

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

**“ESTUDO QUÍMICO DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* E
SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE *Citrus sinensis*”**

EDENILSON DOS SANTOS NICULAU*

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

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

*** Bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2014**

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

N663eq Niculau, Edenilson dos Santos.
Estudo químico de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e sua influência no perfil químico de *Citrus sinensis* / Edenilson dos Santos Niculau. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
182 f.

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

1. Química orgânica. 2. Cancro cítrico. 3. Estudo químico *in vitro* e *in vivo*. 4. Biomarcadores voláteis. 5. Macromoléculas. 6. LC-MS. I. Título.

CDD: 547 (20^a)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ednilson dos Santos Niculau, realizada em 17/12/2014:

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

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli
UNICAMP

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati
ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
FFCLRP/USP

Dedico este trabalho a minha mãe Graciene, meu pai Antônio Niculau, minha tia Berenice e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida e guiar meus caminhos.

Aos meus pais, Antônio Niculau e Graciene dos Santos por todo amor e apoio em todos os momentos de minha vida.

À minha tia, Berenice, e a todos os meus irmãos pelo companheirismo familiar.

À minha esposa, Gilvaneide dos Santos, por acreditar em mim, por todo seu amor, carinho, compreensão e paciência.

À Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva por me orientar na pesquisa, por sua dedicação, confiança e ensinamentos.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Dr. João Batista Fernandes, Dr. Paulo Cesar Vieira e Dr. Moacir Rossi Forim que participaram diretamente e/ou indiretamente na execução deste trabalho.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado do Centro de Citricultura *Sylvio Moreira* – IAC pela parceria em ceder a bactéria *Xac 306* e à Dra. Simone Cristina Picchi pelos ensinamentos dos procedimentos de inoculação da bactéria na planta.

Ao Dr. Leonardo Toffano pelo auxílio e ensinamentos durante toda a parte de cultivo e inoculação da bactéria nas plantas.

Ao biólogo Evandro Luis Prieto pela realização dos experimentos de PCR.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos auxílios e disponibilidade do laboratório e ao Dr. Douglas Ferreira pelos ensinamentos e execução dos experimentos no MALDI-TOF.

Ao Dr. Franklin Behlau e à bióloga Tamires Garcia Silva da FUNDECITRUS pela parceria na parte do trabalho envolvendo interação de planta-patógeno por MALDI-TOF.

A todos os meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, especialmente a Moacir dos Santos Andrade, Israel Cívico Gil de Sá, Wesley Faria Gomes, Ana Paula Terezan e a todos os colegas do Doutorado pelo companheirismo em muitos momentos da vida acadêmica.

À banca por ter aceitado o convite e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

À FAPESP, por meio do Processo 11/22975-8, pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Doutorado durante o período 2011-2012.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
δ	Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
\varnothing	Diâmetro
λ	Comprimento de onda de emissão
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
AcOEt	Acetato de etila
ATP	Adenosina Trifosfato
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
c.c	Cancro cítrico
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
eV	Elétron-volt
F.E	Fase estacionária
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama
h	Altura
HCA	Análise Hierárquica de Clusters
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HS-SPME	Microextração em fase sólida no modo headspace
Hz	Hertz
IFSSIN	Folhas de <i>C. sinensis</i> infectadas com <i>Xac</i> sem sintoma do c.c
IFCSIN	Folhas de <i>C. sinensis</i> infectadas com <i>Xac</i> com sintoma do c.c

<i>J</i>	Constante de acoplamento
MALDI-TOF	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz associada ao analisador de massas Tempo De Voo
MeOH	Metanol
MSP	MALDI BioTyper® Main Spectra
min	minutos
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MHz	Mega-hertz
MS	Espectrometria de massas
NBY	Nutrient Broth Yeast
PC	Folhas de <i>C. sinensis</i> do campo com sintoma do c.c
PS	Folhas de <i>C. sinensis</i> do campo sadia
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	Rotações por minuto
s	Singleto
SA	Folhas de <i>C. sinensis</i> sadia
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
sl	Singleto largo
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Moléculas sinalizadoras isoladas e/ou identificadas em bactérias gram-negativas.....	8
TABELA 4.1 - Composição química dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA); infectada com <i>Xac</i> 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com <i>Xac</i> 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS	42
TABELA 4.2 - Composição química dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA) e infectada com <i>Xac</i> 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS utilizando N ₂ no processo de extração	47
TABELA 4.3 - Composição química dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA); infectada com <i>Xac</i> 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com <i>Xac</i> 306 e com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por “ <i>headspace</i> ” dinâmico-GC-MS	52
TABELA 4.4 - Composição química dos voláteis de <i>Xac</i> 306, cultivada em NBY líquido, por “ <i>headspace</i> ” dinâmico-GC-MS	54
TABELA 5.1 - Massas obtidas dos extratos do sobrenadante e das células bacterianas de <i>Xac</i>	77
TABELA 5.2 - Condições cromatográficas utilizadas para análise dos extratos ou frações da bactéria <i>Xac</i>	80
TABELA 5.3 - Massas obtidas das frações coletadas do subextrato hexânico do sobrenadante (EXSXHEA)	83
TABELA 5.4 - Massas obtidas das subfrações coletadas de “F14”	85
TABELA 5.5 - Constituintes químicos do extrato hexânico do sobrenadante (EXSXHE)	88
TABELA 5.6 - Constituintes químicos do subextrato hexânico do sobrenadante (EXSXHEA)	90
TABELA 5.7 - Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) em comparação com os dados da literatura.....	102
TABELA 5.8 - Comparação da rotação óptica do <i>ciclo</i> (Pro-Leu) isolada com os isômeros descritos na literatura.....	110
TABELA 5.9 - Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) da <i>ciclo</i> (Pro-Val) em comparação com os dados da literatura.....	113

TABELA 5.10 - Comparação da rotação óptica do <i>ciclo</i> (Pro-Val) isolada com os isômeros descritos na literatura.....	116
TABELA 5.11 - Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) em comparação com os dados da literatura.....	120
TABELA 5.12 - Comparação da rotação óptica do <i>ciclo</i> (Pro-Phe) isolada com os isômeros descritos na literatura.....	124
TABELA 5.13 - Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) em comparação com os dados da literatura.....	127
TABELA 5.14 - Comparação da rotação óptica do <i>ciclo</i> (Pro-Phe) isolada com os isômeros descritos na literatura.....	130
TABELA 5.15 - Dados de RMN de ¹ H da quinolina-4-carboxaldeído (5) em comparação com os dados da literatura.....	133
TABELA 5.16 - Dados de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Phe-Phe) (6) em comparação com os dados da literatura.....	136
TABELA 5.17 - Dados de RMN de ¹ H <i>cis</i> -13-docosenamida (7) em comparação com os dados da literatura.....	142
TABELA 5.18 - Análise via GC-MS da subfração PAC4 que contém as amidas 7-9.....	145
TABELA 5.19 - Análise via GC-MS da subfração PAC5 que contém as amidas 7-9 e substâncias 10.1 a 10.8.....	151
TABELA 5.20 - Dados de RMN de ¹ H da uracila (11) em comparação com os dados da literatura.....	152

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Exportação mundial de suco de laranja.....	1
FIGURA 1.2 - Lesão de cancro cítrico em folha (a), frutos (c) e ramos (d) de <i>Citrus</i> sp causada por <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . Microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folha de grapefruit (<i>Citrus paradisi</i>) (b)	3
FIGURA 1.3 - Ciclo da doença do cancro cítrico. Adaptada de GOTTWALD, T., 2002	4
FIGURA 1.4 - Larva minador dos citros provocando ferimentos em folhas de limão tahiti por meio de “galerias”	4
FIGURA 1.5 – Aspecto da colônia da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> após 48 horas de cultivo em meio Nutrient Broth Yeast (NBY) enriquecido com ágar nutriente	5
FIGURA 1.6 - Estrutura química de algumas moléculas sinalizadoras isoladas de bactérias gram-negativas	8
FIGURA 1.7 - Estrutura química de moléculas sinalizadoras da família DSF relacionado a uma variedade de bactérias e a levedura <i>Candida albicans</i>	11
FIGURA 1.8 - Reação de degradação do reagente X-Gluc e formação do derivado de índigo de coloração azul por ação da enzima β -glucuronidase.....	13
FIGURA 1.9 - Alguns metabólitos secundários produzidos por plantas em resposta à presença de micro-organismos	17
FIGURA 1.10 - Sistema para extração de voláteis por HS-SPME	20
FIGURA 1.11 - Sistema para extração de voláteis por “headspace” estático	21
FIGURA 1.12 - Sistema de extração por “headspace” dinâmico.....	22
FIGURA 4.1 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> variando o tempo de extração por HS-SPME/GC-MS.....	39
FIGURA 4.2 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA); infectada com <i>Xac</i> 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com <i>Xac</i> 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS	41
FIGURA 4.3 - Estruturas química dos principais biomarcadores voláteis e respectivos espectros de massas necessários para diagnose do cancro cítrico em <i>C. sinensis</i> por HS-SPME/GC-MS	43

FIGURA 4.4 - Gráfico mostrando variação da composição química dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA); infectada com <i>Xac</i> 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com <i>Xac</i> 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS	44
FIGURA 4.5 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA) e infectada com <i>Xac</i> 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS utilizando N ₂ no processo de extração.....	46
FIGURA 4.6 - Estruturas química dos principais biomarcadores voláteis e respectivos espectros de massas necessários para diagnose do cancro cítrico em <i>C. sinensis</i> por HS-SPME/GC-MS utilizando N ₂ no processo de extração	48
FIGURA 4.7 - Gráfico mostrando variação na composição química dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA) e infectada com <i>Xac</i> 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS utilizando N ₂ no processo de extração	49
FIGURA 4.8 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA); infectada com <i>Xac</i> 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com <i>Xac</i> 306 e com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por “ <i>headspace</i> ” dinâmico-GC-MS.....	51
FIGURA 4.9 - Estrutura química do principal biomarcador volátil e seu espectro de massas necessário para diagnose do cancro cítrico em <i>C. sinensis</i> por “ <i>headspace</i> ” dinâmico-GC-MS	52
FIGURA 4.10 - Gráfico mostrando variação da composição química dos voláteis de <i>Citrus sinensis</i> sadia (SA); infectada com <i>Xac</i> 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com <i>Xac</i> 306 e com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por “ <i>headspace</i> ” dinâmico-GC-MS	53
FIGURA 4.11 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de <i>Xac</i> 306, cultivada em NBY líquido, por “ <i>headspace</i> ” dinâmico-GC-MS.....	54
FIGURA 4.12 - Compostos voláteis identificados em <i>Xac</i> por “ <i>headspace</i> ” dinâmico-GC-MS.....	55
FIGURA 4.13 - Amplificação específica do alvo <i>Xac</i> PCR	55
FIGURA 4.14 - Procedimento para inoculação da bactéria <i>Xac</i> nas folhas de <i>C. sinensis</i>	58
FIGURA 4.15 - Perfil de macromoléculas de <i>Xac</i> necessário para a identificação da bactéria por MALDI-TOF/MS.....	64

FIGURA 4.16 - Diagnóstico de <i>Xac</i> por MALDI-TOF/MS, utilizando o software MALDI Biotyper	65
FIGURA 4.17 - Principais íons (macromoléculas biomarcadoras) que caracterizam a presença da bactéria em plantas sintomáticas do cancro cítrico	66
FIGURA 4.18 - Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 84 amostras (tratamentos T1, T2, T3 e T4) e de <i>Xac</i> cultivado em 48 horas	67
FIGURA 4.19 - Ampliação e grupos da análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 84 amostras (tratamentos T1, T2, T3 e T4) e de <i>Xac</i> cultivado em 48 horas	68
FIGURA 4.20 - Ampliação e grupos da análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 84 amostras (tratamentos T1, T2, T3 e T4) e de <i>Xac</i> cultivado em 48 horas	68
FIGURA 4.21 - Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) dos tratamentos T1, T2, T3 e T4.....	69
FIGURA 4.22 - Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 88 amostras de folhas de <i>C. sinensis</i> do campo.....	70
FIGURA 4.23 - Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 88 amostras de folhas de <i>C. sinensis</i> do campo e <i>Xac</i> cultivada por 48 horas	70
FIGURA 4.24 - Diagnóstico do cancro cítrico, por PCR, das plantas utilizadas no experimentos com o MALDI-TOF/MS	71
FIGURA 5.1 - Cromatograma da eluição gradiente do extrato “EXSXHEA” de <i>Xac</i> 306 em 1 mg/mL (a) e 9,4 mg/mL (b).....	82
FIGURA 5.2 - Cromatograma da eluição gradiente da fração “F14” de <i>Xac</i> 306 concentrada em 1 mg/mL (a) e 9,4 mg/mL (b)	84
FIGURA 5.3 – Aspecto da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> após 5 dias de cultivo em meio Czapeck sólido	85
FIGURA 5.4 – Aspecto da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> após 85 dias de cultivo em meio Czapeck líquido	86
FIGURA 5.5 - Cromatograma de íons totais (TIC) do extrato hexânico do sobrenadante (EXSXHE) e do controle obtido por GC-MS.....	88
FIGURA 5.6 - Cromatograma de íons totais (TIC) do subextrato hexânico do sobrenadante (EXSXHEA) e o controle obtido por GC-MS.....	89
FIGURA 5.7 - Espectro de massas da substância quinolina-4-carboxaldeído obtido experimentalmente por impacto eletrônico 70 eV.....	90

FIGURA 5.8 - Espectro de massas da substância <i>ciclo</i> (Pro-Val) (A) e da literatura (B) [WANG et al., 2010b].....	91
FIGURA 5.9 - Espectro de massas da substância <i>ciclo</i> (Pro-Leu) (A); isolado neste estudo (B) e da literatura (C) [WANG et al., 2010b]	92
FIGURA 5.10 - Estrutura química do ácido 11-metil- <i>cis</i> -2-dodecenóico	92
FIGURA 5.11 - Cromatograma de íons totais (TIC) da solução do ácido 11-metil- <i>cis</i> -2-dodecenóico obtido por GC-MS	94
FIGURA 5.12 - Espectro de massas do ácido 11-metil- <i>cis</i> -2-dodecenóico obtido por GC-MS	94
FIGURA 5.13 - Cromatograma de íons selecionados da solução do ácido 11-metil- <i>cis</i> -2-dodecenóico obtido por GC-MS	94
FIGURA 5.14 - Cromatograma de íons selecionados da solução do ácido 11-metil- <i>cis</i> -2-dodecenóico obtido por GC-MS	94
FIGURA 5.15 - Cromatograma de íons totais (TIC) do extrato hexânico das células bacterianas de <i>Xac</i> (EXPH) obtido por GC-MS.....	95
FIGURA 5.16 - Espectro de massas referente ao pico com tempo de retenção 13,143 min obtido por GC-MS.....	95
FIGURA 5.17 - Cromatograma de íons selecionados do extrato hexânico das células bacterianas de <i>Xac</i> (EXPH) obtido por GC-MS.....	95
FIGURA 5.18 - Cromatograma de íons selecionados do extrato hexânico das células bacterianas de <i>Xac</i> (EXPH) obtido por GC-MS.....	96
FIGURA 5.19 - Cromatograma de íons totais (TIC) do extrato do meio NBY obtido por GC-MS.....	96
FIGURA 5.20 - Cromatograma de íons selecionados do extrato do meio NBY obtido por GC-MS.....	96
FIGURA 5.21 - Cromatograma de íons selecionados do extrato do meio NBY obtido por GC-MS.....	97
FIGURA 5.22 - Estrutura química da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	101
FIGURA 5.23 - Espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) (CDCl ₃ , 400 MHz)..	102
FIGURA 5.24 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	103
FIGURA 5.25 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	103
FIGURA 5.26 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	104

FIGURA 5.27 - Espectro de RMN de ^{13}C da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) (CDCl_3 , 100 MHz).	104
FIGURA 5.28 - Mapa de contorno COSY (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>ciclo</i> (Pro-Leu)	105
FIGURA 5.29 - Mapa de contorno COSY (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>ciclo</i> (Pro-Leu)	105
FIGURA 5.30 - Mapa de contorno HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>ciclo</i> (Pro-Leu)	106
FIGURA 5.31 - Mapa de contorno HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>ciclo</i> (Pro-Leu)	106
FIGURA 5.32 - Mapa de contorno HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) de <i>ciclo</i> (Pro-Leu).	107
FIGURA 5.33 - Cromatograma de íons totais (TIC) da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) obtido por GC-MS.....	107
FIGURA 5.34 - Espectro de massas da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) obtido por GC-MS.....	107
FIGURA 5.35 - Espectro de massas full scan da <i>ciclo</i> (Pro-Leu) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.....	108
FIGURA 5.36 - Possíveis isômeros da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	109
FIGURA 5.37 - Cromatograma de íons totais (TIC) de <i>ciclo</i> (Pro-Leu) obtido por GC-FID.....	109
FIGURA 5.38 - Espectros de <i>g</i> -NOESY (^1H - ^1H), (600 MHz, CDCl_3) da substância <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	111
FIGURA 5.39 - Estrutura química do enantiômero <i>ciclo</i> (D-Pro-D-Leu) isolado neste estudo.....	112
FIGURA 5.40 - Estrutura química da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Val).....	112
FIGURA 5.41 - Cromatograma de íons totais (TIC) de F3 obtido por GC-MS....	112
FIGURA 5.42 - Espectro de massas de F3 obtido por GC-MS.....	113
FIGURA 5.43 - Espectros de massas da substância <i>ciclo</i> (Pro-Val) na literatura [WANG et al., 2010b].....	113
FIGURA 5.44 - Espectro de RMN de ^1H da <i>ciclo</i> (Pro-Val) (CD_3OD , 400 MHz).	114
FIGURA 5.45 - Possíveis isômeros da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	114
FIGURA 5.46 - Cromatograma de íons totais (TIC) de <i>ciclo</i> (Pro-Val) obtido por GC-FID.....	115
FIGURA 5.47 - Espectros de <i>g</i> -NOESY (^1H - ^1H), (600 MHz, CD_3OD) da substância <i>ciclo</i> (Pro-Val).....	117
FIGURA 5.48 - Estrutura química do enantiômero <i>ciclo</i> (L-Pro-L-Val) isolado neste estudo.....	117
FIGURA 5.49 - Estrutura química da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	118
FIGURA 5.50 - Cromatograma de íons totais (TIC) da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) obtido por GC-MS.....	118
FIGURA 5.51 - Espectro de massas de <i>ciclo</i> (Pro-Phe) obtido por GC-MS.....	119

FIGURA 5.52 - Espectros de massas da substância <i>ciclo</i> (Pro-Phe) da literatura [WANG et al., 2010b].....	119
FIGURA 5.53 - Espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) (CD ₃ OD, 400 MHz).121	121
FIGURA 5.54 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) (CD ₃ OD, 400 MHz).....	121
FIGURA 5.55 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) (CD ₃ OD, 400 MHz).....	122
FIGURA 5.56 - Possíveis isômeros da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	123
FIGURA 5.57 - Espectros de <i>g</i> -NOESY (¹ H- ¹ H), (400 MHz, CD ₃ OD) da substância <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	125
FIGURA 5.58 - Estrutura química do enantiômero <i>ciclo</i> (L-Pro-L-Phe) isolado neste estudo.....	125
FIGURA 5.59 - Estrutura química da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	125
FIGURA 5.60 - Cromatograma de íons totais (TIC) de F7 obtido por GC-MS....	126
FIGURA 5.61 - Espectro de massas de <i>ciclo</i> (Pro-Phe) obtido por GC-MS.....	126
FIGURA 5.62 - Espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) (CD ₃ OD, 400 MHz).127	127
FIGURA 5.63 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) (CD ₃ OD, 400 MHz).....	127
FIGURA 5.64 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da <i>ciclo</i> (Pro-Phe) (CD ₃ OD, 400 MHz).....	128
FIGURA 5.65 - Estrutura química do enantiômero <i>ciclo</i> (D-Pro-L-Phe) isolado neste estudo.....	129
FIGURA 5.66 - Espectros de <i>g</i> -NOESY (¹ H- ¹ H), (600 MHz, CD ₃ OD) da substância <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	130
FIGURA 5.67 - Estrutura química da Quinolina-4-carboxaldeído.....	131
FIGURA 5.68 - Cromatograma de íons totais (TIC) da fração que contém a substância quinolina-4-carboxaldeído obtido por GC-MS.....	131
FIGURA 5.69 - Espectro de massas de quinolina-4-carboxaldeído obtido por GC-MS.....	132
FIGURA 5.70 - Espectro de massas da quinolina-4-carboxaldeído do banco de dados do equipamento (NIST05).....	132
FIGURA 5.71 - Cromatograma de íons totais e espectros de massas da quinolina isolada (A), padrão sigma-aldrich (B) e co-injeção dos mesmos (C) obtidos por GC-MS.....	132

FIGURA 5.72 - Espectro de RMN de ^1H da quinolina-4-carboxaldeído (CD_3OD , 600 MHz).....	134
FIGURA 5.73 - Ampliação da região δ 8,83 a 8,30 do espectro de RMN de ^1H da quinolina-4-carboxaldeído (CD_3OD , 600 MHz).....	134
FIGURA 5.74 - Ampliação da região δ 8,05 a 7,51 do espectro de RMN de ^1H da quinolina-4-carboxaldeído (CD_3OD , 600 MHz).....	135
FIGURA 5.75 - Estruturas química da <i>ciclo</i> (Phe-Phe) (6).....	135
FIGURA 5.76 - Ampliação da região δ 8,21 a 8,06 do espectro de RMN de ^1H da <i>ciclo</i> (Phe-Phe) (CD_3OD , 600 MHz).....	136
FIGURA 5.77 - Ampliação da região δ 7,40 a 6,80 do espectro de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) e mapa de contorno COSY (CD_3OD , 600 MHz).....	136
FIGURA 5.78 - Ampliação do espectro do mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 150 MHz).....	137
FIGURA 5.79 - Ampliação da região δ 4,12 a 2,08 do espectro de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) e mapa de contorno COSY (CD_3OD , 600 MHz).....	138
FIGURA 5.80 - Ampliação do espectro do mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 150 MHz).....	138
FIGURA 5.81 - Cromatograma de íons totais (TIC) da subfração 3 que contém a substância <i>ciclo</i> (Phe-Phe) obtido por GC-MS.....	139
FIGURA 5.82 - Espectro de massas de do pico 2, <i>ciclo</i> (Phe-Phe), obtido por GC-MS.....	139
FIGURA 5.83 - Espectro de massas da <i>ciclo</i> (Phe-Phe) do banco de dados do equipamento (NIST08).....	139
FIGURA 5.84 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) da subfração 3 que contém a substância <i>ciclo</i> (Phe-Phe) (6).....	140
FIGURA 5.85 - Estruturas química da <i>cis</i> -13-docosenamida (7), <i>cis</i> -9-octadecenamida (8) e octadecanamida (9).....	140
FIGURA 5.86 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância <i>cis</i> -13-docosenamida.....	143
FIGURA 5.87 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância <i>cis</i> -13-docosenamida.....	143
FIGURA 5.88 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância <i>cis</i> -13-docosenamida.....	144

FIGURA 5.89 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS da subfração PAC4 que contém as amidas 7-9, sendo a amida 7 (<i>cis</i> -13-docosenamida) majoritária.....	144
FIGURA 5.90 - Espectro de massas do pico 3, substância 7, obtido por GC-MS.....	145
FIGURA 5.91 - ESQUEMA de Fragmentação para amida e ácido carboxílico via rearranjo de McLafferty.....	145
FIGURA 5.92 - Espectro de massas de <i>cis</i> -13-docosenamida do banco de dados do equipamento (NIST08).....	146
FIGURA 5.93 - Reação geral de alquitiolação das amidas, <i>cis</i> -13-docosenamida e em <i>cis</i> -9-octadecenamida.....	146
FIGURA 5.94 - Cromatograma e espectro de <i>cis</i> -13-docosenamida derivatizada.....	147
FIGURA 5.95 - Proposta de fragmentação para os íons <i>m/z</i> 258 e 173 de <i>cis</i> -13-docosenamida derivatizada.....	147
FIGURA 5.96 - Cromatograma e espectro de <i>cis</i> -9-octadecenamida derivatizada.....	148
FIGURA 5.97 - Proposta de fragmentação para os íons <i>m/z</i> 202 e 173 de <i>cis</i> -9-octadecenamida derivatizada.....	148
FIGURA 5.98 - Estruturas química dos ácidos tetradecanóico (10.1); pentadecanóico (10.2); hexadecanóico (10.3); <i>cis</i> -9-octadecenóico (10.6); dos hidrocarbonetos <i>n</i> -eicosano (10.4); <i>n</i> -heneicosano (10.5); <i>n</i> -tricosano (10.8) e amida hexadecanamida (10.7).....	149
FIGURA 5.99 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS da subfração PAC5.....	150
FIGURA 5.100 - Estrutura química da uracila (11).....	151
FIGURA 5.101 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHz) da uracila.....	153
FIGURA 5.102 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHz) da uracila.....	153
FIGURA 5.103 - Mapa de correlação COSY (¹ H- ¹ H) (CD ₃ OD, 400 MHz) da uracila.....	154
FIGURA 5.104 - Mapa de correlação HSQC (¹ H- ¹³ C) (CD ₃ OD, 400 MHz) da uracila.....	154
FIGURA 5.105 - Mapa de correlação HMBC (¹ H- ¹³ C, J3) (CD ₃ OD, 400 MHz) da uracila.....	154

FIGURA 5.106 – Síntese da dicetopiperazina <i>ciclo</i> (Pro-Leu) por condensaço direta de aminoácidos.....	155
FIGURA 5.107 - Cromatogramas de íons extraídos MRM da fraço acetato de etila de <i>Xac</i> cultivada em czapeck sólido (a) e das quatro dicetopiperazinas isoladas (b).....	156
FIGURA 5.108 - Espectro de íon produtos <i>m/z</i> 197 [M+H] ⁺ de <i>ciclo</i> (Pro-Val) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.....	157
FIGURA 5.109 - Proposta de fragmentaço para a <i>ciclo</i> (Pro-Val).....	158
FIGURA 5.110 - Espectro de íon produtos <i>m/z</i> 211 [M+H] ⁺ de <i>ciclo</i> (Pro-Leu) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.....	159
FIGURA 5.111 - Proposta de fragmentaço para a <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	159
FIGURA 5.112 - Espectro de íon produtos <i>m/z</i> 245 [M+H] ⁺ de <i>ciclo</i> (Pro-Phe) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.....	160
FIGURA 5.113 - Proposta de fragmentaço para a <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	161
FIGURA 5.114 - Espectro de íon produtos <i>m/z</i> 295 [M+H] ⁺ de <i>ciclo</i> (Phe-Phe) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.....	162
FIGURA 5.115 - Proposta de fragmentaço para a <i>ciclo</i> (Phe-Phe).....	162

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1 - Procedimento para cultivo e inoculação da bactéria <i>Xac</i> 306 em <i>C. sinensis</i>	32
ESQUEMA 4.2 - Procedimento para diagnóstico da bactéria <i>Xac</i> 306 em <i>C. sinensis</i> por fluxo bacteriano.....	33
ESQUEMA 4.3 - ESQUEMA de montagem do sistema de extração dos voláteis por HS-SPME/GC-MS.....	35
ESQUEMA 4.4 - ESQUEMA de montagem do sistema de extração dos voláteis por HS-SPME/GC-MS utilizando N ₂ no preparo de amostra.....	36
ESQUEMA 4.5 - ESQUEMA de montagem do sistema de extração dos voláteis por “headspace” dinâmico associado ao GC-MS.....	37
ESQUEMA 4.6 - Planejamento experimental das plantas de <i>C. sinensis</i> para extração e análise das macromoléculas no MALDI-TOF/MS.....	57
ESQUEMA 4.7 - Procedimento para diagnóstico de <i>Xac</i> por MALDI-TOF/MS....	58
ESQUEMA 4.8 - Metodologia de extração com agitação seguida de centrifugação para identificação dos biomarcadores químicos (macromoléculas) das plantas sintomáticas do cancro cítrico por MALDI-TOF/MS.....	60
ESQUEMA 4.9 - Procedimento para identificação e extração do DNA de <i>Xac</i> da planta e diagnóstico do cancro cítrico por PCR.....	62
ESQUEMA 5.1 - Procedimento para obtenção do sobrenadante e células bacterianas.....	75
ESQUEMA 5.2 - Obtenção dos extratos do sobrenadante e das células bacterianas.....	76
ESQUEMA 5.3 - Fracionamento da fase aquosa do sobrenadante de <i>Xac</i>	77
ESQUEMA 5.4 - Resumo da partição do extrato metanólico do “pellet” (EXPM) e fracionamento da fração EXPAC.....	78
ESQUEMA 5.5 - Fracionamento do extrato acetato de etila (EXSXAC) do sobrenadante.....	81

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* E SUA INFLUÊNCIA NO PERFIL QUÍMICO DE *Citrus sinensis* – O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), é uma doença que provoca sérios problemas à citricultura mundial, principalmente à cultura da laranja, *Citrus sinensis*. Neste sentido, esta tese descreveu o desenvolvimento de novas metodologias para a diagnose do cancro cítrico por meio de biomarcadores voláteis ou macromoléculas produzidas por associação *C. sinensis*-*Xac*, bem como, realizou o estudo químico da linhagem selvagem da bactéria *Xac* buscando isolar e/ou identificar compostos químicos que de algum modo podem estar associados ao mecanismo de patogenicidade. As metodologias para diagnóstico do cancro cítrico envolveram: “*headspace*” dinâmico-GC-MS, HS-SPME/GC-MS e MALDI-TOF/MS. O principal biomarcador volátil identificado por “*headspace*” dinâmico-GC-MS foi o benzoato de isoamila e por HS-SPME/GC-MS foram identificados uma série de compostos aromáticos (benzaldeído, fenilmetanol, benzoato de metila, 2-feniletanol, acetato de benzila e benzoato de etila), quando utilizado N₂ no preparo de amostra, enquanto que sem N₂, benzotiazol e benzoato de 2-etilexila foram os principais biomarcadores identificados. A técnica MALDI-TOF/MS foi eficiente para diferenciar estatisticamente macromoléculas produzidas por folhas de *C. sinensis* sadias de folhas sintomáticas com cancro cítrico tanto de plantas em que o processo de infecção ocorreu artificialmente quanto naturalmente. O estudo químico de *Xac* levou ao isolamento e/ou identificação de 15 substâncias, algumas delas sinalizadoras em outras bactérias com similaridade genômica. Entre estas substâncias destacam-se: *ciclo* (Pro-Leu), *ciclo* (Pro-Val), dois diastereoisômeros de *ciclo* (Pro-Phe), às quais as configurações relativas foram determinadas, *ciclo* (Phe-Phe), quinolina-4-carboxaldeído, amidas de ácidos graxos (octadecanamida, *cis*-9-octadecenamida, *cis*-13-docosenamida) e o ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico (sinalizador em *X. campestris* pv. *campestris*). De acordo com vários estudos existentes na literatura, alguns desses compostos são envolvidos na comunicação celular de diferentes micro-organismos ou podem ser fitotoxinas lançadas pela bactéria na planta.

ABSTRACT

CHEMICAL STUDY OF *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* AND ITS INFLUENCE ON THE CHEMICAL PROFILE IN *Citrus sinensis* – Citrus canker, caused by the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), is a disease that causes serious problems to the global citrus industry, especially to orange (*Citrus sinensis*). In this regard, this thesis describes the development of new methodologies for the diagnosis of citrus canker by volatile biomarkers or macromolecules produced by the *C. sinensis*-*Xac* association, as well, performed the chemical study of the wild strain of bacteria *Xac* searching to isolate and/or identify chemical compounds that may be associated to pathogenicity. The methods for diagnosis of citrus canker involved: dynamic headspace-GC-MS, HS-SPME/GC-MS and MALDI-TOF/MS. The main volatile biomarker identified by dynamic headspace-GC-MS was isoamyl benzoate and by HS-SPME/GC-MS aromatic compounds (benzaldehyde, phenyl methanol, methyl benzoate, 2-phenyl ethanol, benzyl acetate and ethyl benzoate) when N₂ was used in the sample preparation, while without N₂, benzothiazole and 2-ethylhexyl benzoate were the main biomarkers. The MALDI-TOF/MS technique was effective to differentiate statistically macromolecules produced by the healthy leaves of *C. sinensis* when in comparison to symptomatic leaves of citrus canker. The chemical study of *Xac* allowed the isolation or identification of 15 substances, some of them acting as signaling molecules in other bacteria with genomic similarity. Among the substances are: cyclo (Pro-Leu), cyclo (Pro-Val) and two diastereoisomers of cyclo (Pro-Phe), for which the relative configurations were determined, cyclo (Phe-Phe), quinolin-4-carboxaldehyde, fatty acid amides (octadecanamide, *cis*-9-octadecenamide, *cis*-13-docosenamide) and *cis*-11-methyl-2-dodecenoic acid (signaling molecule in *X. campestris* pv. *campestris*). According to several studies in literature, some of these compounds are involved in cell communication of some microorganisms or can be phytoxins released by the bacteria into the plant.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Importância econômica dos citros e da doença cancro cítrico.....	1
1.2 - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> : Aspectos biológicos.....	5
1.3 - Comunicação celular em bactérias por meio de moléculas sinalizadoras – “Quorum-sensing molecules”.....	6
1.3.1 - Sistema de secreção em bactérias e fatores de sinais difusíveis (DSF): Influência no processo de fitopatogenicidade	9
1.4 - Perfil químico dos voláteis de voláteis e macromoléculas no diagnóstico de doenças agrícolas de plantas.....	15
1.4.1 - Mecanismo de defesa da planta e espectrometria de massas para detecção.....	15
1.4.2 - Técnicas para diagnóstico do cancro cítrico	18
1.4.3 - Técnicas para diagnóstico de doenças agrícolas por meio do perfil químico dos voláteis liberados pelas plantas.....	18
1.4.3 - Processo de extração de voláteis por SPME e SPE associadas à GC-MS.....	20
2 - JUSTIFICATIVAS.....	25
3 - OBJETIVOS	27
3.1 - Objetivo Geral	27
3.2 - Objetivos Específicos	27
4 – PARTE 1: BUSCA DE BIOMARCADORES VOLÁTEIS E MACROMÉCULAS EM <i>C. sinensis</i> (L.) OSBECK SADIA E INOCULADA COM <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	29
4.1 - Perfil químico de voláteis em <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck sadia e inoculada com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> por HS-SPME e “headspace” dinâmico-GC-MS.....	29
4.1.1 - Procedimentos experimentais	29
4.1.1.1 - Materiais e equipamentos	29
4.1.1.2 - Metodologia dos experimentos	30
4.1.1.2.1 - Inoculação da bactéria Xac 306 em plantas de <i>C. sinensis</i>	30
4.1.1.2.2 - Diagnóstico do cancro cítrico	32
4.1.1.2.3 - Metodologia para HS-SPME/GC-MS	34
4.1.1.2.4 - Metodologia para “headspace” dinâmico associado ao GC-MS	36

4.1.1.2.5 - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS).....	38
4.1.2 – Resultados e discussão.....	38
4.2 - Perfil de macromoléculas biomarcadoras do cancro cítrico por MALDI-TOF/MS.....	56
4.2.1 - Procedimentos experimentais	56
4.2.1.1 - Materiais e equipamentos	56
4.2.1.2 - Metodologia dos experimentos.	56
4.2.1.2.1 - Planejamento experimental das plantas.....	56
4.2.1.2.2 - Identificação rápida de <i>Xac</i> por MALDI-TOF/MS.	58
4.2.1.2.3 - Metodologia para extração das macromoléculas.	59
4.2.1.2.4 - Aplicação da metodologia de extração em amostras do campo.	60
4.2.1.2.5 - Análise multivariada e parâmetros do Maldi.....	61
4.2.1.2.6 - Diagnóstico por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).....	61
4.2.2 – Resultados e discussão.....	63
5 - PARTE 2: ESTUDO QUÍMICO DA BACTÉRIA <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> BUSCANDO ISOLAR E/OU IDENTIFICAR POSSÍVEIS COMPOSTOS SINALIZADORES.....	73
5.1 - Procedimentos experimentais	73
5.1.1 - Materiais e equipamentos	73
5.1.2 - Metodologia dos experimentos	74
5.1.2.1 - Procedimento para cultivo da bactéria e obtenção do sobrenadante e células bacterianas.....	74
5.1.2.2 - Obtenção e fracionamento dos extratos do sobrenadante e das células da bactéria cultivada em meio NBY	75
5.1.2.2.1 - Fracionamento da fase aquosa.....	76
5.1.2.2.2 - Fracionamento do extrato metanólico das células bacterianas (“pellet”).....	77
5.1.2.3 - Determinação da posição da ligação dupla das amidas de ácidos graxos..	78
5.1.2.4 – Desenvolvimento de um método por HPLC para análise das frações... 79	
5.1.2.4.1 - Coleta de frações do sobrenadante de <i>Xac</i> por HPLC semi-preparativo.....	80
5.1.2.4.2 - Coleta de frações e subfrações do sobrenadante de <i>Xac</i> por HPLC analítico.....	81

5.1.2.5 - Crescimento de <i>Xac</i> em meio de cultivo “pobre” em nutrientes (Czapeck modificado).....	85
5.1.2.6 – Aplicação da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de Massas (GC-MS) nas análises das amostras....	87
5.2 - Resultados e Discussões	87
5.2.1 - Análise dos extratos e/ou frações por GC-MS	87
5.2.2 - Identificação do ácido 11-metil-cis-2-dodecenóico por GC-MS.....	92
5.2.3 - Substâncias isoladas e identificadas na cultura de <i>Xac</i>	97
5.2.4 - Determinação estrutural das substâncias isoladas da cultura de <i>Xac</i>	100
5.2.4.1 - Substância 1 – <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	100
5.2.4.1.1 – Configuração relativa da substância 1 – <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	108
5.2.4.2 - Substância 02 – <i>ciclo</i> (Pro-Val).....	112
5.2.4.2.1 – Configuração relativa da substância 2 - <i>ciclo</i> (Pro-Val).....	114
5.2.4.3 - Substância 3 – <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	118
5.2.4.3.1 - Configuração relativa da substância 3 - <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	122
5.2.4.4 - Substância 4 – <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	125
5.2.4.4.1 - Configuração relativa da substância 4 - <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	129
5.2.4.5 - Substância 5 – Quinolina-4-carboxaldeído.....	131
5.2.4.6 - Substância 6 <i>ciclo</i> (Phe-Phe).....	135
5.2.4.7 - Substâncias 7, 8 e 9 – <i>cis</i> -13-docosenamida (7), <i>cis</i> -9-octadecenamida (8), octadecanamida (9).....	140
5.2.4.8 - Substâncias 7 a 9 e 10.1 a 10.8: ácido tetradecanóico (10.1); ácido pentadecanóico (10.2); ácido hexadecanóico (10.3); <i>n</i> -eicosano (10.4); <i>n</i> -heneicosano (10.5); ácido <i>cis</i> -9-octadecenóico (10.6); hexadecanamida (10.7); <i>n</i> -tricosano (10.8).....	149
5.2.4.9 - Substância 11 – uracila.....	151
5.2.5 - Identificação das dicetopiperazinas, <i>ciclo</i> (Pro-Leu), <i>ciclo</i> (Pro-Val), <i>ciclo</i> (Pro-Phe) e <i>ciclo</i> (Phe-Phe), em <i>Xac</i> cultivada em Czapeck sólido por LC-MS.....	154
6 – CONCLUSÃO.....	165
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
8 – APÊNDICES.....	179

1 - Introdução

1.1 - Importância econômica dos citros e da doença cancro cítrico

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, tendo correspondido com cerca de 20,0% (23 milhões de toneladas) da produção mundial entre 2010-2011, seguido pelos Estados Unidos, com 9,0% (FAO, 2011), sendo também responsável por cerca de 84% da exportação de suco de laranja, o qual possui como maior exportador, o estado de São Paulo, seguido por Sergipe, Bahia e Minas Gerais (FIGURA 1.1). No estado de São Paulo, a citricultura gera mais de 400 mil empregos e é responsável pela circulação de R\$ 9 bilhões de reais (BELASQUE et al., 2009). No entanto, a cada ano o número de plantas afetadas por fitopatógenos vem aumentando, pondo em risco empregos e prejudicando a economia do País. As doenças já estabelecidas acarretam maiores gastos de produção, tornando-se parte do manejo da cultura. A introdução ou o surgimento de novas doenças levam a uma quebra da estabilidade das práticas culturais e ocasionam prejuízos no mercado externo em decorrência das barreiras fitossanitárias impostas pelos países como os EUA e a Comunidade Européia (SASSERON, 2008).

Suco de laranja - Exportação

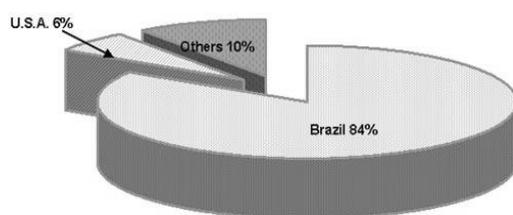


FIGURA 1.1 - Exportação mundial de suco de laranja.

Fonte: <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4343E/y4343e06.htm> e

http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf. Consultado em 08 de Novembro de 2014.

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), classificada em 2005 e 2006 como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006), que provoca sérios problemas na citricultura mundial. A doença teve sua origem na Ásia tropical no século XVII. Evidências convincentes são relatadas por LEE (1918), que encontrou a bactéria em *Fortunela hindsii* (Champ. Ex. Brenth) Swingle, uma espécie de *Citrus* comum no Japão, e no topo das montanhas no sul da China. FAWCETT e JENKINS (1932) observaram lesões do cancro cítrico em espécies de *Citrus medica* L. coletadas na Índia entre 1827-1831, e em espécies de *Citrus aurantifolia* (Chrism. et Panz) coletadas na Indonésia entre 1842-1844. O primeiro relato no continente americano foi em 1910 nos Estados Unidos da América, onde a doença foi introduzida através de mudas trazidas do Japão. No Brasil, foi constatado pela primeira vez em 1957, na região de Presidente Prudente (SP).

Embora tenham sido tomadas medidas para a erradicação da doença, com a criação da Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC), pelo Ministério da Agricultura, em 1975, e do Fundo Paulista de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) em 1977, a doença se disseminou por várias regiões citrícolas e não citrícolas brasileiras, atingindo plantas nos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais e Goiás (LOPES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008). Uma alternativa para redução da quantidade de inóculo da bactéria, muito empregada no Rio Grande do Sul, é o emprego de pulverizações a base de cobre (OLIVEIRA et al., 2008), porém ainda não há meios eficientes para o controle da doença.

Há três tipos distintos de cancro cítrico causado por vários patovares e variantes da bactéria *Xanthomonas axonopodis*. A cancro tipo A, causada pela linhagem asiática *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (classificada recentemente como *Xanthomonas citri* subsp. *citri*) é a mais severa de todas, sendo largamente distribuída no mundo, tendo sido encontrada em mais de 30 países da Ásia, ilhas dos oceanos Índico e Pacífico, Estados Unidos e América do Sul, inclusive no Brasil, primeiramente na região de Presidente Prudente (SP) (GRAHAM et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008). A cancro tipo B ou Sul Americana, causada pela linhagem, *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (classificada recentemente como *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B) é de menor ocorrência no mundo, tendo sido encontrada na Argentina, Paraguai e Uruguai, porém não foi relatada

no Brasil. A cancro tipo C, cancrose ou “cancro do limão galego”, também causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (classificada recentemente como *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C) é raramente encontrada e é específica na limeira ácida ‘Galego’, tendo sido encontrado no Brasil na década de 60 (GRAHAM et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008).

As lesões do cancro cítrico podem ocorrer em folhas, frutos, ramos e raízes, com menor ocorrência para esta última região da planta. Os sintomas nas folhas e frutos são caracterizados por lesão necrótica que penetram na superfície, cercada por uma região oleosa (biofilme) circundada por um halo amarelo característico (BRUNINGS e GABRIEL, 2003) (FIGURA 1.2 a-d). Nos ramos, as lesões são semelhantes aos das folhas com tendência a apresentar coalescência, ou seja, agrupam-se formando lesões de formato irregular e com maior extensão. Como muitas outras doenças bacterianas, o patógeno *X. axonopodis* pv. *citri* penetra nos tecidos do hospedeiro, como em citros, através dos estômatos. A bactéria se multiplica entre 3 a 4 unidades de log por lesão sob condições ótimas, por exemplo, temperaturas entre 20 a 30°C, sendo que as células podem emergir das aberturas dos estômatos em pouco menos de 5 dias, fornecendo o inóculo para posterior desenvolvimento da doença. O ciclo da doença está ilustrado na (FIGURA 1.3)

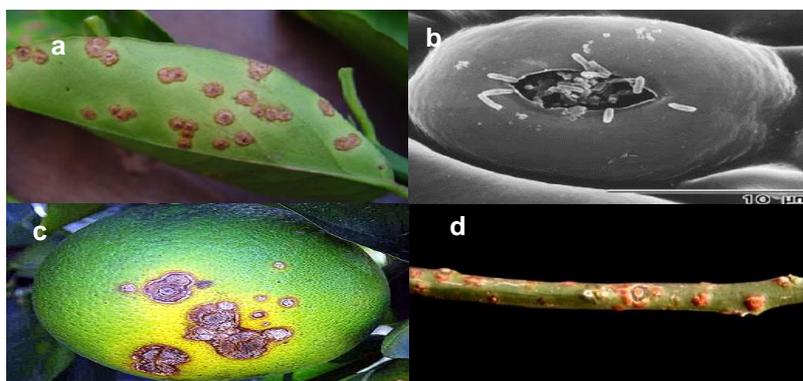


FIGURA 1.2 - Lesão de cancro cítrico em folha (a), frutos (c) e ramos (d) de *Citrus* sp causada por *X. axonopodis* pv. *citri*. Microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folha de grapefruit (*Citrus paradisi*) (b). Fonte: (a) VOJNOV et al., 2010; (b) GRAHAM et al., 2004; (c) http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2005/ju297pag03.html; (d) http://www.ufrgs.br/agrofitossan/galeria/tipos_doencas.asp?id_doenca=303.

Acessos em 16 de novembro de 2012

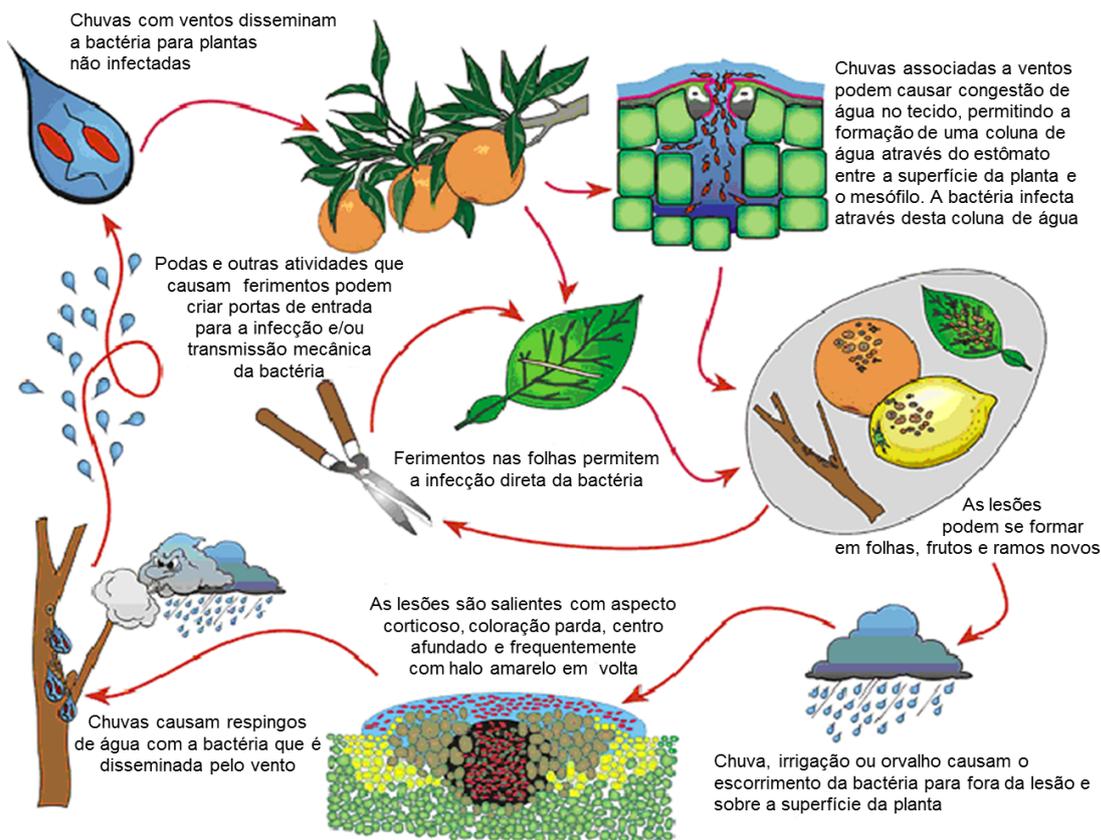


FIGURA 1.3 - Ciclo da doença do cancro cítrico. Adaptada de GOTTWALD, T., 2002.

A disseminação do patógeno ocorre principalmente por meio de três agentes: 1) O próprio homem por meio de roupas ou materiais contaminados; 2) Chuvas com ventos (geralmente com velocidades ≥ 18 mph, ou seja, 29 km/h), às quais são responsáveis pela disseminação em curtas distâncias; 3) A larva minador dos citros, também conhecida como bicho minador (*Phyllocnistis citrella* Stainton), que causa ferimentos nas folhas, por meio das “galerias”, a qual facilita a entrada da bactéria na planta através dos estômatos (FUNDECITRUS, 2008) (FIGURA 1.3 e 1.4).



FIGURA 1.4 - Larva minador dos citros provocando ferimentos em folhas de limão Tahiti por meio de “galerias”. Seta indica larva.

1.2 - *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: Aspectos biológicos

X. axonopodis pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al. [sinonímia *X. campestris* pv. *citri*, Vauterin et al. (1995)] ou *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (reclassificação feita por SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006), é uma espécie de bactéria Gram-negativa, pertencente ao domínio Bactéria, filo Proteobactéria, classe Gammaproteobactéria, ordem Xanthomonadales, família, Xanthomonadaceae e gênero *Xanthomonas* (BRUNINGS e GABRIEL, 2003; GRAHAM et al., 2004). Membros do gênero *Xanthomonas* são caracterizados por estarem associados às plantas, embora nem sempre patogênico, compreendendo 68 famílias e mais de 240 gêneros de plantas, sendo composto por 140 patovares diferentes (HAYWARD, 1993).

X. axonopodis pv. *citri* é um tipo de bactéria baciliforme, aeróbica obrigatória, que apresenta formato de bastonete com presença de um único flagelo polar e não forma esporo (GRAHAM et al., 2004). Esta bactéria sobrevive sob condições ideais em alta umidade e temperatura entre 25 e 30°C (OLIVEIRA et al., 2001), se multiplicando nestas condições (NAMEKATA, 1991). Sob temperaturas inferiores a 12°C e superiores a 50°C, a bactéria mantém-se viva, porém de forma inativa (OLIVEIRA et al., 2008). A bactéria é caracterizada por formar colônias amarelo-alaranjadas de aspecto gorduroso em nutriente ágar (NA), sendo esta uma das características para diagnosticar a presença do micro-organismo na planta (FIGURA 1.5).



FIGURA 1.5 – Aspecto da colônia da bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* após 48 horas de cultivo em meio Nutrient Broth Yeast (NBY,) enriquecido com ágar nutriente.

1.3 - Comunicação celular em bactérias por meio de moléculas sinalizadoras: “*Quorum-sensing molecules*”

Muitas bactérias fitopatogênicas, gram-negativas ou gram-positivas, utilizam sinalização celular, comunicação celular, para regular a expressão de fatores de virulência (aumentar ou diminuir o desenvolvimento dos sintomas de determinadas doenças em plantas).

O processo de comunicação celular bactéria-bactéria denomina-se “*quorum-sensing*”, e este envolve a produção e detecção de moléculas sinalizadoras difusíveis chamadas de autoindutoras. Estas moléculas têm sido referidas como “feromônios bacterianos”, ou seja, elas coordenam o mecanismo de sensoriamento do tamanho de populações de bactérias no ambiente. Em alguns patossistemas, essas moléculas (*quorum-sensing molecules*) atuam somente após um número de bactérias terem se agregado (LAZDUNSKI et al., 2004). Este processo envolve a produção e detecção de moléculas sinalizadoras difusíveis chamadas de autoindutoras às quais após alta densidade celular de bactéria, se ligam à proteína R específica ativando o sistema “*quorum-sensing*” e expressando genes-alvos que, por exemplo, podem estar relacionados ao fator de virulência e à resistência a compostos antimicrobianos (ANTUNES, 2003).

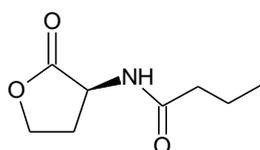
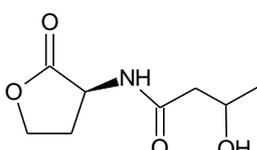
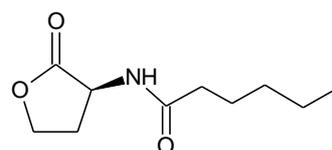
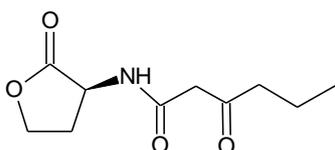
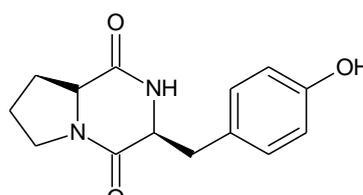
O mecanismo de sensoriamento “*quorum-sensing*” (QS) foi descoberto há mais de 20 anos na bactéria *Vibrio fischeri*, também conhecida como *Photobacterium fischeri*. Este é um exemplo clássico de regulação da expressão gênica por moléculas “*quorum-sensing*” na presença da bioluminescência, através de uma molécula do tipo acil homoserina lactona (AHL), *N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (EBERHARD et al., 1981) (TABELA 1.1 e FIGURA 1.6). As acil homoserina lactonas (AHLs) são compostos de baixo peso molecular produzidos por diversas bactérias gram-negativas e, frequentemente, são as moléculas sinalizadoras neste grupo de bactéria. Estes compostos apresentam o potencial para atuarem na comunicação celular bactéria-bactéria, regulando a expressão gênica responsável por diferentes fenótipos (GRAM et al., 1999; LAZDUNSKI et al., 2004; SHAPIRO et al., 1998). Desde então, as pesquisas envolvendo QS progrediram rapidamente,

principalmente em estudos ao nível molecular e, hoje, é considerado como um sistema geral entre as bactérias Gram-negativas (LAZDUNSKI et al., 2004).

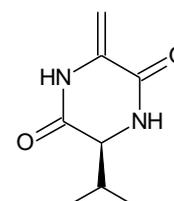
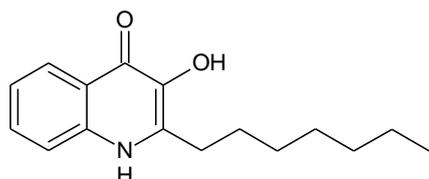
O papel da comunicação intercelular na regulação do comportamento multicelular bacteriano recebeu ampla atenção, e uma variedade de moléculas envolvidas nesta interação foi descoberta. Além das N-acil homoserina lactonas, também foram descobertas a 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (HAQ) e algumas dicetopiperazinas (TABELA 1.1 e FIGURA 1.6). Recentemente, com a utilização da LC/electrospray MS um número maior destas moléculas está sendo descoberto, incluindo principalmente uma série de 2-alquilquinolinas (HAQs), 2-heptil (HHQ) e 2-nonil quinolinas (HNQs). Estudos relatam que 2-heptilquinolinas (HHQ) e 2-heptilquinolonas funcionam como um mensageiro intercelular, participando na comunicação de célula para célula, coordenando a população das comunidades bacterianas (PESCI et al., 1999; MICHAEL, 2005) (TABELA 1.1 e FIGURA 1.6). Este fato fez com que muitos alcalóides do tipo 2-alquilquinolina e 2-alquil-4-quinolonas recebessem os nomes triviais de "Pseudans", por causa da ocorrência destes em bactérias do gênero *Pseudomonas* (MICHAEL, 1997). As dicetopiperazinas *ciclo* (L-Pro-L-Phe), *ciclo* (L-Pro-L-Tyr), *ciclo* (Δ -Ala-L-Val) e *ciclo* (L-Pro-L-Leu) foram descritas por participarem no "quorum-sensing" em diversos micro-organismos (BORTHWICK, 2012; HOLDEN et al., 1999), sendo que as três primeiras também ativaram ou antagonizaram sistemas baseados em LuxR. Assim, a comunicação célula-célula não está restringida somente às acil homoserina lactonas.

TABELA 1.1 - Moléculas sinalizadoras isoladas e/ou identificadas em bactérias gram-negativas.

Metabólito	Espécie de bactéria	Classe de composto	Referências
<i>N</i> -butanoil-L-homoserina lactona	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lactona	Ochsner et al., 1994
<i>N</i> -(3-hidroxi-butanoil)-L-homoserina lactona	<i>Vibrio harveyi</i>	Lactona	Bassler et al., 1993
<i>N</i> -hexanoil-L-homoserina lactona	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Lactona	Pierson et al., 1994
<i>N</i> -(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona	<i>Vibrio fisheri</i>	Lactona	Eberhard, 1981
ciclo (L-Pro-L-Tyr)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dicetopiperazina	Holden et al., 1999
ciclo (Δ -Ala-L-Val)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dicetopiperazina	Holden et al., 1999
2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcalóide	Pesci et al., 1999
ácido 11-metil- <i>cis</i> -2-dodecenóico	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Ácido graxo	Wang et al., 2004

*N*-butanoil-L-homoserina lactona*N*-(3-hidroxi-butanoil)-L-homoserina lactona*N*-hexanoil-L-homoserina lactona*N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona

ciclo (L-Pro-L-Tyr)

ciclo (Δ -Ala-L-Val)

2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona

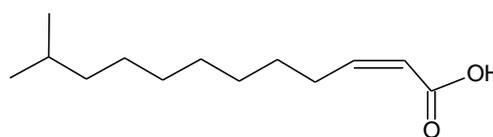
ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico

FIGURA 1.6 - Estrutura química de algumas moléculas sinalizadoras isoladas de bactérias gram-negativas.

O sistema Lux de *Vibrio fischeri* é amplamente distribuído entre as bactérias gram-negativas. Os principais componentes desse sistema são LuxI, uma enzima responsável pela produção do autoindutor *N*-acil homoserina lactona (acil-HSL) e LuxR, um regulador transcricional sensível aos níveis de acil-HSL. Embora baixos níveis de acil-HSLs tenham sido detectados em alguns isolados de *Xanthomonas* spp. (CHA et al., 1998), até o momento, não se conhece genes que codificam para homólogos LuxI em qualquer espécie de *Xanthomonas*.

O “*quorum-sensing*” no patógeno *X. campestris* pv. *campestris* é mediado por dois diferentes autoindutores: (i) DF (fator difusível), uma butirólactona ainda não caracterizada, a qual controla a produção de pigmentos xanthomonadinas e polissacarídeos extracelulares (EPS) (POPLAWSKY et al., 2005); (ii) DSF (fator de sinal difusível), caracterizado como ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico (WANG et al., 2004) (TABELA 1.1 e FIGURA 1.6), o qual contribui para controlar a produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) (goma xanthana), como também é responsável por coordenar a síntese de enzimas extracelulares (incluindo proteases, pectinases e celulases) (TANG et al., 1991; BARBER et al., 1997; SLATER et al., 2000).

1.3.1 - Sistema de secreção em bactérias e fatores de sinais difusíveis (DSF): Influência no processo de fitopatogenicidade

Os sistemas de secreção de proteínas são os mecanismos pelos quais as bactérias translocam estas através das membranas celulares. Em bactérias Gram-negativas, a classificação depende da natureza molecular e funcionalidade e são classificados em tipos: SSTI, SSTII, SSTIII, SSTIV, SSTV e SSTVI (GONZÁLEZ-PEDRAJO, 2003). O tipo de secreção mais importante para as bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* é o sistema de secreção tipo II (SSTII). Em *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) esse sistema é responsável pela secreção de endoglucanases, alfa amilases e poligalacturonato liases (HU et al., 1992).

Há dois agrupamentos gênicos para o SSTII, em *Xac* (*xps* e *xcs*), que possuem um alto grau de homologia com *xps* e *xcs* de *X. campestris* pv. *campestris*, indicando que os mesmos são ortólogos, ou seja, apresentam as

mesmas origens e desempenham as mesmas funções (JHA et al., 2005). Esses genes são importantes durante a interação do patógeno com a planta, pois mutações nos agrupamentos *xps* de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* e *Xac*, causaram redução de patogenicidade destas bactérias quando inoculadas em plantas hospedeiras (HU et al., 1992; SUVENDRA et al., 2000; QIAN et al., 2005; BAPTISTA et al., 2006). Um estudo realizado por HOMEM (2008) mostrou que o sistema *xcs* aparentemente está mais envolvido no processo inicial de adesão e o *xps* na maturação do biofilme em *X. axonopodis* pv. *citri*, porém os dois sistemas, em conjunto, são necessários para a formação de biofilme estruturado. O sistema *xcs* também não se mostrou funcional para secreção de enzimas hidrolíticas degradadoras de amido, carboximetilcelulose (CMC) e proteína. Além dos sistemas de secreção, o sistema de transdução de sinal compreendido pelo domínio HD-GYP regulado pela proteína RpfG e pelo sensor cognato RpfC, também são responsáveis pelo mecanismo de patogenicidade em *Xcc*. O domínio HD-GYP de RpfG é uma fosfodiesterase di-GMP cíclica que degrada um segundo mensageiro intracelular, bis-(3'-5')-monofostado de guanina dimerica cíclica ("cyclic di-GMP"), envolvido na regulação de processos bacterianos como produção de biofilme, virulência e mobilidade (RYAN et al., 2006). Em *Xac*, o domínio fosfodiesterase HD-GYP de RpfG interage diretamente com ciclase de diguanilato no domínio GGDEF, contendo proteínas codificadas pelo genoma desta bactéria.

A degradação da parede celular de plantas, que consiste principalmente da hidrólise enzimática de celulose e pectina, é um mecanismo essencial para a virulência de vários fitopatógenos, incluindo alguns do gênero *Xanthomonas*. *X. campestris* pv. *campestris* causa destruição do tecido vegetal da planta devido à degradação da parede celular por meio de enzimas extracelulares como endoglucanase, proteases e pectinases, às quais, quase sempre, estão associadas aos compostos sinalizadores (BARBER et al., 1997; SLATER et al., 2000; WANG et al., 2004).

Entre os diversos compostos sinalizadores que fazem parte do processo de infecção nas plantas por meio do "*quorum-sensing*", a nova "família" classificada como fator de sinal difusível (do inglês diffusible signal factor, DFS) merece atenção, pois evidências mostram que a sinalização por meio de DSF é amplamente difundida em bactérias (FIGURA 1.7) (BARBER et al., 1997; WAN et

al., 2004; HE et al., 2008; DENG et al., 2011; RYAN & MAXWELL, 2011). Esses compostos são ácidos graxos específicos que contribuem para a comunicação das bactérias fitopatogênicas por indução de produção de protease e endoglucanase, às quais degradam a parede celular da planta durante o processo de patogenicidade (WANG et al., 2004; DENG et al., 2011). Merece atenção também o éster de ácido graxo 3-hidroxi-hexadecanoato de metila (ou comumente nomeado como ácido 3-hidroxipalmitato de metila), uma molécula sinalizadora isolada do sobrenadante do meio de cultivo de *Ralstonia solanacearum* por hidrodestilação, seguida de partição líquido-líquido com diclorometano (CH_2Cl_2) e fracionamento em cartuchos contendo sílica (FLAVIER et al., 1997).

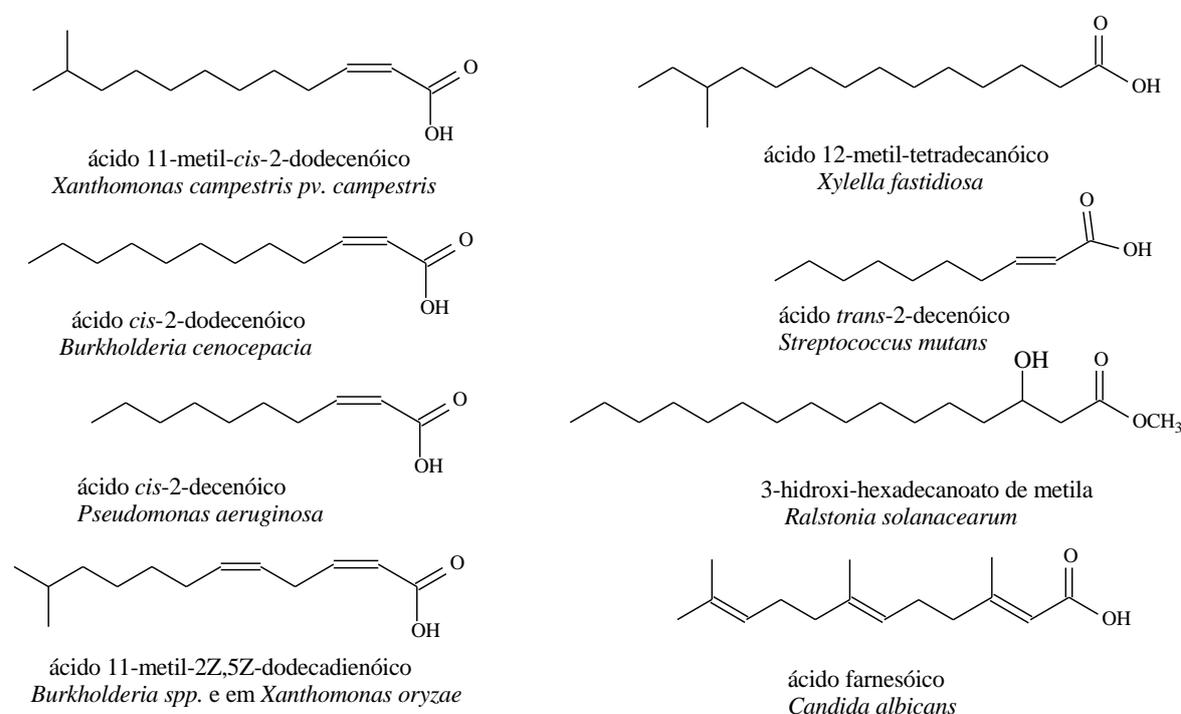


FIGURA 1.7 - Estrutura química de moléculas sinalizadoras da família DSF relacionado a uma variedade de bactérias e a levedura *Candida albicans*. Fonte: Ryan, R. P. & Maxwell, D.J. *Trends in Microbiology*. 19: (3), 145-152. 2011.

A atividade de DSF foi primeiramente relatada há aproximadamente uma década pelo grupo de M. J. Daniels ao analisar um cluster de gene designado como *rpf* ("regulation of pathogenicity factors"), o qual foi responsável pela regulação dos fatores de patogenicidade (BARBER et al., 1997). O grupo

descobriu que a atividade de protease e endoglucanase de um mutante *rpfF* (bactéria sem o gene *rpfF*) poderia ser restaurada quando este era cultivado próximo à cepa “parental” tipo selvagem (sem mutação) de *X. campestris* pv. *campestris* (BARBER et al., 1997). Este resultado revelou que o tipo selvagem de *Xcc* poderia produzir um sinal de fator difusível (DSF), o qual era capaz de induzir a produção de protease e endoglucanase e que a enzima codificada pelo gene *rpfF*, ou seja RpfF, estava associada à biossíntese de DSF.

Atualmente, existem principalmente dois métodos, baseados em biossensores, para detectar a atividade de DSF: **(i)** O primeiro subdivide-se em dois tipos, sendo um bioensaio baseado na protease e outro baseado na atividade de endoglucanase. O primeiro tipo de bioensaio, baseado na atividade de protease para detecção da atividade de DSF, usa uma placa de ágar contendo leite desnatado, onde a produção de proteases extracelulares induzida por DSF, nas cepas *Xcc*, é indicada por um halo claro em volta da colônia bacteriana. O outro bioensaio, necessário para detecção da atividade de endoglucanase, usa uma placa de ágar suplementado com carboximetilcelulose (CMC). A zona da hidrólise de CMC por endoglucanases torna-se visível (halo claro) após desenvolver a placa com solução do corante 0,1% (peso/volume) de vermelho de Congo seguida por lavagem com 1 M NaCl (BARBER et al., 1997; SICILIANO et al., 2006; HOMEM, 2008). Este tipo de bioensaio é baseado na habilidade de DSF's restaurar a produção de endoglucanase ao *rpfF* mutante; **(ii)** O segundo bioensaio é baseado na engenharia genética de biossensores de DSF. Tipicamente, o “promoter” *engXCA* de um “operon” induzível de DSF (o qual codifica uma endoglucanase, ou seja, é o gene responsável pela síntese desta enzima receptora, que também é uma proteína, capaz de “interagir” ao DSF exógeno) é fundido com um “reporter promoterless” contendo o gene *gusA* (geralmente extraído da bactéria *Escherichia coli*) o qual codifica β -glucuronidase (GUS) (enzima capaz de degradar o reagente X-Gluc), então o “cassette” *PengXCA-gusA* é clonada em uma ampla gama de vetor hospedeiro, e o plasmídeo resultante é mobilizado a um mutante de *Xcc* que não produz DSF (o mutante sem o gene *rpfF*) para gerar o biossensor DSF (SLATER et al., 2000; WANG et al., 2004; DENG et al., 2011; RYAN & MAXWELL, 2011). A atividade de DSF é indicada por um halo azul, em volta da colônia teste ou extrato com DSF, em uma placa de ágar contendo o reagente 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-

glucupiranosídeo (X-Gluc) e as células bacterianas do biossensor DSF. Em outras palavras, o mutante *rpfF* o qual, no biossensor, foi mobilizado ao plasmídeo resultante, é incapaz de produzir a substância sinalizadora pela supressão do gene que codifica a enzima RpfF (enzima-chave para produção de sinais DSF). A fusão entre o “promoter” *engXCA* e o “reporter promoterless” *gusA* permite a síntese de endoglucanase capaz de “interagir” com DSF exógeno. Esta “interação”, ou complexo formado, regula positivamente a expressão do gene *gusA* responsável pela síntese de β -glucuronidase (GUS), capaz de degradar o reagente 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucupiranosídeo (X-Gluc) adicionado à placa de ágar. Assim, observa-se uma coloração azul “na placa” caso exista algum DSF em concentração suficiente para ativar o biossensor (FIGURA 1.8).

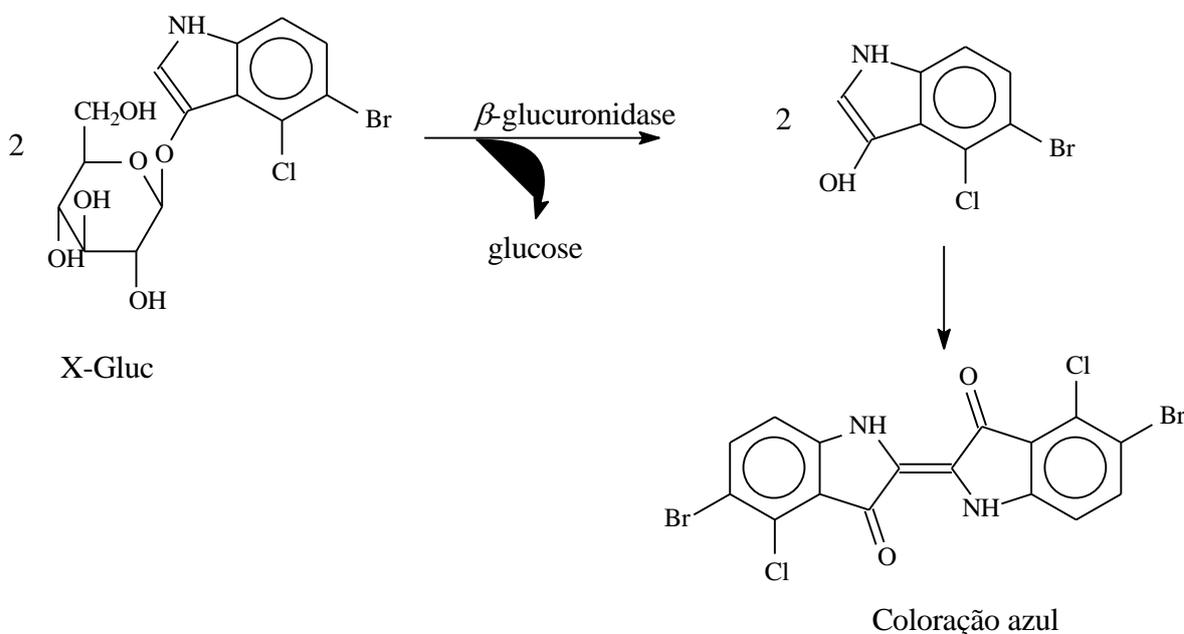


FIGURA 1.8 – Reação de degradação do reagente X-Gluc e formação do derivado de índigo de coloração azul por ação da enzima β -glucuronidase. Adaptada de BERG et al., 2002.

Outro biossensor DSF tem sido construído usando o “promoter” *engXCA* e um “promoterless” contendo o gene *gfp* (na qual codifica ‘green fluorescent protein’) (NEWMAN et al., 2004; CHATTERJEE et al., 2008) para detectar DSF em *Xylella fastidiosa* e *X. axonopodis* pv. *glycines* (NEWMAN et al., 2004; CHATTERJEE et al., 2008; THOWTHAMPITAK et al., 2008).

O sequenciamento do genoma de *Xac* mostrou ser muito parecido com o genoma de *Xcc*, compartilhando uma similaridade > 80%. No genoma de *Xac*, há um locus *rpf* [o qual, em *Xcc*, é composto por nove genes *rpf* (*rpfA-I*)], contendo *rpfF*, *rpfC*, *rpfG*, o qual compartilha ~54 – 96% na identidade dos aminoácidos com seus homólogos em *Xcc*, porém os genes *rpfH* e *rpfI* estão ausentes em *Xac* (Da SILVA et al., 2002). Assim como em *Xcc*, RpfF é a enzima-chave para produção de sinal DSF, bem como a deleção do gene *rpfF* bloqueou a capacidade de *Xac* biossintetizar DSF (Da SILVA et al., 2002; SICILIANO et al., 2006). Curiosamente, enquanto o homólogo RpfC de *Xac* compartilham somente ~58% de aminoácidos idênticos com RpfC de *Xcc*, seu possível regulador de resposta “cognato” RpfG contém > 96% de aminoácidos idênticos com seu equivalente em *Xcc*. Entretanto, estudos mostram que as proteínas RpfC/RpfG de *Xac* carregam uma arquitetura no domínio idêntica à RpfC/RpfG de *Xcc* (ANDRADE et al., 2006).

