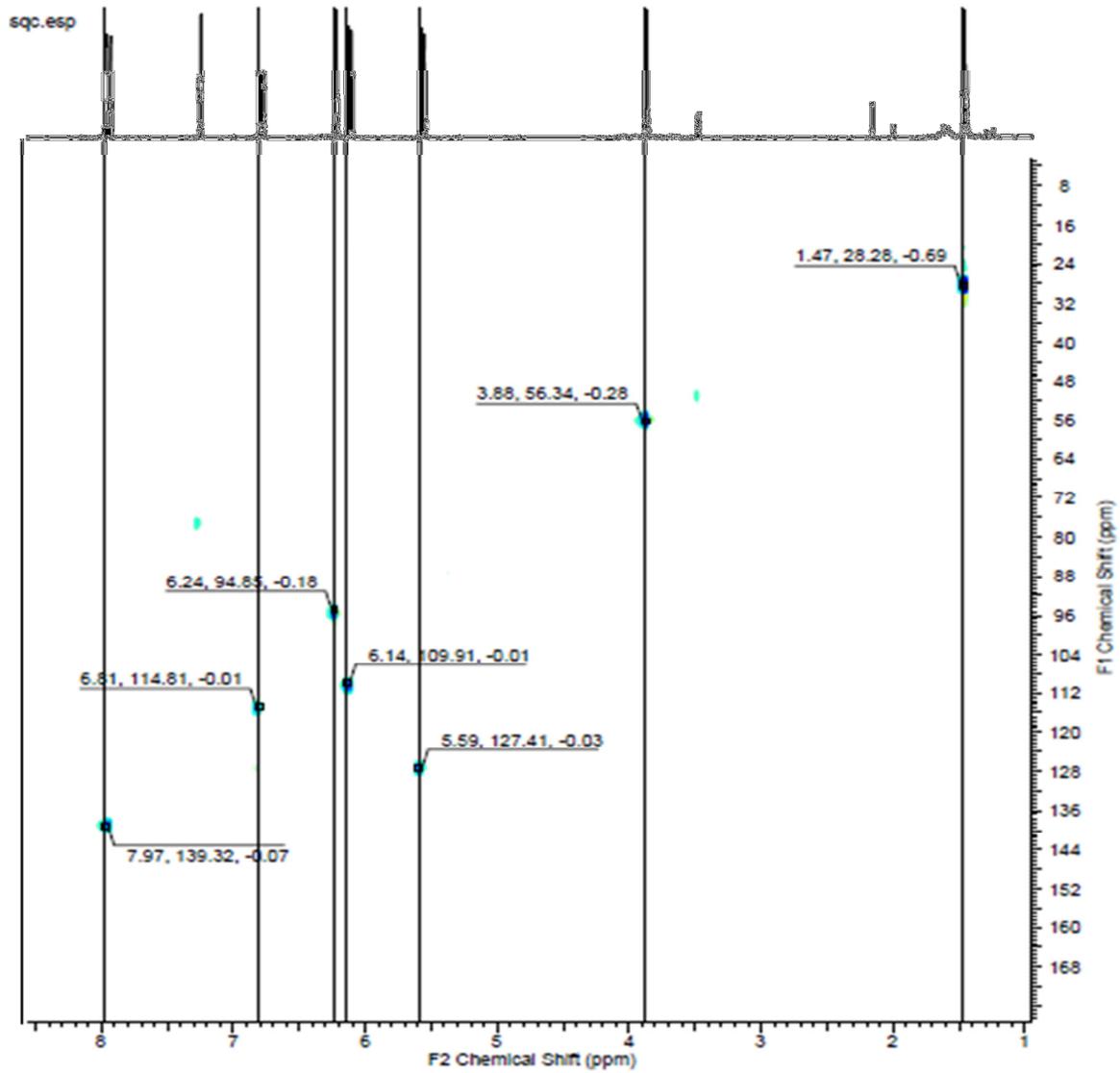


FIGURA 4.18: Mapa de contorno HSQC da cumarina **C4** (CDCl_3).

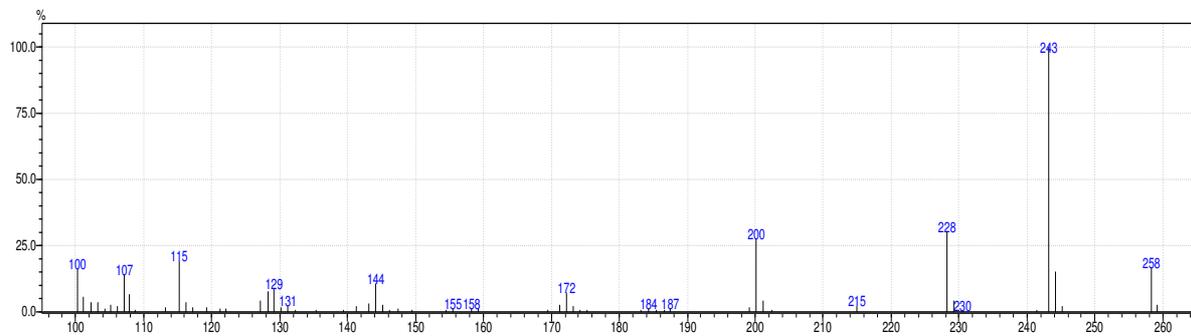


FIGURA 4.19: Espectro de massa via GC-MS (IE = 70 eV) da cumarina **C4**.

TABELA 4.4: Dados de RMN ^1H para a cumarina C4, e comparação com a literatura (Valderrama, 1992):

N ^o C	^1H (δ)	^{13}C (δ)	Literatura (δ)
2	-	161,3	-
3	6,13 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)	110,41	6,06 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)
4	7,96 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)	138,96	7,86 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)
4a	-	103,68	-
5	-	156,53	-
6	6,23 (1H, <i>s</i>)	95,36	6,17 (1H, <i>s</i>)
7	-	157,42	-
8	-	102,62	-
8a	-	151,06	-
2'	-	78	-
3'	5,58 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	127,54	5,55 (1H, <i>d</i> , 9,8 Hz)
4'	6,80 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	114,98	6,70 (1H, <i>d</i> , 9,8 Hz)
5'	1,49 (3H, <i>s</i>)	28,14	1,44 (3H, <i>s</i>)
6'	1,49 (3H, <i>s</i>)	28,14	1,44 (3H, <i>s</i>)
OMe	3,88 (3H, <i>s</i>)	55,95	3,85 (3H, <i>s</i>)

4.1.1.5 Identificação da Cumarina C5

A substância **C5** foi isolada e identificada a partir das frações dos extratos das raízes de *Citrus*, apresentando-se como um sólido amorfo de coloração branca, que fluorescia intensamente ao ser submetido à radiação UV em análises de CCDA. Esta substância, por ser bastante comum no gênero e apresentar um espectro de RMN ^1H simples, foi identificada através da análise dos experimentos RMN de ^1H (em CDCl_3), por análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por comparação com a literatura (SONGSIANGA, 2012).

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.21) da substância em questão, apresentou os sinais característicos do H-4 e H-3 do anel lactônico da cumarina em δ_{H} 7,88 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz) e 6,20 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz). Este também apresentou os sinais referentes ao anel pirano, com dois dubletos em δ_{H} 6,58 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz) e 5,70 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz). A presença de um singlete em δ_{H} 3,84 (3H, *s*)

sugeriu a presença de uma metila ligada a um heteroátomo. Ainda analisando o espectro de RMN ^1H , verificaram-se 3 sinais de duplos dubletos em δ_{H} 6,31 (1H, *dd*, $J=17,3$ e $10,6$ Hz), 4,89 (1H, *dd*, $J=10,6$ e $1,0$ Hz) e 4,95 (1H, *dd*, $J=17,3$ e $1,0$ Hz). O primeiro sinal apresenta duas constantes grandes de $17,3$ e $10,6$ Hz, característicos de acoplamentos de hidrogênios olefínicos vicinais em *trans* e *cis*, respectivamente. Os dois últimos, além da constante maior, apresentam também uma constante pequena, possivelmente de hidrogênios geminais e, ao observar a presença de um singlete intenso em δ_{H} 1,67 (6H, *s*), sugeriu-se a presença de uma prenila modificada na molécula

A confirmação da massa molecular foi obtida através do espectro de massas (IE, 70Ev) que apresentou o pico do íon molecular com m/z 326 (FIGURA 4.22), confirmando a fórmula proposta $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$. A análise dos dados obtidos, juntamente com a comparação com dados da literatura (SONGSIANG, 2012) permitiram atribuir para a substância **C5** a estrutura da cumarina dentatina, já relatada anteriormente no gênero (TABELA 4.5).

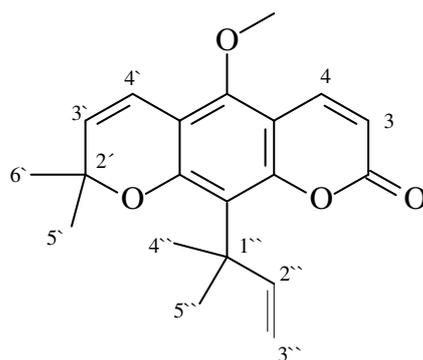


FIGURA 4.20: Estrutura da cumarina **C5**, dentatina.

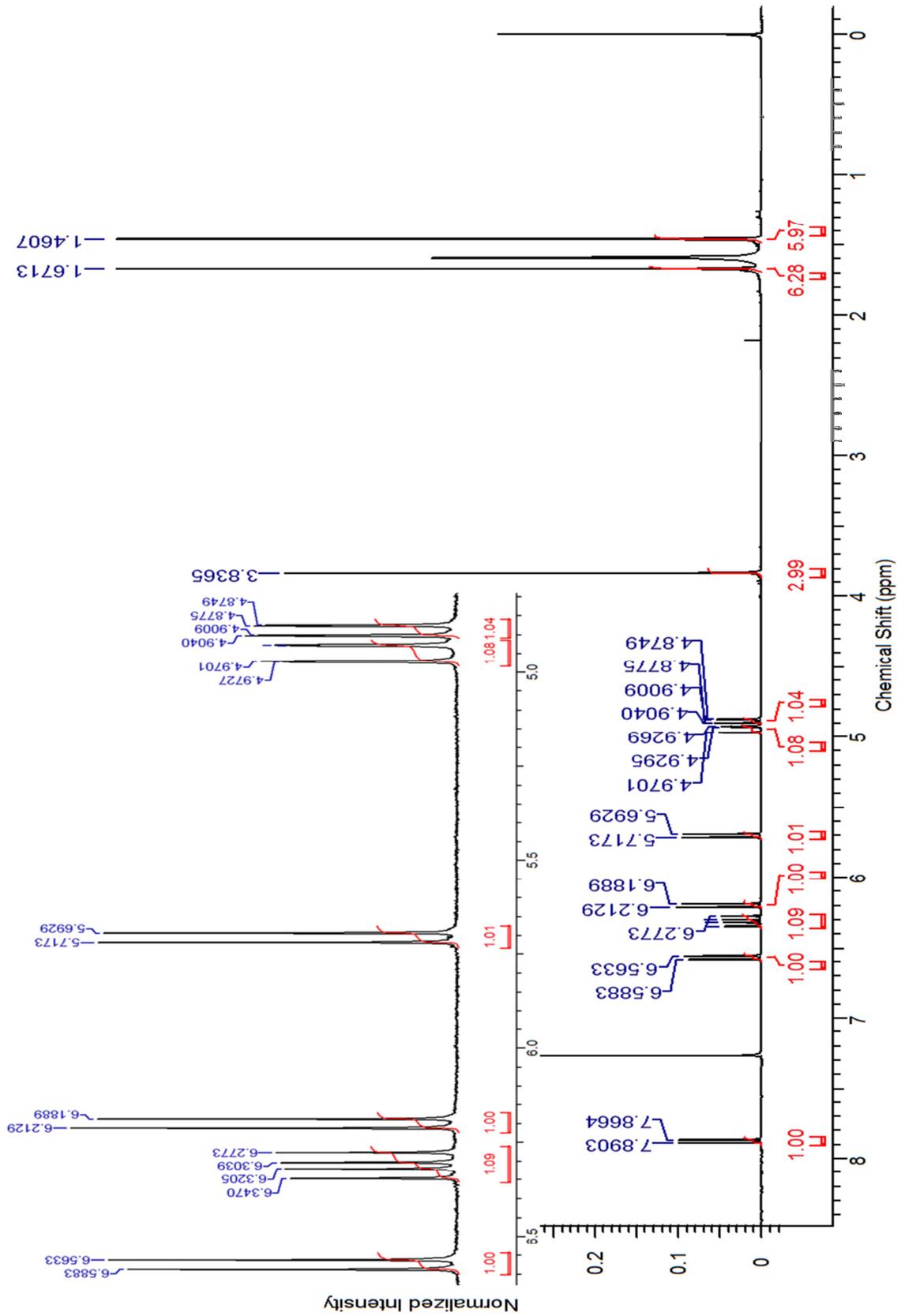
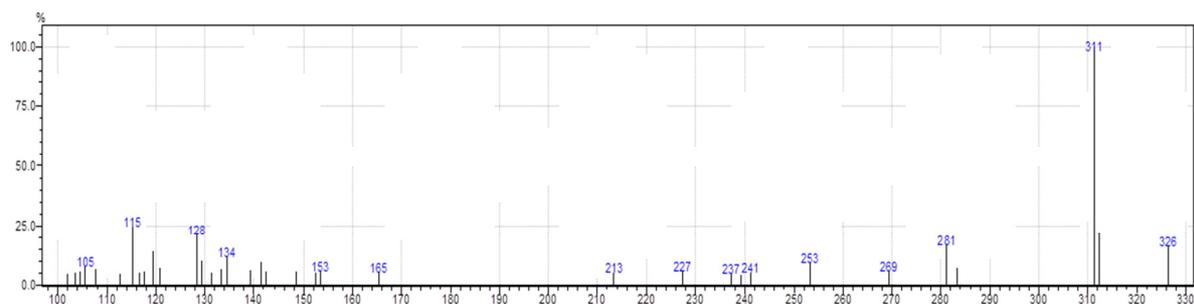


FIGURA 4.21: Espectro de RMN ^1H da cumarina **C5** (CDCl_3 , 400 MHz).

FIGURA 4.22: Espectro de massa (IE = 70 eV) da cumarina **C5**.TABELA 4.5: Dados de RMN ^1H para a cumarina **C5**, e comparação com a literatura (SONGSIANG, 2012):

N ^o C	^1H (δ ; Hz)	Literatura (δ ; Hz)
3	6,20 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)	6,18 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)
4	7,88 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)	7,86 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)
3'	5,71 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	5,69 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)
4'	6,58 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	6,56 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)
5'	1,46 (<i>s</i>)	1,45 (<i>s</i>)
6'	1,46 (<i>s</i>)	1,45 (<i>s</i>)
2''	6,31 (1H, <i>dd</i> , 17,3 e 10,6 Hz)	6,30 (1H, <i>dd</i> , 17,4 e 10,6 Hz)
3'' a	4,89 (1H, <i>dd</i> , 10,6 e 1,0 Hz)	4,94 (1H, <i>d</i> , 10,6 Hz)
3'' b	4,95 (1H, <i>dd</i> , 17,3 e 1,0 Hz)	4,87 (1H, <i>d</i> , 17,4 Hz)
4''	1,67 (<i>s</i>)	1,66 (<i>s</i>)
5''	1,67 (<i>s</i>)	1,66 (<i>s</i>)
OMe	3,84 (<i>s</i>)	3,82 (<i>s</i>)

4.1.1.6 Identificação da Cumarina 6

A substância **C6** foi identificada em mistura, sendo esta a majoritária da fração. Assume-se tratar de uma mistura, e não de um dímero, devido às diferenças nos valores de integrais (os sinais da substância **6** são 3 vezes maiores do que aqueles para uma segunda substância). Assim como nas demais substâncias, essa se apresentou como um sólido amorfo de coloração branca, fluorescendo ao ser submetida à radiação UV em análises de CCDA. Esta substância, é também bastante conhecida e comum no gênero, sendo identificada através da análise dos experimentos RMN de ^1H (em CDCl_3), por análise de

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por comparação com a literatura (ANWER, 1977).

O espectro de RMN ^1H da substância em questão (FIGURA 4.24) não apresentou o dupletos característicos do anel lactônico da cumarina, apresentando apenas um singlete em δ_{H} 7,99 (1H, *s*) referente ao H-4. Este valor bastante desblindado ainda sugere a presença de um substituinte oxigenado na posição C-5. Apesar de não se observar os dupletos do anel lactônico da cumarina, foi possível identificar os sinais do anel pirano, aparecendo dois dupletos em δ_{H} 6,69 (1H, *d*, $J=10,0$ Hz) e 5,61 (1H, *d*, $J=10,0$ Hz), juntamente com um singlete em δ_{H} 1,46 (6H, *s*).

Foi possível ainda identificar um duplo dupletos em δ_{H} 6,17 (1H, *dd*, $J=17,5$ e $10,6$ Hz), sugerindo com essas constantes de acoplamento tratar-se de hidrogênios olefinícos em *trans* e *cis*, respectivamente. Este sinal correlaciona-se com um segundo duplo dupletos em δ_{H} 4,87 (1H, *dd*, $J=10,6$ e $1,0$ Hz), acoplado em *cis* com δ_{H} 6,17, e um terceiro duplo dupletos em δ_{H} 4,91 (1H, *dd*, $J=17,5$ e $1,0$ Hz), acoplado em *trans* com δ_{H} 6,17, sendo estes dois últimos geminais. Um intenso singlete em δ_{H} 1,62 (6H, *s*) sugeriu por fim a presença de uma unidade de prenila modificada.

Mais 3 pares de duplos dupletos foram identificados, com multiplicidades e constantes de acoplamento semelhantes aos duplos dupletos descritos acima: em δ_{H} 6,28 (1H, *dd*, $J=17,5$ e $10,6$ Hz), 5,03 (1H, *dd*, $J=10,6$ e $1,0$ Hz) e 5,07 (1H, *dd*, $J=17,5$ e $1,0$ Hz), correspondendo às posições 2'' e 3''. Também foi confirmada a presença de um singlete bastante intenso em δ_{H} 1,41 (6H, *s*), sugerindo dessa maneira a presença de uma segunda unidade de prenila também modificada.

A análise dos dados obtidos, juntamente com a comparação com dados da literatura (ANWER, 1977) permitiram atribuir para a substância **6** a estrutura da cumarina clausarina, já relatada anteriormente no gênero (TABELA 4.6).

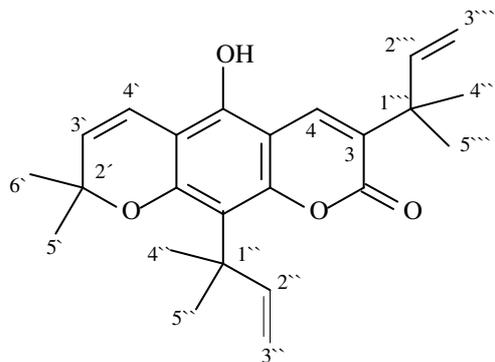


FIGURA 4.23: Estrutura da cumarina **C6**, Clausarina.

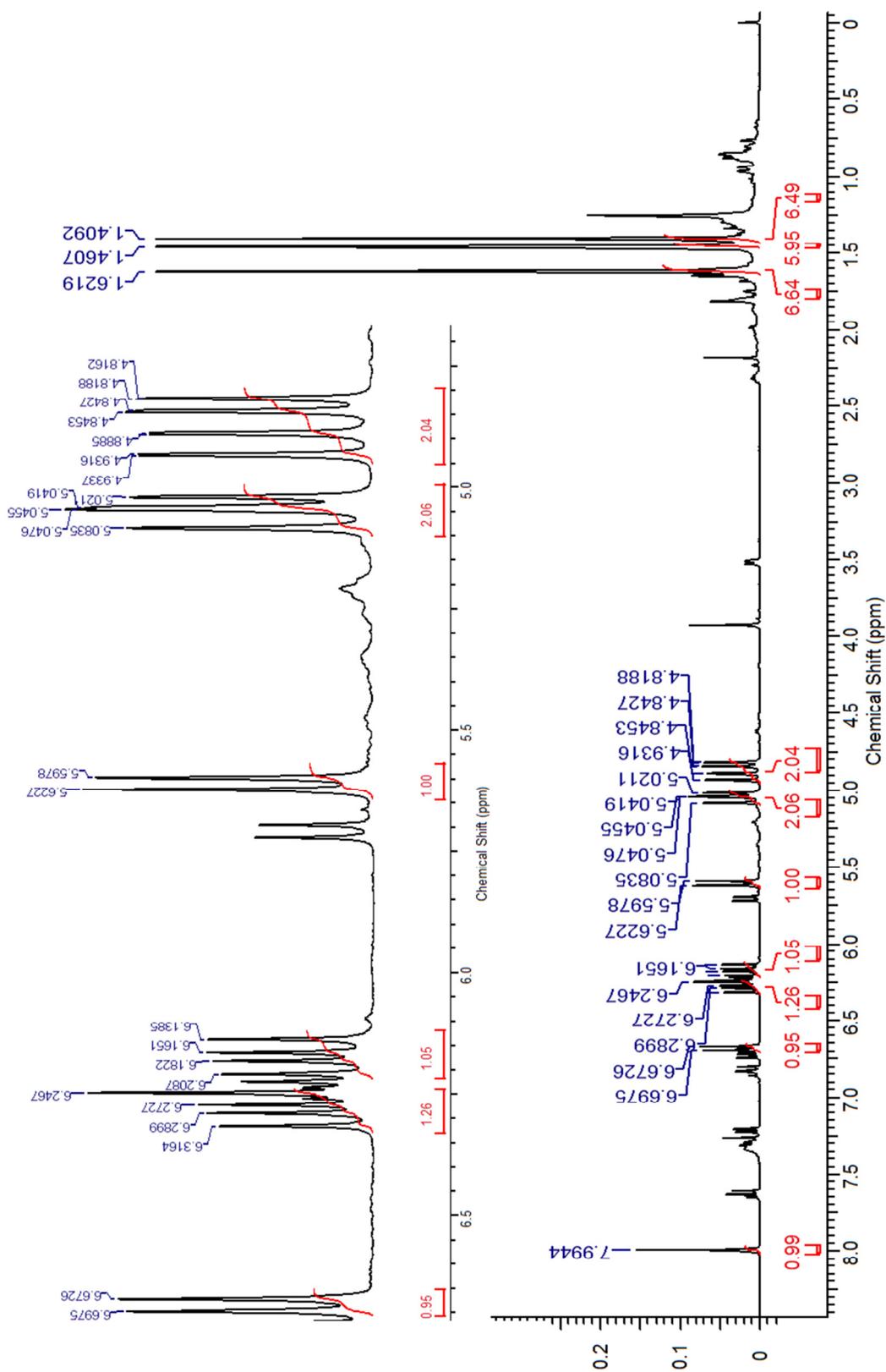


FIGURA 4.24: Espectro de RMN ^1H da cumarina C6 (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 4.6: Dados de RMN ^1H para a cumarina **C6**, e comparação com a literatura (ANWER, 1977):

Nº C	^1H (δ ; Hz)	Literatura (δ ; Hz)
4	7,99 (1H, <i>s</i>)	7,85 (<i>s</i>)
3'	5,61 (1H, <i>d</i> , 10,0)	5,67 (<i>d</i>); 9,8
4'	6,69 (1H, <i>d</i> , 10,0)	6,50 (<i>d</i>); 9,8
5'	1,46 (3H, <i>s</i>)	1,47 (<i>s</i>)
6'	1,46 (3H, <i>s</i>)	1,47 (<i>s</i>)
2''	6,17 (1H, <i>dd</i> , 17,5; 10,6)	6,29 (<i>dd</i>); 17,6 e 10,5
3'' a	4,87 (1H, <i>dd</i> , 17,5; 10,6)	4,85 (<i>dd</i>); 10,5 e 1,2
3'' b	4,91 (1H, <i>dd</i> , 17,5; 1,0)	4,93 (<i>dd</i>); 17,6 e 1,2
4''	1,62 (3H, <i>s</i>)	1,63 (<i>s</i>)
5''	1,62 (3H, <i>s</i>)	1,63 (<i>s</i>)
2'''	6,28 (1H, <i>dd</i> , 17,5; 10,6)	6,18 (<i>dd</i>); 17,6 e 10,5
3''' a	5,03 (1H, <i>dd</i> , 10,6)	5,07 (<i>dd</i>); 10,5 e 1,0
3''' b	5,07 (1H, <i>dd</i> , 17,5)	5,11 (<i>dd</i>); 17,6 e 1,0
4'''	1,41(3H, <i>s</i>)	1,43 (<i>s</i>)
5'''	1,41 (3H, <i>s</i>)	1,43 (<i>s</i>)

4.1.2 Flavonoides

Os flavonoides são produtos de origem biossintética mista. Eles são biossintetizados através da rota do ácido chiquímico (ou chiquimato) e também do acetato (acetil coenzima A). A via do ácido chiquímico origina o ácido cinâmico e seus derivados (ácidos cafeico, ferúlico, sinápico, etc.) com nove átomos de carbono (ou C6C3), na forma de coenzima A, e a via do acetato origina um tricetídeo com seis átomos de carbono. A condensação de um destes derivados do ácido cinâmico com o tricetídeo gera uma chalcona com 15 átomos de carbono, que é o precursor inicial de toda a classe dos flavonoides. A partir da chalcona, todos os demais derivados flavonoídicos são formados (FIGURA 4.25) (DEWICK, 2002).

Estes metabólitos são importantes não apenas no crescimento e desenvolvimentos de plantas, mas também estão relacionados na defesa contra microrganismos e pragas.

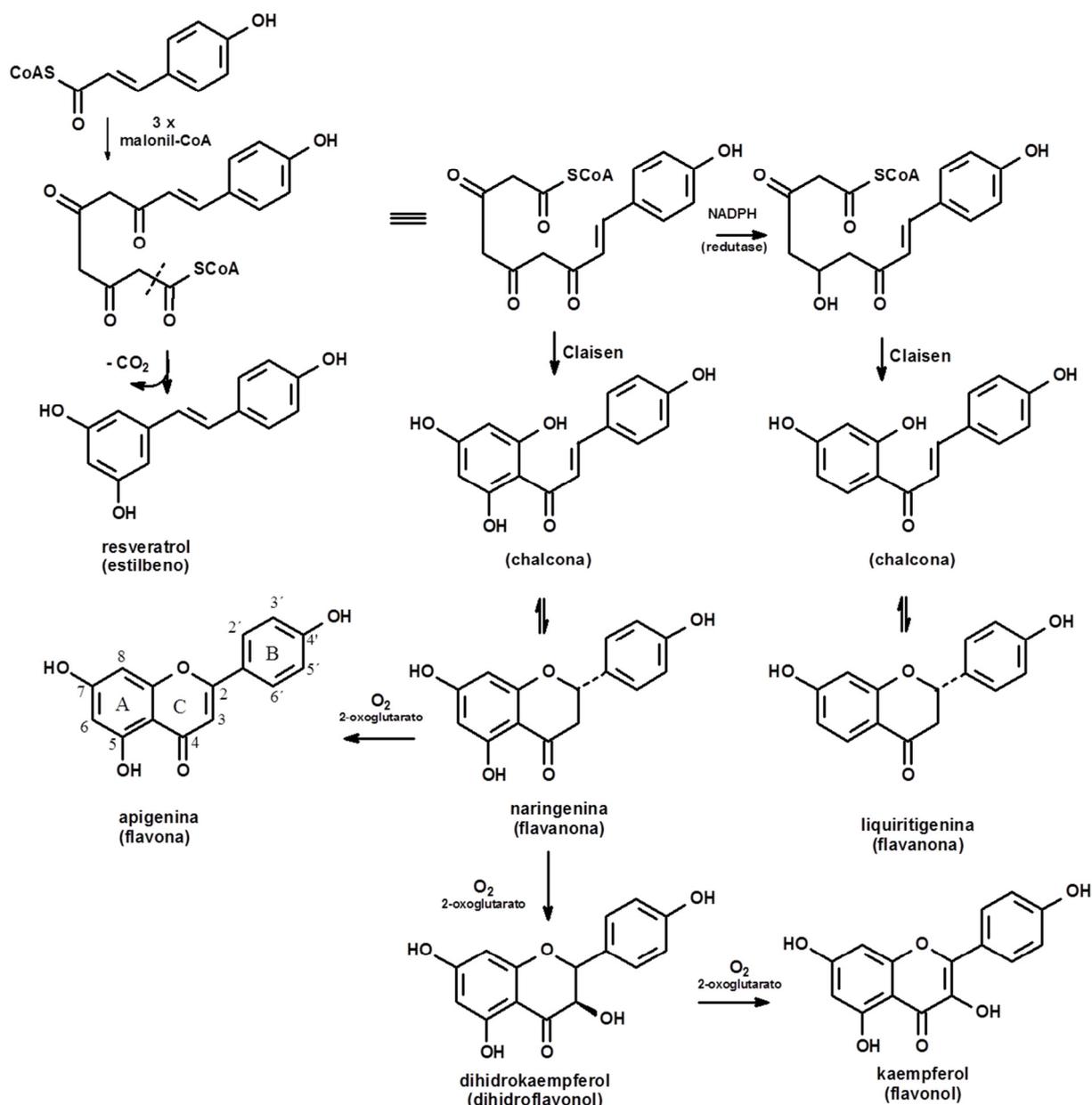


FIGURA 4.25: Proposta para biossíntese de flavonoides (Dewick, 2002).

Os flavonoides isolados são substâncias comumente obtidas em Citrus (TRIPOLI, et. al., 2007). Nesta etapa do trabalho de isolamento de padrões, foram encontrados flavonoides polimetoxilados (PMFs). Estes do gênero citrus têm sido alvo de grande interesse devido à diversidade de atividade biológica que estes apresentam, incluindo propriedades antiinflamatória, anticarcinogênica, antiaterogênica, entre outros (LI, 2006).

Essa classe de compostos apresenta em seus respectivos espectros de RMN ^1H , sinais clássicos que facilitam a identificação dos mesmos. A principal característica desses espectros é o de apresentar diversos singletos intensos na região de δ 4,00, referentes às suas metoxilas (como o próprio nome da classe se

refere, “poli-metoxilados”). Estes costumam apresentar também dois padrões de substituição principais no anel B: substituinte oxigenado na posição 4', ou substituintes oxigenados nas posições 3' e 4', gerando sinais com multiplicidades clássicas, e que serão melhor discutidos a seguir.

4.1.2.1 Identificação dos Flavonoides F1 e F2

As substâncias F1 e F2 foram identificadas em mistura, e foram encontradas nos extratos do caule superior de *Citrus*. Sabe-se que se trata de uma mistura e não de um dímero, pois os sinais apresentam diferentes valores de integrais. Pelas integrais do espectro de RMN ^1H foi possível ainda verificar que a substância **F1** é a majoritária e a **F2** minoritária.

Estas apresentaram-se como um sólido amorfo de coloração amarela, fluorescendo ao ser submetido à radiação UV em análises de CCDA. Por serem substâncias comumente obtidas em Citros, sua identificação estrutural foi feita baseando-se nos deslocamentos de hidrogênios em comparação com os dados da literatura (LI, 2006).

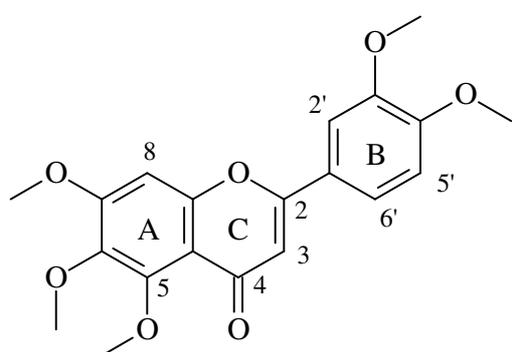
Ambos os flavonoides apresentaram o mesmo perfil de multiplicidades para o anel B, sendo este um anel 1,3,4-trissubstituído. Apresentaram apenas diferenças de substituição para o anel A, e conseqüentemente diferenças na quantidade de metoxilas para cada um.

O espectro de RMN ^1H da substância **F1** (FIGURA 4.27) apresentou sinais em δ_{H} 7,51 (1H, *dd*, $J = 8,4$ e $2,2$ Hz); 7,32 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz); 6,95 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz), que foram associados respectivamente aos hidrogênios H-6', H-2' e H-5' do anel B trissubstituído. O sinal em δ_{H} 6,80 (1H, *s*) foi relacionado a um hidrogênio na posição C-8 do anel A, uma vez que este nesta posição apresenta valores de deslocamento mais desblindados do que quando encontrado em C-6 deste mesmo anel, que seria em torno de δ_{H} 6,40. Já o sinal em δ_{H} 6,61 (1H, *s*) foi relacionado ao hidrogênio na posição 3 do anel C, sendo bastante característico esse valor para as flavonas. Por fim, os sinais em δ_{H} 3,99 (3H, *s*), 3,98 (3H, *s*), 3,97 (3H, *s*), 3,95 (3H, *s*) e 3,91 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos.

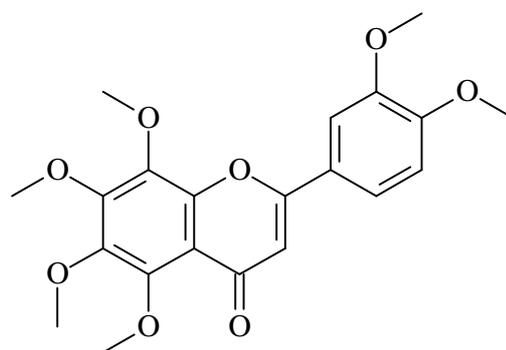
Por sua vez, o espectro de RMN ^1H da substância minoritária **F2** (FIGURA 4.27) apresentou sinais semelhantes, variando apenas os valores de deslocamento químico, encontrando-se estes últimos ligeiramente mais desblindados. Os sinais em δ_{H} 7,56 (1H, *dd*, $J = 8,4$ e $2,2$ Hz); 7,40 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) e 6,99 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz), foram associados respectivamente aos

hidrogênios H-6', H-2' e H-5' do anel B. O sinal em δ_H 6,63 (1H, *s*) foi relacionado ao hidrogênio do anel C. Já os sinais em δ_H 4,09 (3H, *s*), 4,01 (3H, *s*), 3,96 (3H, *s*), 3,94 (3H, *s*) e 3,94 (6H, *s*), foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos.

Os dados discutidos através dos espectros de RMN, juntamente com a comparação desses valores obtidos com aqueles encontrados na literatura (LI, 2006), permitiu a identificação estrutural destas substâncias, sendo elas 3',4',5,6,7-pentametoxiflavona (**F1**) e 3',4',5,6,7,8-hexametoxiflavona (**F2**). (TABELA 4.7).



3',4',5,6,7-pentametoxiflavona (F1) -
Sinensetina



3',4',5,6,7,8-hexametoxiflavona (F2) -
Nobiletina

FIGURA 4.26: Estrutura dos flavonoides F1 e F2.

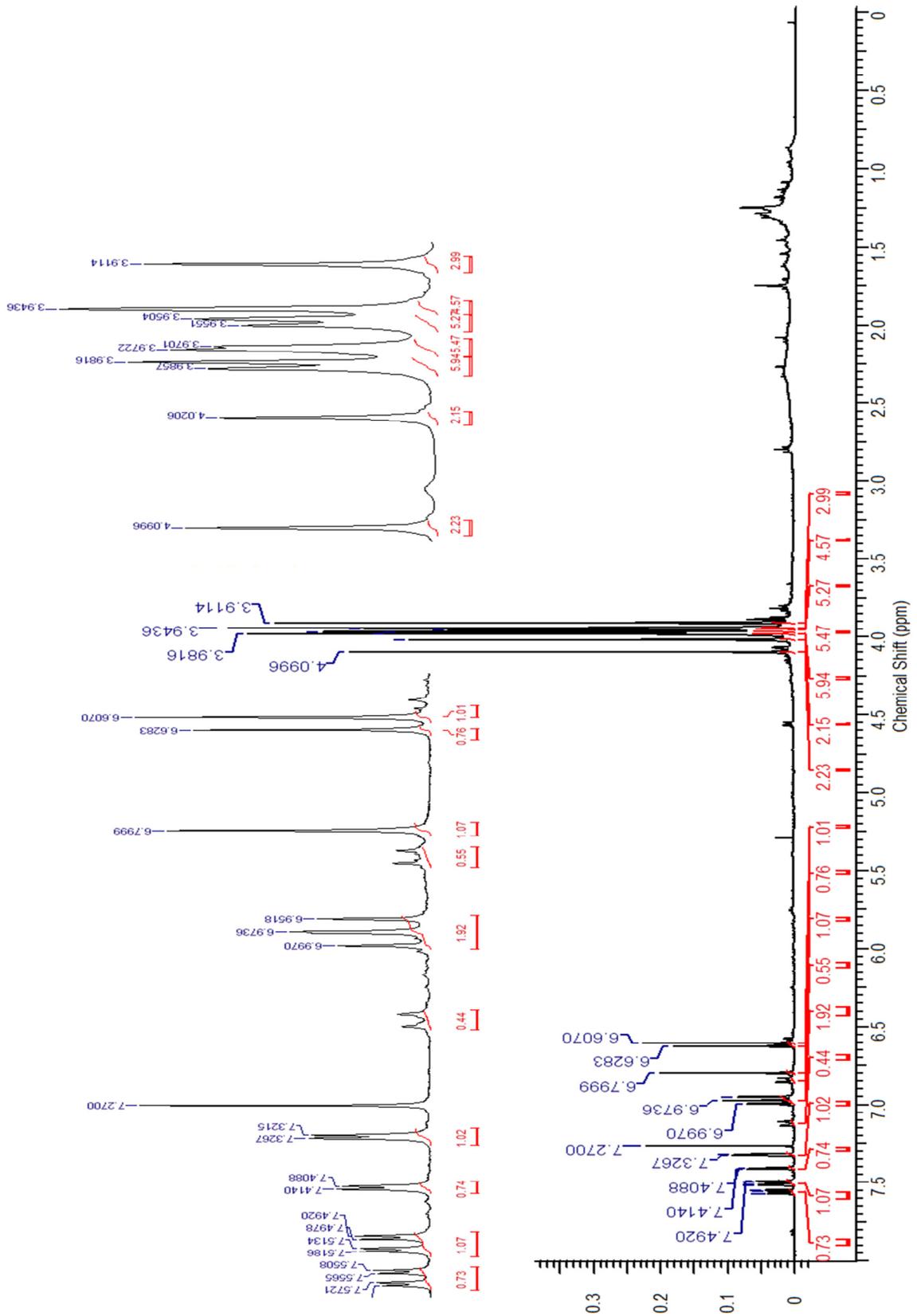


FIGURA 4.27: Espectro de RMN ^1H dos flavonoides F1 e F2 (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 4.7: Dados de RMN ^1H para os flavonóides **F1** e **F2** e comparação com a literatura (LI, 2006):

N° C	^1H F1 (δ)	Literatura F1	^1H F2 (δ)	Literatura F2
3	6,61(1H, <i>s</i>)	6,60(1H, <i>s</i>)	6,63(1H, <i>s</i>)	6,63(1H, <i>s</i>)
8	6,80 (1H, <i>s</i>)	6,80 (1H, <i>s</i>)	NO	NO
2'	7,32 (1H, <i>d</i> , 2,1 Hz)	7,33 (1H, <i>d</i> , 2 Hz)	7,40 (1H, <i>d</i> , 2,1 Hz)	7,42 (1H, <i>d</i> , 2 Hz)
5'	6,95 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)	6,97 (1H, <i>d</i> , 9 Hz)	6,99 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)	7,0 (1H, <i>d</i> , 9 Hz)
6'	7,51 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 2,1 Hz)	7,52 (1H, <i>dd</i> , 9 e 2 Hz)	7,56 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 2,1 Hz)	7,57 (1H, <i>dd</i> , 9 e 2 Hz)
OMe	3,99 (3H, <i>s</i>)	3,99 (3H, <i>s</i>)	4,09 (3H, <i>s</i>)	4,11 (3H, <i>s</i>)
	3,98 (3H, <i>s</i>)	3,99 (3H, <i>s</i>)	4,01 (3H, <i>s</i>)	4,03 (3H, <i>s</i>)
	3,97 (3H, <i>s</i>)	3,98 (3H, <i>s</i>)	3,96 (3H, <i>s</i>)	3,98 (3H, <i>s</i>)
	3,95 (3H, <i>s</i>)	3,97 (3H, <i>s</i>)	3,94 (3H, <i>s</i>)	3,97 (3H, <i>s</i>)
	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,93 (3H, <i>s</i>)	3,94 (6H, <i>s</i>)	3,95 (6H, <i>s</i>)

4.1.2.2 Identificação dos Flavonoides F3-F5

As substâncias **F3**, **F4** e **F5** foram encontradas nos extratos do caule superior do citros estudado, e isoladas através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR (3.4.2.3).

Os flavonoides apresentaram o mesmo perfil de multiplicidades para o anel B (sendo este 1,3,4-trissubstituído) apresentando diferenças de substituição para o anel A, e conseqüentemente diferenças na quantidade de metoxilas para cada um.

O espectro de RMN ^1H da substância **F3** (FIGURA 4.29) apresentou sinais em δ_{H} 7,56 (1H, *dd*, $J = 8,4$ e $2,2$ Hz); 7,54 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz); 6,95 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz), que foram associados respectivamente aos hidrogênios H-6', H-2' e H-5' do anel B trissubstituído. O sinal em δ_{H} 6,86 (1H, *s*) foi relacionado ao hidrogênio na posição C-8 do anel A. Já o sinal em δ_{H} 6,70 (1H, *s*) foi

relacionado ao hidrogênio na posição 3 do anel C. Os sinais em δ_H 3,99 (3H, *s*), 3,98 (3H, *s*) e 3,84 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos.

O espectro de RMN 1H do flavonoide **F4** (FIGURA 4.30) apresentou sinais semelhantes, variando apenas os valores de deslocamento químico. Os sinais em δ_H 7,58 (1H, *dd*, *J* = 8,1 e 2,2 Hz); 7,57 (1H, *d*, *J* = 2,2 Hz) e 6,96 (1H, *d*, *J* = 8,1 Hz), foram associados respectivamente aos hidrogênios H-6', H-2' e H-5' do anel B, enquanto o sinal em δ_H 6,71 (1H, *s*) foi relacionado ao hidrogênio H-3 do anel C. Os sinais em δ_H 4,09 (3H, *s*), 3,98 (3H, *s*), 3,97 (3H, *s*) e 3,90 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos.

Por sua vez, o espectro de RMN 1H do flavonoide **F5** (FIGURA 4.31) também apresentou sinais semelhantes, variando apenas os valores de deslocamento químico e quantidade de metoxilas aromáticas. Os sinais em δ_H 7,66 (1H, *dd*, *J* = 8,6 e 2,2 Hz); 7,55 (1H, *d*, *J* = 2,2 Hz) e 7,13 (1H, *d*, *J* = 8,6 Hz), foram associados respectivamente aos hidrogênios do anel B, os sinais em δ_H 6,86 (1H, *s*) e 6,73 foram relacionados ao anel B e C, respectivamente. Os sinais em δ_H 3,99 (3H, *s*), 3,95 (3H, *s*), 3,93 (3H, *s*) e 3,84 (3H, *s*) foram associados a grupos metilas ligados a heteroátomos.

Ao comparar o número de hidrogênios e metoxilas para os flavonoides em questão, verifica-se que é menor que o necessário, sugerindo a presença de outros substituintes na molécula, provavelmente hidroxilas. O número de metoxilas e hidroxilas para cada composto pôde ser comprovados através dos experimentos de *full scan* de espectrometria de massas, via inserção direta dos flavonoides aprisionados (FIGURA 4.32). Para o composto **F3**, realizado no modo negativo, verifica-se o íon *m/z* 343, confirmando a massa de 344 Da para a fórmula molecular proposta $C_{18}H_{16}O_7$, sugerindo a presença de 3 metoxilas e duas hidroxilas. Para o **F4**, ionizado no modo negativo, encontra-se o íon *m/z* 373, confirmando a massa de 374 Da para a fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_8$, sugerindo assim a presença de 4 metoxilas e 2 hidroxilas. Para o flavonoide **F5**, onde operou-se no modo positivo, verifica-se os íons *m/z* 359 e 381, onde o primeiro refere-se ao íon $[M+H]^+$ e o segundo ao íon $[M+Na]$, aduto bastante comum no modo positivo de ionização. Confirmou-se a massa de 358 Da para fórmula molecular proposta $C_{19}H_{18}O_7$, sugerindo dessa maneira a presença de 4 metoxilas e 1 hidroxila.

Tentou-se realizar experimentos de duas dimensões para localizar a posição exata dos grupos metoxilas nas moléculas, porem a quantidade de amostra aprisionada não foi suficiente para a realização destes.

Os dados discutidos através dos espectros de RMN, juntamente com as massas moleculares obtidas, permitiu a identificação estrutural da substância **F5**, sendo ela 5-hidroxi-sinensetina. Já para os flavonóides **F3** e **F4** foi possível apenas a identificação estrutural parcial destes, uma vez não foi possível o posicionamento exato dos grupos oxigenados substituintes (FIGURA 4.28).

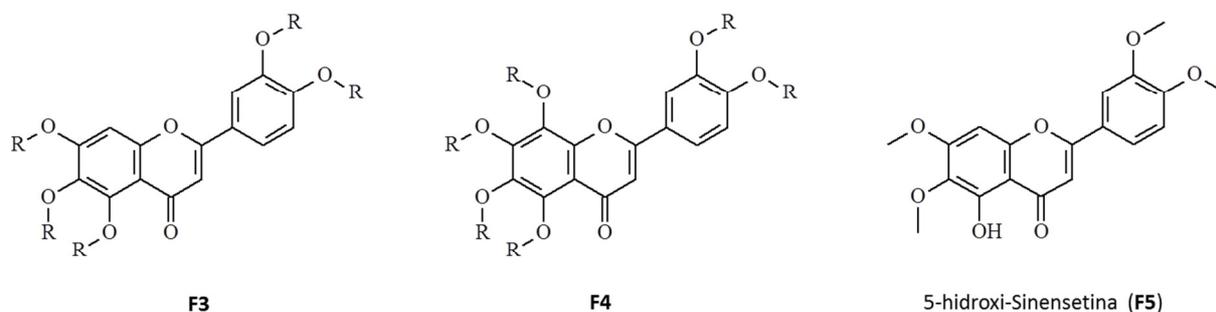


FIGURA 4.28: Estrutura molecular para os flavonoides **F3**, **F4** e **F5**, onde grupos R podem ser grupos –OH ou –OCH₃.

TABELA 4.8: Dados de RMN ¹H para os flavonóides **F3**, **F4** e **F5** (600 MHz, metanol-d₄).

