

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



**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *CITRUS*:  
RESISTÊNCIA A *XYLELLA FASTIDIOSA* E  
INTERAÇÃO COM *ONCOMETOPIA FACIALIS***

**PATRÍCIA VERARDI ABDELNUR\***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química como parte dos requisitos à obtenção do Título de Mestre em Ciências, na área de Concentração Química Orgânica.

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

**\*Bolsista FAPESP**

**São Carlos – SP**

**2006**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar

A135ef

Abdelnur, Patrícia Verardi.

Estudo fitoquímico de *Citrus*: resistência a *Xylella fastidiosa* e interação com *Oncometopia facialis* / Patrícia Verardi Abdelnur. -- São Carlos : UFSCar, 2006.  
275 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Produtos naturais. 2. Ensaio biológico. 3. Fitoquímica. 4. Clorose Variegadas Citros. 5. Limão cravo. I. Título.

CDD: 547.3 (20<sup>a</sup>)

***AOS MEUS PAIS POR TUDO! SEMPRE PARTICIPANDO DA MINHA VIDA:  
INCENTIVANDO, TORCENDO, ACREDITANDO E NUNCA MEDINDO  
ESFORÇOS PARA A REALIZAÇÃO DOS MEUS SONHOS.  
A MINHAS IRMÃS QUE ESTIVERAM AO MEU LADO  
EM TODOS OS MOMENTOS.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, por todos ensinamentos transmitidos, pela orientação, confiança, amizade e excelente convivência;

Aos Profs. Drs. João B. Fernandes, Paulo C. Vieira, Edson R. Filho pela contribuição dada a este trabalho;

Aos Profs. Drs. Giba, Arlene e Quézia, pela disponibilidade de seus laboratórios e colaboração na realização deste trabalho;

À Dra. Alessandra Alves de Souza pela forte contribuição e ensinamentos transmitidos nos ensaios biológicos, pela ótima convivência e amizade;

À Carolina Munari Rodrigues por toda contribuição nos ensaios e pela amizade;

Aos Drs. Marcos A. Machado e Sérgio A. Carvalho pela prestatividade e disponibilidade do laboratório e materiais necessários para a realização do trabalho;

Ao Dr. Pedro T. Yamamoto e Juliana Coelho pela receptibilidade e disponibilidade de materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho;

À doutoranda Gláucia pela essencial ajuda nas análises quimiométricas, e por toda sua prestatividade;

À todos os colegas do PN, especialmente aos amigos Alan, Cebolinha, Djalma, Gi, Karine, Márcio, Moacir, Paty Marinho, Paty Braga, Paty Loira, Simone, Sebastião, Thiago e Tati;

À todos os colegas e amigos dos laboratórios de LSPN, CLAE, LERCI, Massas.

À Sheylla Susan pela imensa amizade, carinho, prestatividade e colaboração na realização deste trabalho;

A minhas amigas Kiria, Karina, Rafaela e Erida por tornar minha vida em São Carlos extremamente agradável, estando presente em todos os momentos, felizes ou tristes, e pela forte amizade;

Aos meus pais, Elisa e Reinaldo, que estiveram sempre do meu lado, pela educação, carinho, apoio e luta para que meus objetivos fossem alcançados;

A minhas irmãs, Priscila e Elisinha, por estarem sempre presente em minha vida;

A toda minha Família que sempre esteve unida e torcendo por mim em todos os momentos;

Ao Elder por estar ao meu lado sempre incentivando e apoiando em cada decisão por todos estes anos;

À FAPESP pela concessão da bolsa;

À Deus por estar ao lado, sempre me protegendo;