Tendo em vista as altas similaridades entre sequenciamento do genoma de *Xac* e *Xcc*, provavelmente o sistema de sinalização (*quorum-sensing*) em *Xac* também pode ser mediado por DSF. Extratos bruto contendo DSF de *Xac* restauraram os fenótipos do mutante *Xcc rpfF*, e a deleção dos genes *rpfF* (o qual bloqueia a biossíntese de DSF) e *rpfC* (o qual induz a bactéria produzir DSF em excesso) atenuou a habilidade de *Xac* causar os sintomas do cancro cítrico em folhas de limão (*Citrus limon*) (SICILIANO et al., 2006). Entretanto, um possível composto sinalizador da “classe” DSF ou de outras classes de *Xac* nunca foi purificado e/ou caracterizado. Como ainda não há certeza absoluta de que ácido graxo é um sinalizador em *Xac*, também é importante identificar, isolar e/ou caracterizar outros compostos sinalizadores já conhecidos em outras bactérias, bem como conhecer outros metabólitos secundários produzidos por esta bactéria para futuramente se buscar métodos eficientes de controle do cancro cítrico.

Um dos principais métodos de controle da doença seria por meio da atenuação do fator de virulência, por meio do processo conhecido como *anti-quorum sensing* ou *quorum-quenching*, ou seja, bloqueando a rota biossintética das moléculas sinalizadoras por modificação de genes que codificam para a síntese desses compostos ou mesmo administrando “reagentes” que fazem a degradação das moléculas sinalizadoras. Uma alternativa seria utilizar plantas modificadas geneticamente para produzir um composto com potente atividade

antimicrobiana frente ao fitopatógeno. Outra maneira seria utilizar a técnica conhecida como indução de resistência, inserindo, na planta, micro-organismos inofensivos com o intuito de induzi-la a produzir metabólitos resistentes à presença da bactéria fitopatogênica por meio, principalmente, de um mecanismo de defesa.

1.4 - Perfil químico de compostos voláteis e macromoléculas no diagnóstico de doenças agrícolas de plantas

1.4.1 - Mecanismo de defesa da planta e espectrometria de massas para detecção

As plantas são cercadas por um enorme número de inimigos em potencial, agentes fitopatogênicos, como bactérias, fungos, vírus, nematóides e insetos. Elas também são expostas a vários tipos de estresse ambiental, os quais podem facilitar a entrada desses fitopatogênicos. Quando isto ocorre, a planta geralmente tenta se defender do “invasor” sintetizando ou aumentando a concentração de uma grande variedade de compostos, já que não podem contar com a mobilidade física para escapar de seus predadores (AMORIN et al., 2011; GOODMAN et al., 1986). Existem vários outros modos de defesa que incluem a construção de barreiras poliméricas para dificultar a penetração do patógeno, e a síntese de enzimas que degradam a parede celular do invasor (AMORIN et al., 2011; HAMMOND e JONES, 2000). A ativação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de uma cascata de sinais que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor com a expressão de genes específicos e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo (AMORIN et al., 2011; SCHALLER e RYAN, 1996).

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

Os mecanismos estruturais constituem-se barreiras físicas à penetração ou colonização do patógeno, os quais podem ser constitutivos (pré-formados) ou induzidos (pós-formados). O mecanismo estrutural constitutivo refere-se a estruturas produzidas pelas plantas independentes da ação de

patógenos, tendo diversas funções na planta além da resistência. Neste grupo pode-se citar a presença de cutícula, forma e número de estômatos, vasos condutores de seiva, entre outros. No mecanismo estrutural induzido a expressão é desencadeada após o início das atividades do patógeno na superfície do hospedeiro. Estes mecanismos podem formar halos, papilas ou lignificação que são barreiras celulares.

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

Os metabólitos secundários de defesa, como alguns descritos na FIGURA 1.9, representam barreiras químicas ao ataque microbiano, e são compostos de baixa massa molecular que podem ser divididos em fitoanticipinas (constitutivos) ou fitoalexina (induzidos). Fitoanticipinas são compostos pré-existent na planta que aumentam em concentração após o contato com o micro-organismo (por exemplo, bactérias ou fungos). Fitoalexinas são substâncias produzidas pela planta nas regiões individuais e na sua vizinhança imediata para ajudar a limitar a propagação de patógenos invasores, não sendo observáveis antes da infecção (GRAYER e HARBORNE, 1994; VANETTEN et al, 1989). Este é um mecanismo comum de resistência à patógenos em uma vasta gama de plantas (BAILEY e MANSFIELD, 1982; DARVILL e ALBERSHEIM, 1984; GRAYER e HARBORNE, 1994; VANETTEN et al., 1989).

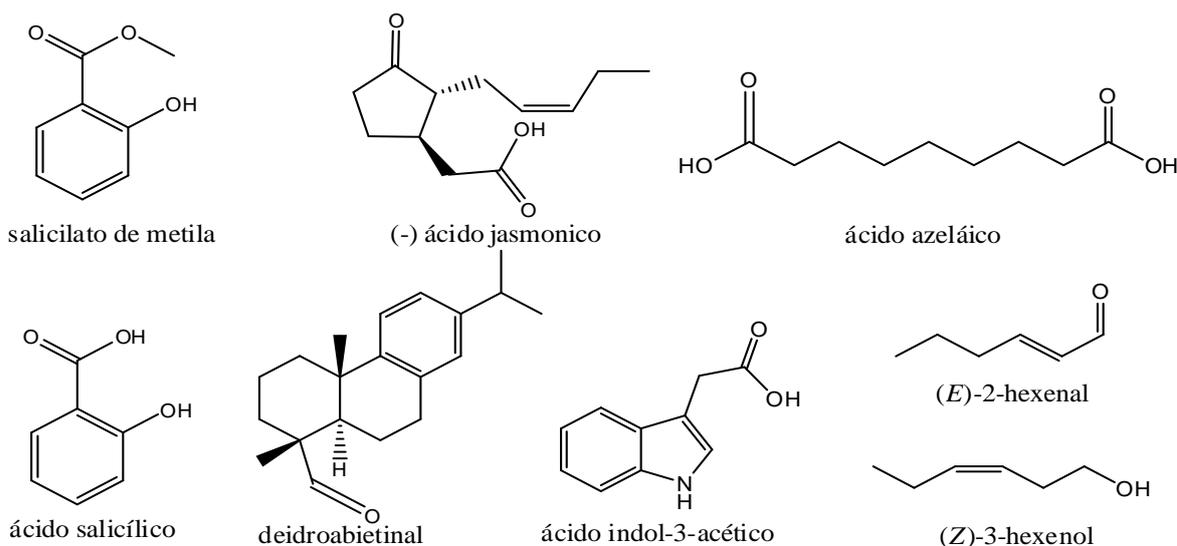


FIGURA 1.9 - Alguns metabólitos secundários produzidos por plantas em resposta à presença de micro-organismos. Adaptado de SHAN, 2009.

Uma forma de se detectar a presença de proteínas ou macromoléculas produzidas pelo mecanismo de defesa da planta ou por uma interação planta-patógeno pode ser realizada por meio da espectrometria de massas, utilizando, por exemplo, ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador tempo de voo (MALDI-TOF/MS). Esta técnica vem sendo utilizada na medicina humana para diagnosticar diversas doenças causadas por fungos e bactérias (DEMIREV & FENSELAU, 2008; STUMP et al., 2005) e na agricultura também pode ser um excelente meio para diagnóstico de fitopatogênias, devido ao baixo custo das análises em larga escala, rapidez para a aquisição dos dados e para a extração dos compostos de interesse. A análise e identificação de micromoléculas (até 1000 Da) por MALDI-TOF é pouco empregada devido, principalmente, à interferência das matrizes comumente usadas, porém em trabalho recente foi relatado a identificação de compostos de baixo peso molecular por MALDI-TOF imagem (MALDI-MSI) (LOPES et al., 2013). Alternativamente, é utilizado líquido iônicos para facilitar a ionização e análise dessa classe de compostos.

Se as substâncias são voláteis ou semi-voláteis, as mesmas podem ser detectadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Estas técnicas também podem ser utilizadas como ferramentas para detectar a presença do micro-organismo na planta, podendo servir como meio de diagnóstico de doenças.

1.4.2 - Técnicas para o diagnóstico do cancro cítrico

A identificação inicial da doença do cancro cítrico é realizada baseando-se nos sintomas visuais das lesões causadas pela bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) nos órgãos da planta. Outros métodos também podem ser aplicados, como por exemplo: a) fluxo bacteriano, o qual permite verificar um fluxo da bactéria, em microscópio óptico, que migra do meio menos aquoso para o meio mais aquoso; b) por isolamento de Xac de plantas infectadas, o qual após crescimento é observado colônias amarelas características da bactéria; c) por inoculação da bactéria na planta com o intuito de se observar os sintomas após 45 dias, aproximadamente. Esses métodos geralmente não são precisos e gastam-se muito tempo para serem realizados. Atualmente, a técnica PCR (Reação de Polimerase em Cadeia, o qual é baseada na seleção de Primers contendo genes da região 16S rRNA) é a mais utilizada e confiável para o diagnóstico da doença, pois ela permite uma identificação precisa da bactéria (CUBERO et al., 2002; HARTUNG et al., 1993), porém as plantas podem conter alguns compostos naturais que inibem a amplificação dos ácidos nucleicos (CUBERO et al., 2001; WILSON, 1997), podendo gerar um resultado falso-negativo no diagnóstico da doença. Além disso, o PCR é um processo demorado, pois muitas vezes há exigência de extração do DNA do micro-organismo, e caro para ser utilizado em análises de rotina.

1.4.3 - Técnicas para diagnóstico de doenças agrícolas por meio do perfil químico dos voláteis liberados pelas plantas

A identificação de algumas substâncias voláteis produzidas pelas plantas ou pelos micro-organismos associados às plantas pode ser extremamente útil na detecção e diagnóstico de diversas doenças causadas por fungos, bactérias, entre outros organismos fitopatogênicos, porque muitas plantas quando

infectadas emitem estas substâncias como mecanismo de defesa ou mesmo por interação do patógeno com alguns órgãos da planta. Além disso, geralmente os micro-organismos sintetizam substâncias tóxicas específicas quando associados aos seus diversos hospedeiros. A técnica de “*headspace*” dinâmico e HS-SPME (Microextração em fase sólida no modo “*headspace*”) associadas à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) pode ser extremamente útil para o diagnóstico de diversas doenças agrícolas de plantas, antes mesmo dos sintomas aparecerem.

O diagnóstico de doenças por meio da análise das substâncias voláteis já foi utilizado por alguns autores, entre os quais pode-se destacar MOALEMIYAN e KUSHALAPPA, 2007, que têm detectado e diferenciado as doenças fúngicas antracnose e podridão peduncular em frutos de manga por GC-MS. WORNKITKUL et al., 2008 empregaram a técnicas de sensoriamento eletrônico utilizando um nariz eletrônico e GC-MS para monitorar os voláteis produzidos por folhas de pepino, pimentão e tomate, quando infectados por doenças fúngicas e atacados por algumas pragas agrícolas. Recentemente, HANTÃO et al., 2013a utilizaram HS-SPME/GC-MS para determinar alguns biomarcadores voláteis em *Eucalyptus globulus* infectada com o fungo *Teratosphaeria Nubilosa*. Além disso, os autores diferenciaram híbridos susceptível e resistentes de *Eucalyptus* à doença ferrugem fúngica (*Puccinia psidii*) também utilizando HS-SPME/GC-MS (HANTÃO et al., 2013b).

Há poucos trabalhos realizados com o objetivo de se identificar doenças bacterianas em plantas utilizando o monitoramento dos voláteis. ZHANG et al., 2005, utilizaram a extração em fase sólida (SPME) e “*headspace*” dinâmico associadas ao GC-MS em folhas de toranja, *Citrus paradisi* MacFadyen Hook, infectadas com *X. axonopodis* pv. *citri*. Estes autores mostraram que folhas de toranja infectadas por *X. axonopodis* pv. *citri* produziram um composto volátil, fenilacetaldéido-O-metil-oxima, o qual não estava presente em folhas saudáveis, porém os autores não fizeram a quantificação deste volátil, e nem mesmo fizeram o estudo em outras espécies de *Citrus*, como a laranjeira Pêra, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

1.4.3.1 - Processo de extração de voláteis por SPME e SPE associadas à GC-MS

As técnicas de amostragem de voláteis mais empregadas utilizam pouco ou nenhum solvente orgânico, assim como, também não é necessário o uso de altas temperaturas (NOGUEIRA, 2002), reduzindo dessa forma, a possibilidade de degradação de algumas substâncias comparado ao método de extração convencional, hidrodestilação. Como qualquer outro método de amostragem, dependem da partição entre os analitos da matriz e uma fase extratora que pode ser um gás, um líquido ou um adsorvente.

Entre essas técnicas, as duas principais metodologias são: Microextração em fase sólida e a extração em fase sólida voltada para compostos voláteis.

A microextração em fase sólida pode ser realizada no modo direto (DI-SPME) ou no modo “*headspace*” (HS-SPME) (FIGURA 1.10) e em ambas é utilizado uma fibra revestida por fases de diferentes polaridades. Os principais revestimentos disponíveis comercialmente são: polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVD), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB) e poliacrilato (PA). O uso do tipo de revestimento da fibra depende da aplicação, assim como das características dos voláteis que são adsorvidos ou absorvidos pela fase da fibra. O equilíbrio é controlado pelo coeficiente de partição dos solutos entre três fases (headspace, matriz da amostra e revestimento da fibra) (OCHIAI et al., 2012).



FIGURA 1.10 - Sistema para extração de voláteis por HS-SPME.

A extração em fase sólida (SPE) voltada para isolamento de compostos voláteis utiliza materiais adsorventes (em geral polímeros polorosos)

em cartuchos de vidro e é classificada como “*headspace*” estático (SHS) e “*headspace*” dinâmico (DHS).

“*Headspace*” estático (SHS) é o caminho mais simples para avaliar a composição química de um aroma, no entanto, devido os compostos voláteis estarem presentes em concentrações muito baixas, muitas vezes torna-se inviável a aplicação desta técnica. Todavia quando instrumentos com baixos limite de detecção são utilizados e dependendo da concentração do analíto, o “*headspace*” estático pode ser utilizado. Nesta técnica, a amostra é fechada em um recipiente, onde o equilíbrio é atingido entre o “*headspace*” e a fase extratora a uma temperatura predeterminada sem passagem de fluxo de ar (FIGURA 1.11). Os voláteis presentes no material adsorvente são eluídos termicamente ou com poucos microlitros de solventes e analisados em cromatógrafo gasoso (AGELOPOLUS e PICKETT, 1998).

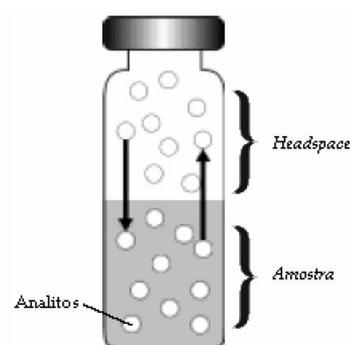


FIGURA 1.11 - Sistema para extração de voláteis por “*headspace*” estático.

Na técnica de extração de voláteis por “*headspace*” dinâmico (DHS) (FIGURA 1.12), através da passagem de um fluxo de ar os compostos ficam adsorvidos, geralmente em polímeros porosos, os quais são posteriormente dessorvidos termicamente no cromatógrafo ou eluído com solventes orgânicos adequados. Não há o estabelecimento de um estado de equilíbrio, fazendo com que a maioria dos compostos voláteis dispersos na matriz deixe a amostra e passe para o “*headspace*”. O processo físico de adsorção é baseado em atrações eletrostáticas entre os grupos funcionais da superfície dos adsorventes e os das moléculas dos constituintes adsorvidos. Os principais materiais adsorventes utilizados são os polímeros porosos, nos quais podemos destacar o Tenax TA, Poli (óxido de 2,6-difenilfenileno), e Porapak Q®, etilvinilbenzeno-divinilbenzeno, um polímero sem quantidade significativa de água, com superfícies inertes a

algumas moléculas como terpenos e com área superficial de aproximadamente $550 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (HARPER, 2000; NOGUEIRA, 2002). As condições ótimas de coleta dos compostos voláteis são fortemente dependentes da velocidade do gás de arraste e da seletividade do processo de adsorção e dessorção (ZHEN, 2005).

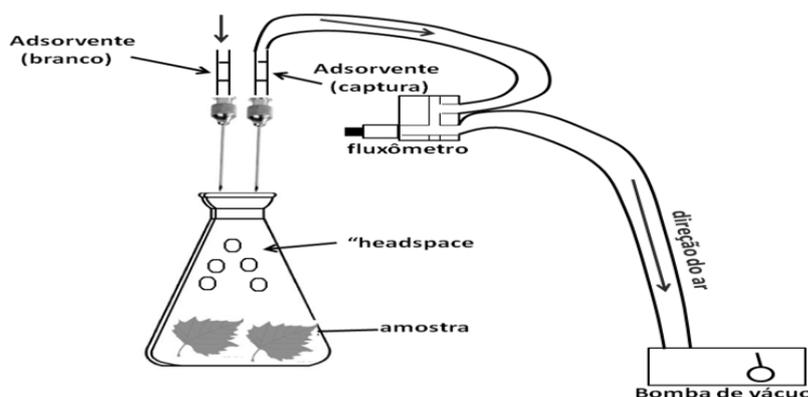


FIGURA 1.12 - Sistema de extração por “*headspace*” dinâmico.

A cromatografia gasosa é uma das técnicas mais utilizadas em análises qualitativas e quantitativas. Hoje é a técnica mais utilizada para análise da composição química de compostos voláteis, devido a sua alta sensibilidade, rapidez na análise, boa precisão quantitativa e alto poder de resolução. Nesta técnica os componentes de uma amostra, volatilizáveis e termicamente estáveis, são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte (He , H_2 ou N_2) que não interage com as moléculas do analito, pois sua função é apenas transportar o analito através da coluna (SKOOG et al., 2002). As colunas capilares empregadas atualmente propiciam um poder de resolução mais satisfatório para misturas complexas como em óleos essenciais, pois são feitas de sílica fundida, o que garante uma maior eficiência, inércia e longevidade quando comparada às antigas colunas de vidro. Para aplicações mais gerais, as melhores fases são os dimetilsiloxanos (DB-1 ou equivalente) e as 5% fenil 95% dimetilsiloxano (DB-5 ou equivalente), ou seja, pouco polares.

Quando a técnica de cromatografia gasosa é utilizada de forma hifenizada, a espectrometria de massas é a mais aplicada para identificação de compostos voláteis, podendo também ser utilizada para quantificação. Os

compostos passam pelo cromatógrafo gasoso e quando chegam ao espectrômetro de massas são geralmente ionizados por impacto de elétrons, que consiste de bombardeamento de um feixe de elétrons (normalmente 70 eV), provocando ionização e quebra em muitos fragmentos da molécula original. Alguns dos fragmentos possuem carga positiva ou negativa, os quais são detectados no analisador de massas através de sua razão massa/carga (m/z). Os sinais gerados (fragmentos de massas) chegam ao detector (geralmente um multiplicador de elétrons) onde são amplificados e posteriormente são registrados na forma de espectro de massas.

2 - Justificativas

Embora o sequenciamento do genoma de *Xac* tenha sido concluído (Da silva et al., 2002), ainda não há medidas de controle satisfatórias que possam ser recomendadas para esse patossistema, sendo a única maneira de eliminar a doença por meio da erradicação das plantas contaminadas e suspeitas (FUNDECITRUS, 2008).

Uma alternativa para a inibição do crescimento desta bactéria pode ser a atenuação da produção do fator de virulência por meio do processo conhecido como *anti-quorum sensing* ou *quorum-quenching*, ou seja, bloqueando a rota biossintética das moléculas sinalizadoras por modificação de genes que codificam para a síntese desses compostos ou mesmo administrando “reagentes” que fazem a degradação das moléculas sinalizadoras. Como uma molécula sinalizadora nunca foi isolada ou identificada em *Xac*, um estudo químico da bactéria buscando isolar e/ou identificar compostos possivelmente relacionada à comunicação bacteriana pode contribuir para a compreensão do fator de virulência e, conseqüentemente, do controle da doença. Ou seja, o estudo químico desta bactéria fornecerá possíveis estratégias para o controle do cancro cítrico.

Além disso, há uma necessidade na busca por novos métodos fáceis e rápidos para a diagnose da doença, antes mesmo dos sintomas aparecerem, pois as plantas podem, por exemplo, conter alguns compostos naturais que inibem a amplificação dos ácidos nucléicos na PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) (WILSON, 1997), podendo gerar um resultado falso-negativo. Dessa forma, o estudo do perfil químico de *Citrus sinensis*, após a inoculação com *X. axonopodis* pv. *citri*, utilizando as técnicas HS-SPME e “*headspace*” dinâmico associadas à GC-MS e a técnica MALDI-TOF/MS fornecerá possíveis estratégias para o controle do cancro cítrico, por meio, principalmente, da busca de biomarcadores químicos (voláteis, semi-voláteis ou macromoléculas) que indiquem a presença da bactéria na planta.

3 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral: Realizar o estudo químico de *X. axonopodis* pv. *citri* e desenvolver uma metodologia econômica, fácil e rápida para a identificação do cancro cítrico.

3.2 - Objetivos Específicos

1. Inocular a bactéria selvagem, isolado *Xac* 306, em plantas de laranjeira Pêra, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck;
2. Identificar biomarcadores químicos voláteis e/ou semivoláteis presentes em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com sintomas e antes do início dos sintomas do cancro cítrico por HS-SPME e “*headspace*” dinâmico associadas à GC-MS;
3. Diferenciar estatisticamente folhas de laranjeira Pêra sadias de folhas sintomáticas com cancro cítrico por MALDI-TOF/MS;
4. Realizar o estudo químico de *Xac* 306 por métodos usuais de isolamento e separação cromatográfica;
5. Elucidar as estruturas dos compostos isolados do cultivo de *Xac* 306 através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas: Espectrometria de Massas, Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (1D e 2D), dentre outros.

4 – Parte 1: Busca de biomarcadores voláteis e macromoléculas em *C. sinensis* (L.) Osbeck sadia e inoculada com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

4.1 - Perfil químico de voláteis em *C. sinensis* (L.) Osbeck sadia e inoculada com *X. axonopodis* pv. *citri* por HS-SPME e “*headspace*” dinâmico-GC-MS

Esta subparte do trabalho leva a busca de biomarcadores voláteis em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sadia e inoculada com a linhagem selvagem *Xac* 306 por HS-SPME e “*headspace*” dinâmico associados à GC-MS, assim como, também determina o perfil de macromoléculas na mesma planta por MALDI-TOF/MS.

4.1.1 - Procedimentos experimentais

4.1.1.1 - Materiais e equipamentos

➤ Materiais em geral

- ✓ Tubos de vidro (5,0 x 0,5 cm di);
- ✓ Adsorvente Porapak Q[®] supelco (50-80 mesh 75 cc);
- ✓ Fibra SPME PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno 65 µm;
- ✓ Holder para fibra SPME;
- ✓ Solventes: Metanol, diclorometano e hexano grau HPLC da marca J.T. Backer;
- ✓ Motobomba de sucção (utilizados com o mesmo intuito da bomba de vácuo para sucção do ar atmosférico);
- ✓ Tubos Falcon 50 mL.

➤ Materiais e reagentes utilizados para o isolamento, identificação, cultivo e conservação do micro-organismo *Xac*

- ✓ Álcool 70%;
- ✓ Água destilada;
- ✓ Alça de platina;
- ✓ Bico de Bunsen;

- ✓ Lâminas de bisturi;
- ✓ Pinça;
- ✓ Gaze;
- ✓ Câmara de Neubauer;
- ✓ Placas de Petri;
- ✓ Erlenmeyers;
- ✓ Peptona fitona;
- ✓ Extrato de carne;
- ✓ Extrato de levedura;
- ✓ K₂HPO₄;
- ✓ KH₂PO₄.

➤ **Equipamentos**

- ✓ Autoclave vertical Phoenix AV 75;
- ✓ Balança Analítica Sartorius modelo BP 210S;
- ✓ Câmara de Fluxo Laminar Veco VL FS-12M;
- ✓ Cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP5000;
- ✓ Cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP2010;
- ✓ Espectrofotômetro FEMTO 700 Plus;
- ✓ Estufa Incubadora (B.O.D.) Fanem – 347 CD;
- ✓ Microscópio binocular modelo L.2000A.
- ✓ Termociclador;
- ✓ Fotodocumentador.

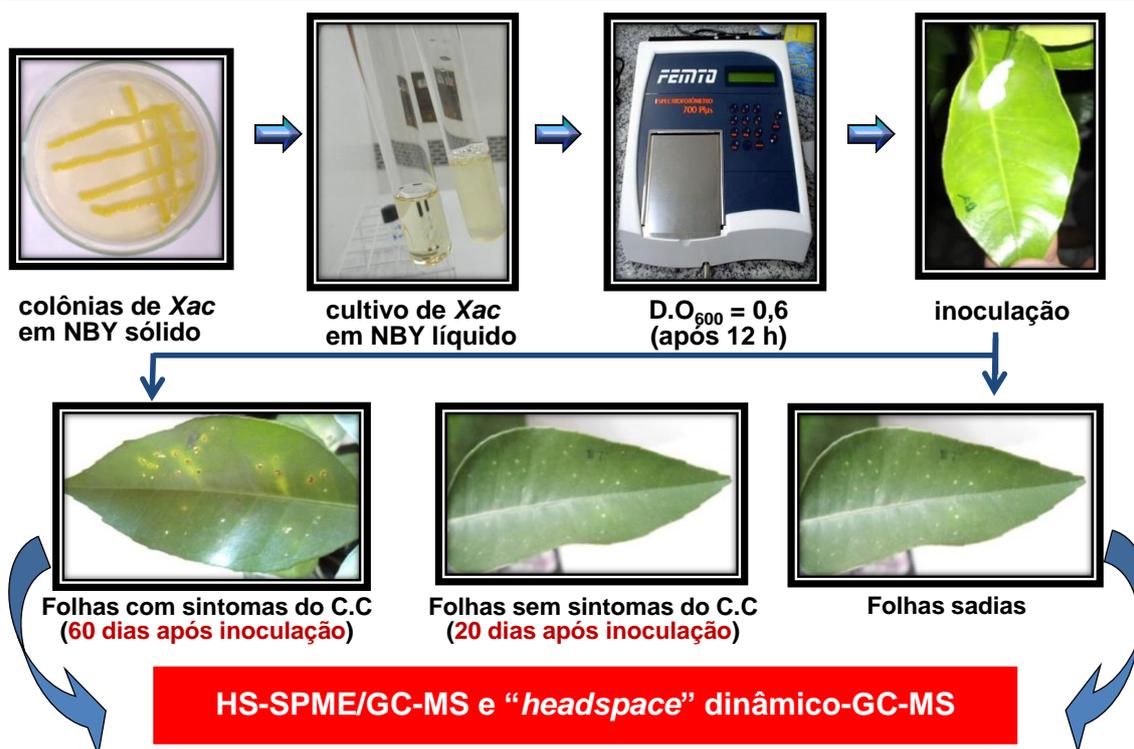
4.1.1.2 - Metodologia dos experimentos

4.1.1.2.1 - Inoculação da bactéria *Xac* 306 em plantas de *C. sinensis*

A linhagem *Xac* 306 da bactéria *X. axonopodis pv. citri* foi cedida pelo Prof. Dr. Marcos Antônio Machado do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira do Instituto Agronômico

(IAC), situado na cidade de Cordeirópolis-SP. As mudas de *C. sinensis* foram compradas junto a um viveiro de plantas certificadas, Sítio Manga Rosa, situado em Bonfim Paulista na cidade de Ribeirão Preto. Os experimentos de cultivo da bactéria e extração dos voláteis foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar e no Laboratório de Reações Perigosas, respectivamente. A linhagem selvagem de Xac 306 preservada em solução 50% glicerol a -80°C foi crescida em Nutrient Broth Yeast (NBY) sólido (contendo por litro 5,0 g de peptona fitona, 3,0 g de extrato de carne, 2,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de K_2HPO_4 , 0,5 g KH_2PO_4 e 16 g de ágar bacteriológico) a 28°C com fotoperíodo de 12 horas e após 48 horas, colônias da bactéria foram repicadas para NBY líquido (contendo por litro 5,0 g de peptona fitona, 3,0 g de extrato de carne, 2,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de K_2HPO_4 e 0,5 g KH_2PO_4 em $\text{pH} = 7,2$) até as concentrações do inóculo atingirem uma densidade óptica de 0,6 a 600 nm (concentração aproximada de 10^8 UFC/mL correspondente à fase midlog de crescimento), o que equivale aproximadamente a um período de crescimentos overnight (~ 12 horas), ou seja, da noite para a manhã seguinte.

Para testes de patogenicidade e virulência, a bactéria foi inoculada nas folhas das plantas *C. sinensis* (L.) Osbeck por infiltração de seringa com agulha com auxílio de cotonetes a fim de simular o processo de infecção natural (bactérias que entram na planta através dos estômatos). Os sintomas do cancro cítrico (c. c) foram marcados por qualquer modificação visual na lesão. Após 20 dias (tempo em que as plantas estavam infectadas pela bactéria, porém ainda os sintomas não estavam presentes) e 60 dias (tempo em que as plantas estavam infectadas pela bactéria, e os sintomas desenvolveram) as folhas foram selecionadas para estudo dos voláteis por Microextração em Fase Sólida no modo “*headspace*” (HS-SPME) e “*headspace*” dinâmico (DHS) associado ao GC-MS com o intuito de buscar biomarcadores químicos voláteis ou semivoláteis que caracterizem a doença. Folhas da planta sadia também foram utilizadas no estudo como controle (ESQUEMA 4.1).



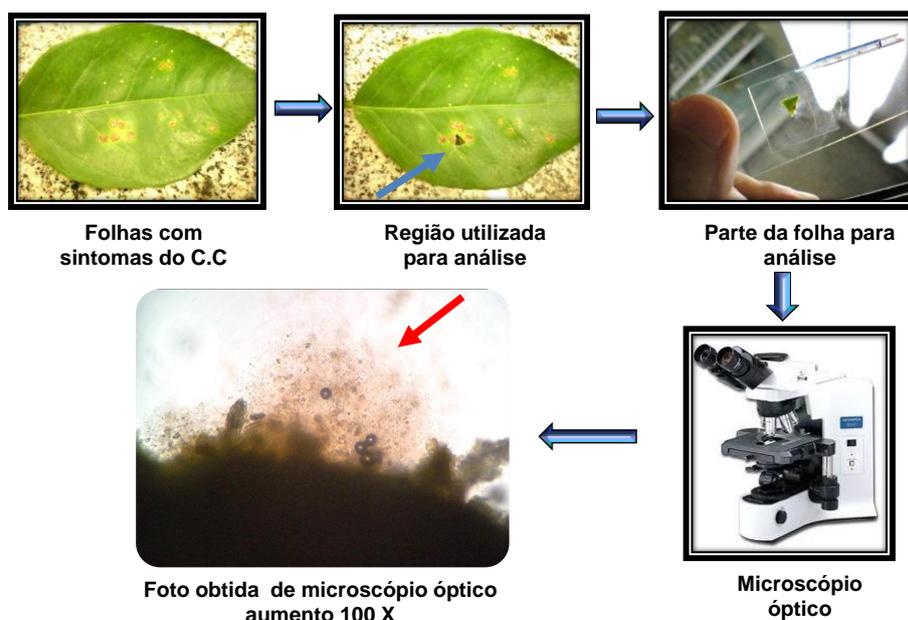
ESQUEMA 4.1 - Procedimento para cultivo e inoculação da bactéria *Xac* 306 em *C. sinensis*.

4.1.1.2.2 - Diagnóstico do cancro cítrico

O diagnóstico do cancro cítrico (confirmação da identidade da bactéria *Xac* 306) foi realizado por fluxo bacteriano e por Reação de Polimerase em cadeia (PCR).

a) Diagnóstico do cancro cítrico por fluxo bacteriano

A confirmação preliminar da presença da bactéria na planta foi realizada por meio da técnica fluxo bacteriano. Dessa forma, foi cortado um pedaço da folha na intersecção da região lesionada (com sintoma do c.c) e não lesionada. Esta parte da folha foi inserida em uma Câmara de Neubauer, e uma gota de água destilada foi inserida. A análise foi realizada em microscópio óptico com aumento de 100 X, onde foi possível observar um "fluxo" de bactéria migrando do meio menos aquoso para o mais aquoso (ESQUEMA 4.2). Esse "fluxo" migratório é característico de infecção bacteriana.



ESQUEMA 4.2 - Procedimento para diagnóstico da bactéria *Xac 306* em *C. sinensis* por fluxo bacteriano. C. C = cancro cítrico. Seta vermelha indica fluxo bacteriano.

b) Diagnóstico do cancro cítrico por PCR

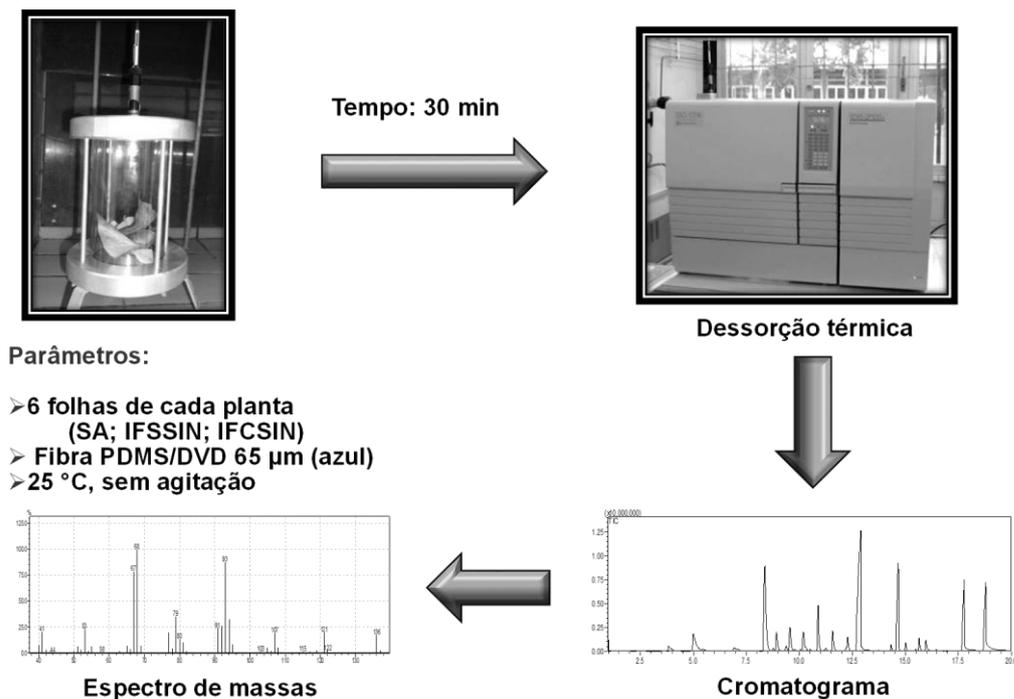
A confirmação definitiva da identidade da bactéria *Xac 306* inoculada em plantas *Citrus sinensis* foi realizada por meio da técnica Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) utilizando o kit Norgen's Bacterial Genomic DNA Isolation, Product #17900. A bactéria cultivada em NBY líquido por 48 horas foi submetida ao processo de extração do DNA genômico total (DNA da bactéria), conforme adaptação de MURRAY e THOMPSON (1980), DELLAPORTA et al., 1983 e COLETA-FILHO et al., 2006. Uma alíquota de 1 mL do cultivo de *Xac* foi inserida em microtubos de 1,5 mL e centrifugada a 14000 RPM por 1 min (repetido 5x). Em seguida, o sobrenadante foi descartado, adicionado 250 μ L solução de lise e 12 μ L de proteinase K. A solução foi misturada em vortex a 55 $^{\circ}$ C por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi submetida a coluna de resina e os demais passos do protocolo do kit Norgen's foram seguidos para obtenção do DNA genômico.

A amplificação do DNA por PCR para a confirmação da identidade do isolado de *Xac 306* foi realizada em reações de 25 μ L contendo Taq Buffer

[tampão de amplificação (1X)], 200µM de dNTP MIX (misturas de nucleotídeos), 0,02mM de MgCl₂, 50µM dos iniciadores Forward Primer (5'-CGC CAT CCC CAC CAC CAC CAC GAC-3') e Reverse Primer (5'-AAC CGC TCA ATG CCA TCC ACT TCA-3'), 0,5 uL Taq DNA polimerase (enzima) e 2µL de DNA (aproximadamente 200-250 ng). A seguinte programação foi utilizada em termociclador: desnaturação a 95°C por 5 minutos seguidos de 36 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 65 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos; A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL de gel) à 80 V/cm num sistema de eletroforese horizontal com fonte modelo 200, da Gibco BRL Life Technologies, USA. O peso molecular foi comparado ao padrão 1 Kb, e o gel foi fotografado após a corrida com fotodocumentador.

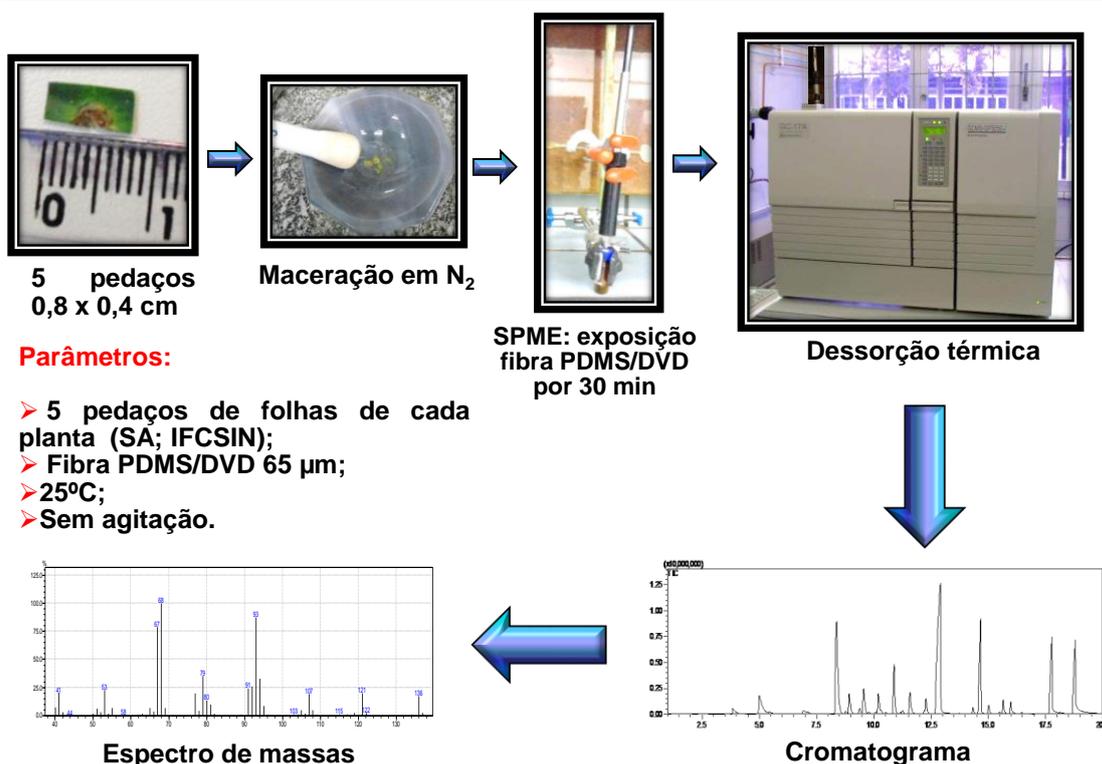
4.1.1.2.3 - Metodologia para HS-SPME/GC-MS

A técnica HS-SPME foi utilizada para extração dos compostos voláteis de *Citrus sinensis* sadias e infectadas (previamente inoculada com o patógeno) com *X. axonopodis* pv. *citri* (realizadas em triplicatas) (ZHANG et al., 2005). Para isso, 6 folhas (de cada planta sendo 3 plantas) sadias (SA); antes do início do sintoma, mas com a bactéria em seu interior (IFSSIN); e com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) foram inseridas separadamente em sistema apropriado. O parâmetro utilizado para a otimização da extração foi apenas o tempo de exposição da fibra. Portanto, a fibra azul (PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno 65 µm) foi utilizada por possuir característica bipolar e os tempos de exposição preliminares foram 30 minutos, 1 hora e 30 min, e 3 horas. O melhor tempo de extração foi definido em 30 minutos (ESQUEMA 4.3), baseado na intensidade máxima, áreas dos sinais cromatográficos e na quantidade de voláteis adsorvidos na fibra.



ESQUEMA 4.3 - ESQUEMA de montagem do sistema de extração dos voláteis por HS-SPME/GC-MS. SA = folhas das plantas saudáveis; IFSSIN = folhas das plantas assintomáticas do cancro cítrico; IFCSIN = folhas das plantas sintomáticas do cancro cítrico.

A metodologia de preparo de amostra utilizando N₂ líquido para trituração das folhas foi utilizada e posteriormente os voláteis foram analisados novamente por HS-SPME. Para isso, foram recortados 5 pedaços (0,8 x 0,4 cm) de cada folha sadia e infectada com sintoma. Posteriormente os 5 pedaços de cada tipo de folha foram triturados em N₂ (nitrogênio) líquido, inseridos em vial de 2 mL e vedados. Em seguida, os voláteis emitidos pelas folhas saudáveis (SA) e infectada com sintoma (IFCSIN) foram extraídos por HS-SPME por 30 min. Imediatamente, a fibra PDMS/DVD foi exposta na porta do injetor do GC-MS para dessorção e análise dos voláteis (ESQUEMA 4.4). O experimento foi realizado em quintuplicata.



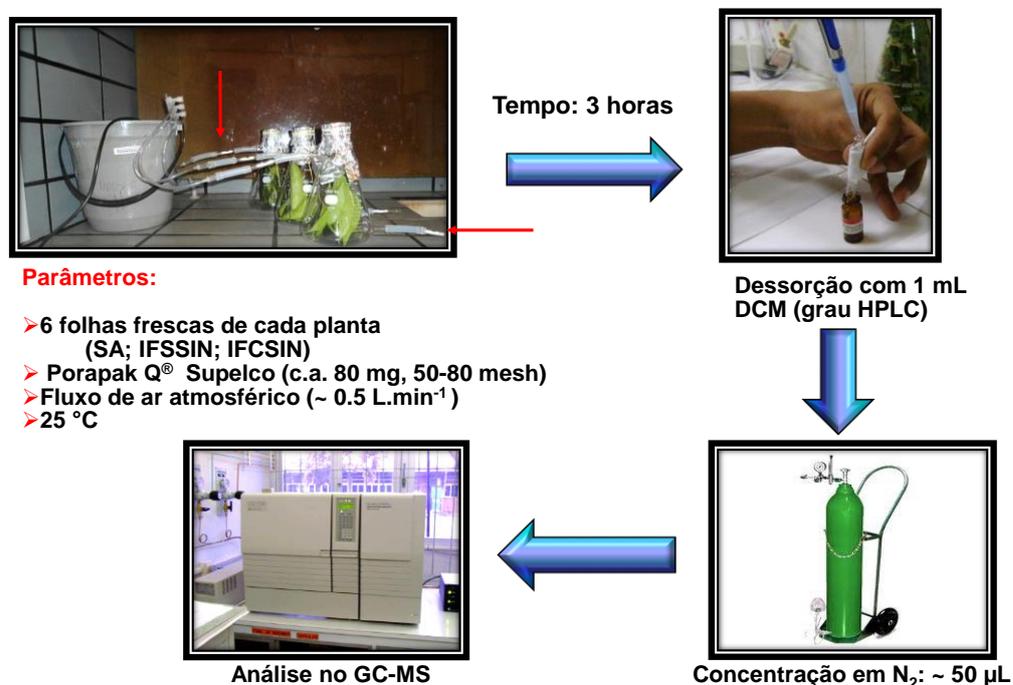
ESQUEMA 4.4 - ESQUEMA de montagem do sistema de extração dos voláteis por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ no preparo de amostra. SA = folhas das plantas sadias; IFCSIN = folhas das plantas sintomáticas do cancro cítrico.

4.1.1.2.4 - Metodologia para “*headspace*” dinâmico associado ao GC-MS

Para extração dos compostos voláteis de *Citrus sinensis* sadias e infectadas (previamente inoculada com o patógeno) com *X. axonopodis* pv. *citri* (realizadas em triplicatas), 6 folhas (de cada planta sendo 3 plantas) sadias (SA); antes do início de sintoma, mas com a bactéria em seu interior (IFSSIN); e com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) foram inseridas separadamente em recipiente de vidro apropriado, o qual foi posteriormente vedado (ESQUEMA 4.5). Então um fluxo de ar atmosférico de aproximadamente ~ 0,5 L.min⁻¹ por 3 horas, utilizando bomba de aquário mergulhada em água para realizar sucção do ar, foi passado através do frasco contendo as amostras a temperatura ambiente. Os voláteis capturados foram eluídos do cartucho contendo Porapak Q®, com 1 mL de diclorometano, DCM, (grau HPLC), os quais foram coletados diretamente em

frasco de vidro âmbar. O volume de solvente foi reduzido cuidadosamente para aproximadamente 50 μL em fluxo brando de N_2 e estocado em freezer até análise por GC-MS em aparelho Shimadzu QP 5000 (NICULAU, 2011; THOLL et al., 2006).

Foram utilizados Porapak Q® (ca. 80 mg, Supelco) como material adsorvente, os quais foram colocados em tubos de vidro com extremidades fechadas com lã de vidro silanizada. Os cartuchos contendo Porapak Q® (50-80 mesh 75 cc), antes de serem utilizados, foram condicionados através de eluição com 6 mL de MeOH (grau HPLC) e DCM (grau HPLC), em seguida aquecidos à 125 °C em estufa por 24 horas e, posteriormente, resfriados sob fluxo de nitrogênio por 10 min.



ESQUEMA 4.5 - ESQUEMA de montagem do sistema de extração dos voláteis por “headspace” dinâmico associado ao GC-MS. SA = folhas das plantas sadias; IFSSIN = folhas das plantas assintomáticas do cancro cítrico; IFCSIN = folhas das plantas sintomáticas do cancro cítrico. Seta na horizontal indica cartuchos “branco” e seta na vertical indica cartuchos onde foram coletados voláteis.

4.1.1.2.5 - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), hifenizado a um espectrômetro de massas (GC-MS) QP5000 ou QP2010. Os cromatógrafos operaram com colunas capilares DB-5MS, L = 30 m, DI = 0,25 mm e filme = 0,25 µm e Rtx[®]-5MS, L = 30 m, DI = 0,25 mm e filme = 0,25 µm, respectivamente. O gás de arraste foi Hélio (99.999%). As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 250°C e 280°C, respectivamente. Os volumes de amostra injetados foram de 1 µL em splitless ou dessorção diretamente na porta do injetor. A detecção por massas foi realizada num intervalo de 45 -550 Da.

Os componentes voláteis foram identificados através da comparação de seu espectro de massas com espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007), com espectros do banco de dados (WILEY8, NIST05, NIST21 e NIST107) do equipamento, do NIST Web Book, do Software NIST MS Search 2.0, do site www.pherobase.com e pela comparação dos Índices de Retenção (IR).

O percentual de cada constituinte foi estimado pela normalização da área (%) e organizados em ordem de eluição. Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de VAN DEN DOOL e KRATZ (1963). Para HS-SPME, a mistura de *n*-alcanos (solubilizada em hexano grau HPLC) também foi injetada separadamente no GC-MS.

4.1.2 - Resultados e Discussão

A extração dos compostos voláteis de *Citrus sinensis* foi otimizada por HS-SPME avaliando o tempo necessário para adsorção de grande parte dos compostos. O tempo de 30 min foi suficiente para extração da maior parte dos compostos, assim como também forneceu a intensidade máxima relativa do sinal ($1,27 \times 10^6$). No tempo de 1 hora e 30 min, o perfil dos compostos adsorvidos na fibra foi similar a 30 min, porém houve uma pequena redução na intensidade máxima relativa do sinal ($1,17 \times 10^6$). Já no tempo de 3,0 horas, poucos

compostos foram adsorvidos, assim como a intensidade do sinal foi menor entre os tempos avaliados ($7,92 \times 10^5$) (FIGURA 4.1). A fibra utilizada para otimização foi a PDMS/DVB por possuir característica bipolar, ou seja, tem a capacidade de adsorver tanto compostos mais apolares quanto compostos mais polares.

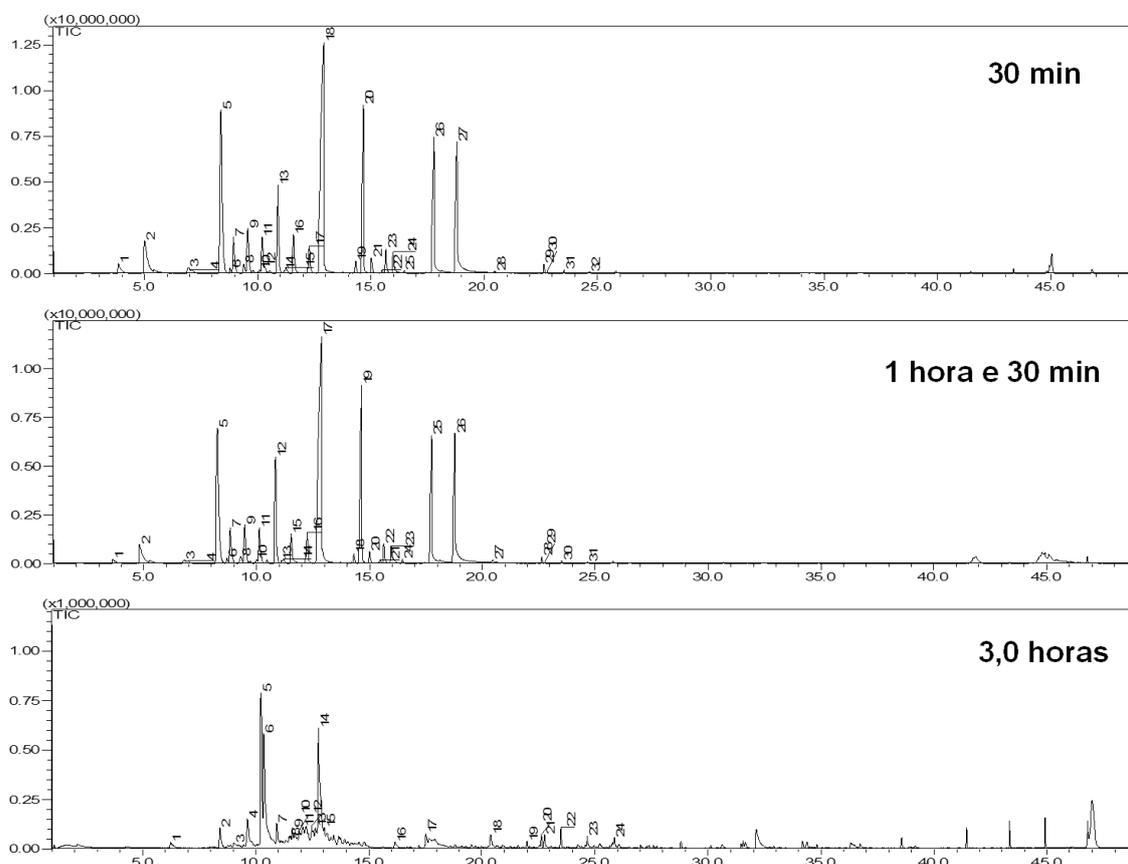


FIGURA 4.1 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de *Citrus sinensis* variando o tempo de extração por HS-SPME/GC-MS.

Vários compostos voláteis diferentes foram identificados, considerando os dois métodos de extração (“*headspace*” dinâmico e HS-SPME) e a natureza das folhas das plantas: Sadia (SA); infectada, mas sem sintoma (IFSSIN) e infectada, mas com sintoma do cancro cítrico (IFCSIN). Houve uma alta variação dos compostos de acordo com o grau de infecção das folhas.

O perfil químico dos voláteis da planta identificado por HS-SPME/GC-MS está descrito na FIGURAS 4.2 a 4.4 e TABELA 4.1. Nas folhas das plantas sadias (SA), foram identificados um total de 30 compostos voláteis, enquanto que nas folhas das plantas infectadas sem sintoma (IFSSIN) 33 e nas folhas das plantas infectadas com sintoma (IFCSIN) apenas 26 compostos foram

extraídos. Nas folhas das plantas infectadas sem sintoma (IFSSIN) e com sintoma (IFCSIN), as análises revelaram a presença de benzotiazol (**27**) (0,72% em IFSSIN e 2,15 em IFCSIN) e benzoato de 2-etilexila (**48**) (0,53% em IFSSIN e 2,05% em IFCSIN), os quais não foram detectados nas folhas das plantas sadias (SA), sendo estes os principais biomarcadores voláteis necessários para o diagnóstico precoce do cancro cítrico utilizando essa metodologia (FIGURAS 4.2 a 4.4 e TABELA 4.1). Estes compostos podem ter sido produzidos por um mecanismo de defesa da planta ou por uma interação planta-bactéria. O alcaloide sulfurado, benzotiazol, é de ocorrência rara na natureza, porém foi produzido pelo fungo *Aspergillus clavatus* (SEIFERT e KING, 1982). Outros derivados do benzotiazol também já foram isolados de outros micro-organismos: ácido 6-hidroxibenzotiazol-5-acético, isolado de cultura da bactéria *Actinosynnema sp* (KOZASA et al., 1988) e do fungo *Paecilomyces lilacinus* (YAGINUMA et al., 1989). Além desse, a luciferina (um composto contendo a estrutura básica do benzotiazol) também tem sido isolado do inseto *Photinus pyralis* (BITLER & GABRIEL, 1957).

Compostos voláteis da classe dos alcanos alifáticos acíclicos não-ramificados: *n*-pentadecano (**40**), *n*-hexadecano (**44**), *n*-heptadecano (**47**) e *n*-octadecano (**49**) também foram identificados apenas nas folhas das plantas com sintoma (IFCSIN), porém sua utilização como biomarcador não é aconselhável, porque os mesmos geralmente não apresentam íons moleculares nos respectivos espectros de massas, além de poderem estar presentes como interferentes em diversas matrizes vegetais e animais. Além disso, nas folhas das plantas sadias (SA) foram detectados limoneno (**13**) (2,31%), neral (**28**) (8,93%), geranial (**30**) (9,37%) e β -elemeno (**35**) (0,35%), enquanto que nas folhas das plantas infectadas sem sintoma e com sintoma, as áreas percentuais relativas aumentaram para limoneno (8,05% e 35,03%), e diminuíram para neral (2,21% e 0,00%, nd) e geranial (1,28% e 0,00%, nd), respectivamente. Um estudo recente publicado RODRÍGUEZ et al., 2011, demonstrou que limoneno presente na casca de laranja tem a propriedade de atrair algumas pragas e micro-organismos. Portanto, o aumento na área percentual deste composto quando a bactéria *Xac* está presente está relacionado a uma resposta da planta à bactéria, a qual pode ser explicada como um mecanismo de defesa. (FIGURAS 4.2; 4.4 e TABELA 4.1).

A pressão de vapor em 25 °C (mmHg) de alguns analitos foram calculados com o software EPI Suite™ v4.10, disponível em: <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm>. Este parâmetro indica a volatilidade dos compostos, pois quando a pressão de vapor de um analito é maior significa que suas moléculas passam para o estado gasoso com mais facilidade, ou seja, possui maior volatilidade. Os compostos que eluem com tempo de retenção menor geralmente são os compostos mais voláteis, conseqüentemente os com maiores tempos de retenção são os menos voláteis (TABELA 4.1).

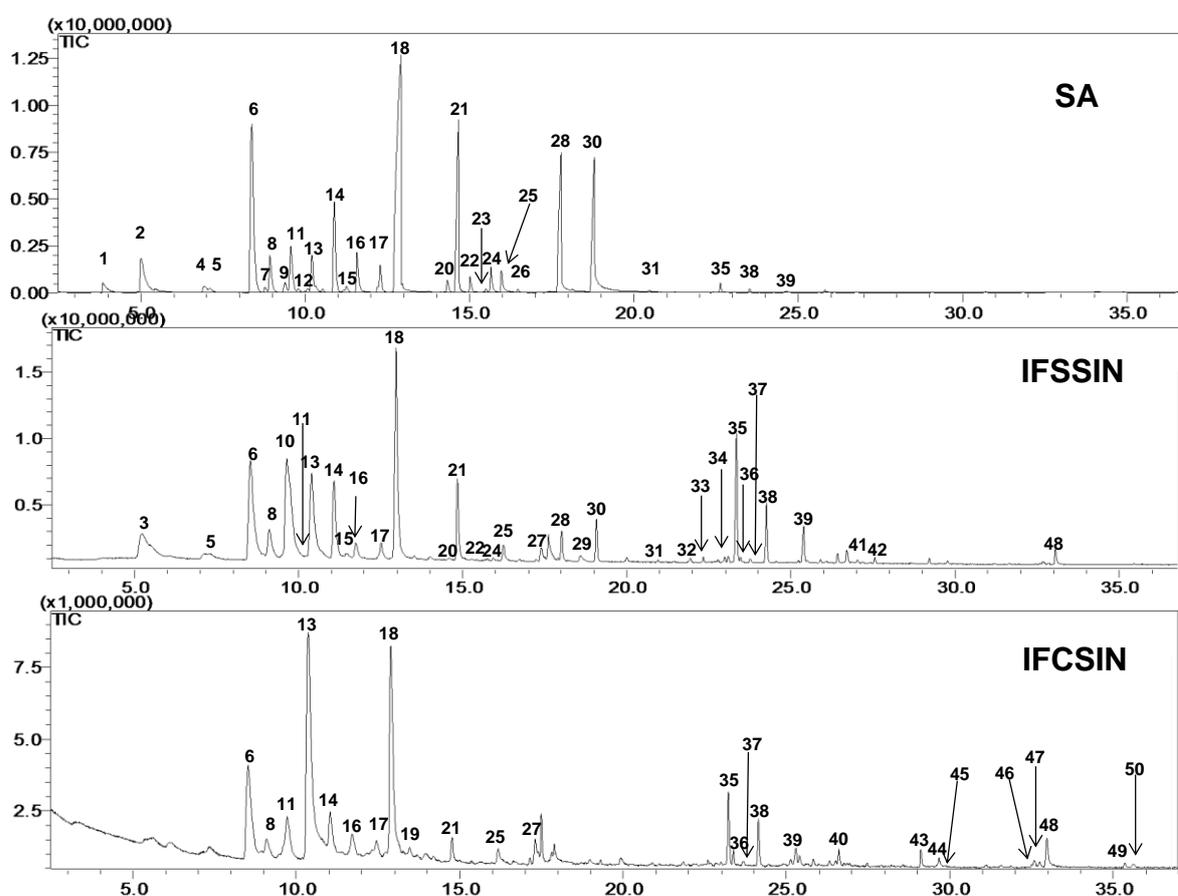


FIGURA 4.2 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA); infectada com *Xac* 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com *Xac* 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS. Condições cromatográficas: coluna DB-5MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 µm); rampa de 50° C (1.5 min.) (4° C/min)-200° C (10° C/min)-250° C (5 min.). Injetor: 250° C, Detector: 280° C; He-1,2 mL/min.

TABELA 4.1 - Composição química dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA); infectada com Xac 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com Xac 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS.

Nº	Componentes	% área do pico					
		Vp	IR	IR-lit	SA	IFSSIN	IFCSIN
1	hexanal	9,57	807	801	0,66 ± 0,26	nd	nd
2	(2E)-hexenal	-	849	846	3,35 ± 0,99	nd	nd
3	(3Z)-hexenol	-	868	850	nd	2,15 ± 1,72	nd
4	α-tujeno	-	918	924	0,30 ± 0,11	nd	nd
5	α-pineno	4,02	934	932	0,05 ± 0,02	1,62 ± 1,22	nd
6	sabineno	-	967	969	14,76 ± 0,65	17,81 ± 9,34	13,27 ± 4,02
7	2,3-octanediona	-	981	967*	0,27 ± 0,03	nd	nd
8	β-mirceno	2,40	986	988	2,43 ± 0,13	3,00 ± 0,90	0,73 ± 0,59
9	α-felandreno	1,91	1001	1002	0,61 ± 0,06	nd	nd
10	(3E)-acetato de hexanila	-	1010	1001	nd	8,57 ± 7,70	nd
11	γ-3-careno	-	1012	1008	3,05 ± 0,11	1,37 ± 2,37	4,17 ± 0,88
12	p-cimeno	1,14	1021	1020	0,13 ± 0,01	nd	nd
13	limoneno	1,45	1025	1024	2,31 ± 0,13	8,05 ± 1,04	35,03 ± 4,34
14	β-(E)-ocimeno	-	1046	1044	5,71 ± 0,93	7,76 ± 1,45	4,12 ± 1,58
15	γ-terpineno	1,15	1056	1054	0,19 ± 0,14	0,49 ± 0,30	nd
16	cis-hidrato de sabineno	-	1066	1065	2,26 ± 0,29	1,06 ± 0,38	2,12 ± 0,34
17	p-menta-2,4,(8)-dieno	-	1087	1085	1,60 ± 0,16	1,36 ± 0,19	1,46 ± 0,54
18	linalol	0,08	1105	1095	27,97 ± 0,43	16,10 ± 4,75	14,84 ± 5,64
19	perileno	-	1119	1102	nd	nd	0,67 ± 0,30
20	exo-isocitral	-	1146	1140	0,56 ± 0,05	0,07 ± 0,13	nd
21	citronelal	-	1156	1148	11,48 ± 1,18	5,63 ± 3,26	0,85 ± 0,45
22	(Z)-isocitral	-	1166	1160	0,71 ± 0,08	0,06 ± 0,10	nd
23	terpinen-4-ol	-	1180	1174	0,12 ± 0,01	nd	nd
24	(E)-isocitral	-	1184	1177	1,12 ± 0,15	0,13 ± 0,18	nd
25	α-terpineol	0,01	1194	1186	0,74 ± 0,47	0,69 ± 0,23	0,95 ± 0,53
26	decanal	0,23	1208	1201	0,15 ± 0,06	nd	nd
27	benzotiazol	-	1225	1208*	nd	0,72 ± 0,31	2,15 ± 0,69
28	neral	-	1247	1235	8,93 ± 0,45	2,21 ± 1,47	nd
29	geraniol	0,01	1259	1249	nd	0,25 ± 0,24	nd
30	geranial	-	1277	1264	9,37 ± 0,29	1,28 ± 0,97	nd
31	geraniato de metila	-	1328	1322	0,09 ± 0,02	0,04 ± 0,06	nd
32	acetato de citronelila	-	1355	1352	nd	0,13 ± 0,02	nd
33	acetato de nerila	-	1367	1359	nd	0,17 ± 0,15	nd
34	acetato de geranila	0,04	1386	1379	nd	0,14 ± 0,12	nd
35	β-elemeno	-	1395	1389	0,35 ± 0,05	7,06 ± 1,17	2,32 ± 1,06
36	n-tetradecano	0,03	1399	1400	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,10	0,64 ± 0,03
37	sesquitujeno	-	1409	1405	nd	0,22 ± 0,06	0,10 ± 0,10
38	(E)-cariofileno	-	1423	1417	0,13 ± 0,01	3,35 ± 0,66	2,40 ± 0,11
39	β-(E)-farneseno	0,03	1460	1454	0,10 ± 0,00	2,50 ± 0,57	0,49 ± 0,50
40	n-pentadecano	0,01	1499	1500	nd	nd	0,58 ± 0,14
41	α-(E,E)-farneseno	-	1511	1505	nd	0,08 ± 0,07	nd
42	β-sesquifelandreno	-	1528	1521	nd	0,26 ± 0,05	nd
43	cianeto de farnesila	-	1581	**	nd	nd	0,61 ± 0,55
44	n-hexadecano	0,00	1600	1600	nd	nd	0,45 ± 0,53
45	tetradecanal	-	1609	1611	nd	nd	0,53 ± 0,92
46	2-pentadecanona	-	1696	1697	nd	nd	0,18 ± 0,31
47	n-heptadecano	0,00	1699	1700	nd	nd	0,21 ± 0,22
48	benzoato de 2-etilexila	-	1713	1692*	nd	0,53 ± 0,22	2,05 ± 0,77
49	n-octadecano	0,00	1800	1800	nd	nd	0,24 ± 0,04
50	hexadecanal	-	1817	1800*	nd	nd	0,25 ± 0,43
Total					99,52	94,97	91,42

Vp = pressão de vapor em 25 °C (mmHg) dos analitos foram calculados com o EPI Suite™ v4.10

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

IR-lit = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

* = identificado pelo NIST Web Book, NIST MS Search 2.0 e/ou www.pherobase.com.

** = tentativamente identificado pelo perfil do espectro de massas e em comparação com o espectro de massas do NIST MS Search 2.0.

nd = não detectado.

- = não determinado

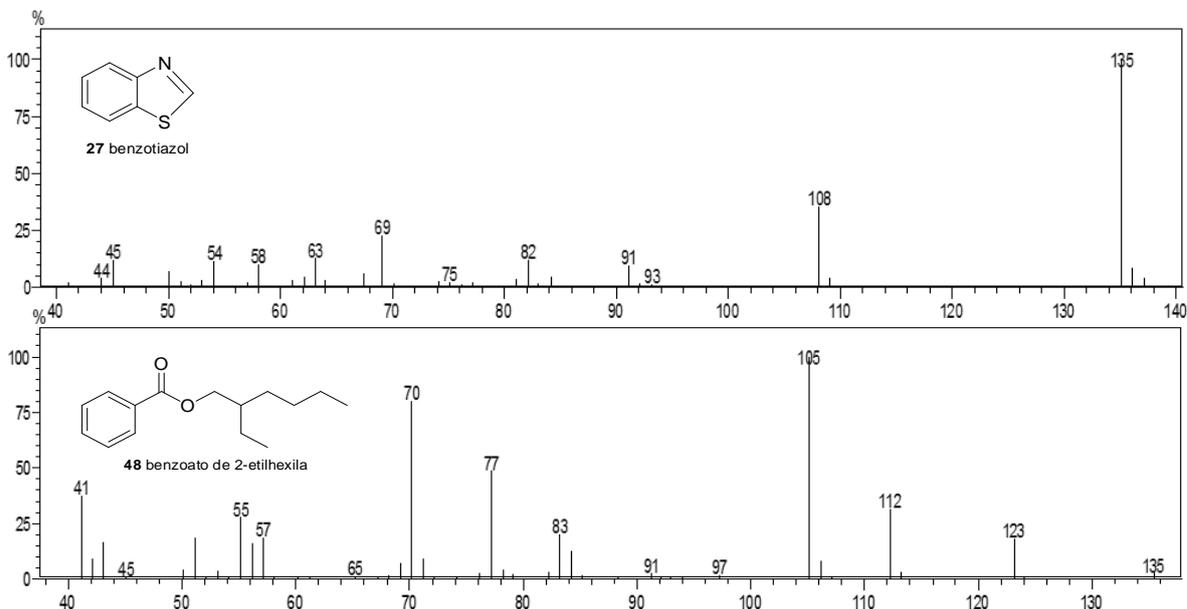


FIGURA 4.3 - Estruturas química dos principais biomarcadores voláteis e respectivos espectros de massas necessários para diagnose do cancro cítrico em *C. sinensis* por HS-SPME/GC-MS.

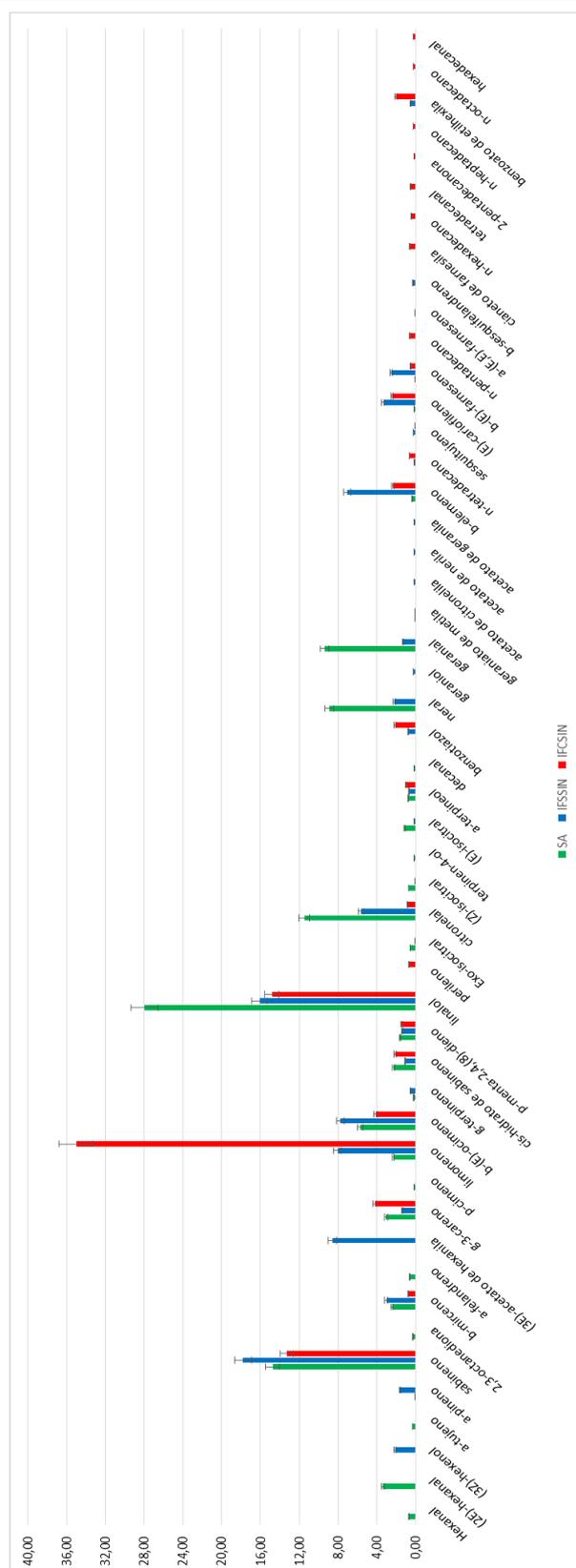


FIGURA 4.4 - Gráfico mostrando variação da composição química dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA); infectada com *Xac* 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com *Xac* 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS.

O perfil químico dos voláteis nas folhas das plantas identificado por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ líquido no preparo de amostra está descrito nas FIGURAS 4.5 a 4.7 e TABELA 4.2. Esta é a metodologia mais indicada para utilização como diagnóstico do cancro cítrico, pois ao utilizar apenas regiões das folhas que apresentam o sintoma, há uma maior concentração dos biomarcadores voláteis e conseqüentemente uma maior diversidade dos mesmos. Nas folhas das plantas infectadas com sintoma (IFCSIN), as análises revelaram a presença de vários biomarcadores químicos voláteis que auxiliam na identificação do cancro cítrico. Entre estes destacam-se uma série de compostos derivados do benzeno: benzaldeído (**9**) (1,12%), fenilmetanol (**18**) (7,38%), benzoato de metila (**24**) (2,06%), 2-feniletanol (**26**) (1,11%), acetato de benzila (**33**) (2,05%) e benzoato de etila (**34**) (7,56%). Além destes outros menos importantes, com menores áreas percentuais, também foram identificados apenas em IFCSIN: acetato de 1-fenil etila (**37**) (0,04%), salicilato de metila (**38**) (0,04%), acetato de 2-feniletila (**45**) (0,50%), acetato de prenila (**5**) (0,38%), hexadecanoato de etila (**13**) (0,35%), *n*-tetradecano (**56**) (0,01%), *n*-pentadecanal (**72**) (0,06%), porém não é aconselhável a utilização destes como biomarcadores por apresentarem com baixas áreas percentuais no modo de análise. Alguns compostos dessa classe foram descritos como voláteis produzidos por outra espécie de bactéria, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10: fenilmetanol; 2-feniletanol e acetato de 2-feniletila (WEISE et al., 2012). ZHANG et al., 2005, também mostrou que folhas de grapefruit infectadas com *X. citri* subsp. *citri* produziram um composto volátil contendo o grupo fenil em sua estrutura, fenilacetaldeído-O-metil-oxima.

A maioria destes compostos podem ter sido produzidos por um mecanismo de defesa da planta sendo, possivelmente, caracterizados como fitoalexinas (FIGURAS 4.5 a 4.7 e TABELA 4.2). Pelo nosso conhecimento, compostos dessa classe não haviam sido identificados na planta *C. sinensis*. Acredita-se que a maioria das plantas sejam capazes de sintetizar fitoalexinas, mas algumas a fazem de maneira muito lenta, permitindo que o micro-organismo complete a infecção antes que haja o acúmulo dessas substâncias em quantidades suficientes para inibi-lo (OSBOURN, 1999). Além disso, geralmente as quantidades das fitoalexinas produzidas pelas plantas atacadas pelo patógeno pode não ser suficiente para inibir a infecção causada pelo micro-organismo.

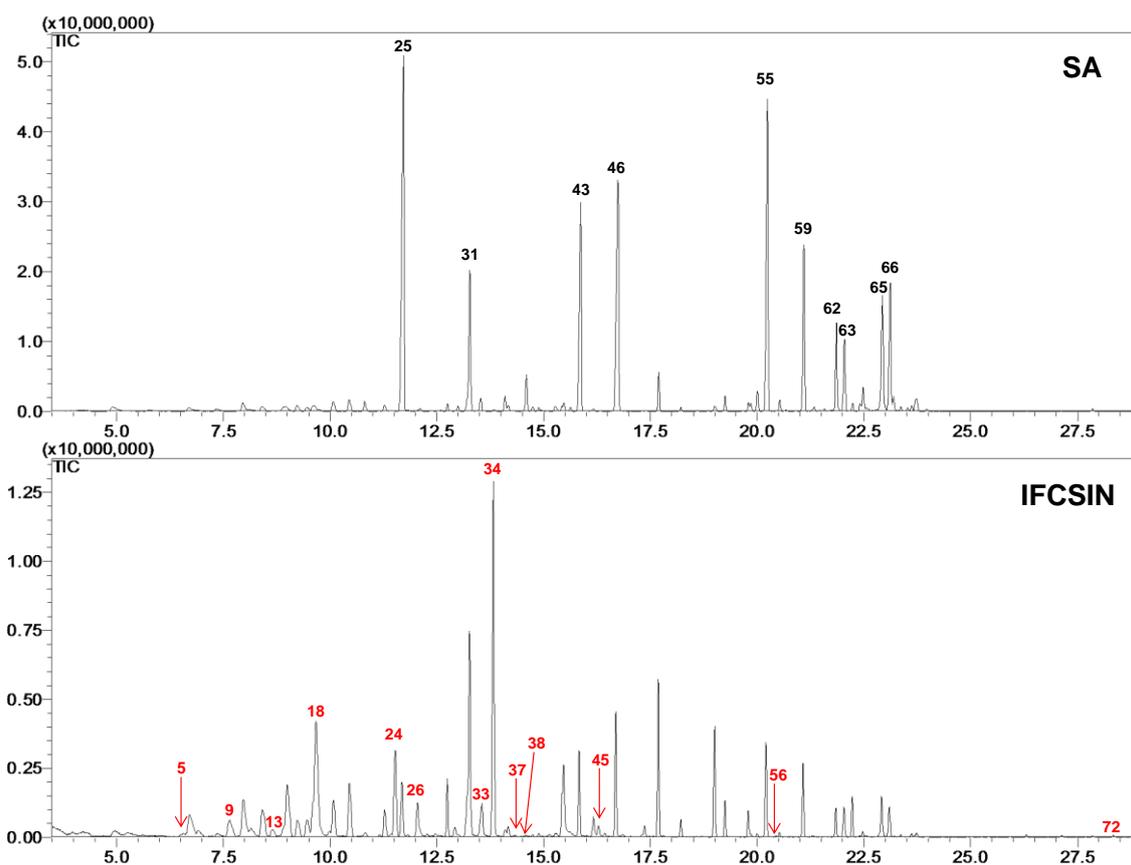


FIGURA 4.5 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA) e infectada com *Xac* 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ no processo de extração. Condições cromatográficas: coluna DB-5MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 µm; rampa de 50° C (1.0 min.) (5° C/min)-270° C (2 min). Injetor: 250° C, Detector: 270° C; He-1,2 mL/min.