Nº C	¹ H F3 (δ)	¹ H F4 (δ)	¹ H F5 (δ)
3	6,70 (1H, <i>s</i>)	6,71(1H, <i>s</i>)	6,73(1H, <i>s</i>)
8	6,86 (1H, <i>s</i>)	NO	6,86 (1H, <i>s</i>)
2'	7,54 (1H, <i>d</i> , 2,2 Hz)	7,57 (1H, <i>d</i> , 2,2 Hz)	7,55 (1H, <i>d</i> , 2,2 Hz)
5'	6,95 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)	6,96 (1H, <i>d</i> , 8,1 Hz)	7,13 (1H, <i>d</i> , 8,6 Hz)
6'	7,56 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 2,2 Hz)	7,58 (1H, <i>dd</i> , 8,1 e 2,2 Hz)	7,66 (1H, <i>dd</i> , 8,6 e 2,2 Hz)
OMe	3,99 (3H, <i>s</i>)	4,09 (3H, <i>s</i>)	3,99 (3H, <i>s</i>)
	3,98 (3H, <i>s</i>)	3,98 (3H, <i>s</i>)	3,95 (3H, <i>s</i>)
	3,84 (3H, <i>s</i>)	3,97 (3H, <i>s</i>)	3,93 (3H, <i>s</i>)
		3,90 (3H, <i>s</i>)	3,84 (3H, <i>s</i>)

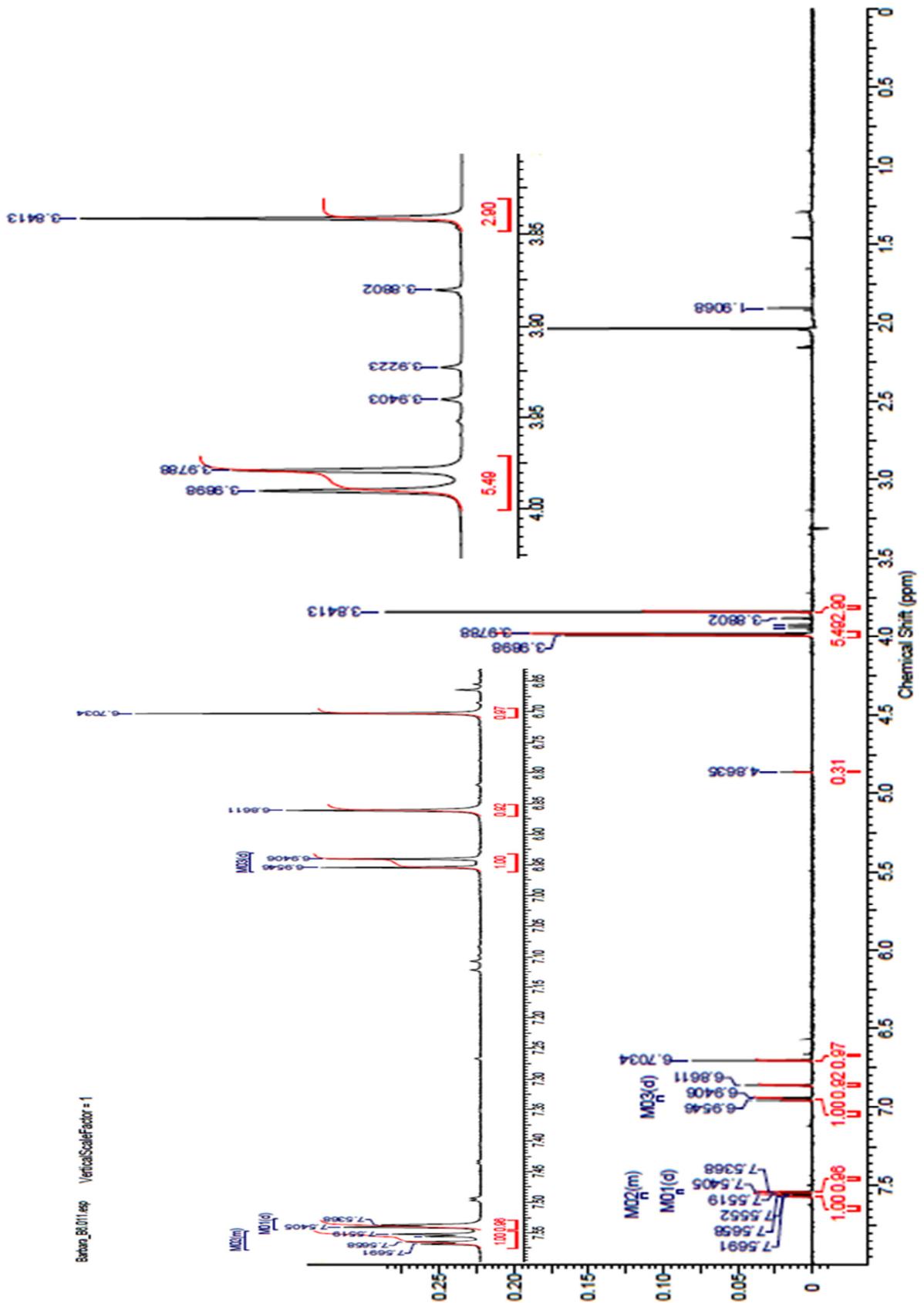


FIGURA 4.29: Espectro de RMN ^1H do flavonóide **F3** (Metanol- d_4 , 600 MHz).

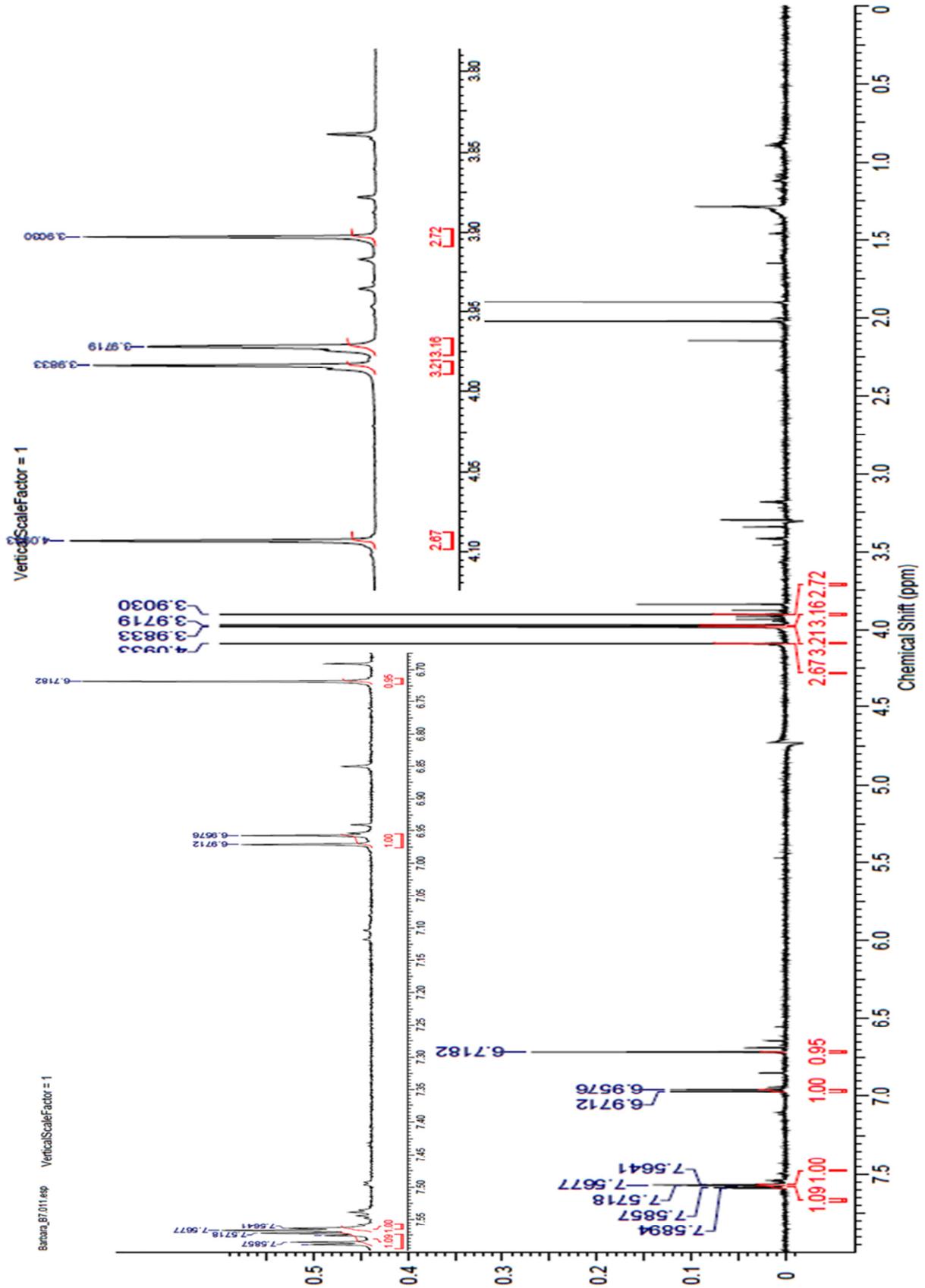


FIGURA 4.30: Espectro de RMN 1H do flavonóide **F4** (Metanol-d4, 600 MHz).

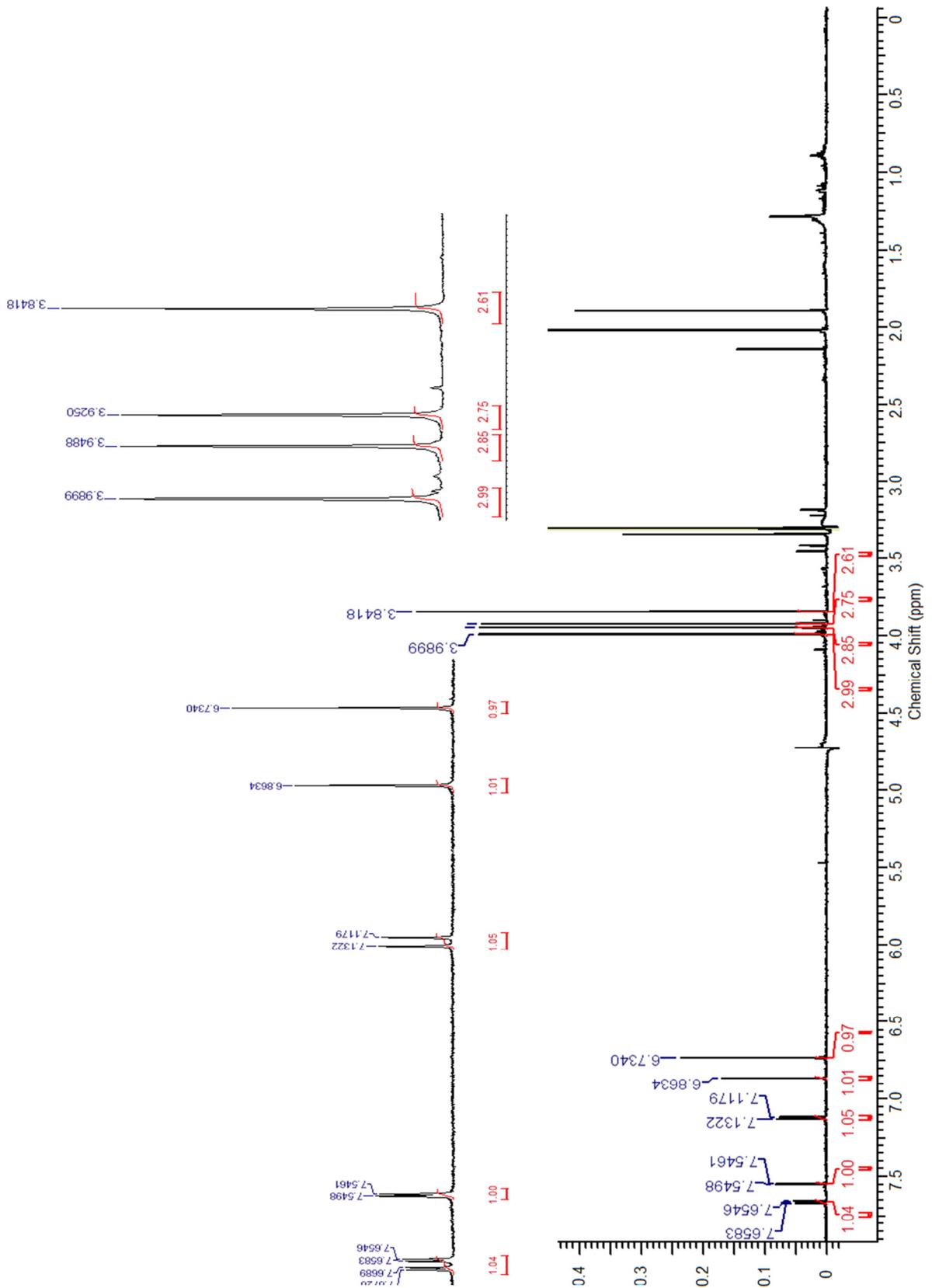


FIGURA 4.31: Espectro de RMN ^1H do flavonóide **F5** (Metanol- d_4 , 600 MHz).

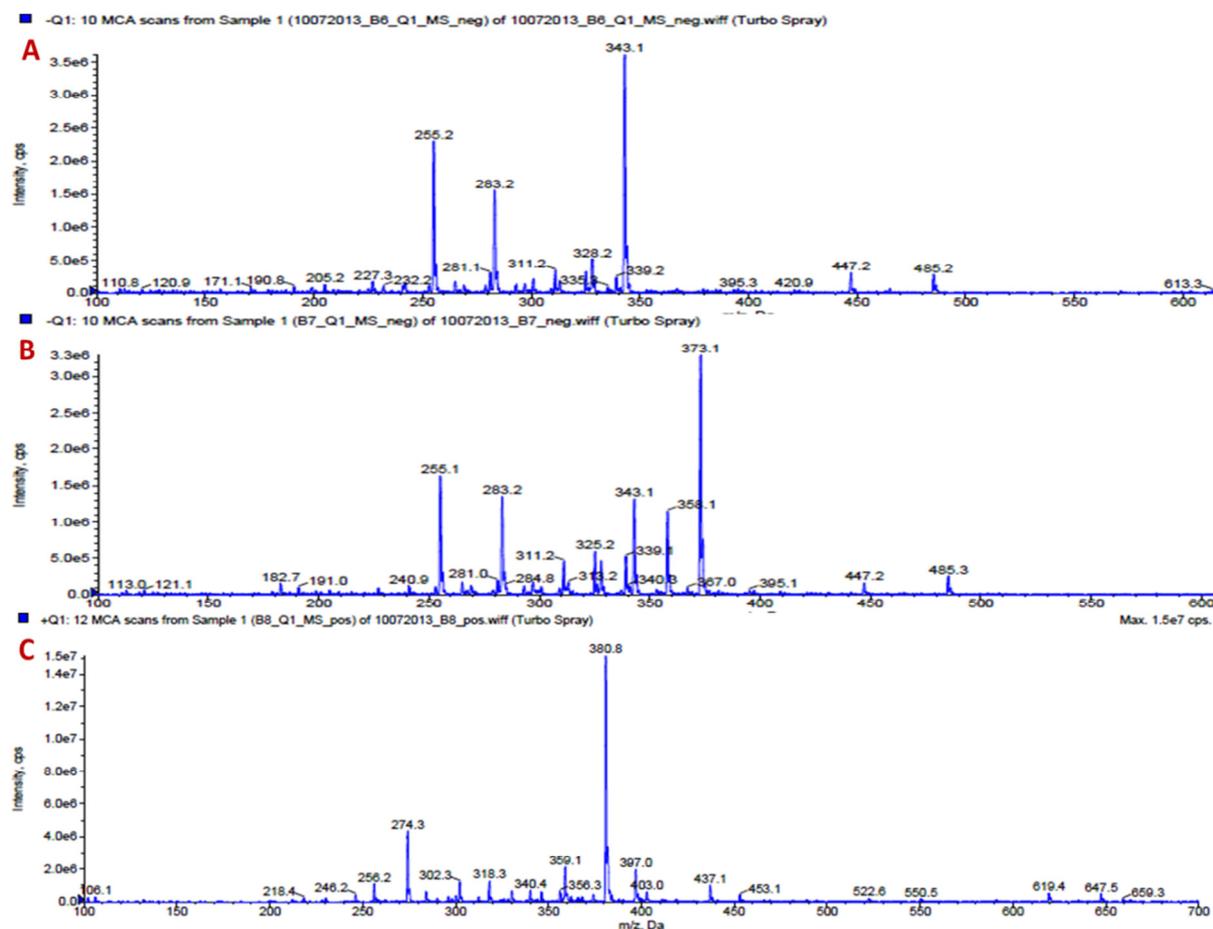


FIGURA 4.32: Espectro de massas *full scan* para os flavonoides **F3** (A: ESI, modo negativo), **F4** (B: ESI, modo negativo) e **F5** (C: ESI, modo positivo).

4.1.3 Fito-hormônio

Em plantas, assim como nos animais, muitos processos bioquímicos e fisiológicos são regulados por hormônios. Fito hormônios são substâncias orgânicas de ocorrência natural que, em baixas concentrações, alteram o crescimento e desenvolvimento da planta. Estas podem ser transportadas a partir do tecido de onde foi sintetizada para um tecido alvo específico. São cinco principais grupos de hormônios naturais em plantas, sendo eles: (1) auxinas, representadas pelo ácido indolo-acético (AIA); (2) giberelinas; (3) citocininas; (4) ácido abscísico (ABA) e (5) etileno.

O ácido abscísico (ABA) foi originalmente considerado um inibidor de crescimento. Sabe-se hoje que, como outros hormônios vegetais, ele tem várias funções durante o ciclo de vida de uma planta, tais como respostas ao estresse

hídrico, inibição da germinação de sementes e o desenvolvimento dos gomos. Estes compostos ajudam as plantas no crescimento e desenvolvimento do caule, estando envolvido diretamente em respostas ao estresse hídrico, promovendo o desenvolvimento de raízes. Cada uma de suas funções é determinada em termos do desenvolvimento e meio ambiente. O ABA está presente e também é distribuído por todas as plantas superiores, mas pode também ser produzido por certas algas e por vários fungos patogênicos (ZEEVAART, 1988).

4.1.3.1 Identificação da Substância FH1

A substância **FH1** foi isolada da fração do caule superior de *Citrus*. Esta se apresentou, após purificação, como um sólido cristalino de coloração branca. Esta substância foi identificada através da realização dos experimentos RMN de ^1H e ^{13}C em 1D e 2D (em metanol- d_4), e também por comparação com dados da literatura.

O espectro de RMN ^1H para essa substância (FIGURA 4.34), mostrou um par de dubletos em δ_{H} 7,77 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz) e 6,23 (1H, *d*, $J = 16,1$ Hz), característicos de acoplamentos de hidrogênios olefínicos vicinais em *trans*. Seus valores de deslocamento encontram-se bastante desblindados devido à conjugação com a carboxila em C1. Nessa região do espectro ainda foi possível observar a presença de dois singletos em δ_{H} 5,92 (1H, *s*) e 5,74 (1H, *s*), referindo-se estes a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . Foi possível verificar a presença de mais um par de dubletos, em campo mais alto, em δ_{H} 2,53 (1H, *d*, $J = 17,0$ Hz) e 2,18 (1H, *d*, $J = 17,0$ Hz), referindo-se estes respectivamente aos hidrogênios axial e equatorial do C-5', apresentando devido a esta relação uma constante de acoplamento grande. No espectro de RMN ^1H ainda foi possível observar quatro sinais bastante intensos, sendo eles em δ_{H} 2,03 (3H, *s*), 1,93 (3H, *s*), 1,07 (3H, *s*) e 1,03 (3H, *s*). Devido aos seus respectivos deslocamentos químicos, multiplicidades e integrais, concluiu-se tratar de metilas, sendo estas atribuídas respectivamente às posições C-3, C-2' e C-6'.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 15 sinais (FIGURA 4.35), estando estes divididos em 2 sinais de carbonos carbonílicos, 6 sinais de carbonos sp^2 , 3 sinais de carbonos sp^3 , e 4 sinais referentes às metilas. No espectro de HSQC foi possível correlacionar os sinais de hidrogênio com seus respectivos carbonos diretamente ligados, como mostrado na FIGURA 4.36.

Os dados discutidos através dos experimentos de RMN, juntamente com a comparação desses valores obtidos com os encontrados na literatura

(MILBORROW, 1984 e SMITH, 2006), permitiram a identificação da estrutura como sendo o ácido abscísico (TABELA 4.9). Os valores de deslocamento químico para os dados da literatura foram medidos com o solvente CDCl_3 .

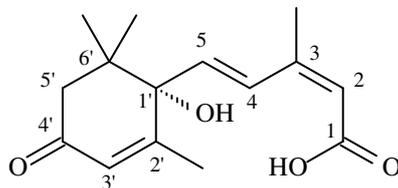


FIGURA 4.33: Estrutura molecular para o ácido abscísico.

TABELA 4.9: Dados de RMN ^1H para o ácido abscísico, e comparação com a literatura:

$\text{N}^{\circ} \text{C}$	^1H (δ)	^{13}C (δ)	Literatura (δ)	Literatura (δ)
1	-	170,0	-	170,6
2	5,74 (1H, <i>s</i>)	120,21	5,77 (1H, <i>s</i>)	117,9
3	-	150,66	-	151,6
4	6,23 (1H, <i>d</i> , 16,0)	129,62	7,81(1H, <i>d</i>)	128,3
5	7,77 (1H, <i>d</i> , 16,0)	137,83	6,17(1H, <i>d</i>)	136,8
1'	-	80,74	-	79,9
2'	-	166,72	-	162,6
3'	5,92 (1H, <i>s</i>)	127,70	5,98 (1H, <i>s</i>)	127,1
4'	-	201,19	-	198,1
5' ax	2,53 (1H, <i>d</i> , 17,0)	50,81	2,30 (1H, <i>d</i>)	49,7
5' eq	2,18 (1H, <i>d</i> , 17,0)	''	2,50 (1H, <i>d</i>)	''
6'	-	43,00	-	41,6
Me - 6'	1,03 (3H, <i>s</i>)	24,80	1,04 (3H, <i>s</i>)	24,3
Me - 6'	1,07 (3H, <i>s</i>)	23,71	1,12 (3H, <i>s</i>)	21,1
Me - 2'	1,93 (3H, <i>s</i>)	19,77	1,93 (3H, <i>s</i>)	19,1
Me - 3	2,03 (3H, <i>s</i>)	21,36	2,05 (3H, <i>s</i>)	21,4

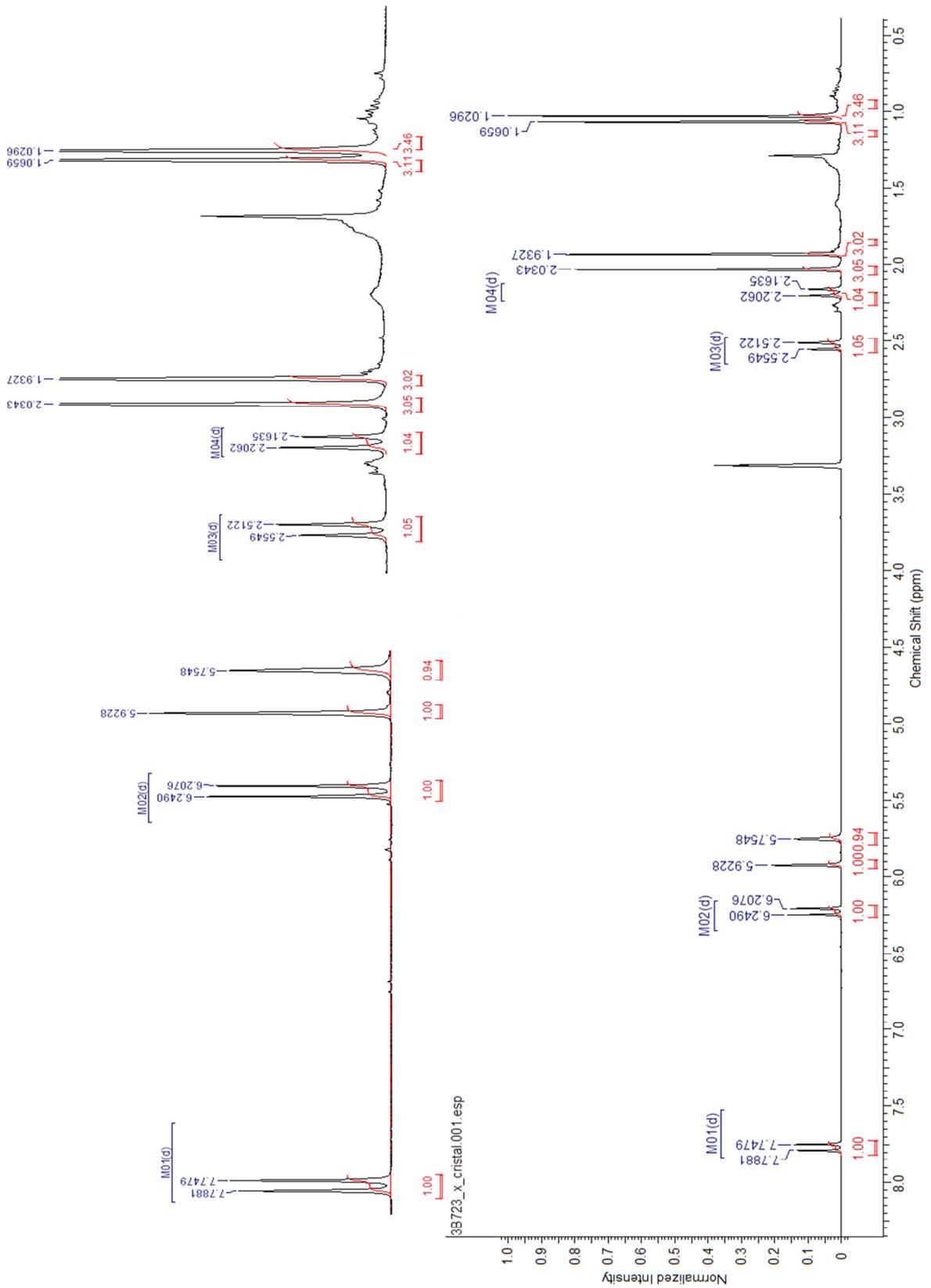


FIGURA 4.34: Espectro de RMN ^1H do ácido abscísico (Metanol- d_4 , 400 MHz).

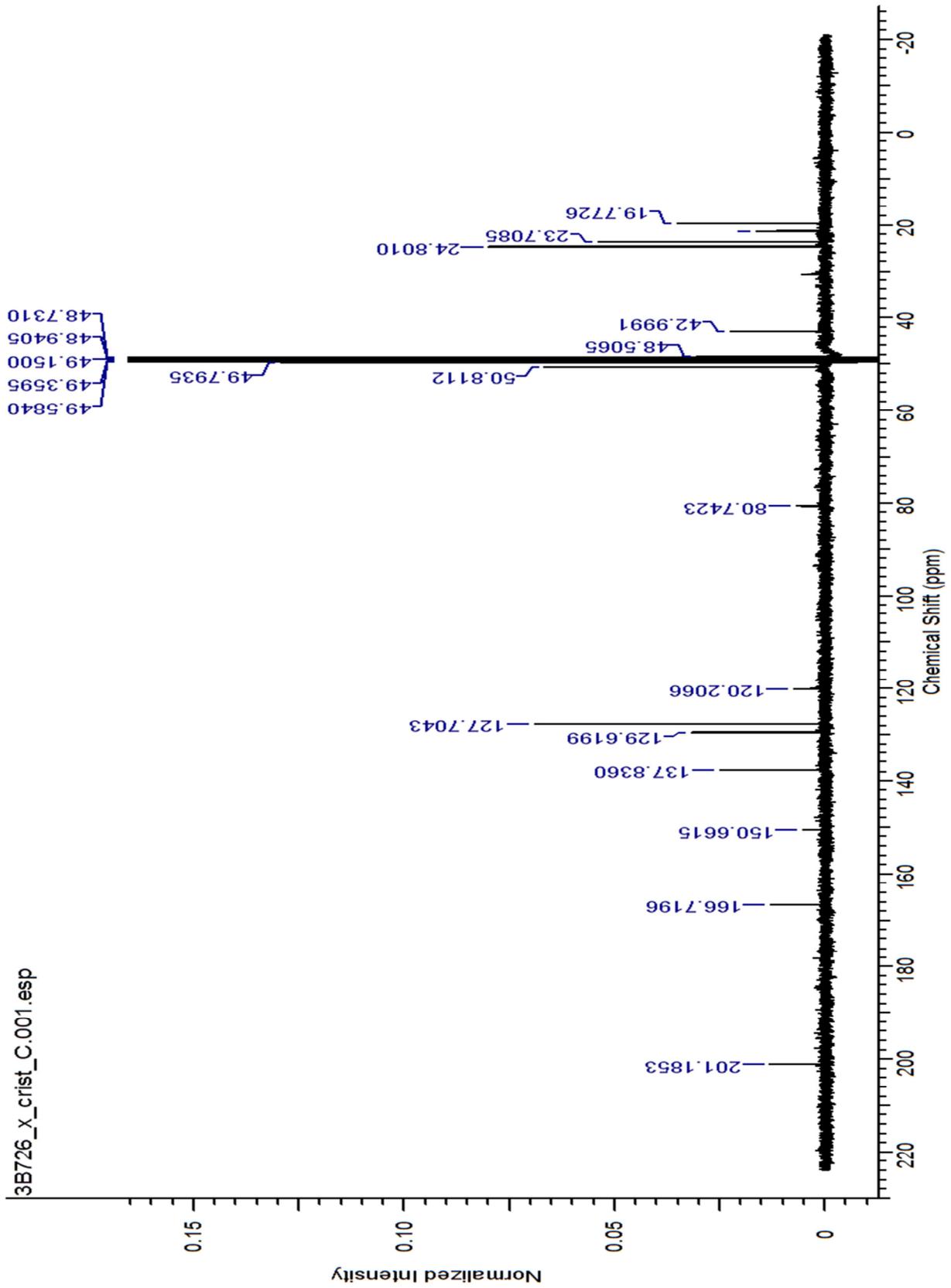


FIGURA 4.35: Espectro de RMN ^{13}C do ácido abscísico (Metanol-d₄, 400 MHz).

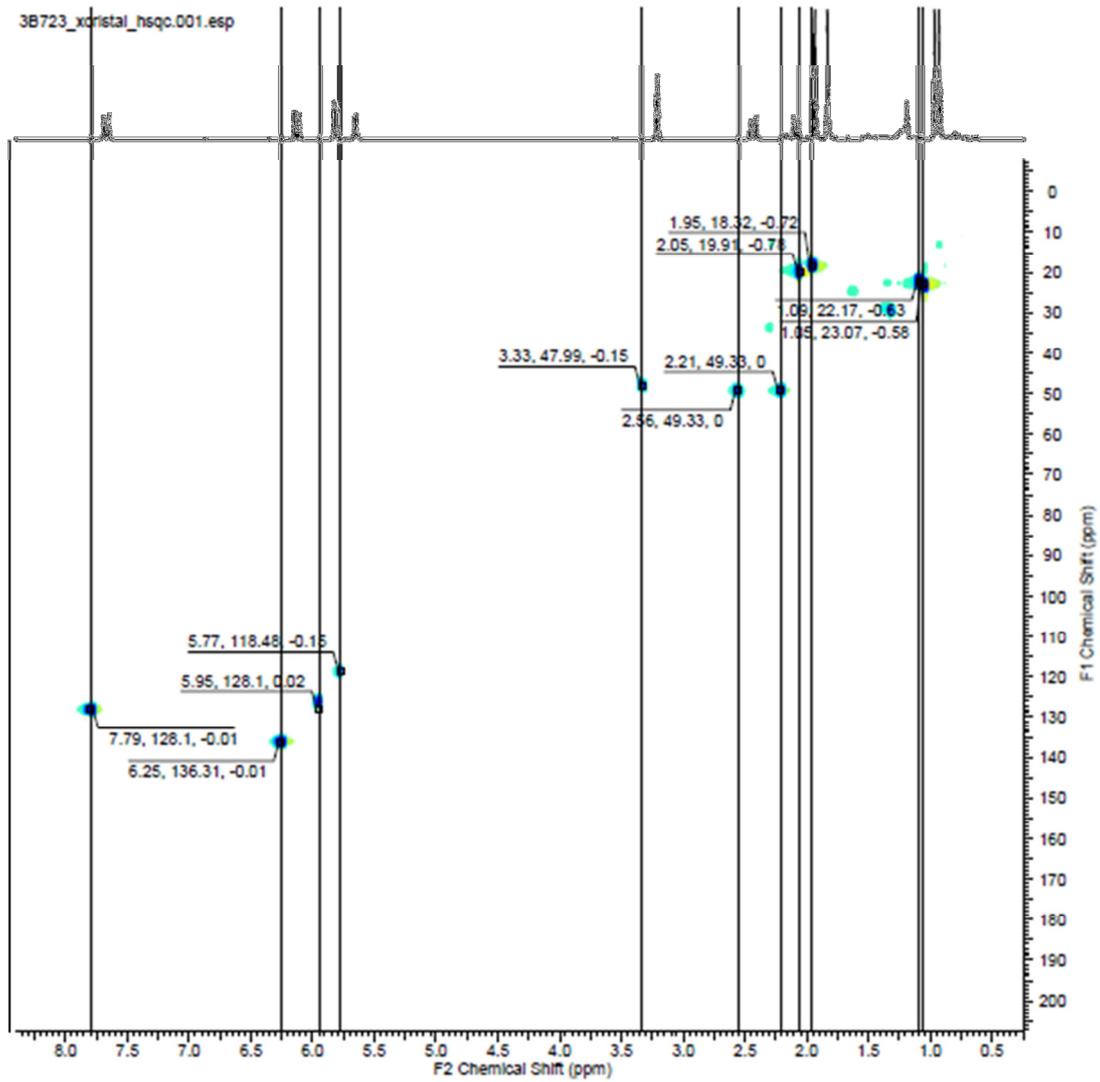


FIGURA 4.36: Mapa de contorno HSQC do ácido abscísico (Metanol-d4).

4.1.4 Esteróides

Os esteróides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol, mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14 (DEWICK, 2002). Originados das frações lipídicas de vegetais e animais o sitosterol, estigmasterol e campesterol são os esteróides mais frequentemente encontrados no reino vegetal. Por apresentarem propriedades físico-químicas bastante semelhantes, existe uma grande dificuldade em suas separações, aparecendo esses esteróides na maioria das vezes em mistura. Por esse motivo, suas identificações costumam ser realizadas em mistura, principalmente através de CG/EM.

4.1.4.1 Identificação dos Esteróides E1, E2 e E3.

Estes esteróides foram obtidos do fracionamento do extrato diclorometânico do caule (2632CDD). Estes foram identificados através da análise do espectro de RMN ^1H , por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e também por comparação com dados da literatura. Foram identificadas em mistura, apresentando-se como um sólido branco amorfo. Em CCDA não apresentavam fluorescência quando expostos à radiação UV e apresentavam uma coloração violeta quando revelados com vanilina.

O espectro de RMN ^1H da mistura (FIGURA 4.37) apresentou sinais característicos de esteroides. Os hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,36 (*dl*) e 5,10 (*m*) (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz) foram associados respectivamente ao H-6 do esqueleto do esteroide e aos vinílicos da cadeia lateral do estigmasterol (substância **2**). O sinal em δ_{H} 3,50 (*m*) foi associado ao hidrogênio carbinólico H-3. Os muitos sinais em região mais blindada (δ_{H} 0,6-2,4) foram associados aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos da mistura dos três esteroides. Através da análise por CG/EM, foi possível confirmar a existência de três substâncias. A presença da mistura de sitosterol (**1**), estigmasterol (**2**) e campesterol (**3**) (FIGURA 4.39) foram confirmadas através dos picos referentes ao íon molecular em m/z 414, 412 e 400 (FIGURA 4.38), que conferiram com as fórmulas moleculares das três substâncias $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ e $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$, respectivamente.

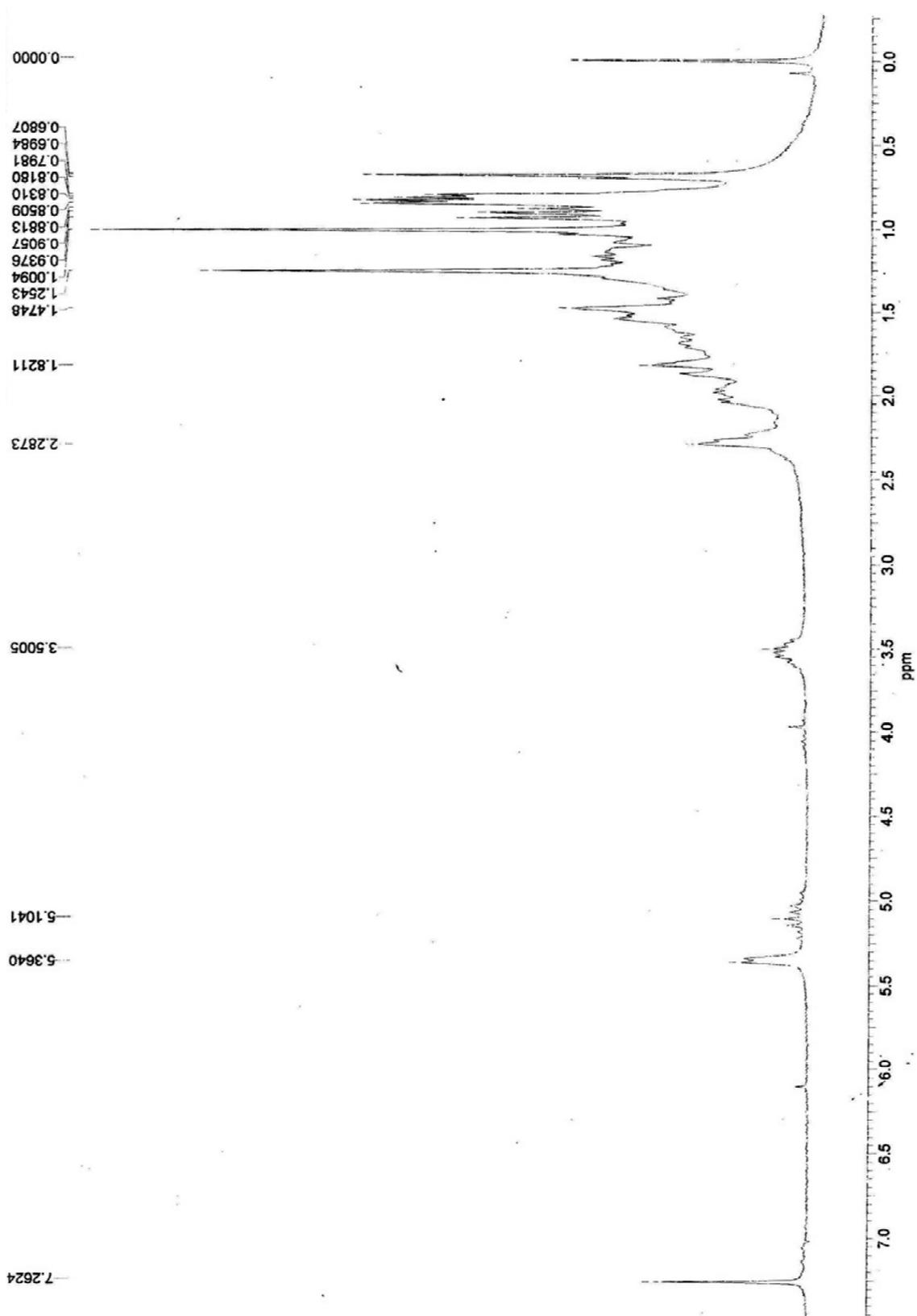


FIGURA 4.37: Espectro de RMN 1H (CDCl₃, 400MHz) da mistura dos esteróides E1, E2 e E3.

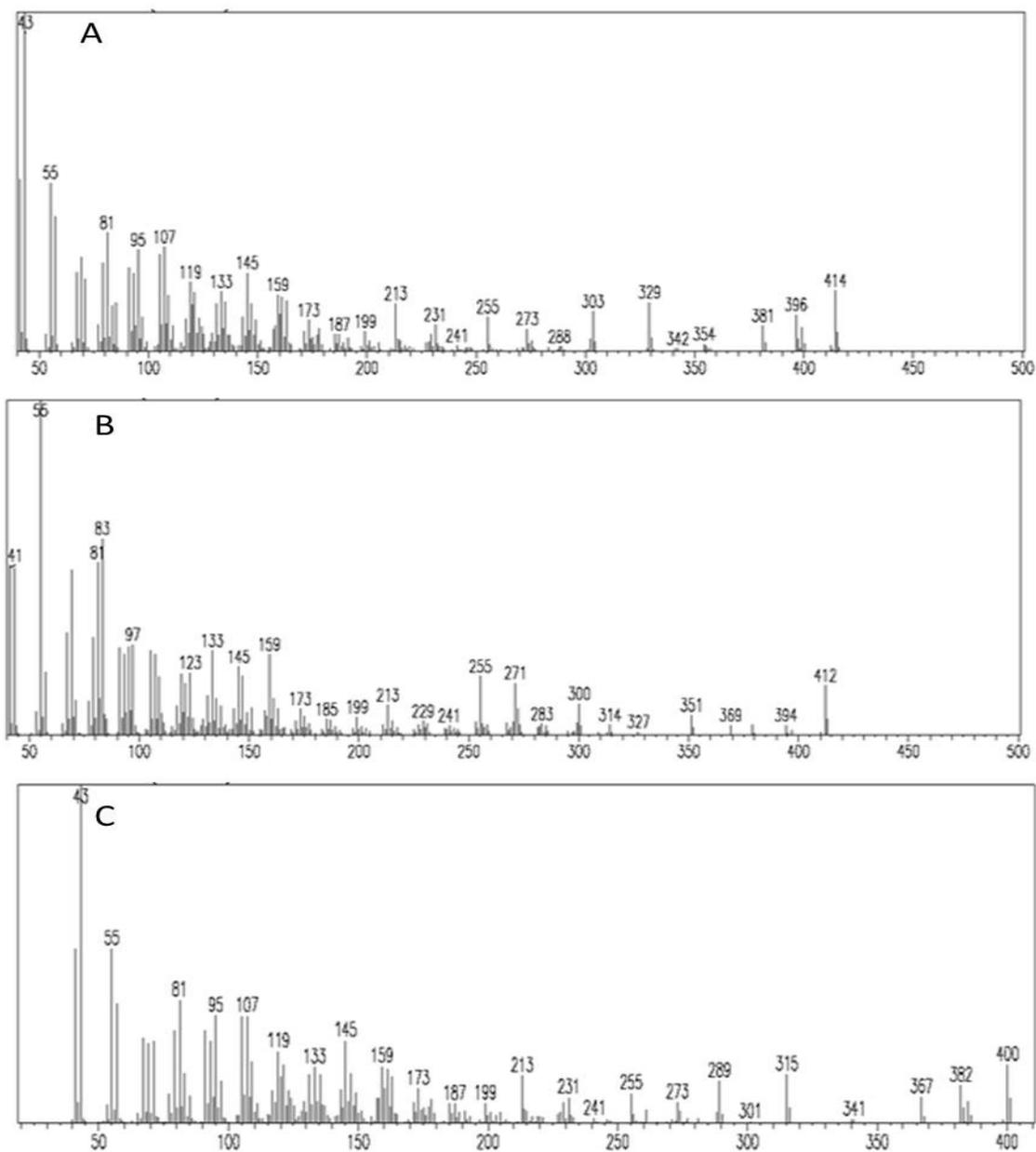


FIGURA 4.38: Espectro de massas via GC-MS de **E1** (A); **E2** (B) e **E3** (C) (IE = 70 eV).

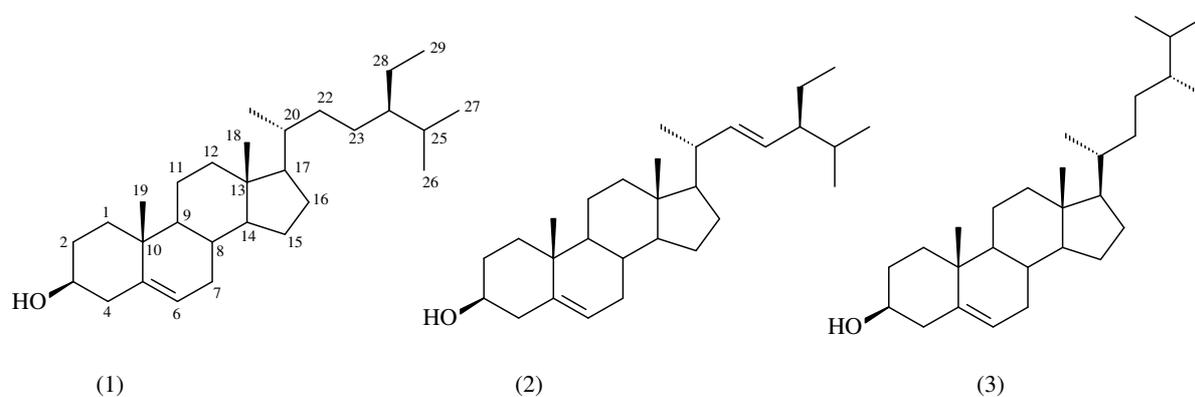


FIGURA 4.39: Estrutura dos esteróides Sitosterol (**E1**), Estigmasterol (**E2**) e Campesterol (**E3**).

4.2 Separações cromatográficas obtidas dos diferentes extratos de citros por LC-UV

Para avaliar possíveis diferenças no perfil químico das mudas sadias e infectadas com HLB, realizou-se um piloto para iniciar esses estudos de comparação através da técnica LC-UV, que será mostrado a seguir. A partir da técnica mencionada, procurou-se avaliar a variação de perfil químico através da comparação dos cromatogramas entre os tratamentos sadios e infectados, procurando diferenças quantitativas ou qualitativas das bandas entre eles. Todos os resultados foram obtidos com plantas da mesma idade e nas mesmas condições, evitando assim resultados equivocados de quantificação e de variação do perfil químico devido a fatores como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, etc.

Optou-se por eluição gradiente é feita pois as substâncias presentes na amostra apresentaram ampla faixa de polaridade. Nesses casos, nenhuma condição isocrática consegue, ao mesmo tempo, oferecer boa resolução, tempo de análise adequado e pequeno alargamento de bandas. Quando isso acontece, o modo de eluição gradiente é a melhor opção a ser adotada, pois permite uma retenção adequada de todos os componentes de interesse, e conseqüentemente, as bandas cromatográficas podem ser melhor detectadas (SNYDER, 1997). Pôde-se concluir que a técnica de extração apresentou uma boa reprodutibilidade. Os cromatogramas dos extratos das mudas infectadas dos diferentes órgãos estudados foram utilizados como modelo para mostrar a reprodutibilidade do método (FIGURA 4.40), entretanto, todos os experimentos, para ambos os tratamentos, foram realizados em triplicata. Confirmada a reprodutibilidade da extração foi realizada a comparação entre o tratamento sadio e o tratamento doente para cada parte da planta. A FIGURA 4.41 mostra a comparação dos cromatogramas dos extratos sadios e infectados com HLB, obtidos de todas as partes vegetais da espécie estudada. Realizado uma análise visual dos cromatogramas foi possível verificar grande similaridade das bandas cromatográficas, dentro de um mesmo órgão estudado. Não foi possível verificar, para nenhum dos diferentes órgãos, alguma diferença qualitativa entre os tratamentos. Algumas das bandas cromatográficas diferenciaram-se apenas em intensidades nas respectivas matrizes analisadas. Para essas bandas que mostraram diferença quantitativa entre os cromatogramas, houve o interesse em identificá-las. Para isso, recorreu-se à técnica de HPLC-UV-SPE-NMR, que será discutida nos próximos itens.