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

## ABREVIATURA E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
BOD	Biological Oxygen Demand
CAR/PDMS	Carboxen Polimetilsiloxano
CC	Cromatografia em Camada
CCL	Caule do <i>C. limonia</i>
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-R	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
CLS	<i>C. limonia</i> sem sintomas de CVC
COSY	Correlation Spectroscopy
C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> O	Acetona Deuterada
CRS	<i>C. reticulata</i> sem sintomas de CVC
CSC	<i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> com sintomas de CVC
CSS	<i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> sem sintomas de CVC
CVC	Clorose Variegada dos Citros
CW/DVB	Carbowax Divinilbenzeno
d	Dubleto
dd	Duplo Dubleto
DCM	Diclorometano
DI	Diâmetro da Coluna
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ES-	Electrospray no Modo Negativo
FCL	Folha do <i>C. limonia</i>
Fundecitrus	Fundo de Defesa da Citricultura
GC-EAD	Cromatografia Gasosa Acoplada à Detecção Eletroantenográfica
h	Altura da Coluna
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HS	HeadSpace
Hz	Hertz
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IR	Índice de Retenção de Kovats
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Mega-Hertz
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
<i>m/z</i>	Massa sobre Carga
P	Porcentagem Relativa
PDMS/DVB	Polimetilsiloxano Divinilbenzeno
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
SPME	Solid Phase Micro-Extraction
<i>t</i>	Triplete
t	Tempo
T	Temperatura
R1C	Raiz Terminal do <i>C. limonia</i>
R2C	Raiz do <i>C. limonia</i>
R1E	Raiz Terminal do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>
R2E	Raiz do enxerto de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Xf	<i>Xylella fastidiosa</i>
δ	Deslocamento Químico em Partes por Milhão

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Divisão das plantas <i>C. limonia</i> e <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> , extratos obtidos e suas respectivas massas.....	36
TABELA 3.2. Dados de RMN $H^1$ ( $CDCl_3$ 200 MHz) e $C^{13}$ ( $CDCl_3$ 200 MHz) da cumarina C1 em comparação com os dados da literatura.....	60
TABELA 3.3. Dados de RMN $H^1$ ( $CDCl_3$ 200 MHz) e $C^{13}$ ( $CDCl_3$ 200 MHz) da cumarina C2 em comparação com os dados da literatura.....	64
TABELA 3.4. Dados de RMN $H^1$ ( $CDCl_3$ 200 MHz) da cumarina C3 em comparação com os dados da literatura.....	68
TABELA 3.5. Dados de RMN $H^1$ das cumarinas C4 e C5 em comparação com os dados das cumarinas A, C e D.....	71
TABELA 3.6. Dados de RMN $^{13}C$ da estrutura proposta C e das cumarinas isoladas C4 e C5.....	72
TABELA 3.7. Dados do espectro de RMN $^1H$ para as estruturas D, G e H obtidos da literatura.....	74
TABELA 3.8. Dados do espectro de RMN $^{13}C$ para as estruturas D, G e H obtidos da literatura.....	74
TABELA 3.9. Dados de RMN $H^1$ (400 MHz) das cumarinas C4 e C5.....	76
TABELA 3.10. Dados do espectro de RMN $^1H$ para o composto C5, e para as estruturas I e J obtidos pela literatura.....	78
TABELA 3.11. Dados do espectro de RMN $^{13}C$ para o composto C5, e para as estruturas I e J obtidos pela literatura.....	78
TABELA 3.12. Dados de RMN $H^1$ e RMN $C^{13}$ ( $CDCl_3$ 400 MHz) da cumarina C6.....	91
TABELA 3.13. Dados de RMN $H^1$ (400 MHz) e RMN $C^{13}$ (400 MHz) da cumarina C8 em comparação com os dados da literatura.....	104
TABELA 3.14. Dados de RMN $H^1$ (200 MHz) da cumarina C9 em comparação com os dados da literatura.....	111
TABELA 3.15. Valores de RMN $^{13}C$ (400 MHz) obtidos pelas correlações apresentadas no espectro de HMBC e no HSQC.....	114
TABELA 3.16. Dados de RMN $H^1$ e RMN $C^{13}$ ( $CDCl_3$ 400 MHz) da cumarina C10.....	120