TABELA 4.2 - Composição química dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA) e infectada com *Xac* 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ no processo de extração.

Nº	TR	Componentes	Vp	IR	IR-lit	% área do pico	
						SA	IFCSIN
1	3,94	hexanal	9,57	821	801	nd	0,28 ± 0,63
2	4,94	(2E)-hexenal	-	857	846	0,79 ± 0,80	0,84 ± 1,89
3	5,24	(2E)-hexenol	-	871	854	nd	1,34 ± 3,01
4	6,26	(2E, 4E)-hexadienal	-	909	907	nd	0,03 ± 0,06
5	6,54	acetato de prenila	-	919	914	nd	0,38 ± 0,29
6	6,71	α-tujeno	-	924	924	0,53 ± 0,22	2,91 ± 1,27
7	6,91	α-pineno	4,02	934	932	nd	0,27 ± 0,24
8	7,34	canfeno	-	949	946	0,48 ± 0,57	0,24 ± 0,31
9	7,63	benzaldeído	-	960	952	nd	1,12 ± 0,58
10	7,98	sabineno	-	972	969	0,75 ± 0,35	4,30 ± 2,18
11	8,15	β-pineno	-	980	974	nd	0,36 ± 0,34
12	8,42	β-mirceno	2,40	989	988	0,59 ± 0,42	2,25 ± 0,34
13	8,64	hexanoato de etila	-	997	997	nd	0,35 ± 0,15
14	8,99	δ-3-careno	-	1008	1008	0,59 ± 0,21	4,80 ± 1,16
15	9,24	α-terpineno	-	1017	1014	0,70 ± 0,40	1,53 ± 0,34
16	9,45	p-cimeno	-	1025	1022	1,11 ± 1,24	1,35 ± 0,75
17	9,23	limoneno	1,14	1030	1024	1,47 ± 1,46	0,41 ± 0,92
18	9,67	fenilmetanol	-	1031	1026	nd	7,38 ± 4,21
19	10,08	β-(E)-ocimeno	-	1045	1044	0,91 ± 0,69	2,63 ± 0,58
20	10,46	γ-terpineno	1,15	1058	1054	2,20 ± 2,01	3,77 ± 0,71
21	10,83	cis-hidrato de sabineno	-	1070	1066	0,40 ± 0,28	0,18 ± 0,08
22	11,27	p-menta-2,4(8)-dieno	-	1085	1085	0,94 ± 0,77	1,42 ± 0,82
23	11,41	p-cimeno	-	1090	1089	nd	0,02 ± 0,04
24	11,52	benzoato de metila	-	1093	1088	nd	2,06 ± 2,22
25	11,68	linalol	0,08	1100	1095	17,77 ± 5,77	6,42 ± 7,94
26	12,04	2-feniletanol	-	1111	1106	nd	1,11 ± 0,62
27	12,11	p-1,3,8-mentatrieno	-	1113	1108	0,14 ± 0,04	nd
28	12,92	trans-sabinol	-	1140	1137	nd	0,21 ± 0,13
29	12,99	exo-isocitral	-	1142	1140	0,18 ± 0,07	nd
30	13,18	cânfora	-	1149	1141	0,21 ± 0,46	nd
31	13,26	citronelal	-	1152	1148	6,25 ± 3,50	10,63 ± 1,53
32	13,52	(Z)-isocitral	-	1160	1160	0,62 ± 0,26	nd
33	13,56	acetato de benzila	-	1161	1157	nd	2,05 ± 1,44
34	13,82	benzoato de etila	-	1170	1169	nd	7,56 ± 5,62
35	14,10	(E)-isocitral	-	1179	1177	0,61 ± 0,20	0,24 ± 0,09
36	14,18	terpinen-4-ol	-	1182	1174	0,24 ± 0,06	0,31 ± 0,06
37	14,35	acetato de 1-fenil etila	-	1188	1192	nd	0,04 ± 0,03
38	14,45	salicilato de metila	-	1191	1190	nd	0,04 ± 0,05
39	14,60	α-terpineol	0,01	1196	1186	1,58 ± 0,63	0,03 ± 0,06
40	14,88	n-decanal	0,23	1206	1201	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,05
41	15,42	citronelol	-	1223	1223	0,21 ± 0,10	2,49 ± 1,31
42	15,58	timol metil éter	-	1228	1232	nd	0,02 ± 0,04
43	15,83	neral	-	1238	1235	9,32 ± 2,65	2,38 ± 0,98
44	16,17	geraniol	0,01	1247	1249	nd	0,48 ± 0,27
45	16,29	acetato de 2-feniletila	-	1265	1254	nd	0,50 ± 0,36
46	16,69	geranial	-	1266	1264	12,55 ± 2,61	3,22 ± 1,41
47	16,84	(E)-cinamaldeído	-	1270	1267	nd	0,03 ± 0,03
48	17,30	timol	-	1285	1289	nd	nd
49	17,36	safrol	-	1287	1285	0,51 ± 1,08	0,20 ± 0,12
50	18,22	geraniato de metila	-	1317	1322	0,09 ± 0,08	0,47 ± 0,16
51	18,61	δ-elemeno	-	1331	1335	0,11 ± 0,24	0,01 ± 0,01
52	19,00	acetato de citronelila	-	1346	1350	nd	3,27 ± 1,65

Continuação da Tabela 4.2

53	19,25	acetato de nerila	-	1355	1359	0,27 ± 0,04	1,13 ± 0,66
54	19,79	acetato de geranila	0,04	1375	1379	0,23 ± 0,05	0,82 ± 0,50
55	20,21	β -elemeno	-	1392	1389	10,06 ± 3,55	3,66 ± 0,73
56	20,46	<i>n</i> -tetradecano	0,03	1400	1400	nd	0,01 ± 0,02
57	20,54	sesquitujeno	-	1403	1405	0,30 ± 0,07	0,16 ± 0,02
58	20,68	dodecanal	-	1408	1408	0,01 ± 0,02	nd
59	20,10	(<i>E</i>)-cariofileno	-	1424	1417	4,99 ± 1,54	3,26 ± 0,38
60	21,29	γ -elemeno	-	1431	1434	nd	0,06 ± 0,14
61	21,59	aromadendreno	-	1443	1439	nd	0,06 ± 0,13
62	21,86	β -(<i>E</i>)-farneseno	0,03	1453	1454	3,04 ± 0,27	1,17 ± 0,21
63	22,05	α -humuleno	-	1459	1452	nd	1,26 ± 0,07
64	22,41	4,5-di-epi-aristolocheno	-	1474	1471	0,23 ± 0,07	nd
65	22,94	β -selineno	-	1494	1489	5,22 ± 1,45	1,73 ± 0,47
66	23,11	α -selineno	-	1501	1498	5,60 ± 1,63	1,58 ± 0,58
67	23,20	α -(<i>E,E</i>)-farneseno	-	1504	1505	0,45 ± 0,10	0,05 ± 0,10
68	23,37	β -curcumeno	-	1511	1514	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,02
69	23,62	δ -cadineno	-	1521	1522	0,17 ± 0,04	0,13 ± 0,03
70	23,75	β -sesquifelandreno	-	1525	1521	0,60 ± 0,37	0,24 ± 0,10
71	27,87	β -sinensal	-	1694	1699	0,07 ± 0,02	0,83 ± 1,77
72	28,35	pentadecanal	-	1715	1711	nd	0,06 ± 0,01
Total						93,30	97,91

Vp = pressão de vapor em 25 °C (mmHg) dos analitos calculados com o EPI Suite™ v4.10.

TR = Tempo de retenção em minutos.

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

IR-lit = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

* = identificado pelo NIST Web Book, NIST MS Search 2.0 e/ou www.pherobase.com.

** = tentativamente identificado pelo perfil do espectro de massas e em comparação com o espectro de massas do NIST MS Search 2.0.

nd = não detectado.

- = não determinado

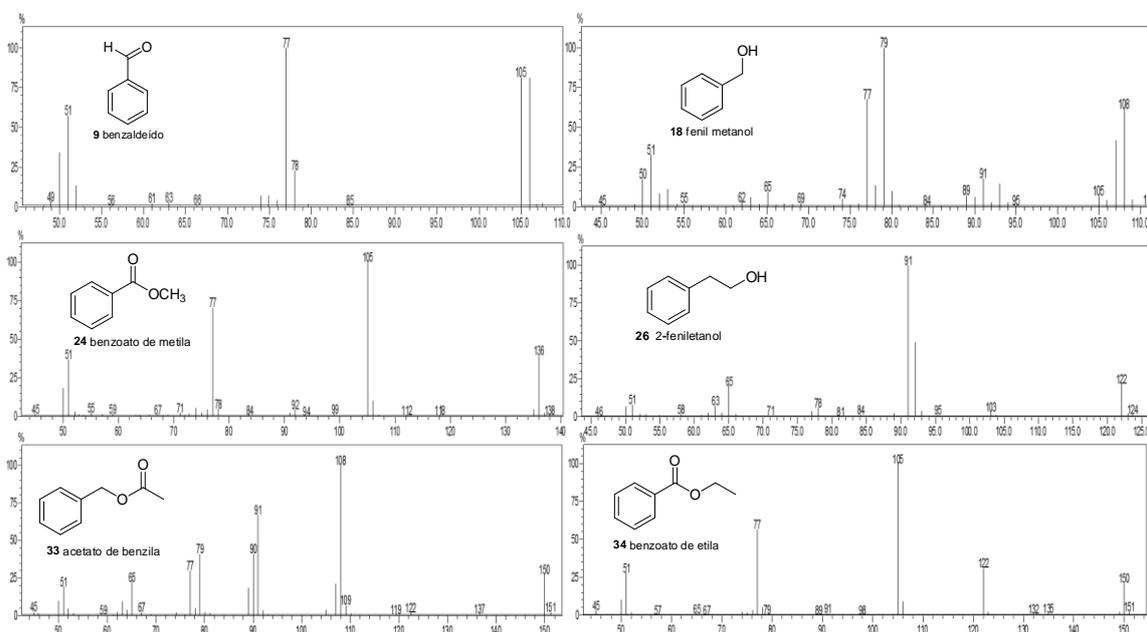


FIGURA 4.6 - Estruturas químicas dos principais biomarcadores voláteis e respectivos espectros de massas necessários para diagnóstico do cancro cítrico em *C. sinensis* por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ no processo de extração.

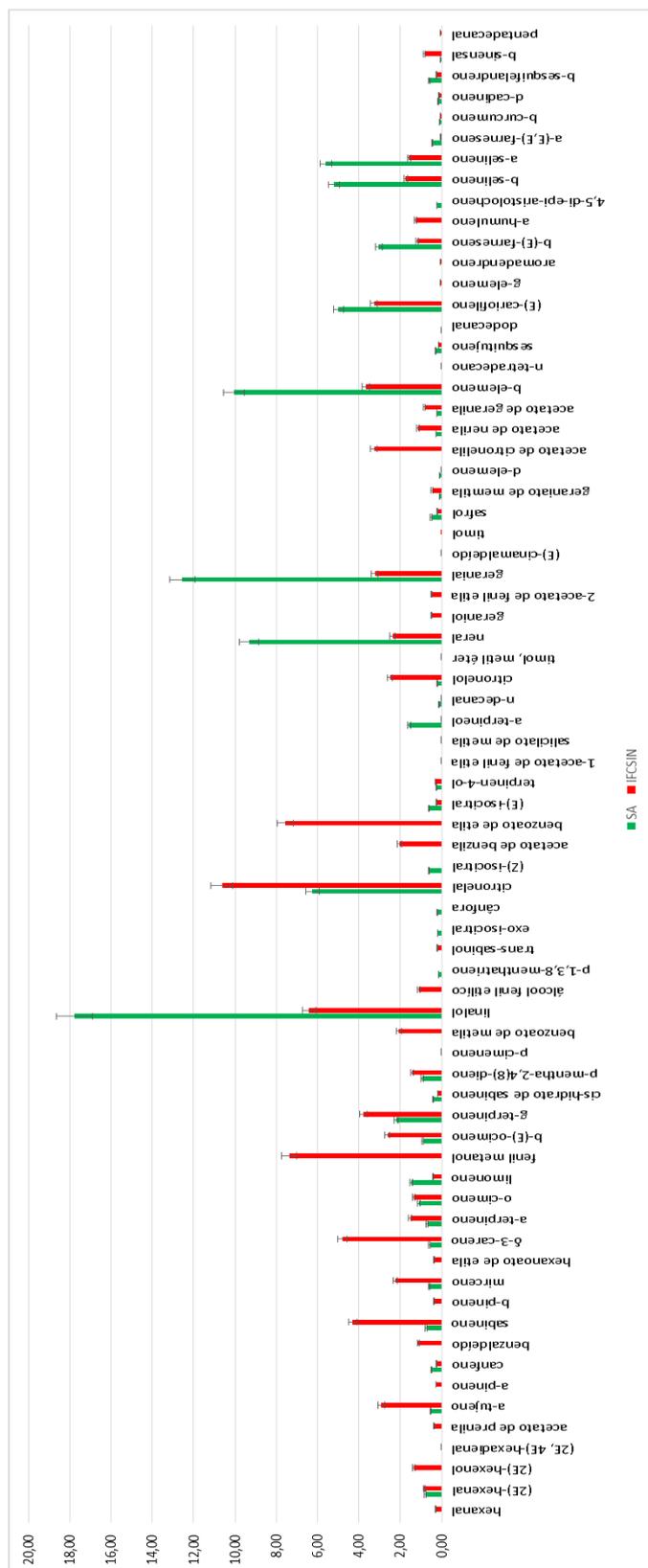


FIGURA 4.7 - Gráfico mostrando variação na composição química dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA) e infectada com *Xac* 306 com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ no processo de extração.

O perfil químico dos voláteis nas folhas das plantas identificado por “*headspace*” dinâmico associado à GC-MS está descrito na FIGURAS 4.8 a 4.10 e TABELA 4.3, no qual foi identificado um total de 24 compostos voláteis. Nas folhas das plantas sadias (SA), foram identificados um total de 7 compostos voláteis, enquanto que nas folhas das plantas infectadas sem sintoma (IFSSIN) 11 e nas folhas das plantas infectadas com sintoma (IFCSIN) 21. Benzoato de isoamila (0,67%) foi o único biomarcador volátil aromático, identificado apenas nas folhas das plantas sintomáticas (IFCSIN) (FIGURAS 4.8 a 4.10 e TABELA 4.3). Além destes, foram identificados cianeto de farnesila (2,33%), *n*-tetradecano (1,26%), *n*-pentadecano (1,17%) e *n*-hexadecano (1,55%) apenas nas folhas das plantas infectadas com sintoma (IFCSIN), porém sua utilização como biomarcadores não é aconselhável pelos mesmo motivos já comentadas anteriormente (FIGURA 4.8 e TABELA 4.3). Novamente, estes compostos podem ter sido produzidos por um mecanismo de defesa da planta ou por uma interação planta-bactéria.

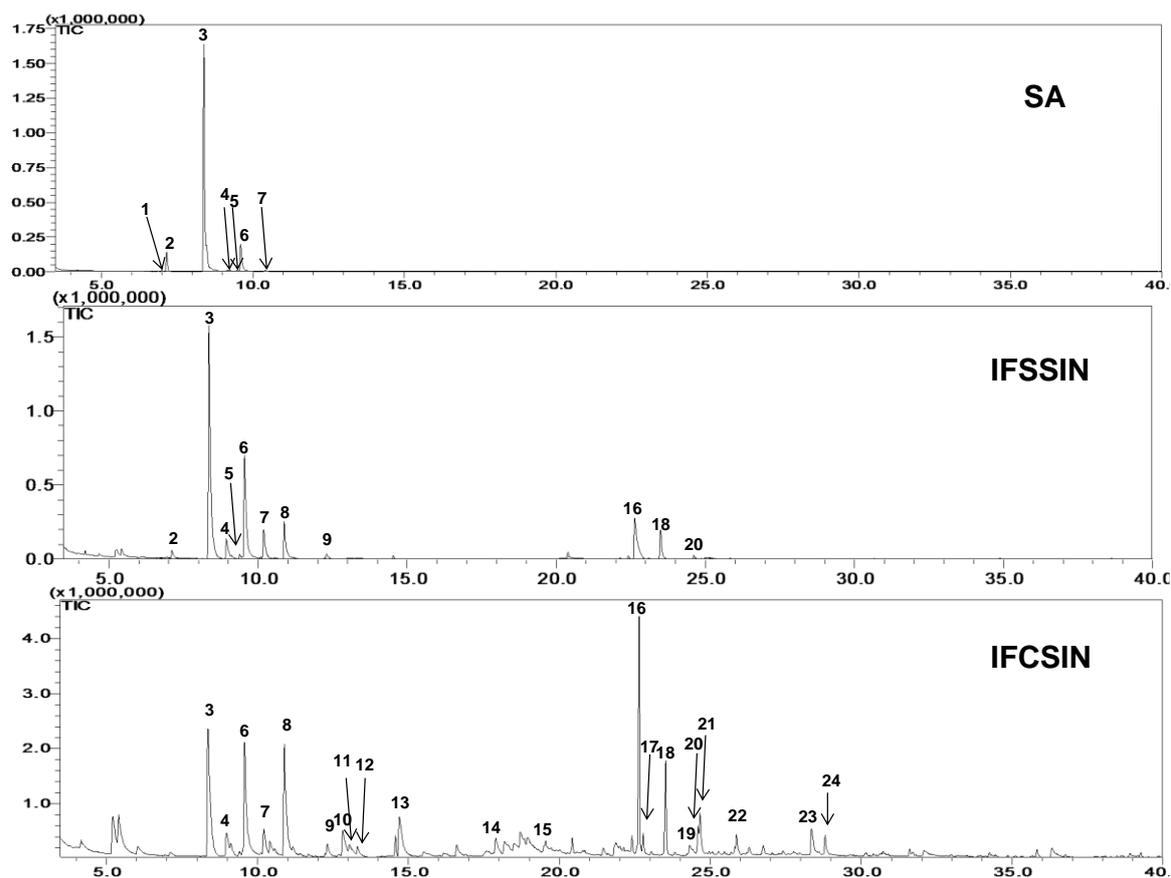


FIGURA 4.8 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA); infectada com *Xac* 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com *Xac* 306 e com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por “*headspace*” dinâmico-GC-MS. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5ms 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m); rampa de 50° C (1.5 min.) (4° C/min)-200° C (10° C/min)-250° C (5 min.). Injetor: 250° C, Detector: 280° C; He-1,2 mL/min.

TABELA 4.3 - Composição química dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA); infectada com *Xac* 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com *Xac* 306 e com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por “*headspace*” dinâmico-GC-MS.

Nº	Componentes	Vp	IR	IR-lit	% área do pico		
					SA	IFSSIN	IFCSIN
1	α -tujeno	-	921	924	0,31 \pm 0,13	nd	nd
2	α -pineno	4,02	926	932	5,08 \pm 1,29	0,58 \pm 0,50	nd
3	sabineno	-	967	969	80,51 \pm 0,98	49,35 \pm 4,73	18,46 \pm 2,35
4	β -mirreno	2,40	994	988	0,39 \pm 0,05	2,79 \pm 0,69	1,59 \pm 0,26
5	α -felandreno	1,91	1004	1002	0,22 \pm 0,12	0,25 \pm 0,03	0,21 \pm 0,03
6	δ -3-careno	-	1008	1008	12,72 \pm 1,44	16,53 \pm 4,03	10,68 \pm 2,25
7	limoneno	1,45	1031	1024	0,76 \pm 0,44	3,81 \pm 1,61	2,43 \pm 0,06
8	β -(E)-ocimeno	-	1046	1044	nd	3,55 \pm 3,30	12,24 \pm 0,68
9	<i>p</i> -menta-2,4,(8)-diene	-	1087	1085	nd	0,36 \pm 0,35	0,74 \pm 0,10
10	linalol	0,08	1105	1095	nd	nd	2,02 \pm 0,73
11	nonanal	0,56	1109	1100	nd	nd	0,13 \pm 0,22
12	perileno	-	1117	1102	nd	nd	0,16 \pm 0,28
13	citronelal	-	1156	1148	nd	nd	4,24 \pm 1,33
14	neral	-	1247	1235	nd	nd	0,91 \pm 0,97
15	<i>n</i> -tridecano	0,09	1300	1300	nd	nd	0,25 \pm 0,44
16	β -elemeno	-	1395	1389	nd	15,96 \pm 4,36	21,26 \pm 5,86
17	<i>n</i> -tetradecano	0,03	1399	1400	nd	nd	1,26 \pm 0,21
18	(E)-cariofileno	-	1423	1417	nd	6,40 \pm 2,00	7,45 \pm 1,55
19	benzoato de isoamila	0,01	1451	1433	nd	nd	0,67 \pm 0,58
20	α -cariofileno	-	1459	1452	nd	0,27 \pm 0,24	1,89 \pm 0,18
21	β -(E)-farneseno	0,03	1460	1454	nd	nd	3,70 \pm 0,47
22	<i>n</i> -pentadecano	0,01	1499	1500	nd	nd	1,17 \pm 0,19
23	cianeto de farnesila	-	1581	**	nd	nd	2,33 \pm 0,41
24	<i>n</i> -hexadecano	0,00	1600	1600	nd	nd	1,55 \pm 0,11
Total					100,00	99,85	95,33

Vp = pressão de vapor em 25 °C (mmHg) dos analitos calculados com o EPI Suite™ v4.10.

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

IR-lit = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

* = identificado pelo NIST Web Book, NIST MS Search 2.0 e/ou /www.pherobase.com.

** = tentativamente identificado pelo perfil do espectro de massas e em comparação com o espectro de massas do NIST MS Search 2.0.

nd = não detectado.

- = não determinado

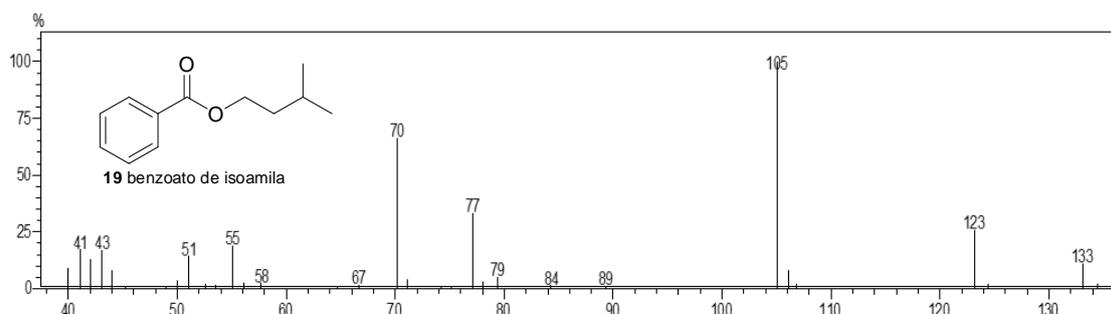


FIGURA 4.9 - Estrutura química do principal biomarcador volátil e seu espectro de massas necessário para diagnose do cancro cítrico em *C. sinensis* por “*headspace*” dinâmico-GC-MS.

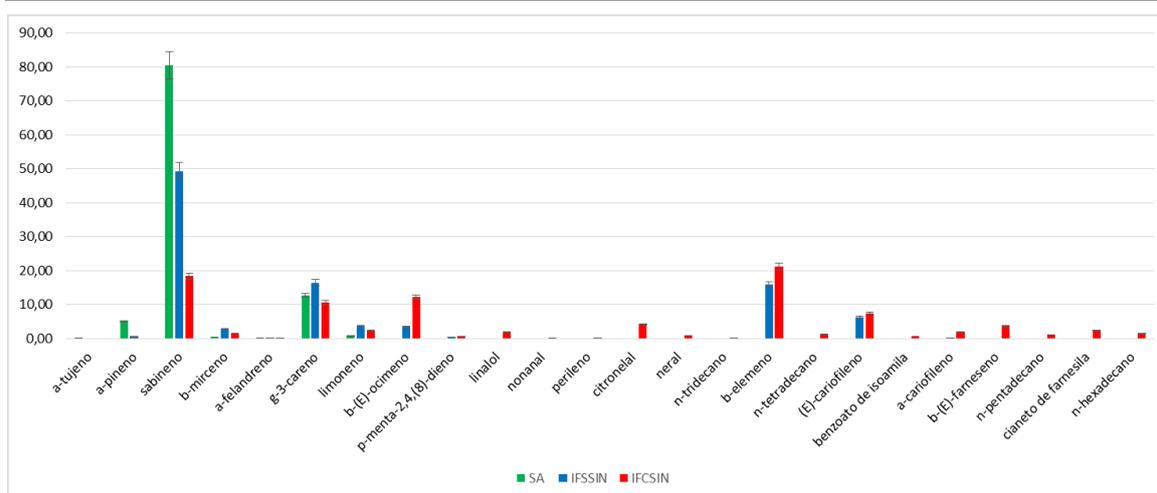


FIGURA 4.10 - Gráfico mostrando variação da composição química dos voláteis de *Citrus sinensis* sadia (SA); infectada com *Xac* 306, mas sem sintomas (IFSSIN) e infectada com *Xac* 306 e com sintomas do cancro cítrico (IFCSIN) obtidos por “*headspace*” dinâmico-GC-MS.

As análises por “*headspace*” dinâmico-GC-MS permitiram identificar alguns compostos voláteis produzidos pela bactéria *Xac in vitro* (FIGURA 4.11; 2.12 e TABELA 4.4). Por comparação com as análises do branco (meio de cultivo NBY sem a bactéria) foi possível detectar que os compostos voláteis majoritários são provenientes do meio de cultivo (picos codificados com a letra “m” na FIGURA 4.11). Não foi possível identificar os compostos m1 e m2, porém m3, m4 e m5 foram identificados como *m*-acetofenona de etila, *p*-acetofenona de etila e triacetina, respectivamente.

Como exposto nas FIGURAS 4.11, FIGURA 4.12 e TABELA 4.4, a bactéria produz: alguns derivados do benzeno (3-etil-benzaldeído, 4-etil-benzaldeído, *m*-acetil acetofenona, benzoato de isoamila e *p*-acetil acetofenona), alcanos lineares de série homóloga (*n*-tetradecano, *n*-pentadecano e *n*-hexadecano) e a amida hexadecanamida. Alguns desses compostos já tinham sido identificados nas análises das plantas na presença de *Xac* por HS-SPME e/ou “*headspace*” dinâmico, como por exemplo, benzoato de isoamila, *n*-tetradecano, *n*-pentadecano e *n*-hexadecano. Conforme seção 5.2.4.8, a hexadecanamida também foi isolada no estudo químico da bactéria buscando possíveis moléculas sinalizadoras. Isso confirma que esses compostos foram produzidos pela bactéria.

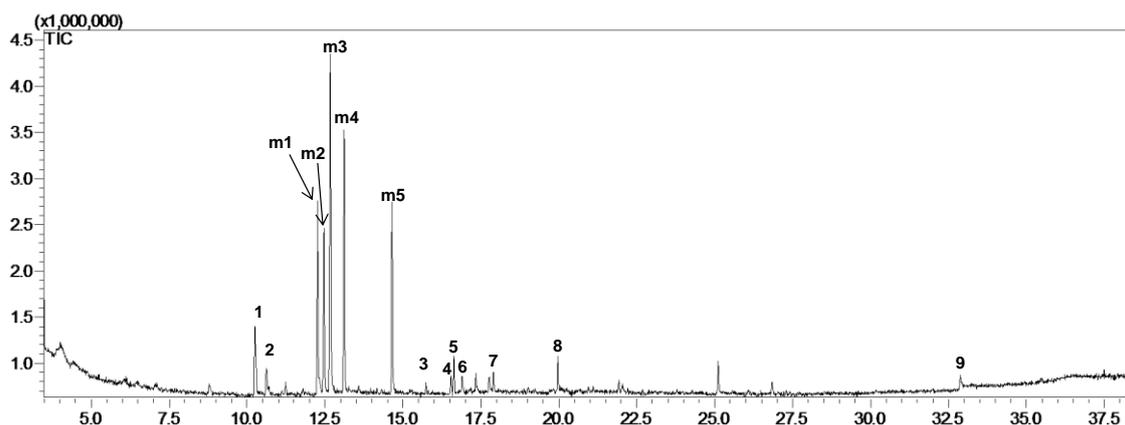


FIGURA 4.11 - Cromatograma de íons totais (TIC) dos voláteis de *Xac* 306, cultivada em NBY líquido, por “*headspace*” dinâmico-GC-MS. Condições cromatográficas: coluna Rtx-5ms 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 µm; rampa de 60° C (1.5 min.) (6° C/min)-270° C (2 min.). Injetor: 250° C, Detector: 280° C; He-1,2 mL/min.

TABELA 4.4 - Composição química dos voláteis de *Xac* 306, cultivada em NBY líquido, por “*headspace*” dinâmico-GC-MS.

Nº	Componentes				% área do pico
		Vp	IR	IR-lit	<i>Xac</i>
1	3-etil-benzaldeído	-	1165	1168*	5,84 ± 0,01
2	4-etil-benzaldeído	-	1181	1195*	1,63 ± 0,06
3	<i>n</i> -tetradecano	0,037	1400	1400	0,43 ± 0,13
4	<i>m</i> -acetil acetofenona	-	1437	**	1,24 ± 0,33
5	benzoato de isoamila	0,015	1441	1433	2,14 ± 0,24
6	<i>p</i> -acetil acetofenona	-	1454	1444	0,98 ± 0,10
7	<i>n</i> -pentadecano	0,015	1500	1500	1,14 ± 0,55
8	<i>n</i> -hexadecano	0,007	1600	1600	1,16 ± 1,00
9	hexadecanamida ^a	-	2194	2186*	0,95 ± 0,00
Total					15,50

Vp = pressão de vapor em 25 °C (mmHg) dos analítos foram calculados com o EPI Suite™ v4.10

a = identificação confirmada com padrão isolado em estudo químico da bactéria *Xac*, conforme seção 5.2.4.8.

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

IR-lit = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

* = identificado pelo NIST Web Book, NIST MS Search 2.0 e/ou www.pherobase.com.

** = tentativamente identificado pelo perfil do espectro de massas e em comparação com o espectro de massas do NIST MS Search 2.0.

- = não determinado

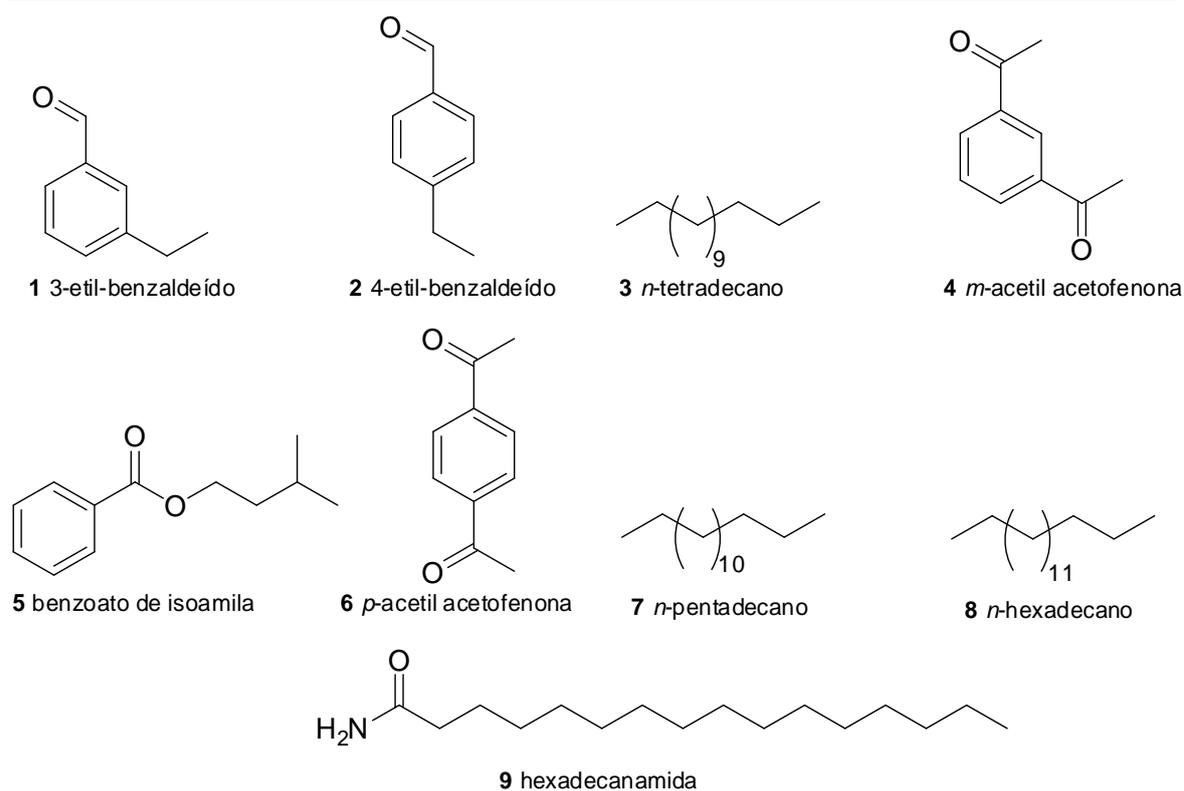


FIGURA 4.12 - Compostos voláteis identificados em *Xac* por “*headspace*” dinâmico-GC-MS.

A Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) amplifica uma determinada sequência do DNA (criação de múltiplas cópias), onde foi utilizado primers específicos 581-pb para a confirmação da espécie. O PCR da bactéria *Xac* 306 comprovou a identidade do micro-organismo utilizado no estudo (FIGURA 4.13).

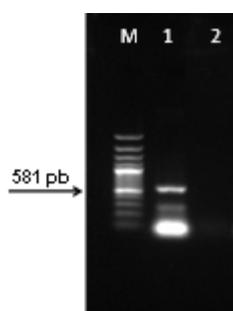


FIGURA 4.13 - Amplificação específica do alvo *Xac* PCR. M: Marcador de peso molecular 1kb plus NEOBIO; 1: Bactéria *Xac* 306; 2: Controle negativo. Seta indica o fragmento 581-pb específico para identificação da bactéria *Xac*.

4.2 - Perfil de macromoléculas biomarcadoras do cancro cítrico por MALDI-TOF/MS

Esta subparte do trabalho foi realizada com intuito de identificar a bactéria *Xac* por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz associada ao analisador de massas Tempo de Vôo (MALDI-TOF/MS), bem como avaliar a utilização desta técnica como ferramenta de diagnóstico do cancro cítrico por análise hierárquica de clusters (HCA) e pela detecção de macromoléculas produzidos pela planta por um mecanismo de defesa ou por interação planta-bactéria.

4.2.1 - Procedimentos experimentais

4.2.1.1 - Materiais e equipamentos

➤ **Materiais em geral**

- ✓ Eppendorf;
- ✓ Água Mili-Q;
- ✓ Acetonitrila;
- ✓ Ácido trifluoracético;
- ✓ α -ciano-4-hidroxicinâmico.

➤ **Equipamentos**

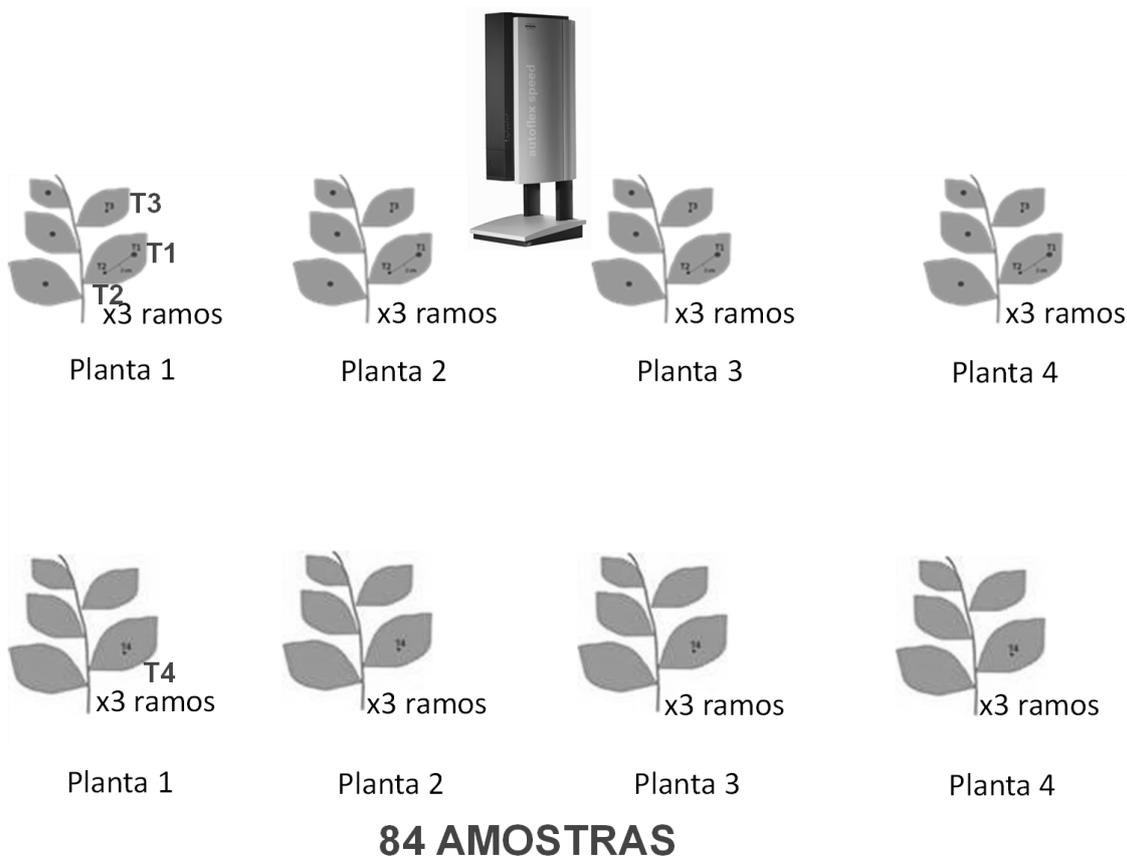
- ✓ Centrífuga Eppendorf 5804 R;
- ✓ Agitador magnético IKA VIBRAX VRX basic;
- ✓ MALDI-TOF/MS Autoflex Speed Bruker.

4.2.1.2 - Metodologia dos experimentos

4.2.1.2.1 - Planejamento experimental das plantas

Para realização do experimento foram utilizadas 4 plantas, sendo cada planta subdividida em 3 ramos, contendo os seguintes tratamentos: T1 (folhas inoculadas com a bactéria das plantas sintomáticas do cancro cítrico); T2 (região com lesão de algumas folhas a dois centímetros da inoculação T1 de cada ramo das plantas sintomáticas); T3 (uma folha com lesão de cada ramo das plantas sintomáticas); T4 (folhas somente com lesão das plantas sadias,

controle). Os tratamentos geraram um total de 84 amostras para extração das macromoléculas e análise por MALDI-TOF/MS (ESQUEMA 4.6).



ESQUEMA 4.6 - Planejamento experimental das plantas de *C. sinensis* para extração e análise das macromoléculas no MALDI-TOF/MS.

a) Procedimento para inoculação de *Xac* nas plantas

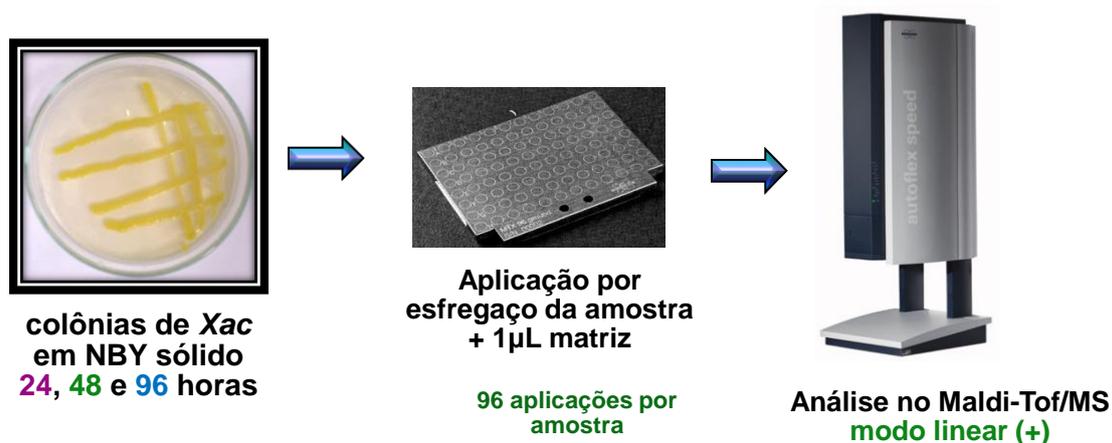
As inoculações foram realizadas com suspensão da bactéria *Xac* (concentração do inóculo de aproximadamente 10^8 ufc/mL) com auxílio de seringa com agulha a fim de simular o processo de infecção natural (bactérias que entram na planta através dos estômatos) (FIGURA 4.14). Os sintomas do cancro cítrico (c. c) foram marcados por qualquer modificação visual na lesão. Após 60 dias (tempo em que as plantas estavam infectadas pela bactéria, e os sintomas desenvolveram) as folhas foram coletas e congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até realização das extrações das macromoléculas para análise por MALDI-TOF/MS, conforme seção 4.2.1.2.3.



FIGURA 4.14 - Procedimento para inoculação da bactéria *Xac* nas folhas de *C. sinensis*.

4.2.1.2.2 - Identificação rápida de *Xac* por MALDI-TOF/MS

A bactéria *Xac* foi diagnosticada rapidamente por MALDI-TOF/MS, após cultura em NBY (Nutrient Broth Yeast) sólido por 24, 48 e 96 horas. Os experimentos foram realizados utilizando a metodologia de esgotagem direta (esfregaço) das placas contendo a bactéria após os períodos de cultivo. As condições da análise foram: solução matrix contendo α -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvido em 50% acetonitrila e 50% água contendo 0,2% ácido trifluoracético; aplicação de uma alçada da colônia e $\approx 1\mu\text{L}$ de solução matrix; média de 27 repetições (espotagens) por experimento (ESQUEMA 4.7).



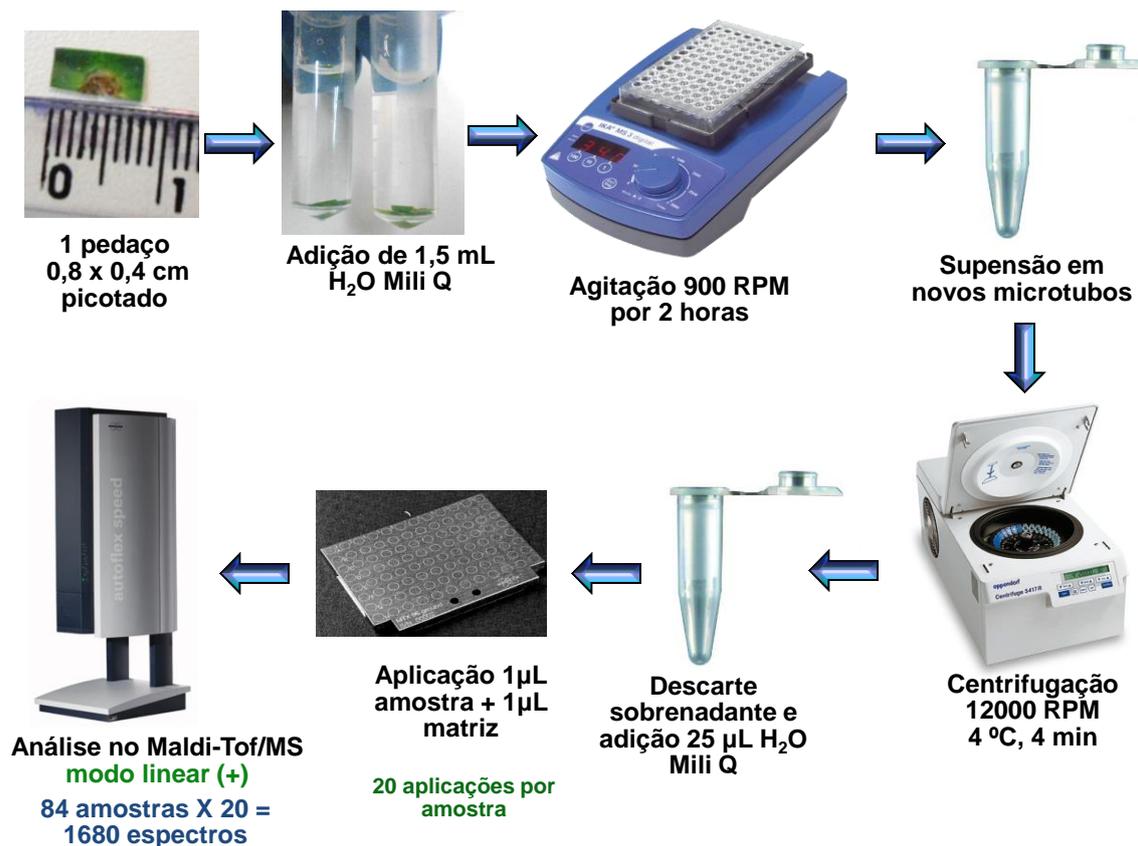
ESQUEMA 4.7 - Procedimento para diagnóstico de *Xac* por MALDI-TOF/MS.

4.2.1.2.3 - Metodologia para extração das macromoléculas

O perfil de macromoléculas das plantas sintomáticas do cancro cítrico e sadias, incluindo todos os tratamentos descritos na seção 4.2.1.2.1, foi analisada por MALDI-TOF/MS. Foi utilizada a metodologia de extração com agitação seguida de centrifugação para extração dos biomarcadores químicos (macromoléculas) na presença (folhas inoculadas com a bactéria das plantas sintomáticas do cancro cítrico, T1) e ausência (folhas somente com lesão das plantas sadias, T4) da bactéria. A metodologia de extração foi realizada seguindo os seguintes procedimentos: extração dos biomarcadores químicos cortando pequenos pedaços de cada folha ($\approx 0,8$ cm x $0,4$ cm), às quais foram colocadas em microtubos de 2 mL contendo 1,5 mL de água. Em seguida as amostras foram submetidas à agitação a 900 rpm por 2 horas em temperatura ambiente utilizando um agitador IKA VIBRAX VRX basic. A suspensão foi inserida para novos microtubos de 2 mL e centrifugada em 12000 RPM por 4 minutos em 4 °C em centrífuga eppendorf 5804 R. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 25 μ L de água Mili-Q (ESQUEMA 4.8).

A aplicação das amostras, sadias e com sintoma, foi realizada pipetando 20 μ L para serem aplicadas 1 μ L em cada poço da placa de Maldi. Após secagem, 1 μ L da solução matrix também foi aplicada em cada poço contendo as amostras. As soluções matrix foram preparadas com α -ciano-4-hidroxicinâmico dissolvido em 50% acetonitrila e 50% água contendo 0,2% ácido trifluoracético; média de 20 repetições (spotagens) por tratamento (ESQUEMA 4.8).

Os tratamentos T2 (região com lesão de algumas folhas a dois centímetros da inoculação T1 de cada ramo das plantas sintomáticas) e T3 (folhas com lesão de cada ramo das plantas sintomáticas) foram analisados seguindo os mesmos procedimentos descrito anteriormente.



ESQUEMA 4.8 - Metodologia de extração com agitação seguida de centrifugação para identificação dos biomarcadores químicos (macromoléculas) das plantas sintomáticas do cancro cítrico por MALDI-TOF/MS.

4.2.1.2.4 - Aplicação da metodologia de extração em amostras do campo

Um total de 44 amostras de folhas de *C. sinensis* em que o processo de infecção da bactéria *Xac* ocorreu naturalmente no campo (sem o procedimento de inoculação artificial já descrito na seção 4.2.1.2.1a) foram selecionadas para extração das macromoléculas, análise por MALDI-TOF/MS e agrupamento estatístico, seguindo as mesmas metodologias das amostras artificiais. 44 amostras de folhas sadias foram utilizadas como controle. As amostras foram coletadas no dia 17/07/2014 na Unidade de Desenvolvimento Tecnológico da Cocamar, município de Guairaçá, Estado do Paraná, sendo que o transporte foi realizado após armazenamento das mesmas em caixa térmica de isopor.

4.2.1.2.5 - Análise multivariada e parâmetros do MALDI

A análise hierárquica de agrupamento (HCA) foi realizada utilizando o método linkage average com o programa MALDI Biotyper, usando os seguintes parâmetros: Distance Measure (correlation); Max. Number of topel level nodes (0); Score oriented dendrogram (marked); Score threshold value of single organism (300); Score threshold value for related organism (0). Os MSPs (MALDI BioTyper® Main Spectra) dos espectros das 84 amostras artificiais (tratamentos T1, T2, T3 e T4) e das 88 amostras do campo foram criados, inclusive dos espectros da *Xac* cultivada em 48 horas, e os mesmos foram utilizados para HCA. Para confirmar o agrupamento das amostras artificiais sintomáticas do cancro cítrico, 4 MSPs de todos os espectros de cada tratamento (T1, T2, T3 e T4) foram criados separadamente.

4.2.1.2.6 - Diagnóstico por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

A confirmação definitiva da presença da bactéria nas plantas *Citrus sinensis* foi realizada por meio da técnica Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Uma região específica das folhas das respectivas plantas (1 folha para cada planta sadia e 1 folha para cada planta infectada com sintoma) foi recortada para análise e extração do DNA genômico total (planta + bactéria ou planta somente) conforme adaptação de MURRAY e THOMPSON (1980), DELLAPORTA et al., 1983 e COLETA-FILHO et al., 2006 e realizando a análise de PCR (“polymerase chain reaction” - reação em cadeia pela polimerase) dos extraídos a fim de verificar a presença ou não do micro-organismo. Mediante auxílio de um pistilo de porcelana, os cortes de folhas foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos assepticamente para microtubos de 1,5 mL, contendo 600 µL de tampão de extração (NaCl 0,5 M; EDTA 0,05 M; Tris-HCl 0,1 M; pH 8,0; β-mercapoetanol 0,2%). Após maceração foi adicionado em cada microtubo 50 µL de SDS 20%, seguindo-se agitação durante um minuto e incubação a 60 °C por 15 minutos. Posteriormente adicionou-se 300 µL de acetato de sódio 5 M, agitou-se por um minuto e a mistura obtida foi lavada para

centrifugação a 14000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, 400 µL do sobrenadante, obtidos da centrifugação, foram transferidos para novos microtubos contendo 400 µL de isopropanol. Uma breve agitação foi realizada nos microtubos e, em seguida, foram levados para centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente do microtubo e junto ao precipitado foram introduzidos 500 µL de etanol 70% em cada tubo. Os microtubos foram submetidos à nova centrifugação a 14000 rpm durante 5 minutos. Por fim todo o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água Milli Q autoclavada para obter o DNA da bactéria (ESQUEMA 4.9).



ESQUEMA 4.9 - Procedimento para identificação e extração do DNA de *Xac* da planta e diagnóstico do cancro cítrico por PCR. NL=Nitrogênio Líquido; Tampão de extração=NaCl 0,5 M; EDTA 0,05 M; Tris-HCl 0,1 M; pH 8,0; β -mercapoetanol 0,2%; Acetato de sódio 5 M; Isopropanol armazenado em congelador -20°C.

Reações de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) foram realizadas para amplificação do gene *atpD* (subunidade F₁-F₀ da síntese do ATP) “housekeeping genes”. Amplificações do gene *atpD* foi conduzida com os iniciadores (Primers), 5'-GGG CAA GAT CGT TCA GAT-3' e 5'-GCT CTT GGT CGA GGT GAT-3', descritos por AH-YOU e colaboradores (2009). As reações foram realizadas em 50 µL (volume final), com 1 U de enzima DNA polimerase de

alta fidelidade (Phusion, Finnzymes), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador e 50 ng de DNA genômico. O programa utilizado para as ampliações foi realizada seguindo a programação: 98°C/30 s; 35 ciclos a 98°C/10 s, 68°C/15 s e 72°C/15 s; e 72°C/10 min. Todas as ampliações foram realizadas em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler. Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,1 Pg/mL), visualizados em luz ultravioleta e fotodocumentado.

4.2.2 - Resultados e Discussão

As análises por MADL-TOF de *Xanthomonas axonopodis pv. citri* (Xac 306) permitiram identificar a bactéria em nível de gênero com garantia e em nível da espécie *Xanthomonas axonopodis* com boa probabilidade nas colônias provenientes de 48 horas de cultivo (espotagens e identificações em verde) (FIGURAS 4.15b e 4.16b). Em algumas repetições (espotagens), a identificação se deu apenas em nível de gênero com boa probabilidade (espotagens e identificações em amarelo) (FIGURA 4.16b). Quando a bactéria foi cultivada por 24 horas, em apenas uma repetição (espotagem) foi possível realizar a identificação em nível de gênero com boa probabilidade (espotagem em amarelo) (FIGURA 4.16a), porém nas demais espotagens não foi possível identificar confiavelmente a bactéria em nível de gênero nem de espécie (espotagens e identificações em vermelho) (FIGURAS 4.15a e 4.16a). O mesmo foi observado quando a bactéria foi cultivada por 96 horas (FIGURAS 4.15c e 4.16c). Isso se justifica pelo fato de Xac 306 atingir a fase estacionária de crescimento no meio NBY em 48 horas de cultivo, por isso levou a um espectro com muitos íons (FIGURA 4.15b), os quais são similares aos de "*Xanthomonas axonopodis*" (FIGURA 4.16b).

Busca de biomarcadores voláteis e macromoléculas em *C. sinensis* (L.) Osbeck sadia e inoculada com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

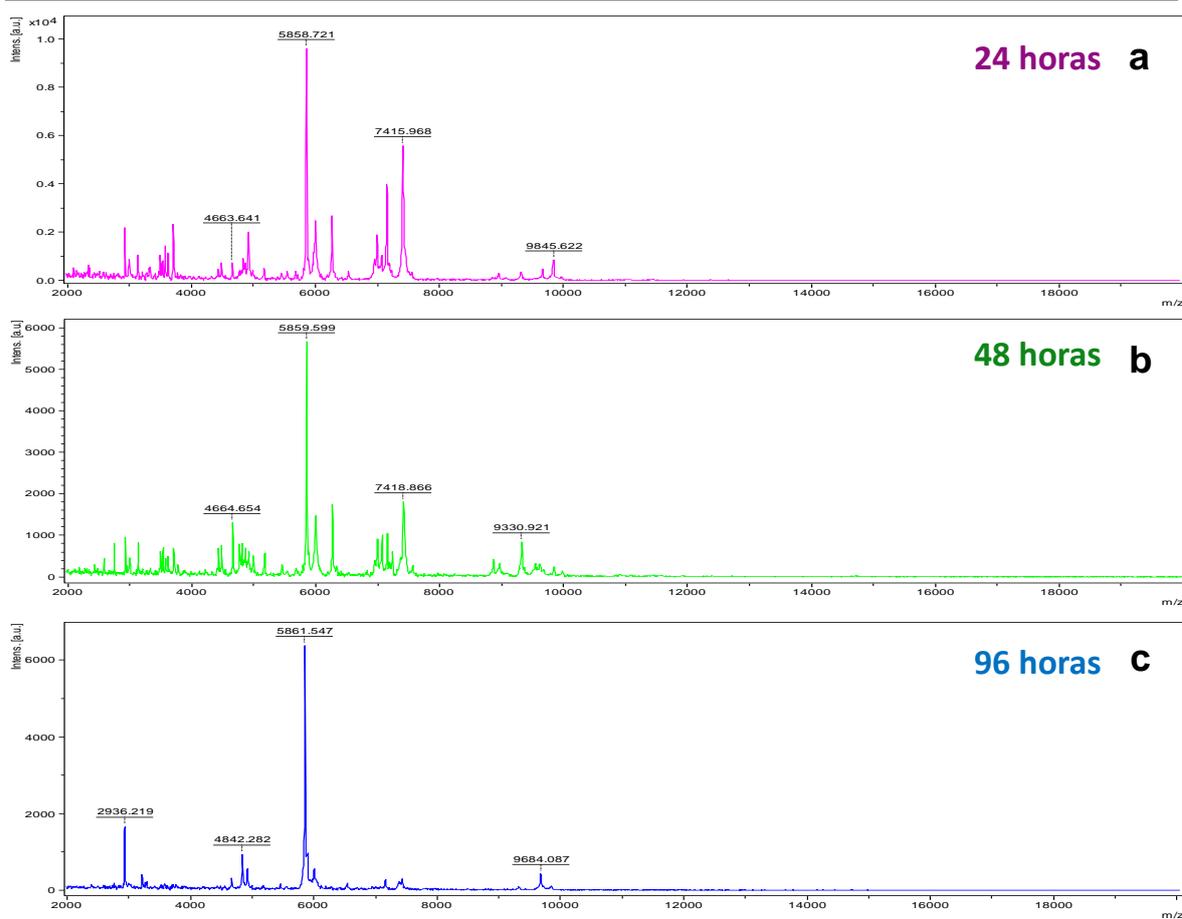


FIGURA 4.15 - Perfil de macromoléculas de *Xac* necessário para a identificação da bactéria por MALDI-TOF/MS.

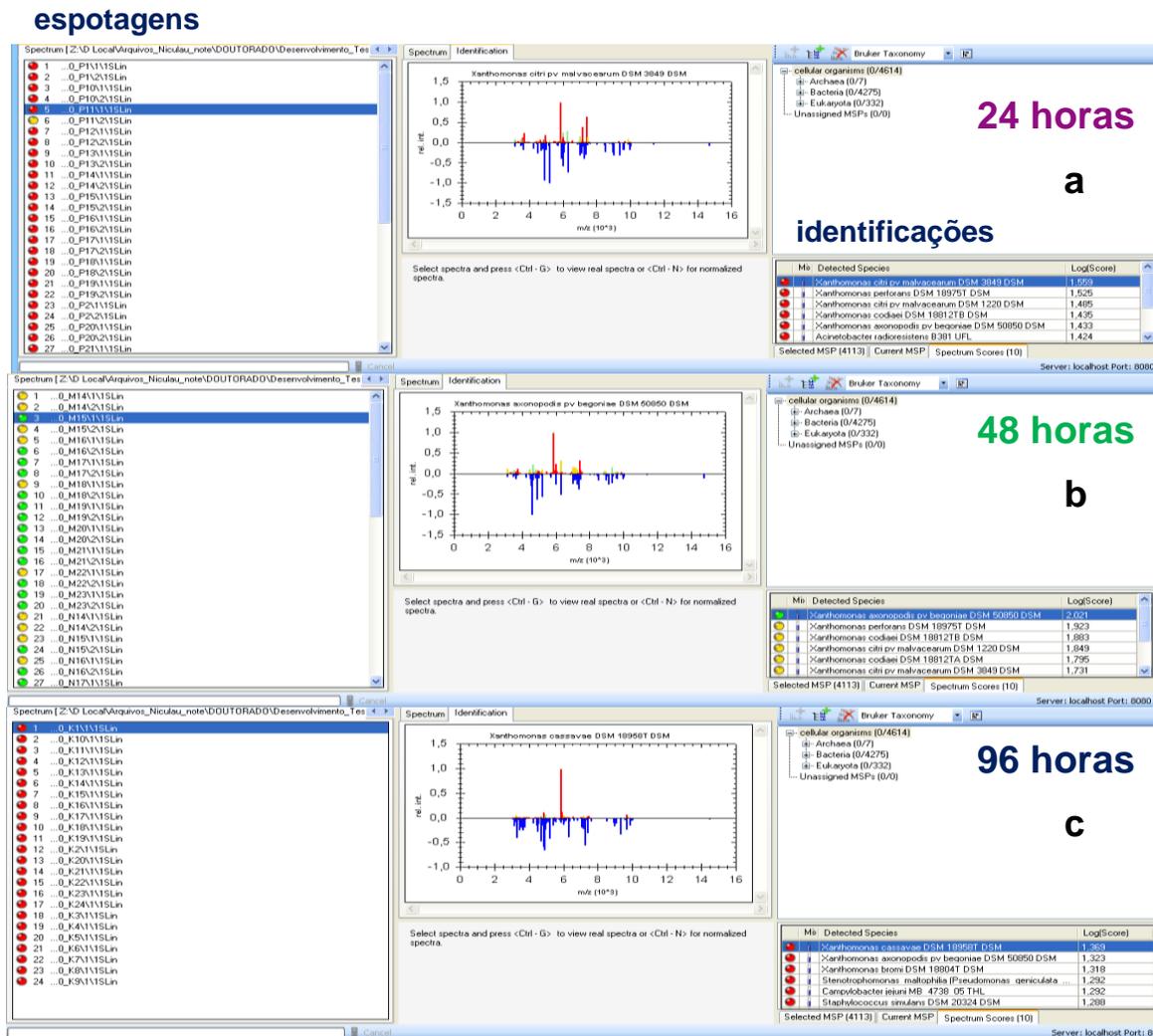


FIGURA 4.16 - Diagnóstico de *Xac* por MALDI-TOF/MS, utilizando o software MALDI Biotyper.

Espectros de massas representativos das amostras de folhas em que o processo de inoculação foi realizado artificialmente estão descritos nas FIGURAS 4.17a e 4.17b. Alguns sinais das macromoléculas extraídas dos tratamentos em que foram inoculadas a bactéria (folhas com sintoma) (FIGURA 4.17b) foram diferenciadas das análises dos tratamentos das plantas sadias (FIGURA 4.17a), porém as mesmas diferenças não ocorreram em todas repetições. Em algumas repetições, foi possível observar, principalmente, íons presentes apenas nas plantas sintomáticas (em vermelho) e íons característicos da bactéria *Xac* cultivada por 48 h (em azul).

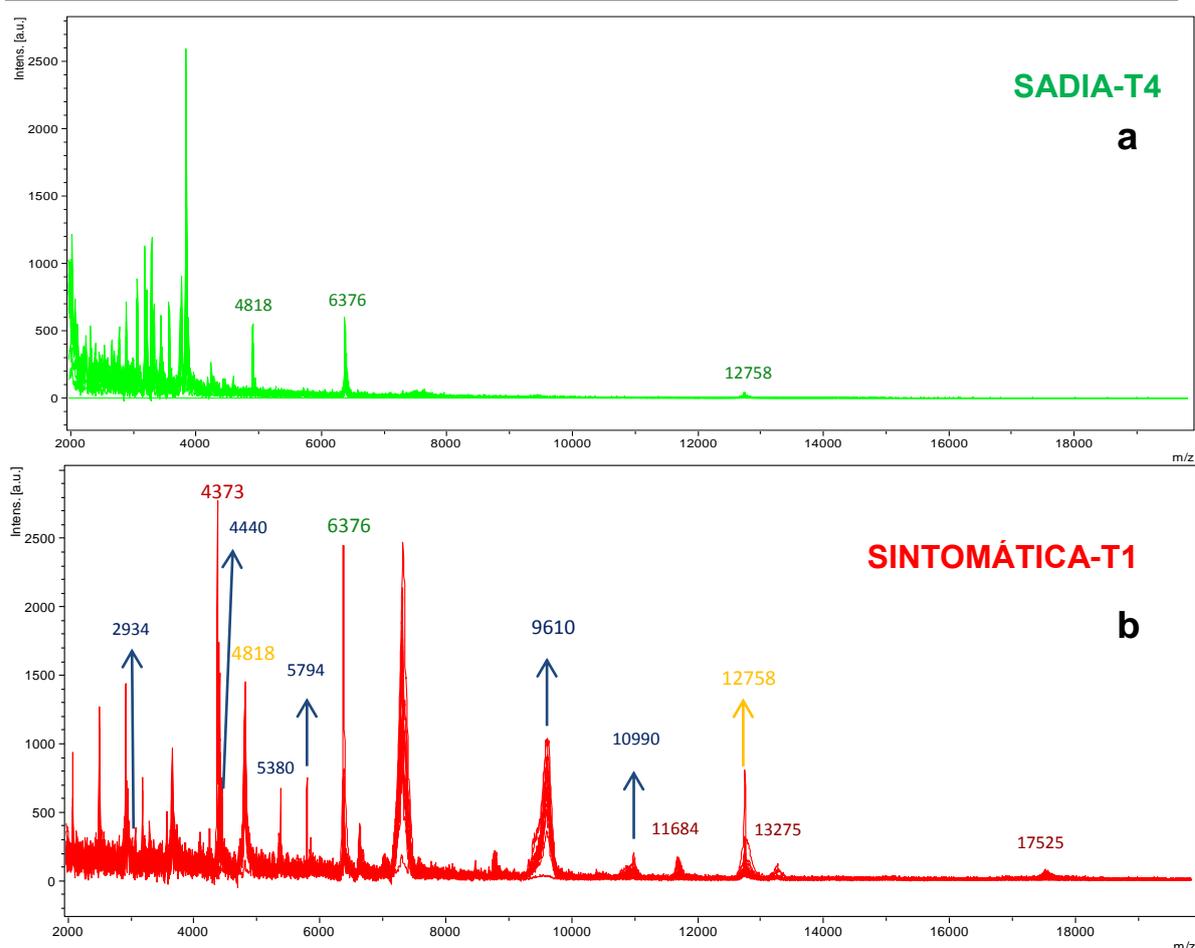


FIGURA 4.17 - Principais íons (macromoléculas biomarcadoras) que caracterizam a presença da bactéria em plantas sintomáticas do cancro cítrico. Sadia-T4 (uma folha da planta sadia), Sintomática-T1 (uma folha da planta sintomática). Em verde (íons presentes nas plantas sadias e sintomáticas); em vermelho (íons presentes apenas nas plantas sintomáticas); em azul (íons presentes apenas nas plantas sintomáticas e na bactéria *Xac* após 48 h de cultivo), em laranjeira pêra (íon presente nas plantas sadias, sintomáticas e em *Xac* após 48 h de cultivo. Obs: Os espectros das figuras acima são sobreposições de 20 espectros de uma amostra sadia e 20 espectros de uma amostra sintomática.

Os MSPs (MALDI BioTyper® Main Spectra) contendo os espectros das 84 amostras das folhas das plantas e de *Xac* cultivada por 48 horas foram criados para realização da análise hierárquica de agrupamentos (HCA) (FIGURAS 4.18 a 4.20). Houve a formação de 4 grupos no nível de distância em 500, sendo possível diferenciar a maior parte das amostras contendo os tratamentos com inoculação da bactéria (códigos iniciando com PC e terminando com T1) dos

tratamentos em que não foram inoculadas a bactéria (códigos iniciando com PS e terminando com T4). No entanto, o HCA não diferenciou estatisticamente os tratamentos com códigos finalizando em T2 (região com lesão de algumas folhas a dois centímetros da inoculação T1 de cada ramo das plantas sintomáticas) e T3 (uma folha com lesão de cada ramo das plantas sintomáticas) (FIGURAS 4.18 a 4.20).

Quando a análise estatística foi realizada somente com os MSPs dos tratamentos T1; T2; T3 e T4, foi possível comprovar que o HCA diferenciou claramente o tratamento T1 (contendo as amostras de folhas com sintoma do cancro cítrico) dos demais tratamentos, sendo que os tratamentos T2; T3 e T4 agruparam-se em um único grupo (FIGURA 4.21).

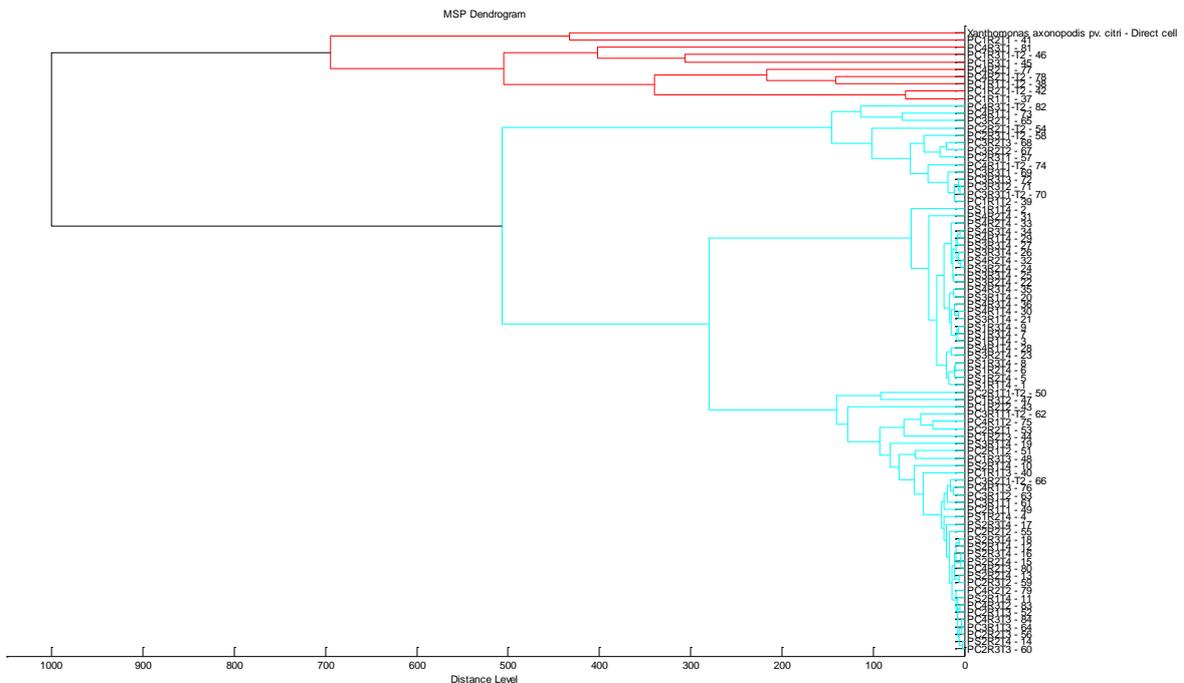


FIGURA 4.18 - Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 84 amostras (tratamentos T1, T2, T3 e T4) e de Xac cultivado em 48 horas. T1 = folhas das plantas com sintomas do cancro cítrico; T4 = folhas das plantas sadias; T2 = região da lesão com seringa a 2 cm da inoculação da bactéria nas folhas das plantas com sintoma; T3 = Folhas com lesão feita com seringa somente.

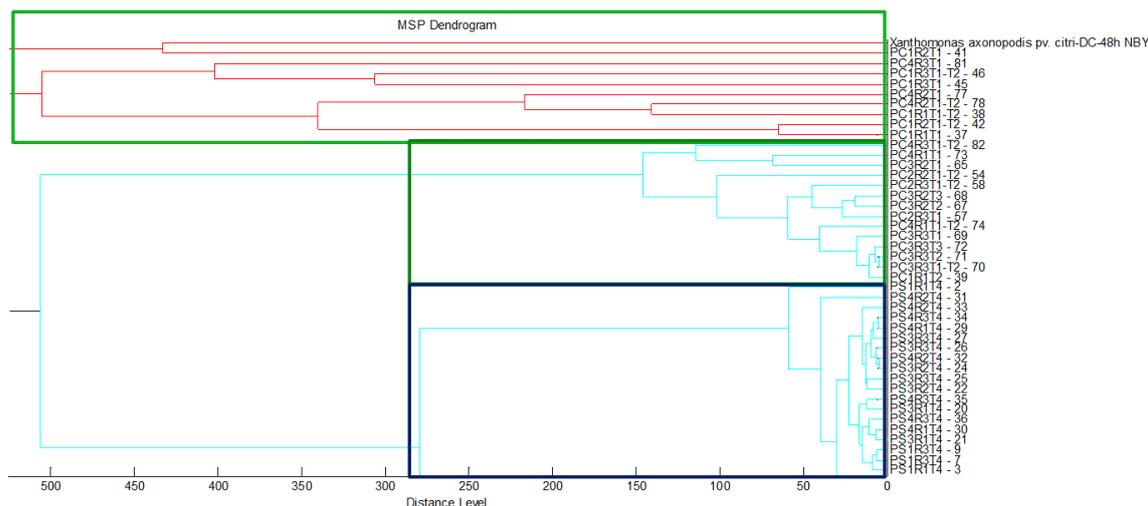


FIGURA 4.19 - Ampliação e grupos da análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 84 amostras (tratamentos T1, T2, T3 e T4) e de Xac cultivado em 48 horas. T1 = folhas das plantas com sintomas do cancro cítrico; T4 = folhas das plantas sadias; T2 = região da lesão com seringa a 2 cm da inoculação da bactéria nas folhas das plantas com sintoma; T3 = Folhas com lesão feita com seringa somente.

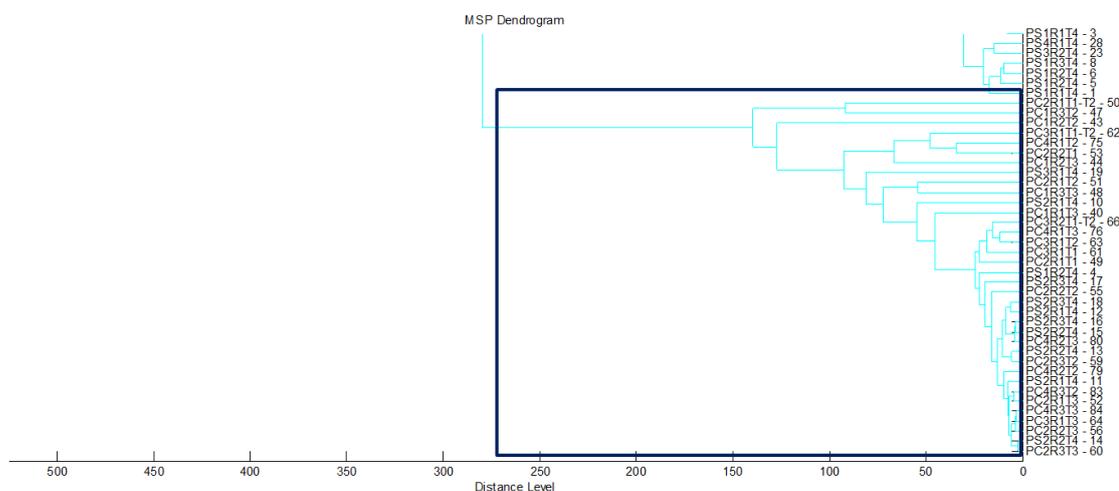


FIGURA 4.20 - Ampliação e grupos da análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 84 amostras (tratamentos T1, T2, T3 e T4) e de Xac cultivado em 48 horas. T1 = folhas das plantas com sintomas do cancro cítrico; T4 = folhas das plantas sadias; T2 = região da lesão com seringa a 2 cm da inoculação da bactéria nas folhas das plantas com sintoma; T3 = Folhas com lesão feita com seringa somente.