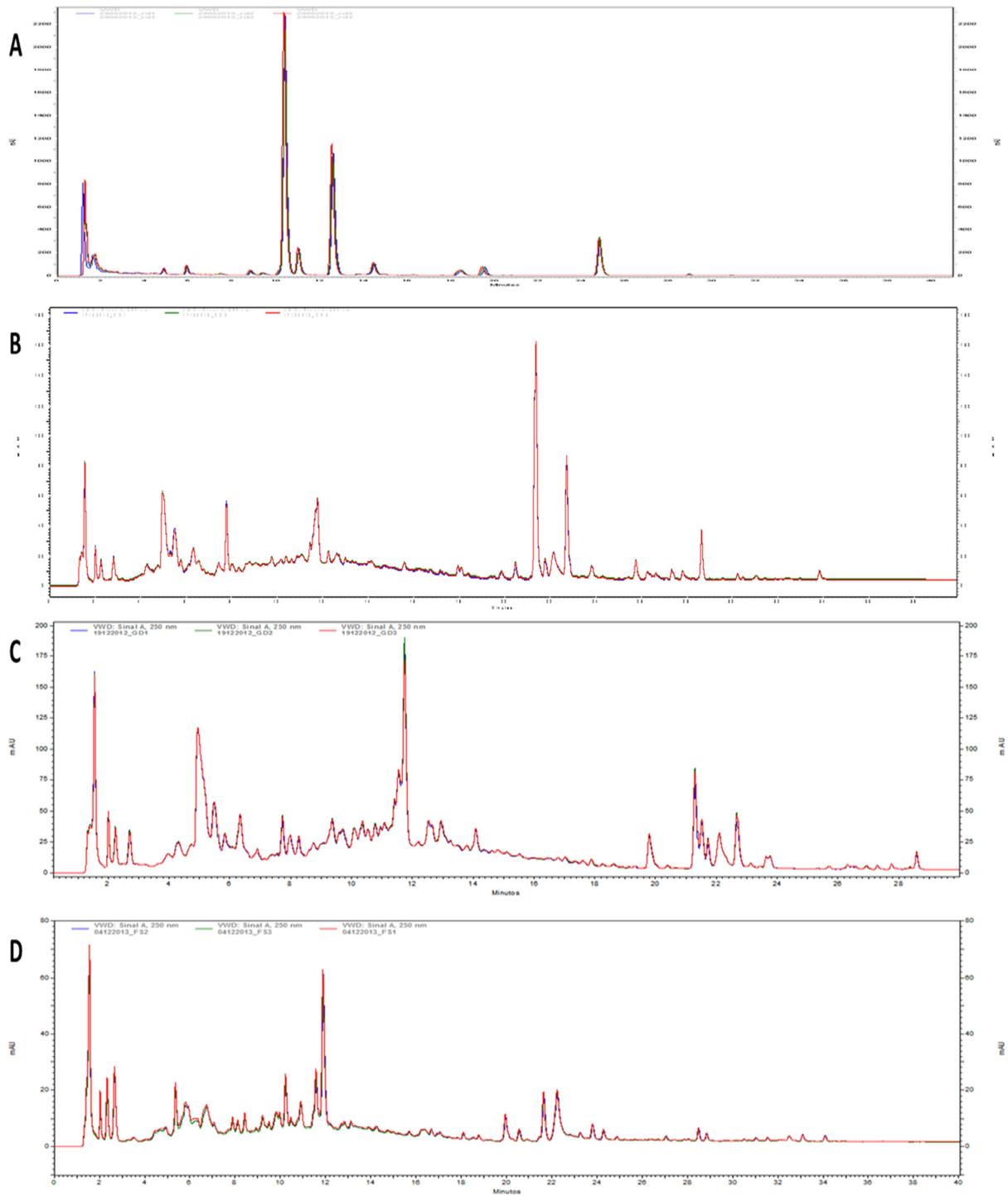


FIGURA 4.40: Cromatogramas sobrepostos das replicatas (n=3) dos extratos: das raízes dos citros estudados (A), do caule do porta enxerto (B), do caule da copa (C), e das folhas (D). Amostras infectadas com HLB. Obtidos através da técnica LC-UV.

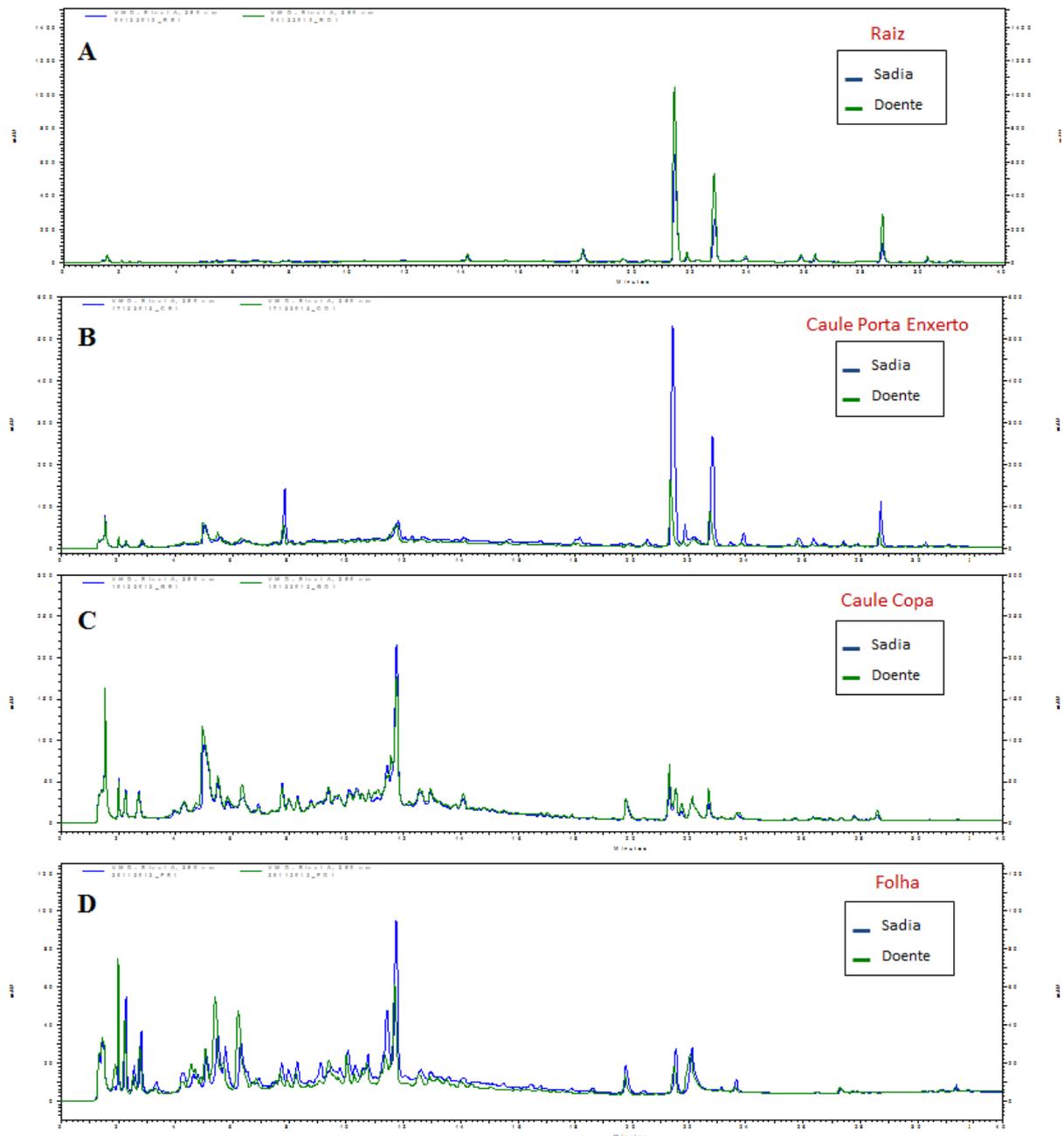


FIGURA 4.41: Cromatogramas obtidos dos diferentes órgão de citros, obtidos através da técnica LC-UV. Comparação de plantas saudias e infectadas com HLB. A: Raízes; B: Caule porta enxerto; C: Caule Copa; D: Folhas.

4.3 Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-UV-SPE-NMR

Como mencionado anteriormente, os diferentes órgãos da planta estudada mostraram diferentes perfis cromatográficos, e foi possível verificar diferenças quantitativas entre estes ao comparar os tratamentos saudios e

infectados. Assim surgiu o interesse em identificar essas bandas que variaram entre os cromatogramas, a fim de se encontrar os compostos que pudessem estar relacionados ao mecanismo de defesa da planta.

Nessa técnica, as bandas cromatográficas foram detectadas por UV e em seguida foram retidas nos cartuchos de SPE individualmente. A mesma banda, provenientes de subseqüentes injeções, foi aprisionada no mesmo cartucho para aumentar a sensibilidade da medida final de RMN. Os picos cromatográficos de interesse, ao saírem da cela do detector de DAD, foram diluídos com fase aquosa antes de serem aprisionados no módulo de SPE. Isto altera o coeficiente de partição e aumenta a afinidade da molécula de interesse com a fase estacionária do cartucho, gerando conseqüentemente melhores resultados.

Após todas as corridas cromatográficas serem concluídas, os cartuchos foram secos com nitrogênio para remover o solvente grau HPLC, e foram então eluídos com solventes deuterados para medições espectroscópicas. Dessa maneira, a separação pôde ser realizada com solventes grau HPLC, reduzindo os custos para a cromatografia.

A técnica de LC-UV-SPE-NMR neste trabalho utilizou-se o critério de *threshold* para indicar o início e o final da etapa de aprisionamento. No LC-UV-SPE-NMR, o fluxo de saída do detector é descartado durante a cromatografia. Apenas quando uma banda de interesse é eluída da coluna de HPLC é que o fluxo é dirigido para o cartucho de SPE. Devido ao curto comprimento do capilar que conduz a amostra da célula de UV até o cartucho, e devido à elevada vazão, não existe a necessidade de esperar a detecção do máximo da banda para começar o seu aprisionamento.

Foram analisados através da técnica de LC-NMR os extratos de todos os órgãos estudados, e foram aprisionadas as bandas que mostraram variação entre o tratamento sadio e infectado com HLB, para cada parte da planta separadamente.

4.3.1 Análise das raízes via HPLC-UV-SPE-NMR

O extrato das raízes foi analisado de acordo como descrito no item 3.5.4.2, e as bandas aprisionadas neste experimento foram as 5 que podem ser visualizadas na FIGURA 4.42. As bandas de maior interesse foram àquelas que apresentaram variação no perfil químico entre os extratos das mudas sadias e doentes, ou seja, aquelas com tempo de retenção em 14,3, 15,7 e 22,7 minutos. Para estas, foi possível verificar um aumento dessas bandas para o tratamento

infectado com uma simples análise visual. Sendo assim, essas bandas que mais variaram foram o alvo do estudo, sendo a etapa seguinte o aprisionamento para posterior identificação desses compostos. Optou-se por aprisionar mais duas bandas para maior informação estrutural (em 14,6 e 16,9 minutos), e pelo fato delas apresentarem alta absorção em UV e eluïrem em força moderada de solvente orgânico. Todas elas puderam ter sua identificação elucidada através dos espectros de RMN, como será mostrado em seguida, e foi possível, portanto, verificar quais compostos que estavam aumentando quantitativamente nas mudas infectadas com HLB.

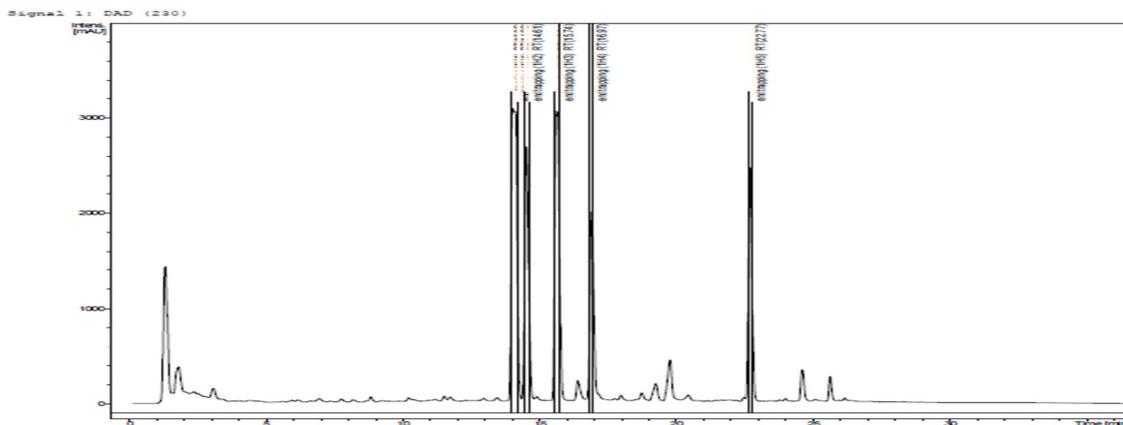


FIGURA 4.42: Cromatograma de HPLC-UV-SPE-NMR das raïzes, indicando as bandas cromatogrãficas aprisionadas.

4.3.1.1 Identificação das bandas R1 à R5

Ao analisar o espectro de RMN ^1H obtido via HPLC-UV-SPE-NMR para as bandas R1 à R5, verificaram-se para todas elas espectros de boa qualidade, com sinais bem resolvidos, assim como suas multiplicidades e integrais, além de pouco ruído. Alguns poucos sinais de contaminação apareceram, porém foi possível assegurar se tratar de contaminação do próprio cartucho de SPE, uma vez que estes são permanentes, sendo assim reutilizados diversas vezes. Também foi possível detectar sinais de água residual, o que também é bastante comum neste tipo de análise, mesmo utilizando uma sequência de pulso que suprima esses sinais, devido às baixas concentrações de amostra que estão sendo analisadas (poucos microgramas). Os sinais referentes à amostra se mostraram característicos de cumarinas, para todas as bandas avaliadas. As bandas R1 à R5 apresentaram dubletos do anel lactônico da cumarina, e também dubletos do anel pirano condensados. Foi possível identificar essas bandas como sendo as cumarinas xantiletina (R1), seselina (R2), xantoxiletina (R3), metoxiseselina (R4) e dentatina (R5) (FIGURA 4.43).

A identificação estrutural completa para todas essas cumarinas já foram realizadas neste trabalho no item 4.1.1, na etapa de isolamento de padrões, portanto sua caracterização não será repetida nesse momento. Estes espectros foram realizados em metanol-d₄ (FIGURA 4.44 à FIGURA 4.48), apresentando assim valores de deslocamento químicos ligeiramente diferentes daqueles encontrados em CDCl₃. Seus respectivos valores de deslocamento, assim como multiplicidades e constantes de acoplamento, podem ser verificados nas TABELA 4.10 à TABELA 4.14. Essas tabelas também fazem uma comparação com os valores obtidos nos espectros realizados com os respectivos padrões em CDCl₃. Para a banda R5, referente à molécula dentatina, não foi possível verificar nos espectros realizados em metanol-d₄ os sinais referentes aos dois hidrogênios na posição 3''. Esses sinais caem na região de δ_H 4,9, e como esses experimentos foram realizados com uma sequência de pulso que suprime o sinal do solvente e da água residual, esses sinais também foram suprimidos, por possuírem frequência de trabalho próximo ao da água.

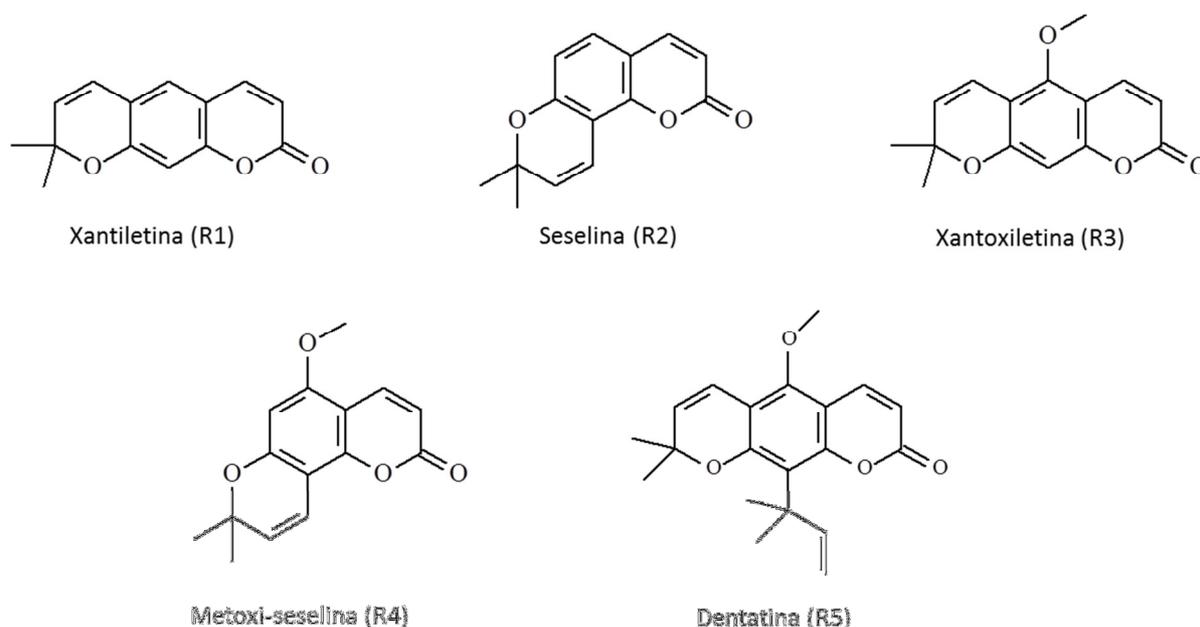


FIGURA 4.43: Bandas aprisionadas do extrato das raízes do citros estudado através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR, e seus respectivos compostos identificados.

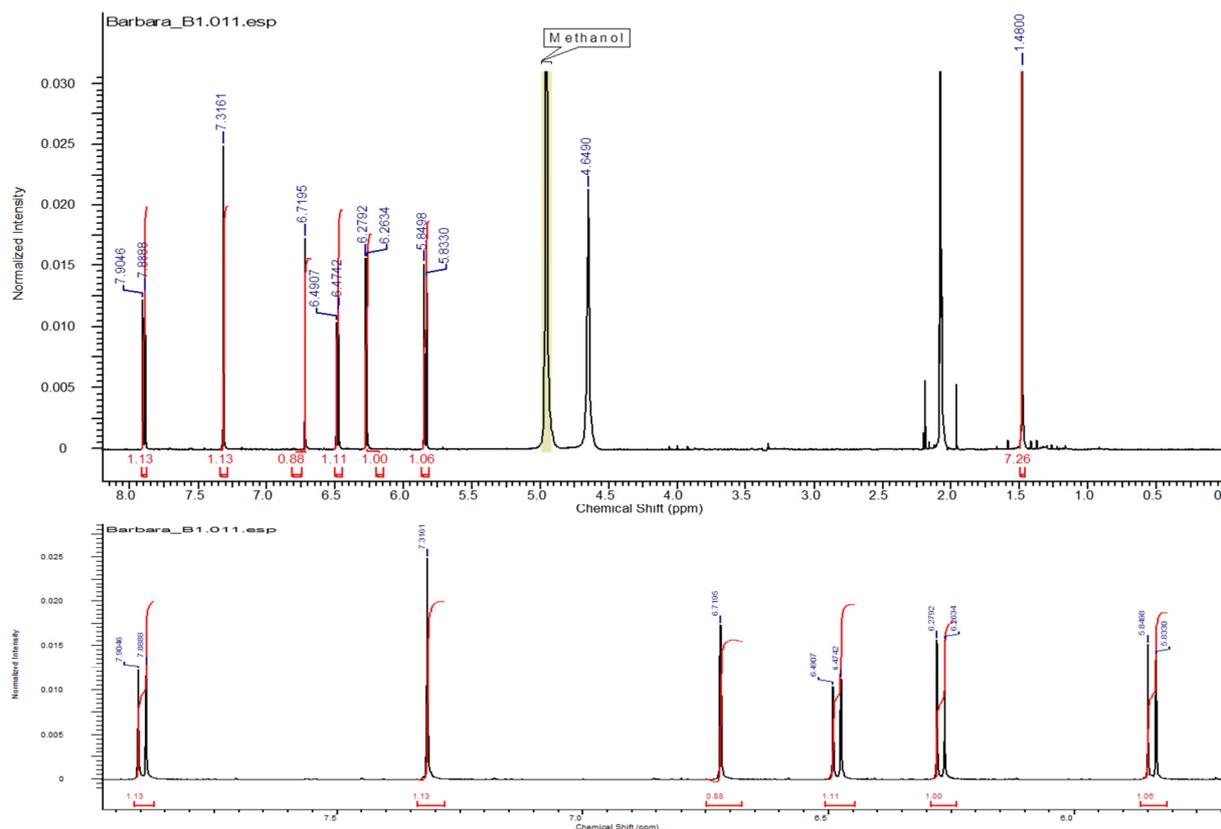

 FIGURA 4.44: Espectro de RMN ^1H do composto **R1** (metanol- d_4 , 600 MHz).

 TABELA 4.10: Dados de RMN ^1H para o composto **R1** (metanol- d_4 e comparação com os dados obtidos em CDCl_3).

$\text{N}^{\circ} \text{C}$	^1H (δ) (metanol- d_4)	^1H (δ) (CDCl_3)
3	6,23 (1H, <i>d</i> , 9,5 Hz)	6,21 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)
4	7,85 (1H, <i>d</i> , 9,5 Hz)	7,57 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)
5	7,27 (1H, <i>s</i>)	7,04 (1H, <i>s</i>)
8	6,67 (1H, <i>s</i>)	6,71 (1H, <i>s</i>)
3'	5,80 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	5,68 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)
4'	6,44 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	6,33 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)
5' e 6'	1,43 (6H, <i>s</i>)	1,47 (6H, <i>s</i>)

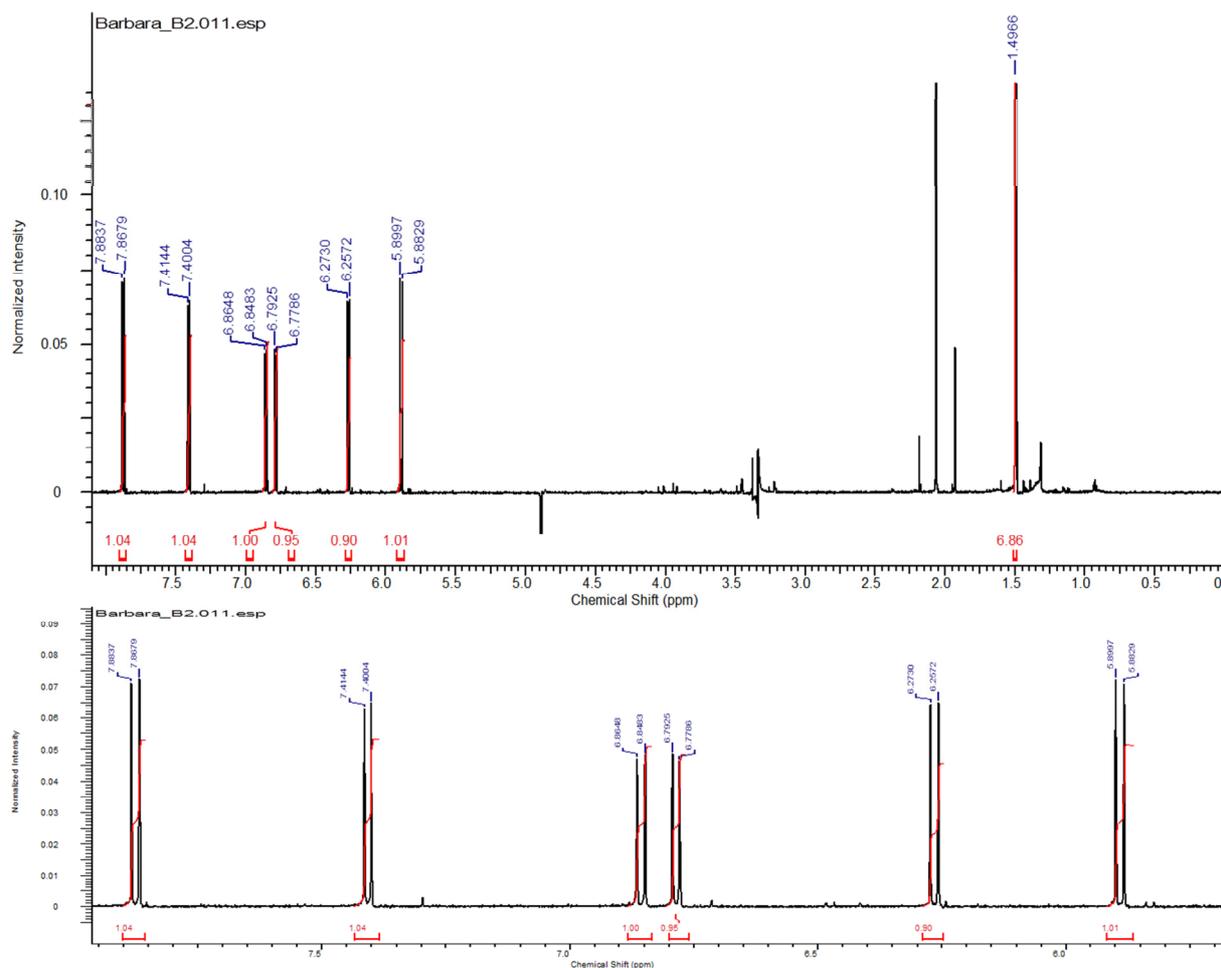

 FIGURA 4.45: Espectro de RMN ^1H do composto **R2** (metanol- d_4 , 600 MHz).

 TABELA 4.11: Dados de RMN ^1H para o composto **R2** (metanol- d_4 e comparação com os dados obtidos em CDCl_3).

Nº C	^1H (δ) (metanol- d_4)	^1H (δ) (CDCl_3)
3	6,25 (1H, <i>d</i> , 9,5 Hz)	6,24 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)
4	7,86 (1H, <i>d</i> , 9,5 Hz)	7,66 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)
5	7,39 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)	7,22 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)
6	6,77 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)	6,73 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)
3'	5,87 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	5,74 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)
4'	6,84 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	6,89 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)
5' e 6'	1,48 (6H, <i>s</i>)	1,48 (6H, <i>s</i>)

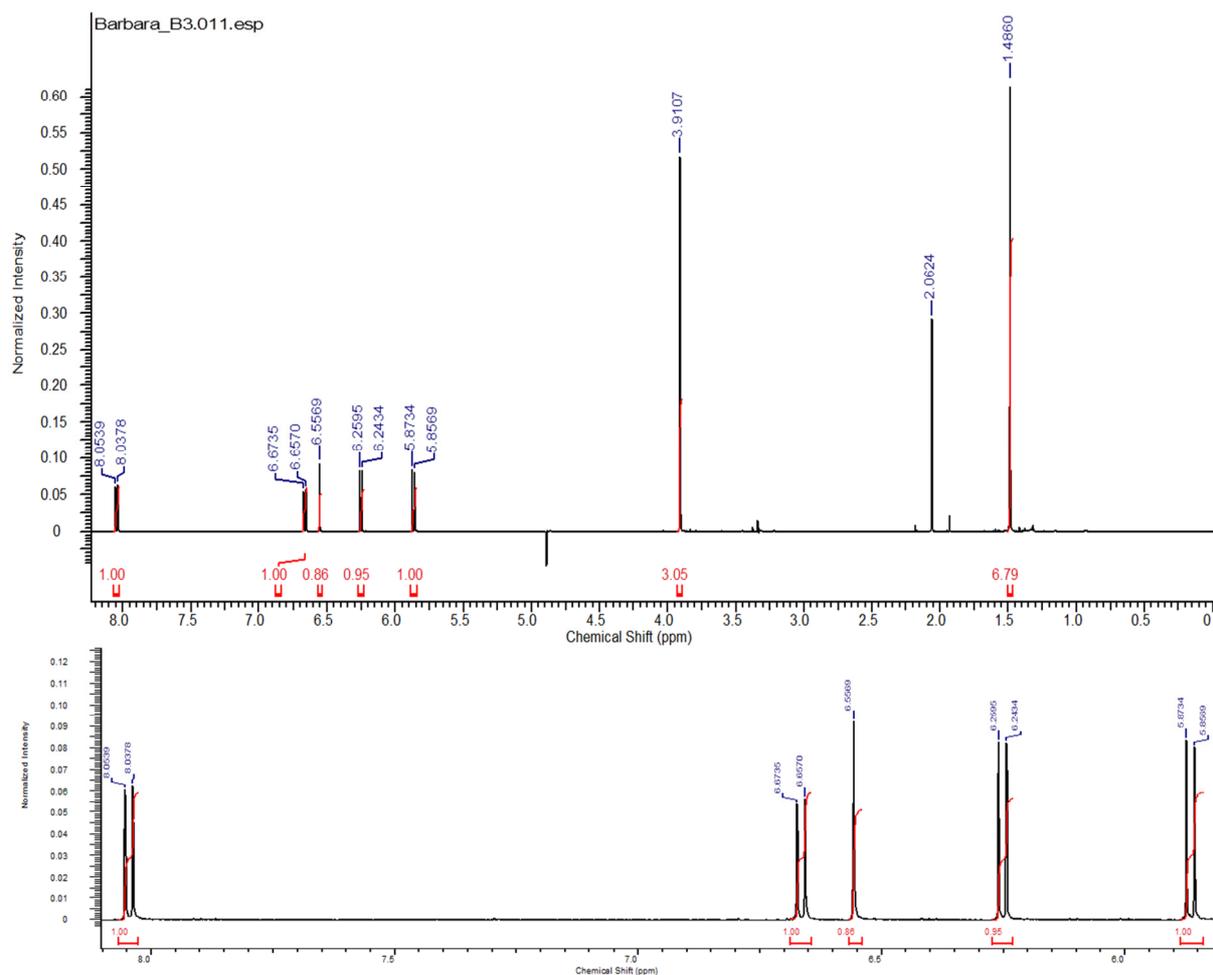

 FIGURA 4.46: Espectro de RMN ^1H do composto **R3** (metanol- d_4 , 600 MHz).

 TABELA 4.12: Dados de RMN ^1H para o composto **R3** (metanol- d_4 e comparação com os dados obtidos em CDCl_3).

Nº C	^1H (δ) (metanol- d_4)	^1H (δ) (CDCl_3)
3	6,25 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	6,20 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)
4	8,05 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	7,85 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)
8	6,56 (1H, <i>s</i>)	6,55 (1H, <i>s</i>)
3'	5,87 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	5,71 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)
4'	6,67 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	6,57 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)
5' e 6'	1,49 (6H, <i>s</i>)	1,47 (6H, <i>s</i>)
OMe	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,86 (3H, <i>s</i>)

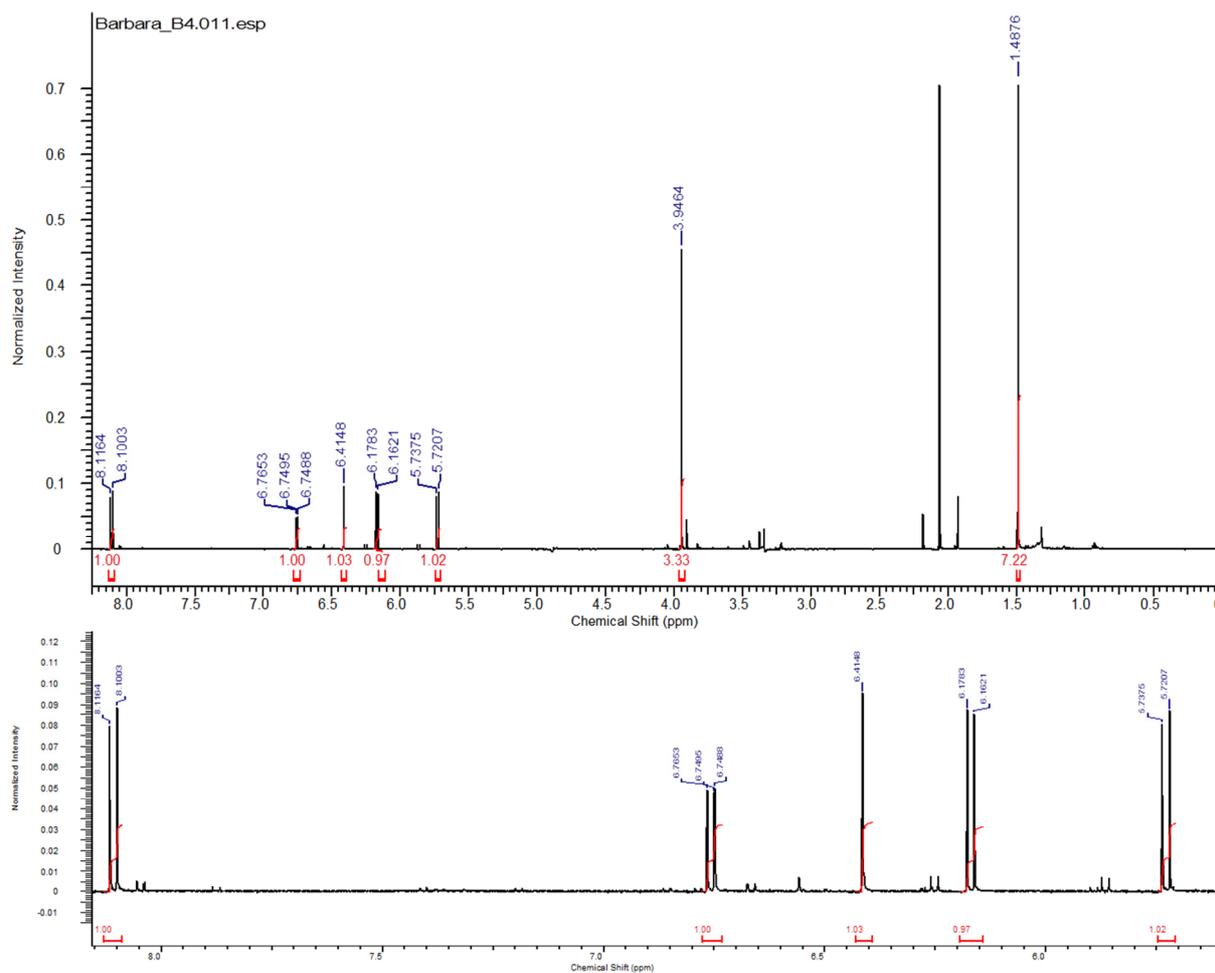

 FIGURA 4.47: Espectro de RMN ^1H do composto **R4** (metanol- d_4 , 600 MHz).

 TABELA 4.13: Dados de RMN ^1H para o composto **R4** (metanol- d_4 e comparação com os dados obtidos em CDCl_3).

N°C	^1H (δ) (metanol- d_4)	^1H (δ) (CDCl_3)
3	6,17 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	6,13 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)
4	8,11 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	7,96 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)
6	6,41 (1H, <i>s</i>)	6,23 (1H, <i>s</i>)
3'	5,73 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	5,58 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)
4'	6,76 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	6,8 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)
5' e 6'	1,49 (6H, <i>s</i>)	1,49 (3H, <i>s</i>)
OMe	3,95 (3H, <i>s</i>)	3,88 (3H, <i>s</i>)

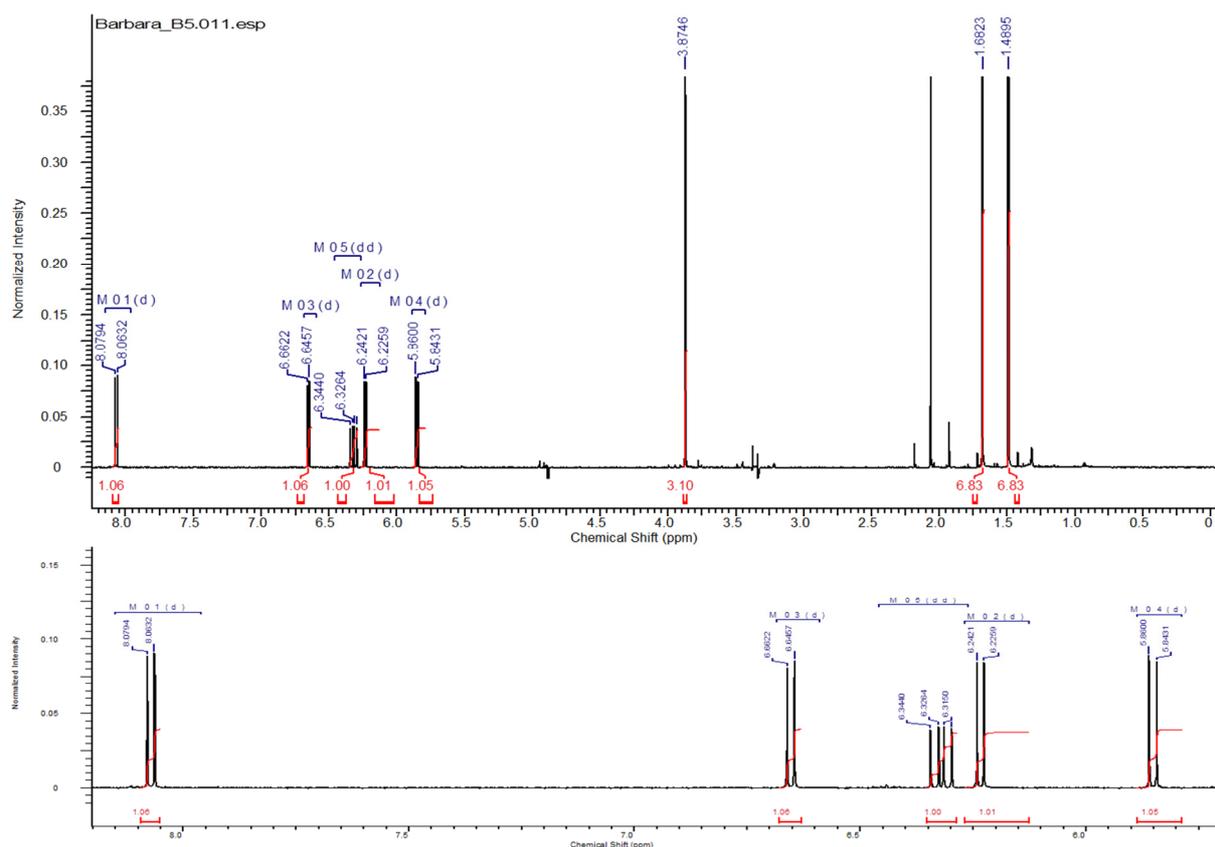

 FIGURA 4.48: Espectro de RMN ^1H do composto **R5** (metanol- d_4 , 600 MHz).

 TABELA 4.14: Dados de RMN ^1H e para o composto **R5** (metanol- d_4 e comparação com o espectro obtido em CDCl_3).

N $^{\circ}$ C	^1H (δ) (metanol- d_4)	^1H (δ) (CDCl_3)
3	6,23 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	6,20 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)
4	8,07 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	7,86 (1H, <i>d</i> , 9,6 Hz)
3'	5,85 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	5,71 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)
4'	6,50 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	6,58 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)
5' e 6'	1,46 (6H, <i>s</i>)	1,46 (6H, <i>s</i>)
2''	6,32 (1H, <i>dd</i> , 17,4 e 10,6 Hz)	6,31 (1H, <i>dd</i> , 17,3 e 10,6 Hz)
3'' z	NO	4,89 (1H, <i>dd</i> , 10,6 e 1,0 Hz)
3'' e	NO	4,95 (1H, <i>dd</i> , 17,3 e 1,0 Hz)
4'' e 5''	1,67 (6H, <i>s</i>)	1,67 (6H, <i>s</i>)
OMe	3,87 (3H, <i>s</i>)	3,82 (3H, <i>s</i>)

4.3.2 Análise do caule do porta enxerto via HPLC-UV-SPE-NMR

O extrato do caule inferior foi analisado de acordo como descrito no item 3.5.4.1, e as bandas aprisionadas neste experimento foram aquelas que apresentaram variação no perfil químico entre os extratos das mudas sadias com aqueles das doentes. As bandas de interesse que foram aprisionadas podem ser visualizadas na FIGURA 4.49. Para o extrato do caule inferior, as duas primeiras bandas aprisionadas (8,14 e 12,19 minutos) não puderam ter sua determinação estrutural concluída através dos respectivos experimentos de RMN. Muitas dessas estruturas não apresentaram características ideais para serem analisadas via LC-UV-SPE-NMR. Para se obter excelentes resultados com essa técnica, recomenda-se trabalhar com moléculas de polaridade intermediária, e que absorvam intensamente luz ultravioleta. Do contrário não se consegue bons espectros de RMN. Isso ocorre porque compostos que eluem com proporções muito baixa de solvente orgânico são difíceis de aprisionar em cartuchos de SPE (GODEJOHANN, 2004).

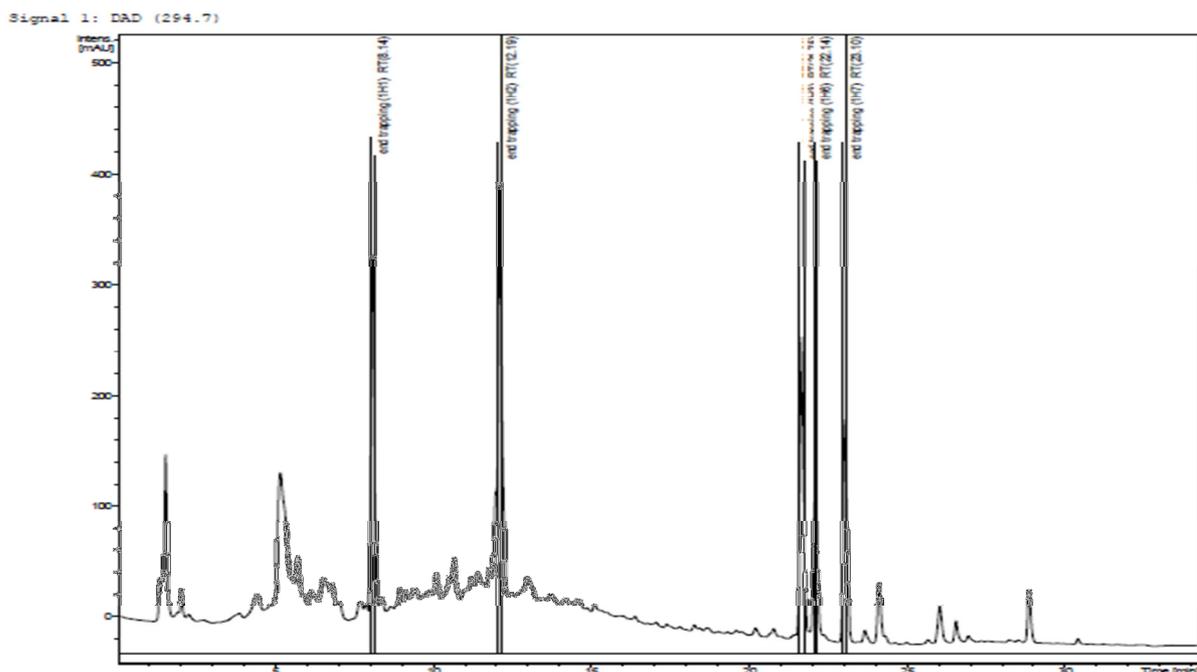


FIGURA 4.49: Cromatograma de HPLC-UV-SPE-NMR do caule inferior, indicando as bandas cromatográficas aprisionadas.

Nos extratos do caule do porta enxerto, assim como para as folhas e caule da copa estudados, muitos dos compostos de interesse apresentavam alta polaridade (hidrofílicos) e pouca absorção sob radiação ultravioleta. Essas características fizeram que estes compostos não ficassem bem retidos nos

cartuchos de SPE, diminuindo a sensibilidade da técnica, resultando em espectros de RMN de baixa qualidade. Dessa maneira, para estes a caracterização foi somente possível através da espectrometria de massas. As últimas três bandas puderam ser identificadas normalmente através da técnica de RMN, e essas serão apresentadas a seguir. Seus respectivos tempos de retenção foram de 21,75, 22,14 e 23,10 minutos.

4.3.2.1 Identificação das bandas CI-3 à CI-5

Ao analisar o espectro de RMN ^1H obtido via HLPC-UV-SPE-NMR para as bandas CI-3 à CI-5, verificaram-se para todas elas espectros de boa qualidade apesar da pouca quantidade de amostra. Alguns sinais de contaminação do próprio cartucho de SPE apareceram principalmente na região de blindagem do espectro de RMN ^1H . Estas impurezas ficam mais fortemente ligadas à fase destes cartuchos, sendo mais difícil sua remoção. Os sinais referentes à amostra se mostraram mais uma vez característicos de cumarinas para as três bandas avaliadas. As bandas CI-3 à CI-5 apresentaram dubletos do anel lactônico da cumarina, e também dubletos do anel pirano. Foi possível identificar para essas bandas as cumarinas xantiletina (CI-3), seselina (CI-4) e xantoxiletina (CI-5) (FIGURA 4.50). A identificação estrutural completa para todas essas cumarinas foram realizada anteriormente para as raízes, no item 4.1.1, e dessa maneira não será novamente discutida.

Estes espectros foram realizados em metanol- d_4 deuterado (FIGURA 4.51 à FIGURA 4.53), apresentando assim valores de deslocamento químicos ligeiramente diferentes daqueles encontrados em CDCl_3 . A TABELA 4.15 mostra seus respectivos valores de deslocamento, assim como multiplicidades e constantes de acoplamento encontradas. É possível verificar para a banda CI-4 a presença de um segundo composto em mistura, sendo este identificado como xantiletina. Essas duas cumarinas apresentam tempos de retenção muito próximos, e a metodologia utilizada nas análises do caule inferior apresentou uma rampa mais íngreme do que a utilizada nos extratos das raízes, não sendo possível coletar a seselina pura. Assim, a banda em questão apresentou-se como uma mistura das cumarinas xantiletina e seselina.



FIGURA 4.50: Bandas CI-3 à CI-5 aprisionadas dos extratos do caule inferior do citros estudado através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR, e seus respectivos compostos identificados.