TABELA 3.17. Dados de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ 400 MHz) da cumarina C3.....	123
TABELA 3.18. Dados de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C11 em comparação com os dados da literatura.....	129
TABELA 3.19. Dados de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C11 em comparação com os dados da literatura.....	130
TABELA 3.20. Dados de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) obtidos experimentalmente e pela literatura do flavonóide (F1).....	135
TABELA 3.21. Correlações obtidas do HSQC para o flavonóide F1.....	136
TABELA 3.22. Correlações obtidas do HMQC para o flavonóide F1.....	137
TABELA 3.23. Dados obtidos para os carbonos da molécula a partir das correlações obtidas por HMBC e HSQC e comparadas com a literatura.....	138
TABELA 3.24. Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) do flavanóide F2 comparados com os dados da literatura.....	142
TABELA 3.25. Correlações obtidas pelo espectro de NOESY do flavanóide F2.....	143
TABELA 3.26. Dados obtidos de RMN $^{13}\text{C}$ (200 MHz) da mistura de Sitosterol, Estigmasterol e Campesterol em comparação com a literatura.....	151
TABELA 4.1. Reagentes e suas concentrações necessárias para preparar um determinado volume do meio PW.....	156
TABELA 4.2. Volumes retirados da solução estoque e a correspondente concentração final.....	159
TABELA 4.3. Colônias observadas nas diferentes concentrações de substâncias ensaiadas contra <i>Xylella fastidiosa</i> na Fase Estacionária.....	165
TABELA 4.4. Colônias observadas com a <i>Xylella fastidiosa</i> na Fase Exponencial e no início da Fase Estacionária.....	168
TABELA 4.5. Colônias observadas nas diferentes concentrações de substâncias ensaiadas contra <i>Xylella fastidiosa</i> na Fase Exponencial.....	169
TABELA 4.6. MICs das substâncias ensaiadas frente a <i>Xylella fastidiosa</i> .....	172
TABELA 5.1. Condições de condicionamento para as fibras utilizadas.....	178
TABELA 5.2. Número de carbonos de cada hidrocarboneto e seus respectivos tempos de retenção obtidos a partir da injeção por seringa e por fibra (PDMS/DVB)..	184

TABELA 5.3. Compostos voláteis identificados no <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> sem ter sido submetido às cigarrinhas.....	188
TABELA 5.4. Compostos voláteis identificados na planta 0 h após a inserção das cigarrinhas.....	190
TABELA 5.5. Compostos voláteis identificados na planta 24 h após a inserção das cigarrinhas.....	193
TABELA 5.6. Compostos voláteis identificados na planta 48 h após a inserção das cigarrinhas.....	195
TABELA 5.7. Compostos voláteis identificados na planta 0 h após a remoção das cigarrinhas.....	197
TABELA 5.8. Compostos voláteis identificados na planta 24 h após a remoção das cigarrinhas.....	198
TABELA 5.9. Compostos voláteis identificados na planta 48 h após a remoção das cigarrinhas.....	200
TABELA 5.10. Porcentagens das componentes principais do sistema (voláteis extraídos de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> ) sem pré-processamento.....	203
TABELA 5.11. Porcentagens das componentes principais do sistema (voláteis extraídos de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> ) com pré-processamento.....	208
TABELA 5.12. Áreas dos picos dos compostos importantes na separação dos grupos 1, 2 e 3, observados na análise quimiométrica.....	212
TABELA 5.13. Porcentagens relativas dos picos dos compostos importantes na separação dos grupos (1, 2 e 3) observados na análise quimiométrica.....	213
TABELA 5.14. Compostos identificados no óleo essencial das folhas de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> sem ter sido submetido às cigarrinhas.....	220
TABELA 5.15. Compostos identificados no óleo essencial das folhas de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> após a remoção das cigarrinhas.....	222
TABELA 5.16. Porcentagens das componentes principais do sistema (óleos essenciais extraídos de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> ) com pré-processamento.....	224
TABELA 5.17. Extratos analisados, e suas respectivas áreas dos picos e tempos de retenção.....	238