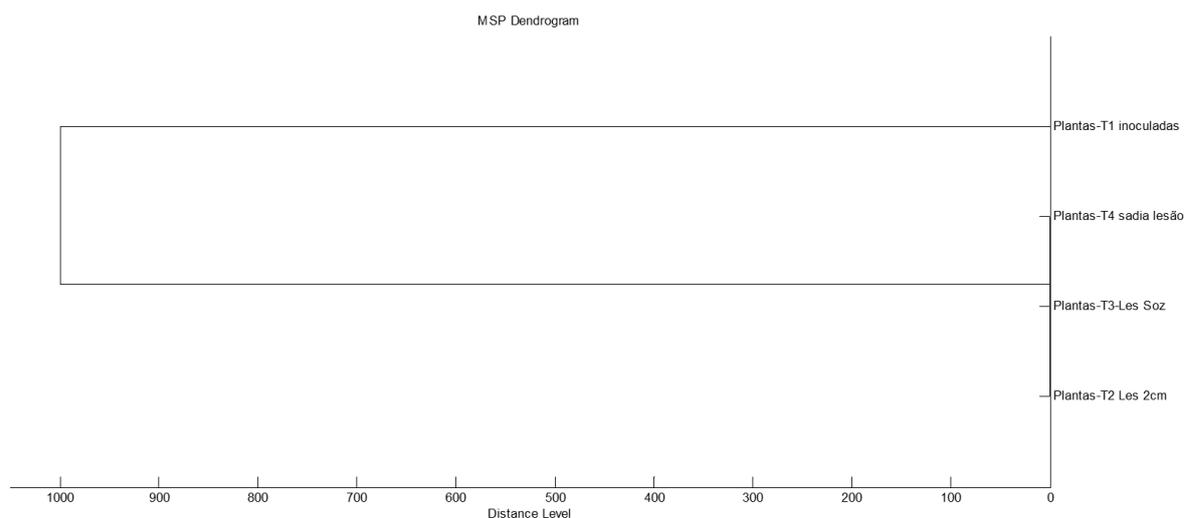


FIGURA 4.21 - Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) dos tratamentos T1, T2, T3 e T4. T1 = folhas das plantas com sintomas do cancro cítrico; T4 = folhas das plantas sadias; T2 = região da lesão com seringa a 2 cm da inoculação da bactéria nas folhas das plantas com sintoma; T3 = Folhas com lesão feita com seringa somente.

A análise estatística, HCA, nas 88 amostras de folhas oriundas do campo (44 sadias e 44 com sintoma em que o processo de infecção ocorreu naturalmente) está ilustrada nas FIGURAS 4.22 e 4.23. Houve a formação de dois grupos, no nível de distância máximo, sendo possível diferenciar o tipo de amostra com uma probabilidade estatística de 100% para as 88 amostras aplicadas. O agrupamento mostrou claramente que as amostras de folhas sintomáticas agruparam-se em outro grupo diferente das amostras de folhas sadias. MSP de *Xac* cultivada por 48 horas agrupou junto com grupo das folhas sintomáticas (FIGURA 4.23). Esses resultados sugerem que a técnica MALDI-TOF/MS pode ser utilizada para diagnóstico rápido do cancro cítrico em folhas de L. Pêra.

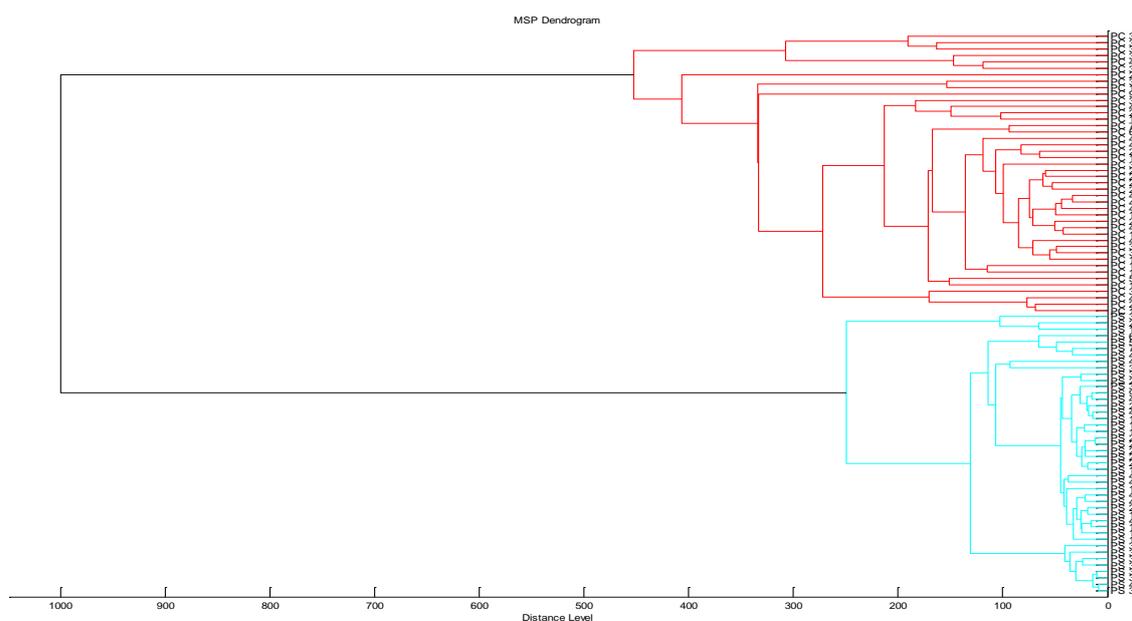


FIGURA 4.22 - Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 88 amostras de folhas de *C. sinensis* do campo. Grupo em vermelho e preto representa as amostras de folhas com sintoma do cancro cítrico (códigos iniciando em PC); grupo em azul representa as amostras de folhas do campo sadias (códigos iniciando em PS).

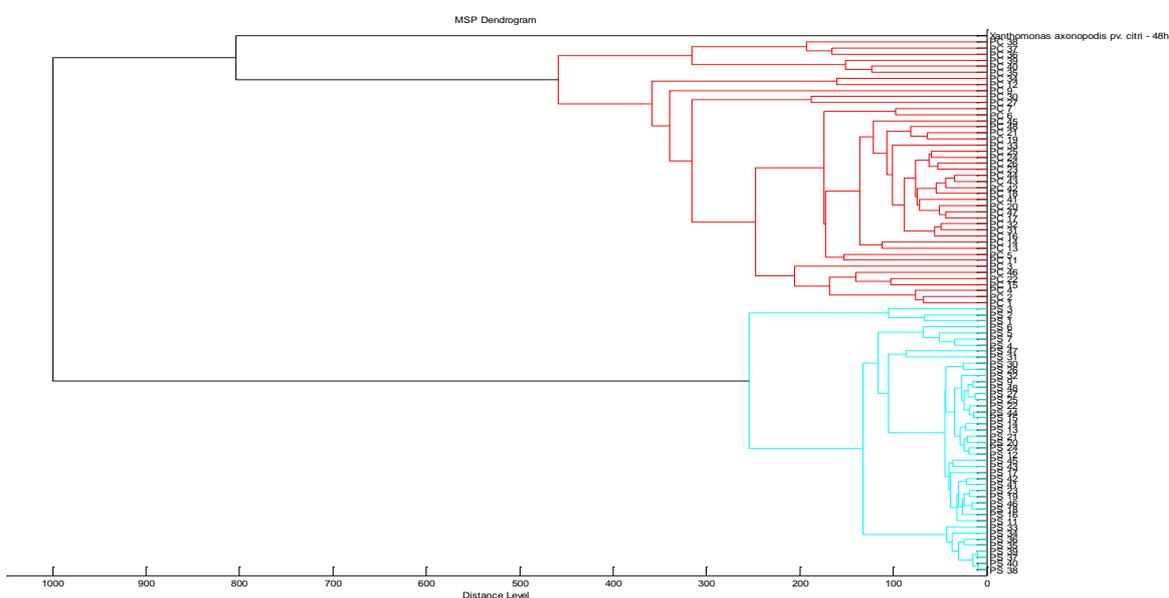


FIGURA 4.23 - Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) das 88 amostras de folhas de *C. sinensis* do campo e *Xac* cultivada por 48 horas. Grupo em vermelho e preto representa as amostras de folhas com sintoma do cancro cítrico (códigos iniciando em PC) e *Xac* cultiva por 48 horas, respectivamente; grupo em azul representa as amostras de folhas do campo sadias (códigos iniciando em PS).

O diagnóstico do cancro cítrico foi realizado por PCR utilizando aleatoriamente 1 folha de cada planta (em que a bactéria foi inoculada) com sintomas do cancro cítrico. Folhas das plantas saudias foram utilizadas para comparação. A amplificação do fragmento 747 pb, referente ao gene *atpD* (subunidade F₁-F₀ da síntese do ATP) (fragmento específico da região do DNA de *Xac*), mostra a presença da bactéria nas folhas sintomáticas, comprovando a identidade da bactéria em estudo (FIGURA 4.24).

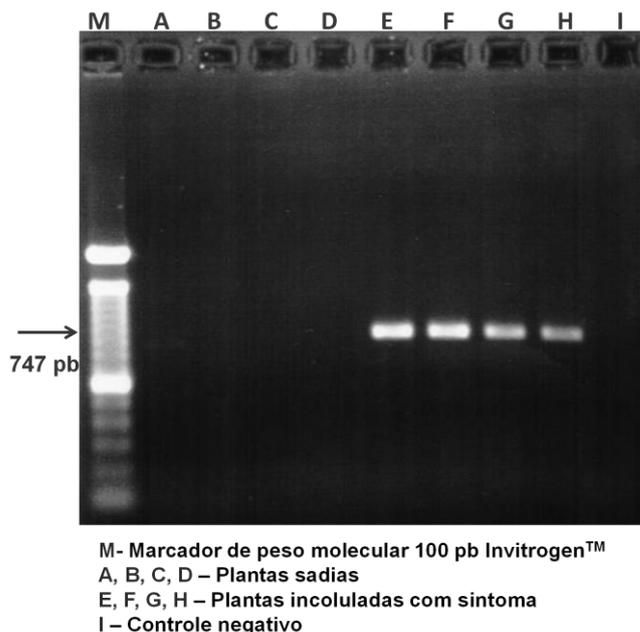


FIGURA 4.24 - Diagnóstico do cancro cítrico, por PCR, das plantas utilizadas nos experimentos com o MALDI-TOF/MS.

5 - Parte 2: Estudo químico da bactéria X. axonopodis pv. citri buscando isolar e/ou identificar possíveis compostos sinalizadores

Esta parte do trabalho refere-se ao estudo químico da linhagem selvagem de Xac 306, visando conhecer a química da bactéria isolando e/ou identificando possíveis “moléculas” sinalizadoras, assim como outros compostos importantes produzidos pelo micro-organismo.

5.1 - Procedimentos experimentais

5.1.1 - Materiais e equipamentos

➤ **Materiais em geral**

- ✓ Beckers, Erlenmeyers e Tubos Falcon 50 mL;
- ✓ Colunas HPLC analítica Agilent SB-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula); Phenomexex Luna® Phenyl-Hexyl (150 x 4,6 mm, 10 µm de tamanho de partícula) e Phenomex Gemini® C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula);
- ✓ Coluna HPLC semi-preparativa Phenomexex Luna® Phenyl-Hexyl (250 x 7,0 mm, 10 µm de tamanho de partícula);
- ✓ Filtros com membrana PVDF e PTFE 0,45 e 0,22 µm;
- ✓ Pipetadores semi-automáticos Gilson;
- ✓ Papel de filtro INLAB tipo 10, porosidade 3,0 µm;
- ✓ Solventes comerciais destilados no DQ – UFSCar;
- ✓ Solventes Deuterados da Merck e Aldrich 98-99,9%;
- ✓ Solventes grau HPLC.

➤ **Materiais e reagentes utilizados para o isolamento, identificação, cultivo e conservação do micro-organismo Xac**



Estes materiais e reagentes foram os mesmos descritos na seção 4.1.1.1.

➤ **Equipamentos**

- ✓ Autoclave vertical Phoenix AV 75;

- ✓ Balanças analítica e semi-analítica, BEL ENGINEERING e outra Balança Analítica Sartorius modelo BP 210S;
- ✓ Câmara de Fluxo Laminar Veco VL FS-12M;
- ✓ Centrífuga com sistema de refrigeração, Eppendorf modelo 5810R;
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu modelo SCL-10A VP com válvula para reciclo, com injetor Rheodyne modelo 7725i e bomba Shimadzu modelo LC-10AD. Detector UV-Vis;
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e detector de Ultravioleta G1314B. O equipamento está acoplado a uma interface G1369A e os cromatogramas foram registrados através do software EZCrom Elite;
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker), DRX 400 Bruker (9,4 Tesla);
- ✓ Evaporador rotatório BUCHI, rotavapor R-114 e R-200, equipado com banho BUCHI B-480 e 490, respectivamente. Recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- ✓ LC-MS/MS: Agilent Technologies 1200 acoplado a um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo, modelo API 2000 (Applied Biosystems MDS SCIEX), foi utilizada a ESI como fonte de ionização;
- ✓ Cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP5000;
- ✓ Espectrofotômetro FEMTO 700 Plus;
- ✓ Estufa Incubadora (B.O.D.) Fanem – 347 CD;
- ✓ Microscópio binocular modelo L.2000A;
- ✓ Purificador de água por Osmose Reversa, modelo PRO 4000, KEMFLO.

5.1.2 - Metodologia dos experimentos

5.1.2.1 - Procedimento para cultivo da bactéria e obtenção do sobrenadante e células bacterianas

Os experimentos de cultivo da bactéria foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar. A bactéria, a

qual foi cedida pelo Dr. Marcos Antônio Machado, foi recuperada de cultura permanente (preservada em glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), cultivada em meio sólido NBY (contendo por litro 5,0 g peptona, 3,0 g extrato de carne, 2,0 g extrato de levedura, 2,0 g K_2HPO_4 , 0,5 g KH_2PO_4 e 16 g de ágar bacteriológico) e repicada para NBY líquido (contendo por litro 5,0 g de peptona fitona, 3,0 g de extrato de carne, 2,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de K_2HPO_4 e 0,5 g KH_2PO_4 em $\text{pH} = 7,2$). Após os cultivos bacterianos em larga escala atingirem a fase estacionária de crescimento (aproximadamente $\text{DO}_{600\text{nm}} = 2,0$), encontrando-se em maior nível populacional, o meio contendo a massa bacteriana foi centrifugado a 12.000 RPM a 4°C por 10 minutos a fim de obter o sobrenadante e as células bacterianas (ESQUEMA 5.1).

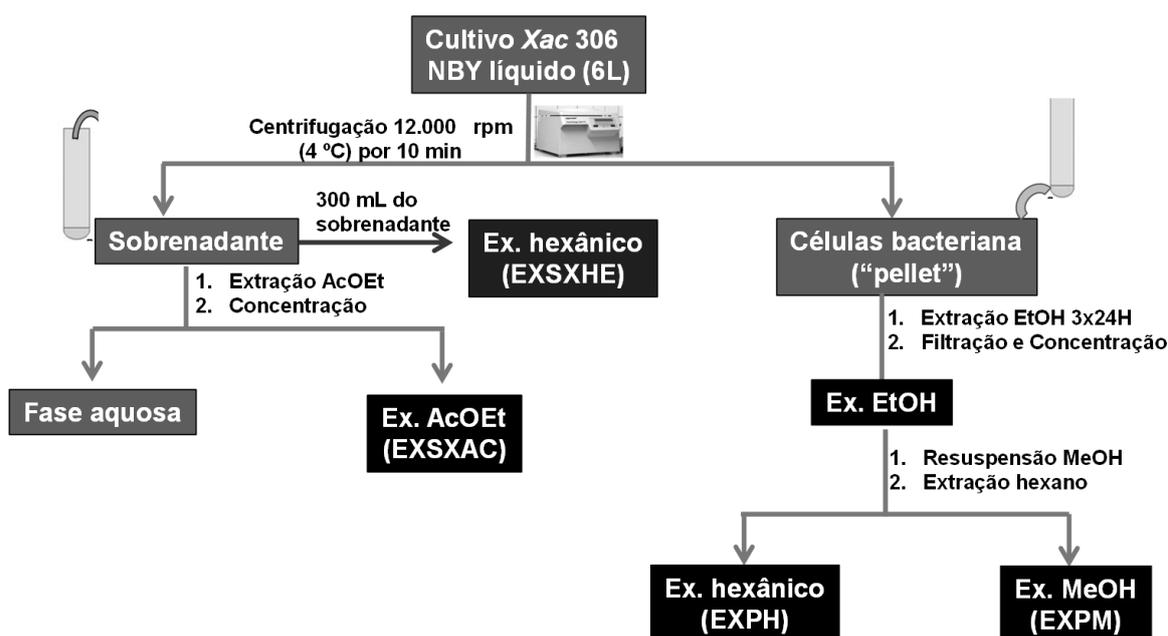


ESQUEMA 5.1 - Procedimento para obtenção do sobrenadante e células bacterianas.

5.1.2.2 - Obtenção e fracionamento dos extratos do sobrenadante e das células da bactéria cultivada em meio NBY

O sobrenadante foi avaliado pelo processo de extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos comerciais. Primeiramente, foi separada uma alíquota do sobrenadante (300 mL) e a mesma foi submetida à extração

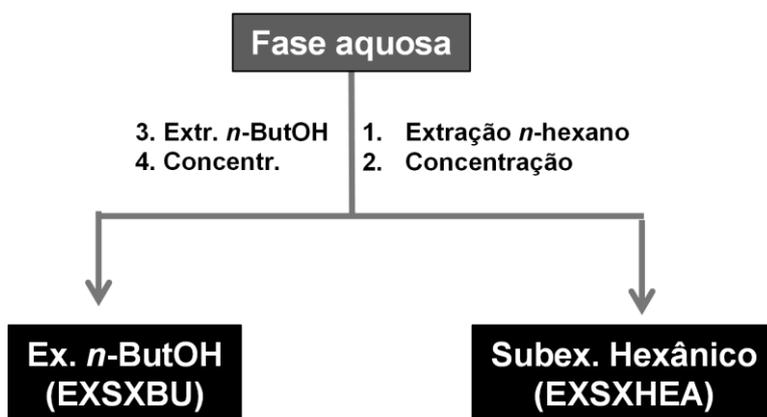
líquido-líquido com hexano, que após concentração em rotaevaporador gerou o extrato codificado **EXSXHE**. O restante do sobrenadante foi extraído com acetato de etila, gerando o extrato denominado **EXSXAC** (ESQUEMA 5.2). O resíduo celular (células bacterianas) foi colocado em etanol e submetido à extração por três vezes sucessivas, sendo cada extração com intervalo de 24 horas. Posteriormente, foi realizada a concentração em rotaevaporador de todas as extrações, dando origem ao extrato etanólico que foi ressuscitado em MeOH e extraído com hexano para gerar os extratos denominados **EXPH** e **EXPM** das células bacterianas (ESQUEMA 5.2 e TABELA 5.1).



ESQUEMA 5.2 - Obtenção dos extratos do sobrenadante e das células bacterianas.

5.1.2.2.1 - Fracionamento da fase aquosa

A fase aquosa foi particionada com hexano para obtenção do subextrato denominado **EXSXHEA** (ESQUEMA 5.3). Esta etapa de extração foi realizada com o intuito de extrair alguns compostos apolares que não apresentaram um bom coeficiente de partição em acetato de etila e também para ser possível avaliar o perfil de alguns compostos solúveis na fase aquosa por GC-MS. Da fase aquosa residual foi realizada uma extração com *n*-butanol gerando o extrato denominado **EXSXBU**, porém o estudo deste extrato não foi iniciado (ESQUEMA 5.3.).



ESQUEMA 5.3 - Fracionamento da fase aquosa do sobrenadante de *Xac*.

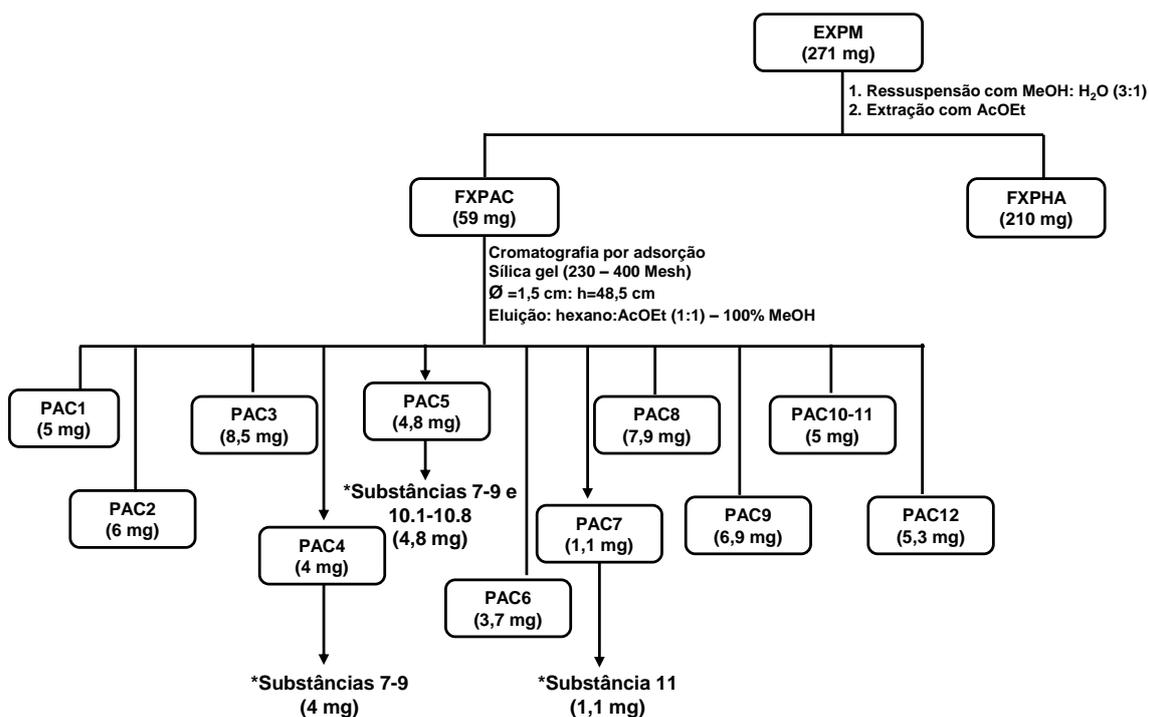
TABELA 5.1 - Massas obtidas dos extratos do sobrenadante e das células bacterianas de *Xac*.

Extratos	Código do extrato *	Massa (mg)
Sobrenadante	EXSXHE	6,4
	EXSXHEA	3,5
	EXSXAC	172
	EXSXBU	992,4
Células bacterianas	EXPH	3,5
	EXPM	270,7

* vide Esquema 5.2.

5.1.2.2.2 - Fracionamento do extrato metanólico das células bacterianas (“pellet”)

O extrato metanólico das células bacterianas (**EXPM**) foi ressuspensionado com MeOH:H₂O (3:1) e posteriormente submetido ao processo de extração por meio de partição líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt) para a obtenção das frações denominadas **FXPAC** e **FXPHA**. A fração acetato de etila (**FXPAC**) foi submetida à cromatografia por adsorção utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol), gerando 12 subfrações (ESQUEMA 5.4).



ESQUEMA 5.4 - Resumo da partição do extrato metanólico do “pellet” (EXPM) e fracionamento da fração FXPAC.

A partir da subfração PAC4 foram isoladas as substâncias *cis*-13-docosenamida (**7**), *cis*-9-octadecenamida (**8**), octadecanamida (**9**) em forma de cristais (ESQUEMA 5.4).

Na subfração PAC5 também foram isoladas as substâncias **7-9**, além das substâncias **10.1 – 10.8** (mistura de amida, ácidos graxos e alcanos identificadas por GC-MS) em forma de sólido branco cristalino (ESQUEMA 5.4).

Na subfração PAC7 foi isolada a uracila (**11**) em forma de sólido rosa claro (ESQUEMA 5.4).

5.1.2.3 - Determinação da posição da ligação dupla das amidas de ácidos graxos

A reação foi realizada com modificações das metodologias descritas por VICENTI et al., 1987 e POMINI et al., 2009. À um frasco de vidro de 10 mL adicionou-se 0,5 mg da subfração PAC4 (Fracionamento descrito na seção 5.1.2.2.1) das células bacteriana e 1,0 mL de dissulfeto de dimetila (DMS). Em seguida, adicionou-se 80 µL de solução de iodo (60 mg/mL em éter etílico 99,7%

de marca vetec). O frasco foi fechado com tampa de teflon e vedado com parafilme. O sistema permaneceu sob aquecimento em banho de óleo e agitação magnética a 60 °C por 24 horas. Após este período, adicionou-se ao meio reacional 3 mL de hexano grau HPLC e 3 mL de solução de tiosulfato de sódio 5%. A mistura foi agitada magneticamente com vigor durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída com hexano (2 X 3 mL). As fases orgânicas reunidas foram secas sob sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas sob fluxo de nitrogênio. Posteriormente, a amostra derivatizada foi analisada por GC-MS para obtenção de fragmentos de ions que caracterizam a posição da ligação dupla das amidas.

5.1.2.4 – Desenvolvimento de um método por HPLC para análise das frações

O desenvolvimento do método cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no modo reverso para algumas frações obtidas foi iniciado utilizando um gradiente exploratório para decidir se seria possível utilizar uma eluição gradiente ou isocrática para as amostras. Os compostos das amostras tiveram uma grande distribuição de banda, com tempos de retenção baixos e altos (SNYDER & DOLAN, 1996), e por isso a eluição gradiente foi empregada.

Com o intuito de encontrar uma melhor separação (resolução) dos compostos provenientes dos extratos ou frações, foram utilizadas diferentes fases móveis e estacionárias. Preliminarmente, as análises foram realizadas utilizando uma varredura de comprimento de onda entre 190 – 500 nm para determinar o melhor comprimento de onda em que grande parte dos compostos absorve, sendo escolhido 210 nm para a maioria das amostras (TABELA 5.2).

TABELA 5.2 - Condições cromatográficas utilizadas para análise dos extratos ou frações da bactéria *Xac*.

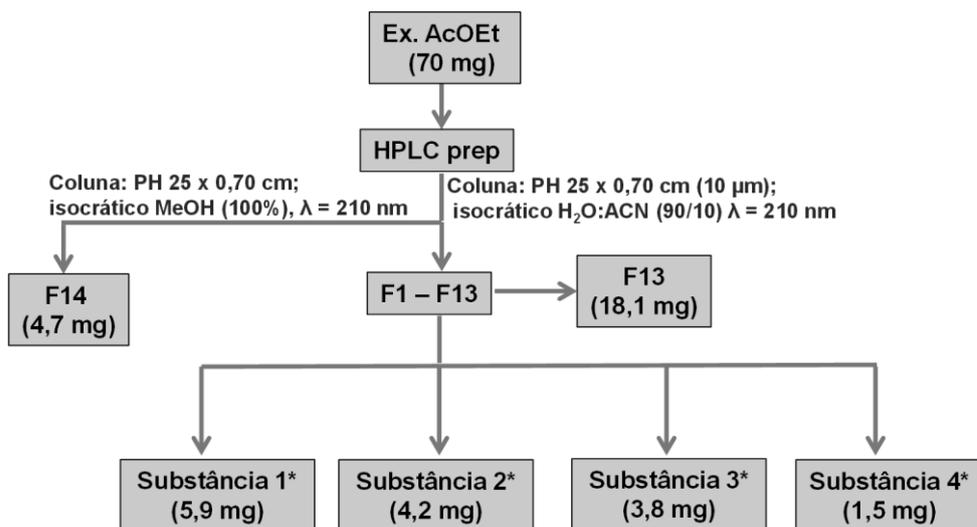
Condição	Coluna	Parâmetros cromatográficos
1A	Agilent SB-C18 (250 x 4,6 mm), 5 µm	5% de MeOH, 5-50% em 55 min. 50-100% em 5 min., isocrático 100% por 10 min., vazão 1 mL/min. λ = 210 nm, Vinj = 20µL, [] = 1 mg/mL.
1B		5% de ACN, 5-50% em 55 min. 50-100% em 5 min., isocrático 100% por 10 min., vazão 1 mL/min. λ = 210 nm, Vinj = 20µL, [] = 1 mg/mL.
2	Phenomexex Luna® Phenyl-Hexyl (150 x 4,6 mm), 10 µm	5% de ACN, 5-50% em 55 min. 50-100% em 5 min., isocrático 100% por 10 min., vazão 1 mL/min. λ = 210 nm, Vinj = 20µL, [] = 1 mg/mL.
3	Phenomexex Luna® Phenyl-Hexyl (250 x 7,0 mm), 10 µm	Isocrático: H ₂ O:ACN (90 % / 10%) vazão 3,5 mL/min. λ = 210 nm, Vinj = 150 µL, [] = 40 mg/mL.
4A	Phenomex Gemini® C18 (150 x 4,6 mm), 5 µm	5% de ACN, 5-50% em 40 min, 50-100 em 2 min, isocrático 100% por 4 min., vazão 0,8 mL/min. λ = 290 nm, Vinj = 20µL, [] = 1 mg/mL.
4B		5% de ACN, 5-25% em 4 min, 25-60 em 21 min, 60-100 em 1 min, isocrático 100% por 4 min., vazão 0,8 mL/min. λ = 290 nm, Vinj = 20µL, [] = 1 mg/mL.

5.1.2.4.1 - Coleta de frações do sobrenadante de *Xac* por HPLC semi-preparativo

Inicialmente foi utilizada a coluna Agilent SB-C18 (250 x 4,6 mm), 5 µm, sendo feita uma eluição com H₂O:MeOH (condição 1A), porém houve uma interferência do MeOH, devido o melhor comprimento de onda ser baixo, 210 nm. Dessa forma, acetonitrila (ACN) foi usado como modificador orgânico, pois o uso da mistura H₂O:ACN como fase móvel geralmente é menos viscosa e permite a utilização de valores baixos de comprimento de onda no UV para detecção dos compostos. Por este motivo, a condição 1B (TABELA 5.2) permitiu melhores separações para os compostos de alguns extratos da bactéria *Xac*.

Para isolar alguns compostos do extrato acetato de etila do sobrenadante (**EXSXAC**), a melhor condição foi a 3 (TABELA 5.2). Foi realizado um fracionamento de 70 mg do extrato por HPLC semi-preparativo Shimadzu 10A

utilizando uma coluna Phenomexex Luna® Phenyl-Hexyl (250 x 7,0 mm), 10 µm e H₂O:ACN como fase móvel na proporção de 90%/10% (TABELA 5.2 e ESQUEMA 5.5).



ESQUEMA 5.5 - Fracionamento do extrato acetato de etila (EXSXAC) do sobrenadante. * Frações contendo substâncias puras ou semipuras.

5.1.2.4.2 - Coleta de frações e subfrações do sobrenadante de Xac por HPLC analítico

O subextrato hexânico do sobrenadante **EXSXHEA** e a fração **F14** foram analisados em equipamento HPLC analítico Agilent 1200, inicialmente na concentração de 1 mg/mL (FIGURA 5.1a e 5.2a) e posteriormente na concentração de 9,4 mg/mL (FIGURA 5.1b e 5.2b) para as coletas das frações.

Para **EXSXHEA** a melhor condição (em 1 mg/mL) apresentada foi a 4A, enquanto que para a fração **F14** a melhor condição (em 1 mg/mL) foi a 4B (TABELA 5.2).

A coleta das frações destacadas no cromatograma da FIGURA 5.1b foi realizado a partir de 15 injeções de 2,8 mg do subextrato hexânico do sobrenadante **EXSXHEA** dissolvido em 300 µL de solvente (concentração de 9,4 mg/mL). O volume de amostra injetado em cada repetição foi de 15 µL. A separação cromatográfica foi realizada com eluição gradiente em HPLC Agilent 1200 no modo analítico utilizando como fase estacionária uma coluna C18, a mesma coluna já descrita na condição 4A (TABELA 5.2). As bandas

Cromatográficas foram monitoradas na região do ultravioleta no comprimento de onda $\lambda = 290$ nm às quais podem ser observadas no cromatograma na FIGURA 5.1a. As massas de cada fração coletada estão descritas na TABELA 5.3.

A coleta da fração 2 no tempo de retenção 13,85 minutos proporcionou o isolamento da substância quinolina-4-carboxaldeído (5) (sendo que a mesma apresentou-se minoritária em mistura).

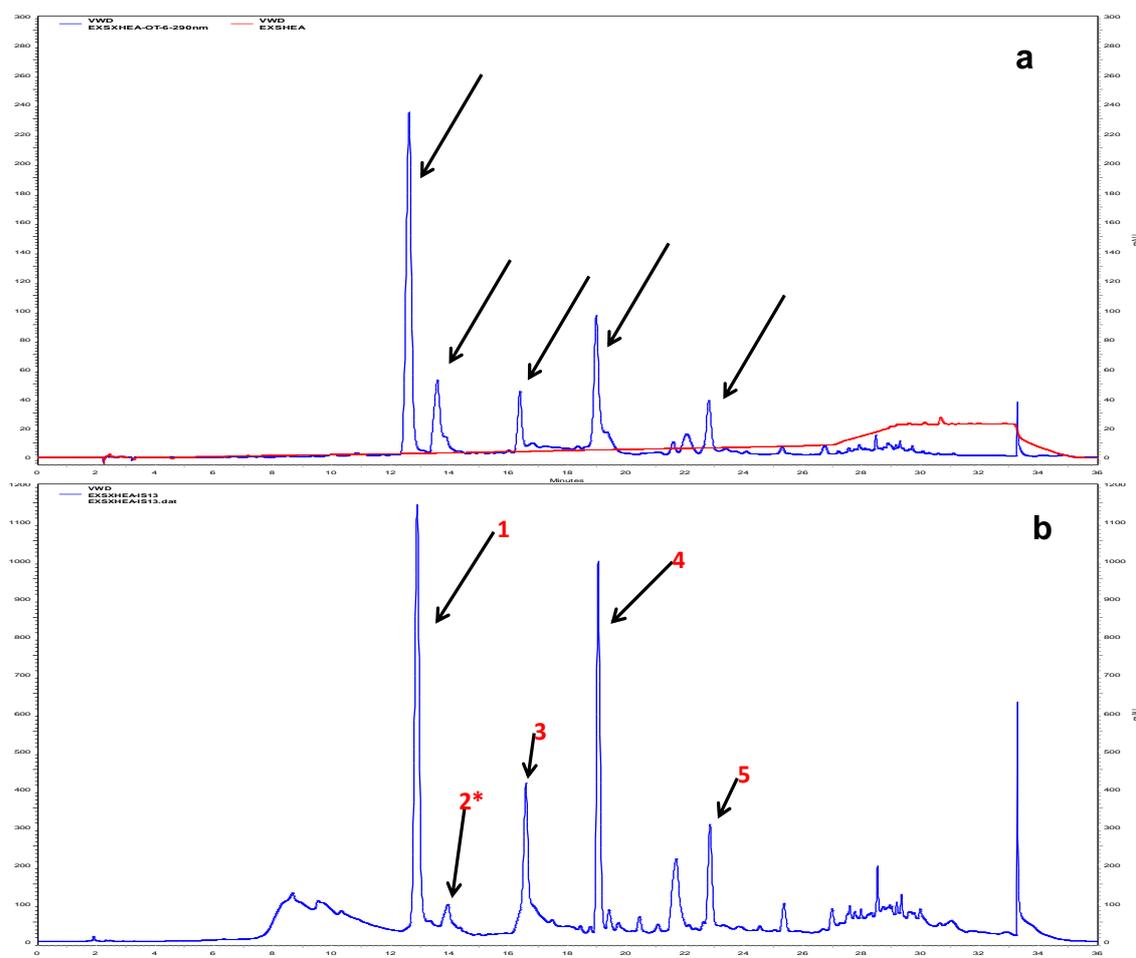


FIGURA 5.1 - Cromatograma da eluição gradiente do extrato “EXSXHEA” de *Xac* 306 em 1 mg/mL (a) e 9,4 mg/mL (b). Condições cromatográficas: 5% de ACN, 5-50% em 40 min, 50-100 em 2 min, isocrático 100% por 4 min., vazão 0,8 mL/min. $\lambda = 290$ nm, Volume de injeção = 15 μ L, coluna Phenomex Gemini® C18 (150 x 4,6 mm), 5 μ m. Obs: Linha vermelha em (a) representa o extrato branco sem a bactéria. * subfração contendo substâncias em mistura. As demais frações coletadas não proporcionaram o isolamento de nenhuma substância de interesse e/ou não houve massa suficiente para identificá-las.

TABELA 5.3 - Massas obtidas das frações coletadas do subextrato hexânico do sobrenadante (**EXSXHEA**).

Tempo de retenção (min)	Fração (banda)	Massa (mg)
12,80	1	1,8
13,85	2	0,3
16,60	3	-
19,10	4	-
22,80	5	0,4

- : Não determinada, pois não houve massa suficiente para pesagem.

A coleta das subfrações destacadas no cromatograma da FIGURA 5.2b foi realizado a partir de 21 injeções de 4,7 mg de **F14** dissolvida em 500 µL de solvente (concentração de 9,4 mg/mL). O volume de amostra injetado em cada repetição foi de 20 µL. A separação cromatográfica foi realizada com eluição gradiente em HPLC analítico utilizando como fase estacionária uma coluna C18. As bandas cromatográficas foram monitoradas na região do ultravioleta no comprimento de onda $\lambda = 290$ nm (Condição 4B da Tabela 5.2). As massas de cada subfração coletada estão descritas na TABELA 5.4.

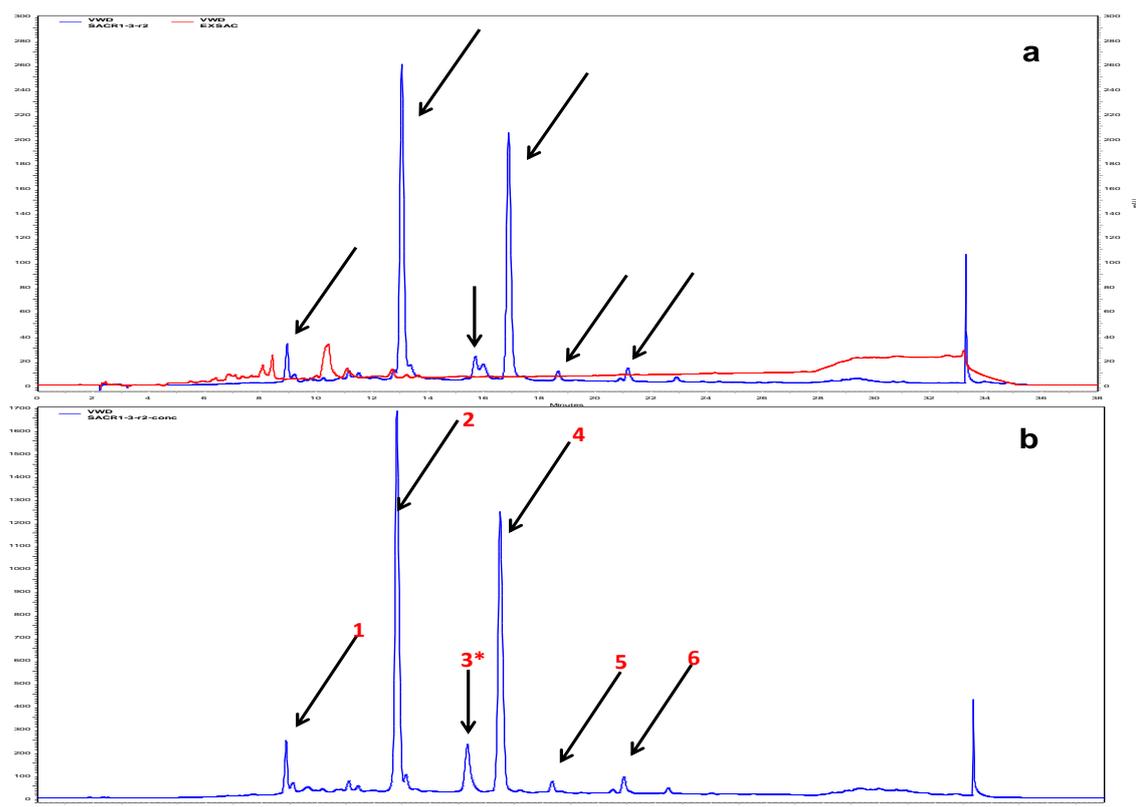


FIGURA 5.2 - Cromatograma da eluição gradiente da fração “F14” de Xac 306 em 1 mg/mL (a) e 9,4 mg/mL (b). Condições cromatográficas: 5% de ACN, 5-25% em 4 min, 25-60 em 21 min, 60-100 em 1 min, isocrático 100% por 4 min., vazão 0,8 mL/min. $\lambda = 290$ nm, Volume de injeção = 20 μ L, coluna Phenomex Gemini® C18 (150 x 4,6 mm), 5 μ m. Obs: Linha vermelha em (a) representa o extrato branco sem a bactéria. * subfração contendo mistura de pelo menos 2 substâncias. As demais subfrações coletadas não proporcionaram o isolamento de nenhuma substância de interesse e/ou não houve massa suficiente para identificá-las.

TABELA 5.4 - Massas obtidas das subfrações coletadas de “F14”.

Tempo de retenção (min)	Subfração (banda)	Massa (mg)
8,80	1	0,1
12,80	2	1,8
15,25	3	1,1
16,45	4	-
18,25	5	-
20,85	6	1,1

- : Não determinada, pois não houve massa suficiente para pesagem.

A coleta da subfração 3 no tempo de retenção 15,25 minutos proporcionou o isolamento da substância *ciclo* (Phe-Phe) (6), porém em mistura.

5.1.2.5 - Crescimento de *Xac* em meio de cultivo “pobre” em nutrientes (Czapeck modificado)

A bactéria foi cultivada em meio pobre em nutrientes, Czapeck modificado, o qual contém apenas glicose como fonte de carbono e nitrato de sódio (NaNO_3) como fonte de nitrogênio. Inicialmente, foi realizado ensaio preliminar para verificar se a bactéria cresce o suficiente após ser repicada para Czapeck líquido. Para isto, a bactéria foi recuperada de cultura permanente (preservada em glicerol a $-80\text{ }^\circ\text{C}$), cultivada em meio Czapeck sólido (3 g de glicose, 0,6 g NaNO_3 , 0,2 g de K_2HPO_4 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de KCL, 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mL de água destilada e 3,2 g de ágar bacteriológico) por 5 dias (FIGURA 5.3) e repicada para Czapeck líquido (3 g de glicose, 0,6 g NaNO_3 , 0,2 g de K_2HPO_4 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de KCL, 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 200 mL de água destilada) em tubos de ensaio (FIGURA 5.4).



FIGURA 5.3 – Aspecto da bactéria *X. axonopodis pv. citri*, após 5 dias de cultivo em meio Czapeck sólido. Setas indicam as colônias bacterianas.

A bactéria não cresceu o suficiente no meio Czapeck líquido a fim de avaliar a curva de crescimento por meio da medida de DO, ou seja, as densidades ópticas (DO) de *Xac* (meio Czapeck líquido + *Xac*) praticamente não

diferiram do controle (meio Czapeck líquido) no início do experimento (12 e 24 horas) nem mesmo após 4, 8 e 85 dias de crescimento. Comparando visualmente *Xac* (meio Czapeck líquido + *Xac*) e meio Czapeck líquido em tubos de ensaio após um longo período de 85 dias de crescimento também ficou evidente que a bactéria não cresceu bem no referido meio de cultivo (FIGURA 5.4).

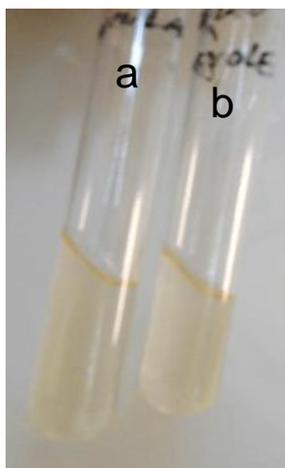


FIGURA 5.4 – Aspecto da bactéria *X. axonopodis pv. citri* após 85 dias de cultivo em meio Czapeck líquido. a: meio Czapeck líquido + *Xac*; b: meio Czapeck líquido (controle).

Como a bactéria não se desenvolveu bem no meio Czapeck líquido, não foi possível realizar o estudo químico da mesma em grande escala utilizando o referido meio. Alternativamente, o estudo de *Xac* 306 foi realizado em **microescala** (na placa contendo a bactéria cultivada em meio **Czapeck sólido modificado**) por meio de extração com metanol/H₂O (4:1) (2x de 24 horas), seguida de limpeza com hexano e partição com acetato de etila, para identificação e confirmação de algumas dicetopiperazinas produzidos pelo micro-organismo, porém neste meio isento de aminoácido. Posteriormente, os extratos foram analisados por LC Agilent 1200 hifenado a um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo modelo API 2000 (Applied Biosystems MDS SCIEX) utilizando ESI (Electrospray) como fonte de ionização. As discussões desses resultados estão descritas na seção 5.2.5.

5.1.2.6 – Aplicação da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) nas análises das amostras

As amostras provenientes das frações ou substâncias puras foram analisadas em um cromatógrafo a gás GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), hifenizado a um espectrômetro de massas (GC-MS) QP5000. O gás de arraste foi hélio (99.999%). A detecção por massas foi realizada num intervalo de 45-550 Da. Os compostos foram identificados da mesma forma que a seção 4.1.1.2.5, assim como, por interpretação dos espectros de massas.

5.2 - Resultados e Discussões

5.2.1 - Análise dos extratos e/ou frações por GC-MS

O extrato hexânico do sobrenadante analisado por GC-MS mostrou a presença de 10 compostos (FIGURA 5.5 e TABELA 5.5). Foram identificados: 6-metil-hepten-2-ol; ciclohexanometanol; 2-feniletanol; os alcanos *n*-octadecano e *n*-eicosano; e o éster de ácido graxo hexadecanoato de metila. Pela análise do perfil de fragmentação (intensidade relativa dos principais fragmentos de íon, m/z) e pela presença do íon base m/z 70, observou-se que a bactéria também produz alguns compostos da classe dicetopiperazinas (DKP) contendo prolina em sua estrutura, porém não foi possível identificá-las. O composto 2-feniletanol já tinha sido identificado em outra espécie de *Xanthomonas* por WEISE et al., 2012.

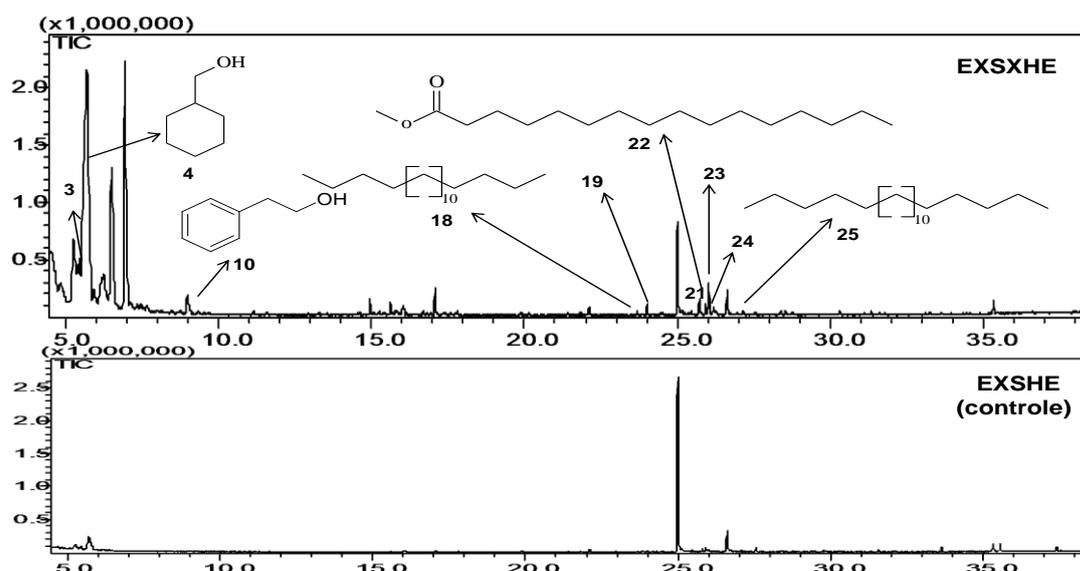


FIGURA 5.5 - Cromatograma de íons totais (TIC) do extrato hexânico do sobrenadante EXSXHE e do controle obtido por GC-MS. Condições cromatográficas: coluna OPTIMA 5-MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m rampa de 80° C (1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.). Injetor: 240° C, Detector: 260° C; He- 1,2 mL/min.

TABELA 5.5 - Constituintes químicos do extrato hexânico do sobrenadante EXSXHE.

Pico	Composto	IR	IR-lit	m/z (%) íons
3	6-metil-hepten-2-ol	939	958	45 (100), 57 (34), 85 (31), 61 (12)
4	ciclohexanometanol	955	**	55 (100), 83 (65), 53 (49), 67 (48)
10	2-feniletanol	1111	1106	91 (100), 92 (49), 59 (41), 58 (35)
18	octadecano	1795	1800	57 (100), 71 (39), 85 (24), 99 (15)
19	DKP NI	1813	-	70 (100), 154 (58), 72 (50), 55 (38)
21	DKP NI	1910	-	70 (100), 154 (82), 86 (25), 69 (21)
22	hexadecanoato de metila	1922	1921	74 (100), 87 (55), 55 (39), 57 (24)
23	DKP NI	1928	-	70 (100), 154 (76), 86 (24), 55 (21)
24	DKP NI	1937	-	70 (100), 154 (62), 55 (20), 125 (18)
25	n-eicosano	1998	2000	57 (100), 71 (63), 85 (35), 99 (16)

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

IR-lit = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

* = identificado pelo NIST Web Book, NIST MS Search 2.0 e/ou www.pherobase.com.

** = tentativamente identificado pelo perfil do espectro de massas e em comparação com o espectro de massas do NIST MS Search 2.0.

DKP NI = dicetopiperazina não identificada.

- = não determinado.

O subextrato hexânico do sobrenadante EXSXHEA analisado por GC-MS mostrou a presença de 14 compostos (FIGURA 5.6 e TABELA 5.6). Novamente, pela análise do perfil de fragmentação (intensidade relativa dos principais fragmentos de íon, m/z) e pela presença do íon base m/z 70, observou-se que a bactéria também produz alguns compostos da classe dicetopiperazinas (DKP). Embora não tenha sido identificada, pode inferir que no extrato também há a substância *ciclo* (Prolina-Isoleucina).

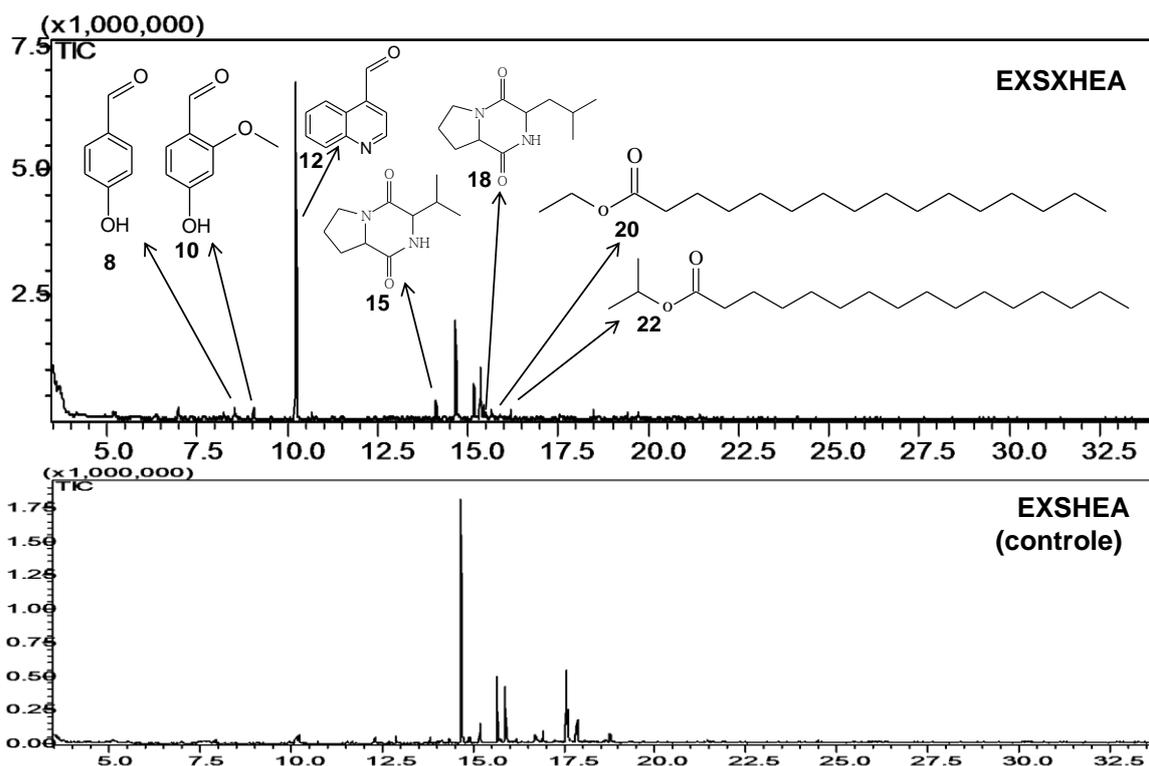


FIGURA 5.6 - Cromatograma de íons totais (TIC) do subextrato hexânico do sobrenadante EXSXHEA e o controle obtido por GC-MS. Condições cromatográficas: coluna OPTIMA 5-MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m rampa de 80° C (1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.). Injetor: 240° C, Detector: 260° C; He-1,2 mL/min.

TABELA 5.6 - Constituintes químicos do subextrato hexânico do sobrenadante EXSXHEA.

Pico	Composto	IR	IR-lit	m/z (%) íons
3	lageracetal	1254	1229*	57 (100), 73 (40), 55 (30), 129 (20)
8	p-hidroxibenzaldeído	1368	**	121 (100), 122 (82), 93 (57), 65 (50)
10	p-hidroxi-m-metoxibenzaldeído	1408	1403*	151 (100), 152 (80), 81 (42), 53 (39)
12	quinolina-4-carboxaldeído ?	1496	**	129 (100), 157 (96), 128 (79), 75 (52)
13	p-etoxibenzoato de etila	1531	1521	121 (100), 149 (47), 138 (26), 65 (22)
15	ciclo (Pro-Val)	1825	**	70 (100), 154 (63), 72 (43), 125 (22)
16	DKP NI	1923	-	70 (100), 154 (91), 86 (28), 69 (21)
17	DKP NI	1939	-	70 (100), 154 (76), 86 (24), 55 (21)
18	ciclo (Pro-Leu)	1947	***	70 (100), 154 (83), 125 (20), 68 (16)
19	DKP NI	1953	-	70 (100), 154 (86), 69 (23), 68 (22)
20	hexadecanoato de etila	1989	1992	88 (100), 57 (90), 101 (61), 181 (59)
22	aconitato de tributila	2157	**	112 (100), 57 (84), 157 (64), 156 (47)
23	acetilcitrato de tributila	2244	2253*	185 (100), 129 (90), 57 (82), 56 (29)
27	ácido adípico	2356	2367*	129 (100), 57 (66), 55 (68), 70 (39)

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

IR-lit = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

* = identificado pelo NIST Web Book, NIST MS Search 2.0 e/ou /www.pherobase.com.

** = tentativamente identificado pelo perfil do espectro de massas e em comparação com o espectro de massas do NIST MS Search 2.0.

*** = identificado pelo perfil do espectro de massas e do tempo de retenção do padrão *ciclo* (Pro-Leu) isolado neste estudo.

DKP NI = dicetopiperazina não identificada.

- = não determinado.

Para o pico 12, a biblioteca NIST08 inserida no software GCMS Solutions mostrou uma similaridade de 87% com o espectro de massas do composto quinolina-4-carboxaldeído (FIGURA 5.7), porém não foi possível identificá-lo com precisão. Dessa forma, foi realizado o isolamento dos composto a partir do subextrato hexânico (HXSXHEA) para posterior análise por RMN. Os dados e discussões estão apresentados na seção 5.2.4.5.

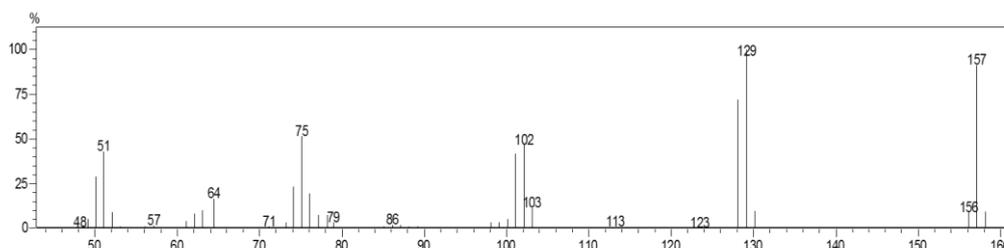


FIGURA 5.7 - Espectro de massas da substância quinolina-4-carboxaldeído obtido experimentalmente por impacto eletrônico 70 eV.

Dessa vez, foi possível identificar a *ciclo* (Pro-Val) (Pico 15) e a *ciclo* (Pro-Leu) (Pico 18). A *ciclo* (Pro-Val) foi tentativamente identificada pelo perfil do espectro de massas em comparação com o espectro de massas do NIST MS Search 2.0 e da literatura (WANG et al., 2010b) (FIGURA 5.8).

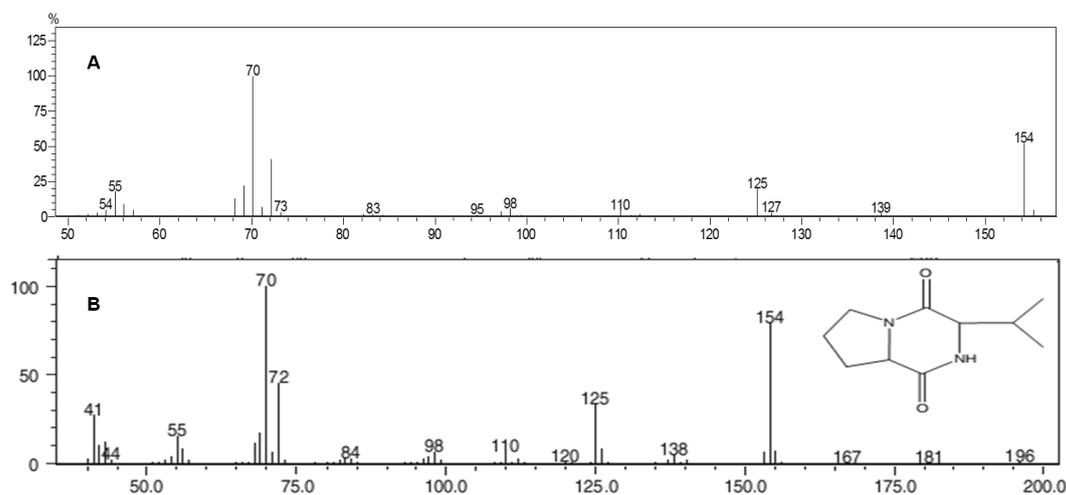


FIGURA 5.8 - Espectro de massas da substância *ciclo* (Pro-Val) (A) e da literatura (B) [WANG et al., 2010b]. Impacto eletrônico 70 eV.

A substância *ciclo* (Pro-Leu) foi identificada por comparação com o espectro de massas, o tempo de retenção do padrão *ciclo* (Pro-Leu) isolado neste estudo (conforme discussão na seção 5.2.4.1), assim como pelo espectro de massas da literatura (WANG et al., 2010b) (FIGURA 5.9).

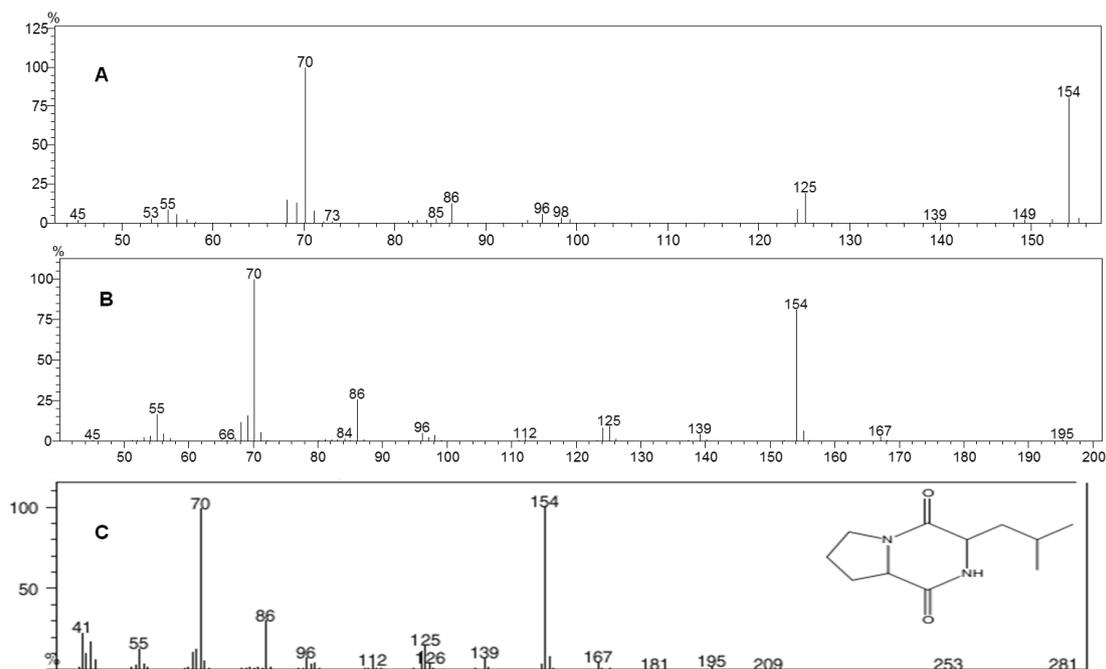


FIGURA 5.9 - Espectro de massas da substância *ciclo* (Pro-Leu) (A); isolado neste estudo (B) e da literatura (C) [WANG et al., 2010b]. Impacto eletrônico 70 eV.

5.2.2 - Identificação do ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico por GC-MS

Nesta parte do trabalho foi realizado um estudo com objetivo de identificar o composto ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico (FIGURA 5.10) no extrato hexânico das células bacterianas de *Xac* (EXPH), cujo processo de obtenção foi descrito na seção 5.1.2.2.

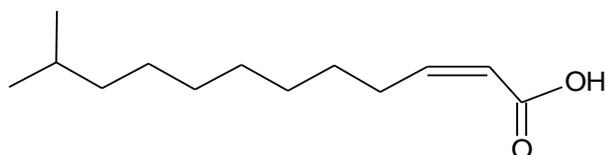


FIGURA 5.10 - Estrutura química do ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico.

O ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico foi descrito em 2004 por WANG e colaboradores como sendo a substância responsável pelo processo de comunicação celular na bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) e o mesmo está associado ao mecanismo de patogenicidade em plantas hospedeiras de *Xcc*. Como a bactéria *Xcc* e a bactéria estudada neste trabalho,

Xac, apresentam uma boa similaridade genômica (>80%), assim como ambas possuem algumas enzimas responsáveis pela produção desse e outros ácidos graxos (DSF) (DENG et al., 2011), houve uma motivação para a busca do ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico em *Xac*. Dessa forma, o ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico foi adquirido junto a Sigma-Aldrich para dar início aos estudos de identificação do mesmo na bactéria.

A solução padrão do composto foi analisada no modo SCAN (FIGURAS 5.11 e 5.12) e no modo SIM, sendo selecionados os pares de íons com m/z 86; 194 (FIGURA 5.13) e 194; 212 (FIGURA 5.14). Estes pares de íons foram escolhidos para a identificação do ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico no extrato hexânico das células bacterianas de *Xac* (**EXPH**), porque os mesmos forneceram uma melhor detecção, haja vista que outros íons diferentes estão presentes em muitos outros compostos do extrato.

A análise no modo SCAN no extrato EXPH forneceu um pico de interesse em 13,143 min (FIGURA 5.15), o mesmo tempo de retenção para o ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico na solução padrão (FIGURA 5.11). O espectro de massas referente a este pico no extrato (FIGURA 5.16) também foi similar àquele para o ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico na solução padrão (FIGURA 5.12), porém não foi observado o íon molecular, m/z 212, porque o composto está presente em baixa quantidade no extrato. A análise do extrato no modo SIM buscando os pares de íons m/z 86 e 194 (FIGURA 5.17) e os íons m/z 194 e 212 (FIGURA 5.18) confirma que o composto ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico está presente no extrato hexânico das células bacterianas de *Xac* (**EXPH**), comprovando que a bactéria *Xac* produz este composto, porém nas células. O extrato hexânico do meio NBY (no qual a bactéria foi cultivada) foi selecionado como branco e o ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico não foi detectado no mesmo após análise tanto no modo SCAN (FIGURA 5.19) quanto no modo SIM (FIGURAS 5.20 e 5.21) injetado nas mesmas condições da solução padrão e do extrato.

Em muitos trabalhos na literatura (DENG et al., 2011; RYAN & MAXWELL, 2011; WANG et al., 2004) é relatado o isolamento e/ou detecção dos ácidos graxos e outros compostos apenas no sobrenadante, porém provavelmente a maioria das bactérias produz os compostos nas células e, posteriormente, libera determinada quantidade para o meio.

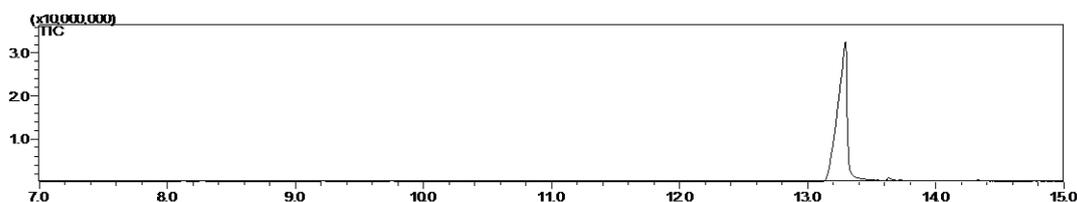


FIGURA 5.11 - Cromatograma de íons totais (TIC) da solução do ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico obtido por GC-MS. Condições: coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.). Injetor: 250° C, Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

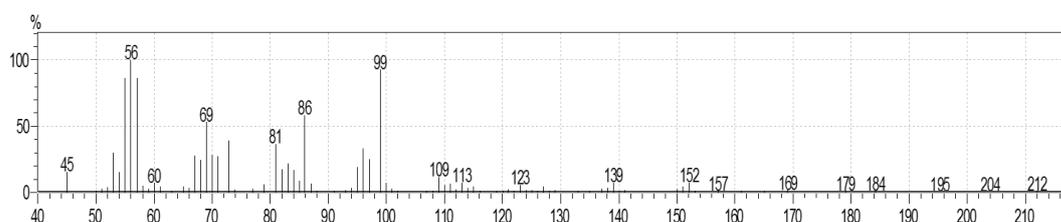


FIGURA 5.12 - Espectro de massas do ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

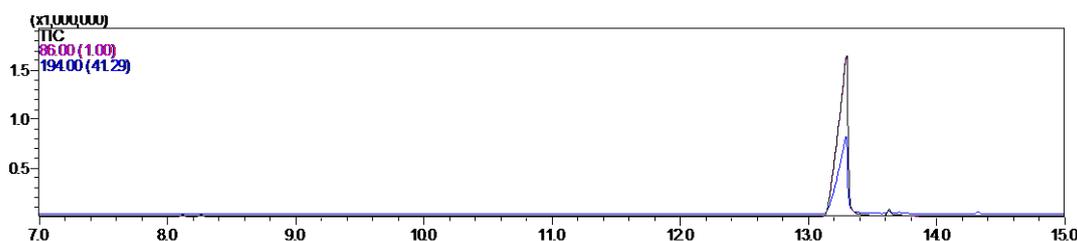


FIGURA 5.13 - Cromatograma de íons selecionados da solução do ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico obtido por GC-MS. Condições: modo SIM (íons *m/z* 86 e 194); coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.); Injetor: 250° C; Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

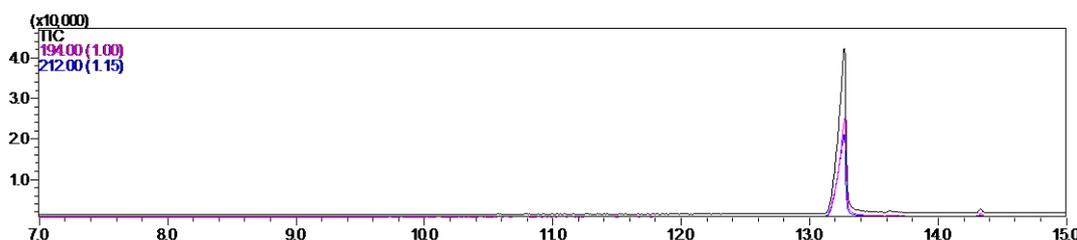


FIGURA 5.14 - Cromatograma de íons selecionados da solução do ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico obtido por GC-MS. Condições: modo SIM (íons *m/z* 194 e 212); coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.); Injetor: 250° C; Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

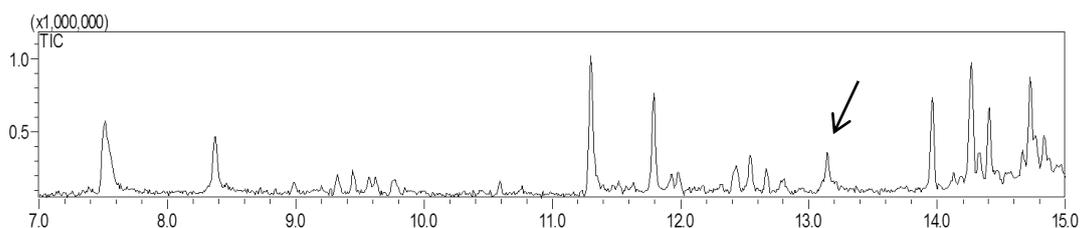


FIGURA 5.15 - Cromatograma de íons totais (TIC) do extrato hexânico das células bacterianas de *Xac* (**EXPH**) obtido por GC-MS. Condições: coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.). Injetor: 250° C, Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

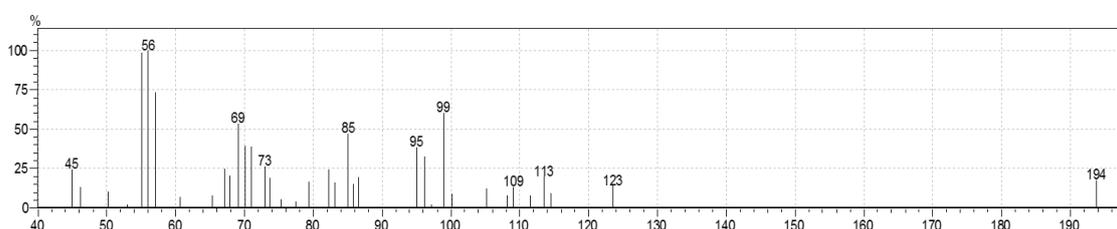


FIGURA 5.16 - Espectro de massas referente ao pico com tempo de retenção 13,143 min obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

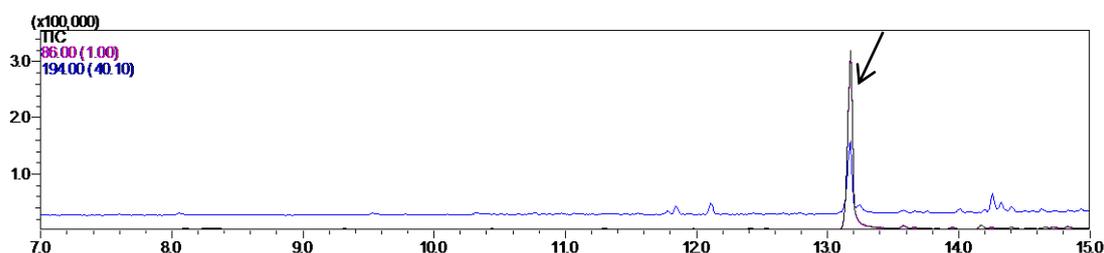


FIGURA 5.17 - Cromatograma de íons selecionados do extrato hexânico das células bacterianas de *Xac* (**EXPH**) obtido por GC-MS. Condições: modo SIM (íons m/z 86 e 194); coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.); Injetor: 250° C; Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

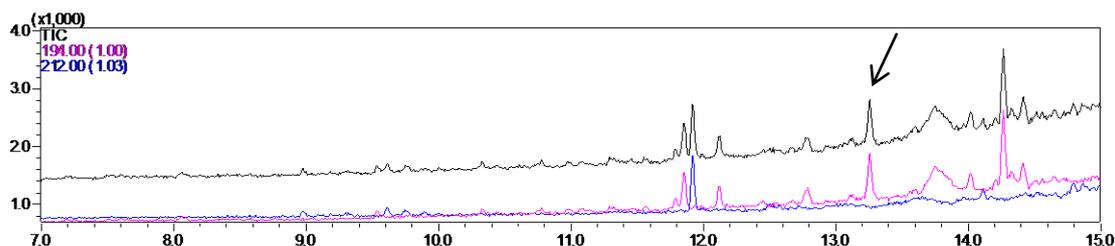


FIGURA 5.18 - Cromatograma de íons selecionados do extrato hexânico das células bacterianas de *Xac* (**EXPH**) obtido por GC-MS. Condições: modo SIM (íons m/z 194 e 212); coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.); Injetor: 250° C; Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

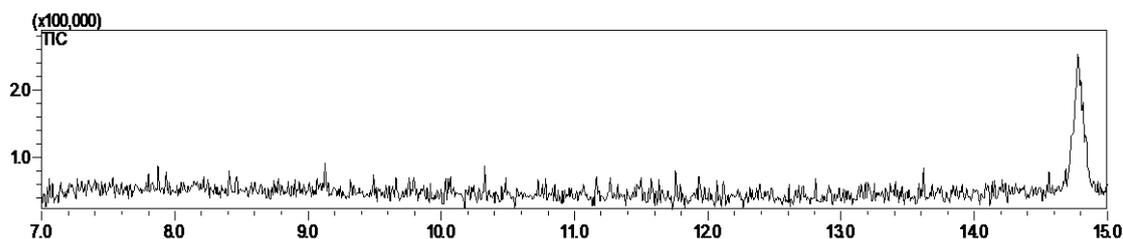


FIGURA 5.19 - Cromatograma de íons totais (TIC) do extrato do meio NBY obtido por GC-MS. Condições: coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.). Injetor: 250° C, Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

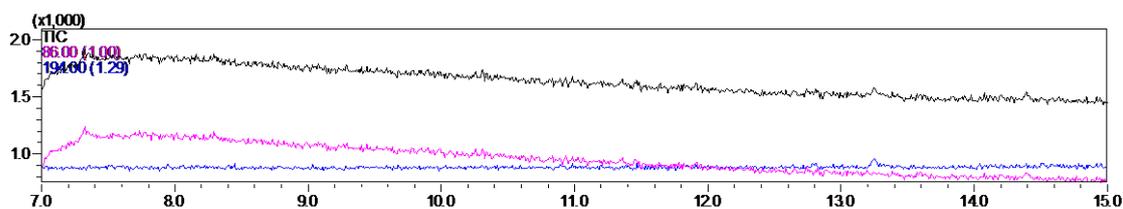


FIGURA 5.20 - Cromatograma de íons selecionados do extrato do meio NBY obtido por GC-MS. Condições: modo SIM (íons m/z 86 e 194); coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.); Injetor: 250° C; Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

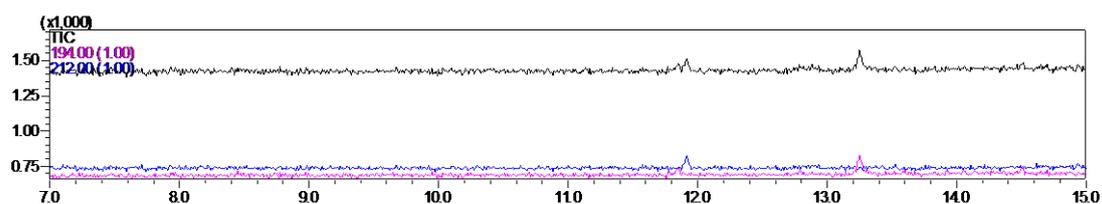
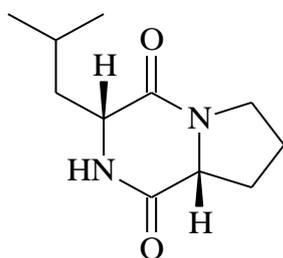


FIGURA 5.21 - Cromatograma de íons selecionados do extrato do meio NBY obtido por GC-MS. Condições: modo SIM (íons m/z 194 e 212); coluna ZB-WAX 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.); Injetor: 250° C; Detector: 260° C; He-1,2 mL/min. [] = 1 mg/mL; 1 μ L injeção no modo splitless.