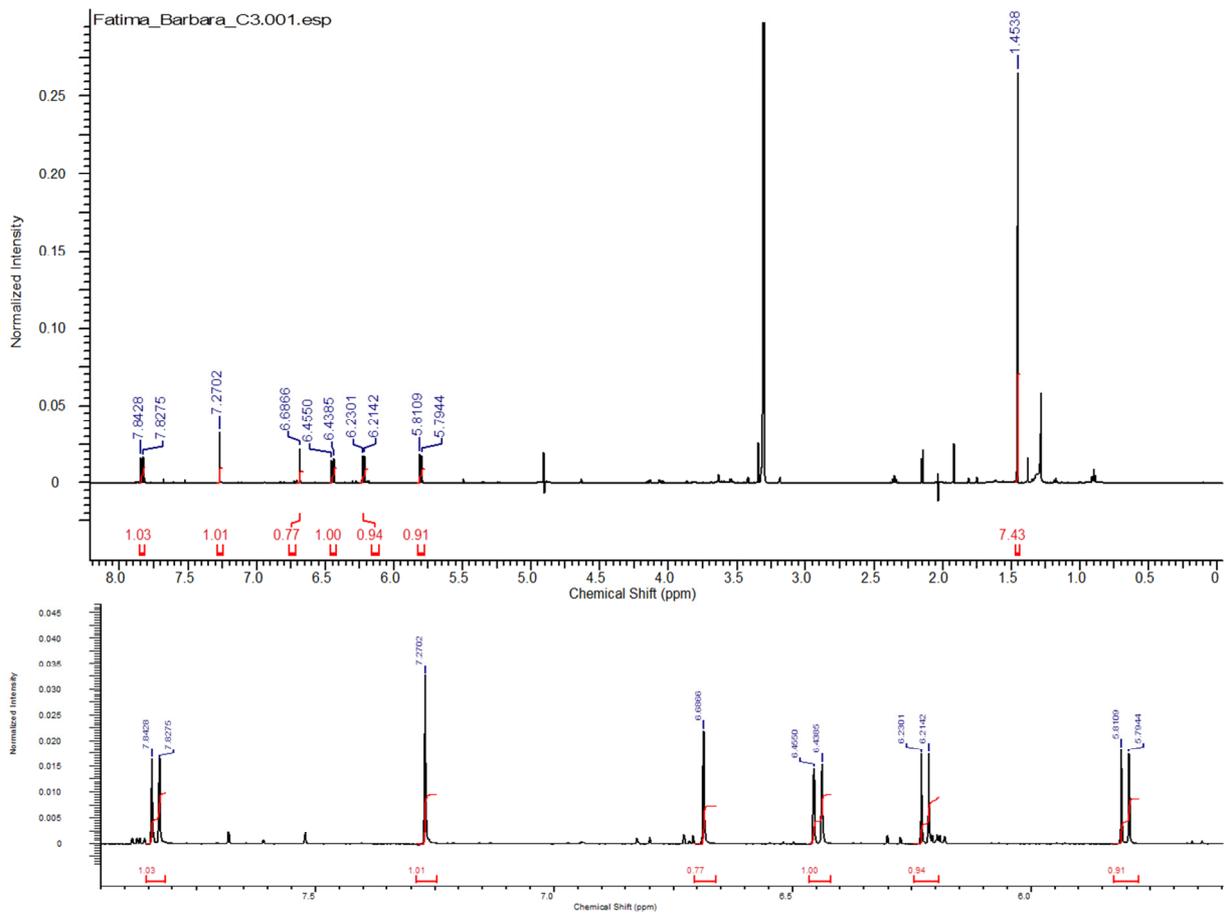


FIGURA 4.51: Espectro de RMN ^1H da banda CI-3 (metanol- d_4 , 600 MHz).

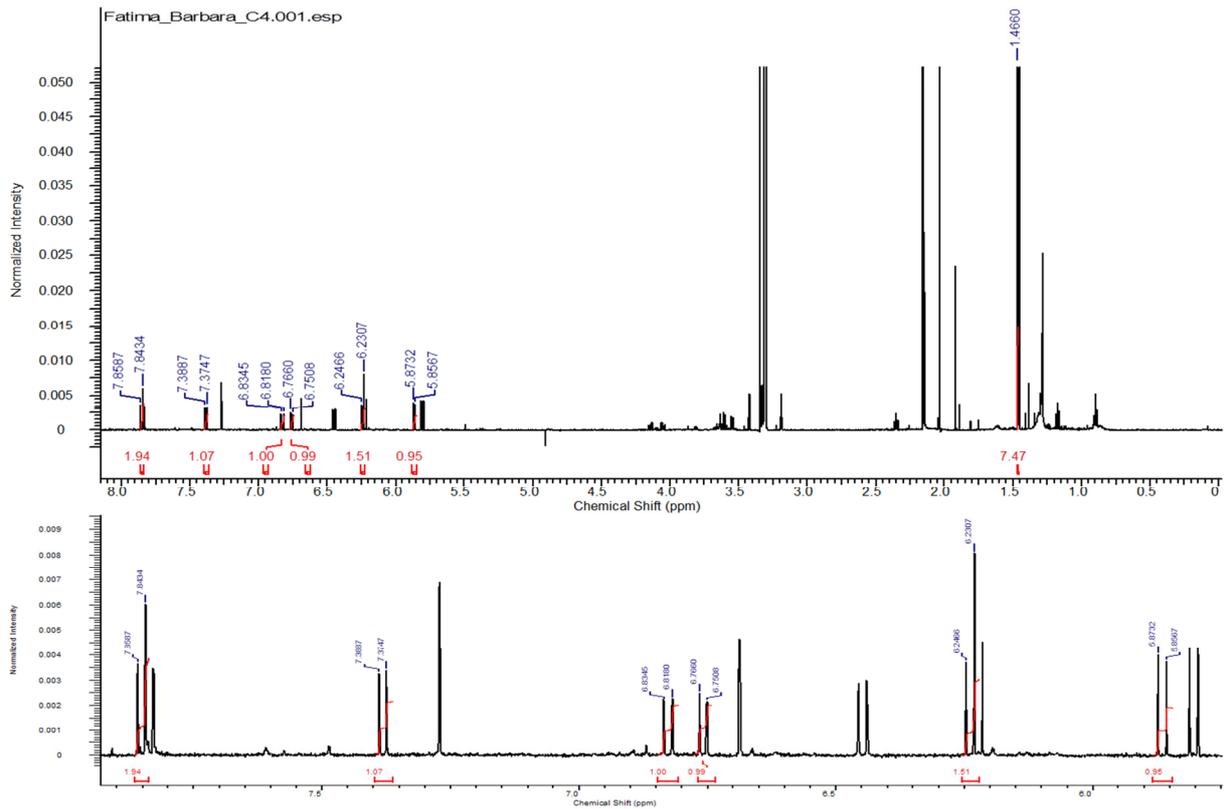


FIGURA 4.52: Espectro de RMN ^1H da banda **CI-4** (metanol-d₄, 600 MHz).

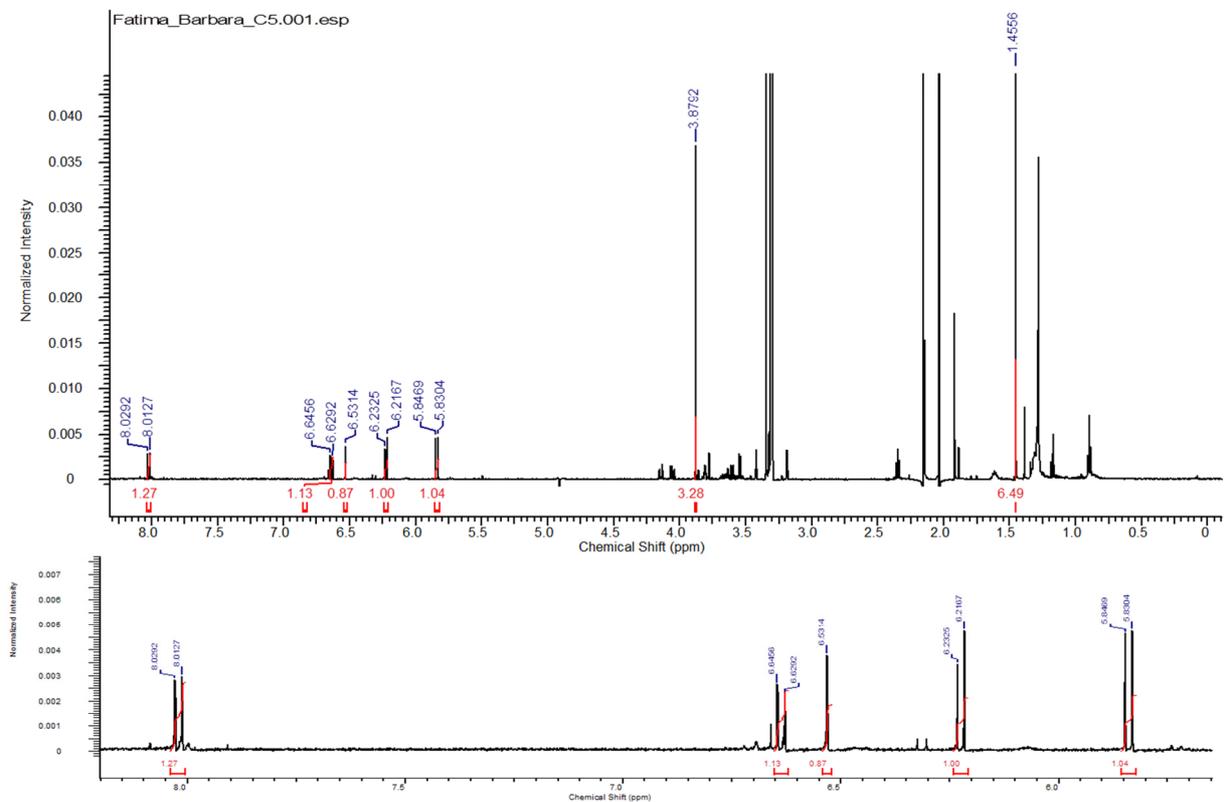


FIGURA 4.53: Espectro de RMN ^1H da banda **CI-5** (metanol-d₄, 600 MHz).

TABELA 4.15: Dados de RMN ^1H e para os compostos **CI-3**, **CI-4** e **CI-5** (metanol- d_4 e comparação com o espectro obtido em CDCl_3).

Nº C	Composto CI-3 ^1H (δ)(metanol- d_4)	Literatura ^1H (δ)(CDCl_3)	Composto CI-4 ^1H (δ) (metanol- d_4)	Literatura ^1H (δ) (CDCl_3)	Composto CI-5 ^1H (δ) (metanol- d_4)	Literatura ^1H (δ) (CDCl_3)
3	6,23 (1H, <i>d</i> , 9,5 Hz)	6,21 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	6,25 (1H, <i>d</i> , 9,5 Hz)	6,24 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	6,25 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	6,20 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)
4	7,85 (1H, <i>d</i> , 9,5 Hz)	7,57 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	7,86 (1H, <i>d</i> , 9,5 Hz)	7,66 (1H, <i>d</i> , 9,4 Hz)	8,05 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)	7,85 (1H, <i>d</i> , 9,7 Hz)
5	7,27 (1H, <i>s</i>)	7,04 (1H, <i>s</i>)	7,39 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)	7,22 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	6,56 (1H, <i>s</i>)	6,55 (1H, <i>s</i>)
8	6,67 (1H, <i>s</i>)	6,71 (1H, <i>s</i>)	6,77 (1H, <i>d</i> , 8,4 Hz)	6,73 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	5,87 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	5,71 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)
3'	5,80 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	5,68 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	5,87 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	5,74 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)	6,67 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	6,57 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)
4'	6,44 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	6,33 (1H, <i>d</i> , 9,9 Hz)	6,84 (1H, <i>d</i> , 10,0 Hz)	6,89 (1H, <i>d</i> , 10,2 Hz)	1,49 (6H, <i>s</i>)	1,47 (6H, <i>s</i>)
5' e 6'	1,43 (6H, <i>s</i>)	1,47 (6H, <i>s</i>)	1,48 (6H, <i>s</i>)	1,48 (6H, <i>s</i>)	3,91 (3H, <i>s</i>)	3,86 (3H, <i>s</i>)

4.3.3 Análise do caule da copa via HPLC-UV-SPE-NMR

O extrato do caule superior foi analisado de acordo como descrito no item 3.5.4.1. As bandas aprisionadas podem ser visualizadas na FIGURA 4.54. As bandas aprisionadas para este extrato, cujos tempos de retenção foram de 8,2 e 13,2 minutos, não puderam ter sua determinação estrutural concluída através dos respectivos experimentos de RMN, pois estas não ficaram bem retidas no cartucho de SPE utilizado devido à sua alta polaridade. Suas devidas caracterizações foram concluídas por meio da técnica de espectrometria de massas, podendo ser verificada no item 4.4.2.9.

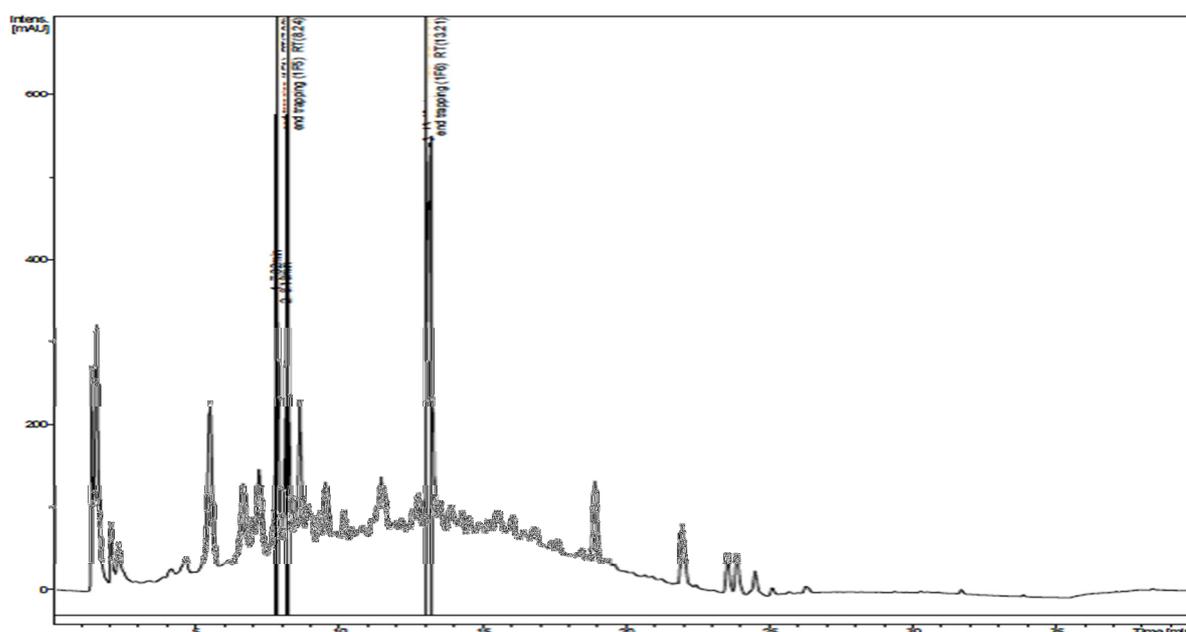


FIGURA 4.54: Cromatograma de HPLC-UV-SPE-NMR do caule da copa, indicando as bandas cromatográficas aprisionadas.

4.3.4 Análise das folhas via HPLC-UV-SPE-NMR

As análises do extrato das folhas via a técnica de HPLC-UV-SPE-NMR foram realizadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.4.1. As bandas de interesse que foram aprisionadas neste experimento foram aquelas que apresentaram variação no perfil químico entre os extratos das mudas sadias com aquelas das doentes, e podem ser visualizadas na FIGURA 4.55. Nenhuma das bandas pôde ter sua determinação estrutural concluída através dos respectivos experimentos de RMN, não ficando bem retidas no cartucho SPE de trabalho (justificativa no item 4.3.2). Ainda assim a técnica utilizada foi de extrema importância, pois mesmo não possibilitando sua identificação, foi possível através desta o isolamento das bandas que variaram quantitativamente entre os extratos. Suas devidas caracterizações foram concluídas por meio da técnica de espectrometria de massas, que foram devidamente discutidas no item 4.4.2 deste trabalho.

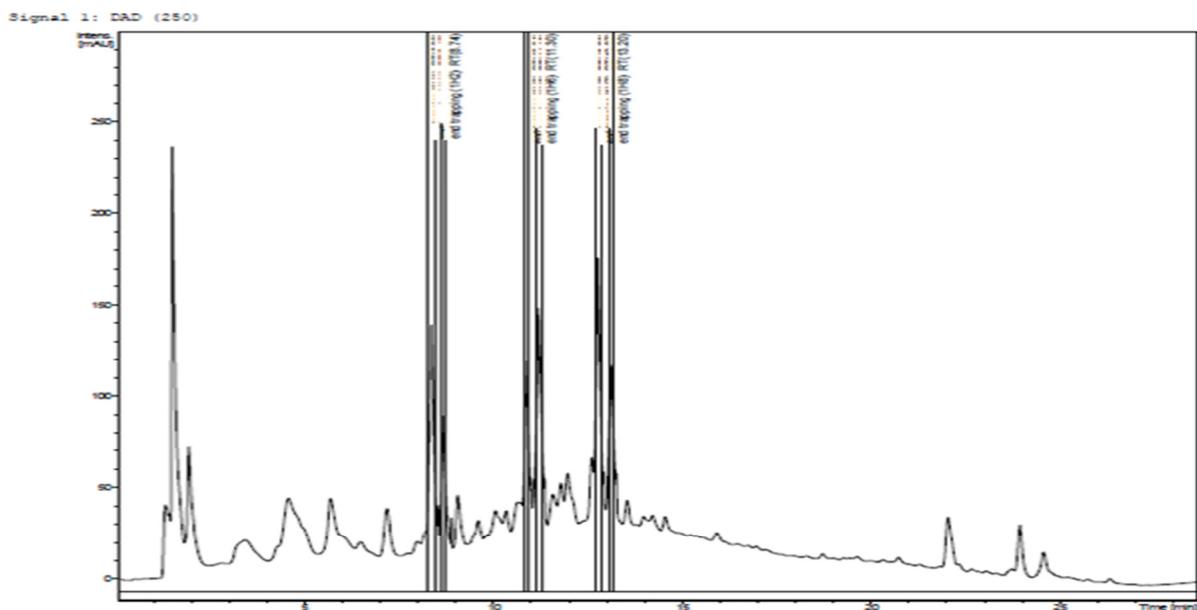


FIGURA 4.55: Cromatograma de HPLC-UV-SPE-NMR das folhas, indicando as bandas cromatográficas aprisionadas.

4.4 Identificação e confirmação dos compostos via espectrometria de massas

4.4.1 Confirmação dos compostos das raízes de *citrus*

Estes experimentos foram realizados a partir do procedimento descrito no item 3.5.5.1. Optou-se por trabalhar com a técnica hifenada LC-MS com este órgão para fins de aprendizado da técnica. Para os demais órgãos foi utilizada a inserção direta das amostras aprisionadas. Com essa metodologia foi possível ionizar as moléculas que variaram quantitativamente entre os diferentes tratamentos, gerando o cromatograma de íons totais que pode ser observado na FIGURA 4.56, assim como seu respectivo cromatograma obtido através do detector de DAD.

No extrato das raízes do citros estudado pôde-se confirmar a presença das cumarinas já identificadas através da técnica de LC-UV-SPE-NMR (item 3.5.4.2). Através dos experimentos de HPLC-UV-MS adquiridos no modo *Full Scan*, e no modo positivo de ionização, observou-se a presença de uma banda no tempo de retenção de 15,11 minutos no TIC, e de 13,90 para o cromatograma de DAD (FIGURA 4.57). Esse atraso no tempo de retenção, de aproximadamente 1 minuto, deve-se ao trajeto percorrido pela amostra, desde a saída da célula do detector de DAD, e posteriormente entrando na fonte de ionização do espectrômetro de massas, passando pelo analisador do equipamento, chegando até o detector, onde será novamente registrado com uma diferença no tempo.

A primeira banda deu origem a um íon pseudo-molecular protonado $[M+H]^+$ de 229 Da. Essa mesma banda já havia sido analisada via técnica de LC-UV-SPE-NMR como sendo a cumarina xantiletina, cuja massa molecular é de 228 Da. Portanto, através desse resultado pode-se confirmar a estrutura dessa cumarina, já descrita anteriormente no gênero *Citrus*. Sugere-se ainda que a banda referente à cumarina seselina tenha coeluído com a banda da xantiletina no cromatograma de íons totais, devido à proximidade do tempo de retenção das mesmas. A banda em 15,11 minutos que originou o íon pseudo-molecular protonado $[M+H]^+$ de 229 Da, refere-se à ambas as cumarinas, uma vez que a cumarina seselina é um isômero da xantiletina, apresentando massa molecular de 229 Da.

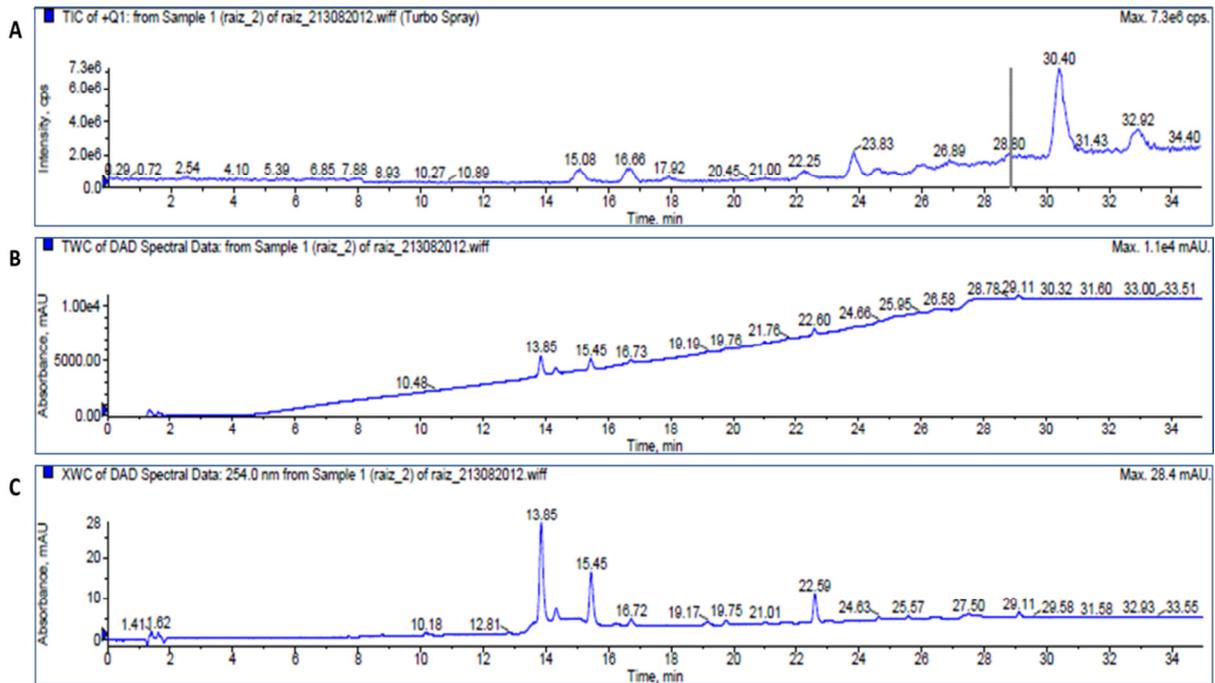


FIGURA 4.56: Cromatograma de íons totais da raiz de citros (ESI, modo positivo) (A); Cromatograma com detector de DAD (B); Cromatograma monitorado à 254 nm (C).

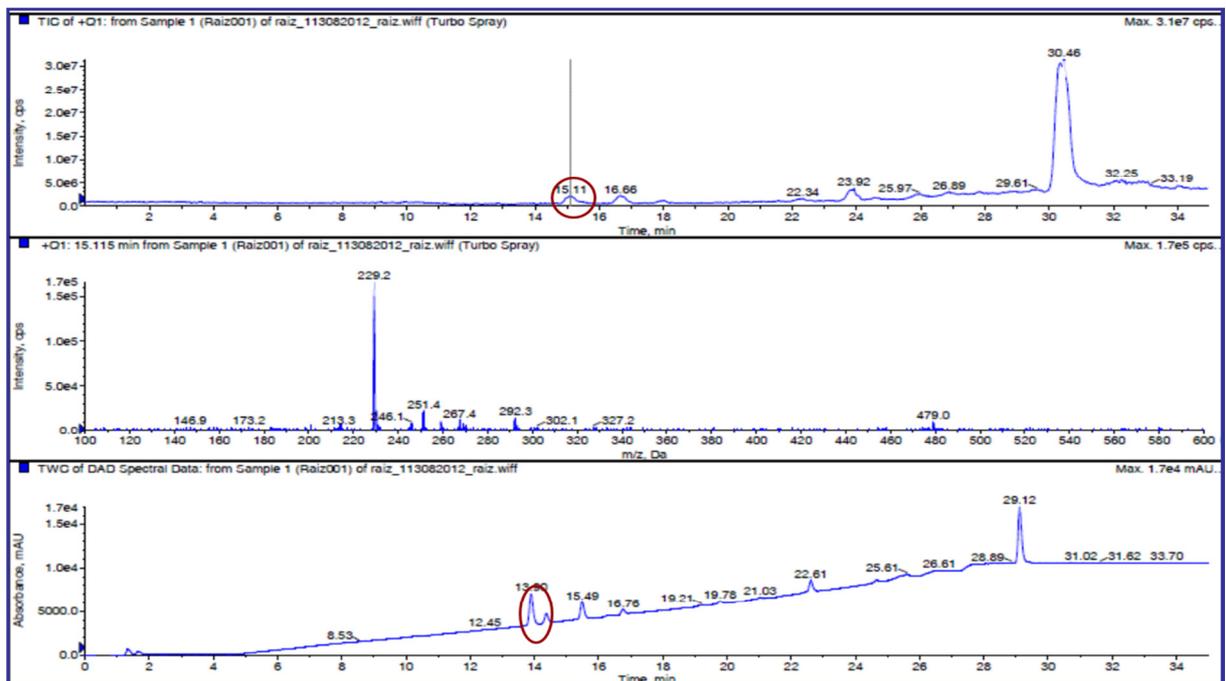


FIGURA 4.57: Espectro de massa da banda em 15 minutos, do extrato das raízes do citros, referente às cumarinas xantiletina e seselina (ESI, modo positivo) (espectro do meio). Cromatograma de íons totais do extrato do citros (acima); Cromatograma com detector de DAD (abaixo).

Continuando as análises com o mesmo modo de aquisição e ionização, observou-se outra banda em 16,66 minutos para o TIC, e de 15,49 para o cromatograma de DAD (FIGURA 4.58), dando origem ao íon pseudo-molecular protonado $[M+H]^+$ com 259 Da. Essa massa confirma a proposta da cumarina xantoxiletina para a banda em questão, cuja massa molecular é de 258 Da. Além do íon pseudo-molecular, ainda foi possível verificar íons de m/z 322 Da e de 539 Da, referente respectivamente a um aduto com massa de 63 Da, e ao dímero com íon sódio $[2M+Na]^+$, agrupamento bastante comum de ser encontrado. De acordo com a literatura, o aduto de 63 Da poderia ser um aduto também bastante comum $[M+ACN+Na]^+$ (TONG, 1999).

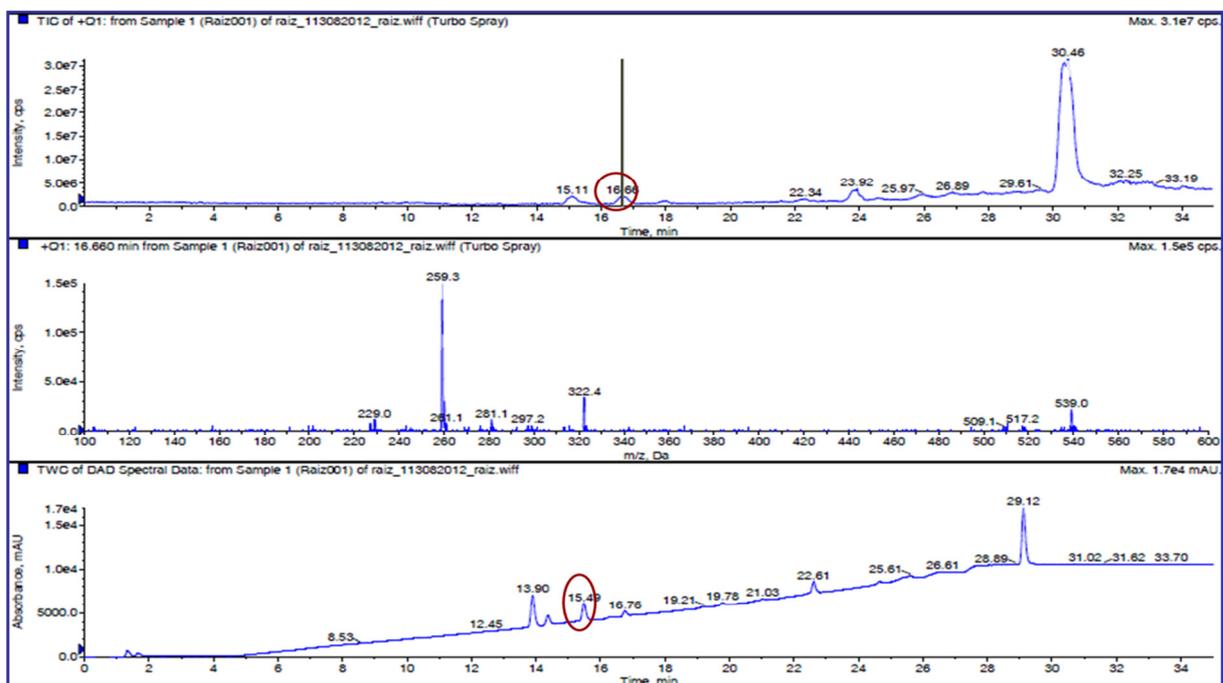


FIGURA 4.58: Espectro de massa da banda em 16 minutos, do extrato das raízes do citros, referente à cumarina xantoxiletina (ESI, modo positivo) (espectro do meio). Cromatograma de íons totais do extrato do citros (acima); Cromatograma com detector de DAD (abaixo).

Foi possível observar também uma banda com tempo de retenção em 16,76 minutos para o cromatograma de DAD, e 17,9 minutos para o TIC (FIGURA 4.59), referente a um íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 259$ Da. Para esta banda, também foi possível encontrar o mesmo aduto de 63 Da encontrado anteriormente, originando o íon $[M+63]^+ = 322$, e também o íon referente ao agrupamento $[2M+Na]^+ = 539$ Da. Para este íon em questão, verificou-se ainda o aduto de sódio $[M+Na]^+ = 281$ Da, sendo possível, através desses resultados,

confirmar a estrutura da cumarina metoxi-seselin, cuja massa molecular é de 258 Da, já proposta pela técnica de LC-UV-SPE-NMR.

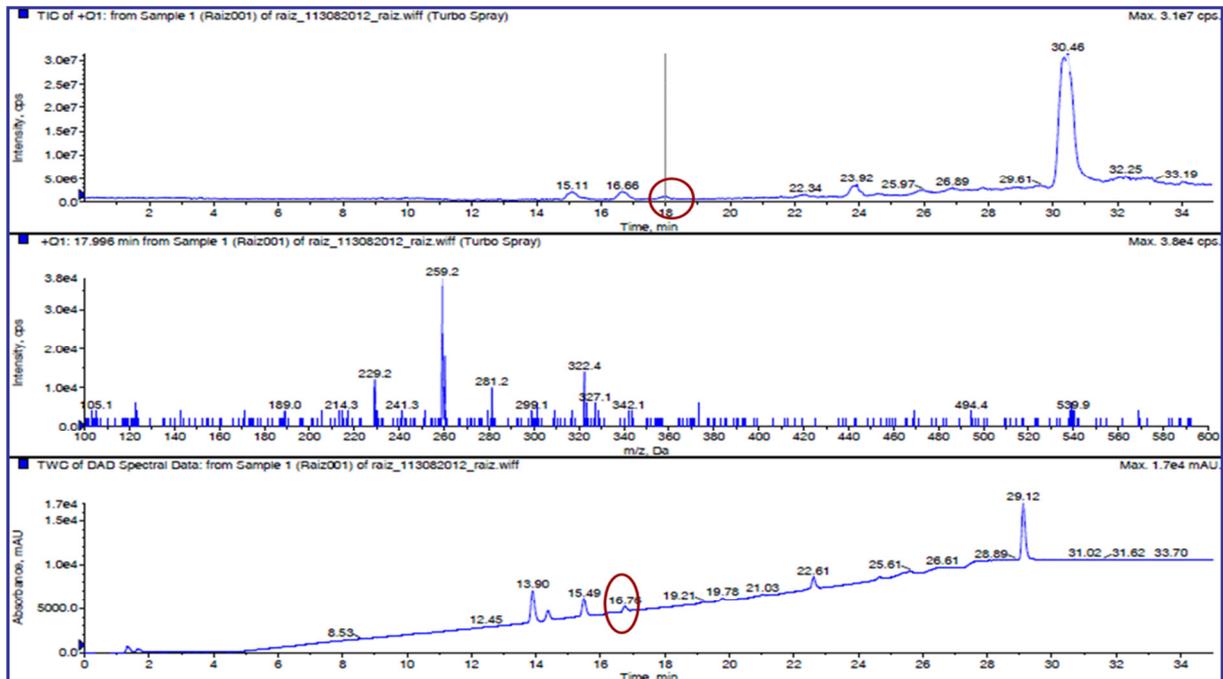


FIGURA 4.59: Espectro de massa da banda em 18 minutos, do extrato das raízes do citros, referente à cumarina metoxi-seselin (ESI, modo positivo) (espectro do meio). Cromatograma de íons totais do extrato do citros (acima); Cromatograma com detector de DAD (abaixo).

A última banda a ser confirmada foi encontrada com tempo de retenção de 23,92 minutos para o TIC, e 22,61 para o cromatograma DAD (FIGURA 4.60). Essa banda, ao ser ionizada no modo positivo, deu origem ao íon pseudo-molecular protonado $[M+H]^+ = 327$ Da. Além desse íon, também verificou-se os adutos de sódio $[M+Na]^+ = 349$ Da, de potássio $[M+K]^+ = 365$ Da, e de formiato $[M+ACN+Na] = 390$ Da. A reunião desses resultados permitiu a confirmação da banda como sendo a cumarina dentatina, já proposta anteriormente e cuja massa molecular é 326 Da. Todas as cumarinas mencionadas nesse item já haviam sido descritas anteriormente na literatura para o gênero *Citrus*.

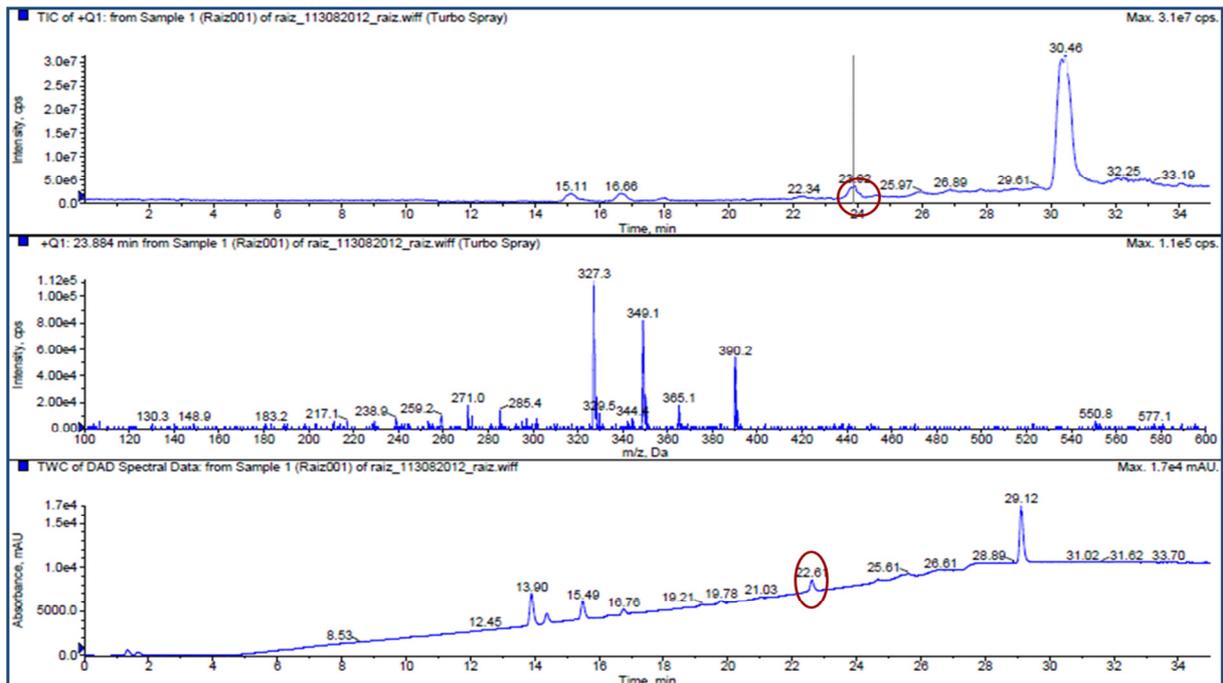


FIGURA 4.60: Espectro de massa da banda em 23 minutos, do extrato das raízes do citros, referente à cumarina Dentatina (ESI, modo positivo) (espectro do meio); Cromatograma de íons totais do extrato do citros (acima); Cromatograma com detector de DAD (abaixo).

4.4.2 Identificação dos compostos isolados do caule do porta enxerto, caule da copa e folhas de citros

Como mencionado anteriormente nesse trabalho, compostos de alta polaridade não ficam bem retidos nos cartuchos de SPE, na técnica de LC-UV-SPE-NMR. Dessa maneira seus respectivos espectros de NMR muitas vezes não são suficientes para identificação estrutural das substâncias isoladas, por ser esta uma técnica menos sensível, sendo necessária uma maior quantidade de amostra. Por esse motivo, para esses compostos retidos na técnica de LC-UV-SPE-NMR e que não geraram bons espectros de NMR, partiu-se para técnica de espectrometria de massas (por ser esta mais sensível), procedendo da maneira descrita no item 3.5.5.2, a fim de concluir a estrutura molecular desses compostos. Foram analisados pela técnica de espectrometria de massas nessa etapa do trabalho, caule do porta enxerto, caule da copa e principalmente folhas, sendo que os flavonoides são a classe majoritária nas folhas de *Citrus* (KAWAII, 2000). Os flavonoides *C*- e *O*-glicosilados apresentam diferentes mecanismos de fragmentação, característico para cada um deles (FIGURA 4.61), sendo essas importantes informações para as identificações dos compostos.

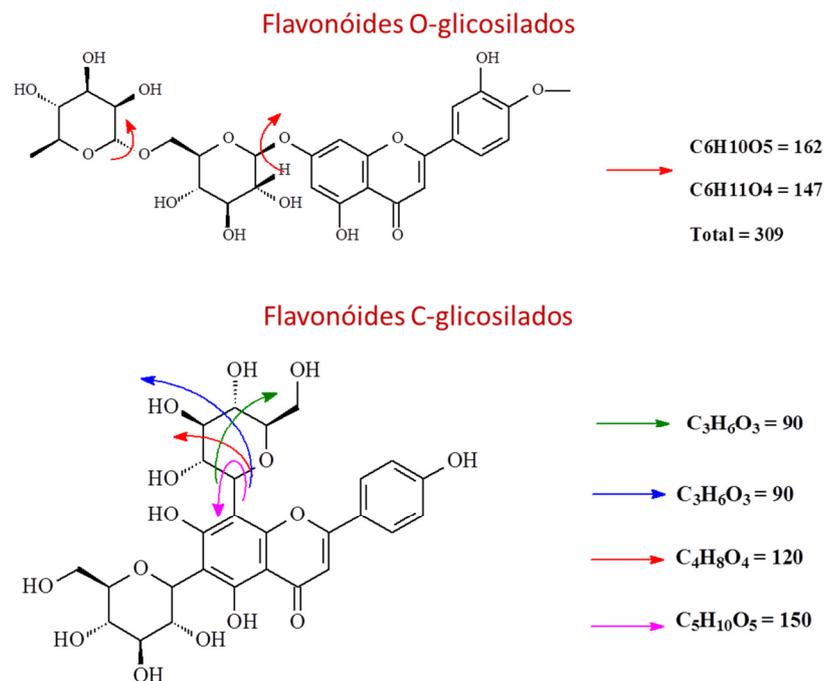


FIGURA 4.61: Fragmentações características de Flavonoides C-glicosilados e O-glicosilados.

4.4.2.1 Identificação da banda F1

A amostra F1 foi isolada a partir do extrato de folhas de citros Valência através da técnica HPLC-UV-SPE-NMR, e ao ser analisada por inserção direta no espectrômetro de massas, no experimento no modo *full scan* no modo negativo, observou-se que essa deu origem ao íon pseudo-molecular desprotonado $[M-H]^-$ 593 (FIGURA 4.62). Dando continuidade, foi realizada a análise de íons fragmentos de 593, e através desse experimento foi possível constatar os íons de m/z 473, 383 e 353, sendo este último o pico base. A perda de 120 Da. do íon pseudo-molecular gerou o pico de m/z 473, podendo ser este o precursor do íon base de m/z 353, com nova perda de 120 Da., sendo este último de maior estabilidade. A partir de m/z 473 foi possível verificar uma perda de 90 Da, gerando o íon fragmento m/z 383. O íon base de m/z 353 pode ainda sofrer rearranjos e perder 2 moléculas de monóxido de carbono (CO), levando aos íons de menores porcentagens de m/z 325 e 297.

A partir das informações do íon pseudo-molecular, juntamente com seus respectivos íons produtos, sugeriu-se que a molécula em questão se tratava da substância vicenina-2 (FIGURA 4.63), uma vez que se sabe pela literatura que essas são perdas clássicas de flavonoides do tipo C-glicosilados. As

propostas para o mecanismo de fragmentação podem ser vistos na FIGURA 4.64 e FIGURA 4.65, onde na primeira é possível verificar as porpostas para as perdas de 120, 90 e 28 Da., enquanto a segunda mostra a clivagem das unidades de açúcar para gerar as perdas de 120 Da. Vicenina-2 já é descrita na literatura como metabólito de *Citrus* (GONZÁLEZ-MOLINA, 2010)

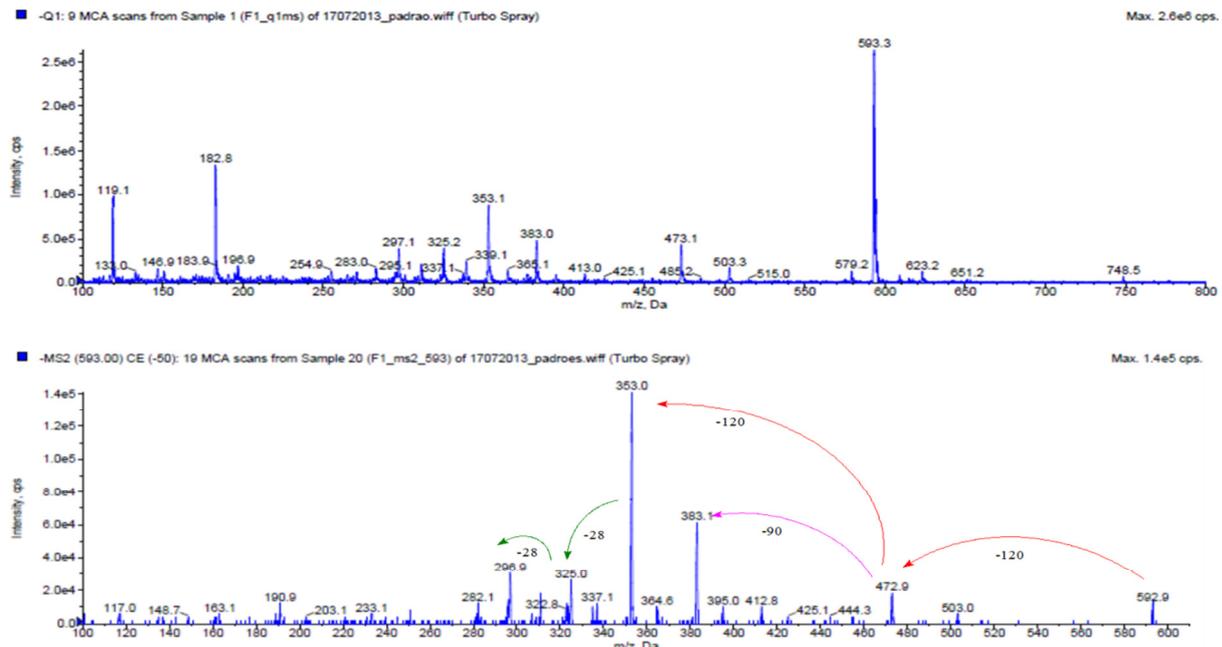


FIGURA 4.62: Espectro de massa (*full scan*) para banda F1 (acima), e espectro de íons produtos para o íon de m/z 593 (abaixo) (ESI, negativo).

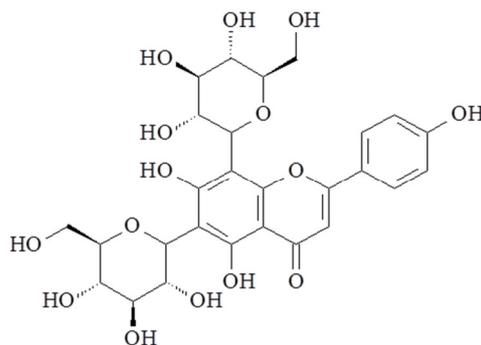


FIGURA 4.63: Estrutura do flavonoide C-glicosilado vicenina-2.

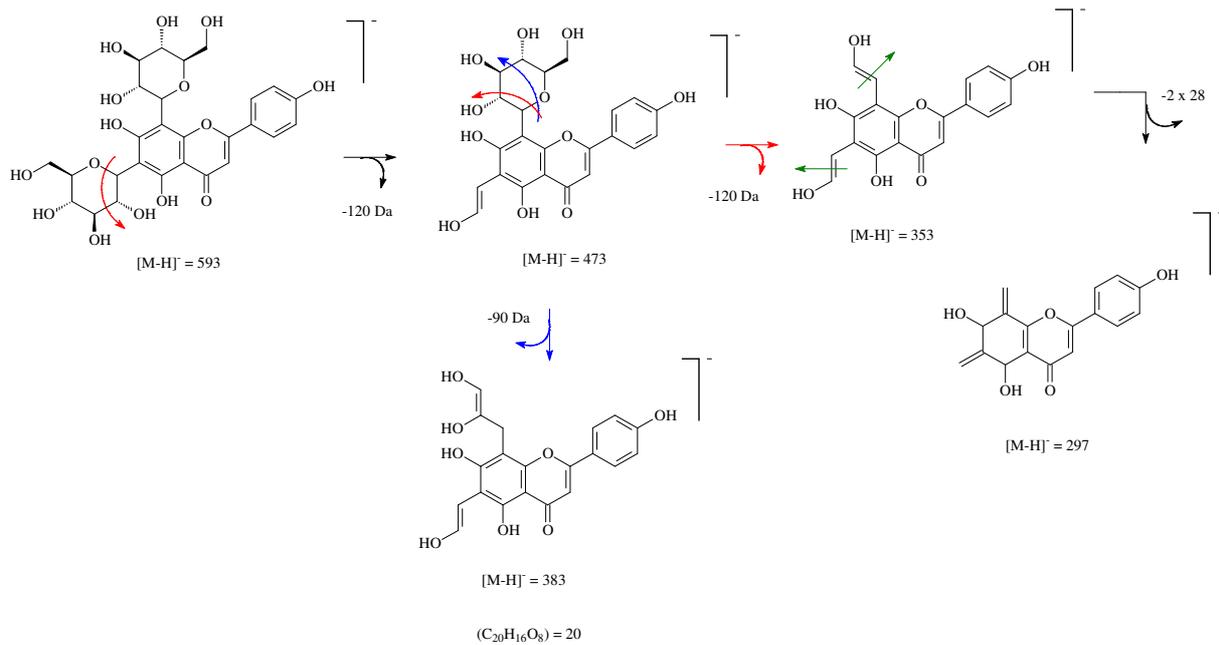


FIGURA 4.64: Proposta de fragmentação para molécula **F1**.