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Laranja Pêra (copa) enxertada sobre Limão Cravo (porta-enxerto).....	3
FIGURA 1.2. Frutos sadios ao lado de frutos de tamanho reduzido devido à CVC.....	10
FIGURA 1.3. Folhas com manchas amareladas, características de CVC.....	12
FIGURA 1.4. Plantas com sintomas da CVC.....	12
FIGURA 1.5. Vasos do xilema obstruído por células e Células de <i>X. fastidiosa</i> .....	13
FIGURA 1.6. Imagens de <i>X. fastidiosa</i> por microscopia eletrônica.....	16
FIGURA 1.7. Cigarrinhas transmissoras de CVC.....	17
FIGURA 1.8. Zoneamento citrícola considerado no levantamento de CVC em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro.....	19
FIGURA 1.9. Muda Sadia - A base para um pomar sem CVC.....	24
FIGURA 1.10. Poda de ramos doentes em plantas com mais de 2 anos.....	24
FIGURA 1.11. Armadilhas utilizadas na captura de cigarrinhas vetores de CVC: Armadilha adesiva amarela, armadilha com cigarrinhas capturadas e puçá.....	25
FIGURA 1.12. Interação Citrus/ <i>X. fastidiosa</i> /Cigarrinhas.....	27
FIGURA 3.1. Metodologia utilizada no Estudo Fitoquímico: extração, purificação e identificação das substâncias isoladas.....	55
FIGURA 3.2. Substâncias isoladas da raiz terminal de <i>C. limonia</i> .....	58
FIGURA 3.3. Estrutura da cumarina Xantiletina.....	59
FIGURA 3.4. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1.....	61
FIGURA 3.5. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1.....	61
FIGURA 3.6. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1.....	62
FIGURA 3.7. Ampliação do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1.....	62
FIGURA 3.8. Estrutura da cumarina Seselina.....	63
FIGURA 3.9. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C2.....	65
FIGURA 3.10. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C2.....	65
FIGURA 3.11. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C2.....	66
FIGURA 3.12. Ampliação do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C2.....	66

FIGURA 3.13. Estrutura da cumarina Xantoxiletina.....	67
FIGURA 3.14. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C3.....	68
FIGURA 3.15. Estrutura da trans-Kelactona.....	75
FIGURA 3.16. Estrutura da trans-Decursidinol.....	79
FIGURA 3.17. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C4.....	81
FIGURA 3.18. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C4.....	82
FIGURA 3.19. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C4.....	82
FIGURA 3.20. Ampliação do Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C4.....	83
FIGURA 3.21. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C4.....	83
FIGURA 3.22. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C5.....	84
FIGURA 3.23. Ampliação do Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C5.....	84
FIGURA 3.24. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C5.....	85
FIGURA 3.25. Ampliação A do Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C5.....	85
FIGURA 3.26. Ampliação B do Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C5.....	86
FIGURA 3.27. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 200 MHz) da cumarina C5.....	86
FIGURA 3.28. Espectro de HSQC ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C5.....	87
FIGURA 3.29. Espectro de HMBC ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C5.....	87
FIGURA 3.30. Espectro de COSY ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C5.....	88
FIGURA 3.31. Deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ da cumarina C6.....	90
FIGURA 3.32. Estrutura da Escopoletina.....	91
FIGURA 3.33. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.....	92
FIGURA 3.34. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.....	92
FIGURA 3.35. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.....	93
FIGURA 3.36. Espectro de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.....	93
FIGURA 3.37. Espectro de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.....	94