5.2.3 - Substâncias isoladas e/ou detectadas na cultura de *Xac*

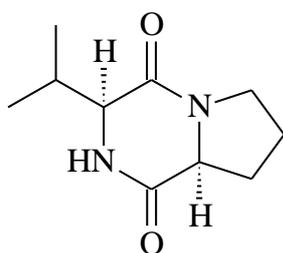


ciclo (D-Pro-D-Leu) (1)

Origem: Extrato acetato de etila do sobrenadante **F6**

Isolamento: seção 5.1.2.4.1

Identificação: seção 5.2.4.1

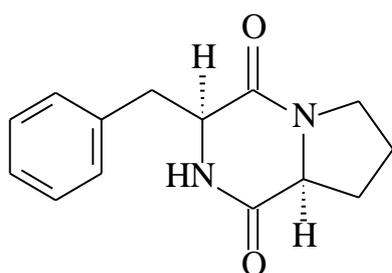


ciclo (L-Pro-L-Val) (2)

Origem: Extrato acetato de etila do sobrenadante **F3**

Isolamento: seção 5.1.2.4.1

Identificação: seção 5.2.4.2

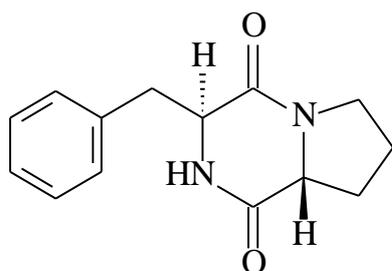


ciclo (L-Pro-L-Phe) (3)

Origem: Extrato acetato de etila do sobrenadante **F8**

Isolamento: seção 5.1.2.4.1

Identificação: seção 5.2.4.3

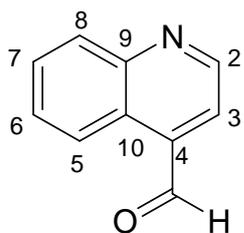


ciclo (D-Pro-L-Phe) (4)

Origem: Extrato acetato de etila do sobrenadante **F7**

Isolamento: seção 5.1.2.4.1

Identificação: seção 5.2.4.4



**quinolina-4-
carboxaldeído (5)**

Origem: subextrato
hexânico do sobrenadante

EXSXHEA

Isolamento: seção 5.1.2.4.2

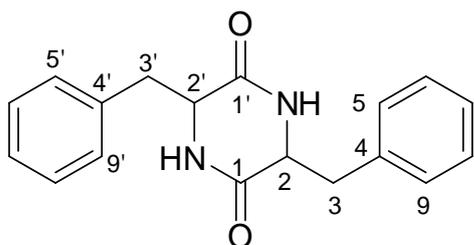
Identificação: seção 5.2.4.5

ciclo (Phe-Phe) (6)

Origem: Fração **F14** do
sobrenadante

Isolamento: seção 5.1.2.4.2

Identificação: seção 5.2.4.6

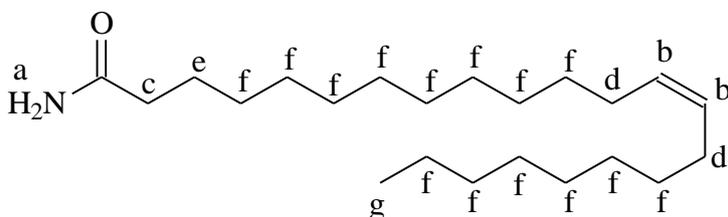


cis-13-docosenamida (7)

Origem: Subfração **PAC4**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.7

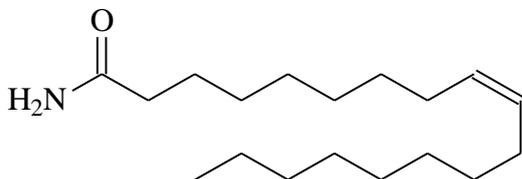


cis-9-octadecenamida (8)

Origem: Subfração **PAC4**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.7

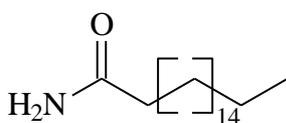


octadecanamida (9)

Origem: Subfração **PAC4**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.7

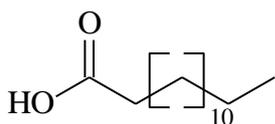


Substâncias (10.1 a 10.8)

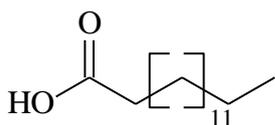
Origem: Subfração **PAC5**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

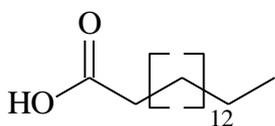
Identificação: seção 5.2.4.8



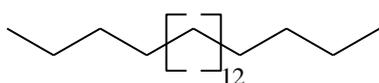
ácido tetradecanóico (10.1)



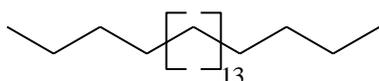
ácido pentadecanóico (10.2)



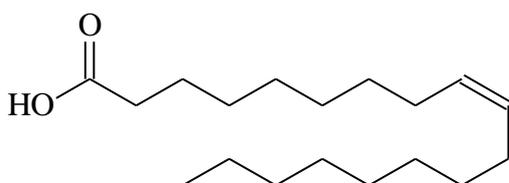
ácido hexadecanóico (10.3)



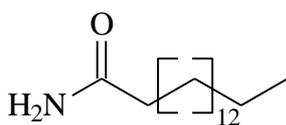
n-eicosano (10.4)



n-heneicosano (10.5)



ácido *cis*-9-octadecenóico (10.6)



hexadecanamida (10.7)

Substâncias (10.1 a 10.8)

Origem: Subfração **PAC5**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.8

Substâncias (10.1 a 10.8)

Origem: Subfração **PAC5**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.8

Substâncias (10.1 a 10.8)

Origem: Subfração **PAC5**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.8

Substâncias (10.1 a 10.8)

Origem: Subfração **PAC5**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.8

Substâncias (10.1 a 10.8)

Origem: Subfração **PAC5**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

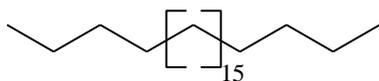
Identificação: seção 5.2.4.8

Substâncias (10.1 a 10.8)

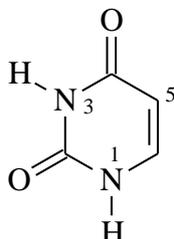
Origem: Subfração **PAC5**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.8



***n*-tricosano (10.8)**



Substâncias (10.1 a 10.8)

Origem: Subfração **PAC5**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.8

uracila (11)

Origem: subfração **PAC7**
das células bacterianas

Isolamento: seção 5.1.2.2.2

Identificação: seção 5.2.4.9

5.2.4 - Determinação estrutural das substâncias isoladas da cultura de *Xac*

5.2.4.1 - Substância 1 – *ciclo* (Pro-Leu)

A determinação estrutural da substância *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 5.22) foi baseada nos dados espectrais de RMN 1D (^1H e ^{13}C), 2D (COSY e HMBC) (FIGURAS 5.23 a 5.32, TABELA 5.7) e espectrometria de massas (FIGURAS 5.33 e 5.35).

A classe da substância foi inicialmente determinada por meio dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para os grupos amidas (δ 166,1 e 170,1) e dos sinais de RMN ^1H dos aminoácidos (FIGURAS 5.23 a 5.32 e TABELA 5.7).

O espectro de RMN ^1H apresentou dois dubletos integrando para 3H cada, em δ 0,94 e 0,99 com constante de acoplamento 6,6 Hz, característicos de hidrogênios metílicos (FIGURAS 5.23 a 5.26 e TABELA 5.7). Um multiplete em δ 1,73, H-11, indicou a presença do grupo isopropil, confirmada por meio das correlações com os hidrogênios H-12 e H-13 no COSY (FIGURA 5.29). Também foi observada correlação entre os hidrogênios H-10a e H-10b. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios diastereotópicos H-10 (δ 2,03 – 2,07 para H-10a e δ 1,51 para H-10b) foram confirmados pelas correlações com C-1 no mapa de correlação HBMC (FIGURA 5.32) e também com C-9, C-11 e C-12 (FIGURA 5.30). O deslocamento químico de H-9, δ 4,01, *dd*, foi confirmado por COSY, o qual mostrou correlação deste hidrogênio com H10-a e H10-b (FIGURA 5.28), e

TABELA 5.7 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da *ciclo* (Pro-Leu) em comparação com os dados da literatura.

Substância 1		Substância 1 na lit		
Nº	δ_{H}^1	δ_{C}^2	δ_{H} (lit) ³	δ_{C} (lit) ⁴
1	-	166,1	-	168,5
2	-	-	-	-
3	3,50 – 3,62 (2H, <i>m</i>)	45,5	3,47 – 3,51 (2H, <i>m</i>)	46,0
4	4a: 1,97 – 2,02 (1H, <i>m</i>) 4b: 1,82 – 1,94 (1H, <i>m</i>)	23,3	4a: 1,96 – 2,05 (1H, <i>m</i>) 4b: 1,81 – 1,94 (1H, <i>m</i>)	23,2
5	5a: 2,34 (1H, <i>m</i>) 5b: 2,08 – 2,17 (1H, <i>m</i>)	28,1	5a: 2,24 – 2,34 (1H, <i>m</i>) 5b: 1,96 – 2,05 (1H, <i>m</i>)	28,8
6	4,11 (1H, <i>t</i> , $J = 8,3$ Hz)	59,0	4,25 (1H, <i>ddd</i> , $J = 1,7; 6,3; 11,1$ Hz)	60,1
7	-	170,1	-	172,6
8	5,92 (1H, <i>sl</i>)	-	4,56 (1H, <i>sl</i>)	-
9	4,01 (<i>dd</i> , $J = 9,4; 3,5$ Hz)	53,4	4,09 – 4,15 (1H, <i>m</i>)	54,0
10	10a: 2,03 – 2,07 (1 H, <i>m</i>) 10b: 1,51 (1H, <i>ddd</i> , $J = 14,4; 9,7; 4,9$ Hz)	38,6	10a: 1,81 – 1,94 (1H, <i>m</i>) 10b: 1,47 – 1,56 (1H, <i>m</i>)	38,2
11	1,73 (1H, <i>m</i>)	24,7	1,81 – 1,94 (1H, <i>m</i>)	25,0
12	0,94 (3H, <i>d</i> , $J = 6,6$ Hz)	21,2	0,94 (3H, <i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)	21,4
13	0,99 (3H, <i>d</i> , $J = 6,6$ Hz)	22,7	0,95 (3H, <i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)	22,8

¹ = Dados de RMN ^{13}H a 400 MHz em CDCl_3 da *ciclo* (Pro-Leu) isolada.

² = Dados de RMN ^{13}C a 100 MHz em CDCl_3 da *ciclo* (Pro-Leu) isolada.

³ = Dados de RMN ^{13}H a 400 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Leu) na literatura, FURTADO et al., 2005.

⁴ = Dados de RMN ^{13}C a 100 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Leu) na literatura, FURTADO et al., 2005.

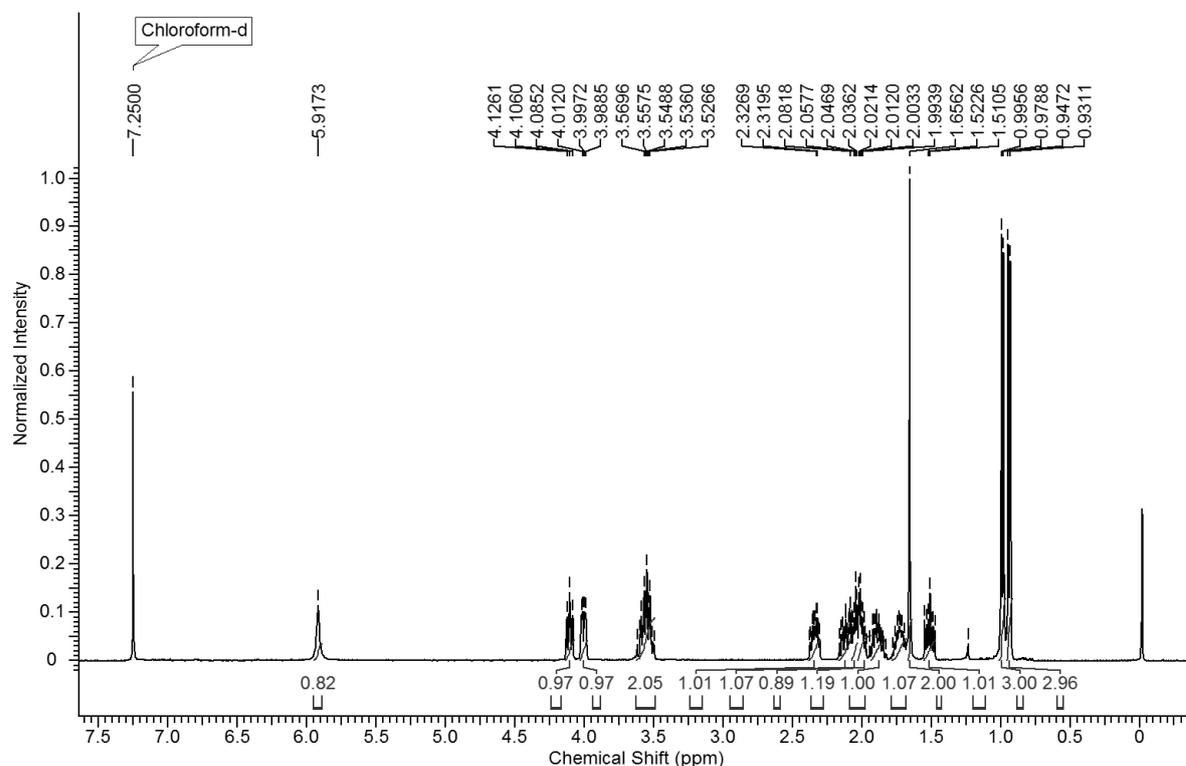


FIGURA 5.23 - Espectro de RMN de ^1H da *ciclo* (Pro-Leu) (CDCl_3 , 400 MHz).

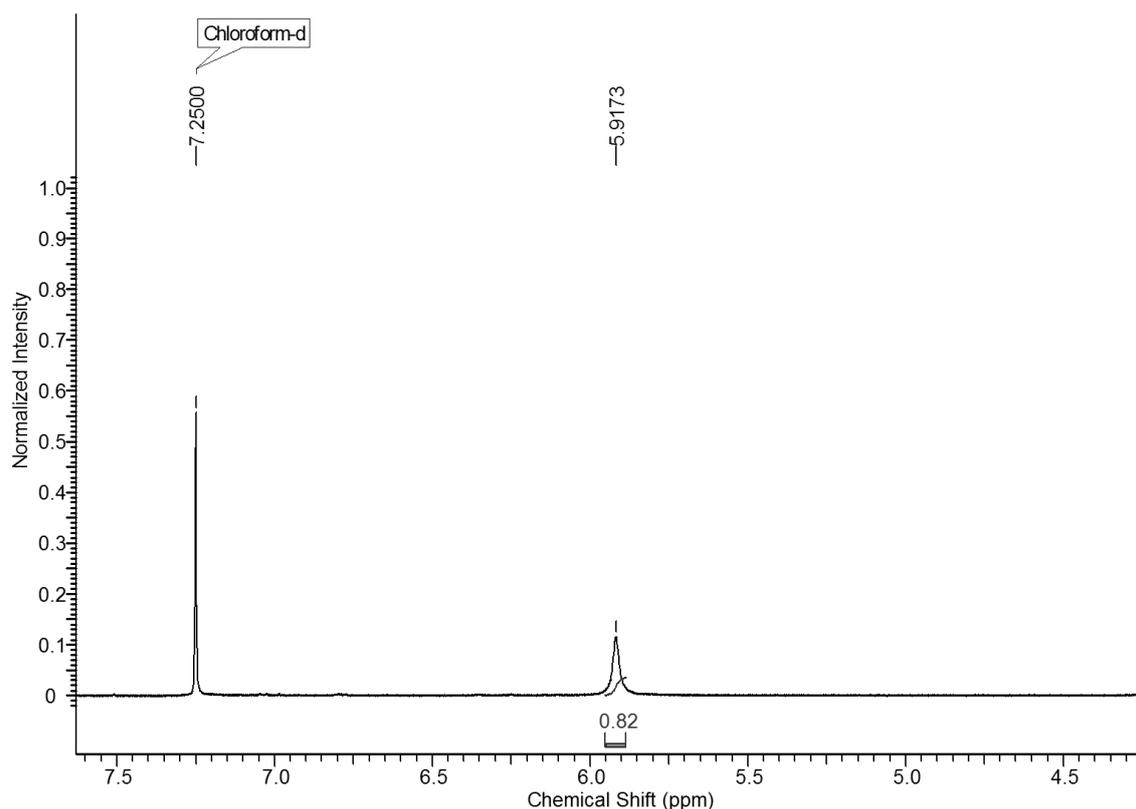


FIGURA 5.24 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da *ciclo* (Pro-Leu) (CDCl_3 , 400 MHz).

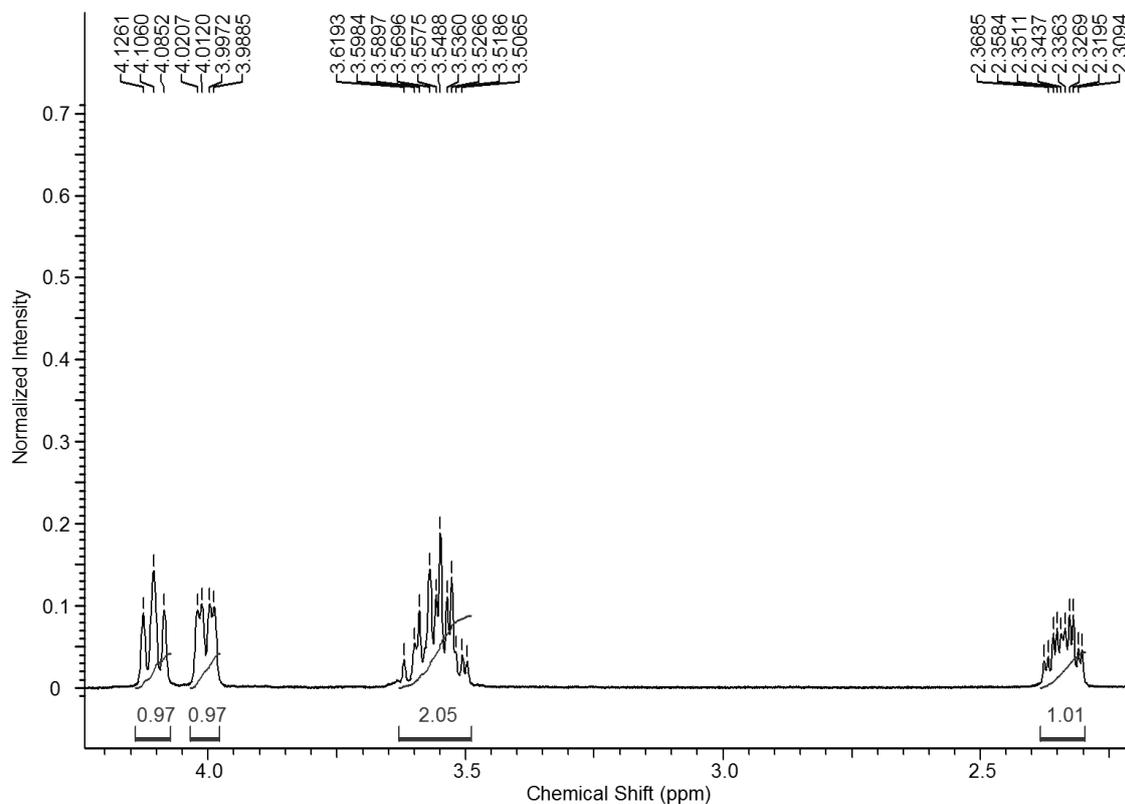


FIGURA 5.25 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da *ciclo* (Pro-Leu) (CDCl_3 , 400 MHz).

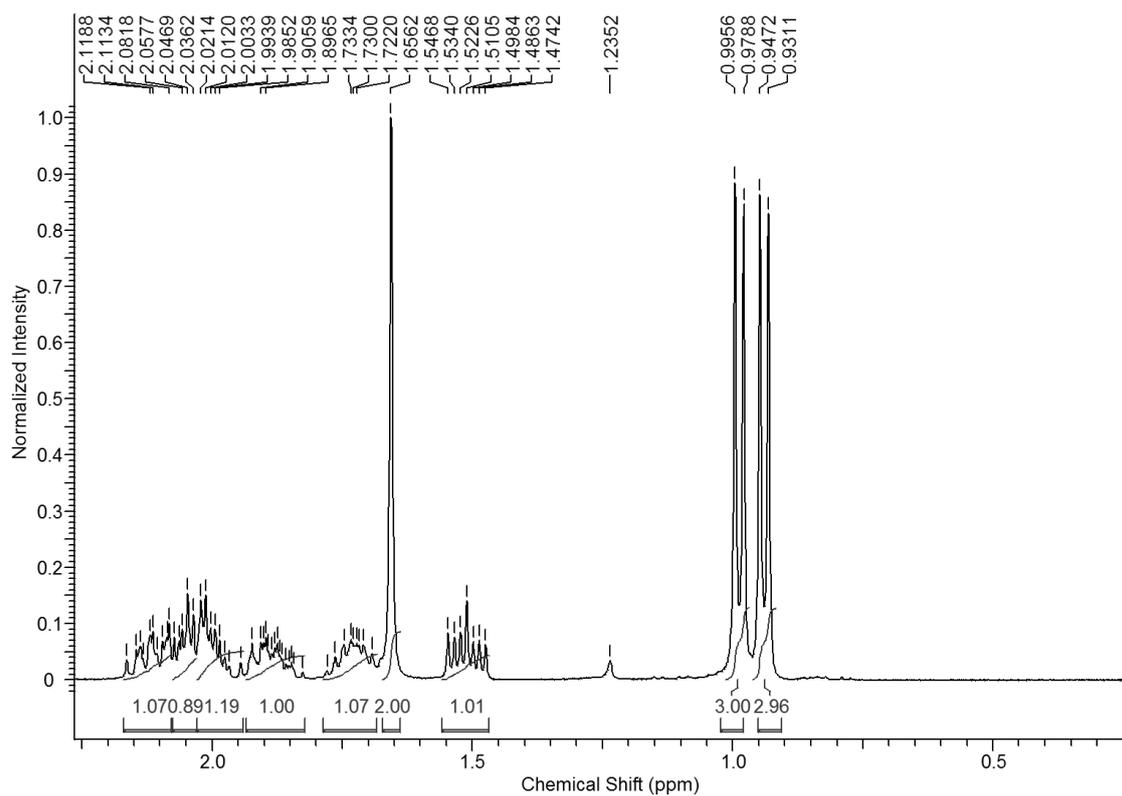


FIGURA 5.26 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da *ciclo* (Pro-Leu) (CDCl_3 , 400 MHz).

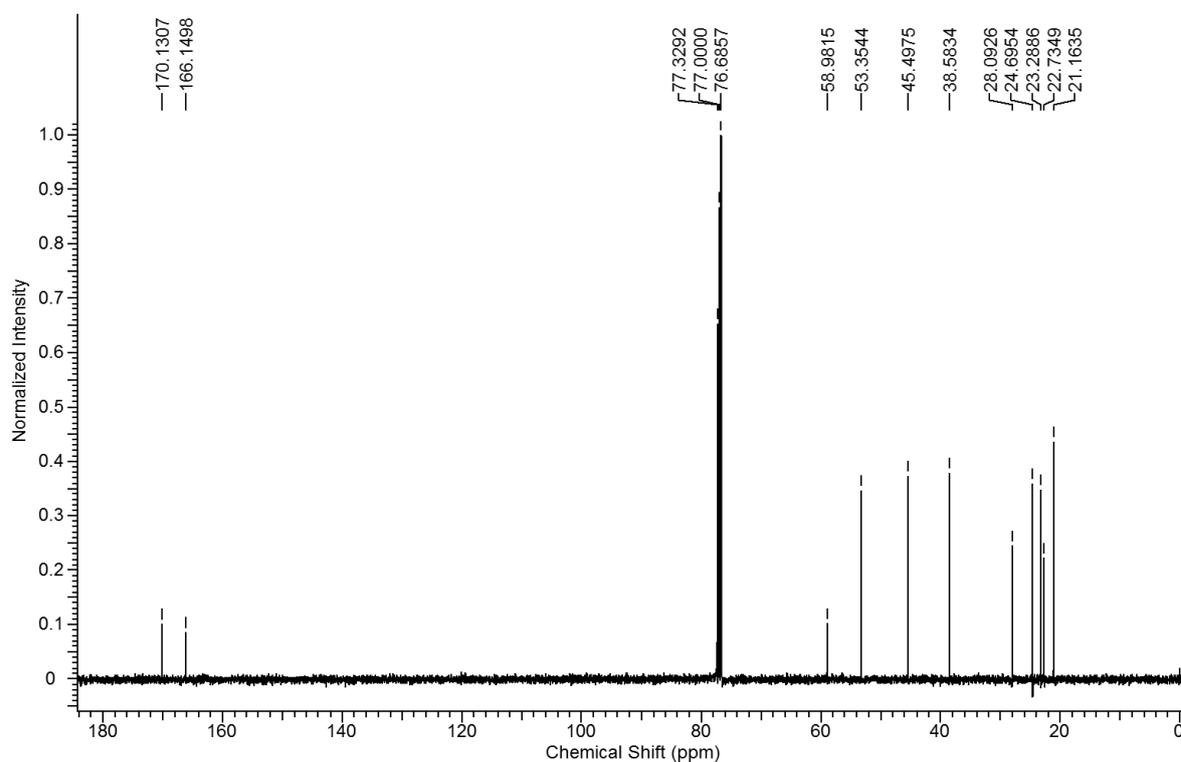


FIGURA 5.27 - Espectro de RMN de ^{13}C da *ciclo* (Pro-Leu) (CDCl_3 , 100 MHz).

3E832_SAC6-P3-P3-P13-cozy16.003.esp

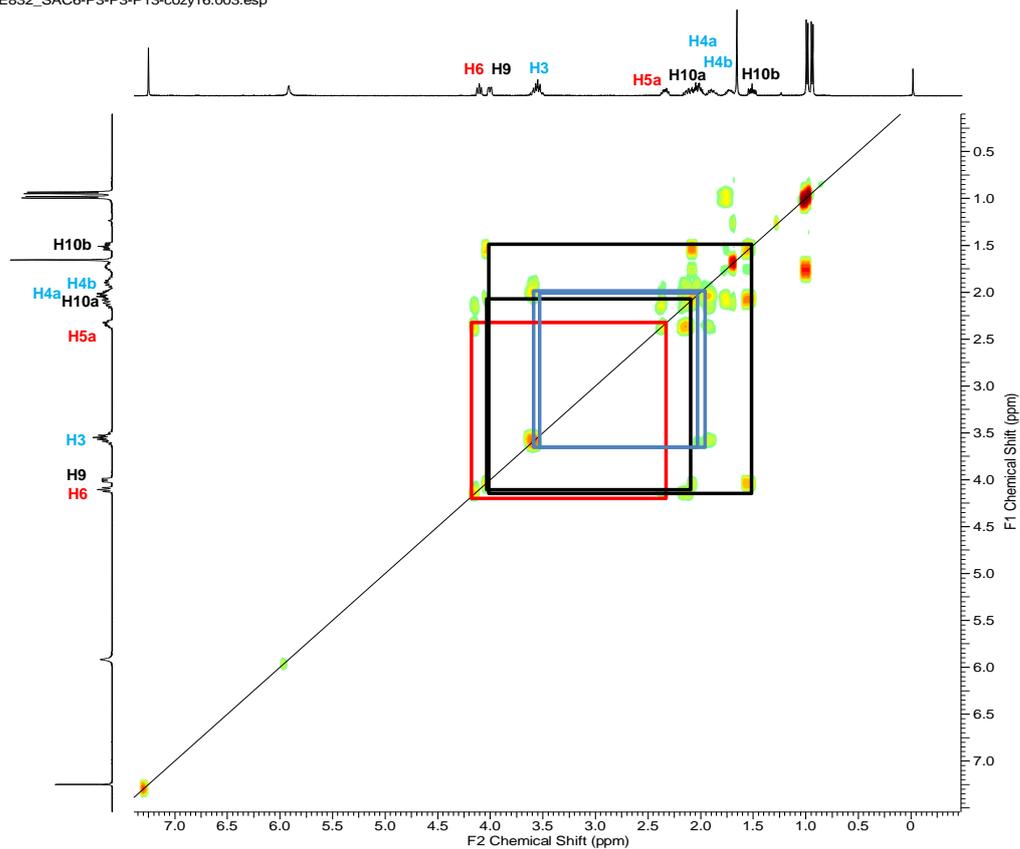


FIGURA 5.28 - Mapa de contorno COSY (CDCl₃, 400 MHz) de *ciclo* (Pro-Leu).

3E832_SAC6-P3-P3-P13-cozy16.003.esp

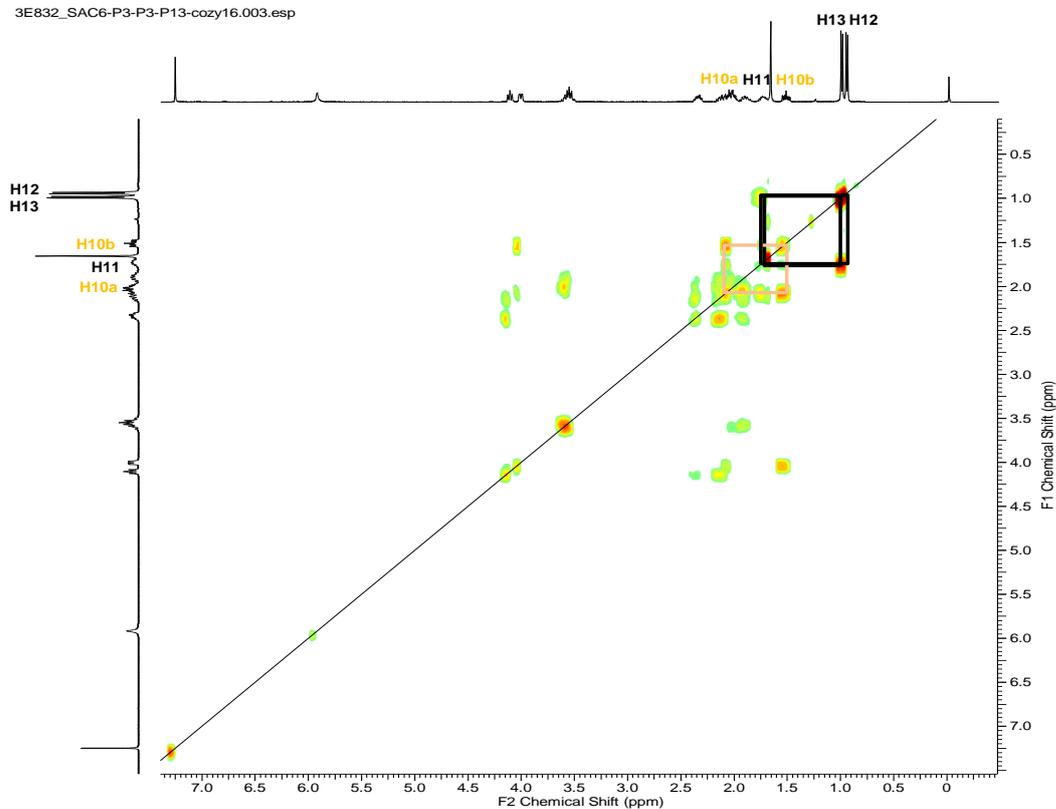


FIGURA 5.29 - Mapa de contorno COSY (CDCl₃, 400 MHz) de *ciclo* (Pro-Leu).

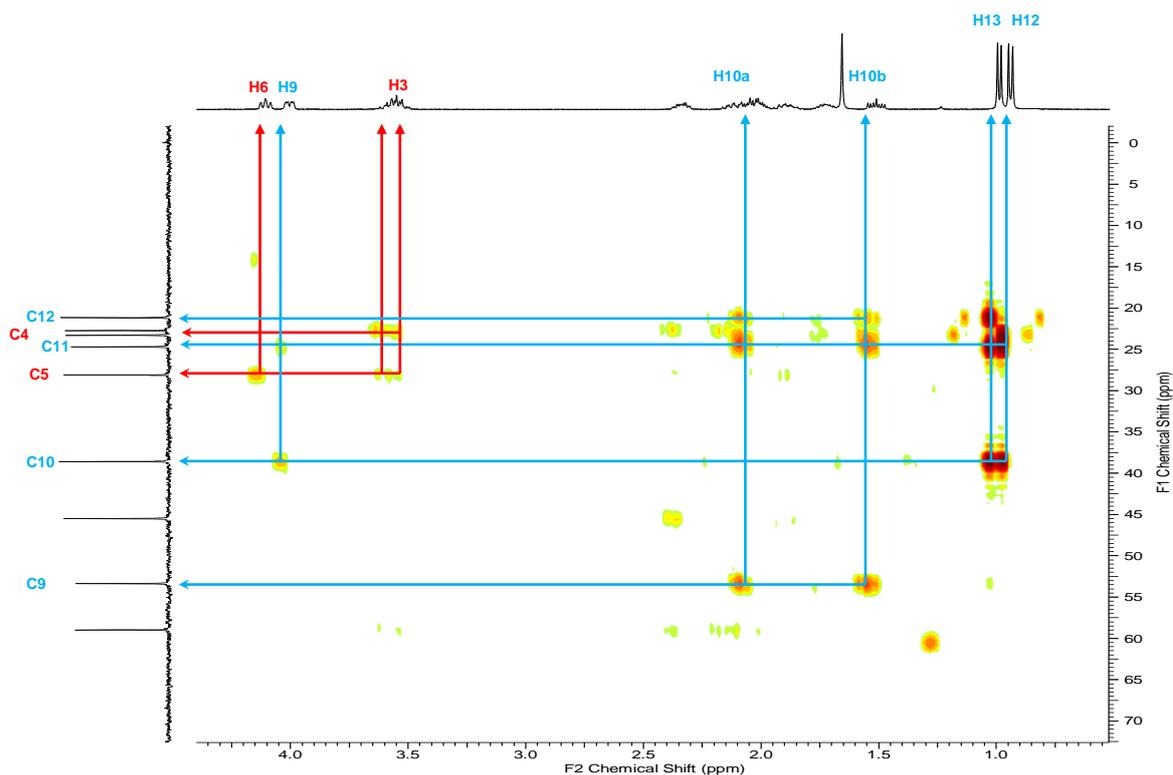


FIGURA 5.30 - Mapa de contorno HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de *ciclo* (Pro-Leu).

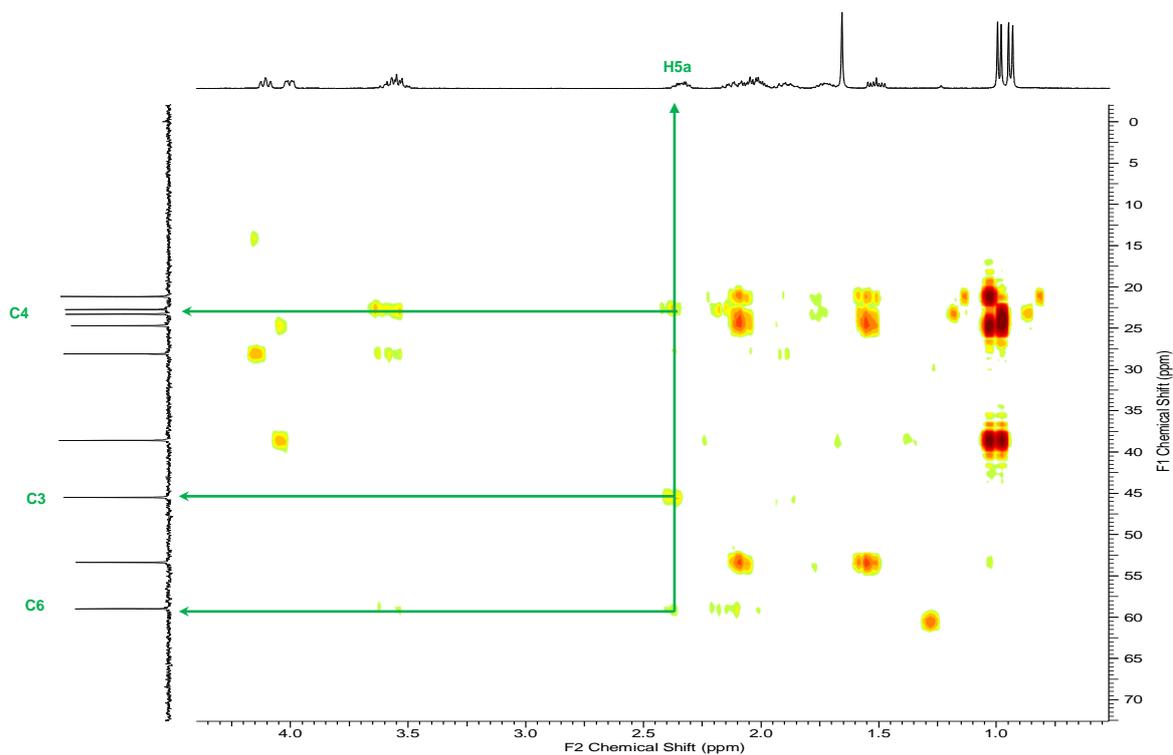


FIGURA 5.31 - Mapa de contorno HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de *ciclo* (Pro-Leu).

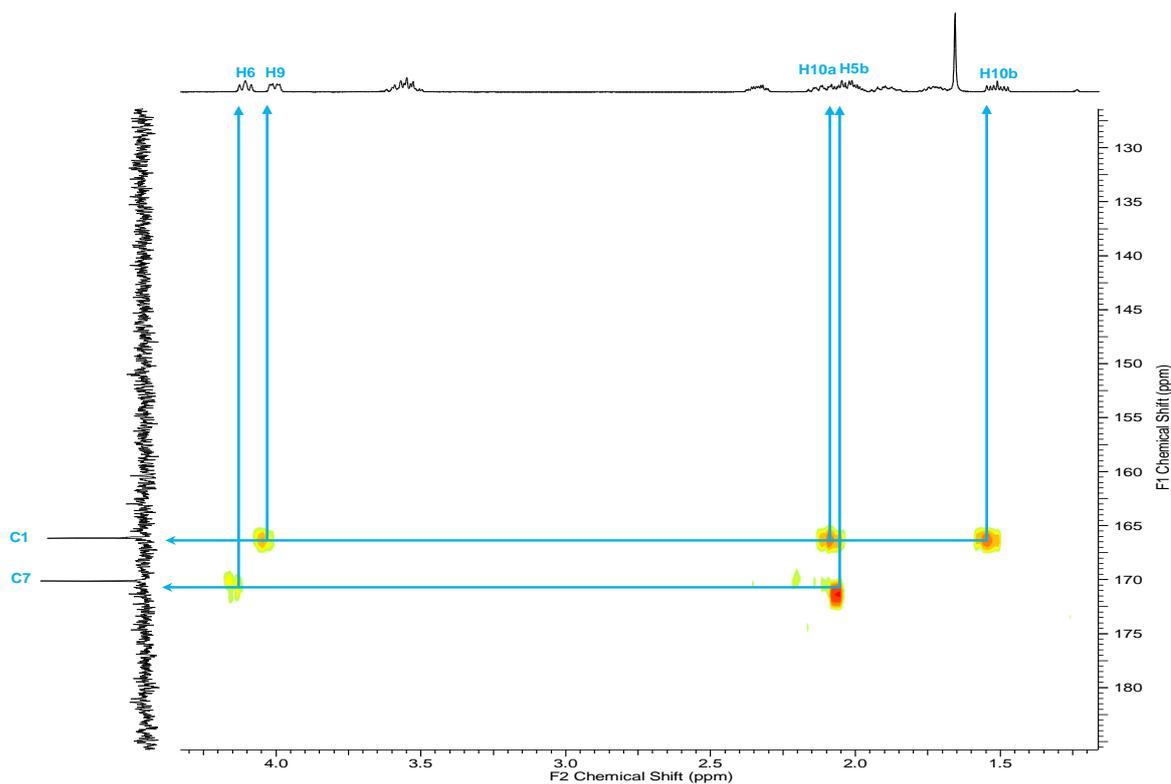


FIGURA 5.32 - Mapa de contorno HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) de *ciclo* (Pro-Leu).

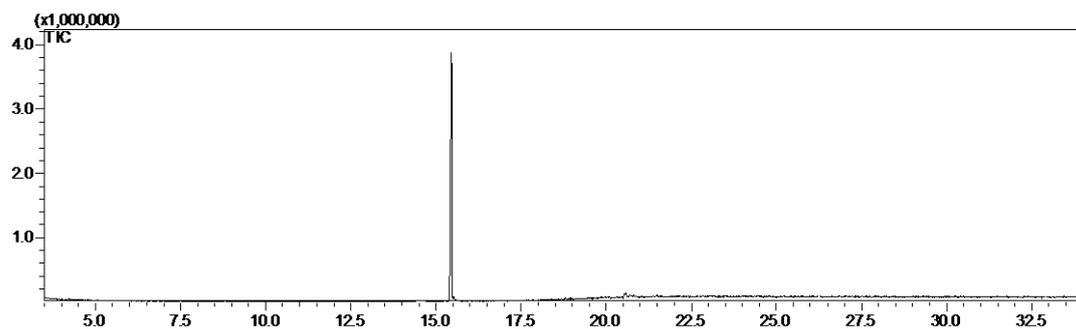


FIGURA 5.33 - Cromatograma de íons totais (TIC) da *ciclo* (Pro-Leu) obtido por GC-MS. Condições: coluna OPTIMA 5-MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μm ; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.). Injetor: 240° C, Detector: 260° C; He-1,2 mL/min.

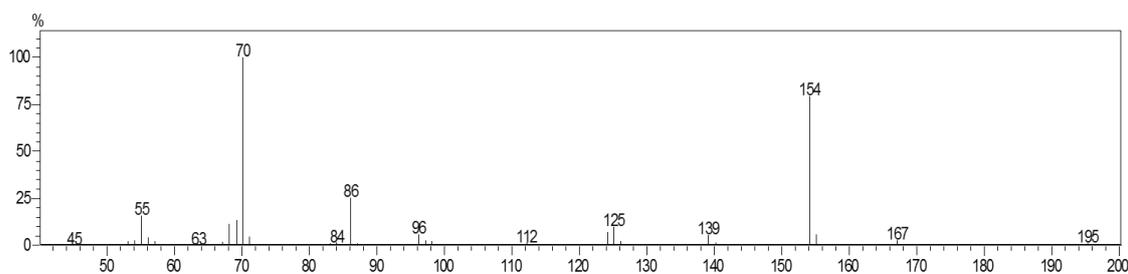


FIGURA 5.34 - Espectro de massas da *ciclo* (Pro-Leu) obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

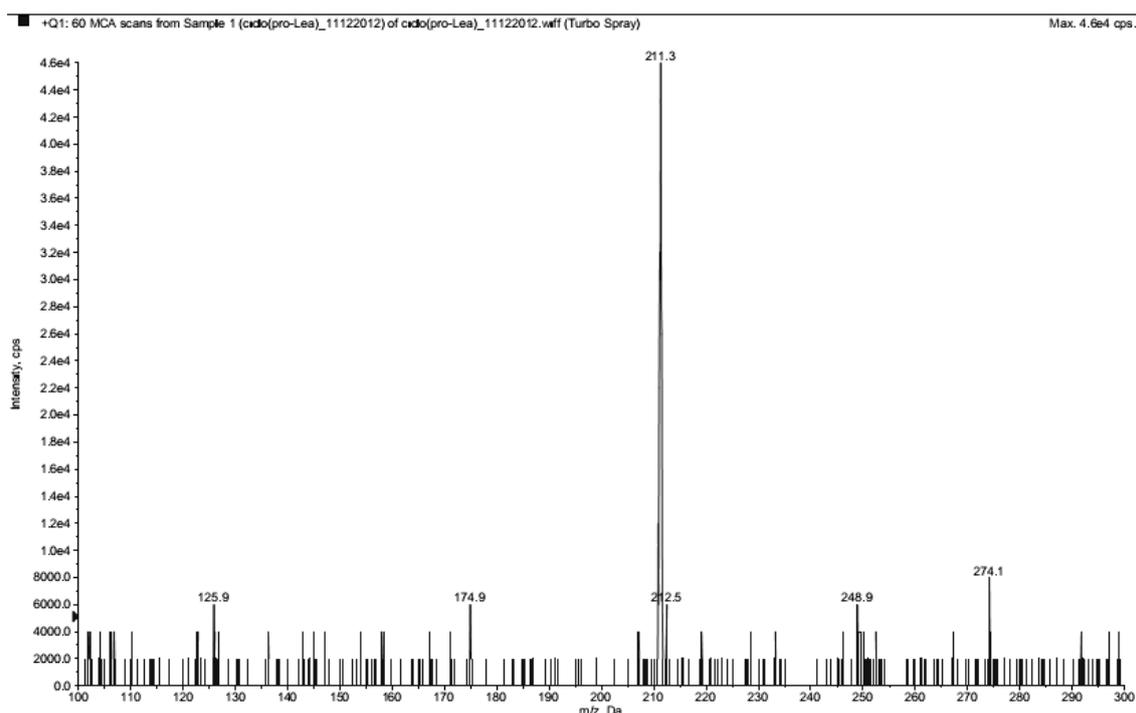


FIGURA 5.35 - Espectro de massas full scan da *ciclo* (Pro-Leu) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.

5.2.4.1.1 – Configuração relativa da substância 1 - *ciclo* (Pro-Leu)

O núcleo dicetopiperazínico de *ciclo* (Pro-Leu) possui dois centros estereogênicos, conseqüentemente podendo levar a quatro possíveis isômeros, dois *cis* e dois *trans* (FIGURA 5.36). Se fosse usado uma coluna aquiral por GC-MS, poderia ser detectado dois picos cromatográficos, um para o *cis* e outro para o *trans*. Entretanto, se uma coluna quiral fosse utilizada e a mesma for útil para separar os enantiômeros, quatro picos poderiam ser detectados, ou seja, um pico para cada isômero da *ciclo* (Pro-Leu).

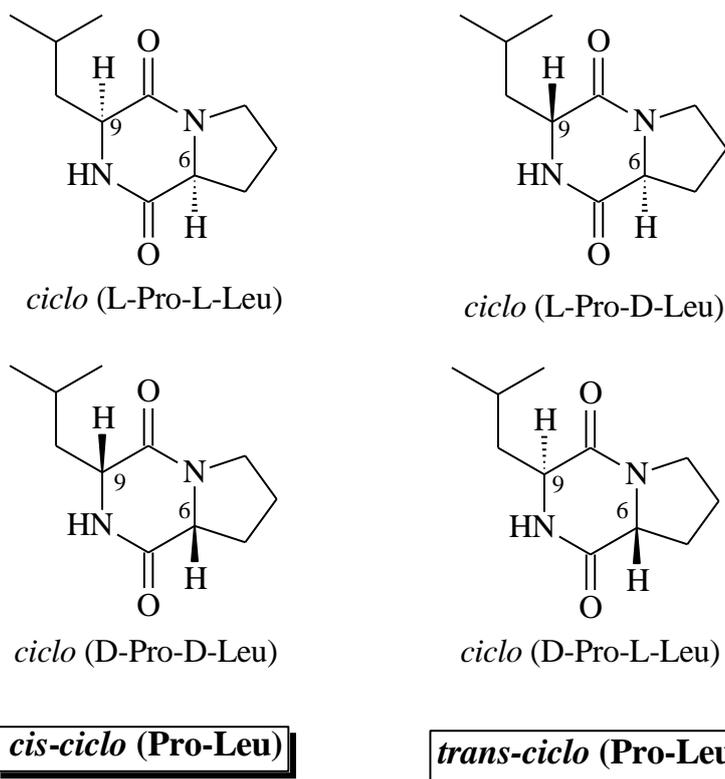


FIGURA 5.36 - Possíveis isômeros da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu).

Para saber qual dos isômeros, o *cis* ou o *trans*, foi isolado e conseqüentemente se haveria um ou mistura de dois enantiômeros, a rotação óptica foi medida, assim como também a substância foi analisada por GC-FID utilizando uma coluna quiral. A análise por GC-FID utilizando uma coluna quiral mostrou a presença de apenas 1 pico em 28,00 min, o que sugere-se a presença de apenas um enantiômero, porém ainda não seria possível saber qual, se é do *cis* ou do *trans* (FIGURA 5.37).

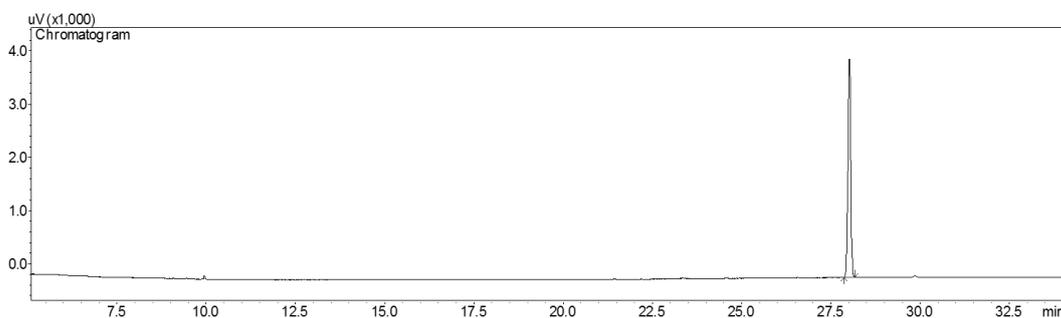


FIGURA 5.37 - Cromatograma de íons totais (TIC) de *ciclo* (Pro-Leu) obtido por GC-FID. Condições: coluna RT- γ DEXsa 30 m x 0,32 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 40° C (1 min.) (15° C/min)-190° C (1 min.) (2° C/min)-220° C (10 min.). Injetor: 215° C, Detector: 220° C; H₂-5,23 mL/min.

O valor da rotação óptica ($[\alpha]_D$) calculada para a *ciclo* (Pro-Leu) isolada no estudo foi +83,0 ° (TABELA 5.8). Como o desvio foi positivo, ao comparar com a literatura, foi observado que os enantiômeros presentes poderiam ser o *ciclo* (D-Pro-L-Leu) ou o *ciclo* (D-Pro-D-Leu), porém o valor medido para rotação óptica do composto isolado aproxima-se mais do *ciclo* (D-Pro-D-Leu) da literatura ($[\alpha]_D = +120,1$ °) (TABELA 5.8).

TABELA 5.8 - Comparação da rotação óptica do *ciclo* (Pro-Leu) isolada com os isômeros descritos na literatura.

Substância isolada	Rotação óptica $[\alpha]_D$ *	Isômeros da literatura	Rotação óptica $[\alpha]_D$
<i>ciclo</i> (Pro-Leu)	+83,0 °	<i>ciclo</i> (L-Pro-L-Leu) ¹	-133 °
		<i>ciclo</i> (L-Pro-D-Leu) ²	-97,34 °
		<i>ciclo</i> (D-Pro-L-Leu) ³	+35,0 °
		<i>ciclo</i> (D-Pro-D-Leu) ⁴	+120,1 °

* Rotação óptica foi medida em um polarímetro digital Perkin-Elmer 241. Condições da análise: c = 1 g/100 mL; etanol; 25 °C.

1: PEDRAS, M. S. C.; YU, Y.; LIU, J; Tandron-Moya, Y. A. Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*: Isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*. **60** (9/10), 717-722, 2005. Condições da análise: c = 0,30 g/100mL; etanol; 25 °C.

2: CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic Dipeptides. *ACS Chem. Biol.*, **4** (12): 1051–1059, 2009. Condições da análise: c = 10,89 mg/mL; etanol; 25 °C.

3: WEGERSKI, C. J.; FRANCE, D.; CORNELL-KENNON, S.; CREWS, P. Using a kinase screen to investigate the constituents of the sponge *Stelletta clavosa* obtained from diverse habitats. *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, **12** (21), 5631-5637, 2004.. Condições da análise: c = 0,11 g/100mL; etanol; 25 °C.

4: FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, **66** (10), 1299–1301, 2003.. Condições da análise: c= 0,10 g/100mL; etanol; 25 °C.

Com os dados apresentados ainda não seria possível determinar o enantiômero (isômero) que foi isolado. Dessa forma, foi realizado um experimento RMN *g*-NOESY com o intuito de estabelecer a estereoquímica de H-9 e H-6 (FIGURA 5.8) e consequentemente atribuir o enantiômero (isômero) isolado.

Os experimentos de *g*-NOESY ¹H-¹H (FIGURA 5.38) associados com os experimentos de $[\alpha]_D$ (TABELA 5.8) e GC-FID quiral (FIGURA 5.37)

confirmam que se trata do enantiômero *ciclo* (D-Pro-D-Leu). Quando o sinal do próton H-9 (δ 4,01) foi irradiado, foi possível observar um incremento no sinal de H-6 (δ 4,11). Quando o sinal do próton H-6 (δ 4,11) foi irradiado, também foi possível observar um incremento no sinal de H-9 (δ 4,01), confirmando que os dois hidrogênios (H-6 e H-9) estão na mesma face (β ou α) (FIGURA 5.38). Como o valor de $[\alpha]_D$ calculado foi $+83,0^\circ$ e comparando com a literatura, somente o enantiômero *ciclo* (D-Pro-D-Leu), dos que apresentam desvio positivo, (TABELA 5.8) contém os dois hidrogênios (H-6 e H-9) na mesma face, neste caso na face β da molécula. Dessa forma, o enantiômero isolado no estudo foi o *ciclo* (D-Pro-D-Leu) (FIGURA 5.39). Os enantiômeros comumente encontrados na natureza têm estereoquímica L, porém alguns trabalhos já relataram que algumas bactérias podem produzir enantiômeros D (CAMPBELL et al., 2009; FDHILA et al., 2003; WEGERSKI et al., 2004). Esta é a primeira vez que uma dicetopiperazina e enantiômero com estereoquímica D-D é descrito em *Xac*, porém esse estereoisômero foi relatado pela primeira vez por FDHILA et al., 2003. É importante destacar que há um excesso enantiomérico do composto isolado, porém utilizando a forma de trabalho não foi possível saber quanto de excesso está presente. Futuramente, isso será realizado.

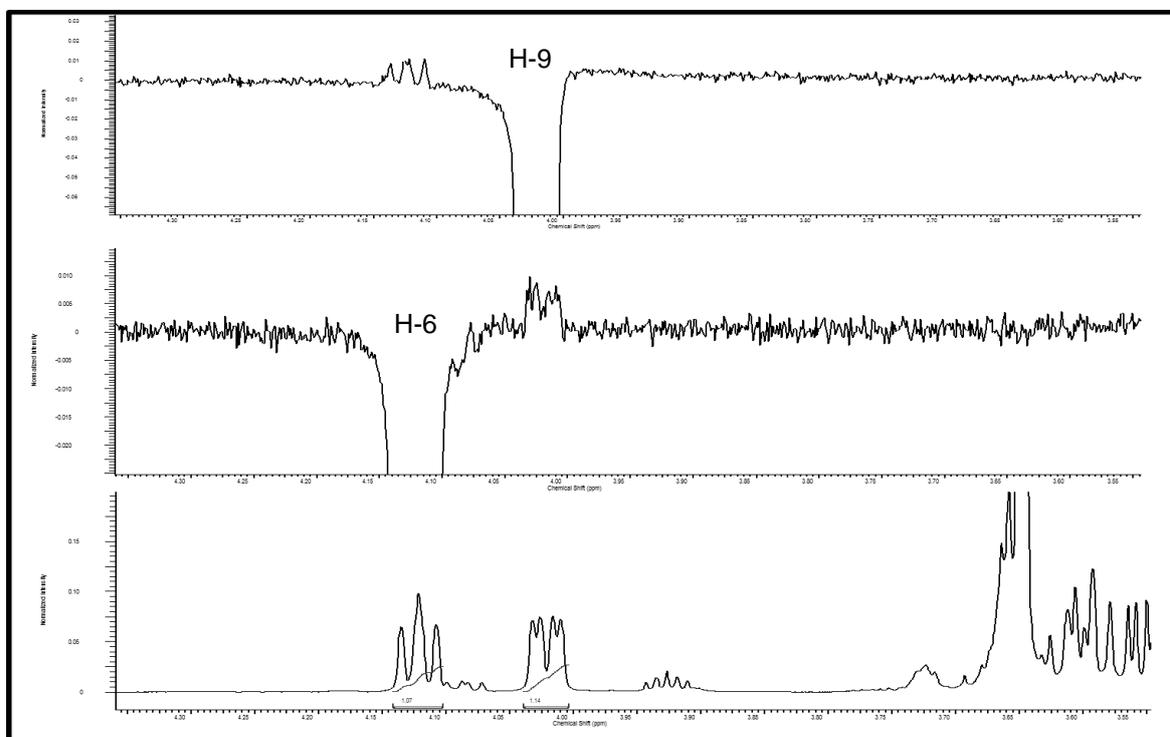


FIGURA 5.38 - Espectros de *g*-NOESY (^1H - ^1H), (600 MHz, CDCl_3) da substância *ciclo* (Pro-Leu).

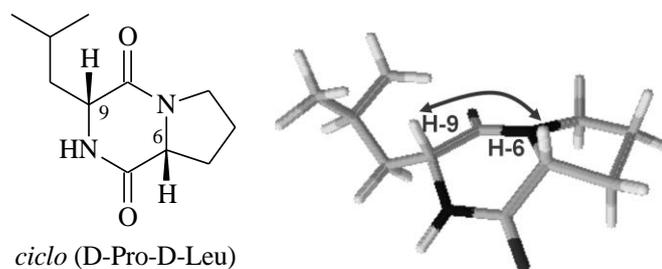


FIGURA 5.39 - Estrutura química do enantiômero *ciclo* (D-Pro-D-Leu) isolado neste estudo.

5.2.4.2 - Substância 02 – *ciclo* (Pro-Val)

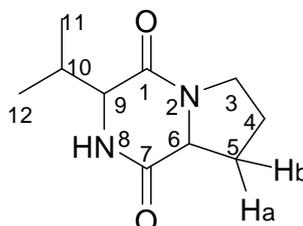


FIGURA 5.40 - Estrutura química da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Val).

A substância *ciclo* (Pro-Val) (FIGURA 5.40) foi isolada em mistura (fração F3), porém apresentou como majoritária (79%) por GC-MS. A análise por GC-MS mostrou a presença de quatro picos, sendo o pico 3 majoritário (FIGURA 5.41). O espectro de massas mostrou o fragmento m/z , 196, referente ao íon molecular da substância (FIGURA 5.42). O perfil de fragmentação (FIGURA 5.42) mostra que a substância pertence à classe das dicetopiperazinas, conforme WANG et al, 2010b (FIGURA 5.43), sendo similar ao perfil de fragmentação da *ciclo* (Pro-Val). A análise por RMN ^1H e ^{13}C da fração, confirmou a substância como *ciclo* (Pro-Val) por comparação com dados das literaturas, FURTADO et al., 2005 e CAMPBELL et al., 2009 (TABELA 5.9 e FIGURA 5.44).

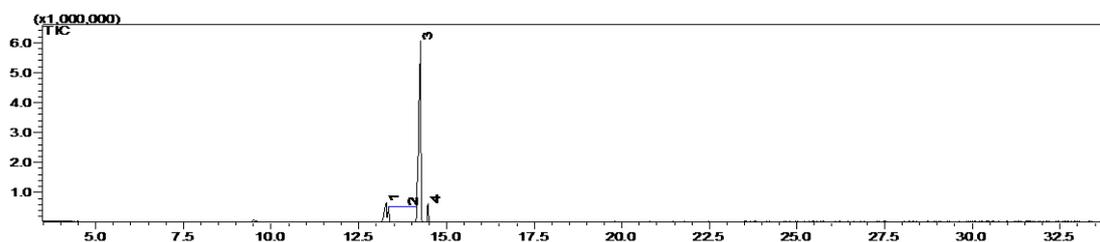


FIGURA 5.41 - Cromatograma de íons totais (TIC) de F3 obtido por GC-MS. Condições: coluna OPTIMA 5-MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μm ; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.). Injetor: 240° C, Detector: 260° C; He-1,2 mL/min.

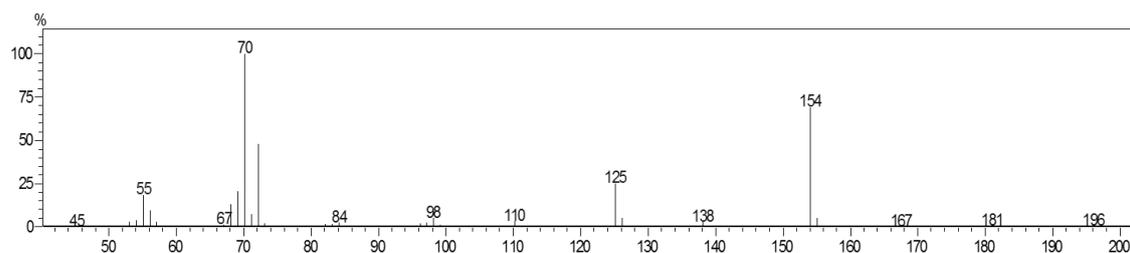


FIGURA 5.42 - Espectro de massas de F3 obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

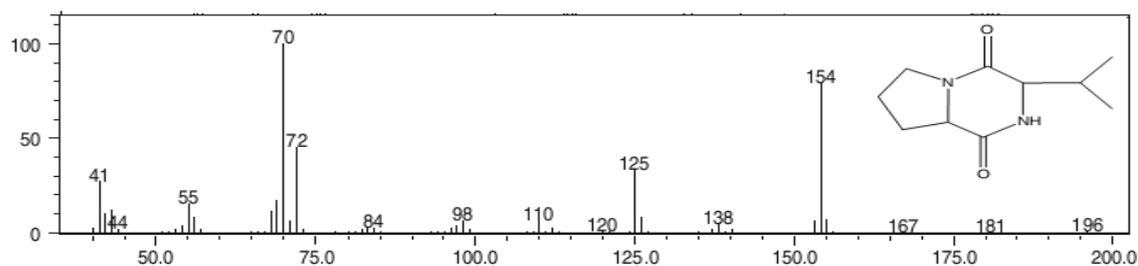


FIGURA 5.43 - Espectros de massas da substância *ciclo* (Pro-Val) na literatura [WANG et al., 2010b]. Impacto eletrônico 70 eV.

TABELA 5.9 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da *ciclo* (Pro-Val) em comparação com os dados da literatura.

Substância 2		Substância 2 na literatura		
Nº	δ_{H}^1	δ_{C}^2	δ_{H} (lit) ³	δ_{C} (lit) ⁴
1	-	165,0	-	165,2
2	-	-	-	-
3	3,46 – 3,59 (2H, <i>m</i>)	45,3	3,45 – 3,59 (2H, <i>m</i>)	45,3
4	1,89 – 2,00 (2H, <i>m</i>)	22,4	1,84 – 2,01 (2H, <i>m</i>)	22,6
5	5a: 2,29 – 2,36 (1H, <i>m</i>) 5b: 1,89 – 2,00 (1H, <i>m</i>)	28,4	5a: 2,28 – 2,34 (1H, <i>m</i>) 5b: 1,84 – 2,01 (1H, <i>m</i>)	28,6
6	4,21 (1H, <i>ddd</i> , $J = 1,5; 6,8; 12,5$ Hz)	58,9	4,21 (1H, <i>ddd</i> , $J = 2,2; 6,5; 12,1$ Hz)	59,0
7	-	170,2	-	170,4
8	4,87 (1H, <i>sl</i>)	-	4,56 (1H, <i>sl</i>)	-
9	4,02 – 4,05 (1H, <i>m</i>)	60,5	4,01 – 4,03 (1H, <i>m</i>)	60,7
10	2,49 (1H, <i>dsept</i> , $J = 2,5; 7,0$ Hz)	28,5	2,48 (1H, <i>dsept</i> , $J = 2,5; 6,9$ Hz)	28,7
11	0,93 (3H, <i>d</i> , $J = 7,3$ Hz)	16,1	0,93 (3H, <i>d</i> , $J = 6,9$ Hz)	16,3
12	1,09 (3H, <i>d</i> , $J = 7,3$ Hz)	19,2	1,07 (3H, <i>d</i> , $J = 6,9$ Hz)	19,3

¹ = Dados de RMN ^1H a 400 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Val) isolada.

² = Dados de RMN ^{13}C a 100 MHz em CDCl_3 da *ciclo* (Pro-Val) isolada.

³ = Dados de RMN ^{13}H a 400 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Val) na literatura FURTADO et al., 2005.

⁴ = Dados de RMN ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 da *ciclo* (Pro-Val) na literatura CAMPBELL et al., 2009.

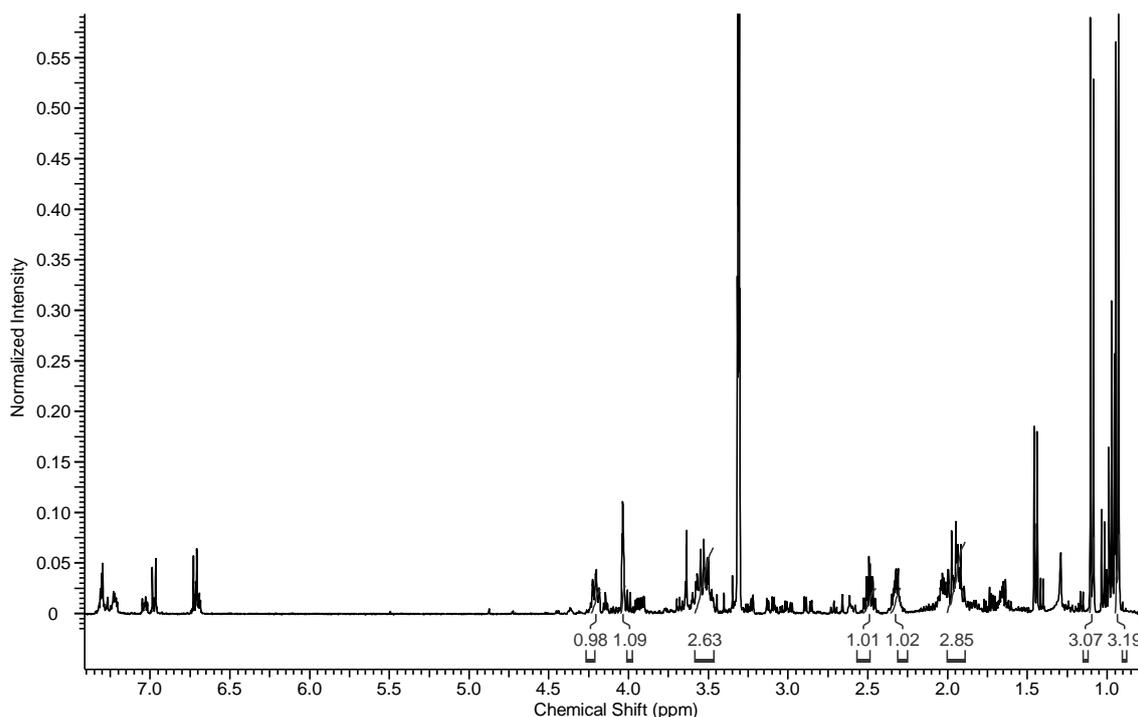
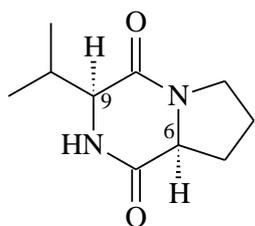


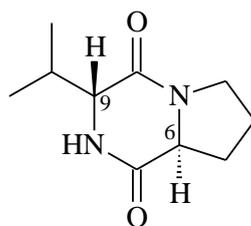
FIGURA 5.44 - Espectro de RMN de ^1H da *ciclo* (Pro-Val) (CD_3OD , 400 MHz).

5.2.4.2.1 – Configuração relativa da substância 2 - *ciclo* (Pro-Val)

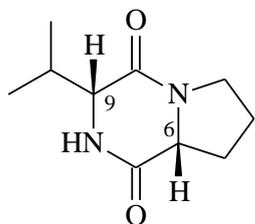
O núcleo dicetopiperazínico de *ciclo* (Pro-Val) possui dois centros estereogênicos, conseqüentemente podendo levar a quatro possíveis isômeros, dois *cis* e dois *trans* (FIGURA 5.45).



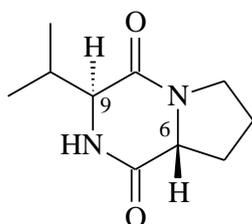
ciclo (L-Pro-L-Val)



ciclo (L-Pro-D-Val)



ciclo (D-Pro-D-Val)



ciclo (D-Pro-L-Val)

***cis-ciclo* (Pro-Val)**

***trans-ciclo* (Pro-Val)**

FIGURA 5.45 - Possíveis isômeros da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu).

Para saber qual dos isômeros, o *cis* ou o *trans*, foi isolado e conseqüentemente se haveria um ou mistura de dois enantiômeros, a rotação óptica foi medida, assim como também a substância foi analisada por GC-FID utilizando uma coluna quiral. A análise por GC-FID utilizando uma coluna quiral mostrou a presença de apenas 1 pico em 24,60 min, o que permite inferir que pode haver apenas um enantiômero, porém ainda não seria possível saber qual, se é do *cis* ou do *trans* (FIGURA 5.46).

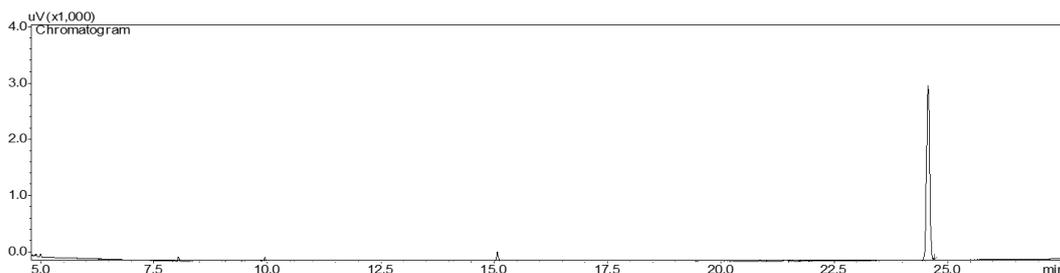


FIGURA 5.46 - Cromatograma de íons totais (TIC) de *ciclo* (Pro-Val) obtido por GC-FID. Condições: coluna RT- γ DEXsa 30 m x 0,32 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 40° C (1 min.) (15° C/min)-190° C (1 min.) (2° C/min)-220° C (10 min.). Injetor: 215° C, Detector: 220° C; H₂-5,23 mL/min.

O valor da rotação óptica ($[\alpha]_D$) calculada para a *ciclo* (Pro-Val) isolada no estudo foi -87,7 °. Como o desvio foi negativo, ao comparar com a literatura foi observado que os enantiômeros presentes poderiam ser o *ciclo* (L-Pro-L-Val) ou o *ciclo* (L-Pro-D-Val) (TABELA 5.10).

TABELA 5.10 - Comparação da rotação óptica do *ciclo* (Pro-Val) isolada com os isômeros descritos na literatura.

Substância isolada	Rotação	Isômeros da literatura	Rotação
	óptica [α] _D *		óptica [α] _D
<i>ciclo</i> (Pro-Val)	-87,7 °	<i>ciclo</i> (L-Pro-L-Val) ¹	-110 °
		<i>ciclo</i> (L-Pro-D-Val) ²	-98,5 °
		<i>ciclo</i> (D-Pro-L-Val) ³	+99,5 °
		<i>ciclo</i> (D-Pro-D-Val) ⁴	+120,1 °

* Rotação óptica foi medida em um polarímetro digital Perkin-Elmer 241. Condições da análise: c = 0,30 g/100 mL; etanol; 25 °C.

1: PEDRAS, M. S. C.; YU, Y.; LIU, J; Tandron-Moya, Y. A. Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*: Isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*. **60** (9/10), 717-722, 2005. Condições da análise: c = 0,11 g/100 mL; etanol; 25 °C.

2: CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chem. Biol.*, **4** (12): 1051–1059, 2009. Condições da análise: c = 8,02 mg/mL; etanol; 25 °C

3: CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chem. Biol.*, **4** (12): 1051–1059, 2009. Condições da análise: c = 8,36 mg/mL; etanol; 25 °C.

4: FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, **66** (10), 1299–1301, 2003.. Condições da análise: c= 0,10 g/100mL; etanol; 25 °C.

Com os dados apresentados ainda não seria possível determinar o enantiômero (isômero) que foi isolado. Dessa forma, foi realizado um experimento RMN *g*-NOESY com o intuito de estabelecer a estereoquímica de H-9 e H-6 (FIGURA 5.47) e conseqüentemente atribuir o enantiômero (isômero) isolado.

Os experimentos de *g*-NOESY ¹H-¹H (FIGURA 5.47) associados com os experimentos de [α]_D (TABELA 5.10) e GC-FID quiral (FIGURA 5.46) confirmam que se trata do enantiômero *ciclo* (L-Pro-L-Val). Quando o sinal do próton H-9 (δ 4,02 – 4,05) foi irradiado, foi possível observar um incremento no sinal de H-6 (δ 4,21). Quando o sinal do próton H-6 (δ 4,21) foi irradiado, também foi possível observar um incremento no sinal de H-9 (δ 4,02 – 4,05), confirmando que os dois hidrogênios (H-6 e H-9) estão na mesma face (α ou β) (FIGURA 5.47). Como o valor de [α]_D calculado foi -87,7 ° e comparando com a literatura, somente o enantiômero *ciclo* (L-Pro-L-Val), dos que apresentam desvio negativo, (TABELA 5.10) contém os dois hidrogênios (H-6 e H-9) na mesma face, neste caso na face α da molécula. Dessa forma, o enantiômero isolado no estudo foi o

ciclo (L-Pro-L-Val) (FIGURA 5.48). Neste caso, a bactéria produziu o composto com estereoquímica natural, L. Esta é a primeira vez que a estereoquímica da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Val) é descrito em *Xac*. É importante destacar que há um excesso enantiomérico do composto isolado, porém utilizando a forma de trabalho não foi possível saber quanto de excesso está presente. Futuramente, isso será realizado.