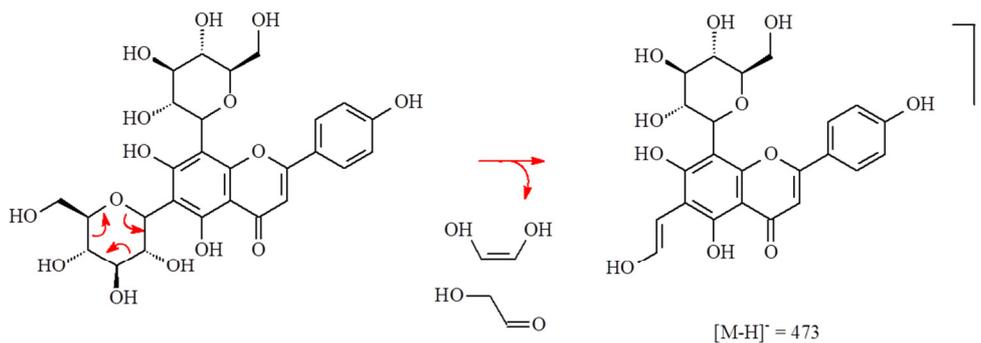


FIGURA 4.65: Mecanismo de fragmentação proposto para perda de 120 Da.

4.4.2.2 Identificação da banda F2

Da mesma forma, procederam-se as análises para a amostra F2, isolada a partir do extrato de folhas de citros Valência. Quando realizada a análise para o extrato das folhas por espectrometria de massas via inserção direta, no experimento de *full scan* no modo negativo, foi possível detectar que a amostra em questão apresentava íon pseudo-molecular [M-H]⁻ de 623 (FIGURA 4.66). Partiu-se, portanto, para o experimento de íons produtos (MS2) deste, onde foi detectado principalmente os íons de *m/z* 503, 413 e 383, sendo este último o pico base do espectro. As fragmentações nesta amostra foram semelhantes à amostra F1, onde se observou uma perda de 120 Da do íon pseudo-molecular, levando ao pico de *m/z* 503, que por sua vez sofre duas outras modificações. A primeira foi

uma perda de 90 Da, levando ao íon de m/z 413. A segunda foi mais uma perda de 120 Da, levando ao íon base de m/z 383. Este íon base, por sua vez, pode também perder duas unidades de monóxido de Carbono (28 Da), gerando respectivamente os íons fragmentos m/z 355 e 327.

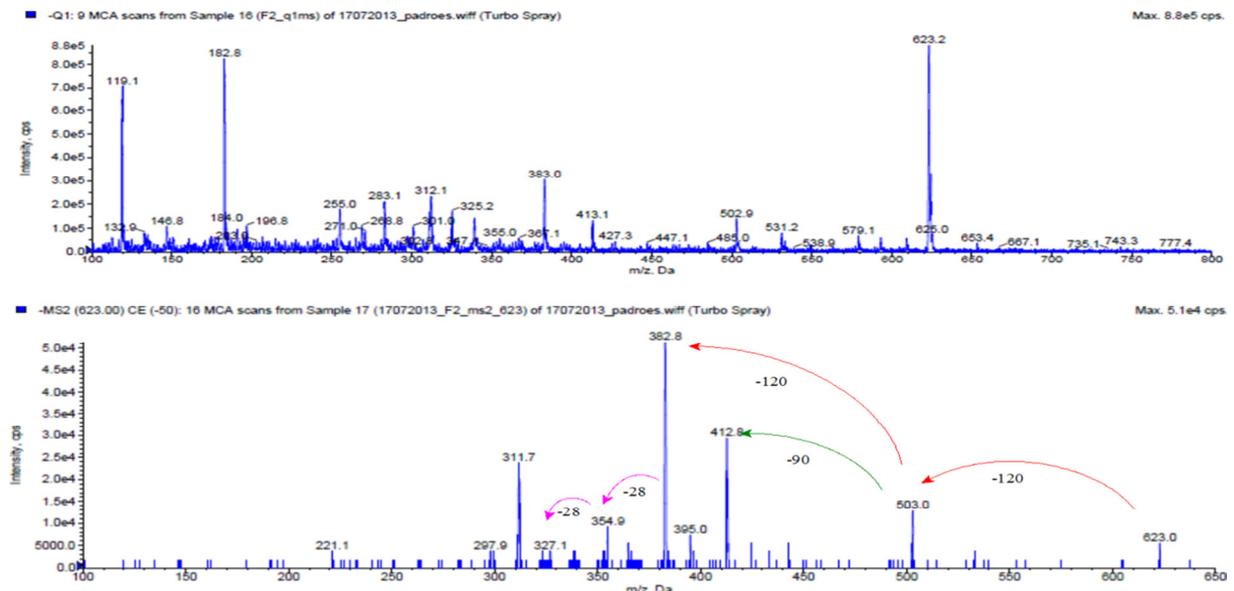


FIGURA 4.66: Espectro de massa (full scan) para banda **F2** (acima), e espectro de íons produtos para o íon de m/z 623 (abaixo) (ESI, negativo).

Ao reunir as informações obtidas através dos experimentos de espectrometria de massas é possível verificar um padrão de fragmentação semelhante à amostra F1, que são, de acordo com a literatura, perdas clássicas de flavonoides do tipo *C*-glicosilados. Sugeriu-se então a molécula 6,8-di-*C*-Glu-diosmetina, outro flavonoide *C*-glicosilado, e já descrito na literatura no gênero *Citrus* (FIGURA 4.67) (DUGO, 2005). Sugere-se que estes fragmentos sejam provenientes de clivagens através das unidades de açúcar do flavonóide proposto. A FIGURA 4.68 mostra as posições onde estariam ocorrendo essas clivagens no açúcar, para as perdas de 120, 90 e 28 Da.

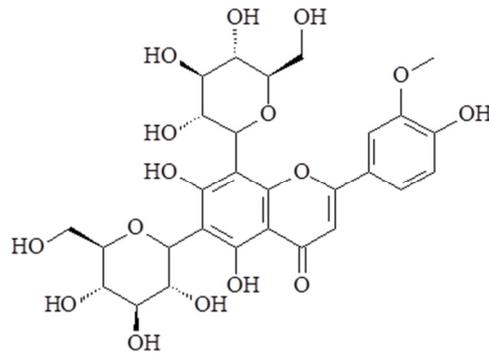


FIGURA 4.67: Estrutura do flavonoide C-glicosilado 6,8-di-C-Glu-diosmetina.

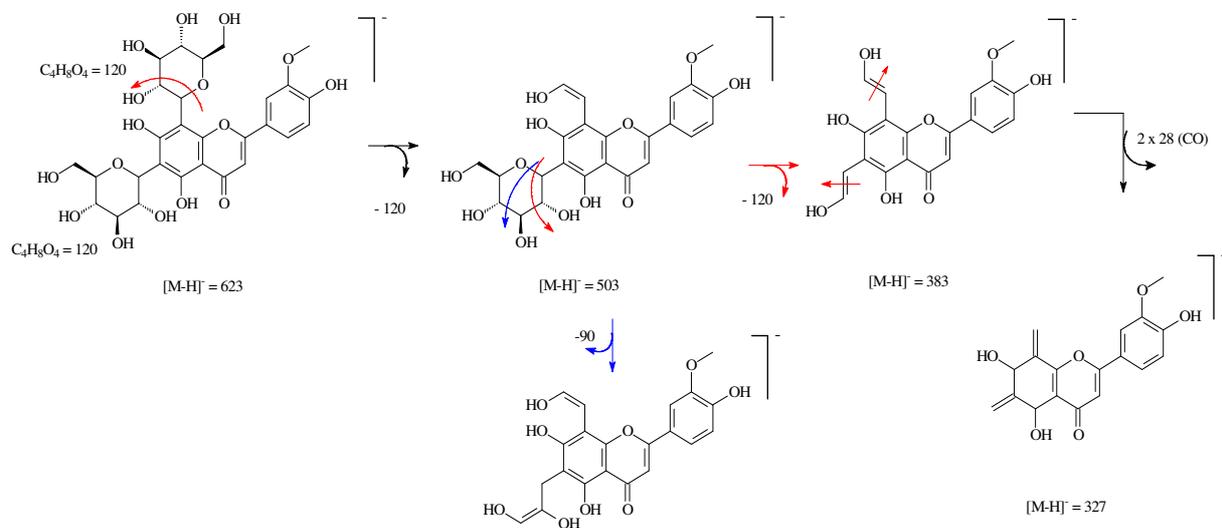


FIGURA 4.68: Proposta de fragmentação para molécula **F2**.

4.4.2.3 Identificação da banda F3

A amostra F3 foi isolada a partir do extrato de folhas de citros Valência e foi analisada por inserção direta no espectrômetro de massas. Primeiramente realizou-se um experimento de *full scan* no modo negativo, observando-se para essa amostra o íon pseudo-molecular desprotonado $[M-H]^-$ 563 (FIGURA 4.69). Após análise do experimento de *full scan*, foi realizado o experimento de íons produtos para o íon m/z 563, a partir deste foi possível verificar a geração de 4 fragmentos principais, sendo eles os íons de m/z 443, 413, 323 e 293, sendo este último o pico base. Para o íon pseudo-molecular m/z 563 foi possível atribuir 2 perdas significantes para a identificação da molécula. A primeira é a perda clássica de 120 Da, já verificado para ambas as amostras anteriores (F1 e F2), levando ao íon m/z 443. A segunda é a perda de 150 Da, aparecendo pela

primeira vez neste trabalho, gerando o íon m/z 413. Essa perda de 150 Da também é descrita na literatura como característica para flavonóides C-glicosilados. Através do espectro de íons produtos pode-se verificar que a perda de 150 u.m.a. levou ao fragmento muito mais intenso do que a perda de 120 Da. Para o íon m/z 413 também foi possível atribuir duas perdas, porém já conhecidas e discutidas nesse trabalho. A primeira foi uma perda de 90 Da, levando ao íon m/z 323, e a segunda de 120 Da gerando o pico base m/z 293.

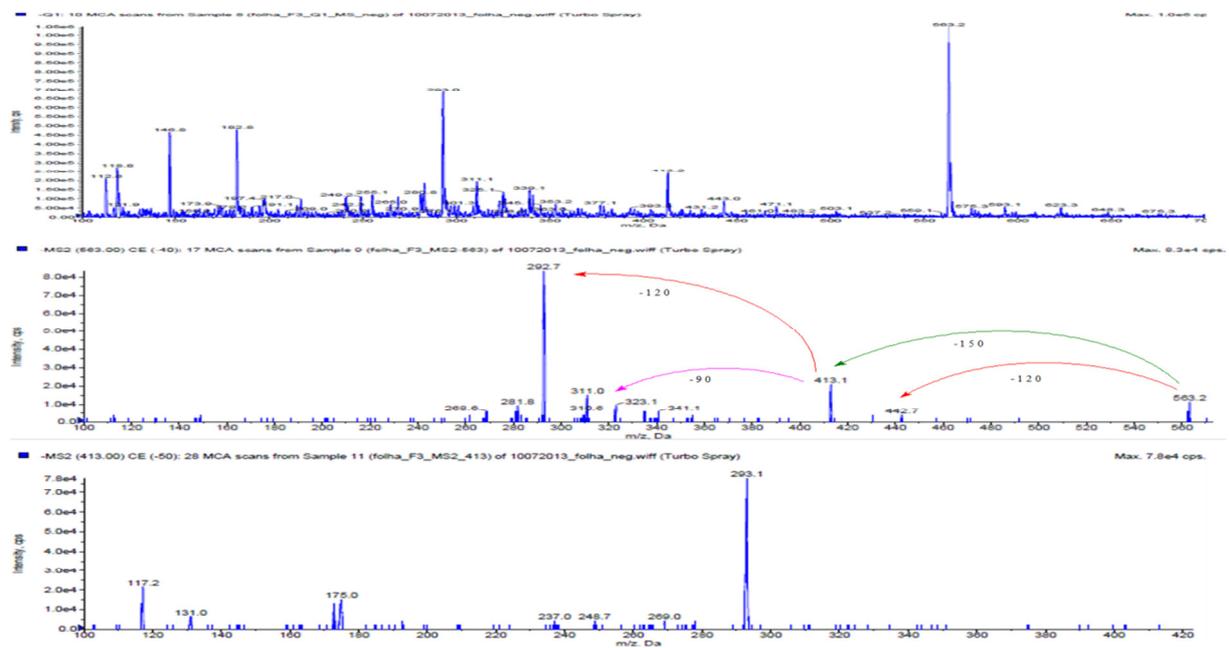


FIGURA 4.69: Espectro de massa (full scan) para banda **F3** (acima); espectro de íons produtos para o íon m/z 563 (meio); espectro de íons produtos para o íon m/z 413 (abaixo) (ESI, negativo).

A partir das informações relatadas dos experimentos de espectrometria de massas, verificou-se mais uma vez se tratar de um flavonóide do tipo C-glicosilado, sugerindo-se para a molécula em questão a substância F3 (FIGURA 4.70). Porém essa molécula não foi encontrada na literatura até o momento, estando essa amostra ainda em estudo. As propostas para o mecanismo de fragmentação podem ser vistos na FIGURA 4.71, onde é possível verificar a clivagem das unidades de açúcar para gerar as perdas mencionadas.

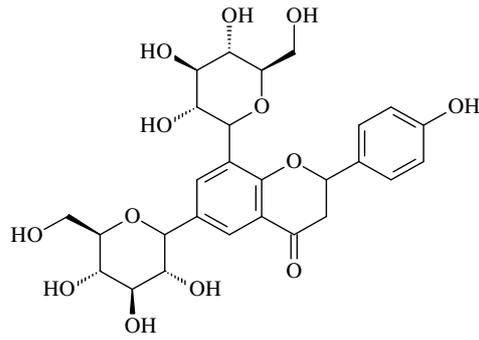


FIGURA 4.70: Estrutura do flavonoide C-glicosilado **F3** ($C_{27}H_{32}O_{13}$).

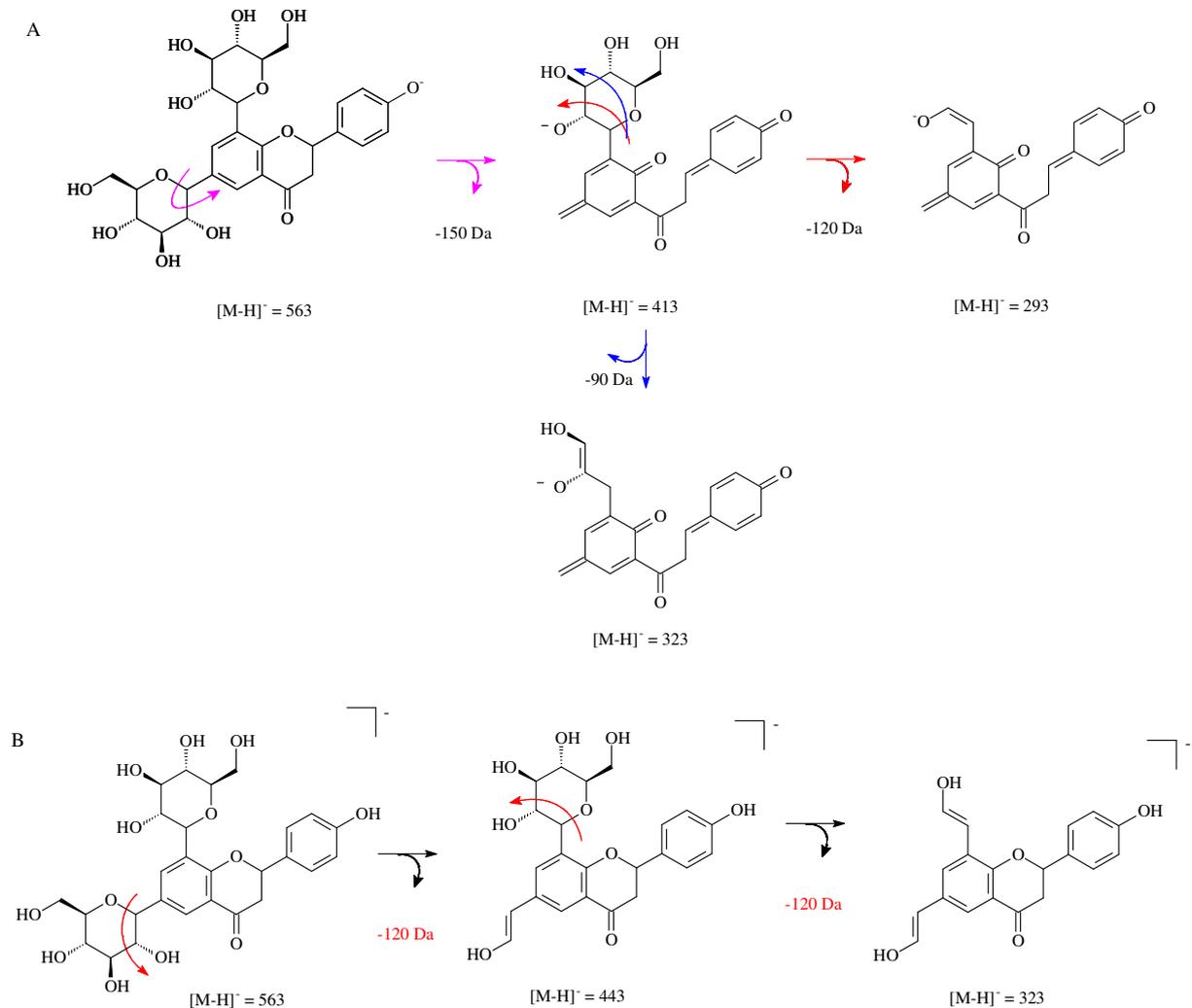


FIGURA 4.71: Proposta de fragmentação para a molécula **F3**. Rota A: perdendo inicialmente 150 Da; Rota (B): perdendo inicialmente 120 Da.

4.4.2.4 Identificação da banda F4

A amostra F4 foi isolada a partir do extrato de folhas de citros Valência, e foi em seguida analisada via espectrometria de massas. A metodologia utilizada foi a técnica de inserção direta, onde primeiramente realizou-se o experimento de *full scan* no modo negativo. Por meio deste experimento foi possível detectar que a amostra em questão apresentava íon pseudo-molecular $[M-H]^-$ 593 (FIGURA 4.72), mesmo íon encontrado para a amostra F1. O próximo passo foi realizar o experimento de íons produtos deste, onde foi detectado quase que exclusivamente um único íon, bastante estável. As perdas observadas para esta foram diferentes das encontradas nas amostras anteriores, onde estas mostraram um padrão de fragmentação bastante semelhante entre si. Neste espectro foi possível observar a partir do íon pseudo-molecular m/z 593, a perda de 308 Da, gerando o íon fragmento de m/z 285. Sabe-se pela literatura que esta é uma perda característica e comum em flavonóides *O*-glicosilados, sugerindo assim tratar-se dessa classe.

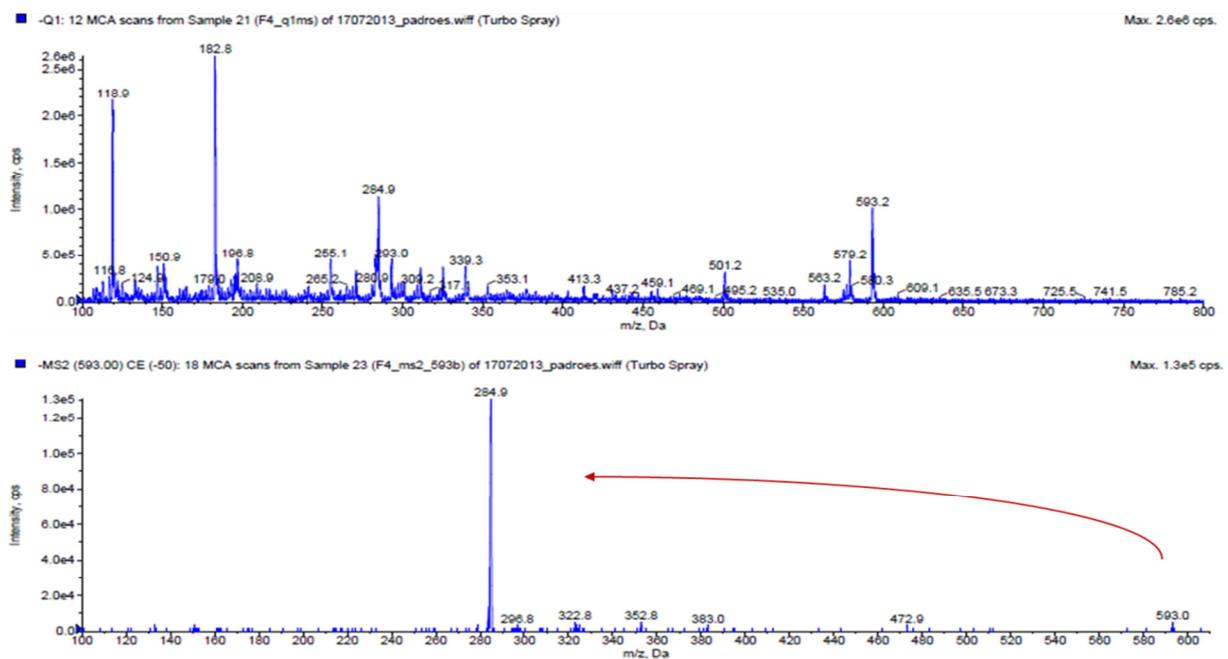


FIGURA 4.72: Espectro de massa (full scan) para banda F4 (acima), e espectro de íons produtos para o íons de m/z 593 (abaixo) (ESI, negativo).

Ao reunir as informações obtidas através dos experimentos de *full scan* e íons produtos, verificou-se que ambos apontam para duas estruturas bastante parecidas: os flavonoides *O*-glicosilados poncirina e didymina (FIGURA 4.73). Ambos os flavonoides são do tipo 7-*O*-glicosilados, e seus resíduos de açúcar são uma glicose e uma raminose para as duas estruturas. A única diferença entre

eles encontra-se em como essas unidades de açúcar estão ligadas entre si. No flavonoide poncirina, a glicose encontra-se ligada à raminose pelo carbono C-2'', enquanto que em didymina a glicose encontra-se ligada à raminose através do C-5''. Ambas as estruturas apresentam íon pseudo-molecular de m/z 593, e íon fragmento de m/z 285, perdendo 308 Da, não sendo possível até o momento definir a proposta correta (FIGURA 4.74). Ambos os flavonoides sugeridos já foram descritos na literatura no gênero *Citrus* (TRIPOLI, 2007).

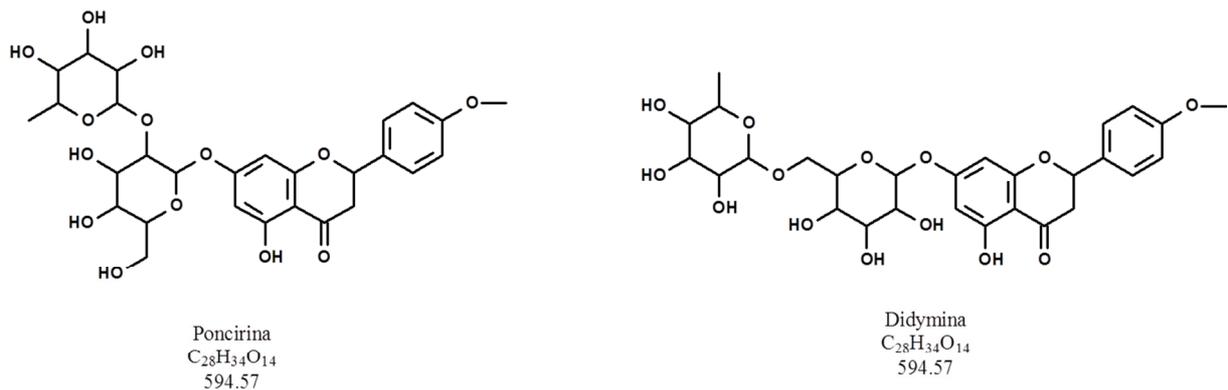


FIGURA 4.73: Estruturas possíveis para o flavonoide O-glicosilado F4.

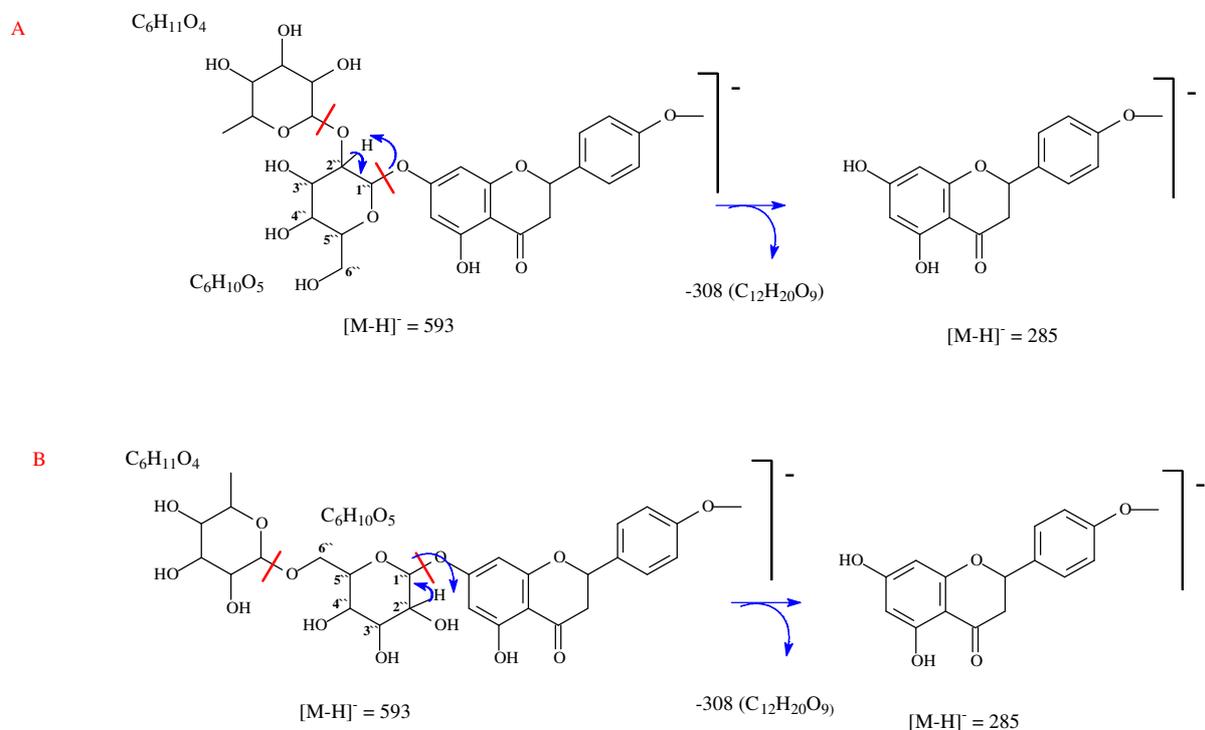


FIGURA 4.74: : Propostas de fragmentação para a banda F4. A: Proposta para o flavonoide poncirina; B: Proposta para o flavonóide didymina (modo negativo de ionização).

No caso de flavonoides *O*-glicosilados, como possui uma ligação bastante instável, rearranjos de açúcares pode ocorrer mesmo durante o processo de ionização, e a sequência de perdas das unidades dos açúcares podem não corresponder à sequência na molécula intacta (CUYCKENS, 2001), justificando o aparecimento do íon m/z 285 ainda no espectro de *full scan* e também, o não aparecimento do íon m/z 447 (a perda somente da raminose).

4.4.2.5 Identificação da banda F5

A amostra F4, previamente isolada do extrato de folhas de citros Valência, foi analisada via espectrometria de massas utilizando a técnica de inserção direta. A partir do experimento de *full scan*, realizado no modo negativo de ionização, obteve-se o íon pseudo-molecular desprotonado $[M-H]^-$ 607 (FIGURA 4.75). Em seguida realizou-se o experimento de íons produtos de m/z 607, podendo assim verificar a presença do íon de m/z 300, através da perda de 308 Da, o qual é bastante estável e intenso. A fragmentação dessa amostra (FIGURA 4.77) apresentou um perfil semelhante à amostra F4, característico de flavonoides *O*-glicosilados.

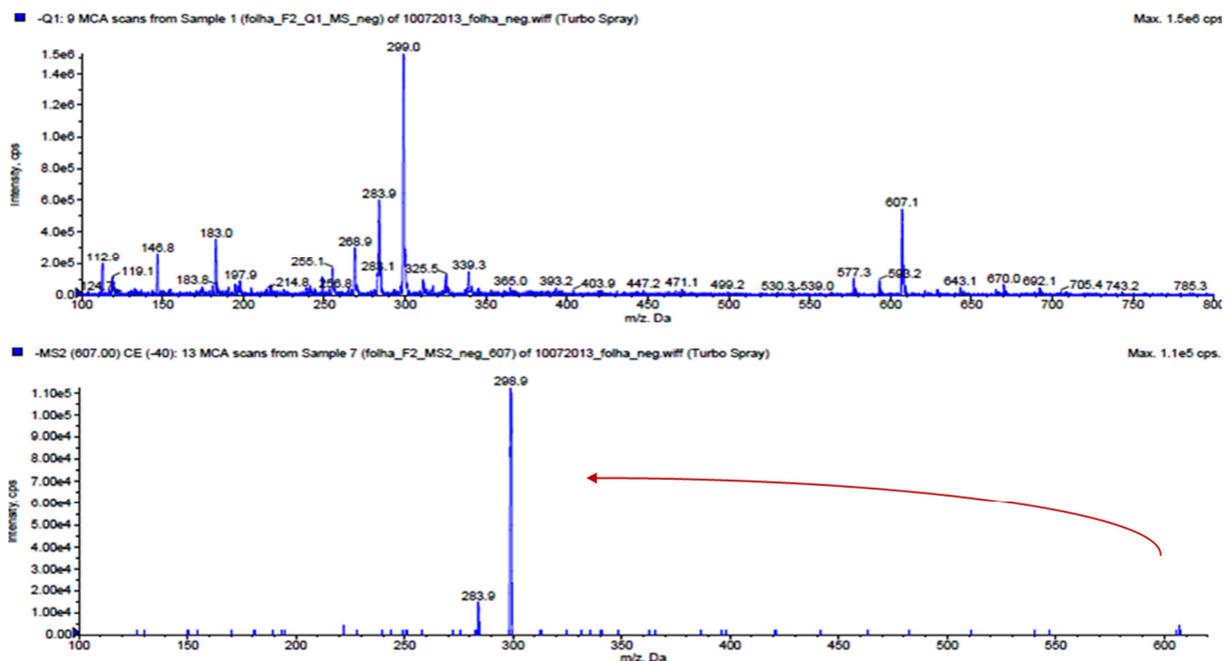


FIGURA 4.75: : Espectro de massa (full scan) para banda **F5** (acima), e espectro de íons produtos para o íon m/z 607 (abaixo) (ESI, negativo).

Concluiu-se, portanto, a partir do espectro de *full scan* e espectro de íons produtos, que a amostra em questão seria o flavonóide diosmina (FIGURA 4.76), já relatado na literatura como presente no gênero *Citrus* (TRIPOLI, 2007), e é atualmente muito utilizado na medicina em associação com o flavonóide hesperidina (BENAVENTE-GARCÍA, 2007).

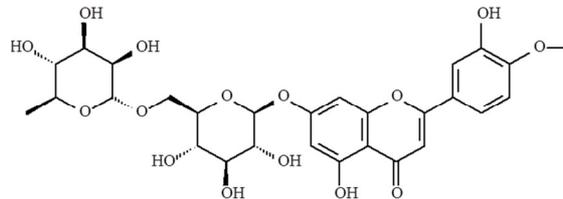


FIGURA 4.76: Estrutura para o Flavonoide *O*-Glicosilado diosmina.

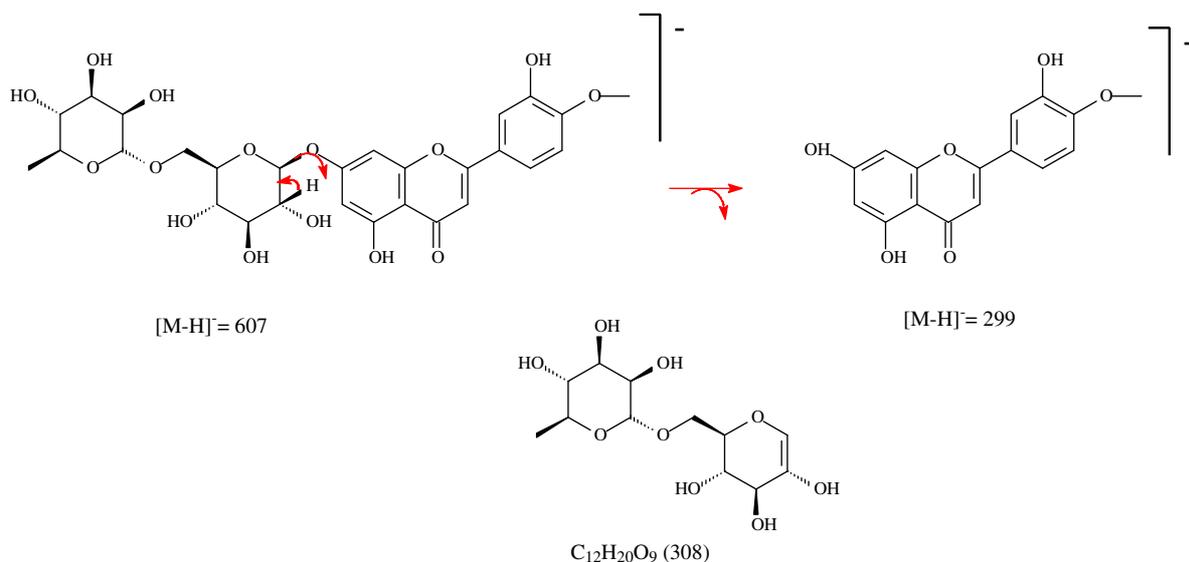


FIGURA 4.77: Propostas de fragmentação para a banda **F5** (modo negativo).

4.4.2.6 Identificação da banda F6

A amostra F6 foi isolada a partir do extrato de folhas de citros Valência. Foram realizados experimentos de espectrometria de massas por inserção direta, do tipo *full scan* e no modo negativo de ionização. Observou-se para essa amostra o íon pseudo-molecular desprotonado $[M-H]^-$ 609 (FIGURA 4.78). Dando continuidade às análises, possível constatar através de m/z 609 o íon fragmento principal m/z 301, obtido pela perda de 308 u.m.a. Essa perda de

308 Da já foi verificada anteriormente neste trabalho e na literatura, como característico de flavonoides *O*-glicosilados.

A partir das informações de íon pseudo-molecular, juntamente com seus respectivos íons produtos, sugeriu-se duas diferentes porpostas para a molécula em questão: o flavonoide 7-*O*-glicosilado hesperidina, ou 3-*O*-glicosilado rutina (FIGURA 4.79). As posições C-3 e C-7 são as mais comuns, sendo um desafio determinar o correto posicionamento do açúcar no flavonoide. Estudos da literatura mostrados nesse trabalho revelou que esses flavonoides sofrem não só a clivagem heterolítica convencional, mas também uma homolítica.

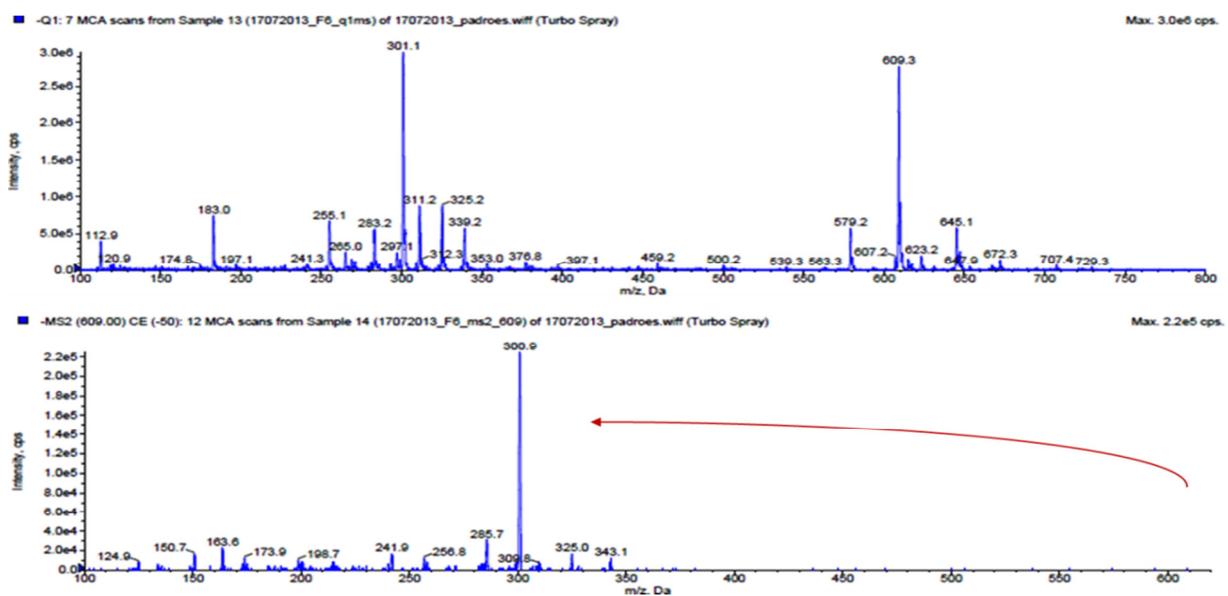


FIGURA 4.78: Espectro de massa (full scan) para banda **F6** (acima), e espectro de íons produtos para o íon m/z 609 (abaixo) (ESI, negativo).

Comparado os 7-*O* e 3-*O*-glicosilados, estes últimos produzem fragmentos de clivagem homolítica em maiores quantidades, e essa abundância relativa é utilizada como critério para determinar a posição da unidade de açúcar (ABLAJAN, 2006; CUYCKENS, 2005). Dessa maneira, analisaram-se padrões comerciais dos dois flavonóides em questão (FIGURA 4.80), e verificou-se que no experimento de íons produtos para a hesperidina, o íon fragmento encontrado foi o de m/z 301, referente à clivagem heterolítica. Para o padrão comercial de rutina, o mesmo experimento levou ao íon fragmento m/z 300, referente à clivagem homolítica. Após examinar esses resultados, sugeriu-se para a amostra F6 em questão a estrutura da hesperidina (FIGURA 4.81), já descrita na literatura como metabólito de *Citrus* (TRIPOLI, 2007).

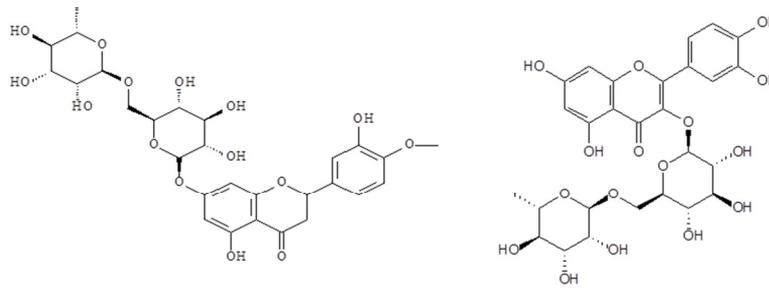


FIGURA 4.79: Estruturas dos flavonoides *O*-glicosilados hesperidina (esquerda) e rutina (direita).

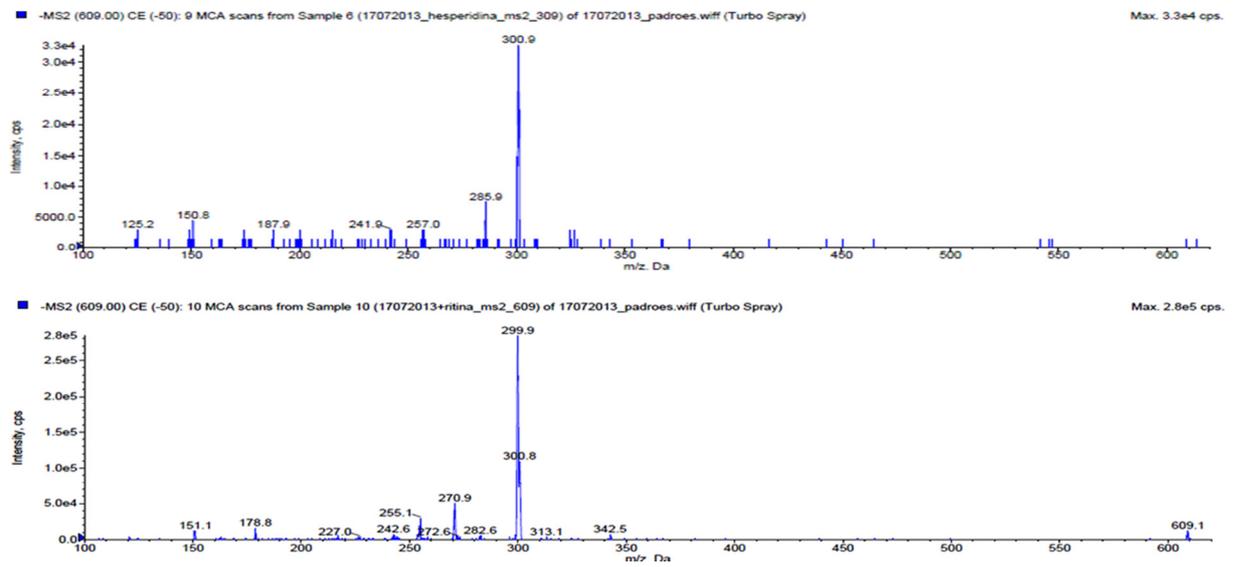


FIGURA 4.80: Espectro de massas de íons produtos do padrão comercial de hesperidina (acima) e rutina (abaixo) (modo negativo).

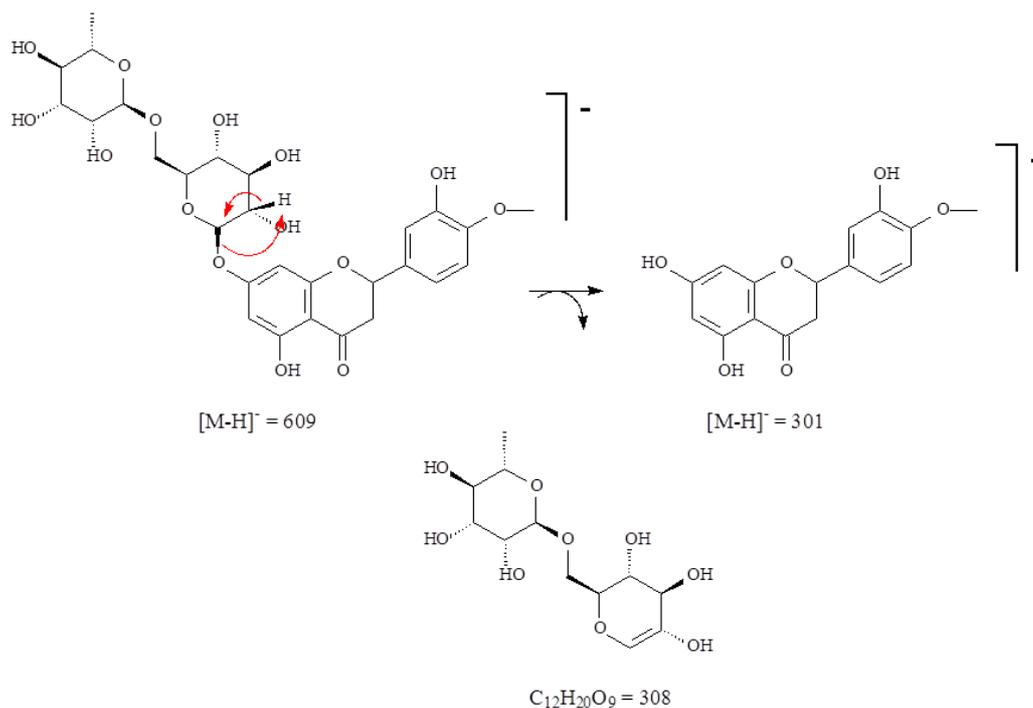


FIGURA 4.81: Proposta de fragmentação para a banda **F6** (modo negativo).

4.4.2.7 Identificação da banda CI-1

Realizaram-se também as análises dos compostos de maior polaridade do caule do porta enxerto (ou caule inferior) de *Citrus*, que foram as amostras eluídas com tempo de retenção muito baixo e grande proporção de água na fase móvel. Somente as duas primeiras amostras isoladas na técnica de HPLC-UV-SPE-NMR do caule inferior de citrus não puderam ser identificadas através das análises de RMN, sendo sua caracterização possível apenas através da técnica de espectrometria de massas.

Para a amostra C1, foram realizados experimentos de *full scan* no modo negativo de ionização, por inserção direta. Para essa amostra observou-se o íon pseudo-molecular $[M-H]^-$ 593 (FIGURA 4.82). Em seguida foi realizada a análise de íons fragmentos do íon m/z 593, gerando os íons m/z 473, 383 e 353, sendo este último o pico base. Várias perdas foram identificadas, como o íon de m/z 593 perdendo 120 e 90 Da, levando à formação dos íons fragmentos de m/z 473 e 503, respectivamente. Foi possível observar que o íon de m/z 473 também perde 120 e 90 Da, gerando os íons m/z 353 e 383. O íon base de m/z 353 pode ainda sofrer rearranjos, perdendo duas moléculas de monóxido de carbono (CO), levando aos íons de menores porcentagens m/z 325 e 297.