FIGURA 3.38. Espectro de COSY (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da cumarina C6.....	94
FIGURA 3.39. Espectro de NOESY (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da cumarina C6.....	95
FIGURA 3.40. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da cumarina C6.....	96
FIGURA 3.41. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz) da cumarina C7.....	97
FIGURA 3.42. Espectro de Massas (ES-) dos íons de <i>m/z</i> 191,3 (M-H) da fração A...	98
FIGURA 3.43. Espectro de Massas (ES-) dos íons de <i>m/z</i> 191,3 (M-H) da fração B...	98
FIGURA 3.44. Espectro de Massas (ES-) dos íons de <i>m/z</i> 191,3 (M-H) da fração C...	99
FIGURA 3.45. Estrutura da Isoescopoletina.....	102
FIGURA 3.46. Deslocamentos químicos dos carbonos da cumarina C8.....	106
FIGURA 3.47. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C8.....	107
FIGURA 3.48. Ampliação A do espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C8.....	107
FIGURA 3.49. Ampliação B do espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C8.....	108
FIGURA 3.50. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C8.....	108
FIGURA 3.51. Espectro de HSQC (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C8.....	109
FIGURA 3.52. Espectro de HMBC (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C8.....	109
FIGURA 3.53. Espectro de NOESY (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C8.....	110
FIGURA 3.54. Estrutura da Demetilsuberosina.....	114
FIGURA 3.55. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 200 MHz) da cumarina C9.....	115
FIGURA 3.56. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 200 MHz) da cumarina C9.....	115
FIGURA 3.57. Espectro de HSQC (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C9.....	116
FIGURA 3.58. Espectro de HMBC (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C9.....	116
FIGURA 3.59. Espectro de COSY (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 400 MHz) da cumarina C9.....	117
FIGURA 3.60. Estrutura da cumarina Clausarina.....	121
FIGURA 3.61. Estrutura da cumarina Xantoxiletina.....	123
FIGURA 3.62. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.....	124
FIGURA 3.63. Ampliação A do espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.....	124

FIGURA 3.64. Ampliação B do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.....	125
FIGURA 3.65. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.....	125
FIGURA 3.66. Espectro de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.....	126
FIGURA 3.67. Espectro de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.....	126
FIGURA 3.68. Espectro de COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.....	127
FIGURA 3.69. Estrutura proposta para a cumarina C11.....	128
FIGURA 3.70. Estrutura da Cumarina C11 identificada.....	131
FIGURA 3.71. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.....	131
FIGURA 3.72. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.....	132
FIGURA 3.73. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.....	132
FIGURA 3.74. Espectro de HSQC ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.....	133
FIGURA 3.75. Espectro de HMBC ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.....	133
FIGURA 3.76. Espectro de COSY ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.....	134
FIGURA 3.77. Correlações observadas pelo HMBC para o flavonóide F1.....	138
FIGURA 3.78. Estrutura da flavona isolada (F1) e seus respectivos valores de RMN $^{13}\text{C}$ comparados com a literatura.....	139
FIGURA 3.79. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) do flavonóide F1.....	139
FIGURA 3.80. Espectro de HSQC ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) do flavonóide F1.....	140
FIGURA 3.81. Espectro de HMBC ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) do flavonóide F1.....	140
FIGURA 3.82. Correlações obtidas pelo NOESY do flavanóide F2.....	143
FIGURA 3.83. Correlações obtidas pelo HMBC que determina a estrutura do flavanóide F2.....	144
FIGURA 3.84. Correlações obtidas pelo HMBC do flavanóide F2.....	145
FIGURA 3.85. Estrutura da Lupinifolina.....	145
FIGURA 3.86. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do flavonóide F2.....	147
FIGURA 3.87. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do flavonóide F2.....	147
FIGURA 3.88. Espectro de NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do flavonóide F2.....	148
FIGURA 3.89. Espectro de HMQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do flavonóide F2.....	148
FIGURA 3.90. Espectro de massas do flavonóide F2.....	149