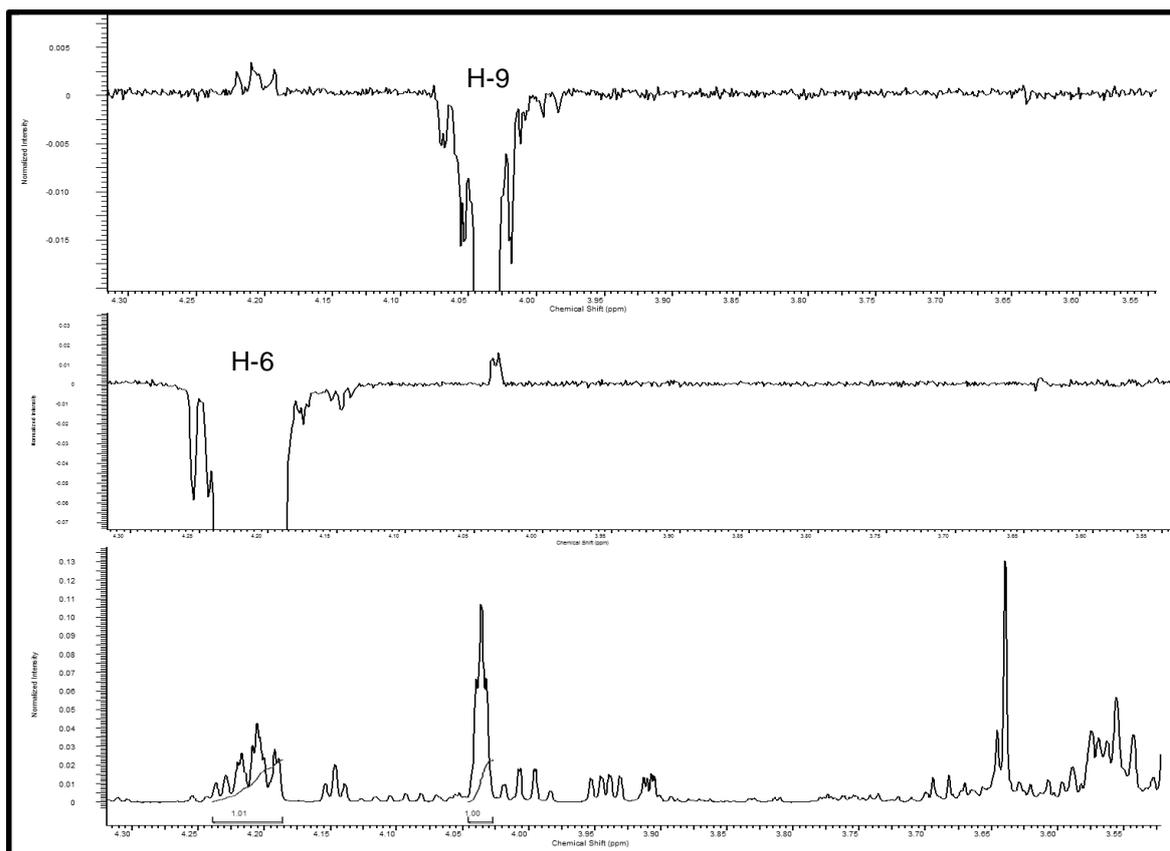


FIGURA 5.47 - Espectros de g -NOESY (^1H - ^1H), (600 MHz, CD_3OD) da substância *ciclo* (Pro-Val).

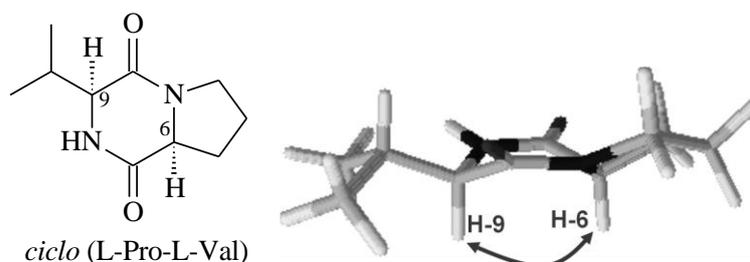


FIGURA 5.48 - Estrutura química do enantiômero *ciclo* (L-Pro-L-Val) isolado neste estudo.

5.2.4.3 - Substância 3 – *ciclo* (Pro-Phe)

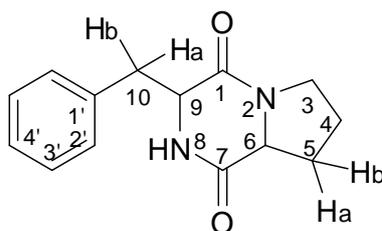


FIGURA 5.49 - Estrutura química da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Phe).

A substância *ciclo* (Pro-Phe) (FIGURA 5.49) foi isolada da fração F8. A análise por GC-MS mostrou a presença de apenas quatro picos, sendo o pico 4 (eluído no tempo de retenção 20,61 min) com área percentual de 98,7%, ou seja, o composto representado pelo pico 4 apresenta 98,7% de pureza por GC-MS (FIGURA 5.50). O espectro de massas deste pico mostrou o fragmento m/z , 244, referente ao íon molecular da substância (FIGURA 5.51). O perfil de fragmentação mostra que a substância pertence à classe das dicetopiperazinas, conforme WANG et al, 2010b (FIGURA 5.52), sendo similar ao perfil de fragmentação da *ciclo* (Pro-Phe). A análise por RMN ^1H e ^{13}C da fração, confirmou que a substância na fração é a *ciclo* (Pro-Phe) por comparação com dados da literatura, FURTADO et al., 2005 (TABELA 5.11 e FIGURA 5.53 a 5.55).

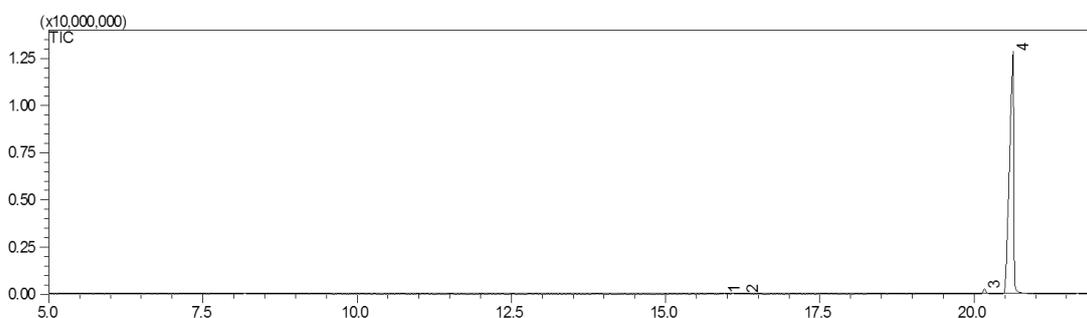


FIGURA 5.50 - Cromatograma de íons totais (TIC) da *ciclo* (Pro-Phe) obtido por GC-MS. Condições: coluna DB-5MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μm ; rampa de 80 $^{\circ}$ C(1 min.) (10 $^{\circ}$ C/min)-290 $^{\circ}$ C (5 min.). Injetor: 280 $^{\circ}$ C, Detector: 290 $^{\circ}$ C; He-1,2 mL/min.

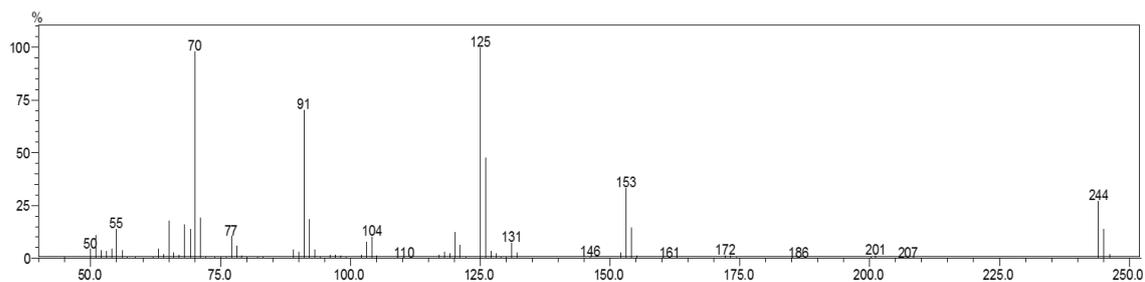


FIGURA 5.51 - Espectro de massas de *ciclo* (Pro-Phe) obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

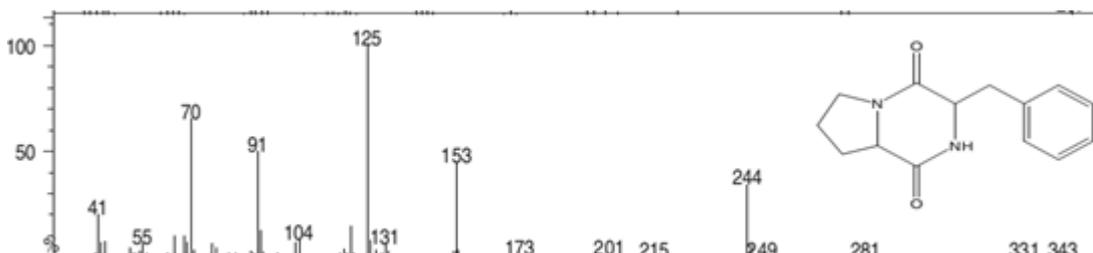


FIGURA 5.52 - Espectros de massas da substância *ciclo* (Pro-Phe) da literatura [WANG et al., 2010b]. Impacto eletrônico 70 eV.

TABELA 5.11 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da *ciclo* (Pro-Phe) em comparação com os dados da literatura.

Substância 3		Substância 3 na lit		
Nº	δ_{H}^1	δ_{C}^2	δ_{H} (lit) ³	δ_{C} (lit) ⁴
1	-	167,1	-	167,3
2	-	-	-	-
3	3a: 3,52 – 3,58 (1H, <i>m</i>) 3b: 3,33 – 3,41 (1H, <i>m</i>)	46,1	3a: 3,48 – 3,56 (1H, <i>m</i>) 3b: 3,33 – 3,39 (1H, <i>m</i>)	45,9
4	1,76 – 1,84 (2H, <i>m</i>)	22,9	1,75 – 1,83 (2H, <i>m</i>)	23,1
5	5a: 1,16 – 1,28 (1H, <i>m</i>) 5a: 2,06 – 2,13 (1H, <i>m</i>)	29,6	5a: 1,15 – 1,24 (1H, <i>m</i>) 5a: 2,04 – 2,12 (1H, <i>m</i>)	29,7
6	4,07 (1H, <i>ddd</i> , $J = 1,8; 6,3; 11,0$ Hz)	60,2	4,06 (1H, <i>ddd</i> , $J = 1,7; 6,3; 10,8$ Hz)	60,4
7	-	171,1	-	171,3
8	4,74 (1H, <i>s</i>)	-	4,56 (1H, <i>s</i>)	-
9	4,45 (1H, <i>ddd</i> , $J = 1,5; 5,0; 5,0$ Hz)	57,9	4,44 (1H, <i>ddd</i> , $J = 1,0; 4,8; 5,0$ Hz)	58,0
10	10a: 3,16 (1H, <i>dd</i> , $J = 5,0; 14,0$ Hz) 10b: 3,17 (1H, <i>dd</i> , $J = 5,0; 14,0$ Hz)	38,4	10a: 3,14 (1H, <i>dd</i> , $J = 5,0; 14,4$ Hz) 10b: 3,18 (1H, <i>dd</i> , $J = 4,8; 14,4$ Hz)	38,6
1'	-	137,5	-	137,6
2'	7,21 – 7,32 (1H, <i>m</i>)	131,2	7,20 – 7,29 (1H, <i>m</i>)	131,4
3'	7,21 – 7,32 (1H, <i>m</i>)	129,6	7,20 – 7,29 (1H, <i>m</i>)	130,1
4'	7,21 – 7,32 (1H, <i>m</i>)	128,2	7,20 – 7,29 (1H, <i>m</i>)	128,5

¹ = Dados de RMN ^1H a 400 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Phe) isolada.

² = Dados de RMN ^{13}C a 100 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Phe) isolada.

³ = Dados de RMN ^1H a 400 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Phe) na literatura, FURTADO et al., 2005.

⁴ = Dados de RMN ^{13}C a 100 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Phe) na literatura, FURTADO et al., 2005.

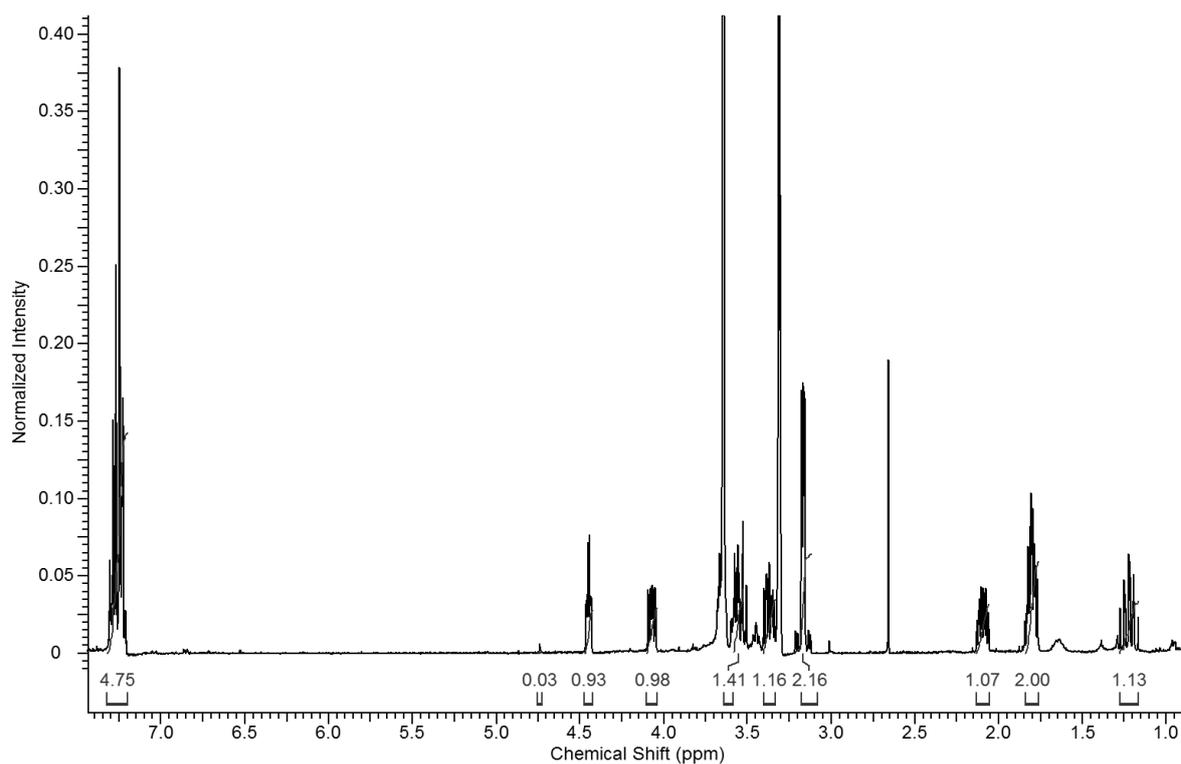


FIGURA 5.53 - Espectro de RMN de ¹H da *ciclo* (Pro-Phe) (CD₃OD, 400 MHz).

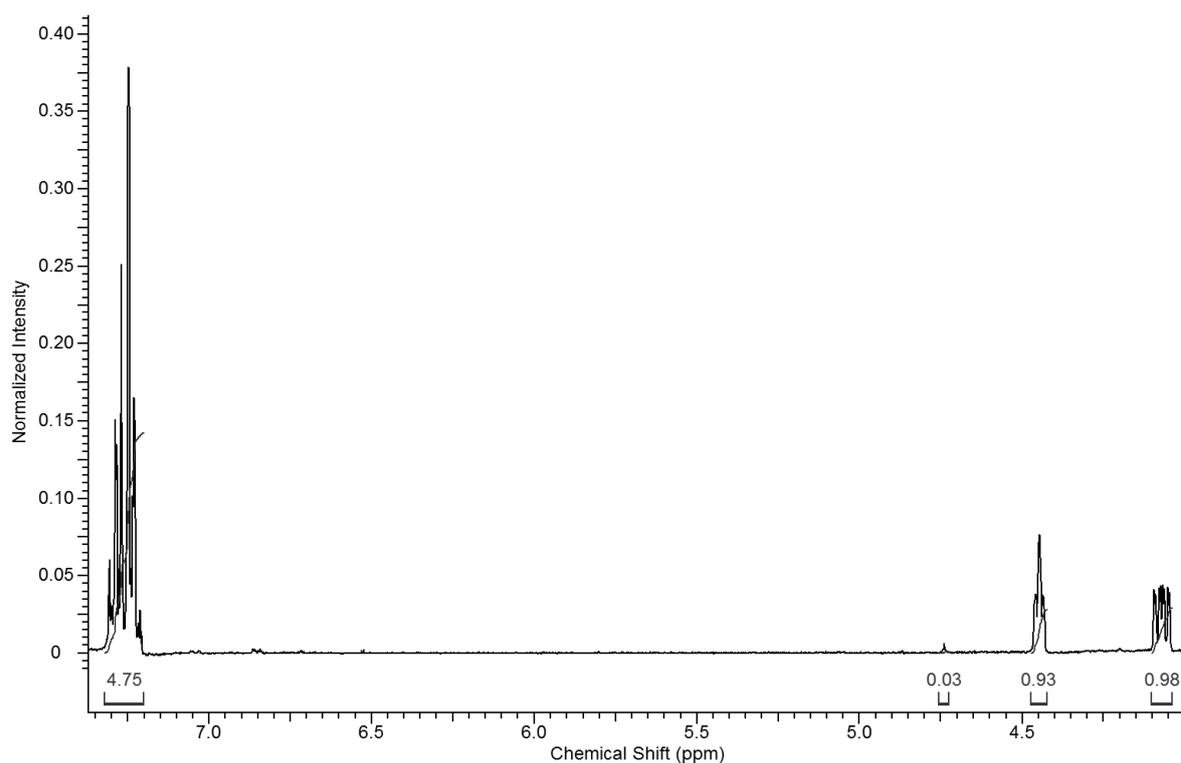


FIGURA 5.54 - Ampliação do espectro de RMN de ¹H da *ciclo* (Pro-Phe) (CD₃OD, 400 MHz).

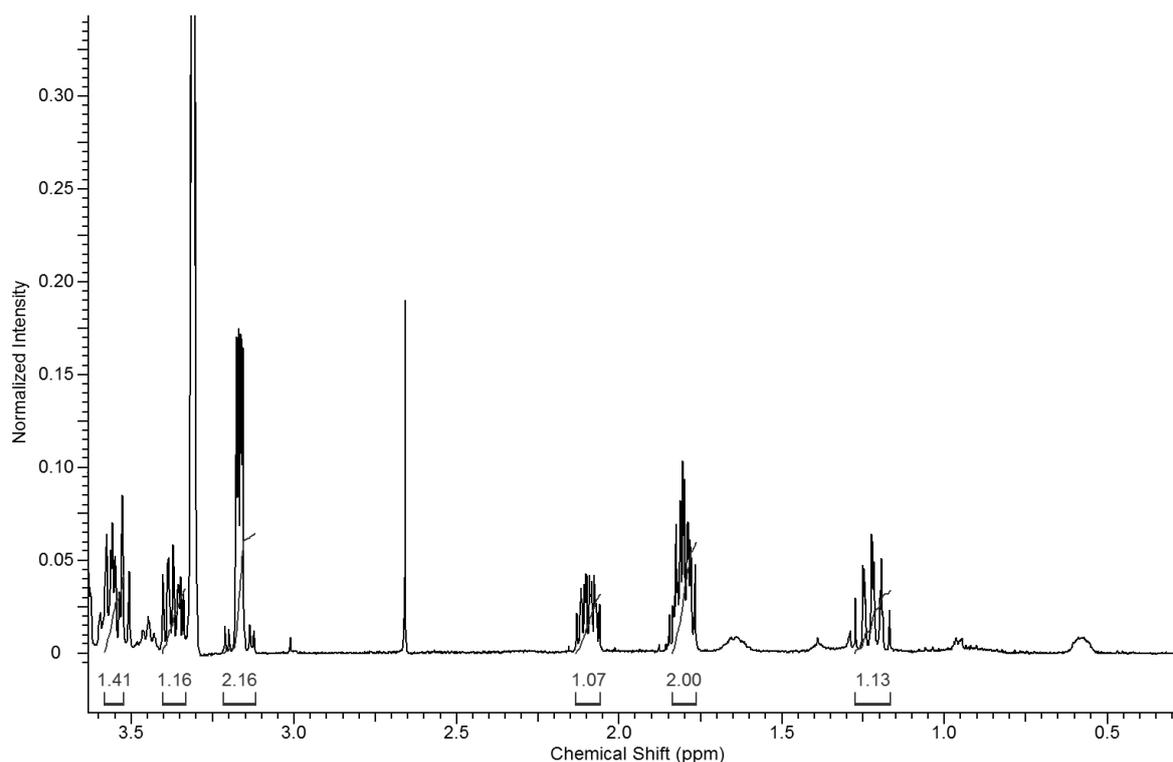


FIGURA 5.55 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da *ciclo* (Pro-Phe) (CD_3OD , 400 MHz).

5.2.4.3.1 – Configuração relativa da substância 3 - *ciclo* (Pro-Phe)

Assim como *ciclo* (Pro-Leu) e *ciclo* (Pro-Val), o núcleo dicetopiperazínico de *ciclo* (Pro-Phe) possui dois centros estereogênicos, conseqüentemente podendo levar a quatro possíveis isômeros, dois *cis* e dois *trans* (FIGURA 5.56).

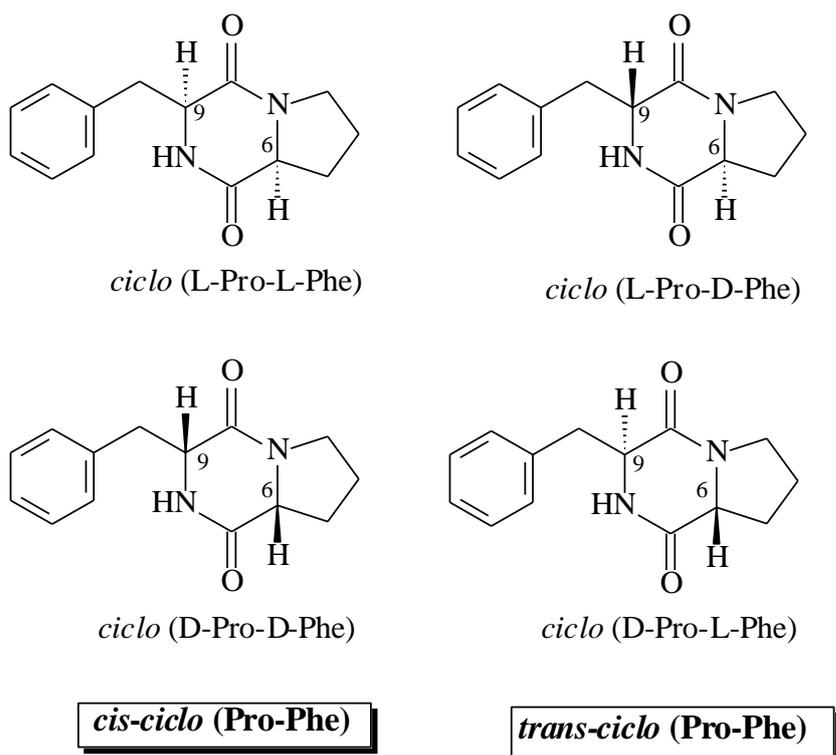


FIGURA 5.56 - Possíveis isômeros da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Phe).

Para saber qual dos isômeros, o *cis* ou o *trans*, foi isolado e conseqüentemente se haveria um ou mistura de dois enantiômeros, a rotação óptica foi medida e comparado com dados da literatura. Neste caso, não foi possível realizar análises no GC-FID utilizando um coluna quiral, porque o composto elui em temperatura do forno não suportada pela coluna.

O valor da rotação óptica ($[\alpha]_D$) calculada para a *ciclo* (Pro-Phe) isolada no estudo foi $-87,6^\circ$ (TABELA 5.12). Como o desvio foi negativo, ao comparar com a literatura, foi observado que os enantiômeros presentes poderiam ser o *ciclo* (L-Pro-L-Phe) ou o *ciclo* (L-Pro-D-Phe), porém o valor medido para rotação óptica do composto isolado aproxima-se mais do *ciclo* (L-Pro-L-Leu) da literatura ($[\alpha]_D = -93,9^\circ$) (TABELA 5.12).

TABELA 5.12 - Comparação da rotação óptica do *ciclo* (Pro-Phe) isolada com os isômeros descritos na literatura.

Substância isolada	Rotação	Isômeros da literatura	Rotação
	óptica [α] _D *		óptica [α] _D
<i>ciclo</i> (Pro-Phe)	-87,6 °	<i>ciclo</i> (L-Pro-L-Phe) ¹	-93.9 °
		<i>ciclo</i> (L-Pro-D-Phe) ²	-79.0 °
		<i>ciclo</i> (D-Pro-L-Phe) ³	+77,13 °
		<i>ciclo</i> (D-Pro-D-Phe) ⁴	+88.7 °

* Rotação óptica foi medida em um polarímetro digital Perkin-Elmer 241. Condições da análise: c = 0.5 g/100 mL; etanol; 25 °C.

1: JAYATILAKE, G. S.; THORNTON, M. P.; LEONARD, A. C.; GRIMWADE, J. E.; BAKER, B. J. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nat. Prod.*, **59** (3), 293-296, 1999. Condições da análise: c = 0,36 g/100mL; etanol; 25 °C.

2: CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chem. Biol.*, **4** (12): 1051–1059, 2009. Condições da análise: c = 9,38 mg/mL; etanol; 25 °C.

3: CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chem. Biol.*, **4** (12): 1051–1059, 2009. Condições da análise: c = 8,12 mg/mL; etanol; 25 °C.

4: FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, **66** (10), 1299–1301, 2003.. Condições da análise: c= 0,22 g/100mL; etanol; 25 °C.

Foi realizado um experimento de RMN *g*-NOESY com o intuito de estabelecer a estereoquímica de H-9 e H-6 (FIGURA 5.57) e consequentemente atribuir o enantiômero (isômero) isolado.

Os experimentos de *g*-NOESY ¹H-¹H (FIGURA 5.57) associados com os experimentos de [α]_D (TABELA 5.12) confirmam que se trata do enantiômero *ciclo* (L-Pro-L-Phe). Quando o sinal do próton H-9 (δ 4,45) foi irradiado, foi possível observar um incremento no sinal de H-6 (δ 4,07). Quando o sinal do próton H-6 (δ 4,07) foi irradiado, também foi possível observar um incremento no sinal de H-9 (δ 4,45), confirmando que os dois hidrogênios (H-6 e H-9) estão na mesma face (β ou α) (FIGURA 5.57). Como o valor de [α]_D calculado foi -87,6 ° e comparando com a literatura, somente o enantiômero *ciclo* (L-Pro-L-Phe), dos que apresentam desvio negativo, (TABELA 5.12) contém os dois hidrogênios (H-6 e H-9) na mesma face, neste caso na face α da molécula. Dessa forma, o enantiômero isolado no estudo foi o *ciclo* (L-Pro-L-Phe) (FIGURA 5.58). É importante destacar que há um excesso enantiomérico do composto

isolado, porém utilizando a forma de trabalho não foi possível saber quanto de excesso está presente. Futuramente, isso será realizado.

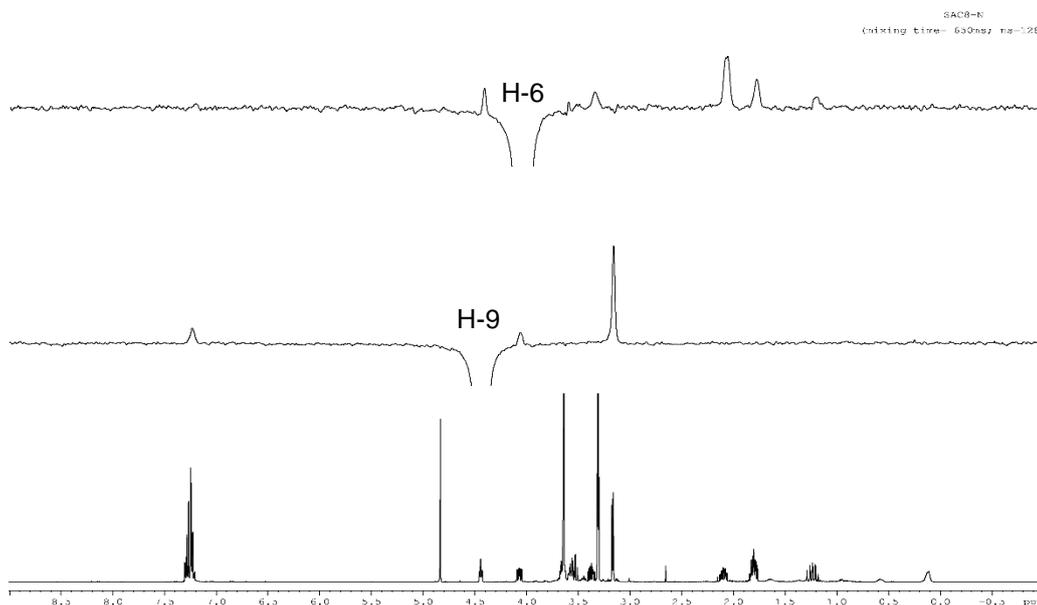


FIGURA 5.57 - Espectros de g -NOESY (^1H - ^1H), (400 MHz, CD_3OD) da substância *ciclo* (Pro-Phe).

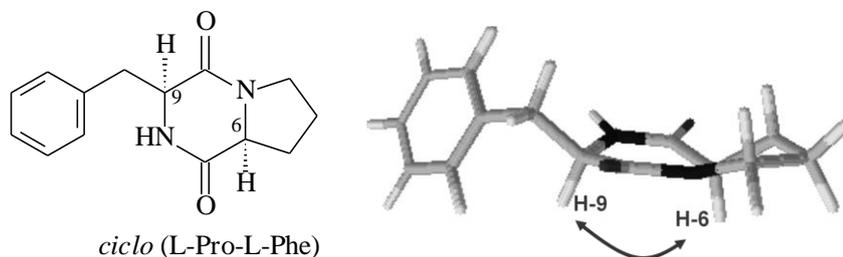


FIGURA 5.58 - Estrutura química do enantiômero *ciclo* (L-Pro-L-Phe) isolado neste estudo.

5.2.4.4 - Substância 4 – *ciclo* (Pro-Phe)

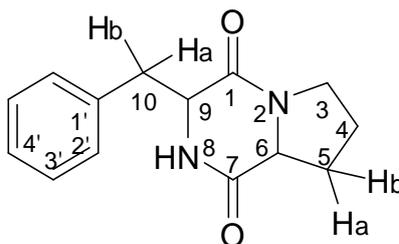


FIGURA 5.59 - Estrutura química da diketopiperazina *ciclo* (Pro-Phe).

A substância *ciclo* (Pro-Phe) (FIGURA 5.59) foi isolada em mistura (Fração F7), porém apresentou como majoritária por GC-MS (97,2%). A análise por GC-MS mostrou a presença de apenas três picos, sendo o pico 3 majoritário (eluído no tempo de retenção 20,17 min) (FIGURA 5.60). O espectro de massas deste pico mostrou o fragmento m/z , 244, referente ao íon molecular da substância (FIGURA 5.61). O perfil de fragmentação mostra que a substância pertence à classe das dicetopiperazinas, conforme WANG et al, 2010b, sendo similar ao perfil de fragmentação da *ciclo* (Pro-Phe). A análise por RMN ^1H e ^{13}C da fração, confirmou que a substância na fração é a *ciclo* (Pro-Phe) por comparação com dados da literatura, FURTADO et al., 2005 (TABELA 5.13 e FIGURA 5.62 a 5.64). É importante ressaltar que este composto é um dos diastereoisômeros de *ciclo* (Pro-Phe) e por esse motivo, a substância 04 eluiu com tempo de retenção diferente da substância 03.

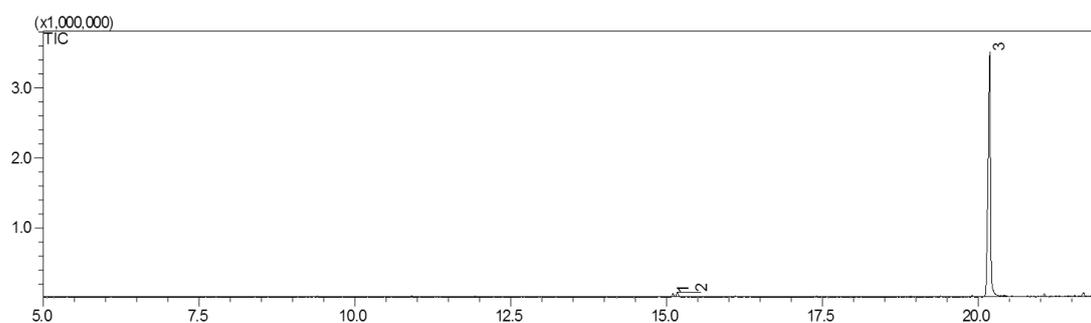


FIGURA 5.60 - Cromatograma de íons totais (TIC) de F7 obtido por GC-MS. Condições: coluna DB-5MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μm ; rampa de 80° C (1 min.) (10° C/min)-290° C (5 min.). Injetor: 280° C, Detector: 290° C; He-1,2 mL/min.

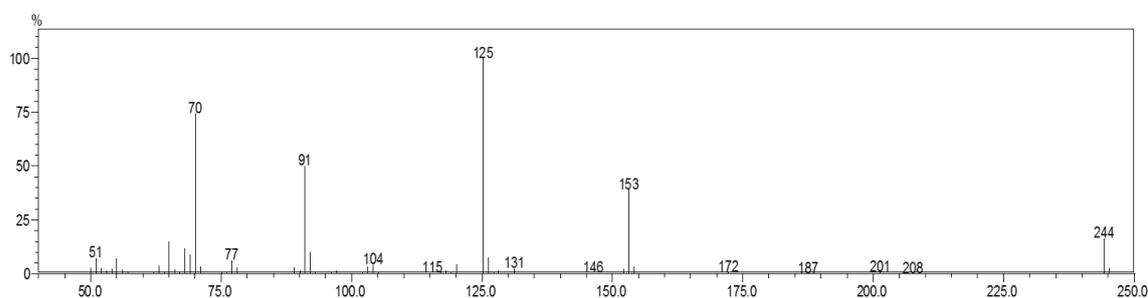


FIGURA 5.61 - Espectro de massas de *ciclo* (Pro-Phe) obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

TABELA 5.13 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da *ciclo* (Pro-Phe) em comparação com os dados da literatura.

Substância 4		Substância 4 na lit		
Nº	δ_{H}^1	δ_{C}^2	δ_{H} (lit) ³	δ_{C} (lit) ⁴
1	-	167,6	-	164,8
2	-	-	-	-
3	3a: 3,50 – 3,55 (1H, <i>m</i>) 3b: 3,42 – 3,47 (1H, <i>m</i>)	46,3	3a: 3,59 – 3,65 (1H, <i>m</i>) 3b: 3,36 – 3,41 (1H, <i>m</i>)	45,1
4	4a: 1,58 – 1,67 (1H, <i>m</i>) 4b: 1,86 – 1,94 (1H, <i>m</i>)	22,6	4a: 1,64 – 1,85 (1H, <i>m</i>) 4b: 1,90 – 1,96 (1H, <i>m</i>)	21,7
5	5a: 1,58 – 1,67 (1H, <i>m</i>) 5b: 2,00 – 2,08 (1H, <i>m</i>)	30,0	5a: 1,64 – 1,85 (1H, <i>m</i>) 5b: 2,15 – 2,20 (1H, <i>m</i>)	28,9
6	2,61 (1H, <i>dd</i> , $J = 6,3; 10,8$ Hz)	59,3	2,91 – 2,94 (1H, <i>dd</i> , $J = 6,5; 10,5$ Hz)	57,7
7	-	171,5	-	169,3
8	4,87 (1H, <i>s</i>)	-	6,49 (1H, <i>s</i>)	-
9	4,20 (1H, <i>m</i>)	59,9	4,22 (1H, <i>m</i>)	59,0
10	10a: 2,99 (1H, <i>dd</i> , $J = 5,0; 13,6$ Hz) 10b: 3,20 (1H, <i>dd</i> , $J = 4,5; 13,6$ Hz)	41,1	10a: 3,06 (1H, <i>dd</i> , $J = 4,0; 13,5$ Hz) 10b: 3,15 (1H, <i>dd</i> , $J = 6,5; 13,5$ Hz)	40,5
1'	-	136,9	-	135,3
2'	7,17 – 7,33 (1H, <i>m</i>)	131,4	7,20 – 7,33 (1H, <i>m</i>)	129,9
3'	7,17 – 7,33 (1H, <i>m</i>)	129,8	7,20 – 7,33 (1H, <i>m</i>)	128,8
4'	7,17 – 7,33 (1H, <i>m</i>)	128,7	7,20 – 7,33 (1H, <i>m</i>)	127,3

¹ = Dados de RMN ^{13}H a 400 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Phe) isolada.

² = Dados de RMN ^{13}C a 100 MHz em CD_3OD da *ciclo* (Pro-Phe) isolada

³ = Dados de RMN ^{13}H a 500 MHz em CDCl_3 da *ciclo* (Pro-Phe) na literatura, WANG et al., 2010a.

⁴ = Dados de RMN ^{13}C a 125 MHz em CDCl_3 da *ciclo* (Pro-Phe) na literatura, WANG et al., 2010a.

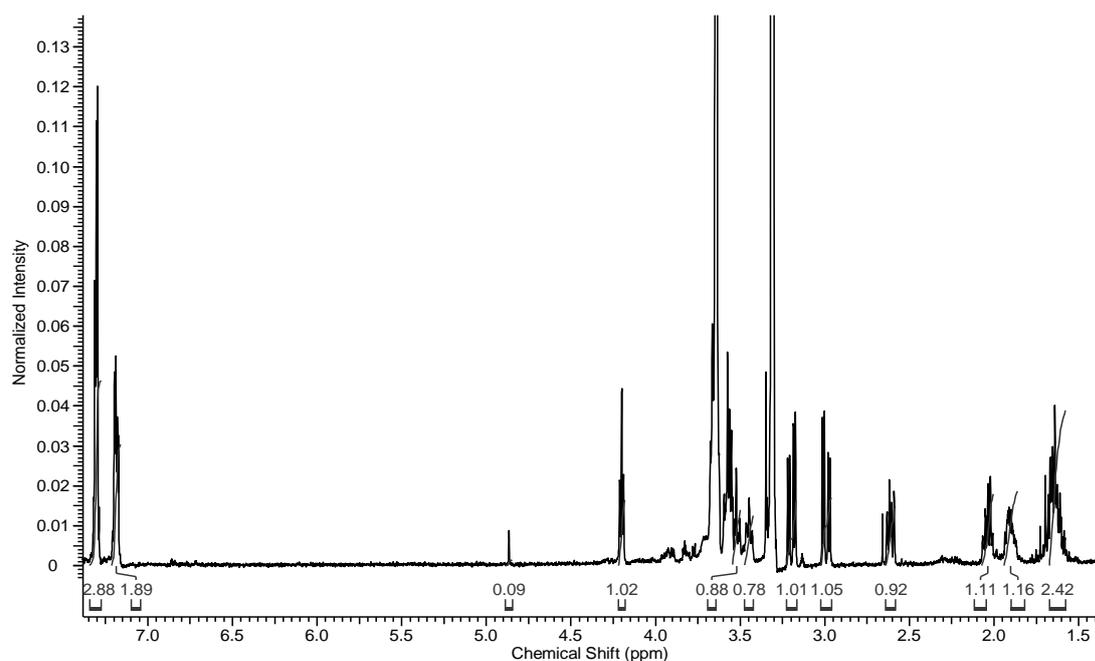


FIGURA 5.62 - Espectro de RMN de ^1H da *ciclo* (Pro-Phe) (CD_3OD , 400 MHz).

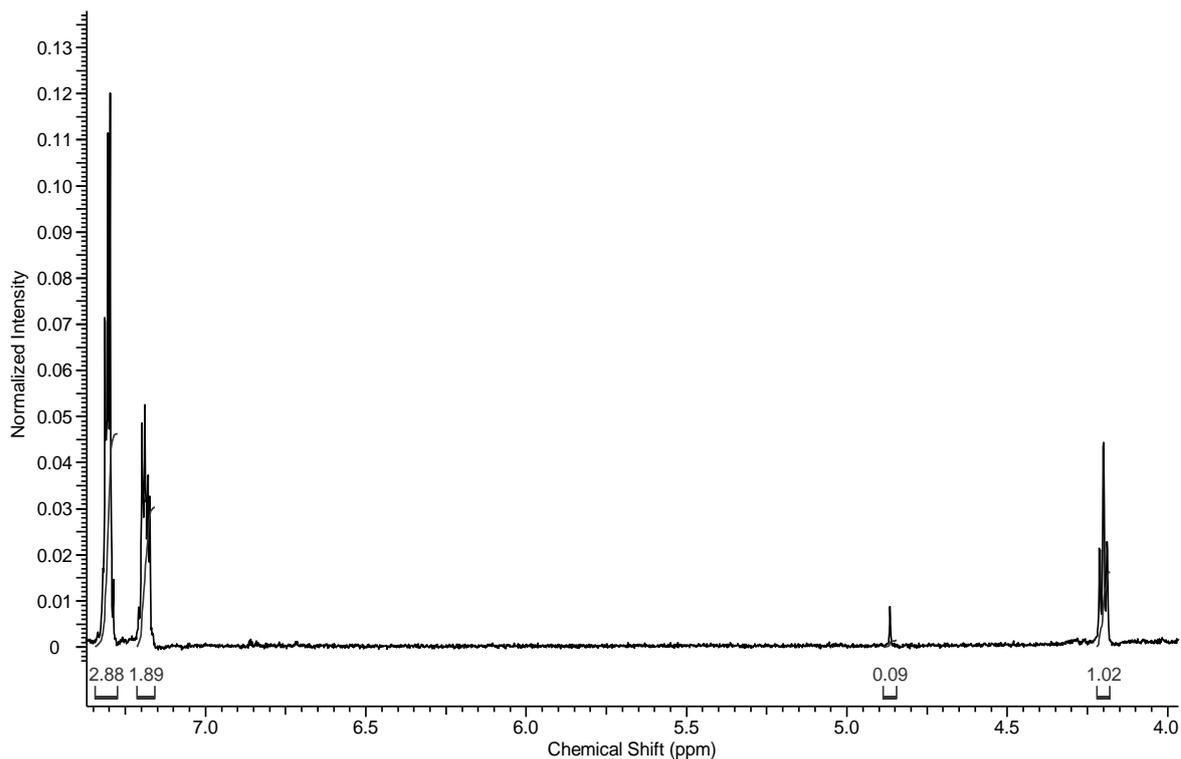


FIGURA 5.63 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da ciclo (Pro-Phe) (CD_3OD , 400 MHz).

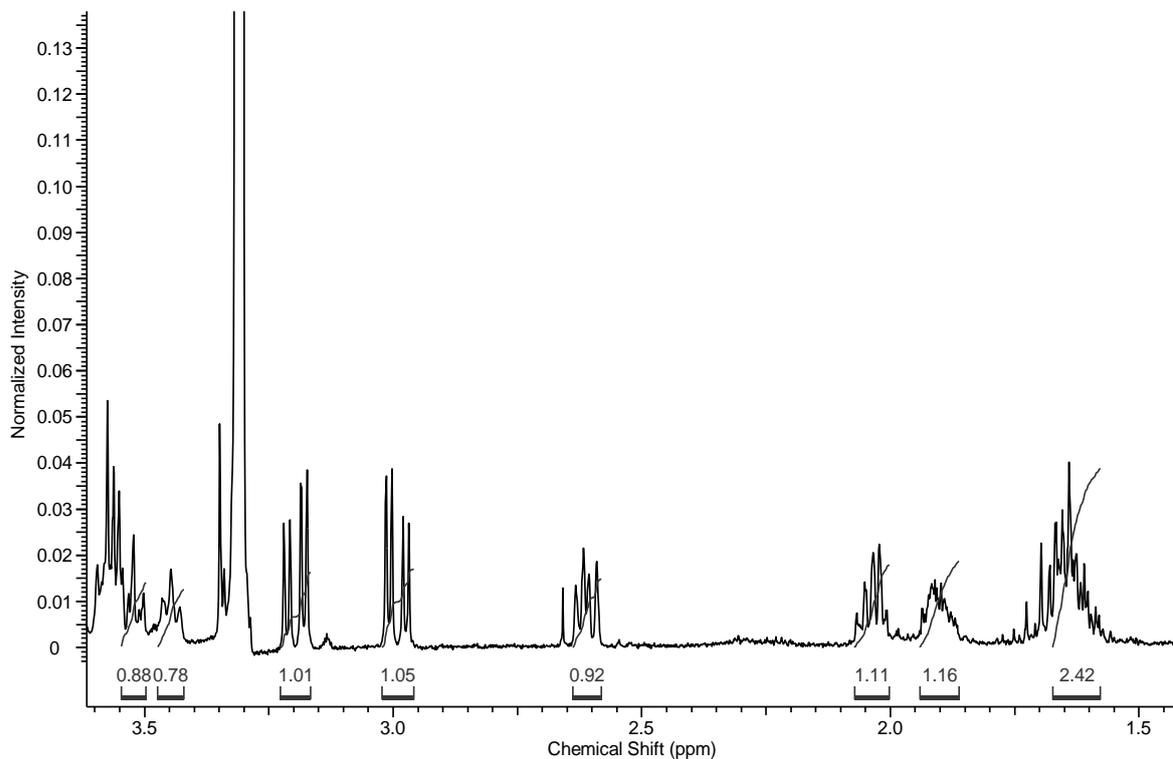


FIGURA 5.64 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da ciclo (Pro-Phe) (CD_3OD , 400 MHz).

5.2.4.4.1 – Configuração relativa da substância 4 - *ciclo* (Pro-Phe)

O valor da rotação óptica ($[\alpha]_D$) calculada para a *ciclo* (Pro-Phe) isolada no estudo foi $+42,0^\circ$ (TABELA 5.14). Como o desvio foi positivo, ao comparar com a literatura, foi observado que os enantiômeros presentes poderiam ser o *ciclo* (D-Pro-L-Phe) ou o *ciclo* (D-Pro-D-Phe) (TABELA 5.14). Como a substância anterior, **3**, é um diastereoisômero da substância **4**, pode-se inferir que este isômero é o *trans-ciclo* (D-Pro-L-Phe) (FIGURA 5.65). Essa relação diastereoisomérica foi relatada em seções anteriores por GC-MS com eluição em tempo de retenção diferente e por RMN com atribuição do deslocamento químico de H-6 em 2,61 ppm, devido ao efeito de blindagem do anel aromático na conformação *trans* (FDHILA et al., 2003; YOUNG et al., 1976; WANG et al., 2010a). Além disso, não foi observado correlação de H-9 com H-6 no experimento *g*-NOESY (FIGURA 5.66). É importante destacar que há um excesso enantiomérico do composto isolado, porém utilizando a forma de trabalho não foi possível saber quanto de excesso está presente. Futuramente, isso será realizado.

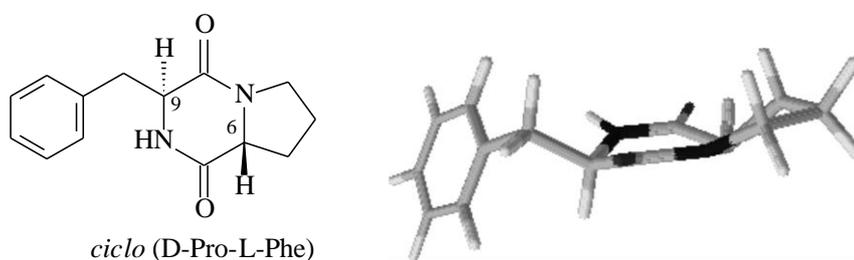


FIGURA 5.65 - Estrutura química do enantiômero *ciclo* (D-Pro-L-Phe) isolado neste estudo.

TABELA 5.14 - Comparação da rotação óptica do *ciclo* (Pro-Phe) isolada com os isômeros descritos na literatura.

Substância isolada	Rotação óptica [α] _D *	Isômeros da literatura	Rotação óptica [α] _D
<i>ciclo</i> (Pro-Phe)	+42,0 °	<i>ciclo</i> (L-Pro-L-Phe) ¹	-93.9 °
		<i>ciclo</i> (L-Pro-D-Phe) ²	-79.0 °
		<i>ciclo</i> (D-Pro-L-Phe) ³	+77,13 °
		<i>ciclo</i> (D-Pro-D-Phe) ⁴	+88.7 °

* Rotação óptica foi medida em um polarímetro digital Perkin-Elmer 241. Condições da análise: c = 0.5 g/100 mL; etanol; 25 °C.

1: JAYATILAKE, G. S.; THORNTON, M. P.; LEONARD, A. C.; GRIMWADE, J. E.; BAKER, B. J. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nat. Prod.*, **59** (3), 293-296, 1999. Condições da análise: c = 0,36 g/100mL; etanol; 25 °C.

2: CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by Cyclic Dipeptides. *ACS Chem. Biol.*, **4** (12): 1051–1059, 2009. Condições da análise: c = 9,38 mg/mL; etanol; 25 °C.

3: CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chem. Biol.*, **4** (12): 1051–1059, 2009. Condições da análise: c = 8,12 mg/mL; etanol; 25 °C.

4: FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, **66** (10), 1299–1301, 2003.. Condições da análise: c= 0,22 g/100mL; etanol; 25 °C.

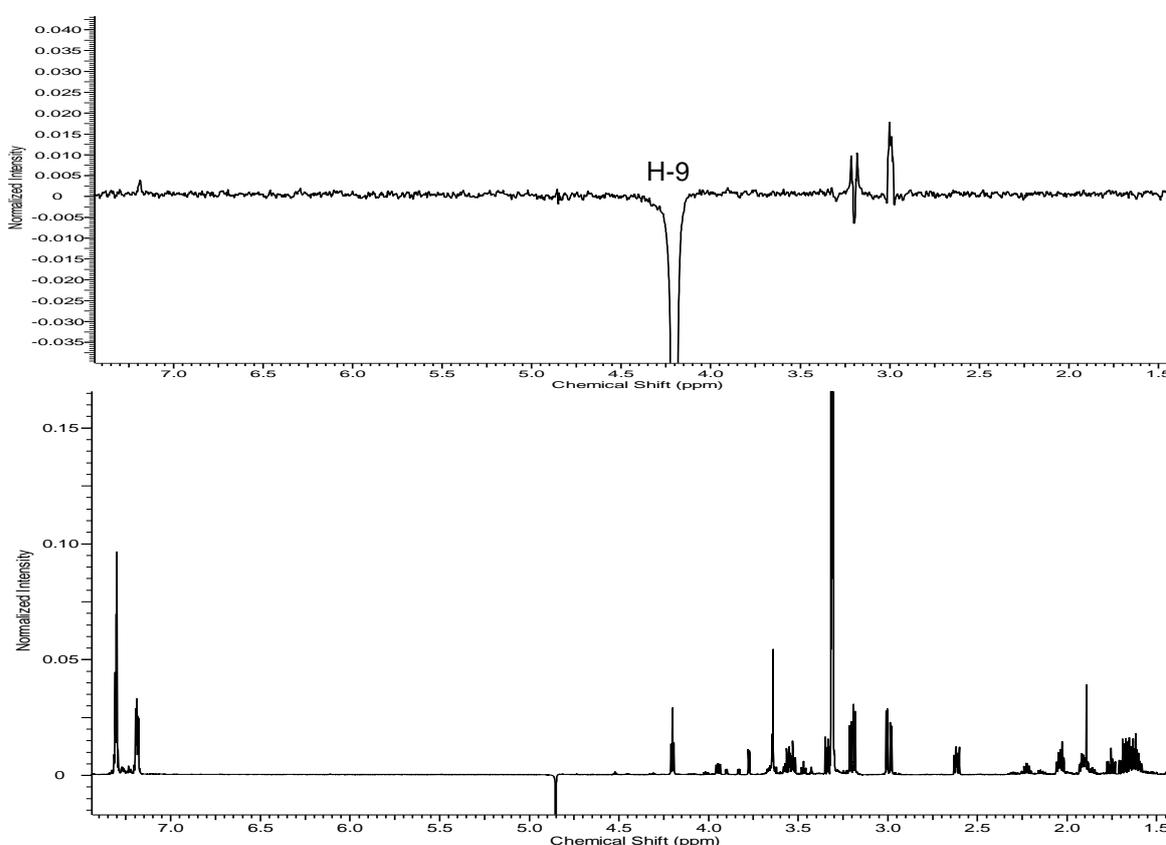


FIGURA 5.66 - Espectros de *g*-NOESY (¹H-¹H), (600 MHz, CD₃OD) da substância *ciclo* (Pro-Phe).

5.2.4.5 - Substância 5 – Quinolina-4-carboxaldeído

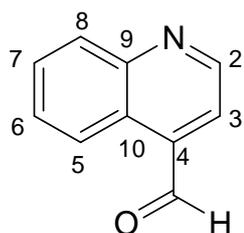


FIGURA 5.67 - Estrutura química da Quinolina-4-carboxaldeído.

O alcalóide quinolina-4-carboxaldeído pertence a uma classe bastante conhecida no processo de comunicação celular, por isso foi feito o isolamento da mesma, como descrito na seção 5.1.2.4.2.

A substância quinolina-4-carboxaldeído (FIGURA 5.67) foi isolada do subextrato hexânico do sobrenadante **EXSXHEA** por HPLC analítico, apresentando como minoritária (7%) por GC-MS (FIGURA 5.68). A análise por GC-MS mostrou a presença de dois picos (porém outros traços de alguns sinais entre 14 – 17 min), sendo o pico 1 minoritário e representativo da substância citada. O espectro de massas mostrou o fragmento m/z , 157, referente ao íon molecular da substância, sugerindo a fórmula molecular $C_{10}H_7NO$ (FIGURA 5.69).

Comparando o espectro de massas obtido (FIGURA 5.69) com aquele do banco de dados do equipamento (NIST05) (FIGURA 5.70) encontra-se uma similaridade de 87% para a quinolina-4-carboxaldeído com o perfil de fragmentação. A injeção do composto isolado juntamente com o padrão sigma-aldrich também confirma a estrutura do composto quinolina-4-carboxaldeído (FIGURA 5.71).

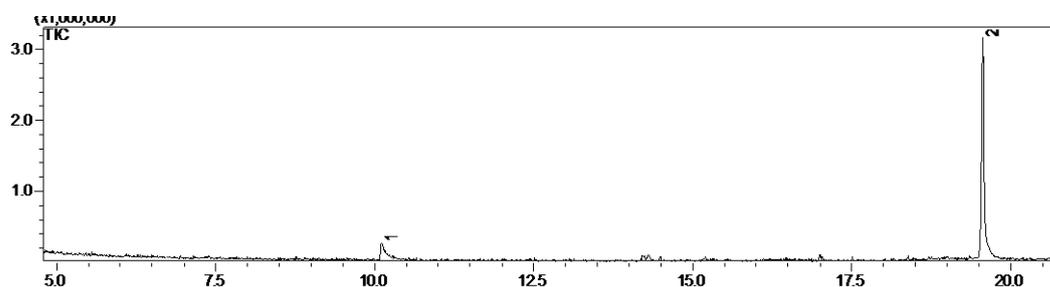


FIGURA 5.68 - Cromatograma de íons totais (TIC) da fração que contém a substância quinolina-4-carboxaldeído obtido por GC-MS. Condições: coluna OPTIMA 5-MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 80° C(1 min.) (10° C/min)-260° C (15 min.). Injetor: 240° C, Detector: 260° C; He-1,2 mL/min.

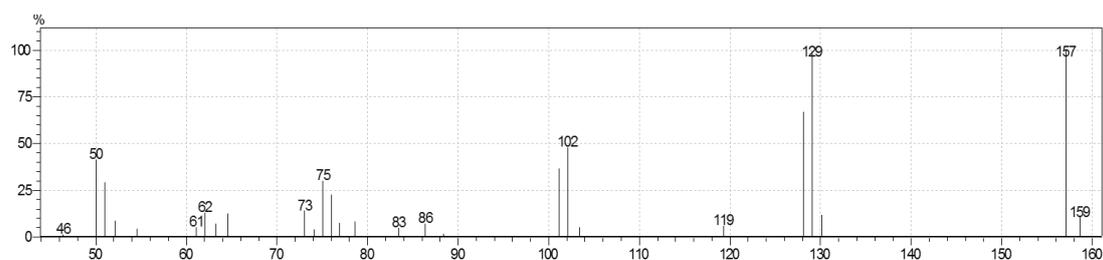


FIGURA 5.69 - Espectro de massas de quinolina-4-carboxaldeído obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

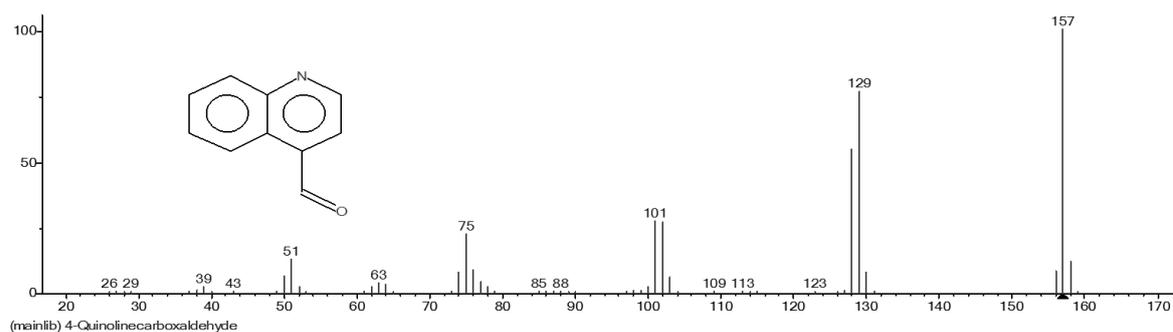


FIGURA 5.70 - Espectro de massas da quinolina-4-carboxaldeído do banco de dados do equipamento (NIST05). Impacto eletrônico, 70 eV.

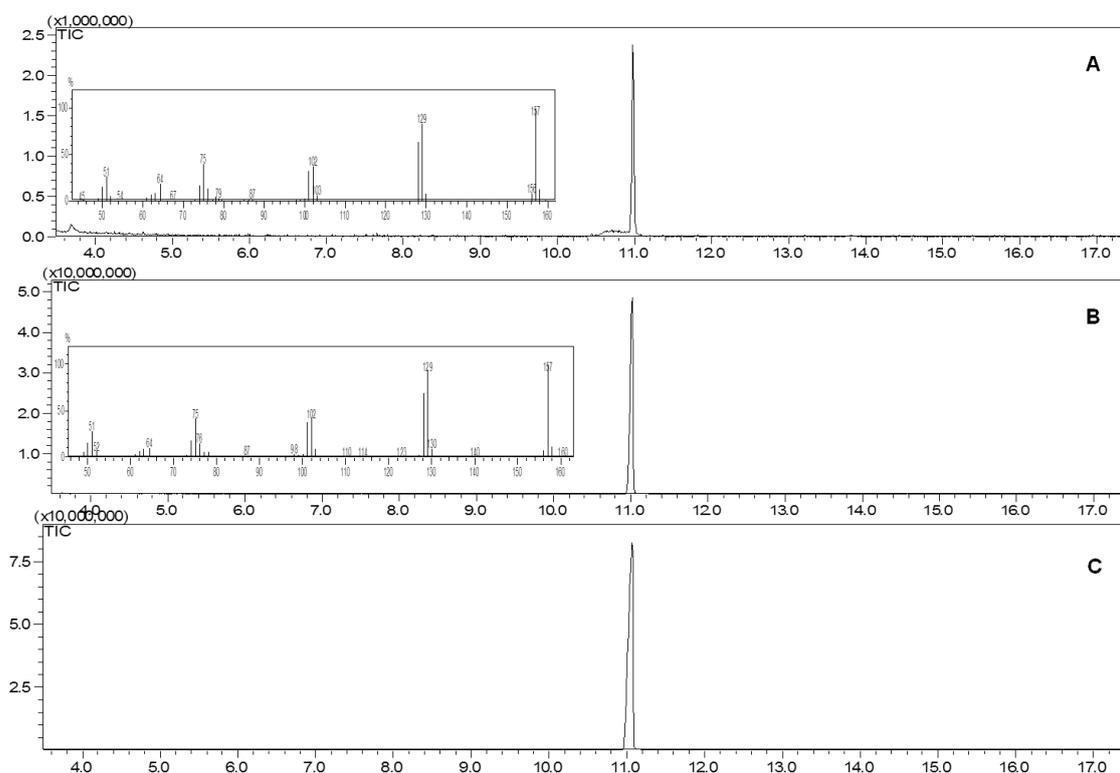


FIGURA 5.71 - Cromatograma de íons totais e espectros de massas da quinolina isolada (A), padrão sigma-aldrich (B) e co-injeção dos mesmos (C) obtidos por GC-MS.

O espectro de RMN ^1H 600 MHz (com cryo-sonda) da fração, apresentou dois dubletos integrando para 1H cada, em δ 8,82 e 7,55 com constante de acoplamento 4,4 Hz, característicos de hidrogênios quinolínicos. Um singlete em δ 8,54, referente ao hidrogênio do aldeído, e sinais referentes ao anel aromático na região de δ 7,63 – 8,39, confirmaram que a substância minoritária é a quinolina-4-carboxaldeído por comparação com dados da literatura (JANG-HEE et al., 2005) (TABELA 5.15 e FIGURAS 5.72 – 5.74).

TABELA 5.15 - Dados de RMN de ^1H da quinolina-4-carboxaldeído (5) em comparação com os dados da literatura.

Substância 5 (600 MHz, CD ₃ OD)		Jang-Hee et al., 2005 ¹ (400 MHz, CD ₃ OD)
Nº	δ_{H}	δ_{H} (lit)
1	-	-
2	8,82 (1H, d, J = 4,4 Hz)	8,82-8,93 (1H, d, J = 4,0 Hz)
3	7,55 (1H, d, J = 4,4 Hz)	7,76-7,77(1H, d, J = 4,0 Hz)
4	-	-
5	8,39 (1H, dd, J = 8,4; 0,9 Hz)	8,26-8,28 (1H, d, J = 8,0 Hz)
6	7,75 (1H, m)	7,76-7,77 (1H, m)
7	7,63 (1H, m)	7,72-7,75 (1H, m)
8	8,02 (1H, dd, J = 8,4; 0,7 Hz)	8,02-8,04 (1H, d, J = 8,0 Hz)
9	-	-
10	-	-
11	8,54 (1H, s)	6,13 (1H, s)

¹ = JANG-HEE, C.; LEE, C.; LEE, H. Antimicrobial activity of quinoline derivates isolated from *Ruta chalepensis* toward human intestinal bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15** (3): 646-651, 2005.

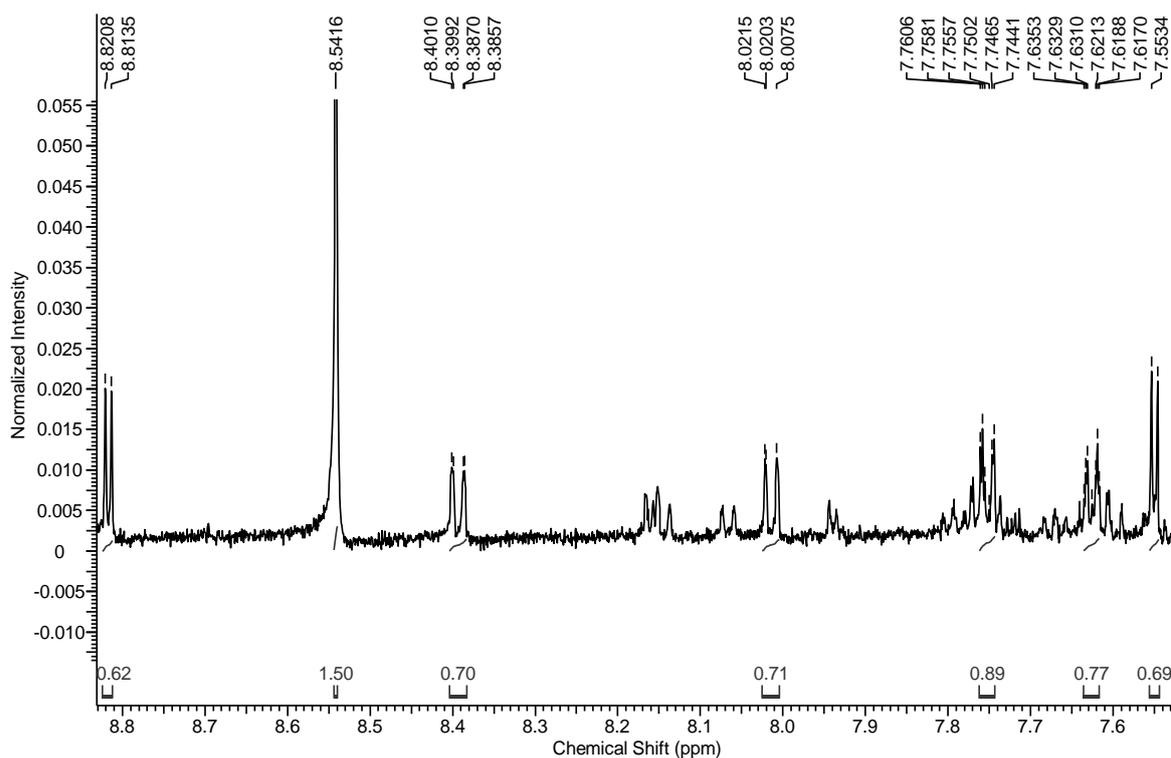


FIGURA 5.72 - Espectro de RMN de ^1H da quinolina-4-carboxaldeído (CD_3OD , 600 MHz).

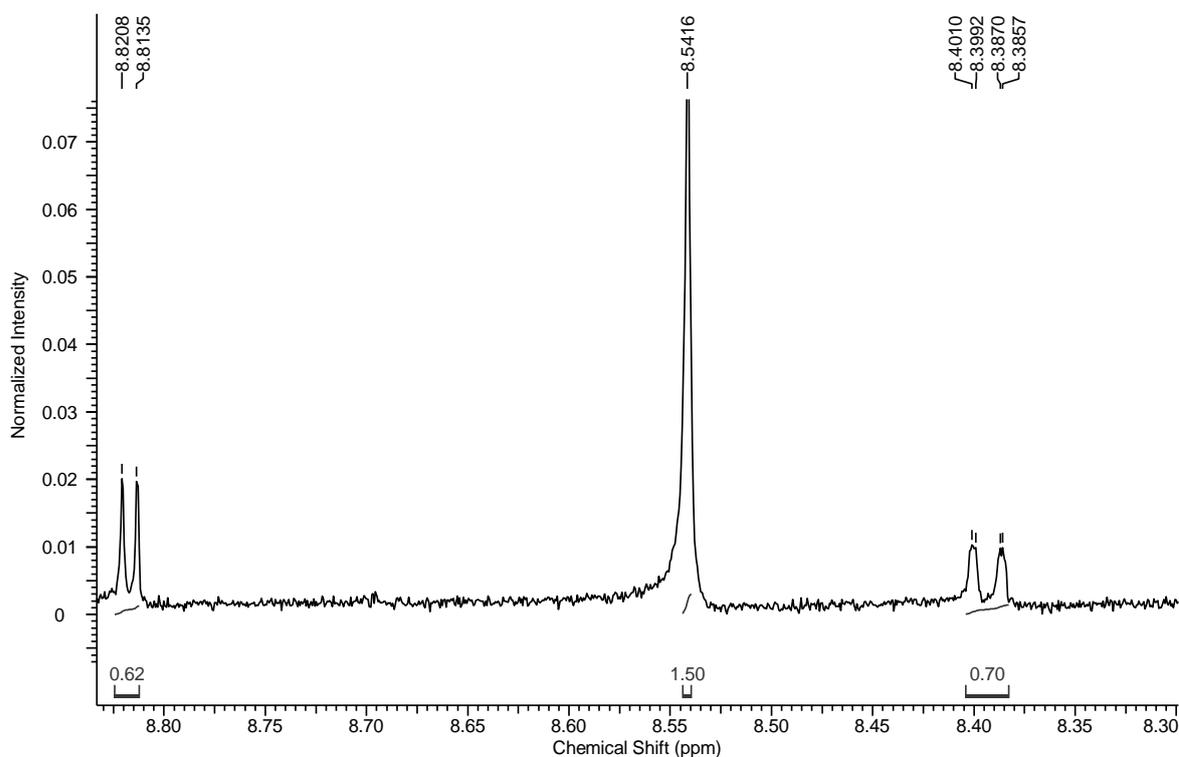


FIGURA 5.73 - Ampliação da região δ 8,83 a 8,30 do espectro de RMN de ^1H da quinolina-4-carboxaldeído (CD_3OD , 600 MHz).

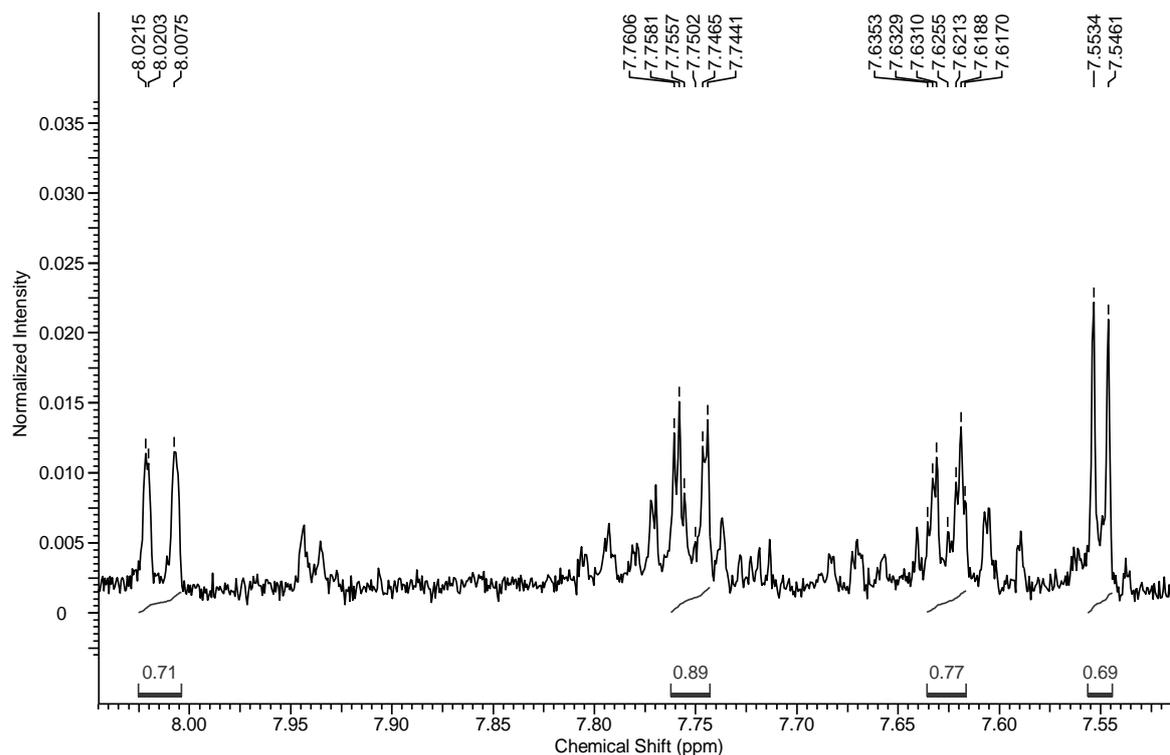
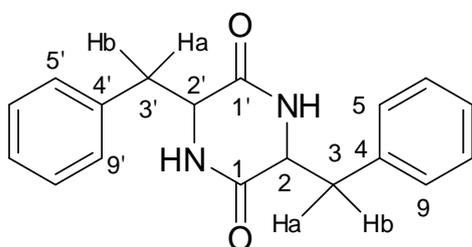


FIGURA 5.74 - Ampliação da região δ 8,05 a 7,51 do espectro de RMN de ^1H da quinolina-4-carboxaldeído (CD_3OD , 600 MHz).

5.2.4.6 - Substância 6 – *ciclo* (Phe-Phe)



ciclo (Phe-Phe)

FIGURA 5.75 - Estruturas química da *ciclo* (Phe-Phe) (6).

As substâncias **6** (FIGURA 5.75) foi isolada a partir da coleta da subfração 3 proveniente da fração **F14** (seção 5.1.2.4.2) e teve sua estrutura determinada baseada em experimentos de RMN 600 MHz (com cryo-sonda) 1D (^1H), 2D (COSY e HSQC) e GC-MS (FIGURAS 5.76 a 5.84). A subfração 3 provavelmente apresenta três substâncias às quais duas não foi possível a identificação ou não são de interesse para o trabalho, por isso apenas os dados da substâncias (**6**) está sendo discutida. É importante destacar que a *ciclo* (Phe-

Phe) já foi isolada de *Guignardia* sp, um fungo endofítico da macro alga *Undaria pinnatifida* (FENG-WU, 2012).

Os dados RMN ^1H da substância **6** estão apresentados na TABELA 5.16. Foi observado um singlete em δ 8,11 integrando para 2H, relacionado ao sinal NH (FIGURA 5.76).

TABELA 5.16 - Dados de RMN de ^1H da *ciclo* (Phe-Phe) (**6**) em comparação com os dados da literatura.

Substância 6 (600 MHz, CD_3OD)		Feng-Wu, 2012 ¹ (300 MHz, DMSO, d_6)
Nº	δ_{H}	δ_{H} (lit)
1, 1'	-	-
2, 2'	4,09 (2H, <i>dd</i> , J = 6,8; 4,0 Hz)	3,97 (2H, <i>s</i>)
3, 3'	Ha-3,3' : 2,78 (2H, <i>dd</i> , J = 13,6; 4,0 Hz) Hb-3,3' : 2,12 (2H, <i>dd</i> , J = 13,6; 6,8 Hz)	Ha-3,3' : 2,58 (2H, <i>dd</i> , J = 13,6; 4,8 Hz) Hb-3,3' : 2,22 (2H, <i>dd</i> , J = 13,6; 6,2 Hz)
4, 4'	-	-
5, 5' e 9, 9'	6,84 (4H, <i>dl</i> , J = 8,4 Hz)	7,02 (4H, <i>dl</i> , J = 7,5 Hz)
6, 6' e 8, 8'	7,36 (4H, <i>m</i>)	7,29 (4H, <i>m</i>)
7,7'	7,34 (2H, <i>t</i> , J = 7,7 Hz)	7,20 (2H, <i>t</i> , J = 7,3 Hz)
NH	8,11 (2H, <i>s</i>)	7,93 (2H, <i>s</i>)

¹ = FENG-WU, W. Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **10** (1): 72-76, 2012.