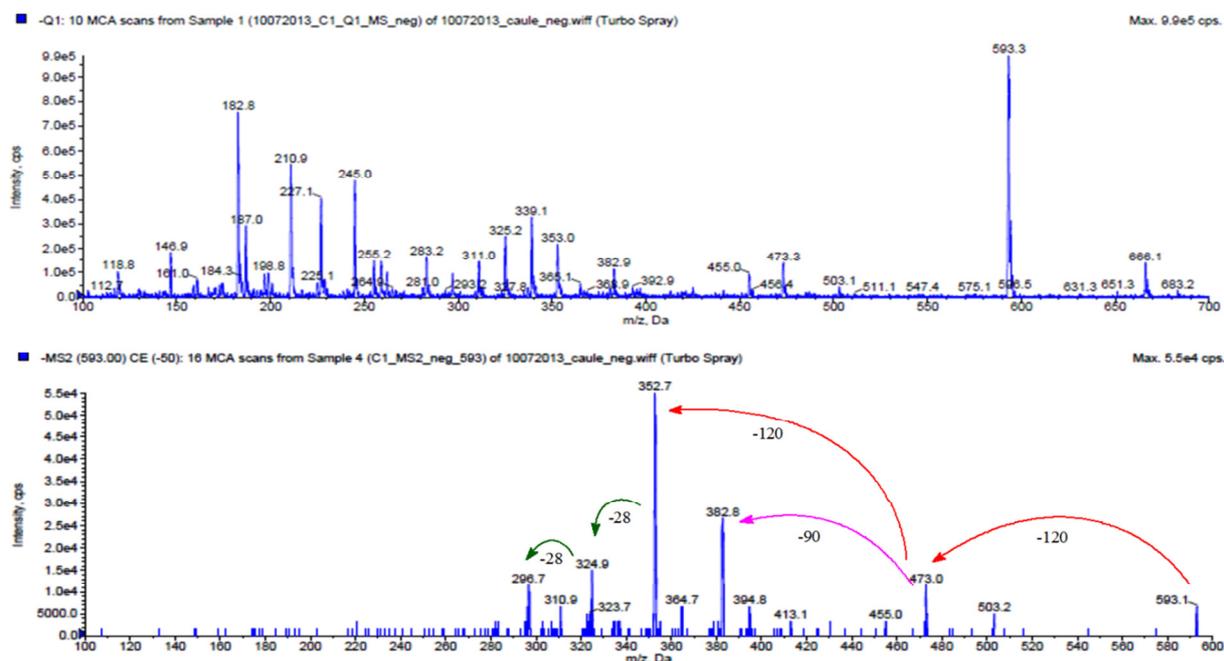


FIGURA 4.82: Espectro de massa (*full scan*) para banda **CI-1** (acima), e espectro de íons produtos (MS2) para o íon m/z 539 (abaixo) (ESI, negativo).

Ao analisar todas as perdas encontradas, verificou-se tratar de fragmentações características de flavonóides *C*-glicosilados, e que estas eram as mesmas da amostra F1, assim como o valor do íon pseudo-molecular. Concluiu-se então tratar novamente do flavonóide Vicenina-2, já isolado e identificado nas folhas de citros Valência neste trabalho. Sua proposta de fragmentação foi sugerida em item anterior (4.4.2.1), e pode ser visualizada na FIGURA 4.64 (pág. 126).

4.4.2.8 Identificação da banda CI-2

A amostra C2 foi isolada a partir do extrato do caule do porta enxerto de citros Valência. Foram realizados experimentos de espectrometria de massas por inserção direta, do tipo *full scan* e no modo negativo de ionização. Para a amostra C2 verificou-se o íon pseudo-molecular desprotonado $[M-H]^-$ 609 (FIGURA 4.83), e o espectro de íons produtos levou ao íon fragmento principal de m/z 301, obtido pela perda de 308 Da. Essa perda de 308 Da com o íon pseudo-molecular, já foi verificado anteriormente neste trabalho. Assim como na amostra F6, há duas possibilidades possíveis que satisfazem esses valores: o flavonoide 7-*O*-glicosilado hesperidina, e o 3-*O*-glicosilado rutina. Porém, ao analisar o espectro de íons produtos, não se observou o íon de m/z 300, indicando a não ocorrência de clivagem homolítica. Portanto, concluiu-se para a

amostra em questão o flavonoide hesperidina, já isolado e também identificado nas folhas do citros em estudo. A proposta sugerida para o mecanismo de fragmentação deste flavonoide pode ser encontrado na FIGURA 4.81 (pág. 137), item 4.4.2.6.

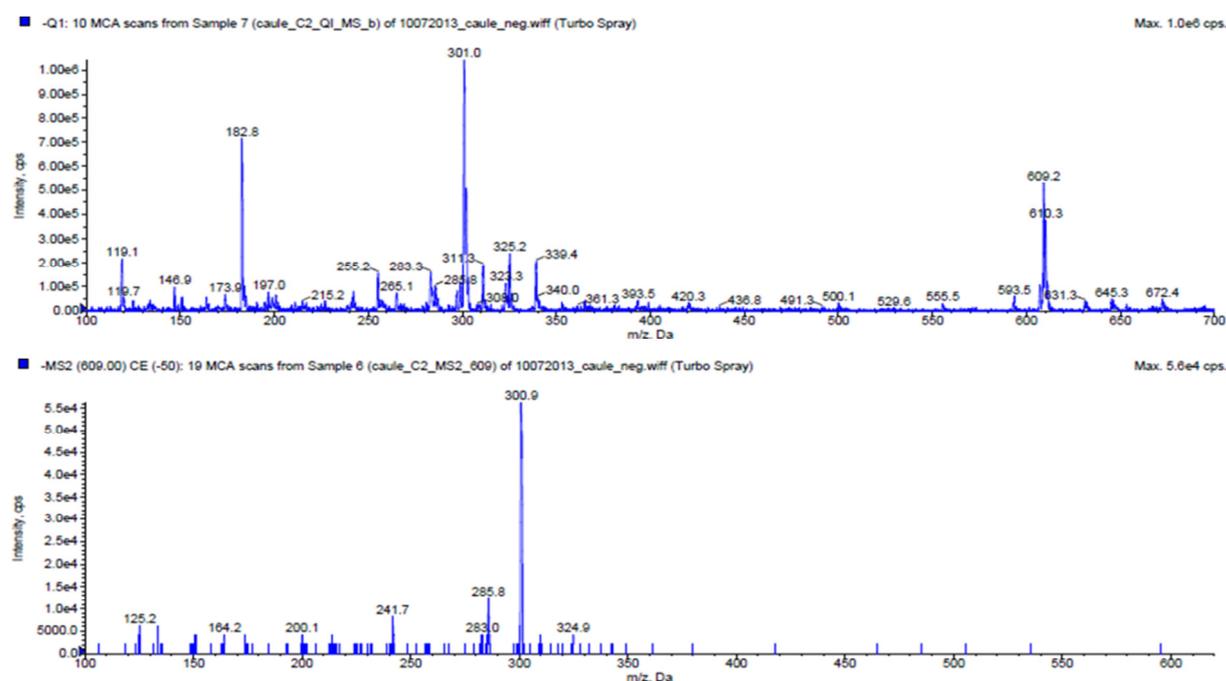


FIGURA 4.83: Espectro de massa (*full scan*) para banda **CI-2** (acima), e espectro de íons produtos (MS2) para o íon m/z 609 (abaixo) (ESI, negativo).

4.4.2.9 Identificação da banda CS-2

A amostra CS-2 foi isolada do caule da copa (ou caule superior) dos extratos de citros Valência (item 3.5.5.2). Primeiramente esta foi analisada através do experimento de *full scan*, utilizando a técnica de inserção direta, no modo negativo de ionização, dando origem ao íon pseudo-molecular $[M-H]^-$ 609 (FIGURA 4.84). Após realização do experimento de íons produtos (MS2), verificou-se a perda de 308 Da, levando à geração do íon m/z 301. Essa perda assim como seus respectivos íons, já foram encontrados neste trabalho tanto nas folhas quanto nos caules inferiores de citros Valência, tornando-se possível concluir para essa amostra o flavonoide hesperidina. A discussão completa da identificação, assim como a proposta para o mecanismo de fragmentação da molécula podem ser encontradas no item 4.4.2.6, uma vez que se trata do mesmo composto.

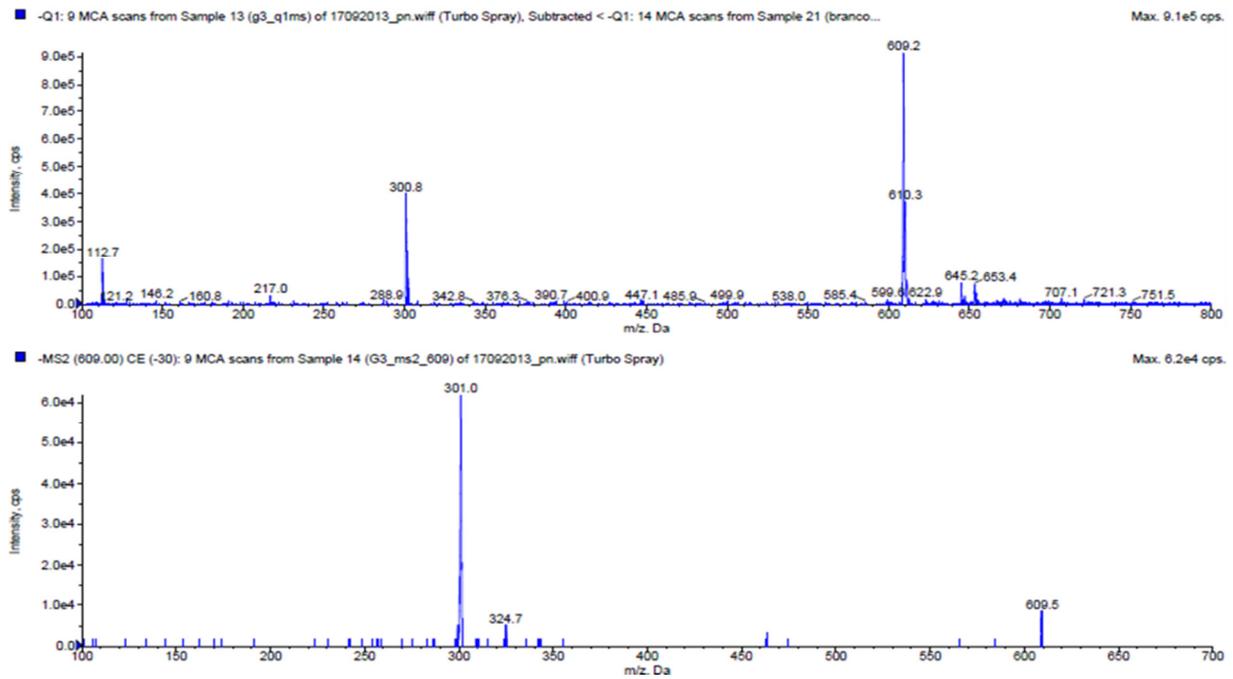


FIGURA 4.84: Espectro de massa (full scan) para banda **CS-2** (acima), e espectro de íons produtos (MS2) para o íon m/z 609 (abaixo) (ESI, negativo).

4.5 Análise da variação do perfil químico através da técnica LC-MS^E

Os resultados apresentados foram obtidos usando-se o modo de aquisição MS^E, nos modos positivo e negativo. Uma grande quantidade de analitos foi encontrada, mas aparentemente o modo negativo apresentou melhor sensibilidade e capacidade de detecção de compostos (FIGURA 4.85). Além disso, no modo positivo, para alguns órgãos da planta houve contaminação possivelmente com o polímero polietileno glicol $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$ (PEG), onde foi possível verificar *clusters* com perdas consecutivas de 44 Da (TONG, 1999). A contaminação por PEG pode também ser proveniente da própria água, ou ainda de polímeros extraídos de plásticos durante todo o procedimento experimental (MAHN, 2005).

Através dos cromatogramas de íons totais foi possível também obter a ionização de diversos compostos. Todos os órgãos da planta (raiz, caule inferior, caule superior e folhas) foram analisados separadamente, onde também foi realizado um estudo de comparação entre as plantas saudas (TIC em verde) e doentes (TIC em vermelho) com HLB. As análises de LC-MS^E foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.9.

Como os espectros obtidos na técnica de LC-MS^E são na maioria das vezes bastante semelhantes e ricos em informação, é difícil identificar diferenças entre as amostras baseando-se em uma simples análise visual. Dessa maneira, fez-se uso de quimiometria para melhor interpretação dos dados.

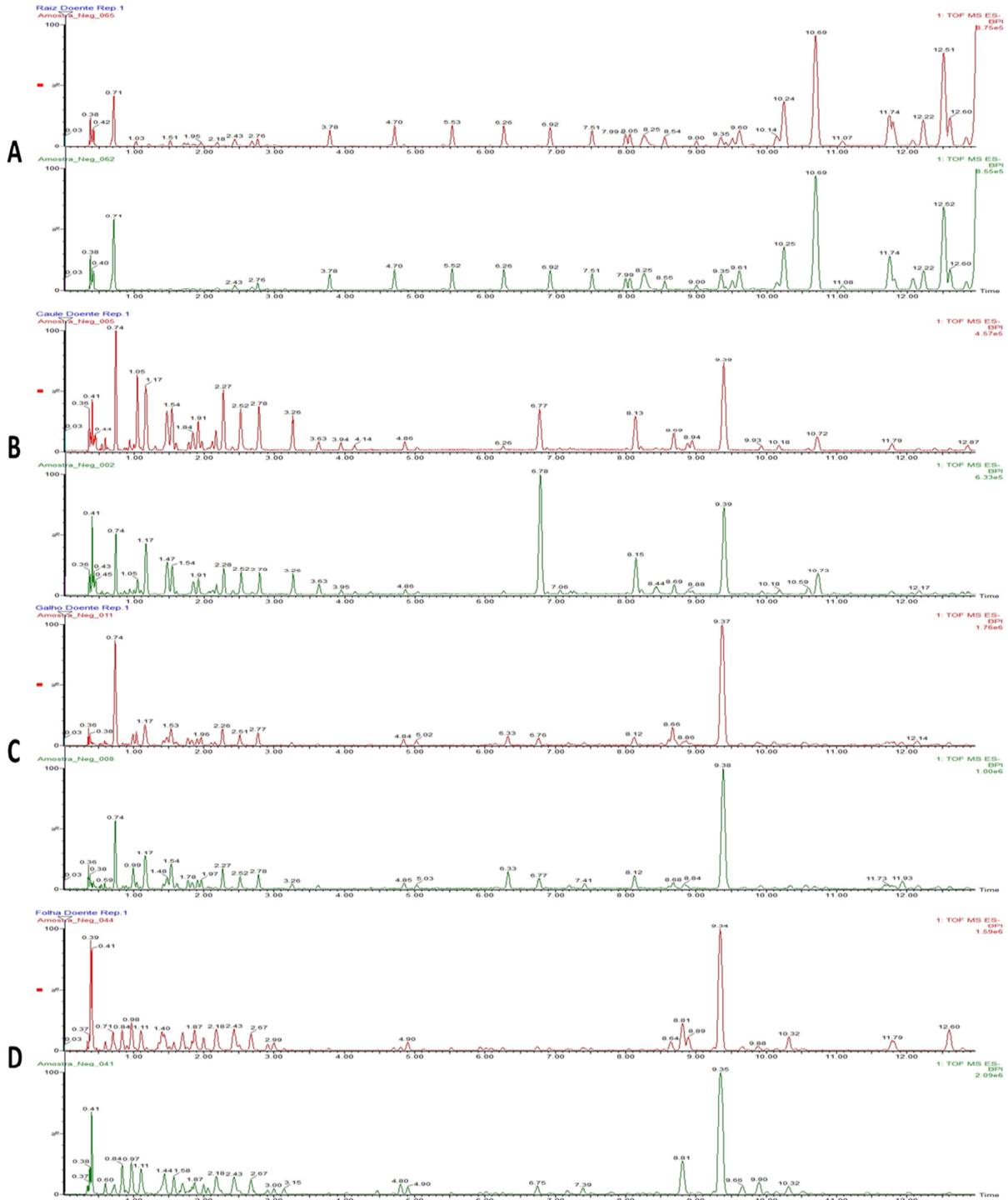


FIGURA 4.85: Cromatogramas de íons totais de todos os órgãos da planta estudada (ESI, negativo), infectadas com HLB (vermelho) e sadias (verde). A: Raízes; B: Caule inferior (ou caule do porta enxerto); C: Caule superior (ou caule da copa); D: folhas.

4.5.1 Análise de dados multivariados

4.5.1.1 Análise de componentes principais

Dentre as diferentes técnicas quimiométricas exploratórias descritas na literatura, a que foi utilizada neste trabalho foi a de análise de componentes principais (PCA), sendo a mais comum para extrair e racionalizar as informações obtidas através de descrição multivariada de sistemas biológicos. Este é um procedimento matemático aplicado aos dados (espectro de massas) para gerar variáveis latentes (PC, principais componentes) as quais são ortogonais e, portanto, não correlacionadas entre si.

Na FIGURA 4.86, cada círculo colorido representa uma amostra injetada. Quanto mais próximo cada círculo, mais semelhantes são as amostras; por isso, círculos da mesma cor representam as replicatas e estão bem próximos entre si, indicando a reprodutibilidade do método. Além disso, o gráfico de PCA permite também comprovar o resultado esperado, onde os diferentes órgãos da planta geraram extratos significativamente diferentes entre si.

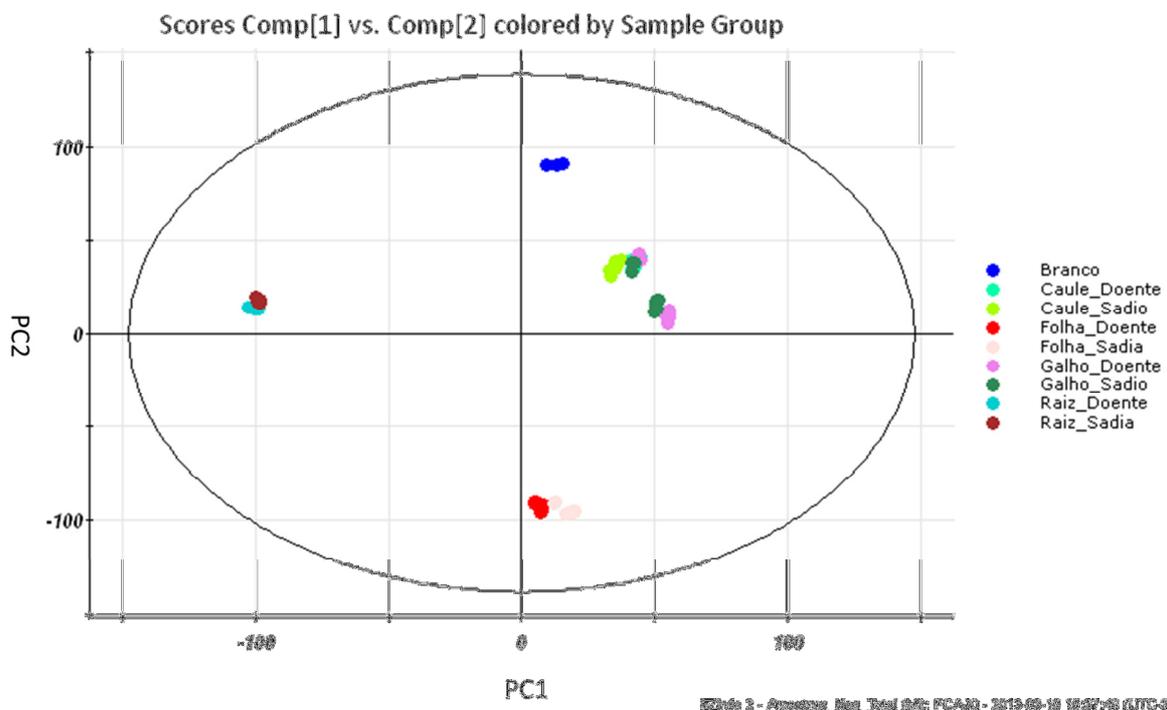


FIGURA 4.86: Gráfico em 2D de PCA, com todas as partes do citros Valência (utilizando fonte de ESI operando no modo negativo).

Na análise conjunta de todas as matrizes estudadas, a quimiometria mostrou haver diferenças relevantes entre as matrizes das partes aéreas daquelas referentes às partes inferiores dos citros estudados, enquanto que não houve grande diferenciação entre caule superior e inferior. Verificou-se nestas análises que não foi possível observar uma boa separação entre as matrizes de cada órgão, sendo necessária uma análise mais refinada. Dessa maneira, as matrizes de cada órgão foram reavaliadas separadamente. Assim, os gráficos de PCA da FIGURA 4.87 mostram agora os extratos dos diferentes órgãos separadamente. Os órgãos analisados foram raiz, caule inferior (ou caule do porta enxerto), caule superior (ou caule da copa) e folhas, e para cada análise comparou-se entre os diferentes tratamentos que são, planta infectada com HLB e planta sadia. Verifica-se em todos os casos sempre 2 grupos distintos. O grupo 1 inclui as matrizes da planta sadia (representado pelos círculos verdes), grupo 2 compreende as matrizes das plantas doentes (represento pelos círculos azuis). Verifica-se em PC1 que há uma tendência de separação das matrizes doentes daquelas referentes às amostras padrões onde a bactéria não foi inoculada.

Os estudos de LC-MS^E analisados com as ferramentas quimiométricas permitiram observar no geral diferenças entre as matrizes do citros Valência doentes com HLB e sadios, assim como entre os diferentes órgãos da planta. Estes estudos mostraram que os objetivos iniciais do projeto poderiam ser alcançados, pois se não houvesse diferenças significativas no perfil químico das matrizes estudadas, as hipóteses do projeto seriam inválidas.

Pôde-se verificar também que a quimiometria não mostrou quais são as diferenças nos perfis químicos em ambos os estudos, mas garante que elas existem e são significativas. Dessa maneira, tentou-se aplicar outras técnicas quimiométricas aos dados de espectrometria de massas, a fim de tentar identificar qual, ou quais compostos, seriam responsáveis pela diferenciação destes grupos.

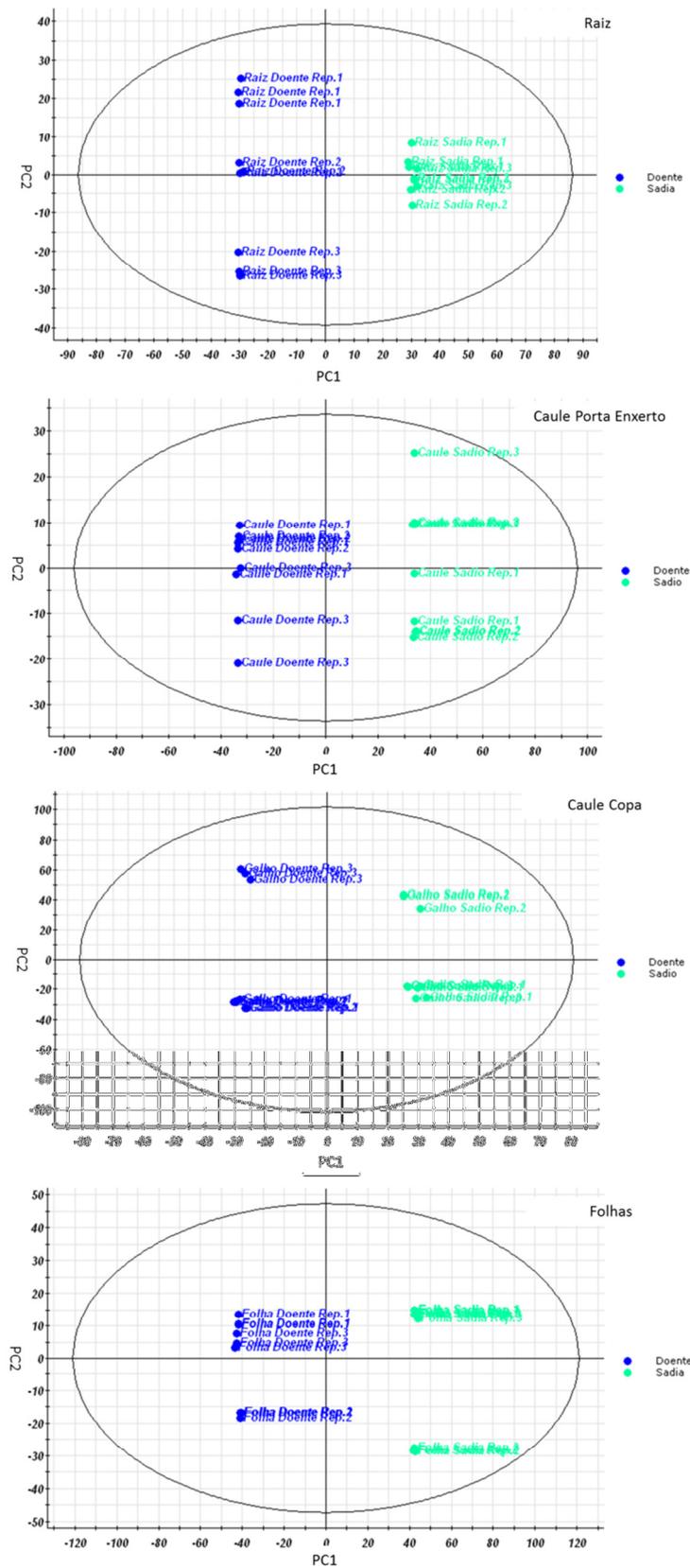


FIGURA 4.87: PCA para os diferentes órgãos de citrus, comparando entre o tratamento doente (azul escuro) e sadio (azul claro) (ESI, modo negativo).

4.5.1.2 Loadings plot

No Loadings Plot, além dos círculos representando as amostras, tem-se também triângulos que representam diferentes íons detectados no experimento de UPLC-MS/MS. Quanto mais próximo o triângulo de um determinado grupo de amostras, mais esse íon é representativo desse grupo. Íons equidistantes entre 2 ou 3 grupos indicam que os mesmos apresentam abundância semelhante nos diferentes grupos de amostras. Na FIGURA 4.88, tem-se o “loadings Plot” com todos os órgãos estudados em um único gráfico. Nesse gráfico é possível verificar a existência de íons que são característicos para cada parte da planta, mas ainda não foi possível verificar a diferenciação dos íons para cada tipo de tratamento, doente e sadio, sendo portanto necessário uma análise mais refinada. Dessa maneira, as matrizes de cada órgão foram novamente reavaliadas separadamente, assim como nas análises de PCA mostradas anteriormente.

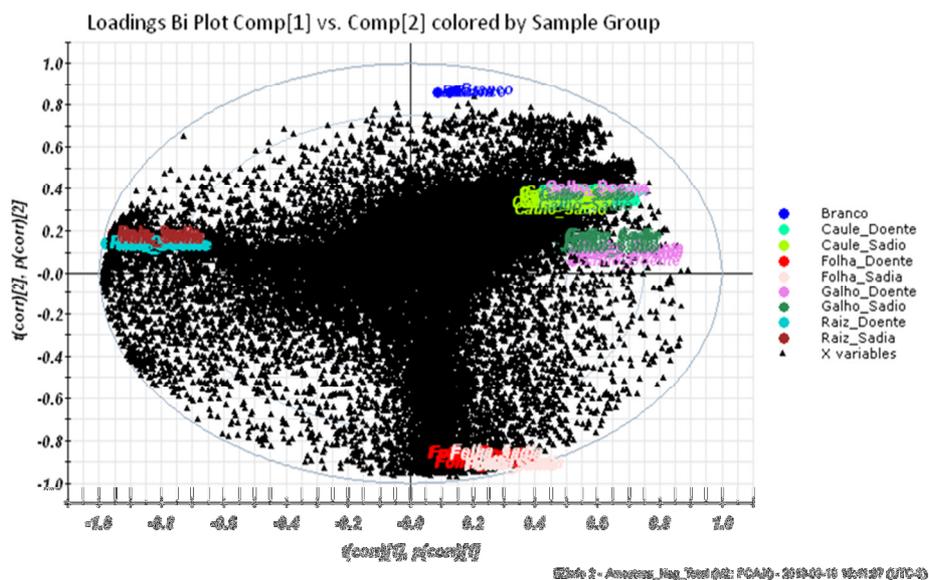


FIGURA 4.88: Gráfico de "Loadings Plot", com todos os órgãos da planta reunidos (ESI, modo negativo).

Os gráficos de Loadings plot da FIGURA 4.89 exibem os gráficos para folhas, caule superior, caule inferior e raízes, analisados separadamente. O objetivo neste estudo foi comparar a diferença do perfil químico entre a planta infectada com a bactéria contra a planta sadia. Pode-se verificar nesses gráficos que a maioria dos íons detectados (representados pelos triângulos pretos) são comuns a ambos os tratamentos, pois se encontram exatamente entre os

agrupamentos das amostras sadias e doentes. Porém, ainda assim é possível verificar alguns íons mais próximos de um dado tratamento, sugerindo que esses íons possam ser os responsáveis pela diferenciação de cada grupo.

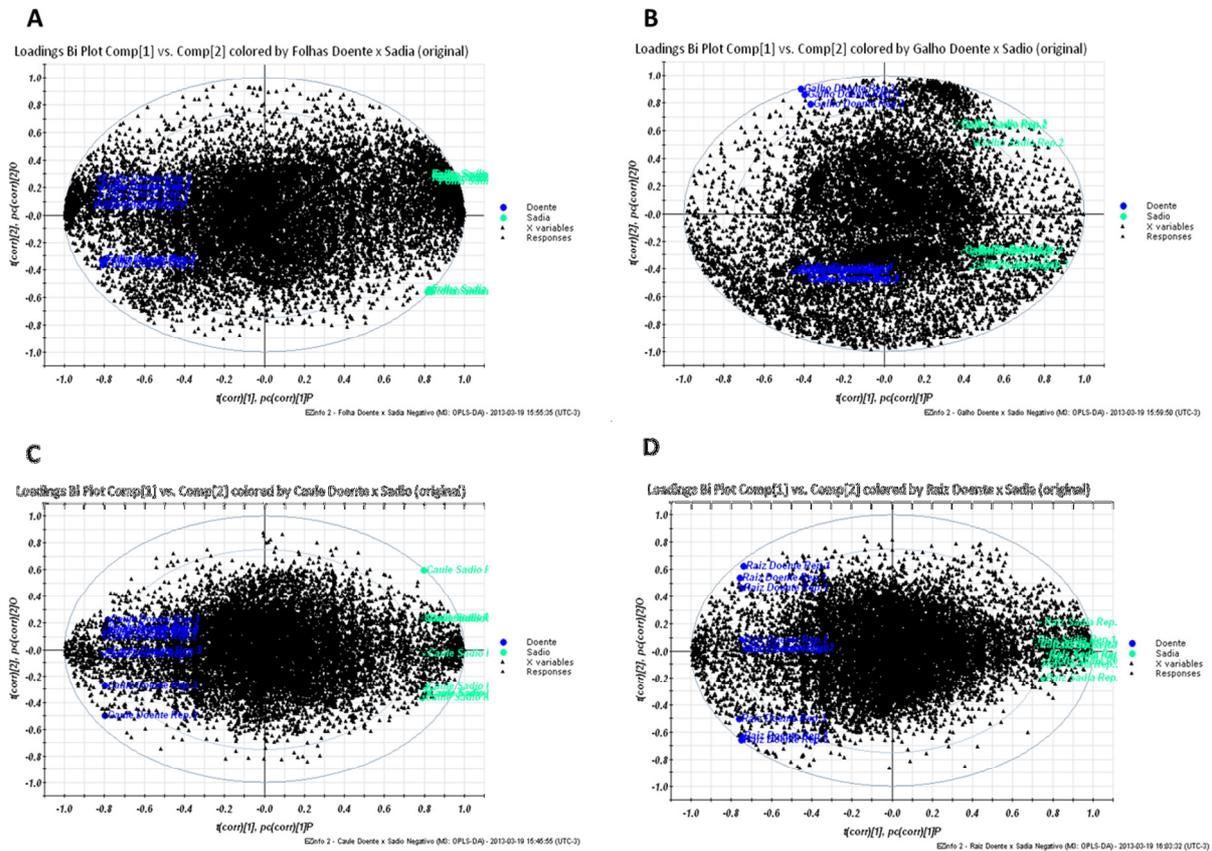


FIGURA 4.89: Loadings Plot para cada órgão da planta, comparando os íons detectados entre os tratamentos doentes e sadios (ESI, modo negativo). A: folhas; B: caule superior; C: caule inferior; D: raiz.

4.5.1.3 S-plot

Outra ferramenta estatística é o S-Plot, um gráfico onde cada círculo representa um composto determinado no experimento de LC-MS^E. Nesse gráfico, os íons abaixo da linha horizontal (valores de Y negativo) representam íons mais característicos para a amostra infectada com HLB, enquanto os íons acima da linha horizontal representam íons mais característicos para a amostra de citrus sadia. Quanto mais afastado do eixo, mais representativo de cada grupo são os íons. Desse modo, os íons mais presentes nos extremos desse gráfico são os mais característicos para cada tipo de tratamento de amostra. A grande vantagem do uso dessa técnica é poder identificar os íons que são mais

representativos. Portanto, para esta técnica em especial, será analisado cada órgão separadamente.

4.5.1.3.1 Caule do porta enxerto

Começando a análise pelo caule do porta enxerto de citros Valência (FIGURA 4.90), foi possível encontrar íons característicos para cada tipo diferente de tratamento, onde abaixo da linha horizontal representa o tratamento doente com HLB e, acima o tratamento sadio. Ao analisar esses íons, o software cria uma lista dos íons que mais se diferenciam entre os dois grupos. Os íons presentes nos extremos desse gráfico foram analisados, e destacaram-se os íons m/z 265,0939, 315,0708 e 593,1513, cujos tempos de retenção são 0,73, 1,04 e 6,78 minutos, respectivamente.

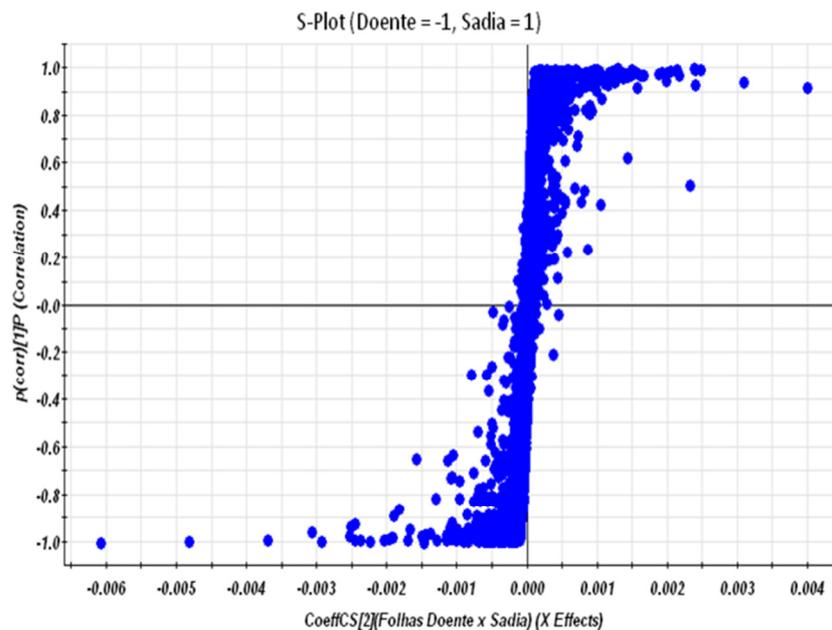


FIGURA 4.90: Gráfico de S-Plot do caule do porta enxerto de citros Valência (ESI, modo negativo).

É possível ainda ressaltar que o primeiro íon mencionado aumenta sua concentração 2,1 vezes no tratamento doente, enquanto que o segundo aumenta quase 4 vezes no mesmo tratamento. Por sua vez, o íon m/z 593 aumenta sua concentração em 4 vezes nas plantas sadias. Em outras palavras, os íons m/z 265 e 315 são produzidos em maior quantidade quando a planta é infectada pela

bactéria “*Ca. Liberibacter*”, enquanto o íon m/z 593 é consumido nessas mesmas condições. Após analisar os espectros de massas, tanto dos respectivos íons moleculares quanto dos íons produtos (FIGURA 4.92 e FIGURA 4.93), foi possível identificar suas estruturas como sendo a orbicularina (ácido 2,5-dihidroxibenzóico 2-O-C1-glicopiranoose) para o íon m/z 315, e o flavonoide vicenina-2 para o íon m/z 593 (FIGURA 4.91).

Para a orbicularina observou-se íons obtidos a partir de clivagens tanto heterolíticas como homolíticas, gerando assim fragmentos com diferenças de 1 Da entre eles, como exemplo m/z 108/109 e 152/153. As propostas para essas fragmentações podem ser verificadas na FIGURA 4.94. Por se tratar de espectros de massas de alta resolução, ao realizar-se uma comparação da massa teórica calculada (315,0716 Da.) e da massa medida experimentalmente (315,0708 Da.), verificou-se que estas são bastante semelhantes, havendo variação de apenas 0,0008 Da, confirmando a estrutura proposta. Ainda analisando este íon, é possível realizar uma comparação quantitativa nos diferentes tratamentos analisados, onde é possível verificar que nas amostras preparadas a partir do caule inferior das mudas infectadas com HLB, a banda referente ao íon é muito mais intensa quando comparada com a amostra do mesmo órgão sadio (FIGURA 4.95), confirmando o aumento significativo de 4 vezes no tratamento infectado. A orbicularina já havia sido relatada na literatura como substância promissora para diagnóstico da doença em estudo (FELDMAN, 1969; VAN VUUREN, 1977), e também foi recentemente estudada por um ex-aluno do grupo (MAGNANI, 2007).

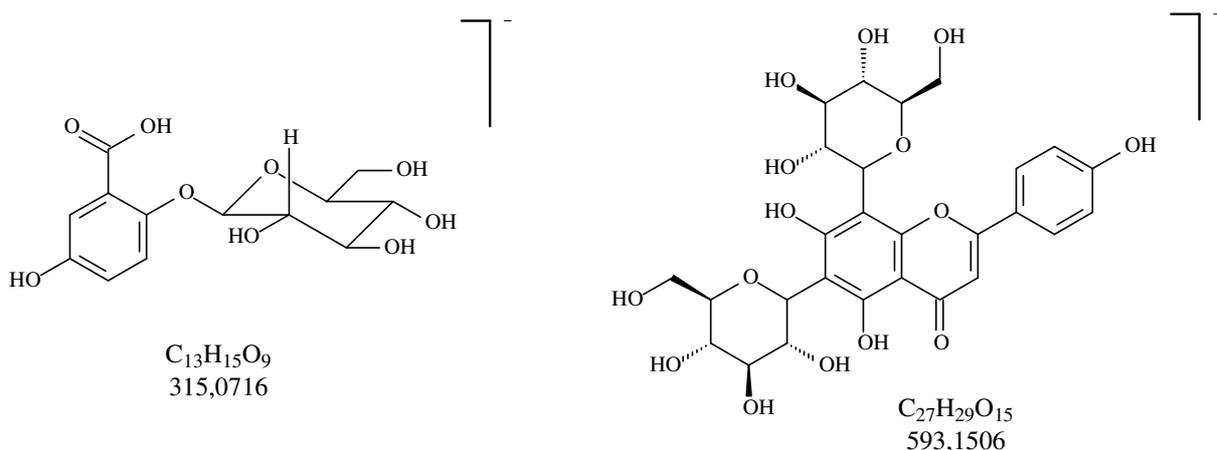


FIGURA 4.91: Estruturas propostas para os íons m/z 315,0724 e 593,1513, com suas respectivas fórmulas moleculares e massa calculada teoricamente.

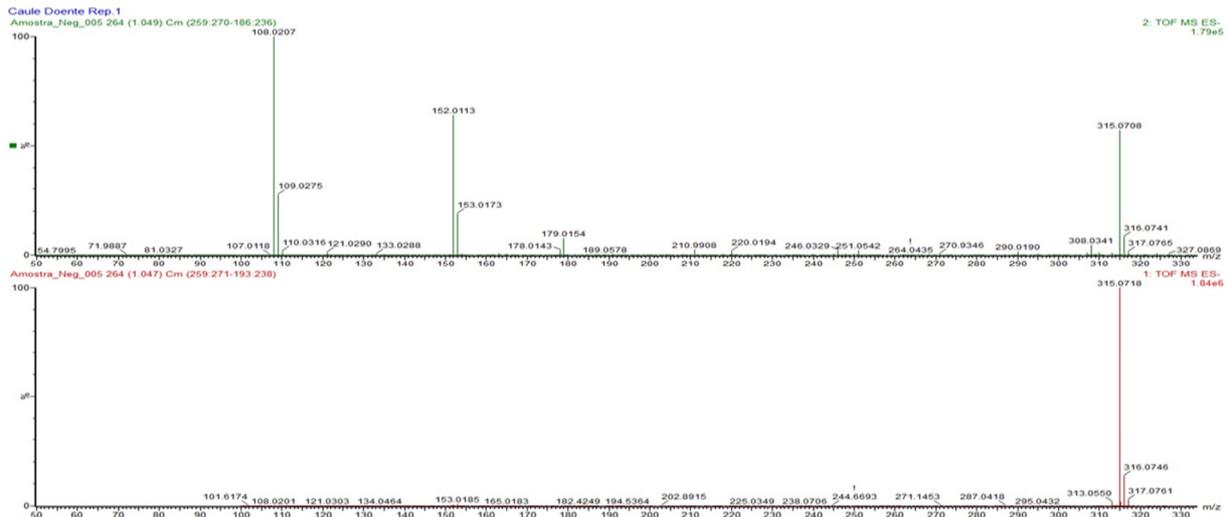


FIGURA 4.92: Espectro de massas para o íon m/z 315,0708 encontrado no caule do porta enxerto (ESI, modo negativo). Acima: espectro de íons produtos. Abaixo: espectro do íon molecular.

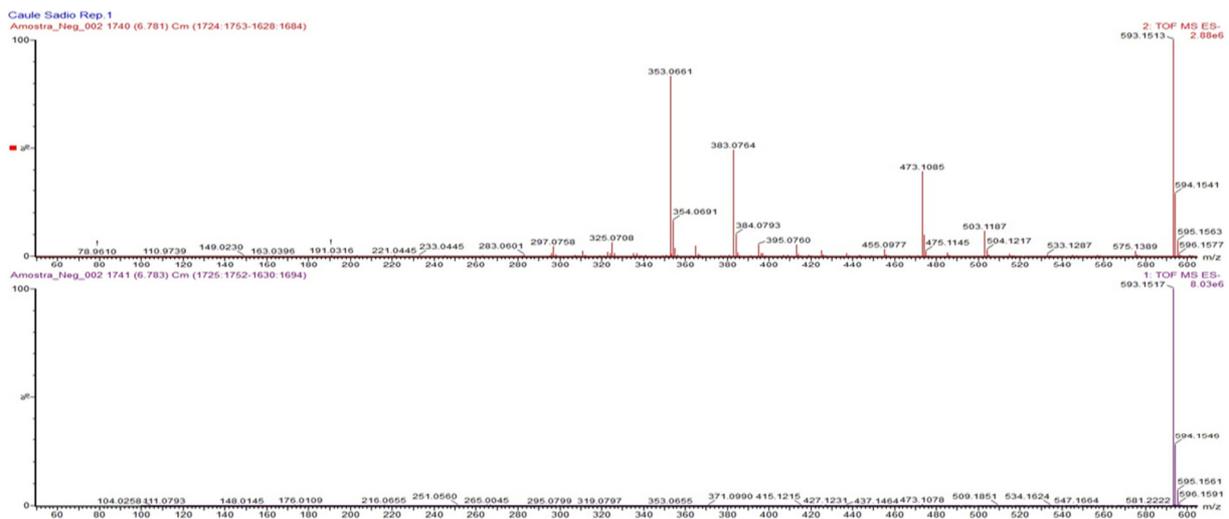
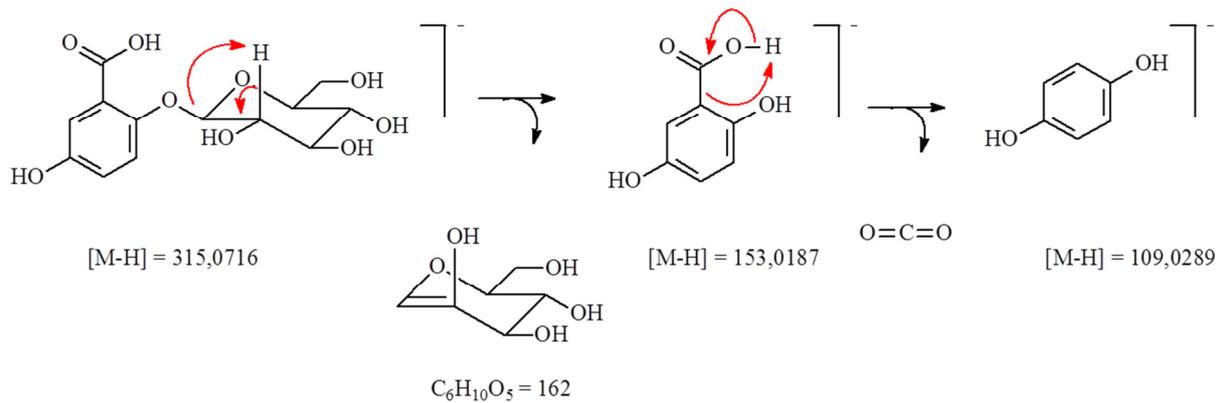


FIGURA 4.93: Espectro de massas para o íon m/z 593,1513 encontrado no caule do porta enxerto (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

Clivagem heterolítica:



Clivagem homolítica:

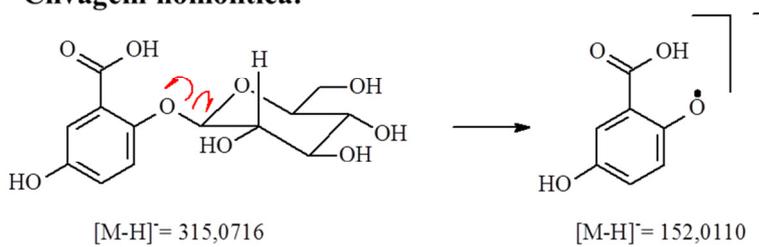


FIGURA 4.94: Proposta de fragmentação para a orbicularina (Ácido 2,5-dihidroxi-benzóico 2-O-C-1-glicopiranosse), identificada nos caule do porta enxerto do citrus em estudo.

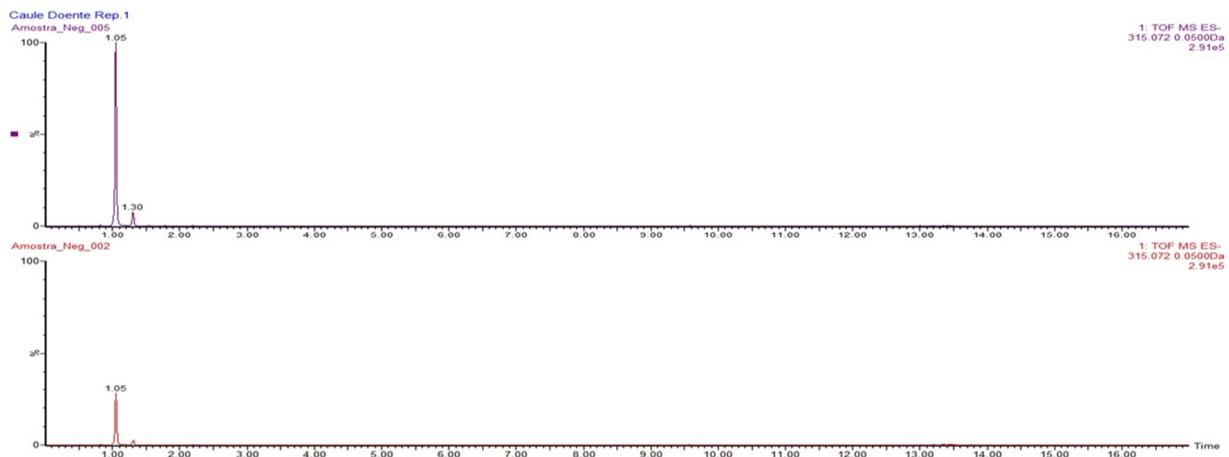


FIGURA 4.95: Comparação da concentração do íon m/z 315,0708, referente à orbicularina, nas amostras do caule doente (acima) e sadio (abaixo) (ESI, modo negativo).