FIGURA 3.91. Cromatograma da mistura dos três esteróides (E1, E2 e E3).....	152
FIGURA 3.92. Espectro de Massas do esteróide E1.....	152
FIGURA 3.93. Espectro de Massas do esteróide E2.....	152
FIGURA 3.94. Espectro de Massas do esteróide E3.....	153
FIGURA 3.95. Estruturas químicas do Sitosterol, Estigmasterol e Campesterol.....	153
FIGURA 3.96. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz) dos esteróides E1, E2 e E3...	154
FIGURA 3.97. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz) dos esteróides E1, E2 e E3..	154
FIGURA 4.1. Placa com a solução de <i>Xylella fastidiosa</i> e as substâncias ensaiadas nas diferentes concentrações.....	160
FIGURA 4.2. a- Placas de Petri com as substâncias ensaiadas (Xantiletina, Seselina, Limonia e Flavona 1, nas concentrações de 1000 µg/mL) e o controle.....	161
FIGURA 4.2. b- Placas de Petri com a Xantiletina nas concentrações 1000, 500 e 300 µg/mL, respectivamente.....	161
FIGURA 4.3. Fluxograma da metodologia empregada nos ensaios bactericida contra <i>X. fastidiosa</i> .....	162
FIGURA 4.4. Crescimento de <i>X. fastidiosa</i> em diferentes meios líquidos: A) Medida da concentração total de proteína, B) Medida por Densidade ótica (OD) a A600 nm..	164
FIGURA 4.5. MIC da 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (Flavona 1), Limonina, Xantiletina e Seselina contra a <i>X. fastidiosa</i> no início da Fase Estacionária.....	166
FIGURA 4.6. Concentrações utilizadas, em mg/mL, no experimento para comparação das fases de crescimento da <i>X. fastidiosa</i> .....	168
FIGURA 4.7. MIC do Ácido Anacárdico, Rauanina, 3'-(1',1'-dimetilalil)-isoescopoletina (C1), metiléter-graveliferona (C2), Hesperidina, Odoratól, Catequina, 7,8,3',4'-tetrametóxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano) flavona (Flavona 2), Gedunina, Odoratóna, Azadirachtina, ensaiadas contra a <i>X. fastidiosa</i> na Fase Exponencial.....	171
FIGURA 4.8. Análise da expressão e purificação da proteína Xylellaina em <i>E. coli</i> : Purificação da Xylellaina por cromatografia de afinidade em resina de níquel.....	173
FIGURA 4.9. Algumas das substâncias ensaiadas frente a enzima Xylellaina.....	174

FIGURA 5.1. Cromatogramas das fibras PDMS/DVB, CW/DVB e CAR/PDMS quando expostas durante sete horas a plantas enxertadas <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .....	179
FIGURA 5.2. Cromatogramas da fibra PDMS/DVB quando expostas a plantas enxertadas <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> em diferentes tempos.....	182
FIGURA 5.3. Cromatograma dos hidrocarbonetos injetados diretamente por seringa.	183
FIGURA 5.4. Cromatograma dos hidrocarbonetos injetados após serem adsorvidos pela fibra PDMS/DVB.....	184
FIGURA 5.5a. Sistema utilizado para extração de voláteis: cuba e fibra.....	185
FIGURA 5.5b. CG-EM utilizado para análise dos voláteis extraídos.....	185
FIGURA 5.6. Sistema utilizado para extração de óleos essenciais por arraste a vapor: Aparelho tipo Clevenger modificado.....	186
FIGURA 5.7. Espectro de Massas teórico do 2-etil-1-hexanol.....	216
FIGURA 5.8. Espectro de Massas experimental do 2-etil-1-hexanol.....	217
FIGURA 5.9. Ampliação do Espectro de Massas experimental do 2-etil-1-hexanol.....	217
FIGURA 5.10. Espectro de Massas experimental do composto com IR = 1907.....	218
FIGURA 5.11. Espectro de Massas experimental do composto com IR = 1859.....	219
FIGURA 5.12. Estrutura da Hesperidina.....	232
FIGURA 5.13. Cromatograma obtido a partir da injeção do padrão de hesperidina 200 µg/mL.....	234
FIGURA 5.14. Cromatograma obtido a partir da injeção do padrão de hesperidina 50 µg/mL.....	234
FIGURA 5.15. Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CSC (A).....	235
FIGURA 5.16. Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CSC (B).....	235
FIGURA 5.17. Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CSS (A).....	236
FIGURA 5.18. Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CSS (B).....	236
FIGURA 5.19. Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CRS (A).....	236
FIGURA 5.20. Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CRS (B).....	237
FIGURA 5.21. Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CLS (A).....	237
FIGURA 5.22. Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CLS (B).....	237