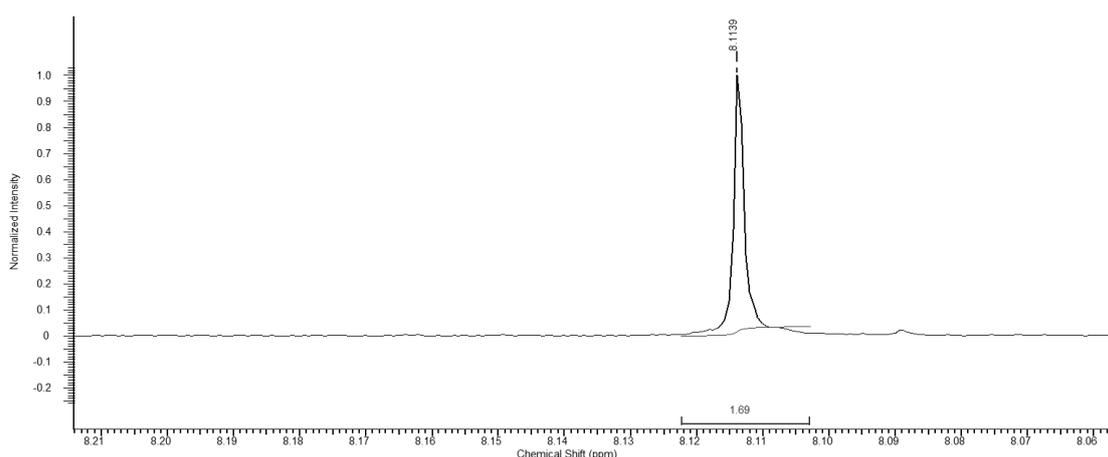


FIGURA 5.76 - Ampliação da região δ 8,21 a 8,06 do espectro de RMN de ^1H da *ciclo* (Phe-Phe) (CD_3OD , 600 MHz).

O espectro de RMN ^1H na região de δ 7,40 a 6,80 apresentou um dubleto largo integrando para 4H em δ 6,84 (H-5,5' e H-9,9') e um multipletto

também para 4H em δ 7,36 (H-6,6' e H-8,8') característicos de hidrogênios aromáticos. O mapa de contorno COSY (H^1-H^1) mostrou que esses dois grupos de hidrogênios em δ 7,36 (H-6,6' e H-8,8') e δ 6,84 (H-5,5' e H-9,9') estão se correlacionando entre si (FIGURA 5.77). Observou-se um tripleto, integrando para 2H, em δ 7,34 (H-7,7') (TABELA 5.16 e FIGURA 5.77).

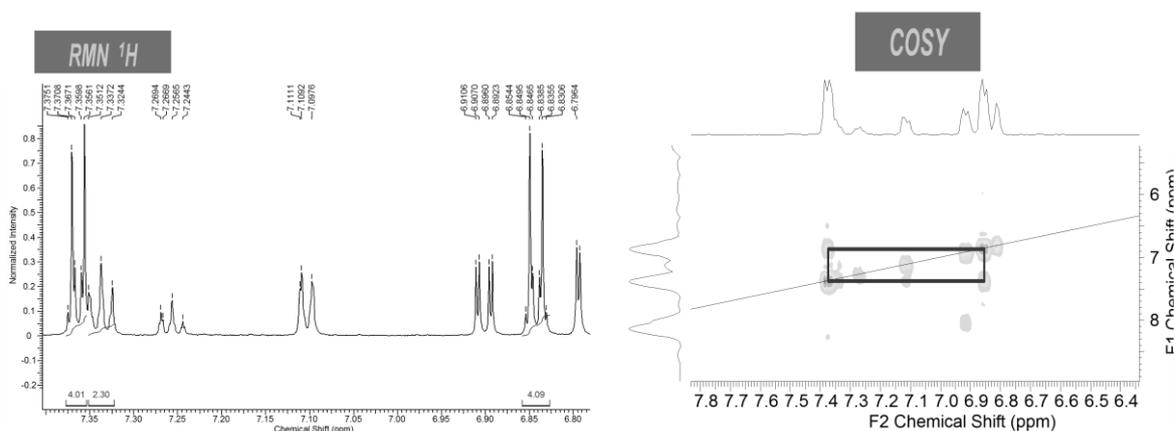


FIGURA 5.77 - Ampliação da região δ 7,40 a 6,80 do espectro de 1H (CD_3OD , 600 MHz) e mapa de contorno COSY (CD_3OD , 600 MHz).

A partir da análise do espectro de correlação heteronuclear ($^1H-^{13}C$) HSQC (FIGURA 5.78) foi possível observar a correlação a 1J dos sinais dos hidrogênios aromáticos ligados aos seus respectivos carbonos, δ 7,36 (H-6,6' e H-8,8') com o carbono em δ 130,7 (C-6,6' e C-8,8'); δ 7,34 (H-7,7') com o carbono em δ 129,7 (C-7,7') e δ 6,84 (H-5,5' e H-9,9') com o carbono em δ 115,9 (C-5,5' e C-9,9').

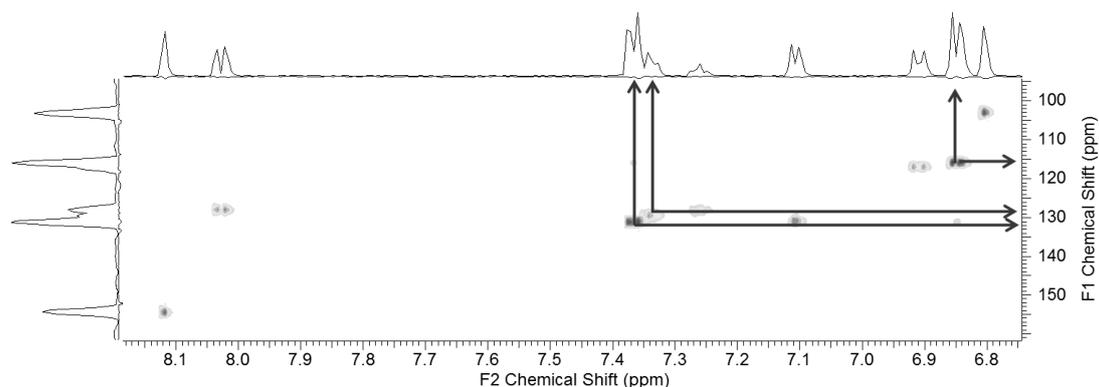


FIGURA 5.78 - Ampliação do espectro do mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 150 MHz).

O espectro de RMN 1H na região de δ 4,12 a 2,08 apresentou 3 sinais integrando para 2H cada [um sinal em δ 4,09 (H-2,2'), um sinal em δ 2,78

(Ha-3,3') e um sinal em δ 2,12 (Hb-3,3')] (FIGURA 5.79). Por COSY, foi possível observar a correlação dos hidrogênios H-2,2' com os hidrogênios Ha-3,3' e Hb-3,3'. Também foi observado que os hidrogênios diastereostópicos Ha-3,3' e Hb-3,3' se correlacionam entre si (FIGURA 5.79). Estes hidrogênios diastereostópicos Ha-3,3' e Hb-3,3', foram confirmados com a análise por HSQC, os quais se correlacionam aos seus respectivos átomos com deslocamento químico em δ 40,6 (C3,3') (FIGURA 5.80). Por HSQC também foi possível observar a correlação a 1J de H2,2' (δ 4,09) com seus respectivos carbonos em δ 57,1 (C-2,2') (FIGURA 5.80). O espectro de RMN 1H completo está apresentado na FIGURA 5.84.

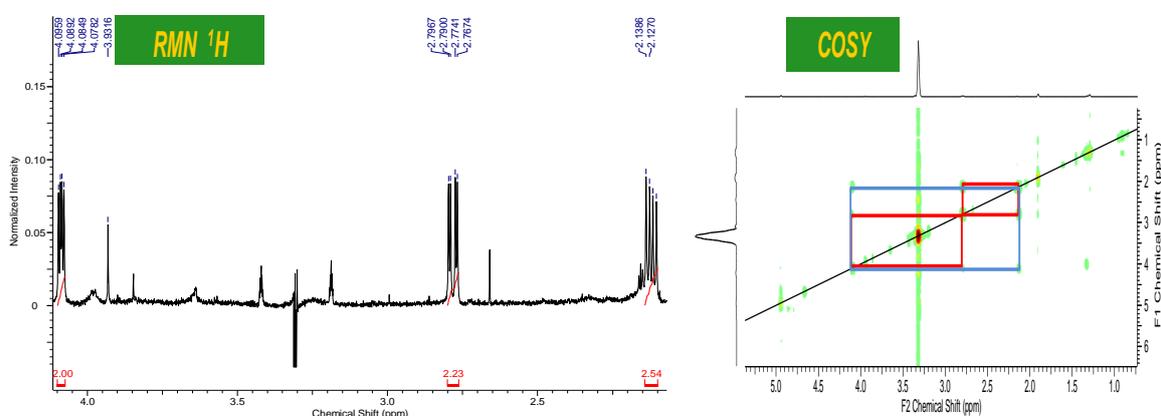


FIGURA 5.79 - Ampliação da região δ 4,12 a 2,08 do espectro de 1H (CD_3OD , 600 MHz) e mapa de contorno COSY (CD_3OD , 600 MHz).

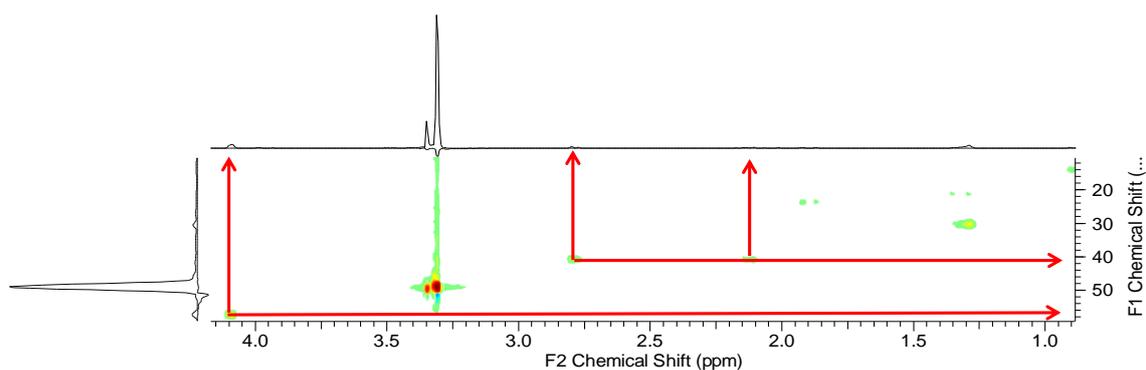


FIGURA 5.80 - Ampliação do espectro do mapa de contorno HSQC (CD_3OD , 150 MHz).

A subfração 3 (A qual contém a substância **6**) proveniente da fração F14 foi submetida à análise via GC-MS, para confirmação da estrutura do composto supracitado a partir do perfil de fragmentação e sua massa molecular. Por meio da análise por GC-MS verificou-se a presença de pelo menos 2 picos (28,97 min e 32,81 min) (FIGURA 5.81). O espectro de massas do pico 2 mostrou

o fragmento $m/z = 294$ daltons, referente ao íon molecular da substância **6**, sugerindo a fórmula molecular $C_{18}H_{18}N_2O_2$ (FIGURA 5.82). Comparando o espectro de massas obtido (FIGURA 5.82) com aquele do banco de dados do equipamento (NIST08) (FIGURA 5.83) encontra-se uma similaridade de 90% para a *ciclo* (Phe-Phe), confirmando, dessa forma, após análise do perfil de fragmentação, comparação com dados do equipamento e RMN, que a substância **6** é a *ciclo* (Phe-Phe).

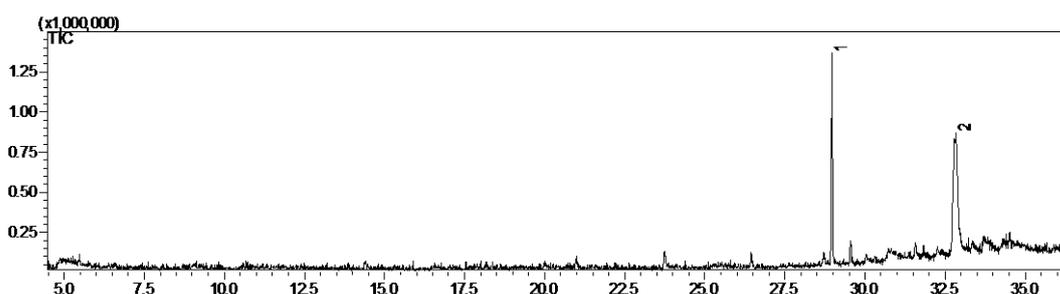


FIGURA 5.81 - Cromatograma de íons totais (TIC) da subfração 3 que contém a substância *ciclo* (Phe-Phe) obtido por GC-MS. Condições: coluna OPTIMA 5-MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μ m; rampa de 159 $^{\circ}$ C(2 min.) (3 $^{\circ}$ C/min)-225 $^{\circ}$ C (10 $^{\circ}$ C/min)-290 $^{\circ}$ C(5 min.). Injetor: 270 $^{\circ}$ C, Detector: 290 $^{\circ}$ C; He-1,2 mL/min.

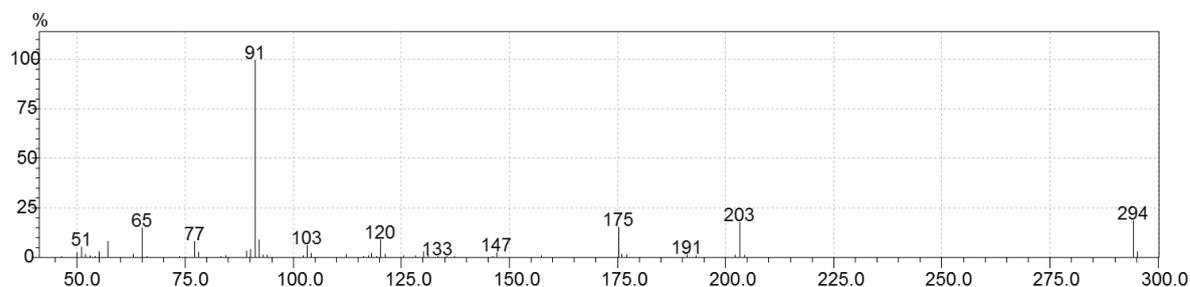


FIGURA 5.82 - Espectro de massas de do pico 2, *ciclo* (Phe-Phe), obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

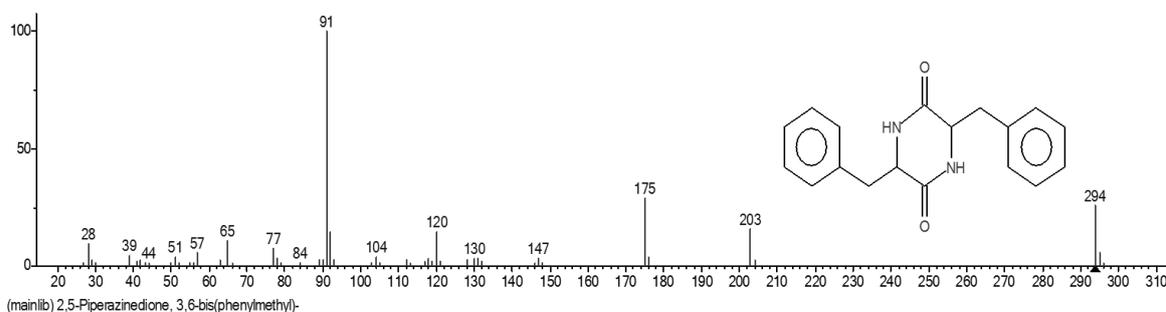


FIGURA 5.83 - Espectro de massas da *ciclo* (Phe-Phe) do banco de dados do equipamento (NIST08). Impacto eletrônico, 70 eV.

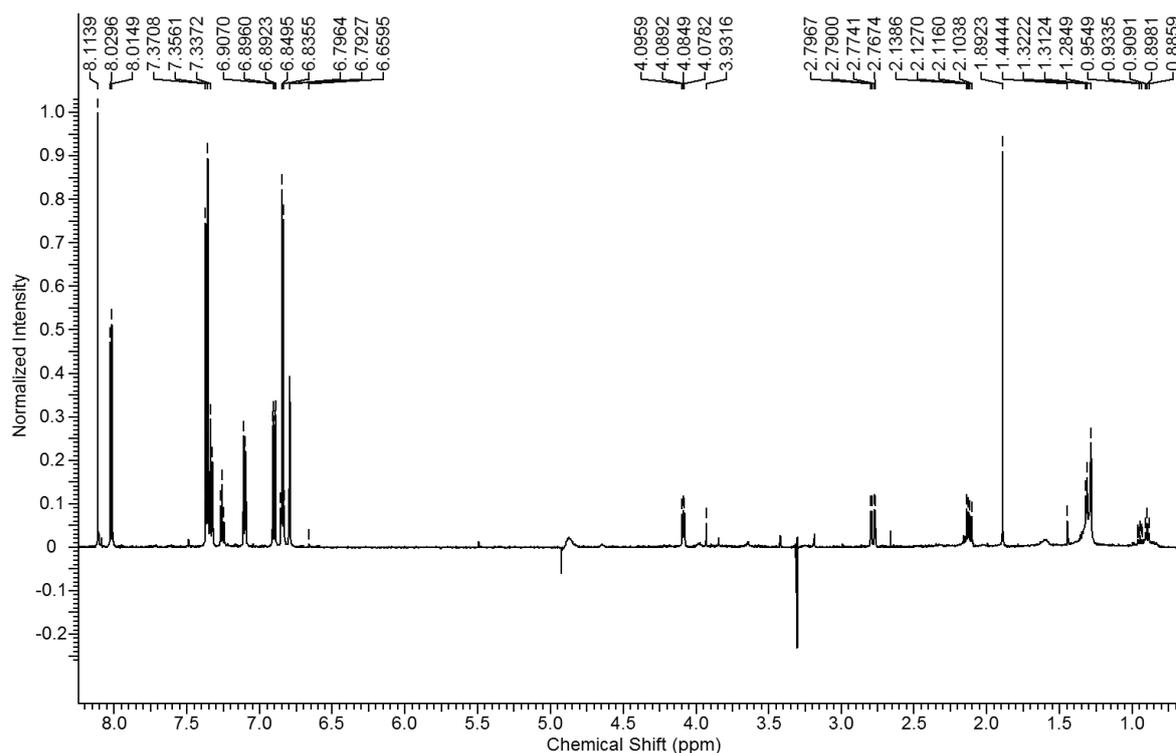


FIGURA 5.84 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) da subfração 3 que contém a substância *ciclo* (Phe-Phe) (6).

5.2.4.7 - Substâncias 7, 8 e 9 – *cis*-13-docosenamida (7), *cis*-9-octadecenamida (8), octadecanamida (9)

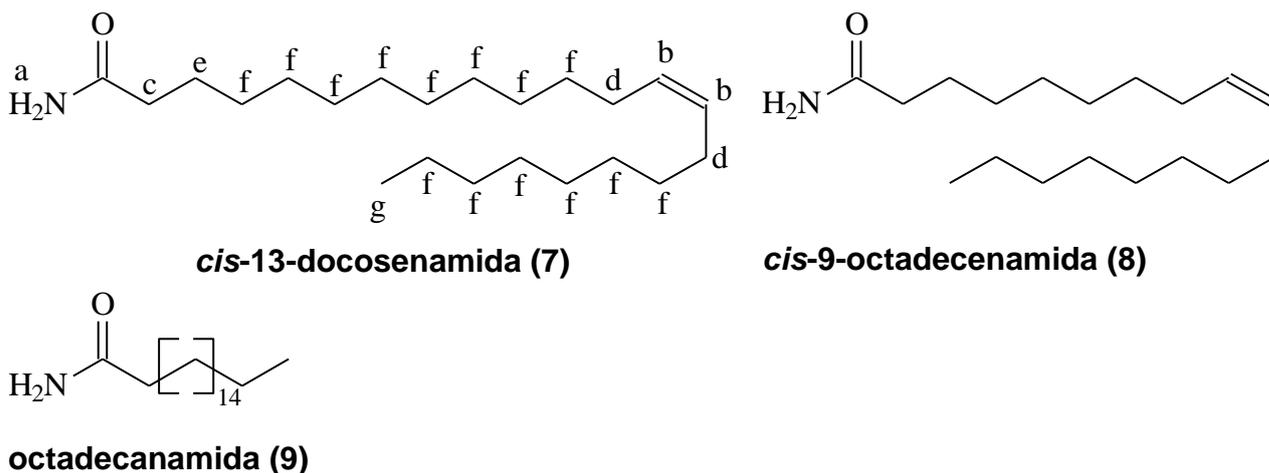


FIGURA 5.85 - Estruturas química da *cis*-13-docosenamida (7), *cis*-9-octadecenamida (8) e octadecanamida (9).

As amidas de ácidos graxos *cis*-13-docosenamida (7), *cis*-9-octadecenamida (8) e octadecanamida (9) (FIGURA 5.85) foram isoladas da subfração PAC4, à qual foi proveniente da fração acetato de etila do extrato metanólico das células bacterianas (seção 5.1.2.2.2) e teve suas estruturas determinadas baseando em experimentos de RMN 1D (¹H) e comparando com dados da literatura (WAKAMATSU et al., 1990) (FIGURAS 5.86 a 5.88 e TABELA 5.17), assim como por GC-MS (FIGURA 5.89 e TABELA 5.18), o qual mostrou a amida 7 como majoritária, pureza ≥ 86,8%. Esta é a primeira vez que uma série de amidas derivadas de ácidos graxos é isolada e descrita em bactérias do gênero *Xanthomonas*, entretanto uma série de amidas de ácidos graxos já foi isolado por BERTIN et al., 2012 da alga *Prymnesium parvum carter*, sendo descritas como toxinas da mesma.

O espectro de RMN ¹H apresentou um sinal em δ 5,35 (H-b) integrando para 2H, indicando a presença de uma ligação dupla; um tripleto integrando para 2H em δ 2,22 (H-c, *J*=7,6 Hz) indicando a presença de um grupo acila; um sinal em δ 2,02 integrando para 4H referente à presença de dois metilenos ligados à carbonos insaturado (H-d). Também foi observado um metileno em δ 1,64 (H-e); um sinal no intervalo δ 1.25 – 1.38 (H-f) integrando para 28H devido à presença de grupos CH₂ degenerados e um tripleto em δ 0,88 (H-g, *J*=6,8 Hz) integrando para 3H referente à presença da metila em região altamente blindada (FIGURAS 5.86 a 5.88 e TABELA 5.17). O sinal em δ 5,35 (H-b) apresentou uma das constantes de acoplamento, *J*_{cis} de 9,2 Hz indicando que o composto apresenta isomeria *cis*. Além disso, o perfil da ressonância do próton olefínico (δ 5,35, H-b) e o deslocamento químico, similar e ligeiramente blindado se comparado ao isômero *trans*, e do próton metileno (δ 2,02, H-d), similar e ligeiramente desblindado comparando com isômero *trans*, indica que a substância 7 tem isomeria *cis* (BERTIN et al., 2012).

A análise por GC-MS da subfração (PAC4) contendo a substância 7 mostrou a presença de três picos, sendo o pico 3 majoritário (pureza ≥ 86,8%) e representativo da substância citada (FIGURA 5.89). O índice de retenção calculado para o pico 3, 2795, foi muito próximo ao índice de retenção do composto *cis*-13-Docosenamida da literatura, 2791 (SANSEERA et al., 2012) (TABELA 5.18), reforçando que a substância 7 tem isomeria *cis*.

O espectro de massas do “pico 3” mostrou o fragmento $m/z = 337$ daltons, referente ao íon molecular da substância, sugerindo a fórmula molecular $C_{22}H_{43}NO$ (FIGURA 5.90). Foi possível observar a presença de um fragmento $m/z = 59$ (pico base), referente ao Rearranjo de McLafferty devido à presença de hidrogênio γ , confirmando que o composto é uma amida e não um ácido graxo (FIGURA 5.91). Comparando o espectro de massas obtido (FIGURA 5.90) com aquele do banco de dados do equipamento (NIST08) (FIGURA 5.92) encontra-se uma similaridade de 91% para a *cis*-13-docosenamida confirmando, dessa forma, após análise do perfil de fragmentação, comparação com dados do equipamento e RMN que a substância **7** é a *cis*-13-docosenamida.

As outras duas substâncias, minoritárias (**8** e **9**) na subfração PAC4, também foram identificadas por GC-MS por comparação dos espectros de massas obtidos com o do banco de dados do equipamento e pelos índices de retenção calculados por meio de uma série de homóloga de *n*-alcanos (FIGURA 5.89 e TABELA 5.18).

TABELA 5.17 - Dados de RMN de 1H *cis*-13-docosenamida (**7**) em comparação com os dados da literatura.

Substância 7 (400 MHz, $CDCl_3$)		Wakamatsu et al., 1990 ¹ (270 MHz, $CDCl_3$)
Nº	δ_H	δ_H (lit)
a	-	-
b	5,35 (2H, <i>m</i> , $J_{cis} = 9,2$; $J_{vic} = 4,6$ Hz)	5,35 (1-2H, <i>t</i>)
c	2,22 (2H, <i>t</i> , $J = 7,6$ Hz)	2,21 (2H, <i>t</i>)
d	2,02 (4H, <i>q</i> , $J = 6,0$ Hz)	2,04 (2-3H, <i>dt</i>)
e	1,64 (2H, <i>m</i>)	1,65 (2H, <i>m</i>)
f	1,25 – 1,38 (28H, degenerado)	1,27 (25-30H, degenerado)
g	0,88 (3H, <i>t</i> , $J = 6,8$ Hz)	0,88 (3H, <i>t</i>)

¹ = WAKAMATSU, K.; MASAKI, T.; ITOH, F.; KONDO, K.; SUDO, K. Isolation of fatty acid amide as an angiogenic principle from bovine mesentery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **168** (2): 423-429, 1990.

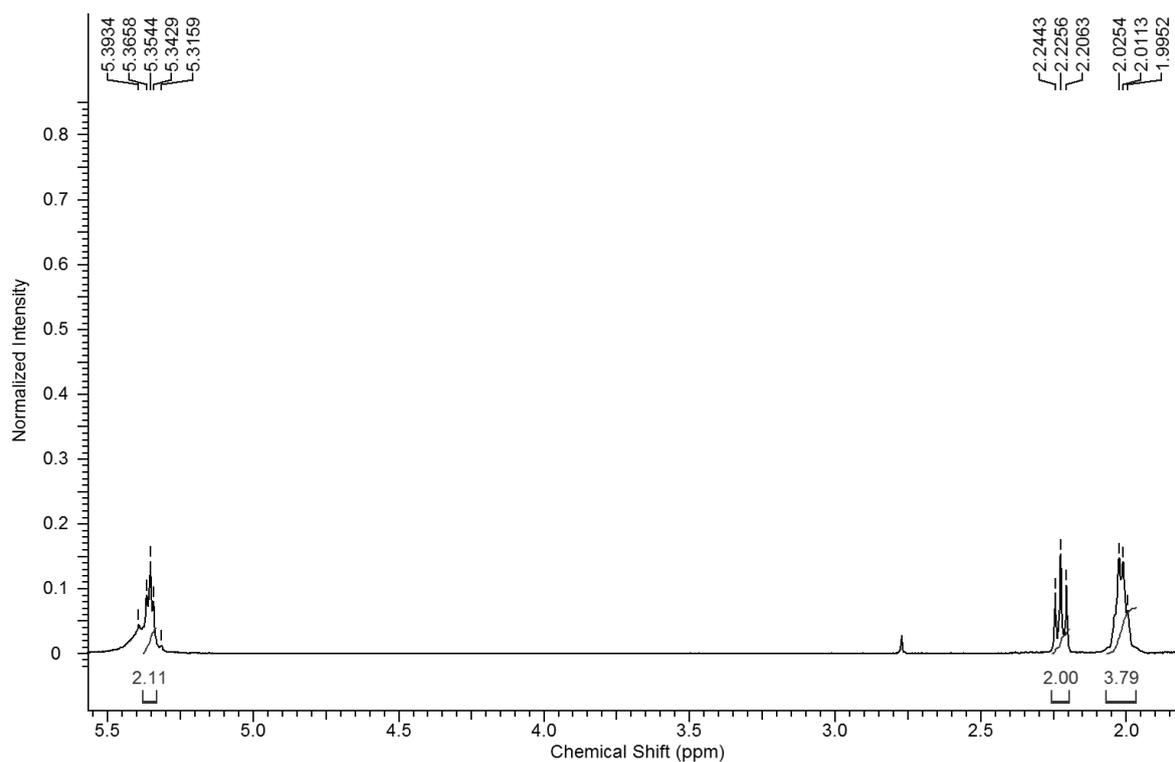


FIGURA 5.86 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância *cis*-13-docosenamida.

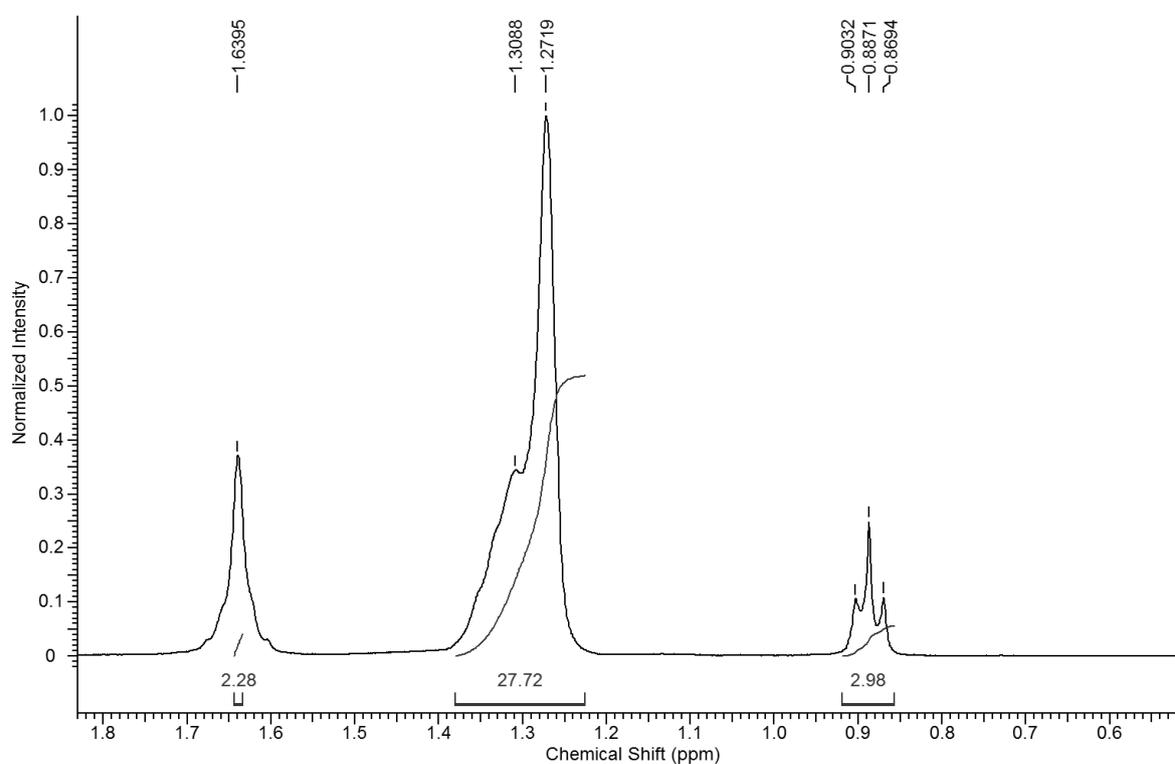


FIGURA 5.87 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância *cis*-13-docosenamida.

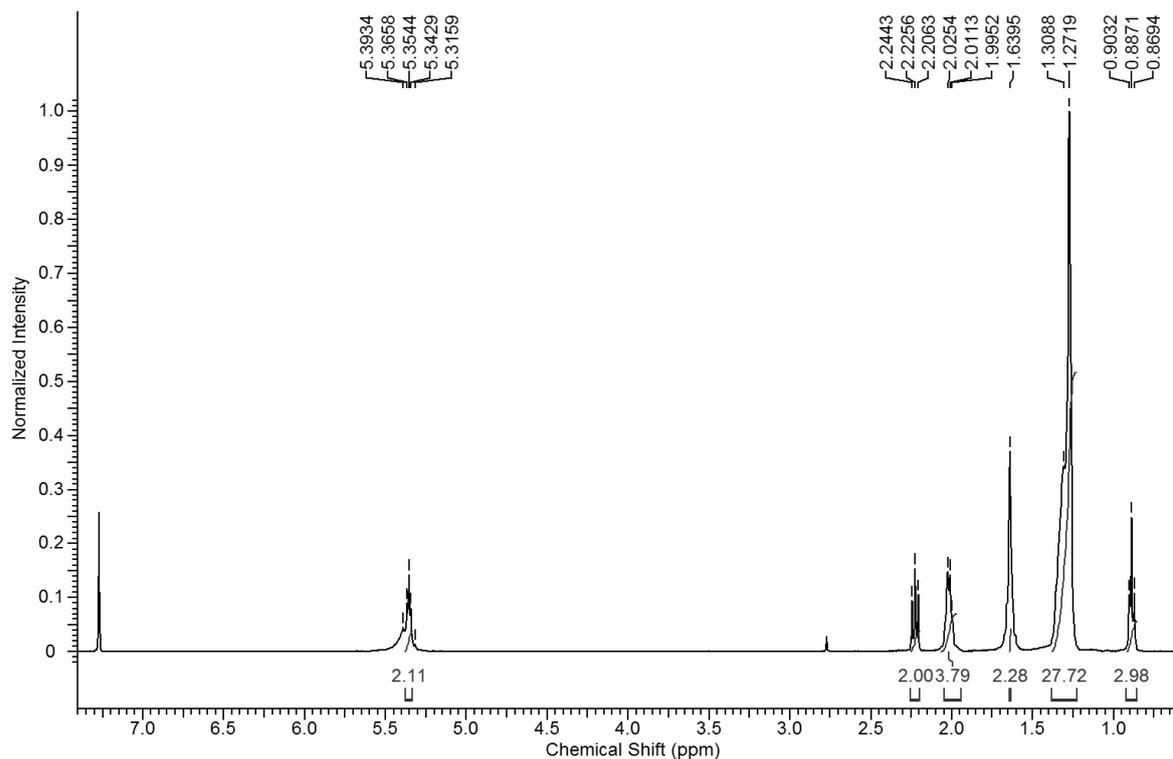


FIGURA 5.88 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância *cis*-13-docosenamida.

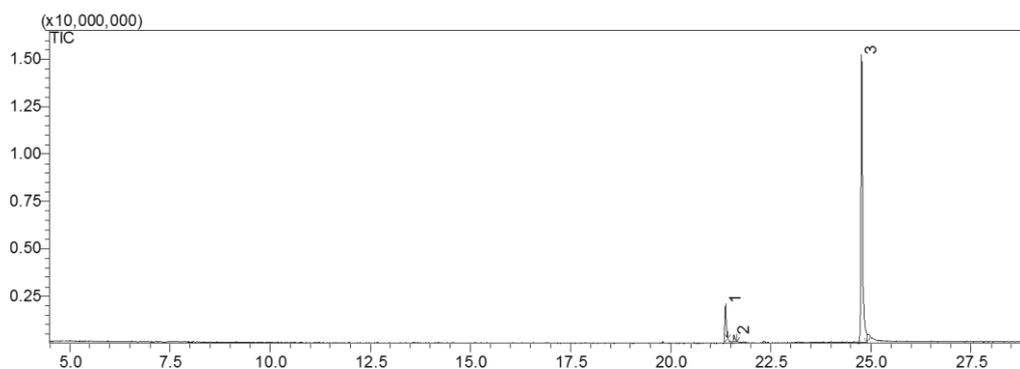


FIGURA 5.89 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS da subfração PAC4 que contém as amidas 7-9, sendo a amida 7 (*cis*-13-docosenamida) majoritária. Condições: coluna OPTIMA 5-MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 μm ; rampa de 60 $^\circ$ C(1 min.) (10 $^\circ$ C/min)-290 $^\circ$ C (5 min.). Injetor: 270 $^\circ$ C, Detector: 290 $^\circ$ C; He-1,2 mL/min.

TABELA 5.18 - Análise via GC-MS da subfração PAC4 que contém as amidas 7-9.

Nº	Componentes			% ^a	MM	m/z (%) íons ^b
		IR	IR-lit			
1	cis-9-octadecenamida (8)	2376	2375*	11,4	281	59 (100), 72 (51), 55 (41)
2	octadecanamida (9)	2402	2398*	1,7	283	59 (100), 72 (34), 55 (21)
3	cis-13-docosenamida (7)	2795	2791**	86,8	337	59 (100), 72 (68), 55 (49)
Total				99,9		

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

IR-lit = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

MM = massa molecular.

a = área percentual relativa do pico.

b = íons mais intensos detectados.

* = identificado pelo NIST Web Book, NIST MS Search 2.0 e/ou /www.pherobase.com.

** = SANSEERA, D.; NIWATANANUM, W.; LIAWRUANGRATH, S.; BARAMEE, A.; KHANTAWA, B.; PYNE, S. T.; LIAWRUANGRATH, B. Composition of chemical constituents and antibacterial activities and antioxidant activities of the essential oil from leaves and fruits of *Bridelia retusa* (L.) A. Juss. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **71**: 733-739, 2012.

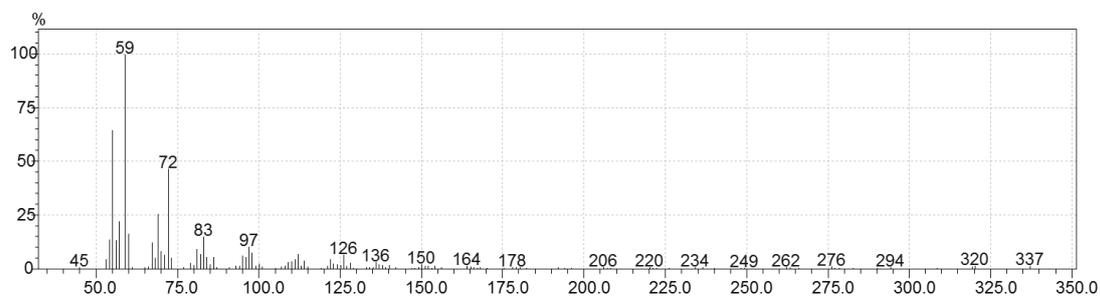


FIGURA 5.90 - Espectro de massas do pico 3, substância 7, obtido por GC-MS. Impacto eletrônico, 70 eV.

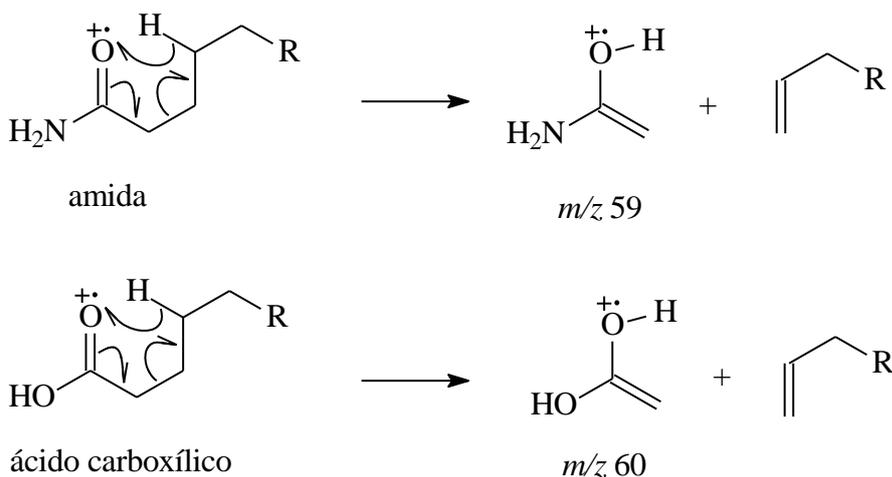


FIGURA 5.91 - ESQUEMA de fragmentação para amida e ácido carboxílico via rearranjo de McLafferty.

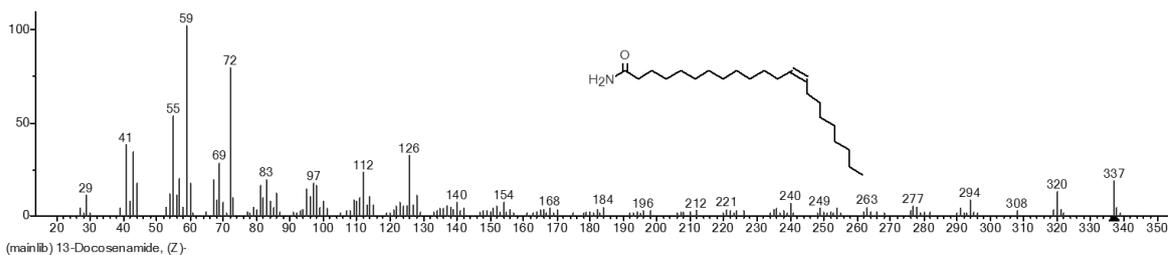


FIGURA 5.92 - Espectro de massas de *cis*-13-docosenamida do banco de dados do equipamento (NIST08). Impacto eletrônico, 70 eV.

Por meio dos índices de retenção calculado para as amidas e comparação com aqueles da literatura (TABELA 5.18) foi possível prever a posição da ligação dupla das mesmas, porém somente a reação de alquiotilação da fração PAC4 (FIGURA 5.93) confirmou a posição da ligação dupla em *cis*-13-docosenamida (FIGURAS 5.94 e 5.95) e em *cis*-9-octadecenamida (FIGURAS 5.96 e 5.97).

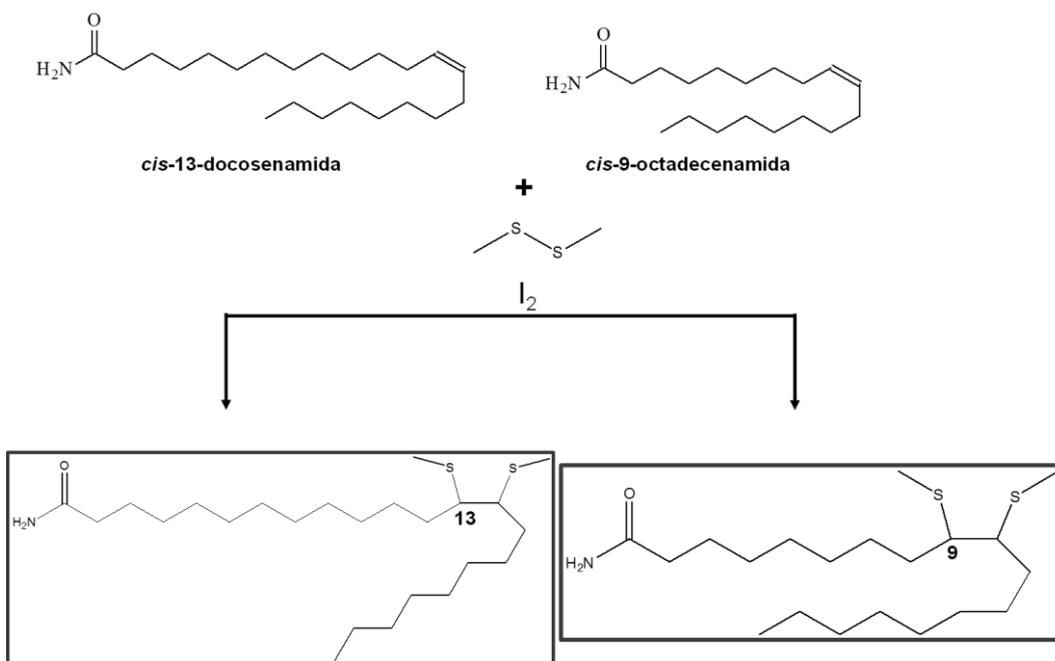


FIGURA 5.93 - Reação geral de alquiotilação das amidas, *cis*-13-docosenamida e em *cis*-9-octadecenamida.

O espectro de massas da amida *cis*-13-docosenamida derivatizada, mostrou dois íons fragmentos intensos, m/z 173 e 258, os quais caracterizam a ligação dupla na posição do carbono 13 (FIGURA 5.94). As propostas de fragmentação pra produzir os dois íons estão ilustradas na FIGURA 5.95.

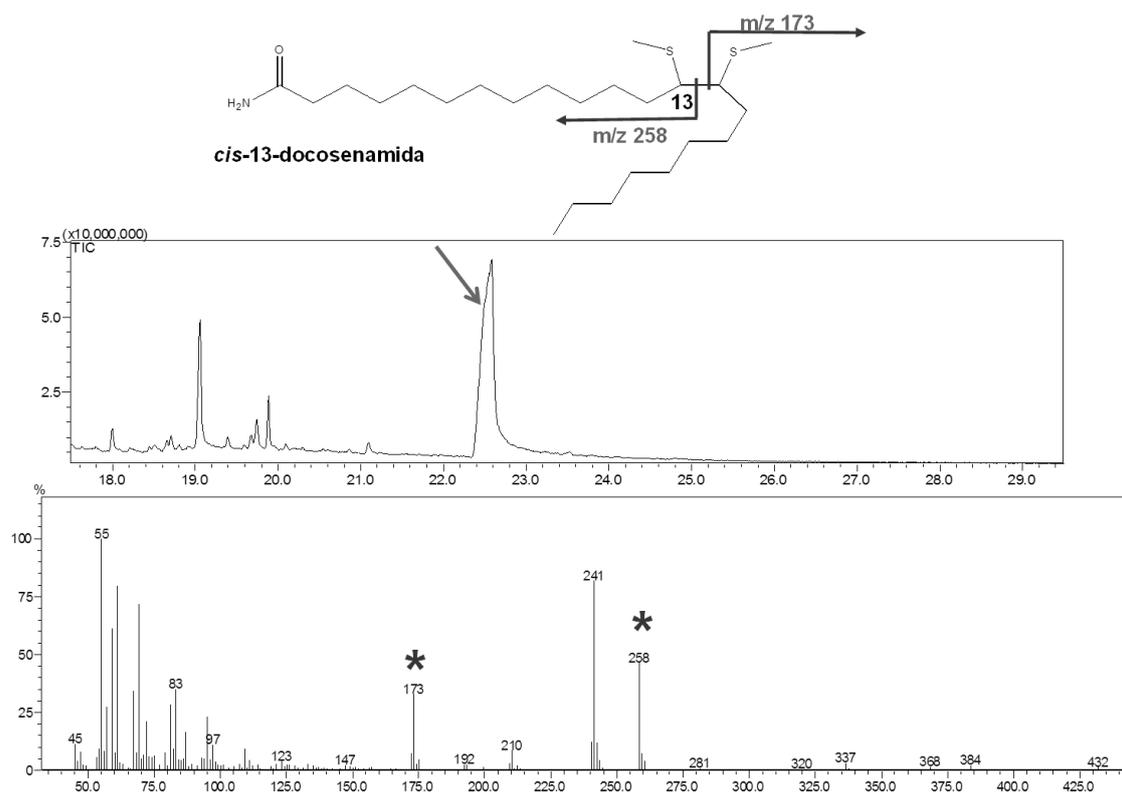


FIGURA 5.94 - Cromatograma e espectro de *cis*-13-docosenamida derivatizada.

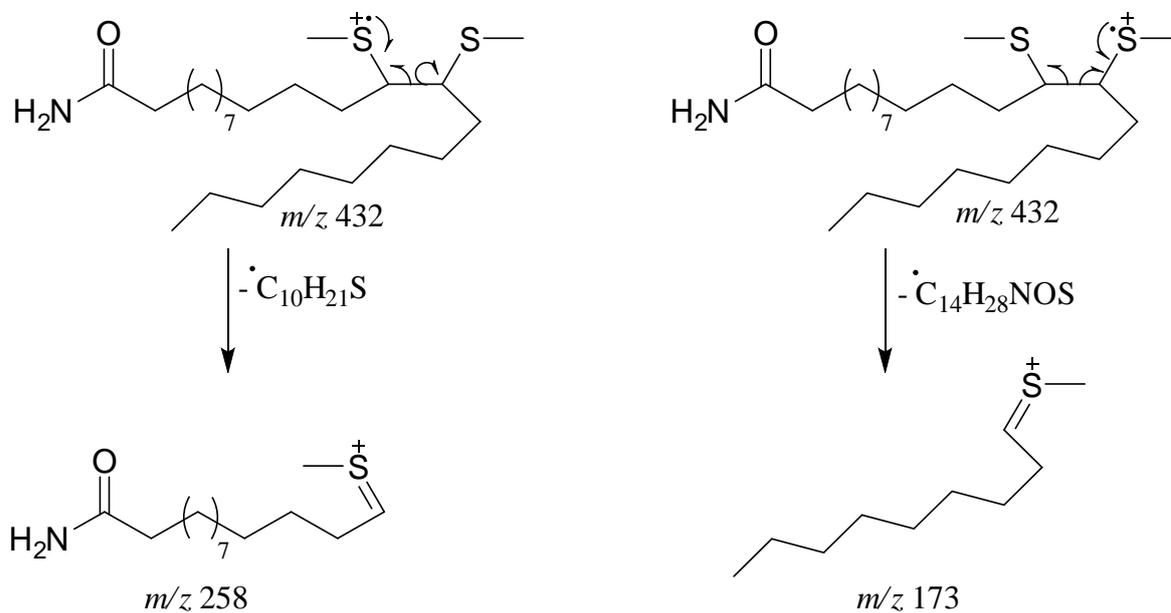


FIGURA 5.95 - Proposta de fragmentação para os íons m/z 258 e 173 de *cis*-13-docosenamida derivatizada.

O espectro de massas da amida *cis*-9-octadecenamida derivatizada, mostrou dois íons fragmentos intensos, m/z 173 e 202, os quais caracterizam a ligação dupla na posição do carbono 13 (FIGURA 5.96). As propostas de fragmentação pra produzir os dois íons estão ilustradas na FIGURA 5.97.

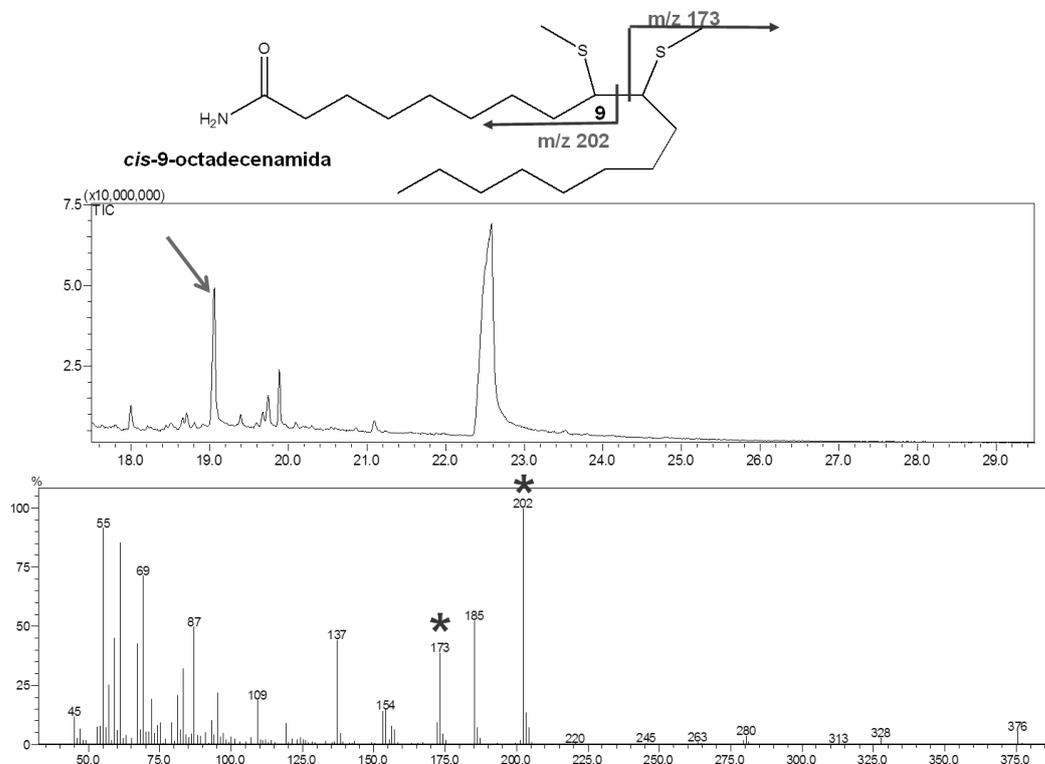


FIGURA 5.96 - Cromatograma e espectro de *cis*-9-octadecenamida derivatizada.

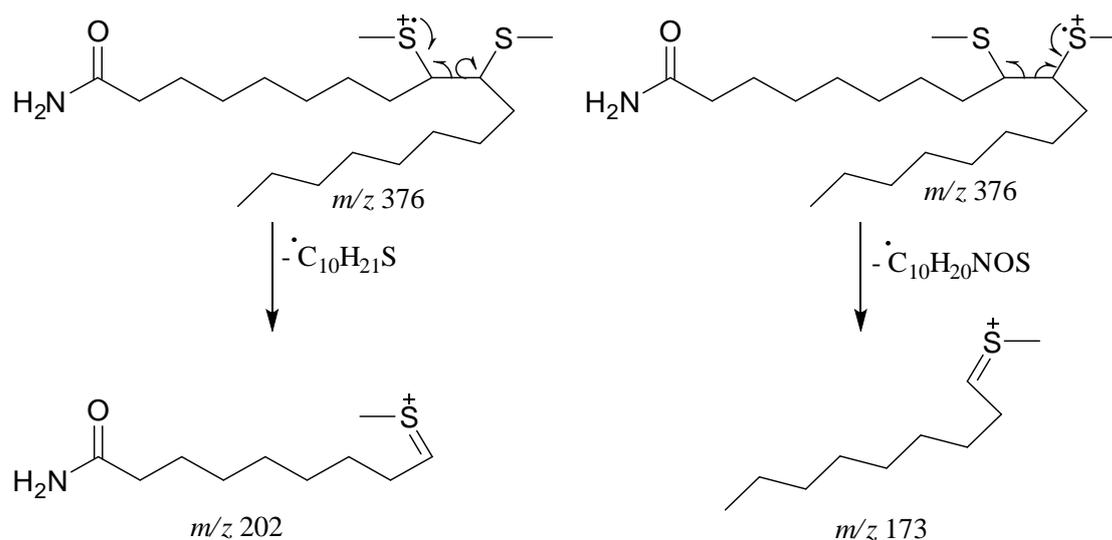
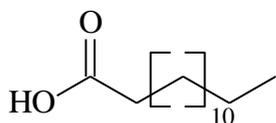
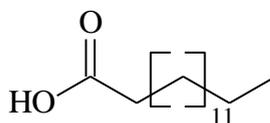


FIGURA 5.97 - Proposta de fragmentação para os íons m/z 202 e 173 de *cis*-9-octadecenamida derivatizada.

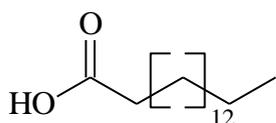
5.2.4.8 - Substâncias 7 a 9 e 10.1 a 10.8: ácido tetradecanóico (10.1); ácido pentadecanóico (10.2); ácido hexadecanóico (10.3); *n*-eicosano (10.4); *n*-heneicosano (10.5); ácido *cis*-9-octadecenóico (10.6); hexadecanamida (10.7); *n*-tricosano (10.8)



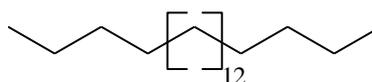
ácido tetradecanóico (10.1)



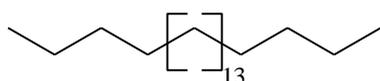
ácido pentadecanóico (10.2)



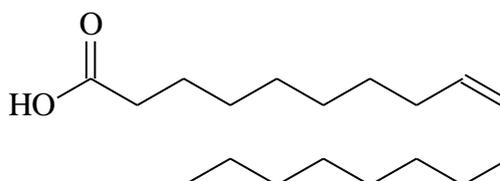
ácido hexadecanóico (10.3)



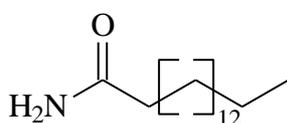
n-eicosano (10.4)



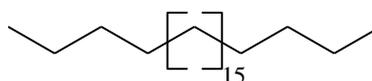
n-heneicosano (10.5)



ácido *cis*-9-octadecenóico (10.6)



hexadecanamida (10.7)



n-tricosano (10.8)

FIGURA 5.98 - Estruturas química dos ácidos tetradecanóico (10.1); pentadecanóico (10.2); hexadecanóico (10.3); *cis*-9-octadecenóico (10.6); dos hidrocarbonetos *n*-eicosano (10.4); *n*-heneicosano (10.5); *n*-tricosano (10.8) e amida hexadecanamida (10.7).

A análise da subfração PAC5 por GC-MS mostrou a presença da série de amidas isoladas anteriormente na sufração PAC4 (substâncias 7 a 9), a amida de ácido graxo (hexadecanamida, 10.7), alguns ácidos graxos (10.1; 10.2; 10.3 e 10.6) e alguns alcanos lineares (10.4; 10.5 e 10.8) (FIGURA 5.98; 5.99 e TABELA 5.19). Os mesmos foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com o do banco de dados do equipamento e pelos índices de

retenção calculados por meio de uma série homóloga de *n*-alcanos, os quais também foram comparados com a literatura (FIGURA 5.99 e TABELA 5.19). A produção de ácidos graxos por bactérias, incluindo *Xanthomonas campestris pv. campestris* (*Xcc*), frequente estão associados à comunicação celular (quorum sensing), relacionado ao processo de patogenicidade na planta (RYAN & MAXWELL, 2011; WANG et al., 2004). Provavelmente, alguns ácidos graxos e/ou derivados de ácidos graxos identificados também podem agir desta forma em *Xac*.

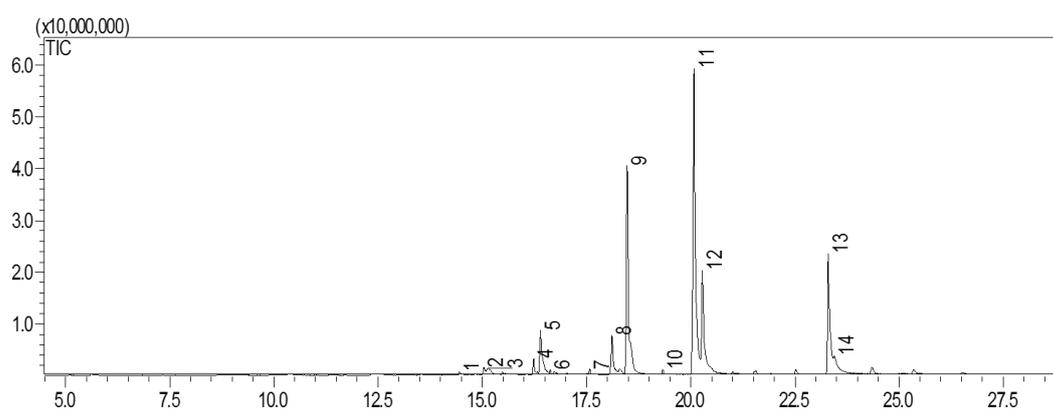


FIGURA 5.99 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS da subfração PAC5. Condições: coluna OPTIMA 5-MS 30 m x 0,25 mm, ID., 0,25 µm; rampa de 60° C(1 min.) (10° C/min)-290° C (5 min.). Injetor: 270° C, Detector: 290° C; He-1,2 mL/min.

TABELA 5.19 - Análise via GC-MS da subfração PAC5 que contém as amidas 7-9 e substâncias 10.1 a 10.8.

Nº	Componentes	IR	IR-lit	% ^a	m/z (%) íons ^b
1	ácido tetradecanóico (10.1)	1787	1787*	0,2	73 (100), 60 (74), 57 (52)
2	ácido pentadecanóico (10.2)	1841	1845*	0,5	73 (100), 60 (99), 57 (89)
3	NI	-	-	-	-
4	NI	-	-	-	-
5	ácido hexadecanóico (10.3)	1973	1975*	5,6	73 (100), 60 (95), 57 (82)
6	<i>n</i> -eicosano (10.4)	1996	2000	0,3	57 (100), 71 (56), 85 (31)
7	<i>n</i> -heneicosano (10.5)	2098	2100	0,2	57 (100), 71 (58), 85 (33)
8	ácido <i>cis</i> -9-octadecenóico (10.6)	2157	2152*	3,5	55 (100), 69 (59), 83 (38)
9	hexadecanamida (10.7)	2194	2186*	22,8	59 (100), 72 (44), 54 (15)
10	<i>n</i> -tricosano (10.8)	2294	2300	0,2	57 (100), 71 (63), 85 (43)
11	<i>cis</i> -9-Octadecenamida (8)	2384	2375*	37,5	59 (100), 72 (62), 55 (37)
12	octadecanamida (9)	2408	2398*	11,3	59 (100), 72 (40), 55 (14)
13	<i>cis</i> -13-Docosenamida (7)	2805	2791**	13,9	59 (100), 72 (62), 55 (47)
14	NI	-	-	-	-
Total				96,0	

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

IR-lit = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

a = área percentual relativa do pico.

b = íons mais intensos detectados.

NI = não identificado.

- = não determinado.

* = identificado pelo NIST Web Book, NIST MS Search 2.0 e/ou www.pherobase.com.

** = SANSEERA, D.; NIWATANANUM, W.; LIAWRUANGRATH, S.; BARAMEE, A.; KHANTAWA, B.; PYNE, S. T.; LIAWRUANGRATH, B. Composition of chemical constituents and antibacterial activities and antioxidant activities of the essential oil from leaves and fruits of *Bridelia retusa* (L.) A. Juss. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **71**: 733-739, 2012.

5.2.4.9 - Substância 11 – uracila

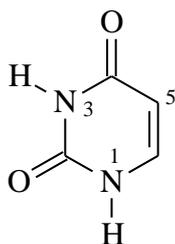


FIGURA 5.100 - Estrutura química da uracila (11).

A uracila (11) (FIGURA 5.100) foi isolada da subfração PAC7 à qual foi proveniente da fração acetato de etila do extrato metanólico das células bacterianas (seção 5.1.2.2.2) e teve suas estruturas determinadas baseando-se em experimentos de RMN 1D (¹H, ¹³C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC) e comparando com dados da literatura MARINHO et al., 2007 (FIGURAS 5.101 a 5.105 e TABELA 5.20).

No espectro de RMN de ^1H foram observados apenas dois dubletos acoplando entre si em δ 7,40 (1H) e 5,62 (1H) com constante de acoplamento de aproximadamente 7,5 e 7,5 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-6 e H-5, respectivamente (FIGURAS 5.101 a 5.105 e TABELA 5.20). O mapa de correlação COSY comprova que esses hidrogênios acoplam entre si (FIGURA 5.103). Não foi observado nenhum sinal típico da unidade ribose, descartando que a substância seria a uridina. Os dados de RMN ^{13}C obtidos por projeção no HSQC e HMBC (FIGURAS 5.104 e 5.105 e TABELA 5.20), comparado com dados da literatura comprovam que a substância é a uracila (**11**), um nucleosídeo constituído de base nitrogenada o qual faz parte da estrutura do DNA dos seres vivos. A presente substância já foi isolada de um fungo endofítico *Penicillium sp*, por MARINHO et al., 2007. Entretanto, esta é a primeira vez em que é descrito o isolamento da uracila da bactéria *Xac*.

TABELA 5.20 - Dados de RMN de ^1H da uracila (**11**) em comparação com os dados da literatura.

Substância 11		Substância 11 na lit		
Nº	δ_{H} ¹	δ_{C} ²	δ_{H} (lit) ³	δ_{C} (lit) ⁴
2	-	152,0*	-	151,7
4	-	166,2*	-	166,2
5	5,62 (1H, d, J= 7,5 Hz)	100,5**	5,89 (d)	102,3
6	7,40 (1H, d, J= 7,5 Hz)	142,0**	7,88 (d)	141,9

¹ = Dados de RMN ^{13}H a 400 MHz em CD_3OD da uracila isolada.

² = Dados de RMN ^{13}C a 100 MHz em CD_3OD da uracila isolada.

³ = Dados de RMN ^{13}H a 400 MHz em DMSO-d_6 da uracila na literatura, MARINHO et al., 2007.

⁴ = Dados de RMN ^{13}C a 100 MHz em DMSO-d_6 da uracila na literatura, MARINHO et al., 2007.

*: Valores de carbono foram obtidos através da projeção no HMBC.

** : Valores de carbono foram obtidos através da projeção no HSQC.

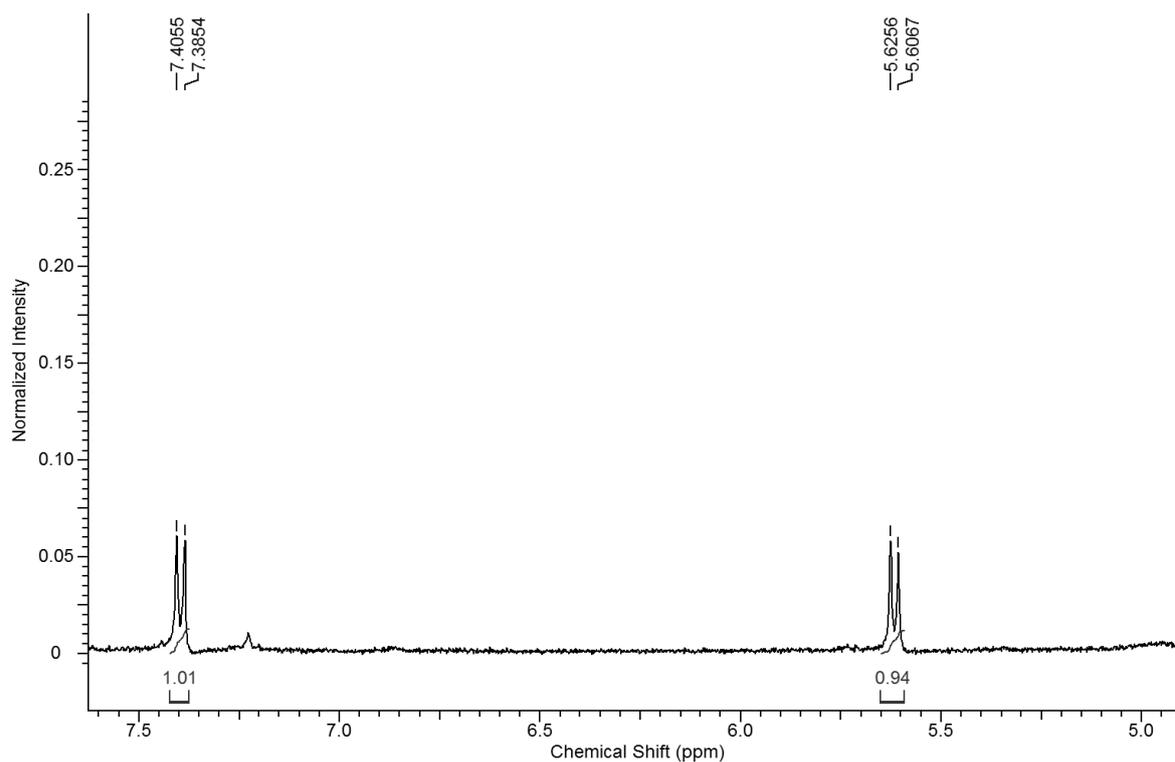


FIGURA 5.101 - Ampliação do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) da uracila.

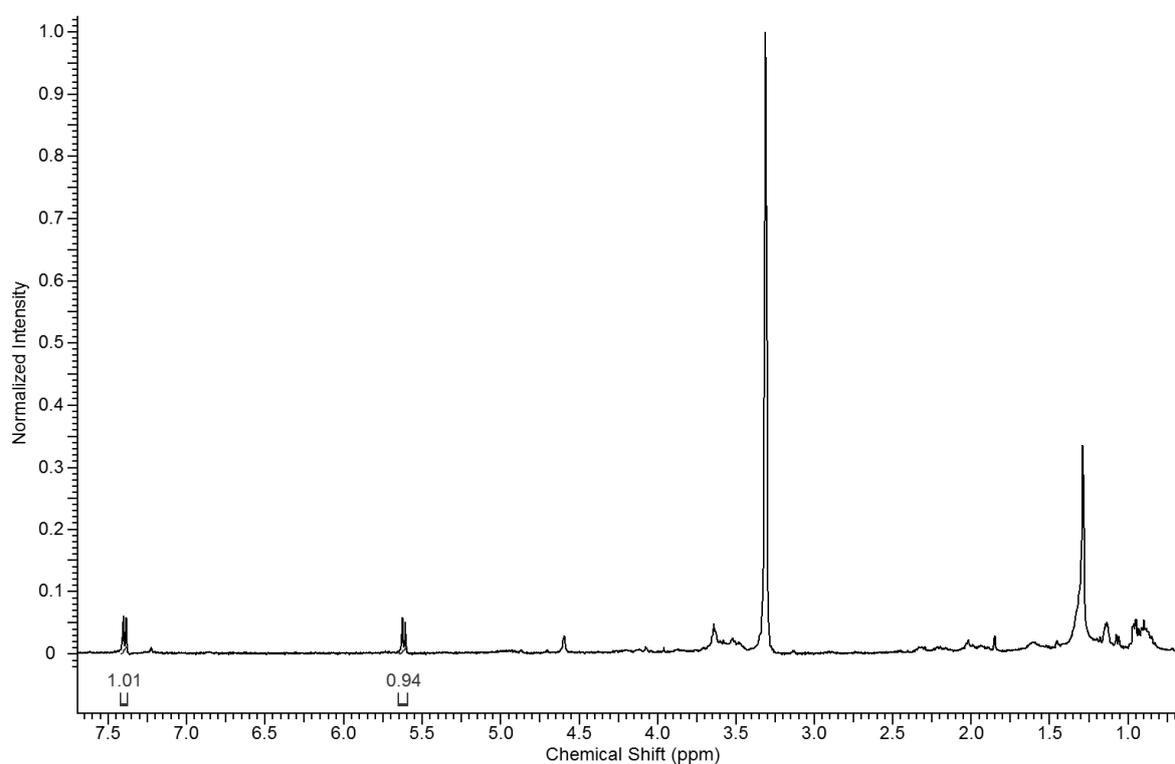


FIGURA 5.102 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) da uracila.

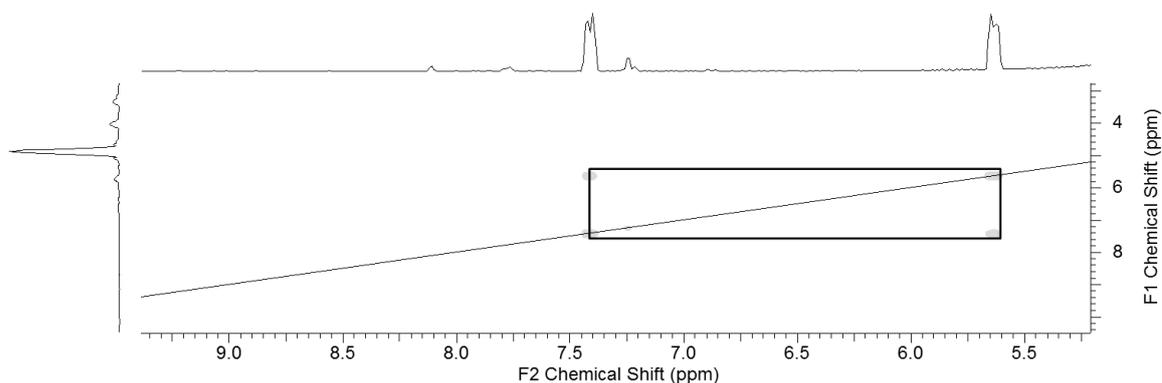


FIGURA 5.103 - Mapa de correlação COSY (¹H-¹H) (CD₃OD, 400 MHz) da uracila.

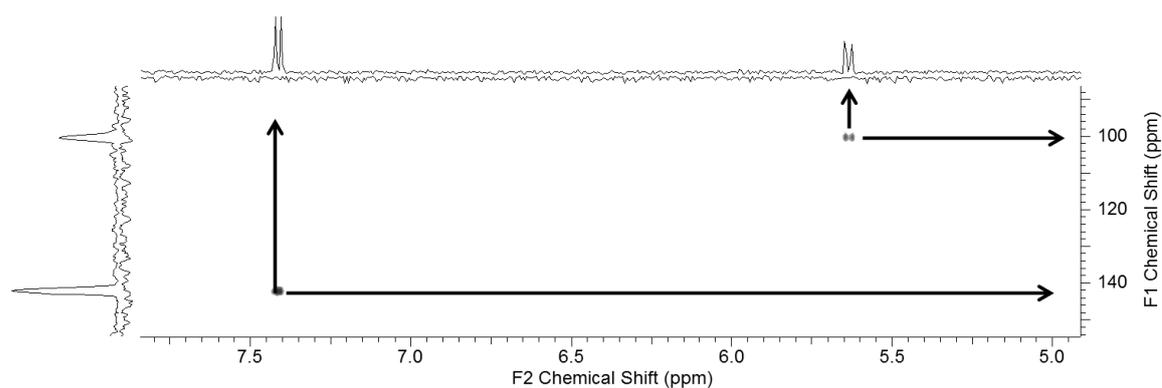


FIGURA 5.104 - Mapa de correlação HSQC (¹H-¹³C) (CD₃OD, 400 MHz) da uracila.

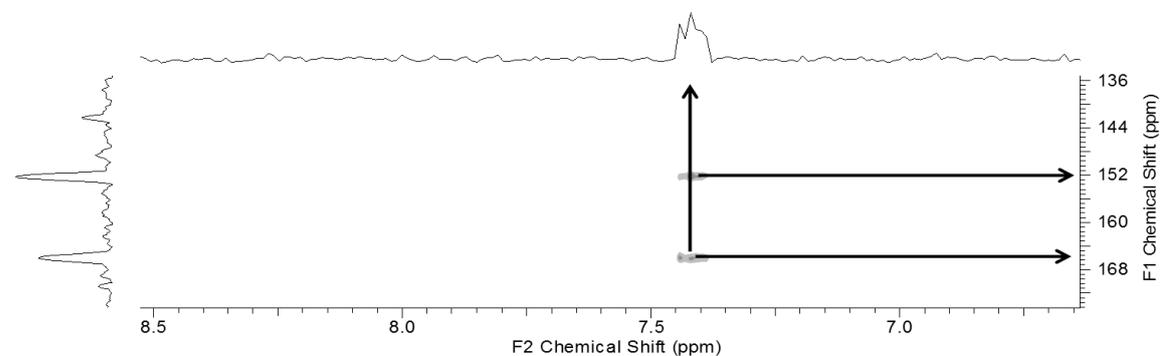


FIGURA 5.105 - Mapa de correlação HMBC (¹H-¹³C, J₃) (CD₃OD, 400 MHz) da uracila.

5.2.5 - Identificação das dicetopiperazinas, *ciclo* (Pro-Leu), *ciclo* (Pro-Val), *ciclo* (Pro-Phe) e *ciclo* (Phe-Phe), em *Xac* cultivada em Czapeck sólido por LC-MS

Esta parte do trabalho foi realizada em microescala, em meio sólido czapeck (seção 5.1.2.5), com o objetivo de confirmar a produção das dicetopiperazinas isoladas durante o desenvolvimento deste trabalho quando a bactéria foi cultivada em meio complexo NBY. O meio de cultivo Czapeck

modificado (contendo apenas glicose como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio) não possui aminoácidos como ingredientes, por isso é possível confirmar a produção de compostos cuja síntese é geralmente descrita por condensação direta de dois aminoácidos (FIGURA 5.106) ou preferencialmente ativação do primeiro aminoácido via catálise ácida ou básica seguida de reação com o segundo aminoácido (BORTHWICK, 2012; FALORNI et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 1995).