Para o flavonoide vicenina-2, por sua vez, é possível verificar uma perda de 240 Da, significando tratar-se nesse momento de um flavonóide C-glicosilado, como já mostrado anteriormente. Essa perda de 240 Da é proveniente de duas perdas de 120 Da, gerando os fragmentos m/z 473 e 353, referente a duas unidades de açúcar, ligados no C-6 e C-8. Essas propostas

podem ser verificadas na FIGURA 4.96, já identificada anteriormente. Foi possível comparar a massa medida experimentalmente (593,1513 Da.) com a respectiva massa calculada teoricamente (593,1506 Da.). Ao fazer essa comparação, foi possível constatar que a variação de massas de 0,0007 Da. Os respectivos fragmentos encontrados para esse composto também apresentam massa exata próxima aos valores teóricos, com uma variação menor de 0,0007 Da, como podem ser observadas na página 152.

Para esse flavonoide também foi possível realizar uma comparação quantitativa entre o caule inferior da planta doente e sadia. Pode-se verificar na FIGURA 4.97 que o íon m/z 593 encontra-se em maior intensidade no espectro das amostras de caules sadios, quadruplicando sua concentração nessas amostras, quando comparadas às plantas infectadas com HLB, de acordo com a TABELA 4.16.

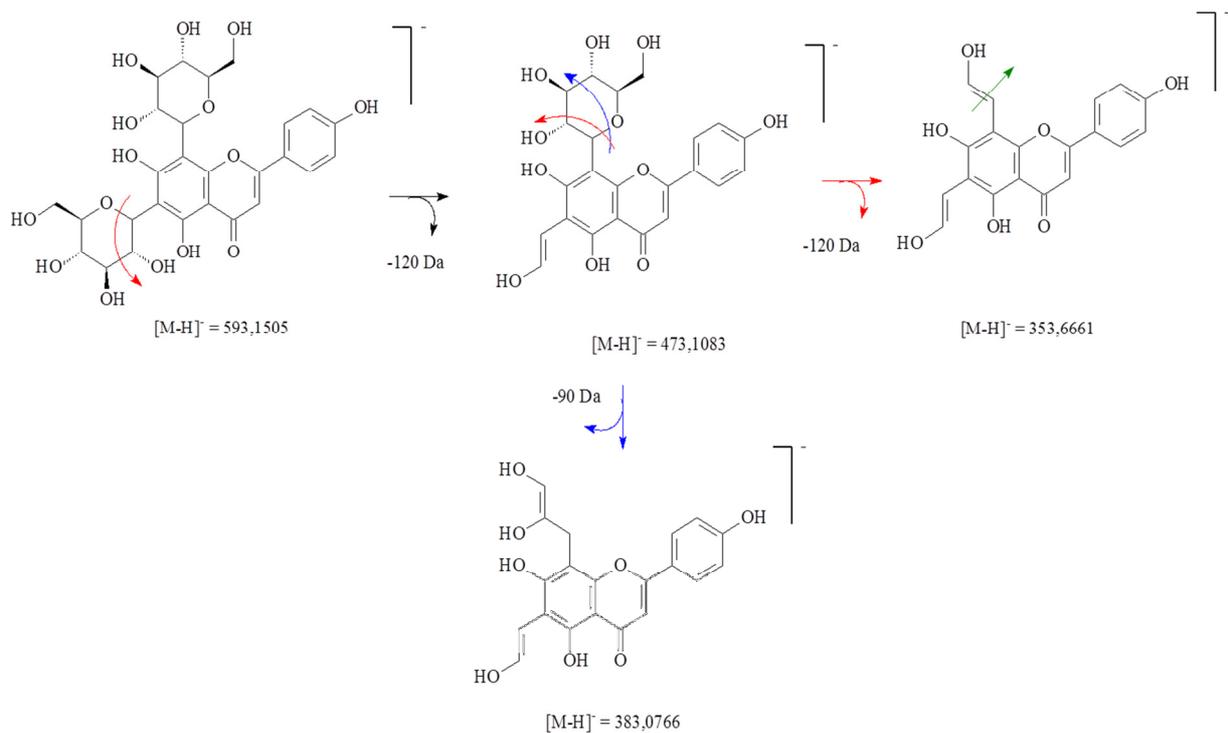


FIGURA 4.96: Proposta de fragmentação para o flavonoide Vicenina-2, identificado no caule do porta enxerto do citrus em estudo.

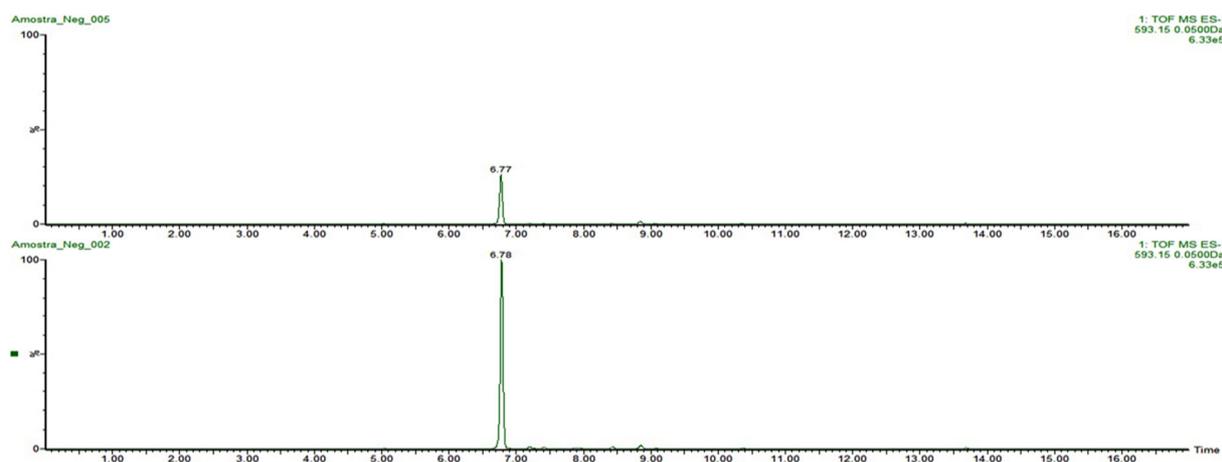


FIGURA 4.97: Comparação da concentração do íon 593, referente ao flavonoide vicenina-2, nas amostras do caule doente (acima) e do caule sadio (abaixo) (ESI, modo negativo).

TABELA 4.16: Variação dos metabólitos secundários do caule do porta enxerto do citros Valência. Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.

Massa	RT (min)	Doente	Sadio	Varição
593,1503	6,78	49,5569	200,0180	+ 4,6
315,0724	1,04	88,9506	23,4375	- 3,8
265,0939	0,73	146,8490	93,7497	- 1,6

4.5.1.3.2 Folhas

Na análise das folhas (FIGURA 4.98) foi possível realizar o mesmo tipo de estudo, uma vez que foram encontrados íons que são mais característicos da planta sadia (acima da linha horizontal) e infectada com HLB (abaixo da linha horizontal). Esses íons foram analisados e, dentre esses se pôde confirmar a presença dos íons de m/z 593,1504, com tempo de retenção em 8,81 minutos, e de m/z 609,1822, com tempo de retenção em 9,37 minutos. Esse último íon corresponde ao flavonoide glicosilado hesperidina (FIGURA 4.79, pág. 136), já o primeiro ainda não pôde ser identificado, pois pode ser tanto o flavonoide didymina quanto poncirina, uma vez que ambos apresentam a mesma massa molecular e mesmo tipo de fragmentação (discutido em seguida). O íon de m/z 593,1504 aumenta em 40% sua concentração na planta sadia, enquanto que o íon 609,1822 aumenta 20% sua concentração, também na planta sadia (TABELA 4.17).

Essas propostas podem ser confirmadas através dos espectros de íons moleculares, e também com aqueles referentes aos íons produtos, obtidos através dos experimentos de MS^E. Na FIGURA 4.99 pode-se visualizar no espectro de massas (abaixo) o íon molecular de massa exata 593,1811, e também tem-se o espectro de íons produtos (acima), mostrando os respectivos fragmentos do íon molecular. Verifica-se uma perda de 308 Da, característica de flavonoides *O*-glicosilados. Essa fragmentação ocorre tanto para o flavonoide poncirina como para didymina, uma vez que ambos são do tipo 7-*O*-glicosilados, diferenciando-se apenas nas ligações na unidade de açúcar (FIGURA 4.73, pág. 132).

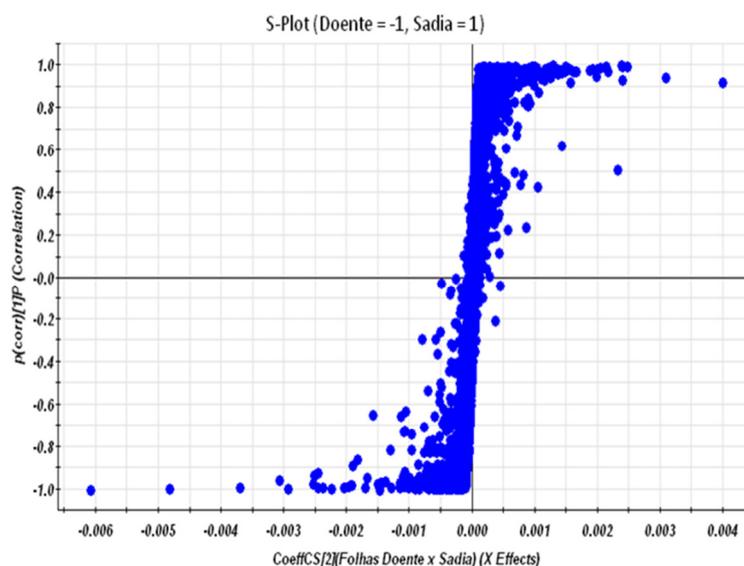


FIGURA 4.98: Gráfico de S-Plot das folhas de citros Valência (ESI, modo negativo).

O mesmo ocorre para o íon m/z 609,1824 (FIGURA 4.100), onde é possível observar o espectro de íon molecular com massa exata, assim como seu respectivo de íons produtos, mostrando a mesma perda característica de 308 Da. Sua proposta de fragmentação pode ser verificada na FIGURA 4.81 (pág. 137). Com a reunião desses dados é possível confirmar a proposta sugeridas para ambos os íons.

Por tratar-se de espectros de massas de alta resolução, foi possível fazer uma comparação da massa calculada teoricamente e da massa experimental medida para cada composto. Para a hesperidina ($C_{28}H_{33}O_{15}$) a massa teórica calculada foi de 609,1819, enquanto a experimental foi de 609,1824. Já para a Poncirina ou didymina ($C_{28}H_{33}O_{14}$) a massa teórica calculada a experimental

foram de 593,1870 e 593,1811, respectivamente. Através delas constatou-se que a variação entre as massas experimentais e teóricas foram de apenas 0,0005 Da, para a hesperidina e 0,0059 Da para Poncirina ou Didymina, fato este que auxilia a confirmação da fórmula molecular empírica proposta.

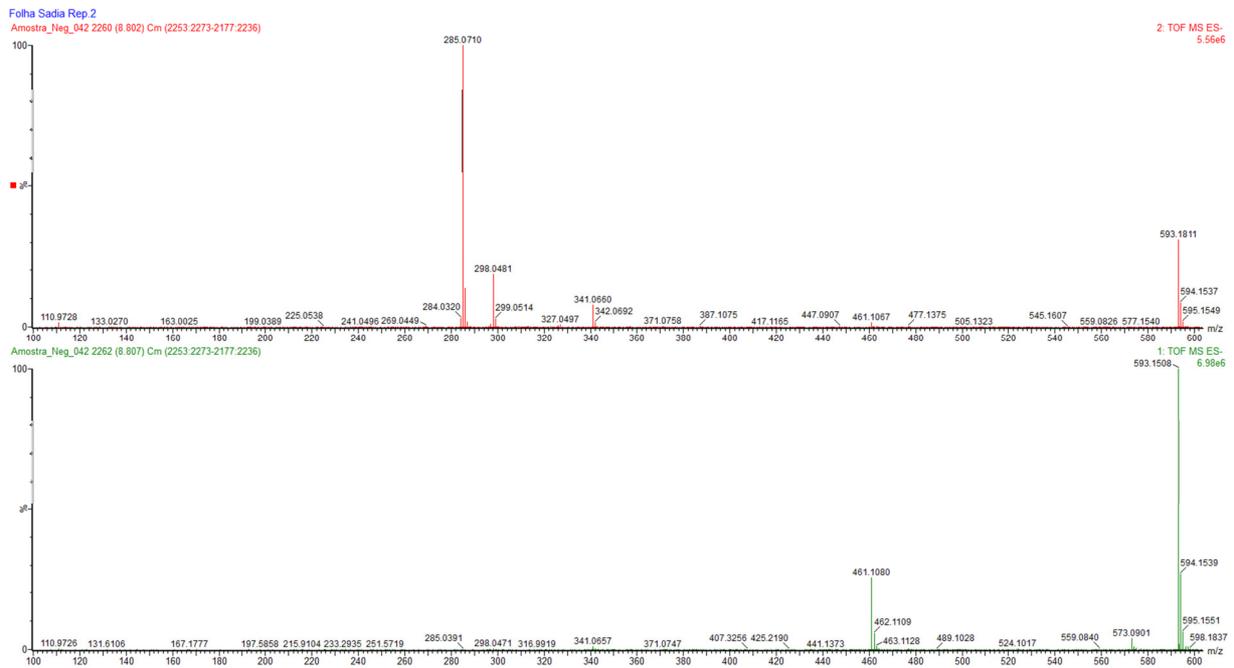


FIGURA 4.99: Espectro de massas para o íons m/z 593,1811 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

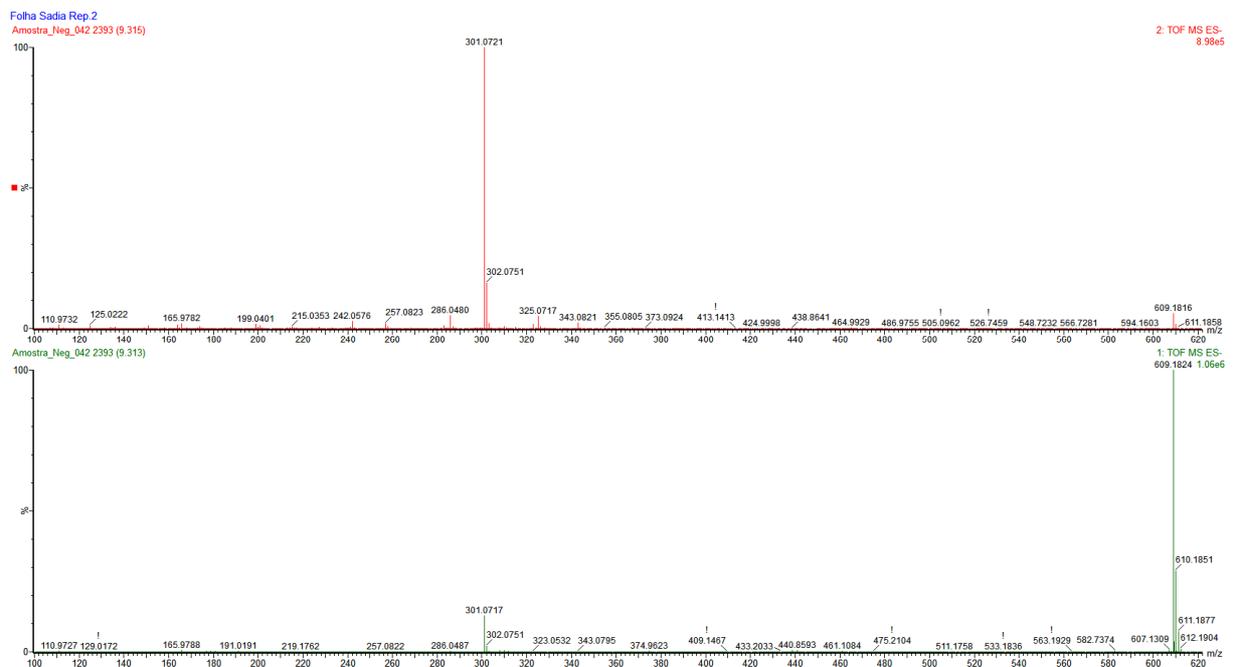


FIGURA 4.100: Espectro de massas para o íons m/z 609,1824 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

Utilizando ainda esta técnica, constatou-se que os íons m/z 391,1035 (FIGURA 4.101) e o 191,0549 (FIGURA 4.102), com os respectivos tempos de retenção de 0,39 e 0,4 minutos, aumentaram sua concentração no tratamento doente (TABELA 4.17). Entretanto, esses íons não puderam ser identificados até o momento.

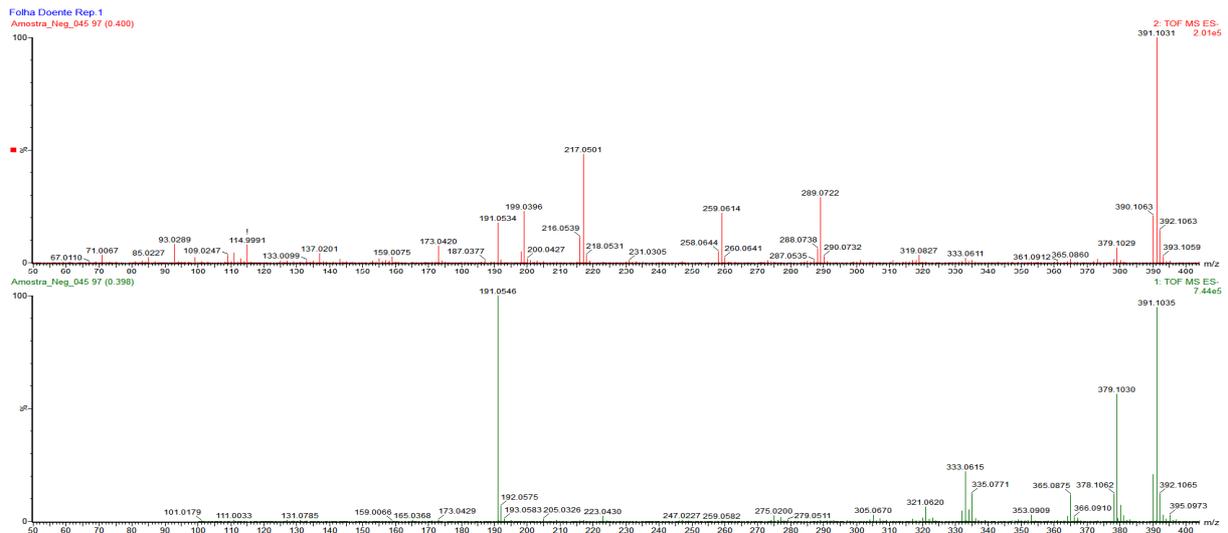


FIGURA 4.101: Espectro de massas para o íons m/z 391,1035 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

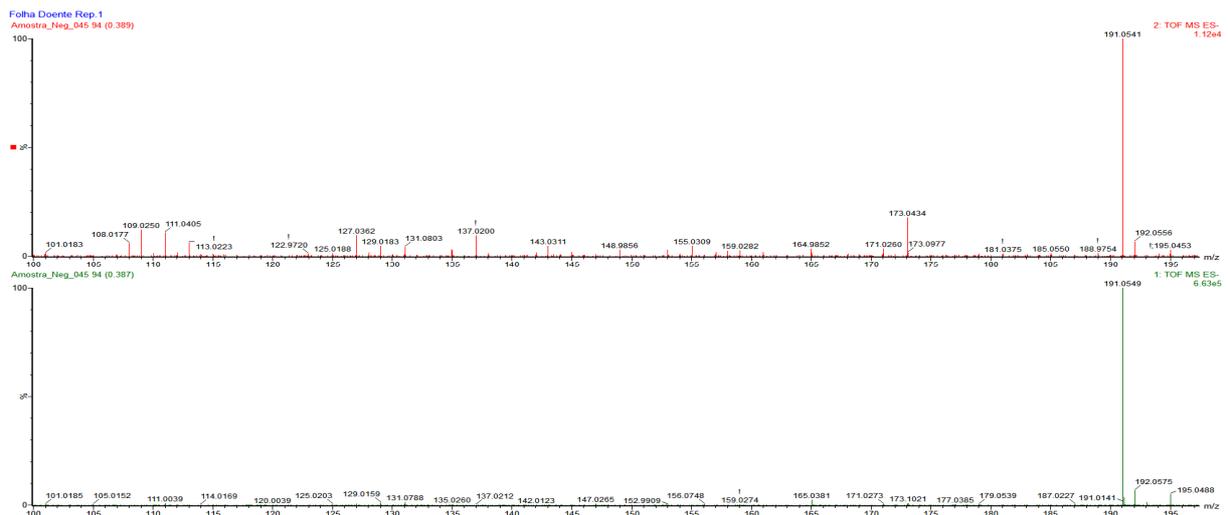


FIGURA 4.102: Espectro de massas para o íons m/z 191,0549 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

TABELA 4.17: Variação dos metabólitos secundários das folhas do citros Valência. Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.

Massa	RT (min)	Doente	Sadio	Varição
191,0564	0,39	321,5690	89,7361	- 3,6
391,1043	0,4	178,6130	24,7495	+ 7,2
593,1504	8,81	78,4775	111,7270	+ 1,4
609,1822	9,37	357,0510	430,2720	+ 1,2

4.5.1.3.3 Raízes

Analisando desta vez as raízes de citros Valência pela técnica quimiométrica *S-Plot* no modo negativo de ionização, novamente foi possível verificar alguns íons mais representativos para um dado tratamento de amostra (FIGURA 4.103). O estudo desse gráfico permite identificar três íons que mais se diferenciaram entre as amostras sadias e infectadas, sendo eles m/z 469,1860 (apresentando tempo de retenção de 11,8 minutos), o 523,1725 (tempo de retenção de 11,79 minutos) e 633,3404 (tempo de retenção em 13,44 minutos). O íon m/z 469,1860 (FIGURA 4.104) dobra sua concentração nas raízes das mudas infectadas com HLB (FIGURA 4.105), enquanto que o íon 523,1725 (FIGURA 4.106) quase triplica sua concentração no mesmo tipo de tratamento. Por sua vez, o íon m/z 633,3404 (FIGURA 4.107) chega a ser quase 2 vezes mais abundante nas raízes das mudas sadias (TABELA 4.18). Dentre esses íons, até o momento foi possível identificar apenas o 469,1858, referente ao limonóide Limonina. Sua massa de alta resolução medida experimentalmente (469,1858 Da) está muito próxima da massa calculada teoricamente, que é de 469,1862 Da, variando em apenas 0,0002 Da, confirmando a estrutura da substância proposta. Este composto não havia sido observado em outras análises neste trabalho, umas das justificativas é o fato das estruturas de limonóides não apresentarem boa absorção nos comprimentos de onda de ultravioleta utilizados nas análise de HPLC, não sendo assim detectado.

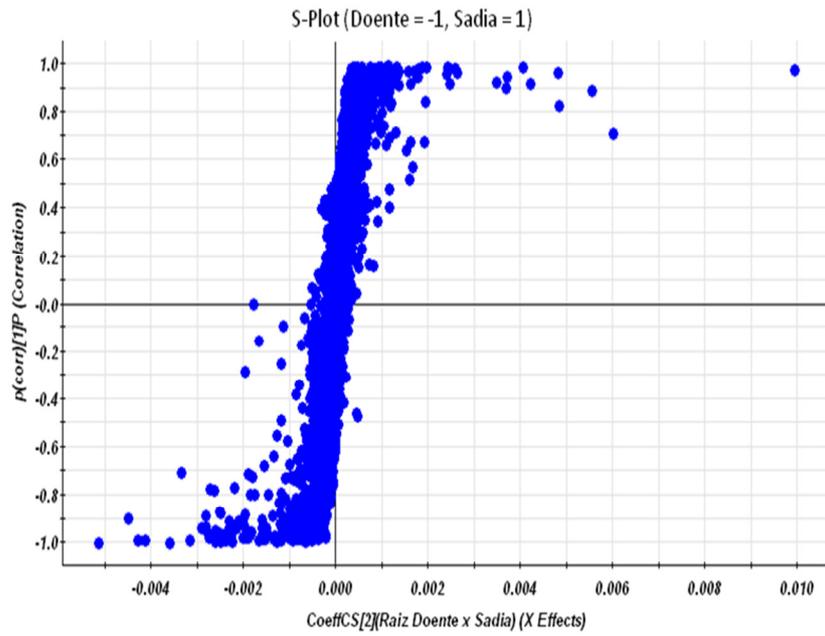


FIGURA 4.103: Gráfico de S-Plot das raízes de citros Valência (ESI, modo negativo).

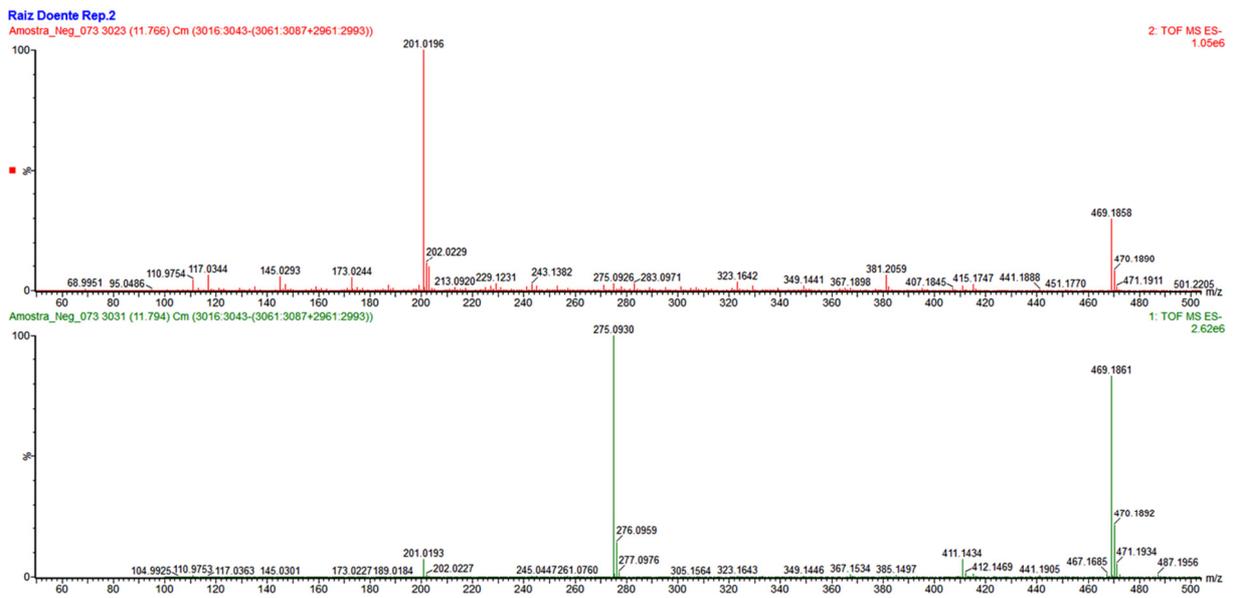


FIGURA 4.104: Espectro de massas para o íon m/z 469,1858 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

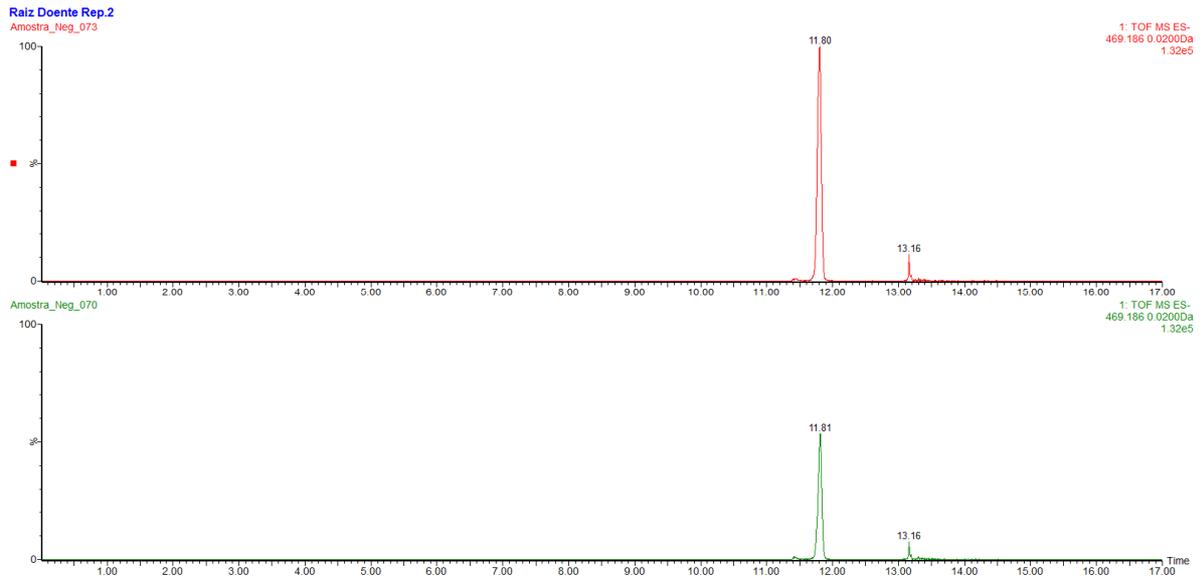


FIGURA 4.105: Comparação da concentração do íon m/z 469,1858, referente ao limonoide limonina, nas amostras do caule doente (acima) e do caule sadio (abaixo) (ESI, modo negativo).

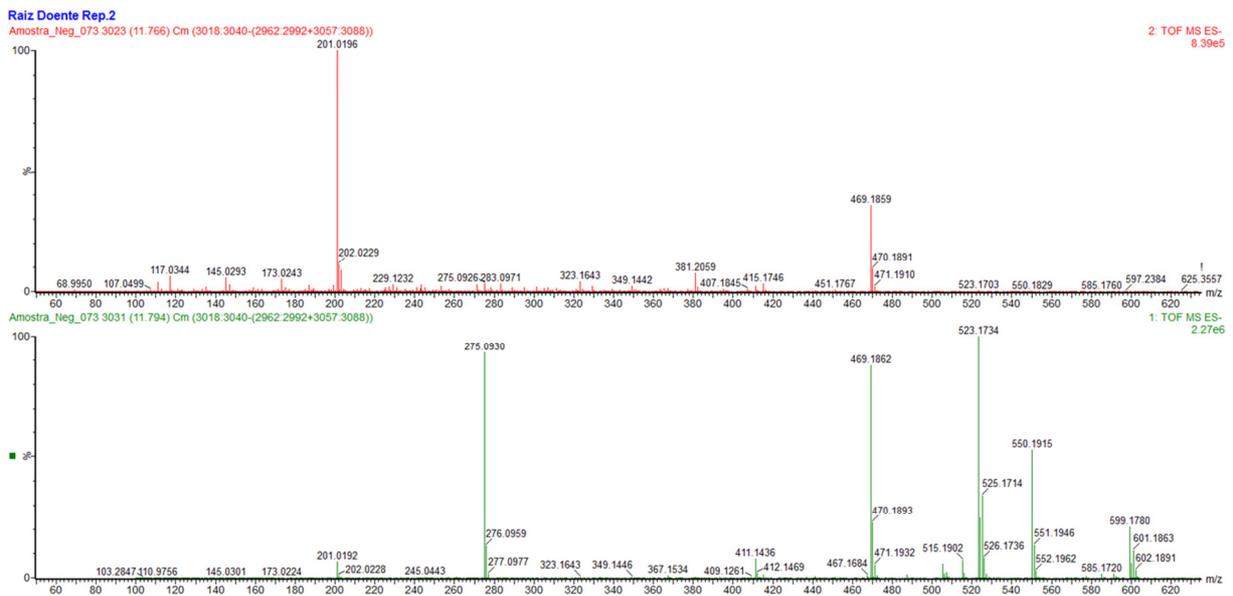


FIGURA 4.106: Espectro de massas para o íons m/z 523,1725 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

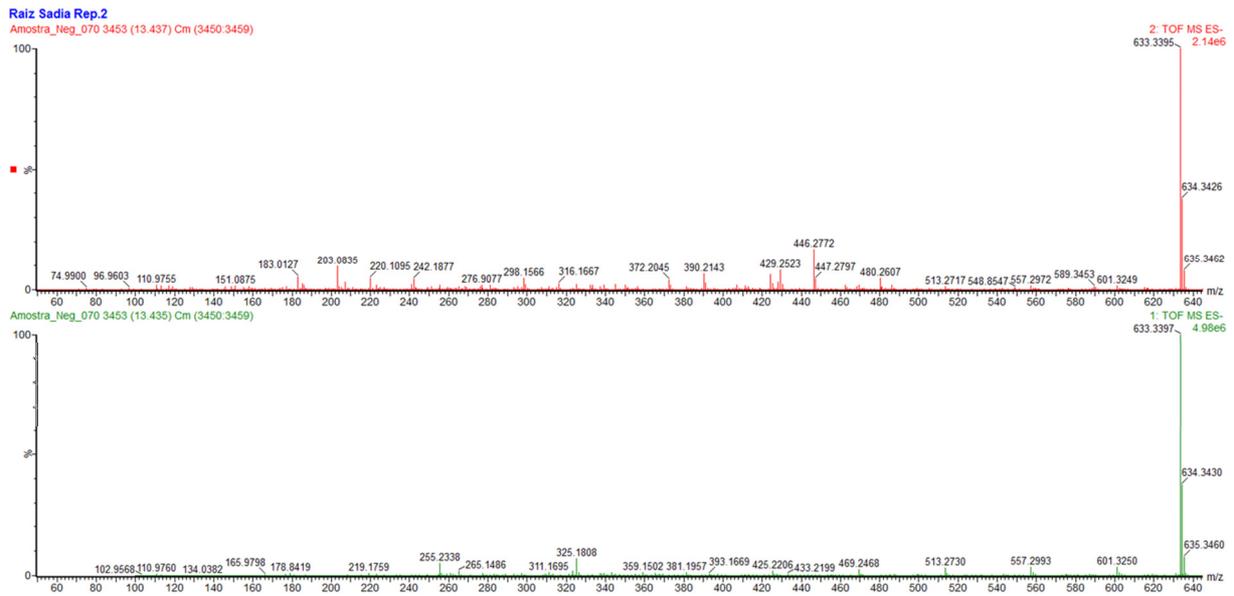


FIGURA 4.107: Espectro de massas para o íons m/z 633,3404 encontrado nas folhas (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

Para completar os resultados encontrados nas raízes através da técnica de LC-MS^E, optou-se por trabalhar também no modo positivo, pois sabe-se que nas raízes de citrus estão presentes grandes quantidades e variedades de cumarinas, e estas ionizam melhor no modo positivo devido à suas características químicas. Dessa maneira, novos resultados foram obtidos, e dessa vez foi possível encontrar novos íons nesse modo de ionização, sendo eles m/z 229,0873 com tempo de retenção de 10,22 minutos, m/z 229,0873, porém com tempo de retenção de 12,24 minutos, e m/z 247,0974 (FIGURA 4.108), com tempo de retenção de 10,23 minutos. Foi possível ainda obter através desses dados, que ambos os íons m/z 229 são os mais abundantes dentro das amostras, e que ambos aumentam 50% em quantidade nas raízes de mudas infectadas com HLB (TABELA 4.19). O íon m/z 247 é pouco abundante, porém aumenta sua produção em 2,6 vezes nas raízes sadias. Para os íons m/z 229,0873, foi possível confirmar sua estrutura, como sendo as cumarinas xantiletina e seselina, respectivamente onde a massa teórica calculada foi de 229,0864, apenas 0,0009 Da de diferenças do valor experimental medido. Essas variações obtidas para as cumarinas xantiletina e seselina reforçam aqueles encontrados no item 4.3.1, onde via técnica LC-UV-SPE-NMR também verificou-se o aumento de ambas onde as mudas haviam sido infectadas com a bactéria do HLB.

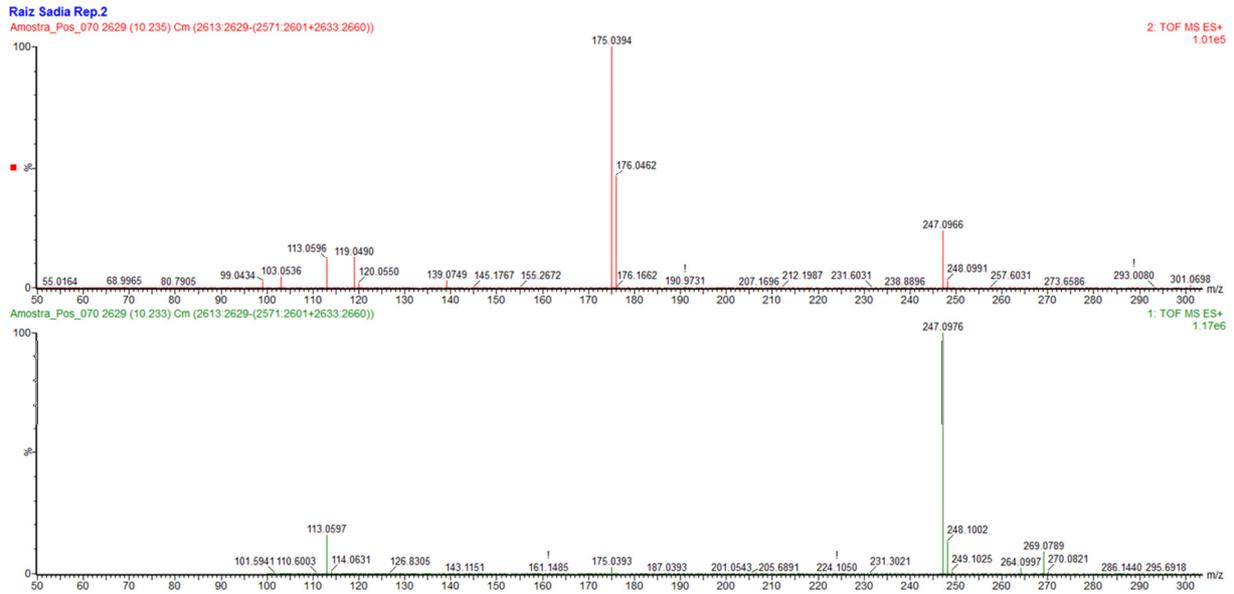


FIGURA 4.108: Espectro de massas para o íons m/z 247,0974 encontrado nas folhas (ESI, modo positivo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

TABELA 4.18: Variação dos metabólitos secundários da raiz do citros Valência (ESI negativo). Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.

Massa	RT	Doente	Sadio	Variação
523,1725	11,79	58,1402	20,7400	- 2,8
469,1860	11,8	46,0445	22,3388	- 2,1
633,3404	13,44	200,2930	358,9220	+ 1,8

TABELA 4.19: Variação dos metabólitos secundários da raiz do citros Valência (ESI positivo). Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.

Massa	RT (min)	Doente	Sadio	Variação
247,0974	10,23	3,07637	8,0760	+ 2,2
229,0873	10,22	22,5532	15,4329	- 1,5
229,0873	12,24	12,8530	8,4451	- 1,5

4.5.1.3.4 Caule da Copa

Por fim, foi realizado o mesmo tipo de estudo também nos caules da copa (ou caule superiores) da espécie de citros estudada, analisando-se estes através da técnica quimiométrica de *S-Plot* (FIGURA 4.109). Analisaram-se os íons mais característicos para cada tipo de tratamento. Os íon m/z 793,4604 (FIGURA 4.110), 633,3404 (FIGURA 4.111) e 427,0596 (FIGURA 4.112), com os tempos de retenção de 13,49, 13,44 e 0,37 minutos, respectivamente, mostraram-se como mais característicos das mudas sadias, aumentando sua produção em quase 4 vezes para o íon m/z 793,4604, em 2 vezes para o íon m/z 633,3404, e em 2,4 vezes para o íon m/z 427,0596 (TABELA 4.20). É possível sugerir que estes íons estejam sendo consumidos quando a planta é infectada pelo HLB. Esses íons não foram identificados até o momento, mas é possível verificar que o íon m/z 633 também aparece em maior concentração nas raízes de citrus sadias estudadas neste trabalho, indicando um mesmo comportamento do íon para ambos os órgãos.

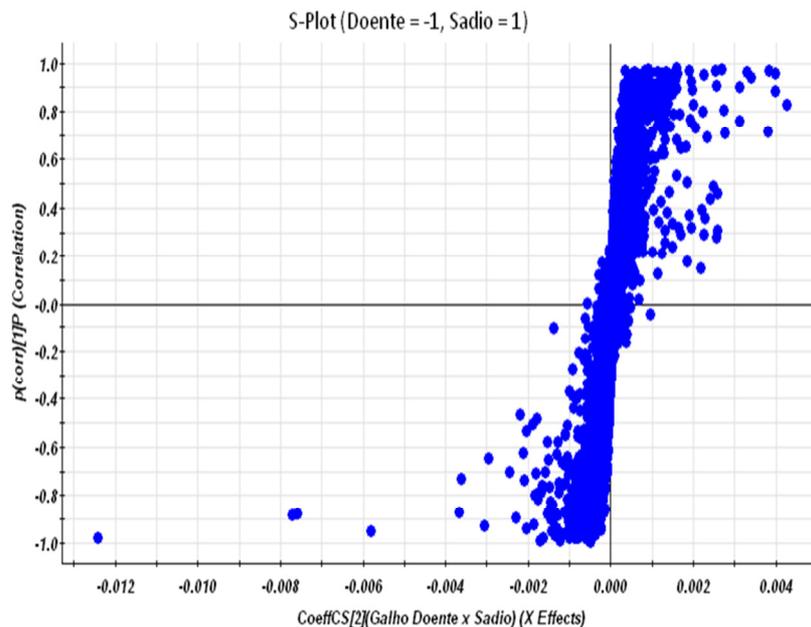


FIGURA 4.109: Gráfico de *S-Plot* do caule da copa de citros Valência (ESI, modo negativo)

O íon característico do tratamento doente que mais se destaca é o m/z 265,0939 (FIGURA 4.113), cujo tempo de retenção é de 0,73 minutos. Sua concentração aumenta 2,1 vezes nas plantas infectadas com a bactéria. Sua identificação não foi concluída até o dado momento, mas é possível verificar

que este mesmo íon aparece também para o caule inferior da planta de citrus estudada, tendo sua concentração aumentada nos citros infectados com HLB, sugerindo que a planta esteja aumentando sua produção na presença da bactéria.