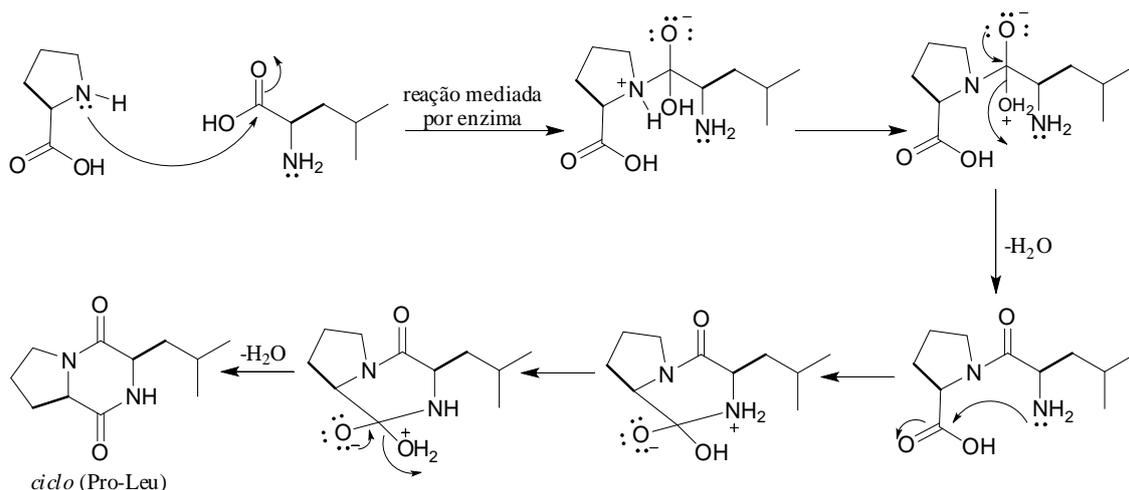


FIGURA 5.106 – Síntese da dicetopiperazina *ciclo* (Pro-Leu) por condensação direta de aminoácidos.

A busca das dicetopiperazinas em meio czapeck é um desafio, pois provavelmente a bactéria as produziria em níveis baixíssimos, tornando difícil a detecção destes compostos. As identificações foram realizadas por análises LC-MS tanto da fração acetato de etila da bactéria *Xac* cultivada em czapeck sólido (seção 5.1.2.5), quanto das dicetopiperazinas isoladas neste estudo utilizando experimentos do tipo monitoramento de reações múltiplas (MRM) em equipamento API 2000 triplo quadrupolo, devido à alta seletividade e sensibilidade, respectivamente. As análises das fração acetato de etila da bactéria *Xac* cultivada em czapeck sólido revelaram a presença de transições de íons (*m/z*) característicos de dicetopiperazinas (FIGURA 5.107a). Foram selecionadas algumas transições para cada composto na fração acetato de etila: transições *m/z* 197→70, 197→124, 197→154 [*ciclo* (Pro-Val)]; 211→70, 211→98, 211→154 [*ciclo* (Pro-Leu)]; 245→70, 245→120, 245→154 [*ciclo* (Pro-Phe)] e 295→120 [*ciclo* (Phe-Phe)] (FIGURA 5.107a). As mesmas transições, condições do HPLC e da espectrometria de massas foram utilizadas para cada composto isolado, a fim de

confirmar a produção das dicetopiperazinas tanto pelo tempo de retenção quanto por informação espectral (FIGURA 5.107b). Foi possível observar que a bactéria produz dois diastereoisômeros de *ciclo* (Pro-Val), *ciclo* (Pro-Leu) e *ciclo* (Pro-Phe) e apenas 1 diastereoisômero da *ciclo* (Phe-Phe). Como a estereoquímica de *ciclo* (Pro-Val) isolada (descrito na seção 5.2.4.2.1) foi determinada, é possível inferir que a *ciclo* (Pro-Val) com tempo de retenção 8,57 min no extrato tem estereoquímica *cis*. O mesmo é observado para o estereoisômero de *ciclo* (Pro-Leu) com tempo de retenção 11,20 min identificado no extrato, sendo determinado, por correlação com o composto isolado (descrito na seção 5.2.4.1.1), com estereoquímica *cis*.

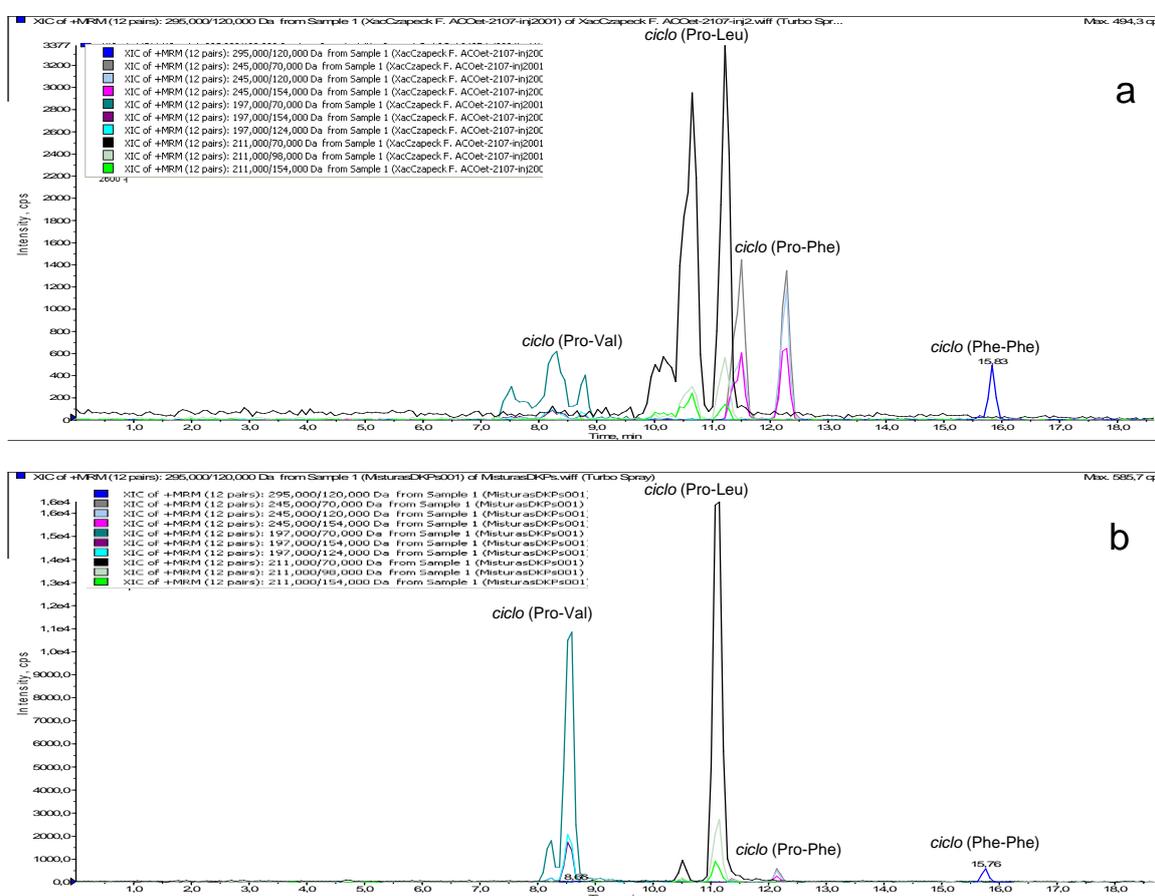


FIGURA 5.107 - Cromatogramas de íons extraídos MRM da fração acetato de etila de *Xac* cultivada em czapeck sólido (a) e das quatro dicetopiperazinas isoladas (b). Condições no modo reverso de eluição: 5% de ACN, 5-100% em 35 min e isocrático 100% durante 5 minutos, vazão 0,8 mL/min. Vinj = 20µL, coluna Phenomex Gemini® C18 (150 x 4,6 mm), 5 µm. Concentrações: fração 1 mg/mL e compostos 2 µg/mL em ACN/H₂O (1:1). ESI (+), Dwell (msec) = 350. Parâmetros da fonte: CUR (20), CAD (5), IS (4500), TEM (400), GS1 (30), GS2 (30). Parâmetros para o composto: DP (46), FP (50), EP (11), CE (39), CXP (5).

Os experimentos de íons produtos dos compostos isolados (FIGURAS 5.108; 5.110; 5.112 e 5.114) confirmaram o perfil de fragmentação característicos das respectivas dicetopiperazinas, *ciclo* (Pro-Val) (FIGURA 5.109), *ciclo* (Pro-Leu) (FIGURA 5.111), *ciclo* (Pro-Phe) (FIGURA 5.113), *ciclo* (Phe-Phe) (FIGURA 5.115) e mostraram a presença dos íon selecionados nas transições de identificação por MRM.

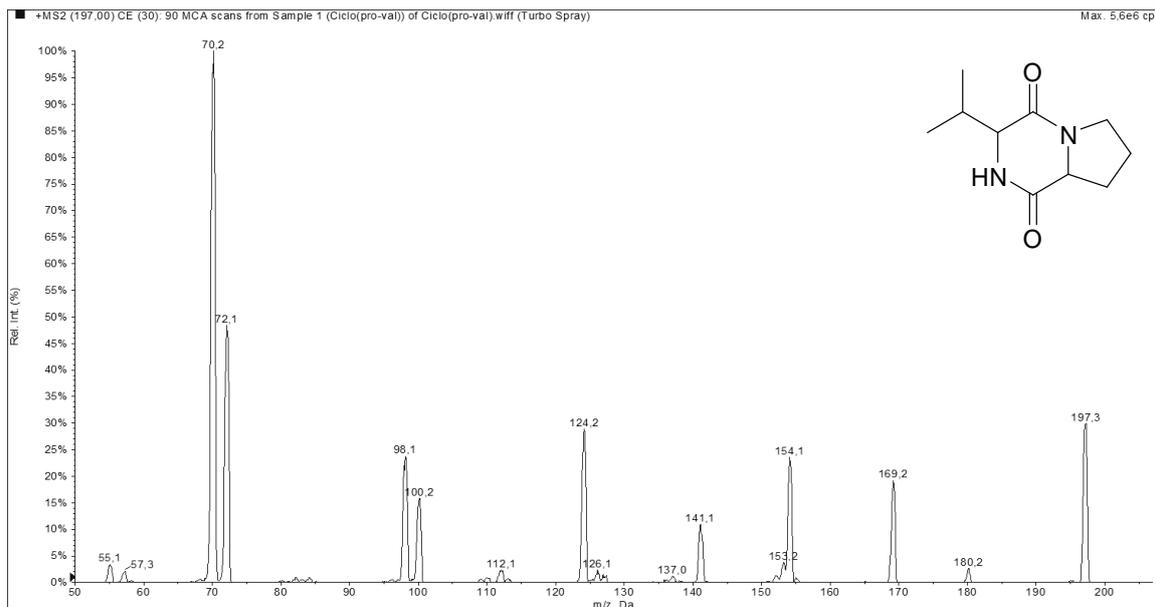


FIGURA 5.108 - Espectro de íon produtos m/z 197 $[M+H]^+$ de *ciclo* (Pro-Val) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.

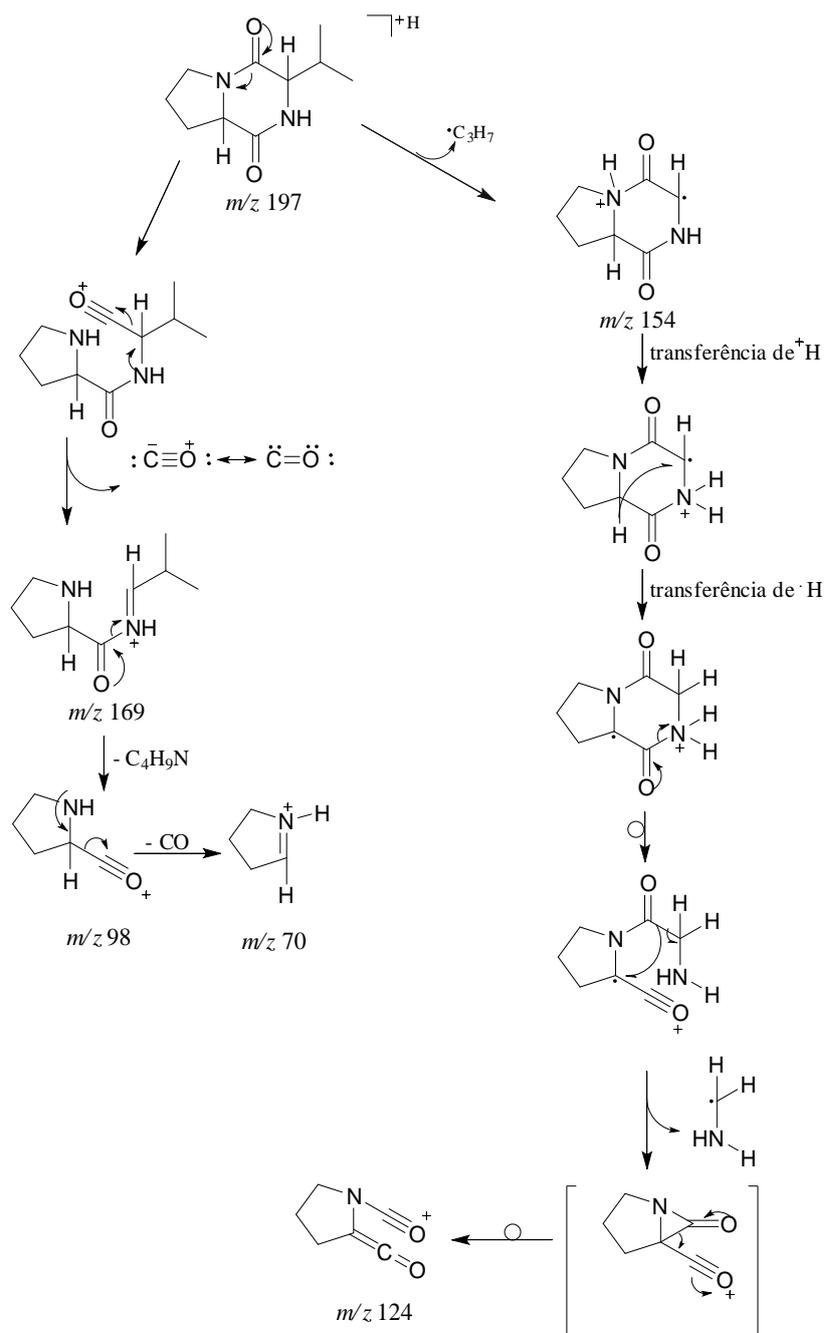


FIGURA 5.109 - Proposta de fragmentação para a ciclo (Pro-Val).

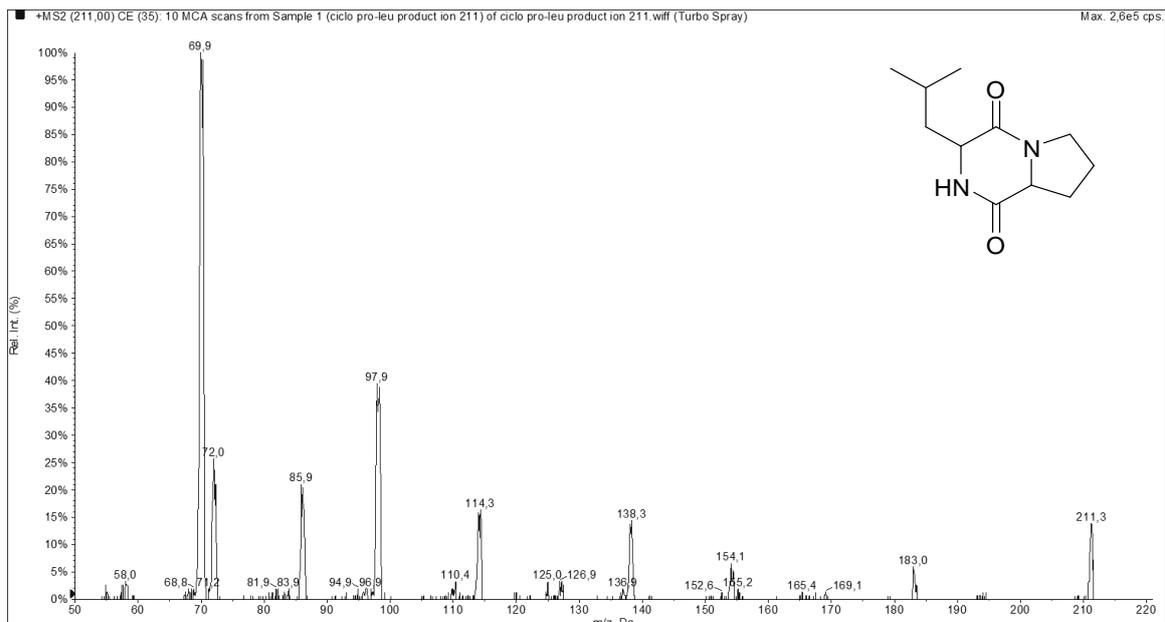


FIGURA 5.110 - Espectro de íon produtos m/z 211 $[M+H]^+$ de *ciclo* (Pro-Leu) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.

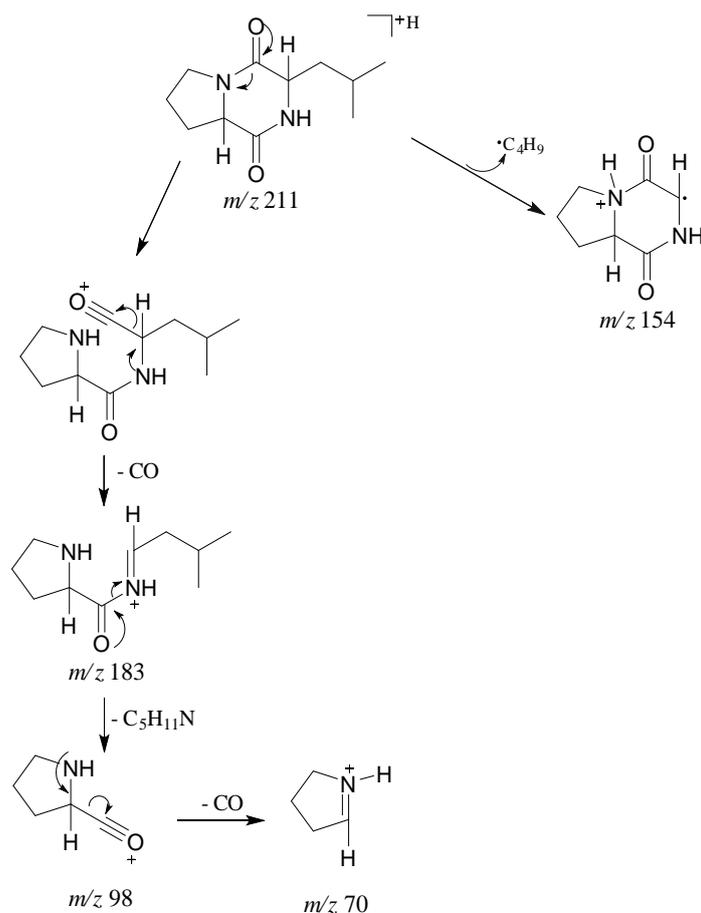


FIGURA 5.111 - Proposta de fragmentação para a *ciclo* (Pro-Leu).

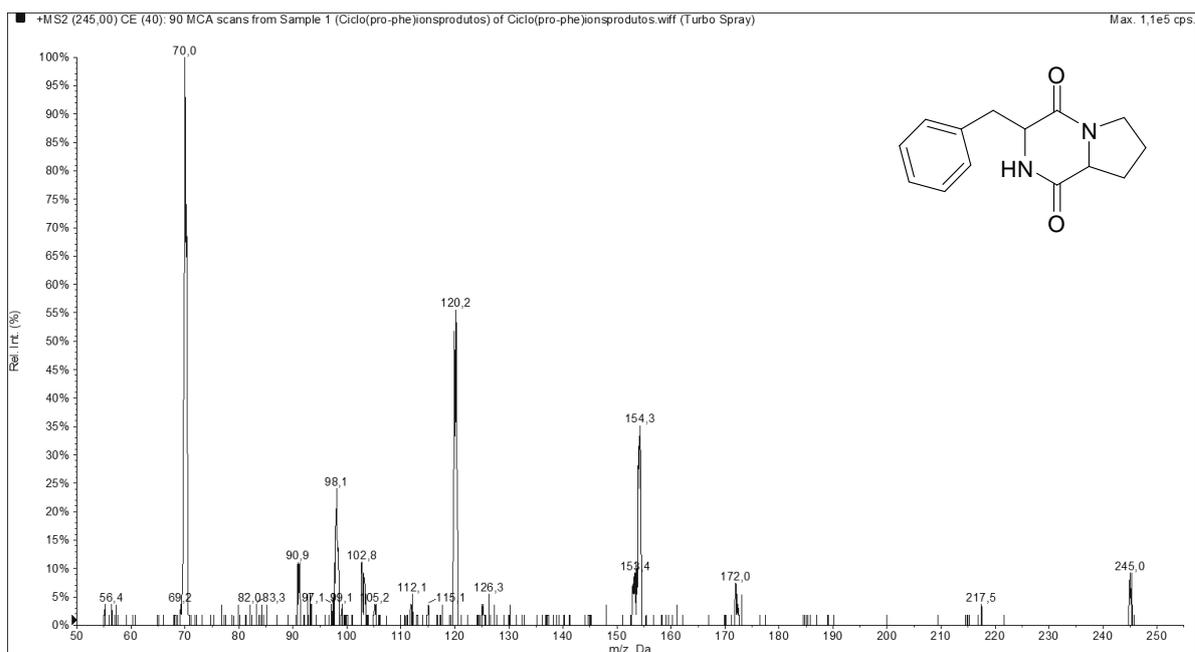


FIGURA 5.112 - Espectro de íon produtos m/z 245 $[M+H]^+$ de *ciclo* (Pro-Phe) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.

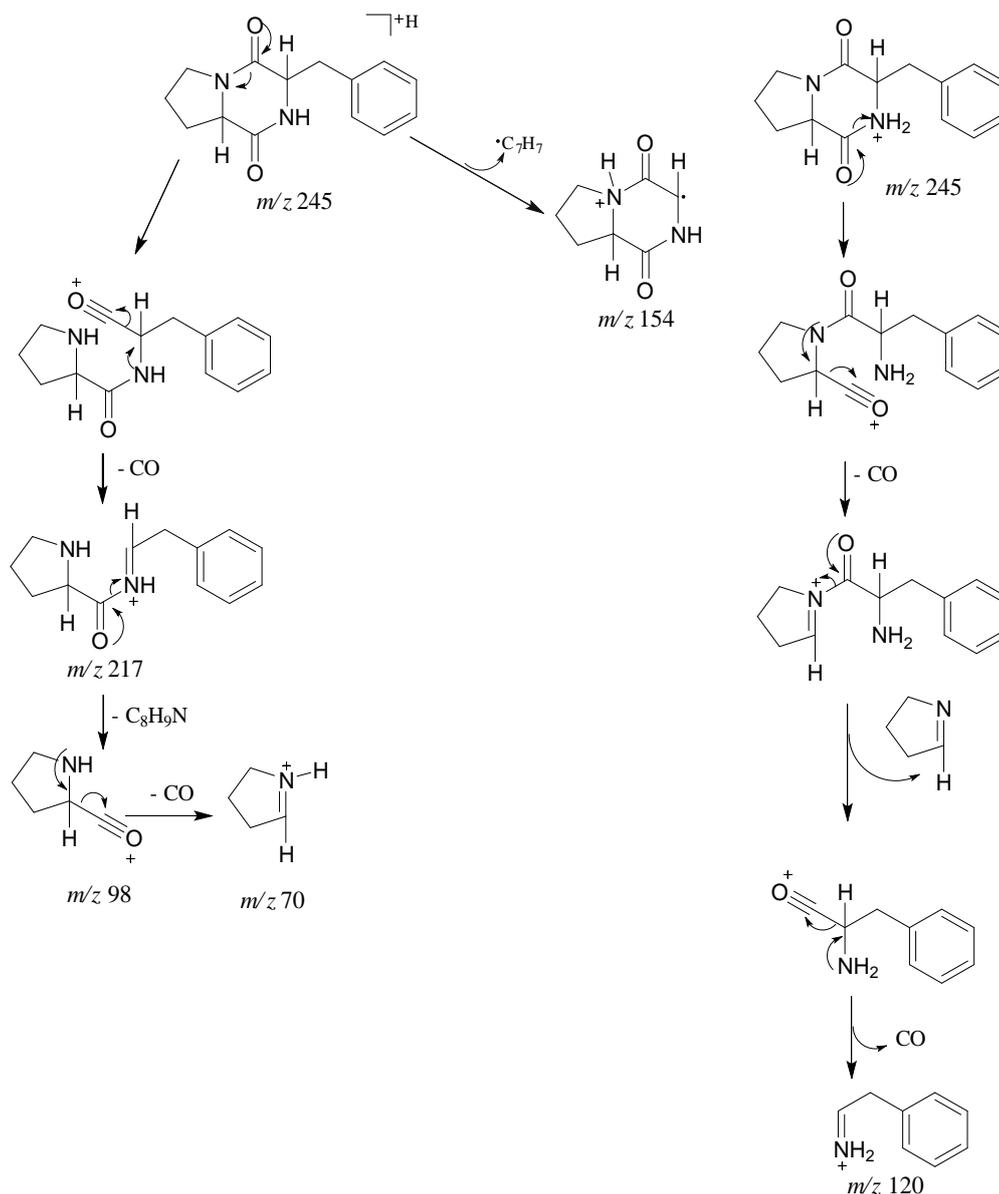


FIGURA 5.113 - Proposta de fragmentação para a ciclo (Pro-Phe).

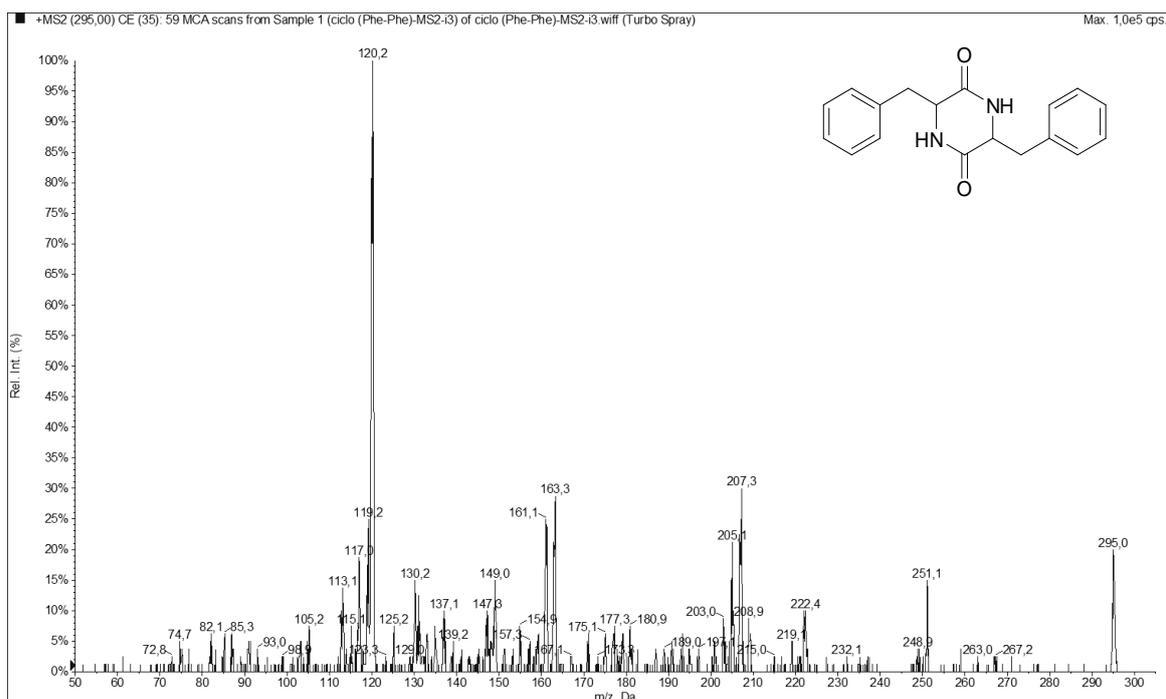


FIGURA 5.114 - Espectro de íon produtos m/z 295 $[M+H]^+$ de *ciclo* (Phe-Phe) obtido por ESI-MS (+) utilizando o equipamento API 2000.

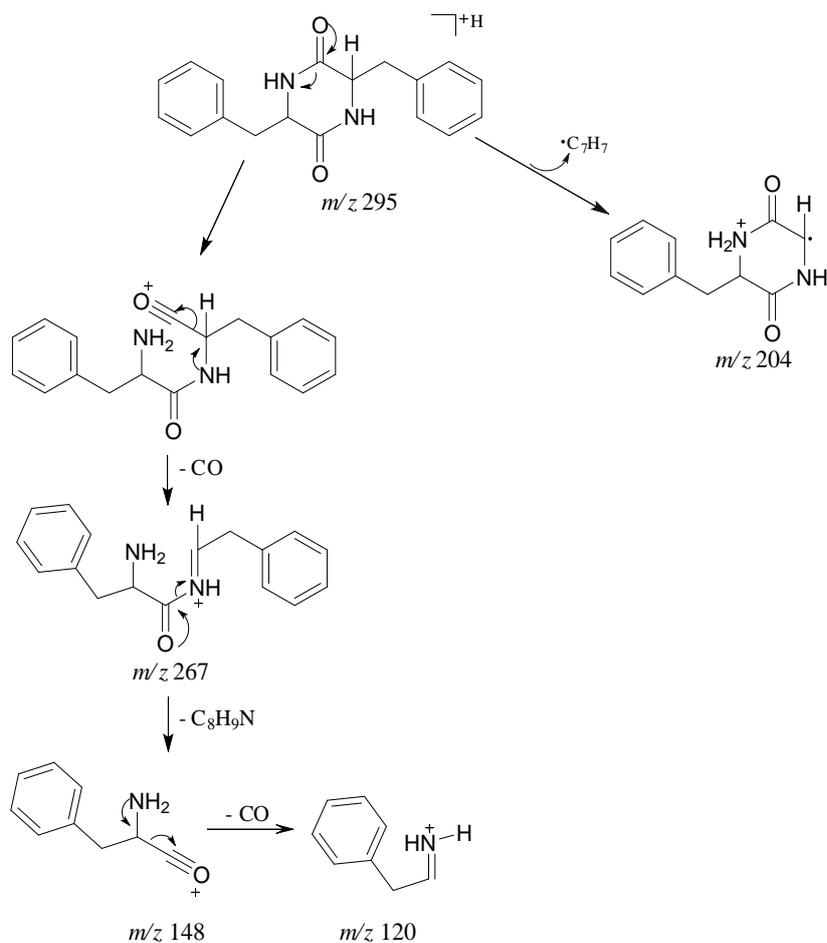


FIGURA 5.115 - Proposta de fragmentação para a *ciclo* (Phe-Phe).

Dessa forma, as análises confirmaram que a bactéria também produz as dicetopiperazinas *ciclo* (Pro-Leu), *ciclo* (Pro-Val), *ciclo* (Pro-Phe) e *ciclo* (Phe-Phe) em meio czapeck (“pobre” em nutrientes), o qual não contém aminoácidos como ingredientes.

6 - Conclusão

O perfil químico de *Citrus sinensis* associado à bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) proporcionou diferenciação e identificação de vários biomarcadores químicos voláteis considerando os dois métodos de extração (“*headspace*” dinâmico-GC-MS e HS-SPME/GC-MS) e a natureza das folhas das plantas: Sadias (SA); infectadas sem sintoma (IFSSIN) e infectadas com sintoma do cancro cítrico (IFCSIN).

As metodologias desenvolvidas mostram-se promissoras para identificar a presença do cancro cítrico pela busca de biomarcadores químicos voláteis, principalmente da classe dos aromáticos, os quais podem ser fitoalexinas ou fitotoxinas lançadas pela bactéria. A busca dos biomarcadores quando a planta apresenta o sintoma do cancro cítrico é mais eficiente por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ no preparo de amostra, haja visto que foram identificados vários compostos aromáticos que não estavam presentes nas folhas das plantas sadias. Os principais biomarcadores por esta metodologia são benzaldeído, fenilmetanol, benzoato de metila, 2-feniletanol, acetato de benzila e benzoato de etila, os quais apresentaram maior área percentual. A mesma técnica, sem o uso de N₂, também mostra-se promissora na identificação da doença, antes e após o desenvolvimento do sintoma, porém pela identificação de benzotiazol e benzoato de 2-etilexila, principalmente. “*Headspace*” dinâmico-GC-MS é satisfatório para a identificação do cancro cítrico após o sintoma, buscando principalmente, benzoato de isoamila, pois além do mesmo ser da classe dos aromáticos, também foi identificado no perfil dos voláteis produzidos pela bactéria cultivada *in vitro*.

MALDI-TOF/MS mostrou ser uma técnica promissora para diagnosticar rapidamente *Xac in vitro*, bem como realizar o diagnóstico do cancro cítrico em folhas de *C. sinensis* do campo por meio da análise hierárquica de agrupamentos.

O estudo químico de *X. axonopodis* pv. *citri* levou ao isolamento e/ou identificação de 16 substâncias, algumas delas sinalizadoras em outras bactérias com similaridade genômica. Entre estas substâncias destacam-se: *ciclo* (Pro-Leu) e *ciclo* (Pro-Val), dois diastereoisômeros de *ciclo* (Pro-Phe), às quais as configurações relativas foram determinadas, *ciclo* (Phe-Phe), quinolina-4-

carboxaldeído, amidas de ácidos graxos (octadecanamida, *cis*-9-octadecenamida, *cis*-13-docosenamida) e o ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenóico (sinalizador em *X. campestris* pv. *campestris*). De acordo com vários estudos na literatura, alguns desses compostos são importantes na comunicação celular de diferentes microorganismos ou podem ser fitotoxinas lançadas pela bactéria na planta.

7 – Referências bibliográficas

ABDELNUR, P. V. Estudo Fitoquímico de *Citrus*: Resistência a *Xylella fastidiosa* e Interação com *Oncometopia facialis*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de mestrado, 275 p.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass spectroscopy. Allured: Carol Stream, 2007. 804 p.

AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JOUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, C. & PRUVOST, O. "Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59** (2): 306-318, 2009.

AGELOPOLUS, N. G. & PICKETT, J. A. "Headspace analysis in chemical ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples". *Journal of Chemical Ecology*, **24**: 1161-1172, 1998.

AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. Manual de Fitopatologia – Volume 1. 1a ed. Agronômica Ceres, 2011. 704 p.

ANDRADE, M. O.; ALEGRIA, M. C.; GUZZO, C. R.; DOCENA, C.; ROSA, M. C.; RAMOS, C. H. & FARAH, C. S. "The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*". *Molecular Microbiology*, **62** (2): 537-551, 2006.

ANTUNES, L. C. M. A. "A linguagem das bactérias". *Ciência Hoje*, **33** (193): 16-20, 2003.

BAILEY, J. A. & MANSFIELD, J. W. (Eds) Phytoalexins. A Halsted Press Book. John Wiley and Sons. New York - Toronto, 334 p, 1982. ISBN 0-470-27291-0.

BAPTISTA, J. C. Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Campinas, Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação de mestrado, 110 p.

BARBER, C. E.; TANG, J. L.; FENG, J. X.; PAN, M. Q.; WILSON, T. J. C.; SLATER, H.; DOWN, J. M.; WILLIAMS, P. & DANIELS, M. J. "A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule". *Molecular Microbiology*, **24** (3): 555-566, 1997.

BASSLER, B. L.; WRIGHT, M.; SHOWALTER, R. E. & SILVERMAN, M. R. "Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence". *Molecular Microbiology*, **9**: 773-786, 1993.

- BELASQUE, J.; FERNANDES, N. G. & MASSARI, C. A. “O Sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo, Brasil”. *Summa Phytopathologica*, **35** (2): 91-92, 2009.
- BERG, J. M., TYMOCKZO, J. L., STRYER, L. Biochemistry. Fifth edition. W. H. Freeman and Company: New York, 2002.
- BERTIN, M. J.; ZIMBA, P. V.; BEAUCHESNE, K. R.; HUNCIK, K. M. & MOELLER, P. D. R. “Identification of toxic fatty acid amides isolated from the harmful alga *Prymnesium parvum carter*”. *Harmful Algae*, **20**: 111-116, 2012.
- BITLER, B. & MCELROY, W. D. A. “The preparation and properties of crystalline firefly luciferin”. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **72**: 358-368, 1957.
- BORTHWICK. “2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products”. *Chemical Reviews*, **112**: 3641-3716, 2012.
- BRUNINGS, A. M. & GABRIEL, D. W. “*Xanthomonas citri*: breaking the surface”. *Molecular Plant Pathology*, **4** (3): 141-157, 2003.
- CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D. & BLACKWELL, H. E. “New and unexpected insights into the modulation of LuxR-Type quorum sensing by cyclic dipeptides”. *ACS Chem. Biol.*, **4** (12): 1051–1059, 2009.
- CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y. C.; SHAW, P. D. & FARRAND, S. K. “Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria”. *Mol Plant Microbe Interact.*, **11**: 1119–1129, 1998.
- CHATTERJEE, S.; WISTROM, C. & LINDOW, S. E. “A cell–cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105** (7): 2670-2675, 2008.
- COLETA-FILHO, H. D.; TAKITA, M. A.; DE SOUZA, A. A.; NETO, J. R.; DESTÉFANO, S. A. L.; HARTUNG, J. S. & MACHADO, M. A. “Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv.citri in naturally and artificially infected citrus plants”. *Journal of Applied Microbiology*, **100**: 279-285, 2006.
- CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. & GOTTWALD, T. R. “Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker”. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2849-2852, 2001.
- CUBERO, J. & GRAHAM, J. H. “Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in *Citrus* species and design of new primers for their identification by PCR”. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 1257–1264, 2002.
- Da SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA JR, N. F.; ALVES, L. M. C.; AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F. S.; CARDOZO, J.;

- CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H. F.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE JR, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA JR, H. A.; ROSSI, A. C.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C. & KITAJIMA, J. P. "Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities". *Nature*, **417**: 459-463, 2002.
- DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. "Phytoalexins and their elicitors-A defense against microbial infection in plants". *Annual Review of Plant Biology*, **35**: 243-275, 1984.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J. & HICKS, J. B. "A plant DNA miniprep: Version II". *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**: 19-21, 1983.
- DEMIREV, P. A.; FENSELAU, C. "Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms". *Annu. Rev. Anal. Chem*, **1**: 71-93, 2008.
- DENG, Y.; WU, J.; TAO, F. & ZHANG, L. "Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in gram-negative bacteria". *Chemical Reviews*, **111**:160-173, 2011.
- EBERHARD, A.; BURLINGAME, A. L.; EBERHARD, C.; KENYON, G. L.; NEALSON, K. H. & OPPENHEIMER, N. J. "Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase". *Biochemistry*, **20** (9): 2444-2449, 1981.
- FALORNI, M.; GIACOMELLI, G.; PORCHEDDU, A.; TADDEI, M. "Solution-phase synthesis of mixed amide libraries by simultaneous addition of functionalities (SPSAF) to a diketopiperazine tetracarboxylic acid scaffold monitored by GC analysis of isobutyl alcohol". *European Journal of Organic Chemistry*, **2000** (8): 1669-1675, 2000.
- FAO (Food and Agriculture Organization) Disponível para consulta em <http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf>, acesso em 08 de novembro de 2014.
- FAWCETT, H. H. & JENKINS, A. E. "Records of citrus canker from herbarium specimens of genus *Citrus* in England and the United States". *Phytopathology*, **23**: 820-924, 1932.
- FDHILA, F.; VAZQUEZ, V.; SANCHEZ, J. L. & RIGUERA, R. "DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*". *J. Nat. Prod.*, **66** (10),1299-1301, 2003.

- FENG-WU, W. "Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*". *Chinese Journal of Natural Medicines*, **10** (1): 72-76, 2012.
- FLAVIER, A. B.; CLOUGH, S. J.; SCHELL, M. A. & DENNY, T. P. "Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*". *Molecular Microbiology*, **26** (2): 251-259, 1997.
- FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. Cancro cítrico. *Manual técnico*, 2008.
- FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T. & BASTOS, J. K. "Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* brazilian strain". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **16** (6B): 1448-1553, 2005.
- GONZÁLEZ, A.; VOROBÉVA, S. L. "Synthesis and structural study of piperazine-2,5-diones derived from (R)-cysteine". *Tetrahedron: Asymmetry*, **6** (6): 1357-1366, 1995.
- GONZÁLEZ-PEDRAJO, B. & DREYFUS, G. "Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram-negativas: Biogénesis flagelary translocación de factores de virulência". *Mensaje Bioquímico*, v. XXVII, 2003
- GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z. & WOOD, K. R. The biochemistry and physiology of plant disease. Columbia, University of Missouri Press, 1986. p. 433.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. & SCHUBERT, T.S. "Citrus canker: the pathogen and its impact". Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker>. Acesso em 20 de outubro de 2012.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J. & ACHOR, D. S." *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: fator affecting successful eradication of citrus canker". *Molecular Plant Pathology*, **5** (1): 1-5, 2004.
- GRAM, L.; CHRISTENSEN, A. B.; SØREN MOLIN, L. R. & GIVSKOV, M. "Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the enterobacteriaceae Isolated from Foods". *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (8): 3458-3463, 1999.
- GRAYER, R.J. & HARBORNE, J. B. "A survey of antifungal compounds from higher plants". *Phytochemistry*, **37** (1): 19-42, 1994.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. & JONES, J. D. G. "Responses to plant pathogens". In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W. & JONES, R. (Ed.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists. cap. 21,1102-1157, 2000.
- HANTÃO, L. W.; ALEME, H. G.; PASSADOR, M. M.; FURTADO, E. L.; RIBEIRO, F. A. L.; POPPI, R. J. & AUGUSTO, F. "Determination of disease biomarkers in

- Eucalyptus* by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis". *Journal of Chromatography A*, **1279**: 86-91, 2013 (a).
- HANTÃO, L. W.; TOLEDO, B. R.; RIBEIRO, F. A. L.; PIZETTA, M.; PIEROZZI, C. G.; FURTADO, E. L. & AUGUSTO, F. "Comprehensive two-dimensional gas chromatography combined to multivariate data analysis for detection of disease-resistant clones of *Eucalyptus*". *Talanta*, **116**: 1079-1084, 2013 (b).
- HARPER, M. "Sorbent trapping of volatile organic compounds from air". *Journal of Chromatography A*, **885**: 129-151, 2000.
- HARTUNG, J. S.; DANIEL, J. F. & PRUVOST, O. P. "Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction". *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 1143–1148, 1993.
- HAYWARD, A. C. The host of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas* (Swings, J. G.; Civerolo, E. L., eds), London: Chapman & Hall, pp. 1-17, 1993.
- HE, Y. W.; ZHANG, L. H. "Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*". *FEMS Microbiology Reviews*, **32** (5): 842-857, 2008.
- HOLDEN, M. T. G.; CHHABRA, S. R.; DE NYS, R.; STEAD, P.; BAINTON, N. J.; HILL, P. J.; MANEFIELD, M.; KUMAR, N.; LABATTE, M.; ENGLAND, D.; RICE, S.; GIVSKOV, M.; SALMOND, G. P. C.; STEWART, G. S. A. B.; BYCROFT, B. W.; KJELLEBERG, S. & WILLIAMS, P. "Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria". *Molecular Microbiology*, **33**: 1254-1266, 1999.
- HOMEM, R. A. Análise funcional do sistema de secreção tipo II de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Campinas, Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, 2008. Tese de Doutorado, 95 p.
- HU, N. T.; HUNG, M. N.; CHIOU, S. J.; TANG, F.; CHIANG, D. C.; HUANG, H. Y. & WU, C. Y. "Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*". *J. Bacteriol.*, **174**: 2679- 2687, 1992.
- JANG-HEE, C.; LEE, C. & LEE, H. "Antimicrobial activity of quinoline derivatives isolated from *Ruta chalepensis* toward human intestinal bacteria". *J. Microbiol. Biotechnol.*, **15** (3): 646-651, 2005.
- JHA, G.; RAJESHWARI, R. & SONTI, R. V. "Bacterial type two secretion system proteins: double-edged swords for plant pathogens". *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **18** (9): 891-898, 2005.
- KOZASA, T.; SUZUKI, K.; TSUNODA, N.; TANAKA, K.; YONEDA, T. & HIRASAWA, M. *Japanese Patent*. **63030493-A**, 1988.
- LAZDUNSKI, A. M.; VENTRE, I. & STURGIS, J. N. "Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria". *Nature Reviews Microbiology*, **2** (7): 581-592, 2004.

- LEE, H. A. "Further data on the susceptibility of Rutaceous plants to citrus canker". *Journal of Agricultural Research*, **15**: 661-664, 1918.
- LOPES, M. V.; BARRETO, M.; SCALOPPI, E. A. G.; BARBOSA, J. C. & BRUNINI, O. "Mapas de zonas de risco de epidemias e zoneamento agroclimático para o Cancro Cítrico no Estado de São Paulo". *Summa Phytopathologica*, **34** (4): 349-353, 2008.
- LOPES, A. A.; PINA, E. S.; SILVA, D. B.; PEREIRA, A. M. S.; DA SILVA, M. F. G. F.; DA COSTA, F. B.; LOPES, N. P. & PUPO, M. T. "A biosynthetic pathway of sesquiterpene lactones in *Smallanthus sonchifolius* and their localization in leaf tissues by MALDI imaging". *Chemical Communications*, **49** (85): 9989-9991, 2013.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B. & RODRIGUES FILHO, E. "Constituintes químicos de *Penicillium sp*, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae)". *Revista Ciências Exatas e Naturais*, **9** (2): 189-199, 2007.
- MICHAEL, J. P. "Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids". *Natural Product Reports*, **14** (11): 605-618, 1997.
- MICHAEL, J. P. "Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids". *Natural Product Reports*, **22**: 627-646, 2005.
- MOALEMIYAN, M.; VIKRAM, A. & KUSHALAPPA, A. C. "Detection and discrimination of two fungal diseases of mango (cv. Keitt) fruits based on volatile metabolite profiles using GC/MS". *Postharvest Biology and Technology*, **45**: 117-125, 2007.
- MURRAY, M. G. & THOMPSON, W. F. "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA". *Nucleic Acids Res*, **8**: 4321-4325, 1980.
- NAMEKATA, T. O cancro cítrico. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.P. & AMARO, A.A. (Ed.). *Citricultura Brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, 1991. 2. ed. v. 2, p. 775-786.
- NEWMAN, K. L.; ALMEIDA, R. P.; PURCELL, A. H. & LINDOW, S. E. "Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101** (6): 1737-1742, 2004.
- NICULAU, E. S. Contribuição à química dos compostos voláteis de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown e *Pelargonium graveolens* L'Herit e atividade inseticida frente à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). São Cristóvão, Núcleo de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal de Sergipe, 2011. Dissertação de Mestrado, 130 p
- NOGUEIRA, P. C. L. Contribuição à química dos compostos voláteis e interações com os organismos receptores. Campinas, Instituto de Química de Campinas - Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese de Doutorado, 231 p.
- OCHIAI, N.; SASAMOTO, K.; HOFFMANN, A. & OKANOYA, K. "Full evaporation dynamic headspace and gas chromatography-mass spectrometry for uniform

- enrichment of odor compounds in aqueous samples”. *Journal of Chromatography A*, **1240**: 59-68, 2012.
- OCHSNER, U. A.; KOCH, A. K.; FIECHTER, A. & REISER, J. “Isolation and characterisation of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*”. *The Journal of Bacteriology*, **176**: 2044-2054, 1994
- OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. & NAKASU, B. H. Manual técnico sobre o cancro cítrico. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. 24 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 27).
- OLIVEIRA, R. P.; UENO, B.; SCIVITTARO, W. B.; KOLLER, O. C. & ROCHA, P. S. G. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 40 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 234).
- OSBOURN, A. E. “Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary”. *Fungal Genetics and Biology*, **26** (3): 163-168, 1999.
- PEDRAS, M. S. C.; YU, Y.; LIU, J. & Tandron-Moya, Y. A. “Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*: Isolation, chemical structure determination, synthesis and bioactivity”. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, **60** (9/10), 717-722, 2005.
- PESCI, E. C.; MILBANK, J. B. J.; PEARSON, J. P.; MCKNIGHT, S.; KENDE, A. S.; GREENBERG, E. P & IGLEWSKI, B. H. “Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, **96**: 11229-11234, 1999.
- PIERSON, L. S.; KEPPELNE, V. D. & WOOD, D. K. “Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density”. *The Journal of Bacteriology*, **176**: 3966-3974, 1994.
- POMINI, A. M.; CRUZ, P. L. R.; GAI, C.; ARAÚJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. “Long-chain acyl-homoserine lactones from *Methylobacterium mesophilicum*: synthesis and absolute Configuration”. *J. Nat. Prod.*, **72**: 2125-2129, 2009.
- POPLAWSKY, A. R.; WALTERS, D. M.; ROUVIERE, P. E. & CHUN, W. “A gene for a dioxygenase-like proteindetermines the production of the DF signal in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*”. *Mol Plant Pathol.*, **6**: 653–657, 2005.
- QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S.; HE, Q. & FENG, J.; et al. “Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*”. *Genome Res.*, **15**: 757 – 767, 2005.
- RODRÍGUEZ, A.; ANDRÉS, V. S.; CERVERA, M.; REDONDO, A.; ALQUÉZAR, B.; SHIMADA, T.; GEDEA, J.; RODRIGO, M.; ZACARÍAS, L.; PALOU, L.; LÓPEZ, M. M.; CASTAÑERA, P. & PEÑA, L. “The monoterpene limonene in orange peels attracts pests and microorganisms”. *Plant Signaling & Behavior*, **6** (11): 1820-1823, 2011.
- RYAN, R. P.; FOUHY, Y.; LUCEI, J. F.; CROSSMAN, L. C.; SPIRO, S.; HE, Y.; ZHANG, L.; HEEB, S.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P. & DOWN, J. M. “Cell-cell

signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover". *PNAS*, **103** (17): 6712-6717, 2006.

RYAN, R. P. & MAXWELL, D. J. "Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria". *Trends in Microbiology*, **19** (3): 145-152. 2011.

SANSEERA, D.; NIWATANANUM, W.; LIAWRUANGRATH, S.; BARAMEE, A.; KHANTAWA, B.; PYNE, S. T. & LIAWRUANGRATH, B. "Composition of chemical constituents and antibacterial activities and antioxidant activities of the essential oil from leaves and fruits of *Bridelia retusa* (L.) A. Juss". *Journal of Scientific & Industrial Research*, **71**: 733-739, 2012.

SASSERON, G. R. Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia do Instituto Agrônomo – UNICAMP, 2008. Dissertação de mestrado, 71 p.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, **29** (8): 690–695, 2006.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, **28** (6): 494–518, 2005.

SCHALLER, A. & RYAN, C. A. "Systemin - a polypeptide signal in plants". *Bioessays*, **18**: 27-33, 1996.

SEIFERT, R. M. & KING, A. D. "Identification of some volatile constituents of *Aspergillus clavatus*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**: 786-790, 1982.

SHAN, L. "Plants under attack: systematic signals in defence". *Current Opinion in Plant Biology*, **12**: 459-464, 2009.

SHAPIRO, J. A. "Thinking about bacterial populations as multicellular organisms". *Annual Review of Microbiology*, **52**: 81-104, 1998.

SICILIANO, F.; TORRES, P.; SENDÍN, L.; BERMEJO, C.; FILIPPONE, P.; VELLICE, G.; RAMALLO, J.; CASTAGNARO, A.; VOJNOV, A. & MARANO, M. A. "Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

pathogenesis in *Citrus limon*". *Electronic Journal of Biotechnology*, **9** (3): 200-204, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. Porto Alegre, Bookman, 5ª edição, 2002, p.257-258.

SLATER, H.; ALVAREZ-MORALES, A.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J. & DOW, J. M. "A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*". *Molecular Microbiology*, **38** (5): 986-1003, 2000.

SNYDER, L. R. & DOLAN, J. W. "Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run". *Journal Chromatography A*, **721**: 3-14, 1996.

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

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

STUMP, M.J.; BLACK, G.; FOX, A.; FOX, K. F.; TURICK, C. E.; MATTHEWS, M. "Identification of marker proteins for *Bacillus anthracis* using MALDI-TOF MS and ion trap MS/MS after direct extraction or electrophoretic separation". *J. Sep. Sci.* **28** (14): 1642–1647, 2005.

SUVENDRA, K. R.; RAJESHWARI, R. & RAMESH, V. S. "Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryza* e deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase". *Molecular Plant Microb Interaction.*, **13** (4): 394-401, 2000.

TANG, J. L.; LIU, Y. N.; BARBER, C. E.; DOW, J. M.; WOOTTON, J. C. & DANIELS, M. J. "Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*". *Mol Gen Genet.*, **226**: 409–417, 1991.

THOLL, D. , BOLAND, W, HANSEL, A.; LORETO, F.; URSULA, S. R. ROSE, S. R.; SCHNITZLER, J. P. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, **45**: 540–560, 2006.

THOWTHAMPITAK, J.; SHAFFER, B. T.; PRATHUANGWONG, S. & LOPER, J. E. "Role of *rpfF* in Virulence and Exoenzyme Production of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the Causal Agent of Bacterial Pustule of Soybean". *Phytopathology*, **98** (12): 1252-1260, 2008.

VAN DEN DOOL, H. & KRATZ, P. D. J. "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography". *Journal of Chromatography A*, **11**: 463-471, 1963.

VANETTEN, H. D., MATTHEWS, D. E. & MATTHEWS, P. S. "Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications". *Ann. Rev. Phytopathol.*, **27**: 143-164, 1989.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K. & SWINGS, J. "Reclassification of *Xanthomonas*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**: 472-489, 1995.

VINCENTI, M.; GUGLIELMETTI, G.; CASSANI, G.; TONINI, C. "Determination of position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives". *Anal. Chem.*, **59**: 694-699, 1987.

VOJNOV, A. A.; AMARAL, A. M.; DOW, J. W.; CASTAGNARO, A. T. & MARANO, M. R. "Bacteria causing importante diseases of *Citrus* utilize distinct modes of pathogenesis to attack a common host". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**: 467-477, 2010.

WAKAMATSU, K.; MASAKI, T.; ITOH, F.; KONDO, K. & SUDO, K. "Isolation of fatty acid amide as an angiogenic principle from bovine mesentery". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **168** (2): 423-429, 1990.

WANG, G.; DAI, S.; CHEN, M.; WU, H.; XIE, L.; LUO, X. & LI, X. "Two diketopiperazine cyclo (Pro-Phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2". *Chemistry of Natural Compounds.*, **46** (4): 583–585, 2010 (a).

WANG, J-H.; QUAN, C-S; QI, X-H; LI, X. & FAN, S-D. "Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography–mass spectrometry". *Anal Bioanal Chem.*, **396**: 1773–1779, 2010 (b).

WANG, L.-H.; HE, Y.; GAO, Y.; WU, J. E.; DONG, Y.-H.; HE, C.; WANG, S. X.; WENG, L.-X.; XU, J.-L.; TAY, L.; FANG, R. X. & ZHANG, L.-H. "A bacterial cell–cell communication signal with cross-kingdom structural analogues". *Molecular Microbiology*, **51** (3): 903-912, 2004.

WEGERSKI, C. J.; FRANCE, D.; CORNELL-KENNON, S. & CREWS, P. "Using a kinase screen to investigate the constituents of the sponge *Stelletta clavosa* obtained from diverse habitats". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **12** (21), 5631-5637, 2004.

WEISE, T.; KAI, M.; GUMMESSON, A.; TROEGER, A.; REU, S. V.; PIEPENBORN, S.; KOSTERKA, F.; SKLORZ, M.; ZIMMERMANN, R.; FRANCKE, W. & PIECHULLA, B. "Volatile organic compound produced by phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10". *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **8**: 579-596, 2012.

WILSON, I. "Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification". *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3741-3751, 1997.

WORKITKUL, J. L.; MOORE, J. P.; TAYLOR, J. E.; POSSELL, M.; GIBSON, T. D.; HEWITT, C. N. & PAUL, N. D. "Discrimination of plant volatile signatures by an electronic nose: A potential technology for plant pest and disease monitoring". *Environmental Science & Technology*, **42**: 8433-8439, 2008.

YAGINUMA, S.; ASAHI, T.; TAKADA, M.; HAYASHI, M. & MIZUNO, K. *Japanese Patent 1181793-A*, 1989.

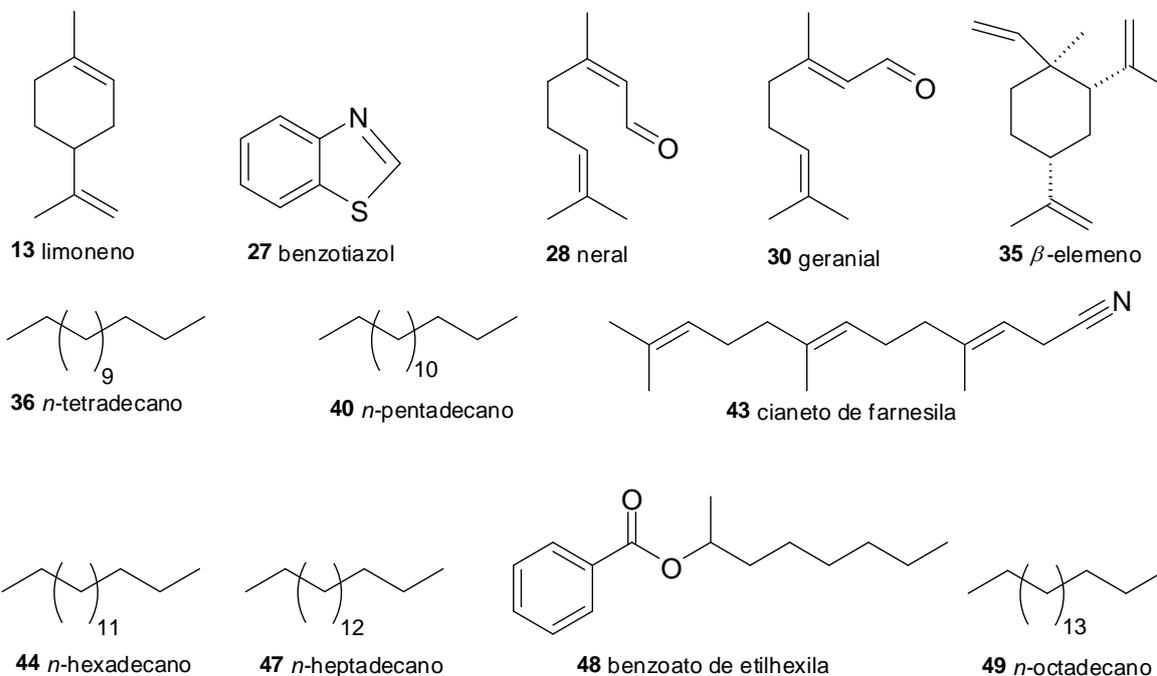
YOUNG, P. E.; MADISON, V.; BLOUT, E. R. J. "Cyclic Peptides. 15. Lanthanide-Assisted ^{13}C and ^1H NMR Analysis of Preferred Side-Chain Rotamers in Proline-Containing Cyclic Dipeptides". *Am. Chem. Soc.*, **98**: 5365, 1976.

ZHANG, A. & HARTUNG, J. S. "Phenylacetaldehyde O-Methyloxime: A volatile compound produced by grapefruit leaves infected with the citrus canker pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 5134-5137, 2005.

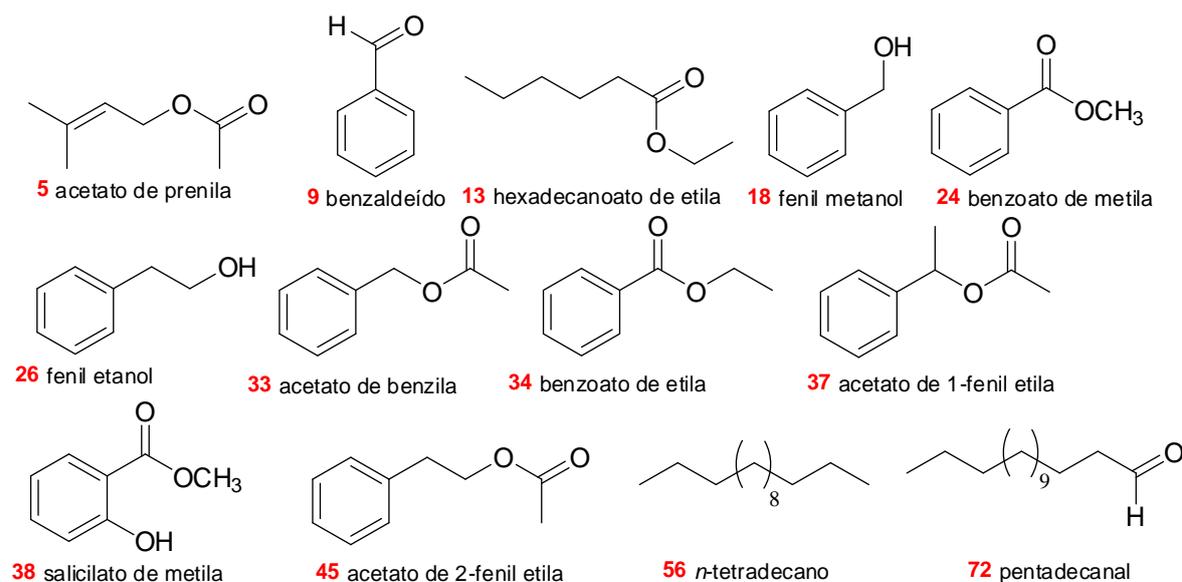
ZHEN, Y. *Thea: Bioactivity and therapeutic potential*. New York, Taylor & Francis, 2005. 267p.

8 - Apêndices

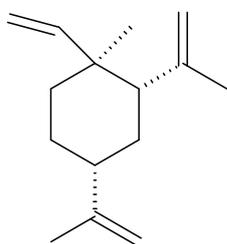
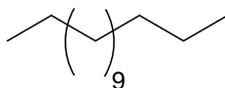
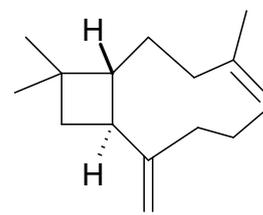
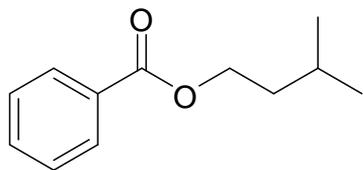
A1 - Estruturas químicas dos principais compostos voláteis identificados em *C. sinensis* por HS-SPME/GC-MS (identificações na TABELA 4.1)



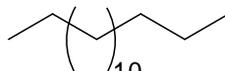
A2 - Estruturas químicas dos principais compostos voláteis identificados em *C. sinensis* por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ no preparo de amostra (Identificações na TABELA 4.2)



A3 - Estruturas químicas dos principais compostos voláteis identificados em *C. sinensis* por “headspace” dinâmico associado à GC-MS (Identificações na TABELA 4.3).

16 β -elemeno17 *n*-tetradecano18 (*E*)-cariofileno

19 benzoato de isoamila

22 *n*-pentadecano24 *n*-hexadecano

A4 - Espectros de massas de alguns compostos voláteis identificados em *C. sinensis* por HS-SPME/GC-MS (Identificações na TABELA 4.1).

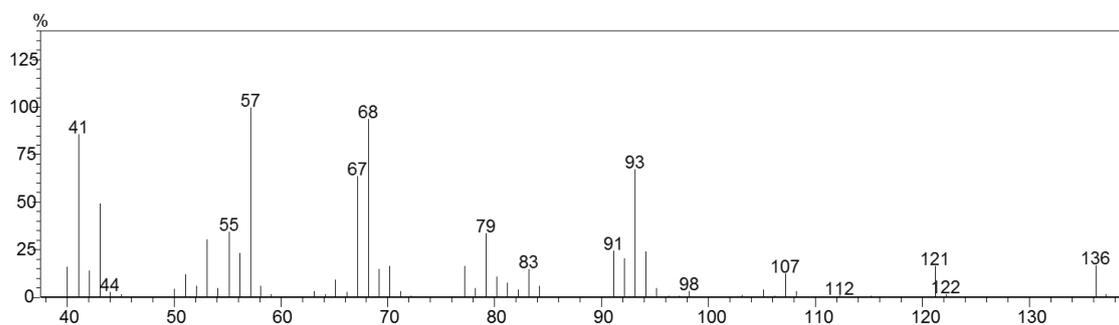


FIGURA A4.1 - Limoneno

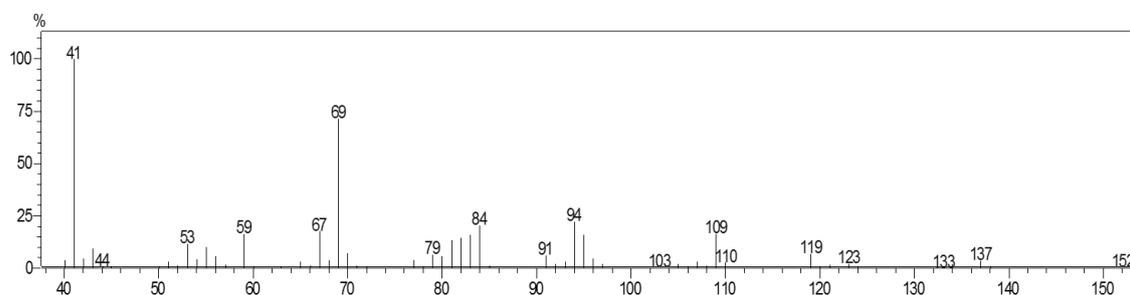


FIGURA A4.2 - Neral

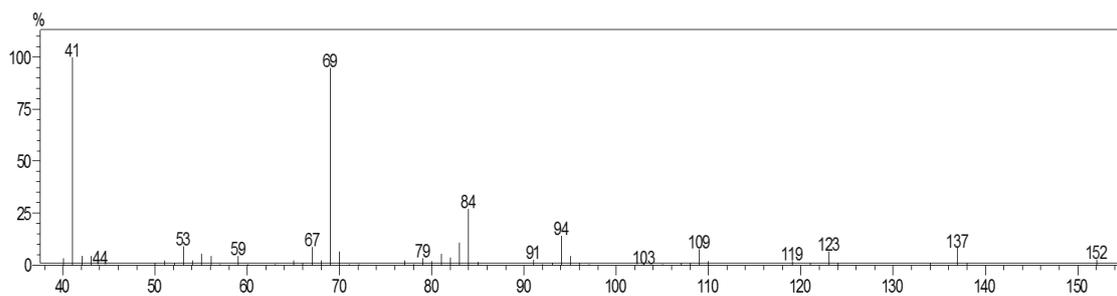


FIGURA A4.3 - Geranial

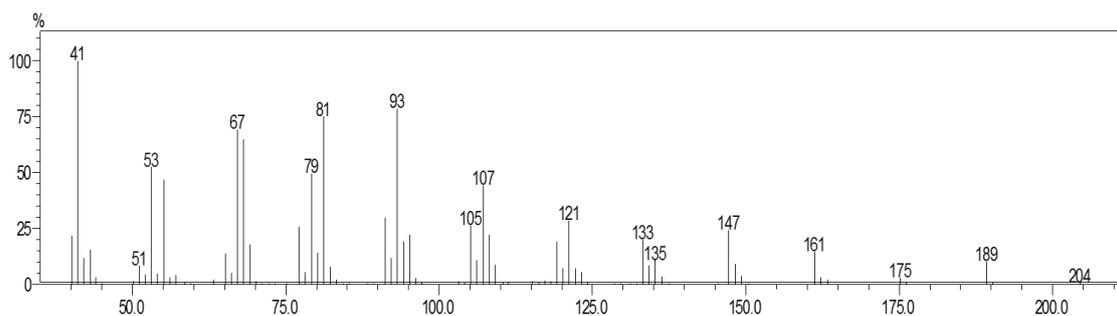
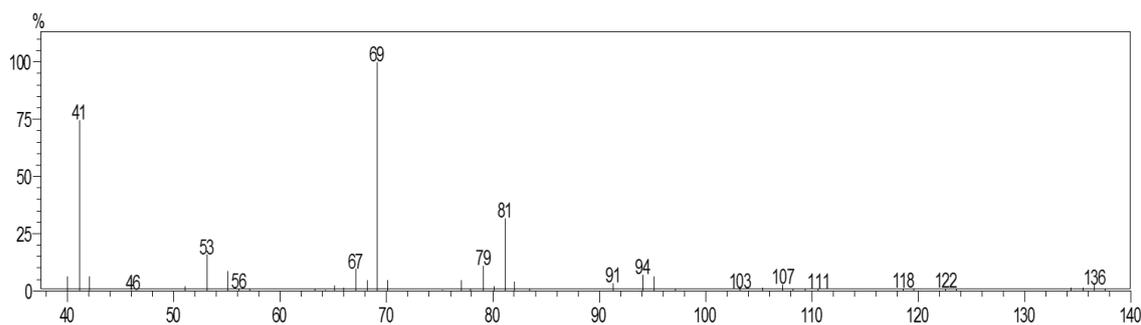
FIGURA A4.4 - β -elemeno

FIGURA A4.5 - Cianeto de farnesila

A5 - Espectros de massas de alguns compostos voláteis identificados em *C. sinensis* por HS-SPME/GC-MS utilizando N₂ no preparo de amostra (Identificações na TABELA 4.2).

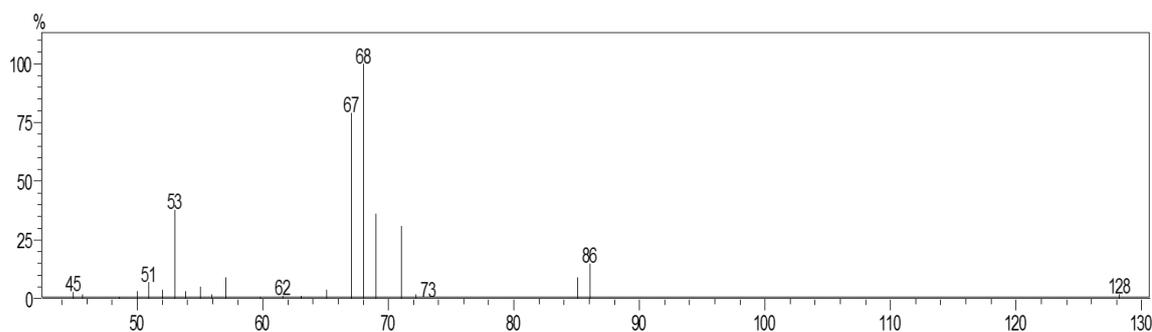


FIGURA A5.1 - Acetato de prenila

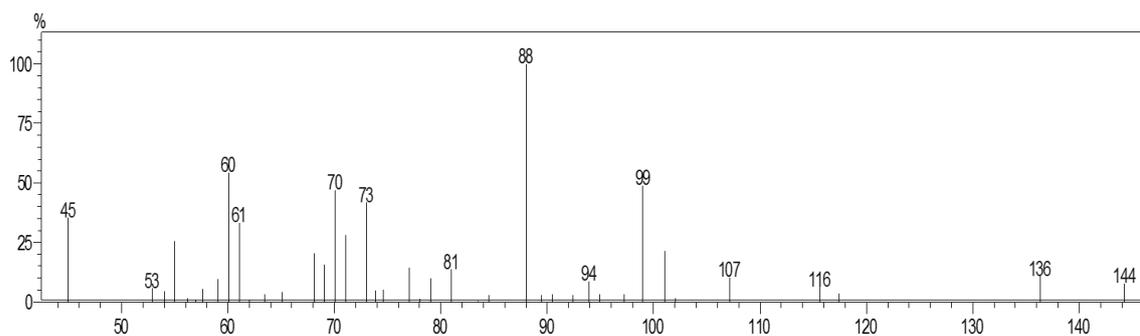


FIGURA A5.2 - Hexanoato de etila

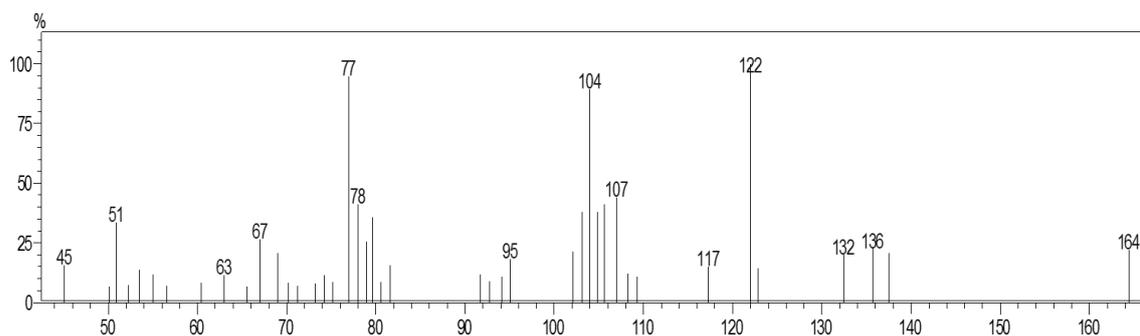


FIGURA A5.3 - Acetato de 1-fenil etila

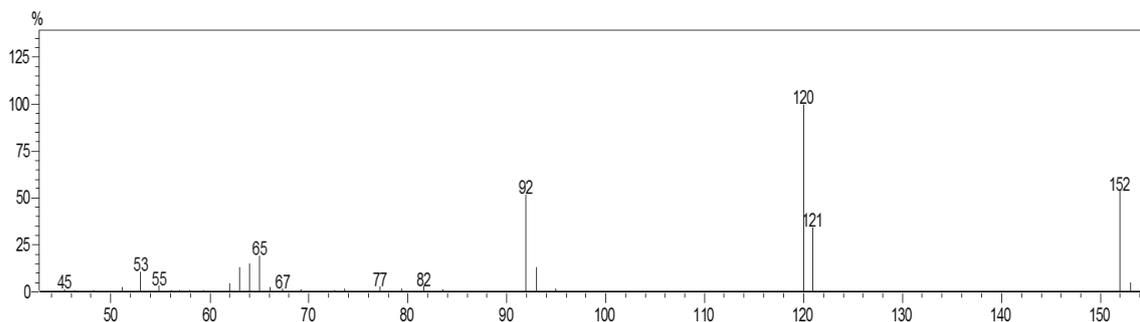


FIGURA A5.4 - Salicilato de metila

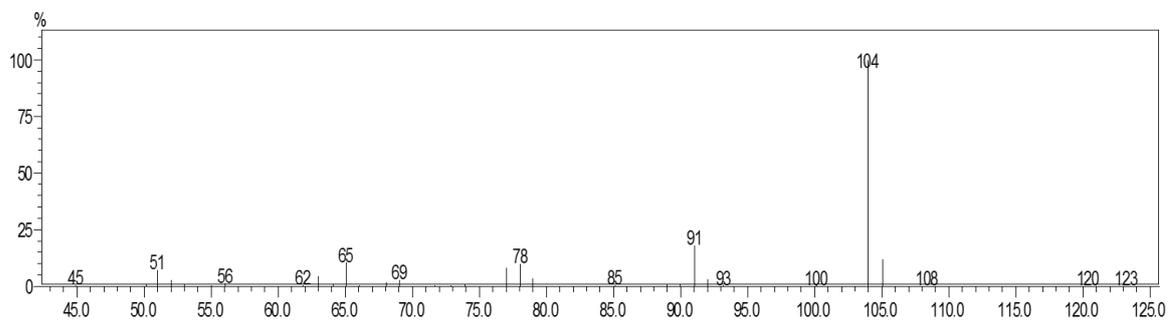


FIGURA A5.5 - Acetato de 2-feniletila