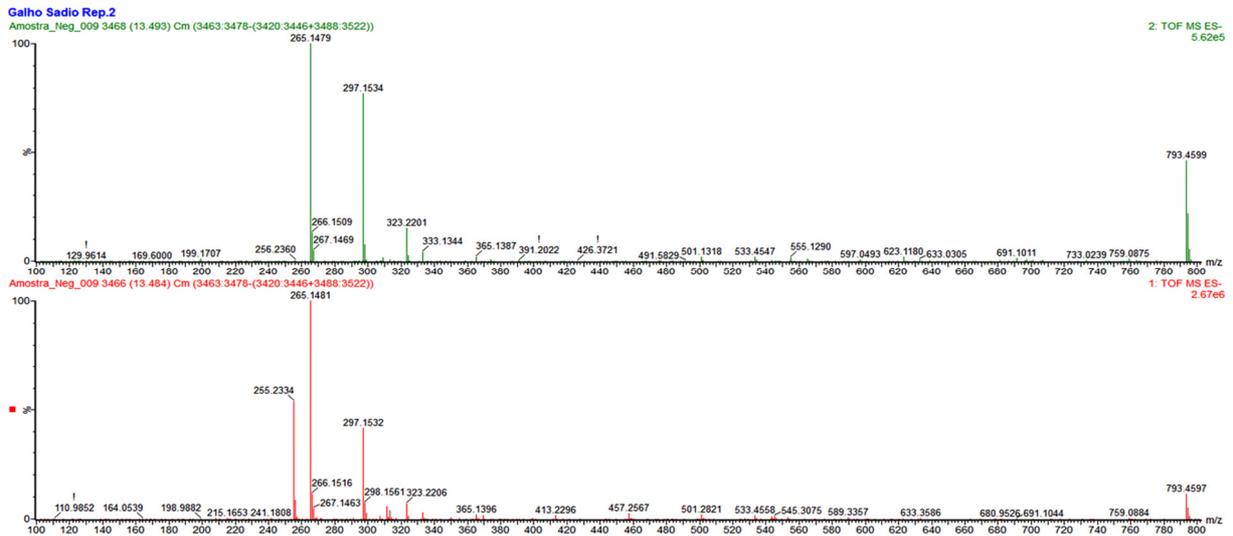


FIGURA 4.110: Espectro de massas para o íons m/z 793,4604 encontrado no caule da copa (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

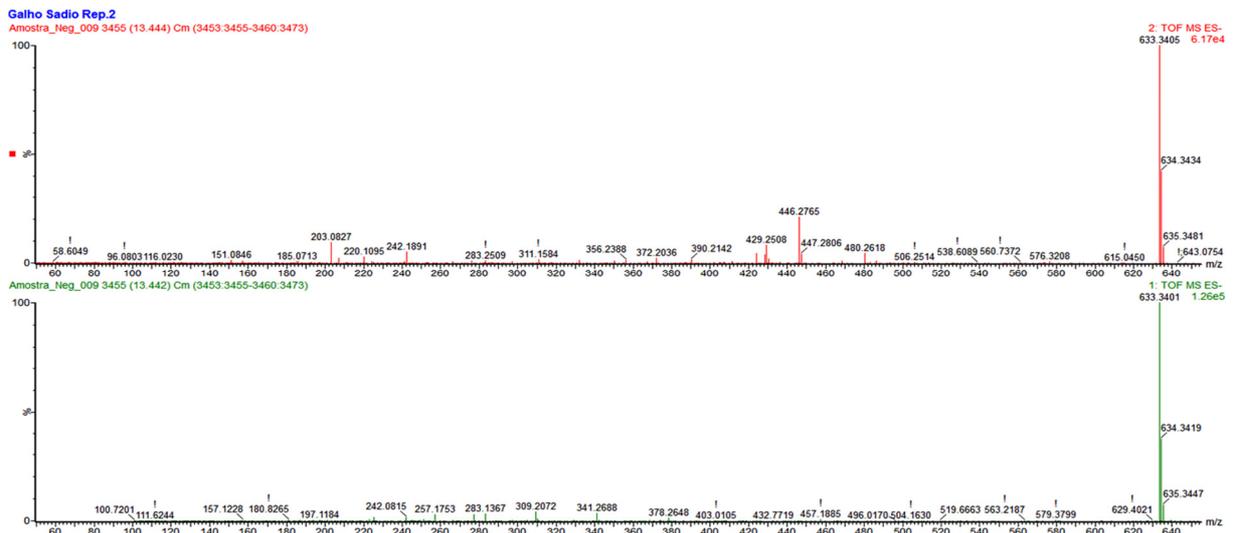


FIGURA 4.111: Espectro de massas para o íons m/z 633,3404 encontrado no caule da copa (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

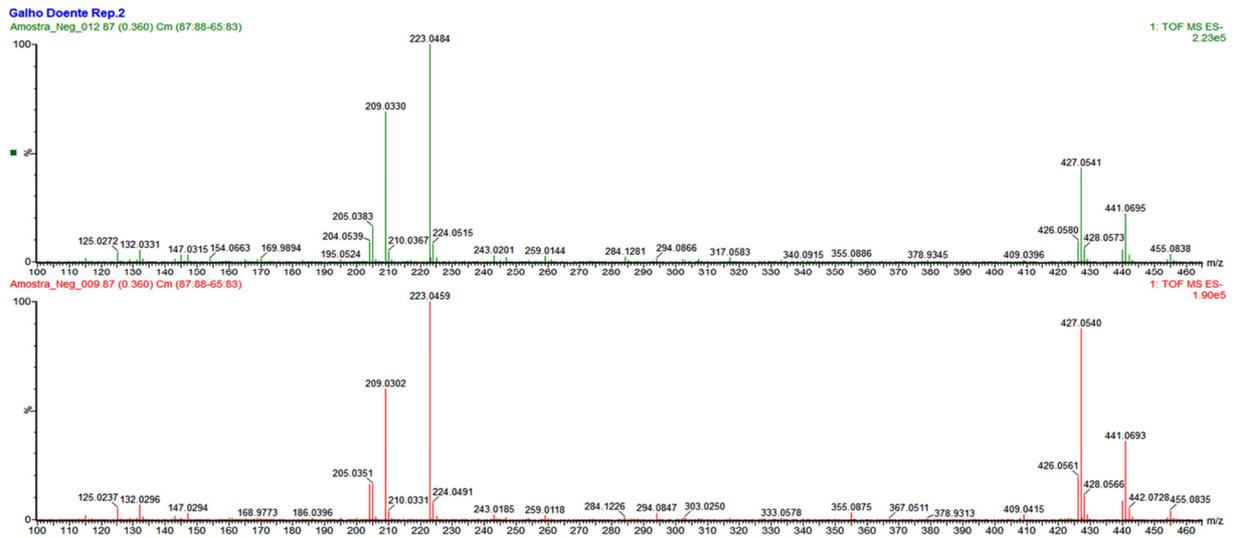


FIGURA 4.112: Espectro de massas para o íons m/z 427,0596 encontrado no caule da copa (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

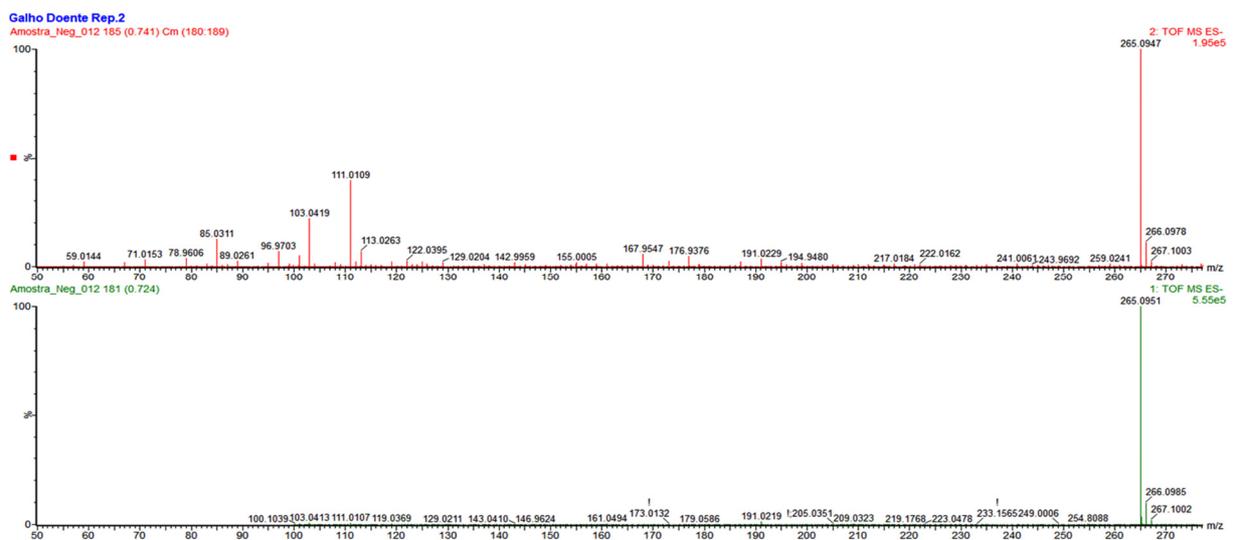


FIGURA 4.113: Espectro de massas para o íons m/z 265,0939 encontrado no caule da copa (ESI, modo negativo). Espectro de íons produtos (acima) e espectro do íon molecular (abaixo).

TABELA 4.20: Variação dos metabólitos secundários do caule da copa do citros Valência (ESI negativo). Suas respectivas massas moleculares, tempo de retenção e áreas nos diferentes tratamentos.

Massa (Da)	RT (min)	Doente	Sadio	Variação
793,4604	13,49	6,2648	24,2139	+ 3,9
623,3404	13,44	13,8922	30,9127	+ 2,2
427,0596	0,37	19,3170	45,4948	+ 2,4
265,0939	0,73	350,8510	163,6700	- 2,1

4.6 Quantificação das cumarinas das raízes de citros via LC-UV

Os cromatogramas para os padrões de xantiletina e xantoxiletina apresentaram grau de pureza acima de 95%. A curva de calibração via LC-UV para cada cumarina foi construída plotando a área das bandas contra sua respectiva concentração. A linearidade foi determinada através do cálculo de regressão linear obtido a partir do gráfico da área das bandas versus a concentração das soluções padrões. A determinação da concentração do analito de interesse nas amostras de citros foi feita substituindo a área da banda medida no cromatograma na equação da reta obtida a partir da curva de calibração construída. Essa equação pode ser verificada na FIGURA 4.114, e as concentrações usadas para a construção da curva, assim como seus respectivos valores das áreas das bandas medidas, estão nas TABELA 4.21 e TABELA 4.22.

Os coeficientes de variação entre as replicatas para ambas as cumarinas não ultrapassaram 3%. Por sua vez, os coeficientes de correlação (R^2) obtidos para a curva de padronização externa para a xantiletina foi de 0,9914, enquanto que para a xantoxiletina foi de 0,9930. Esses valores encontrados estão de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA, que admite curvas cujo R^2 seja maior que 0,98.

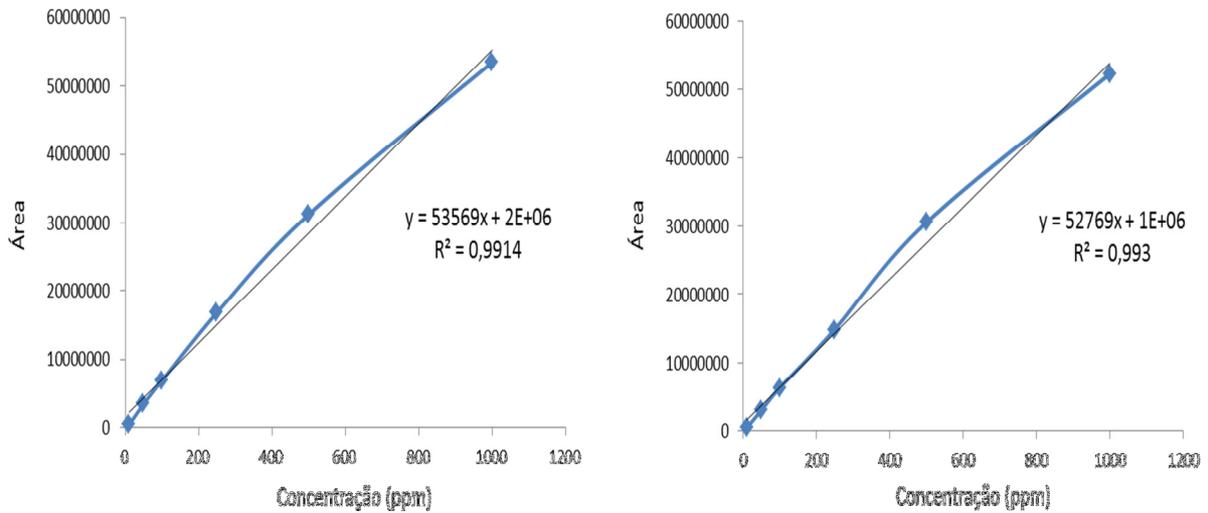


FIGURA 4.114: Curva de calibração via LC-UV para as cumarinas xantiletina (esquerda) e xantoxiletina (direita).

TABELA 4.21: Medidas das áreas das bandas para as concentrações usadas na construção da curva de calibração externa do padrão xantiletina.

Concentração	A1	A2	A3	Media	CV(%)
10	458054	459591	443267	453637,3	2,0
50	3584794	3496760	3446862	3509472,0	2,0
100	7086078	7039643	6800804	6975508,3	2,2
250	17074896	17010763	16530840	16872166,3	1,8
500	30473011	31169590	32175239	31272613,3	2,7
1000	53819468	53247203	53525002	53530557,7	0,5

TABELA 4.22: Medidas das áreas das bandas para as concentrações usadas na construção da curva de calibração externa do padrão xantoxiletina.

Concentração	A1	A2	A3	Media	CV(%)
10	463432	443784	463432	456882,7	2,5
50	3072437	3024212	3026863	3041170,7	0,9
100	6227149	6384943	6390446	6334179,3	1,5
250	14321957	14409091	14658411	14463153,0	1,2
500	30801529	29777672	31090252	30556484,3	2,3
1000	51715122	52329841	52819017	52287993,3	1,1

A próxima etapa foi realizar a quantificação das cumarinas nos extratos das raízes de citros sadios e infectados com HLB, para saber sua real concentração na amostra e também verificar sua variação entre os diferentes tratamentos. Pela curva de calibração por padronização externa, as concentrações médias da xantiletina e da xantoxiletina no extrato das mudas sadias foram de 493 ppm (33,7 mg/g, onde significa “mg do composto” / “grama da matriz seca”) e 290 ppm (22,5 mg/g) respectivamente. Ao se comparar com os extratos das mudas infectadas pela bactéria, obteve-se para xantiletina e xantoxiletina as concentrações de 414 ppm (28,3 mg/g) e 230 ppm (17,8 mg/g), respectivamente.

Pôde-se verificar para a cumarina xantiletina uma redução em sua concentração de 16% na amostra controle, que são as mudas sem a inoculação da bactéria. Para a xantoxiletina também se observou uma redução na concentração no tratamento sadio de 20%. Com base nesses resultados, sugere-se que a planta esteja aumentando a produção desses compostos nas plantas doentes como uma resposta de defesa frente ao patógeno, podendo estar atuando como fitoantecipinas. As fitoantecipinas são a primeira linha de defesa química que agentes patogênicos precisam superar, representando uma barreira química às infecções por patógenos em potencial (OSBOURN, 1999; HARBORNE, 1999). No entanto, para uma fitoantecipina servir como base de um mecanismo de resistência, a planta deve contar com compostos pré-formados, e pode ser passiva na sua interação com um agente patogênico potencial. Propõe-se que estes compostos sejam conhecidos como fitoantecipina, sendo então definido: "fitoantecipinas são compostos antimicrobianos, de baixo peso molecular, que estão presentes em plantas antes de serem infectadas por microorganismos, ou são produzidas após sua infecção unicamente a partir de constituintes pré-existentes". Essa definição pode ser aplicada a compostos que ainda não demonstraram atividade como parte de um mecanismo de defesa. Assim, como as fitoalexinas, algumas fitoantecipinas desempenham um papel na resistência à doença (VANETTEN, 1994).

4.7 Análise semi-quantitativa das cumarinas do caule do porta enxerto de citros via LC-UV

Os extratos do caule do porta enxerto da espécie estudada, tanto das mudas saídas quanto infectadas com HLB, foram analisados via HPLC-UV e apresentaram a banda da xantiletina, seselina, xantoxiletina e dentatina em

aproximadamente 21,5, 22,9 e 28,8 minutos de corrida cromatográfica. Foi possível verificar através de uma análise visual que as áreas dessas bandas nos extratos referentes às amostras sadias foram maiores que as dos extratos das plantas infectadas. Para comprovar se houve um aumento ou diminuição da quantidade destas substâncias, obteve-se, a partir do software do equipamento (EZChrom), a área das bandas referente à cada uma das substância de interesse em cada extrato, e calculou-se então as áreas relativas entre elas. Como os experimentos foram realizados em triplicatas, utilizou-se a média das áreas das bandas dos extratos equivalentes (TABELA 4.23).

Assim, foi possível calcular a alteração na quantidade dessas cumarinas nos diferentes tratamentos. Uma análise comparativa foi realizada utilizando-se essas áreas e, a partir desta foi possível constatar que as amostras sadias apresentaram concentrações de xantiletina, xantoxiletina e dentatina 70% maiores nos extratos analisados, enquanto que para a seselina esse aumento foi de 80% (FIGURA 4.115).

TABELA 4.23: Extratos do caule do porta enxerto analisados, e suas respectivas áreas das bandas (Cd: caule doente; Cs: caule sadio).

Xantiletina		Xantoxiletina		Seselina		Dentatina	
Cd-1	18798759	Cd-1	10145356	Cd-1	1134590	Cd-1	3869477
Cd-2	18498892	Cd-2	10061602	Cd-2	1114031	Cd-2	3850431
Cd-3	18698892	Cd-3	10067392	Cd-3	1249255	Cd-3	3798562
média	18665514	média	10064497	média	1165959	média	3839490
Cs-1	66801629	Cs-1	33199663	Cs-1	6098175	Cs-1	12613522
Cs-2	68822247	Cs-2	33078931	Cs-2	5658299	Cs-2	13383100
Cs-3	68796942	Cs-3	33490592	Cs-3	5804612	Cs-3	13623680
média	68140273	média	33256395	média	5853695	média	13206767

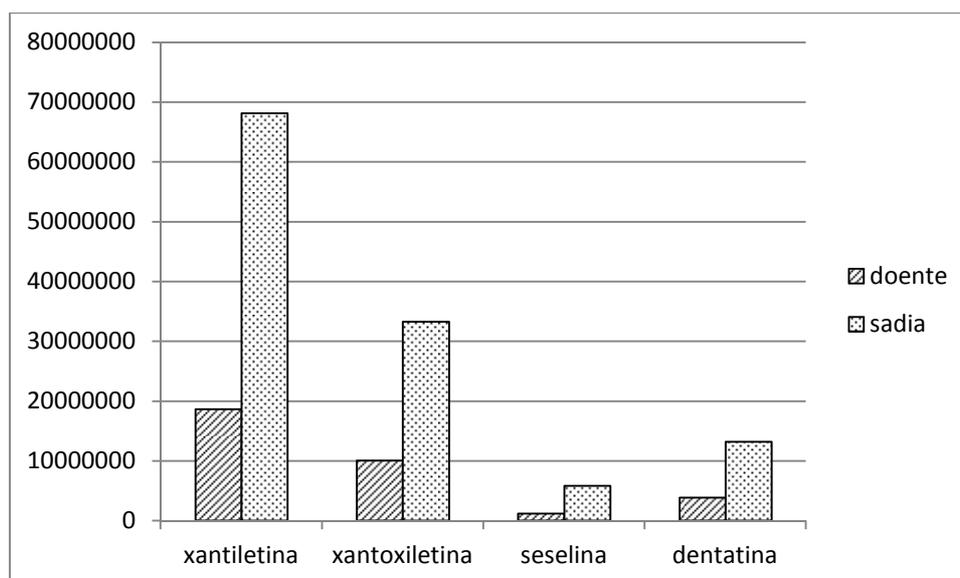


FIGURA 4.115: Variação da concentração das cumarinas xantiletina, xantoxiletina, seselina e dentatina no caule do porta enxerto de citros.

Analisando esses resultados, foi possível constatar que as cumarinas preniladas angulares apresentam um aumento relativo maior quando comparado com as cumarinas lineares. Ainda foi possível observar uma diferença de comportamento na produção dessas cumarinas entre o caule do porta enxerto e as raízes. Enquanto nas raízes houve um aumento da concentração dessas cumarinas no tratamento infectado, no caule do porta enxerto ocorreu a diminuição destas no mesmo tratamento infectado. Esse fato pode estar relacionado com recentes trabalhos onde mostram que a multiplicação da bactéria “*Ca. Liberibacter ssp*” ocorre nas raízes do citros (JOHNSON, 2013).

4.8 Análise semi-quantitativa dos flavonoides das folhas de citros via LC-MS/MS

O interesse nessa parte do trabalho foi a avaliação semi-quantitativa e aplicação de um método analítico utilizando HPLC-MS/MS no modo MRM (do inglês “*Multiple Reaction Monitoring*”). O método MRM é o mais utilizado para a realização de quantificações por espectrometria de massa, por ser extremamente sensível e seletivo.

Para os flavonóides da folhas do citros não foi possível realizar uma quantificação direta assim como no item 3.5.6.2, pois infelizmente não havia padrões dos compostos de interesse disponíveis, sendo necessário para isso o uso da técnica aqui mencionada. Em espectrometria de massas, o modo mais

aceito para realizar quantificações é utilizando um espectrômetro capaz de promover fragmentações dos íons (experimentos do tipo MS/MS), onde o equipamento mais utilizado para quantificações é geralmente composto por um analisador do tipo triplo quadrupolo. O uso de íons fragmentos em experimentos do tipo MS/MS, gera na maioria dos casos um fragmento específico para o composto de interesse. Assim, a combinação de uma massa molecular específica com um íon fragmento também específico, é usada para monitorar de maneira bastante seletiva o composto a ser quantificado.

No modo MRM, o composto de interesse foi selecionado no primeiro quadrupolo (Q1), e seu sinal foi então otimizado no modo *Full Scan* ou SIM (do inglês “*Selected Ion Monitoring*”). O sucesso da fragmentação depende de uma ionização bem sucedida do íon precursor. Quanto maior o número de moléculas ionizadas, maior será a chance de sucesso nas fragmentações.

Após otimizar as energias do primeiro quadrupolo, partiu-se para as energias do segundo quadrupolo (q2), ou câmara de colisão. Nessa etapa foram ajustados os parâmetros CEP, CE, CXP e CAD. Assim, as energias selecionadas para o q2 foram àquelas que levaram a melhores respostas, com bom número de íons fragmentos e com boa intensidade dos sinais. Ao escolher os picos usados para as transições, tomou-se o cuidado de não escolher um pico fragmento muito próximo ao íon precursor, e escolheu-se um pico estável (nesse caso, o pico base). Portanto, os íons fragmentos escolhidos para as transições foram aqueles gerados ao se perder as unidades de açúcar dos flavonóides, levando às agliconas. As respectivas massas dessas agliconas foram então selecionadas no terceiro quadrupolo (Q3). Os flavonóides analisados, assim como suas respectivas transições selecionadas podem ser verificados na TABELA 4.24.

TABELA 4.24: Flavonóides analisados das folhas dos citros estudado, assim como suas respectivas transições monitoradas via experimento de MRM

Código	Nome do Flavonóide	Íon Pseudo molecular [M-H] ⁻ o	Transição monitorada
F1	Vicenina-2	593	593/353
F2	Diosmetina	623	623/383
F3	Não Identificado	563	563/293
F4	Didymina	593	593/285
F5	Diosmina	607	607/299
F6	Hesperidina	609	609/301

Os extratos das mudas sadias e das mudas infectadas com HLB foram portanto analisados via MRM (FIGURA 4.116). Suas respectivas áreas foram obtidas através de experimentos em triplicata, e foram calculadas através do software analyst 1.5.1. Através desses resultados foi possível concluir que todos os flavonoides analisados tem sua produtividade diminuída nos extratos das folhas doentes com HLB (FIGURA 4.117). O conjunto dos dados obtidos sugere que a defesa da planta frente à bactéria parece estar nas raízes, inibindo o caminho do ácido cinâmico que leva aos flavonóides nos demais órgãos, para ativar aquele que conduz às cumarinas.

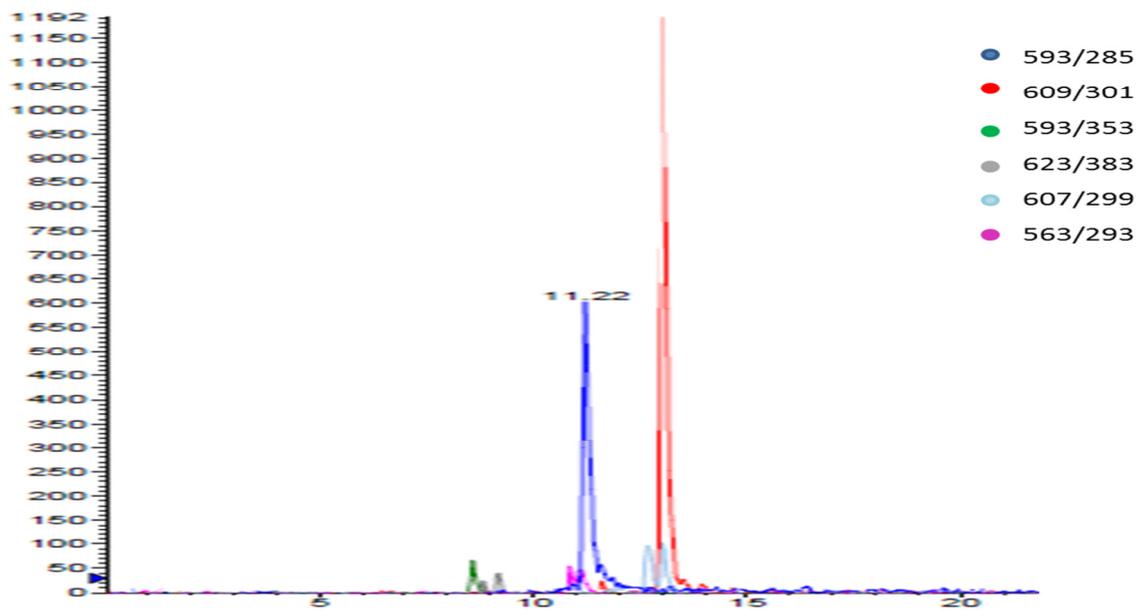


FIGURA 4.116: Experimento de MRM de flavonóides dos extratos das folhas do citros.

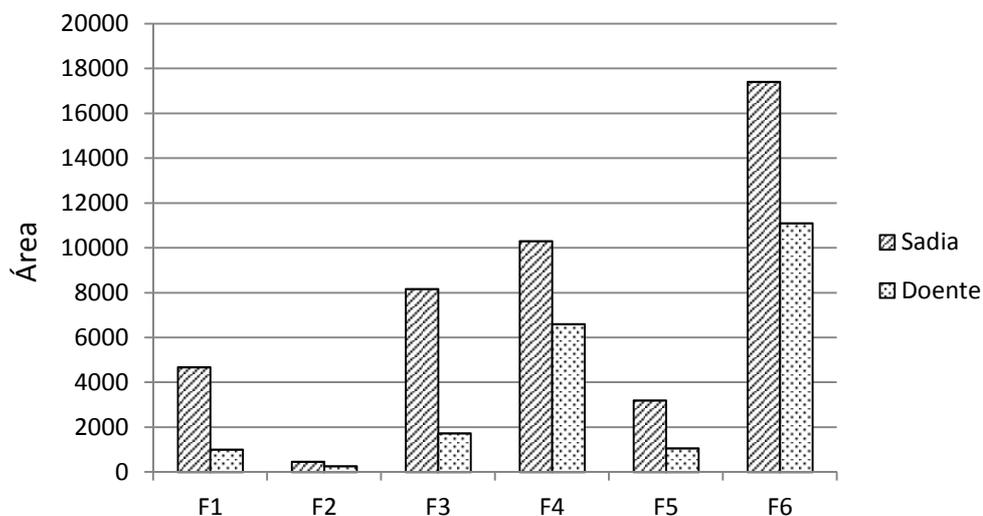


FIGURA 4.117: Variação dos flavonoides das folhas do citros analisados via experimento de MRM, e suas respectivas áreas das bandas.

Conclusões e Perspectivas

5 Conclusões e Perspectivas

O estudo químico da variedade de citros “*Ca. Liberibacter*” em mudas de a “Valência” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) enxertadas em “Swingle” (*Citrus paradisi* X *Poncirus trifoliata*), com o objetivo de se buscar padrões para outros estudos que foram desenvolvidos, proporcionou o isolamento de substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários como esteroides, cumarinas, flavonoides, e o ácido abscísico. Estas substâncias foram as cumarinas xantiletina (C1), seselina (C2), xantoxiletina (C3), metoxiseselina (C4), dentatina (C5) e clausarina (C6); os flavonóides 3’4’,5,6,7-pentametoxiflavona (sinensetina) (F1) e 3’,4’,5,6,7,8-hexametoxiflavona (nobiletina) (F2); 5-hidroxi-sinensetina (F5), e os esteróides sitosterol (E1), campesterol (E2) e estigmasterol(E3).

A análise do perfil químico da mesma variedade de citros em mudas infectadas com HLB (pelo processo de enxertia de borbulha) e sadias com o objetivo de procurar por variações entre os respectivos perfis químicos, foi realizada através das técnicas LC-UV-SPE-NMR e LC-MS^E. Foi possível assim observar diferenças nesses perfis dos diferentes tratamentos, indicando que a planta responde produzindo alguns metabólitos em maior ou menor quantidade em resposta à presença da bactéria. Foi possível observar que a planta aumenta a produtividade de alguns metabólitos em resposta à presença da bactéria somente nos extratos das raízes. Esses compostos são as cumarinas xantiletina, xantoxiletina e dentatina. Nos demais extratos (folhas, caule da copa e caule do porta enxerto) há uma reação inversa, ocorrendo a redução da produção dos metabólitos nas plantas infectadas com HLB. O resumo dessas substâncias podem ser encontradas na TABELA 5.1. Não há relatos na literatura da utilização de análise por HPLC-UV-SPE-NMR na avaliação dos efeitos do HLB no metabolismo dos citros.

A aplicação de quimiometria aos dados de espectrometria de massas obtidos com LC-MS^E permitiu de modo rápido, simples e eficiente, a separação das amostras com diferentes tratamentos e a caracterização dos compostos que mais contribuem para essa diferenciação, indicando que esta técnica poder ser aplicada para o estudo de diferenciação dos extratos analisados, apresentando resultados confiáveis e reprodutíveis. Nos gráficos de PCA onde foi realizada a análise das diferentes partes do citros separadamente (raiz, caule do porta enxerto, caule da copa e folhas), verificou-se em todos os casos sempre 2 grupos

distintos. O grupo 1 incluiu as matrizes da planta sadia enquanto o grupo 2 incluiu as matrizes das plantas doentes. Verificou-se que em PC1 há portanto uma tendência de separação das matrizes doentes daquelas referentes às amostras padrões onde a bactéria não foi inoculada. Além disso, esses estudos ainda apontaram à existência de íons que são característicos para cada parte da planta, e também a diferenciação dos íons para cada tipo de tratamento, doente e sadio. Esses compostos estão resumidos na TABELA 5.2.

O conjunto dos dados obtidos das técnicas analíticas utilizadas sugere que a defesa da planta frente à bactéria parece estar nas raízes, inibindo o caminho do ácido cinâmico que leva aos flavonóides nos demais órgãos, para ativar aquele que conduz às cumarinas. A ativação do caminho que leva às cumarinas sugere estas terem a função de sinalização na defesa contra a bactéria. As cumarinas poderiam ser mensageiras que ativam o mecanismo de defesa para os demais órgãos da planta. Estas informações abrem possibilidades de estudos em engenharia genética da biossíntese destes compostos, com possibilidades de indução de resistência em citros à “*Ca. Liberibacter*”.

Por fim, concluiu-se que os objetivos do projeto foram alcançados, os estudos dos perfis químicos permitiram diferenciar as plantas infectadas daquelas sadias, indicando assim potenciais bactericidas para futuros estudos frente à “*Ca. Liberibacter*”. Os dados obtidos também abriram portas para novos estudos, entre eles entender o mecanismo de interação entre a bactéria e planta, assim como perspectiva de ensaios *in vivo* das substâncias que se mostraram potencialmente promissoras, uma vez que essa bactéria ainda não é cultivável *in vitro*.

TABELA 5.1: Variação do perfil químico obtido via técnica de HPLC-UV-SPE-NMR, entre citros doente e sadios.

Folhas			
Banda	RT	Variação	Identificação
F1	8,3	Redução	Vicenina 2
F2	8,8	Redução	6,8-di-C-glu-Diosmetina
F3	10,8	Redução	NI
F4	11,3	Redução	Didymina
F5	12,9	Redução	Diosmina
F6	13,2	Redução	Hesperidina
Caule do Porta enxerto			
Banda	RT	Variação	Identificação
C1	8,1	Redução	Vicenina 2
C2	12,2	Redução	Hesperidina
C3	21,8	Redução	Xantiletina
C4	22,1	Redução	Xantoxiletina
C5	23,1	Redução	Dentatina
Raiz			
Banda	RT	Variação	Identificação
R1	14,20	Aumento	Xantiletina
R3	15,74	Aumento	Xantoxiletina
R5	22,77	Aumento	Dentatina
Caule da Copa			
Massa	RT	Variação	Identificação
C2	13,2	Redução	Hesperidina

TABELA 5.2: Variação do perfil químico obtido via técnica de LC-MS^E, entre citros doente e sadios.

Folhas			
Massa	RT	Variação	Identificação
593,1511	8,81	Redução	Didymina
609,1822	9,37	Redução	Hesperidina
191,0564	0,39	Aumento	NI
391,1043	0,40	Aumento	NI
Caule do Porta enxerto			
Massa	RT	Variação	Identificação
265,0939	0,73	Aumento	NI
315,0724	1,04	Aumento	Orbicularina
593,1505	6,78	Redução	Vicenina 2
Raiz			
Massa	RT	Variação	Identificação
469,1860	11,8	Aumento	Limonina
523,1725	11,79	Aumento	NI
633,3404	13,44	Redução	NI
229,0873 [*]	10,22	Aumento	NI
229,0873 [*]	12,24	Aumento	NI
Caule da Copa			
Massa	RT	Variação	Identificação
793,4604	13,49	Redução	NI
633,3404	13,44	Redução	NI
427,0596	0,37	Redução	NI
265,0939	0,73	Aumento	NI

Referências Bibliográficas

6 Referências Bibliográficas

ABAD-GARCIA, B.; GARMON-LOBATO, S.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. "On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high performance liquid chromatography with photo- diode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry". *Talanta*, 99, 213–224, 2012.

ABLAJAN, K.; ABLIZ, Z.; SHANG, X.; HE, J. M.; ZHANG, R. P.; SHI, J. G. "Structural characterization of flavonol 3,7-di-*O*-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry". *J. Mass Spectrom.*, 41:3, 352-360, 2006.

AHMAD, J.; SHAMSUDDIN, K.M.; ZAMAN, A. "A pyranocoumarin from *Atlantia ceylanica*". *Phytochemistry*, 23:9, p. 2098, 1984.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. "FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications". CRC Press, Taylor & Francis Group, London, 2006.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Brasil. "Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos". Resolução RE nº 899. 29 de maio de 2003.

ANWER, F.; SHOEB, A.; KAPIL, R. S.; POPLI, S. P. "Clausarin - a novel coumarin from *Clausena pentaphylla* (Roxb.) DC". *Experientia*, 33(4), 412-413, 1977.

ARCHER, J.; DARGAN, P.; WOOD, D.; MISTRY, N.; WOOD, M. "Screening for Classical and Novel Drugs in Pooled Urine Using UPLC-TOF-MS^E". Application Note – WATERS, 2013.

AUBERT, B. "Trioza erytreae Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the biological aspects os citrus greening disease: strategies". *Fruits*, 42:149-162, 1987.

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JUNIOR, R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A." Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença". *Tropical Plant Pathology*, vol. 34, 3, 137-145, 2009.

BELASQUE JR; YAMAMOTO, J. P. T; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B; AYRES, A. J; BOVÉ, J. M. “Controle do *huanglongbing* no estado de São Paulo, Brasil”. Citrus Research & Technology, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.53-64, 2010.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUN, A.; DEL RÍO, J. A. “Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids, Review”. J. Agric. Food Chem., 45(12), 4505-4515, 1997.

BOVÉ, J. M. “Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus”. Journal of Plant Pathology, 88 (1), 7-37, 2006.

BRERETON, R. G. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. Willey, 2002. p. 190-219.

CAPOOR S.P., RAO D.G., VISWANATH S.M. “*Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India”. Indian Journal of Agricultural Science, 37: 572-576, 1967.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação. 1. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p.

CASS, Q. B.; BARREIRO, J. C. “Os avanços tecnológicos na química analítica: sucessos e desafios”. Cienc. Cult., 63(1), 37-40, 2011.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. “Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas”. Quim. Nova, 32:4, 1021-1030, 2009

CEVALLOS-CEVALLOS JM, REYES-DE-CORCUERA JI, ETXEBERRIA E, DANYLUK MD, RODRICK GE. ”Metabolomic analysis in food science: a review”. Trends in Food Science & Technology, 20:557-66, 2009.

CHEN, J.; PU, X.; DENG, X.; LIU, S.; LI, H.; CIVEROLO, E. “A Phytoplasma Related to `Candidatus Phytoplasma asteris` Detected in Citrus Showing Huanglongbing (Yellow Shoot disease) Symptoms in Guangdong, P. R. China”. Phytopathology, 99:(3), 236-242.

CHOI Y. H.; TAPIAS, E. C; KIM, H. K; LEFEBER, A. W. M; ERKELENS, C; VERHOEVEN, J. T. J; BRZIN, J; ZEL, J; VERPOORTE, R. “Metabolic Discrimination of *Catharanthus roseus* Leaves Infected by Phytoplasma Using

1H-NMR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis”. *Plant Physiology*, 135, 2398–2410, 2004.

CITRUS BR: Associação Nacional dos Exportadores de sucos cítricos. “produção de laranja e suco”. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/producao-192415-1.asp>. Acessado em: janeiro, 2014.

COLLETA-FILHO, H.D.; TAGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JÚNIOR, J.; CARVALHO, A.S.; MACHADO, M.A. “First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil”. *Plant Disease*, 88:1382, 2004.

CORREIA, P. R. M. “Reconhecimento de Padrões por Métodos não Supervisionados: Explorando Procedimentos Quimiométricos para Tratamento de Dados Analíticos”. *Quim. Nova*, 30(2), 481-487, 2007.

CUYCKENS F, CLAEYS M. J. “Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids”. *J. Mass Spectrom.*; 39: 1-15, 2004

CUYCKENS F; CLAEYS M. “Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-*O*-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules”. *J. Mass Spectrom.*, 40:(3), 364-372, 2005.

DEWICK, P. M. “Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach”. John Wiley & Sons, second edition, 2002.

DIXON, R. A. “Natural products and plant disease resistance”. *Nature*, 411, 843-847, 2001.

DUGO, P.; PRESTI, M. L.; ÖHMAN, M.; FAZIO, A; DUGO, G.; MONDELLO, L. “Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS”. *Journal of Separation Science*, 28(11), 1149–1156, 2005.

EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; VAN BEEK, T. A.; VERVORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P.; ALBERTI, K.. “LC-NMR coupling technology: Recent advancements and applications in natural products analysis”. *Magn. Reson. Chem.*, 43(9): 681-687, 2005.

FELDMAN, A. W., HANKS, R. W. “The occurrence of a gentic glucoside in the bark and albedo of virus-infected citrus trees”. *Phytopatology*, 59, 603-606, 1969.

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

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. AGRIANUAL 2013: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, 2013. 504P.

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. “Greening”, Manual Técnico, 2008.

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. “Greening”, Manual Técnico, 2009.

GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. “Transmission of the Organism Associated with Citrus Greening Disease from Sweet Orange to Periwinkle by Dodder”. Phytopathology, 73:1358-1363, 1983.

GODEJOHANN, M. “LC-SPE-NMR. Users Guide” Bruker BioSpin GmbH Rheinstetten, Germany, Version 040407 for LC-SPE-NMR with Bruker Prospek2 SPE Interface, 2004.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. “Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health”. J. Pharm. and Biomed. Anal., 51(2), 327–345, 2010.

GOTTWALD, T. R., DA GRAÇA, J. V., AND BASSANEZI, R. B. “Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact”. Plant Health Progress, 2007.

GLAUSER G, GUILLARME D, GRATA E, BOCCARD J, THIOCONE A, CARRUPT P-A, VEUTHEY J-L, RUDAZ S, WOLFENDER J-L. “Optimized liquid chromatography-mass spectrometry approach for the isolation of minor stress biomarkers in plant extracts and their identification by capillary nuclear magnetic resonance”. Journal of Chromatography A. 1180:90-8, 2008.

GOTTWALD, T.R. “Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing”. Annu. Rev. Phytopathol., 48:119-39, 2010.

GRAÇA, J. V. “Citrus Greening Disease”. Annu. Rev. Phytopathol., 29, 109-136, 1991.

- HALBERT, S. E. & MANJUNATH, K. L. “Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida”. *Florida Entomologist*, 87:330-353, 2004.
- HARBORNE, J. B. “The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants”. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 335-367, 1999.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. “Advances in flavonoid research since 1992”. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504, 2000.
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, “Valor da produção da agricultura cresce 27,3% de 2007 para 2008”, *Comunicação Social*, 2009. Disponível em:
<http://ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=1479>. Acesso em: julho, 2013.
- ISIDORO, M. M. Estudo da variação do perfil químico de laranja Pêra e tangor ‘murcott’ após a inoculação do fungo *Alternaria alternata*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2012. Tese de doutorado, 254 p.
- JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. “The Phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the *Proteobacteria*”. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44:379-386, 1994.
- KHAN, A.; KUNESCH, G.; CHUILON, S.; RAVISE, A. “Structure and biological activity of Xanthyletin a new phytoalexin of Citrus”. *Fruits*, 40(12), 807-8011, 1985.
- KLAUS, A. “LC-NMR: theory and experiment”. *On-line LC-NMR Relat. Tech.*, 1-22, 2002.
- KLAUS, A. “Liquid Chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy”. *Journal of Chrom. A*, 856 (1-2), 199-211, 1999.
- KOWALSKI, B.; WANG, Y.; VELTKAMP, D. J. “Multivariate Instrument Standardization”. *Anal. Chem.*, 63:(23), 2750–2756, 1991.
- LAFLECHE D. & BOVE J.M. “Mycoplasmas in the argumes attentis de greening, stubborn, or the diseases similaries”. *Fruits*, 25: 455–465, 1970.

LI, Q. M.; HEUVEL, H. V.; DILLEN, L.; M. CLAEYS, M. “Differentiation of 6-C- and 8-C-glycosidic flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry”. *Biol. Mass Spectrom.*, 21(4), 213–221, 1992.

LU, L.; SONG, F.R.; TSAO, R.; JIN, Y.R.; LIU, Z.Q.; LIU, S.Y. “Studies on the homolytic and heterolytic cleavage of kaempferol and kaempferide glycosides using electrospray ionization tandem mass spectrometry”. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24:169–172, 2010.

MAGNANI, R. F. Aspectos Químicos Envolvidos nas Interações de *Citrus* com Fitopatógenos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 167 p.

MAHN, B. “Notes on Troubleshooting LC/MS Contamination”. 2005. Disponível em: <http://www.chibi.ubc.ca/wp-content/uploads/2013/06/Notes-on-trouble-shooting-LCMS-contamination-full.pdf>. Acessado em 20/12/2013.

MANTHEY, J. A.; REYES-DE-CORCUERA, J.; HIJAZ, F.; FOLIMONOVA, S. Y.; JONES, S.; DAVIS, C. “Secondary Metabolite Profiles of Leaves of Healthy and Huanglongbing-infected Orange (*Citrus sinensis* L.) Seedlings Measured by HPLC-Fluorescence Detection”. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 125:229–232, 2012.

MATERN, U. “Coumarins and other phenylpropanoid compounds in the defense response of plant cells.” *Planta Med.*, 57(7), 815-20, 1991.

MONTON, M. R. N; SOGA T. “Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry”. *J. Chromatog. A*, 1168:237-46, 2007.

MURRAY, R.G.E.; SCHLEIFER, K.H. “Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes”. *Intern. J. System. Bacteriol.*, 44 (1): 174-176, 1994.

NABEKURA T.; YAMAKI, T.; KITAGAWA, S. “Effects of chemopreventive citrus phytochemicals on human P-glycoprotein and multidrug resistance protein”. *Eur. J. Pharmacol.*, 600, 1–3, 14, 45–49, 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics: Understanding the Metabolic Responses of Living Systems to Pathophysiological Stimuli via Multivariate Statistical Analysis of Biological NMR spectroscopic data”. *Xenobiotica*, 29:(11), 1181-1189, 1999.

OSBOURN, A. E. “Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack”. *The Plant Cell*, Vol. 8, 1821-1831, 1996.

PARRA, J. R. P.; LOPES, J. R. S.; TORRES, M. L. G.; NAVA, D. E.; PAIVA, P. E. B. “Bioecologia do Vetor *Diaphorina Citri* e Transmissão de Bactérias Associadas ao Huanglongbing”. *Citrus Research & Technology*, Cordeirópolis, 31:(1), 37-51, 2010.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. “Citrumelos como Porta-Enxertos para a Laranjeira 'Valência’”. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 46:(1), 105-107, 2011.

PRASAIN, J. K.; JONES, K; KIRK, M; WILSON, L; SMITH-JOHNSON, M; WEAVER, C; BARNES, S. “Profiling and Quantification of Isoflavonoids in Kudzu Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry”. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 51, No. 15, 4213-4218, 2003.

RAMAUTAR, R.; DEMIRCI, A.; JONG, G. J. “Capillary electrophoresis in metabolomics”. *Trends Anal. Chem.*, 25(5), 455–466, 2006.

RIECKMANN, R. C.; SCARAMUZZA, L. T.; URNHANI, C. O.; MARZOLA, D. A.; CAMPOS, A. J. “GREENING”. *Revista científica eletrônica de Agronomia*, ISSN: 1677-0293, ano VII, Número 13, 2008.

ROCHFORT S. “Metabolomics reviewed: A new "Omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research”. *J. Nat. Prod.*, 68:1813-20, 2005.

Russell, D.; Edmondson, R. D. “High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry”. *J. Mass Spectrum.*, 32, 263-276, 1997.

SATORU KAWAI, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M.; KOIZUMI, M.; ITO, C.; FURUKAWA, H. “Quantitative Study of Flavonoids in Leaves of *Citrus* Plants”. *J. Agric. Food Chem.*, 48(9), 3865-3871, 2000.

SMITH, T. R.; CLARK, A. J.; CLARKSON, G. J.; TAYLOR, P. C.; MARSH, A. “Concise Enantioselective Synthesis of Abscisic Acid and a New Analogue”. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 22(4), 2006.

- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; “Practical HPLC Method Development”. 2^a ed. New York, Willey, p. 350-400, 1997.
- 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, 355 p.
- SONGSIANGA, U.; THONGTHOOMA, T.; ZEEKPUDSAB, P.; KUKONGVIRIYAPANB, V.; BOONYARATC, C.; WANGBOONSKULC, J.; YENJAIA; C. “Antioxidant activity and cytotoxicity against cholangiocarcinoma of carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana*”. Science Asia, 38, 75–81, 2012.
- STOBIECKI, M. “Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides – Review”. Phytochemistry, 54, 237-256, 2000.
- TANAKA. Isolation and Characterization of Three New Acridone Alkaloids, and a New Coumarin”. Chemical & pharm. Bull., 31(3), 901-906, 1983.
- TANAKA, F. A. O.; COLETTA-FILHO, H. D.; ALVES, K. C. S.; SPINELLI, M. O.; MACHADO, M. A.; KITAJIMA, E. W. “Detection of the “*Candidatus Liberibacter americanus*” in Phloem Vessels of Experimentally Infected *Cataranthus roseus* by Scanning Electron Microscopy”. Fitopatol. Bras., 32(6), 519- 251,2007.
- TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; COSTA, P. I.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. “*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil”. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 1857–1862, 2005.
- TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A. J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. “A Phytoplasma Closely Related to the Pigeon Pea Witches`-Broom Phytoplasma (16Sr IX) Is associated with Citrus Huanglongbing Symptoms in the State os São Paulo, Brazil ”. Phytopathology, 98(9), 977–984, 2008.
- TONG, H.; BELL, D.; TABELI, K.; SIEGEL, M. M. “Automated Data Massaging, Interpretation, and E-Mailing Modules for High Throughput Open Access Mass Spectrometry”. J Am Soc Mass Spectrom. 10, 1174–1187, 1999.

- TREUTTER, D. “Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis - Review”. *Plant Biol.*, 7(6), 581–591, 2005.
- TRIPOLI, E.; GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; MAJO, D.; GIAMMANCO, M. “Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review”. *Food Chemistry*, 104, 466–479, 2007.
- UNIVERSOAGRO, 2013. “Brasil é o maior produtor mundial de laranja.” Disponível em: <http://www.uagro.com.br/editorias/agricultura/laranja/2013/08/07/brasil-e-o-maior-produtor-mundial-de-laranja.html>. Acessado em: janeiro, 2014.
- VALDERRAM, J. C. M. “Utilización de espectros de RMN bidimensionales en la deducción estructural de uma piranocoumarina” . *Rev. Colomb. Quim.*, 21(1-2), 1992.
- VAN VUUREN, S. P. & DA GRAÇA, J. V. “Comparison of thin layer chromatographic methods for indexing citrus Greening disease”. *Phytophylactica*, 9, 91-94, 1977.
- VANETTEN, H., MANSFIELD, J. W., BAILEY, J. A. & FARMER, E. E. “Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. *Plant Cell* , 6, 1191–1192, 1994.
- VENÂNCIO, A. L. Avaliação da precocidade do diagnóstico do greening por técnicas de fluorescência. Ribeirão Preto, Programa de Pós Graduação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – USP, 2010. Dissertação de mestrado, 111 p.
- WATERS, I. “An overview of the principles of MS^E, the engine that drives MS performance”; Waters Technical Note.
- WATERS, II. “SYNAPT G2: Breakthrough quantitative e qualitative performance for UPLC/MS e MS/MS (MS^E) applications”; Waters Technical Note.
- WU, T.S.; FURUKAWA, H. “Acridone Alkaloids. VII. Constituents of *Citrus sinensis* OSBECK var. *brasiliensis*
- YU, J.; WANG, L.; WALZEM, R. L.; MILLER, E. G.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. “Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins”. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (6), 2009–201, 2005.

ZEEVAART, J. A. D. "METABOLISM AND PHYSIOLOGY OF ABSCISIC ACID". *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39, 439-473, 1988.

ZHANG, M.; DUAN, Y.; ZHOU, L.; TURECHEK, W. W.; STOVER, E.; POWELL, C. A. "Screening Molecules for Control of Citrus Huanglongbing Using an Optimized Regeneration System for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'-Infected Periwinkle (*Catharanthus roseus*) Cuttings". *PHYTOPATHOLOGY*, 100(3), 239-245, 2010.