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.1. Incidência de CVC em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro.....	19
GRÁFICO 1.2. Incidência de CVC por zona em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro.....	20
GRÁFICO 1.3. Incidência de CVC por idade em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro.....	21
GRÁFICO 1.4. Comparação da incidência de CVC por idade no período de 1996 - 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro.....	21
GRÁFICO 1.5. Comparação da incidência de CVC apresentando os diferentes níveis de sintomas no período de 1996-2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro.....	22
GRÁFICO 1.6. Comparação da incidência de CVC no período de 1996-2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro.....	22
GRÁFICO 5.1. Gráfico de <i>scores</i> de todas as amostras dos voláteis de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC2, 97,88 e 1,09 %, respectivamente).....	203
GRÁFICO 5.2. Gráfico de <i>loadings</i> de todas as amostras dos voláteis <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC2, 97,88 e 1,09 %, respectivamente).....	204
GRÁFICO 5.3. Gráfico de <i>scores</i> de todas amostras dos voláteis <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC3, 97,88 e 0,51 %, respectivamente).....	205
GRÁFICO 5.4. Gráfico de <i>loadings</i> de todas amostras dos voláteis <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC3, 97,88 e 0,51 %, respectivamente).....	206
GRÁFICO 5.5. Gráfico do poder de modelagem de todas as variáveis dos voláteis <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> , obtido para a análise de PCA sem nenhum pré-processamento.....	207
GRÁFICO 5.6. Gráfico de HCA de todas amostras com índice de similaridade 0,385.	207
GRÁFICO 5.7. Gráfico de <i>scores</i> de todas amostras dos voláteis <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC2, 38,18 e 21,65 %, respectivamente).....	209
GRÁFICO 5.8. Gráfico de <i>loadings</i> de todas amostras dos voláteis <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC2, 38,18 e 21,65 %, respectivamente).....	209

GRÁFICO 5.9. Gráfico de <i>scores</i> de todas amostras dos voláteis <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC3, 38,18 e 8,70 %, respectivamente).....	210
GRÁFICO 5.10. Gráfico de <i>loadings</i> de todas amostras dos voláteis (PC1 x PC3, 38,18 e 8,70 %, respectivamente).....	211
GRÁFICO 5.11. Gráfico do poder de modelagem de todas as variáveis dos voláteis, obtidos a partir do pré-processamento autoescalado.....	211
GRÁFICO 5.12. Gráfico de <i>scores</i> de todas amostras dos óleos essenciais de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC3, 33,84 e 19,31 %, respectivamente).....	225
GRÁFICO 5.13. Gráfico de <i>loadings</i> de todas amostras dos óleos essenciais de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC3, 33,84 e 19,31 %, respectivamente).....	226
GRÁFICO 5.14. Gráfico de <i>scores</i> de todas amostras dos óleos essenciais de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC2, 33,84 e 28,74 %, respectivamente).....	227
GRÁFICO 5.15. Gráfico de <i>loadings</i> de todas amostras dos óleos essenciais de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> (PC1 x PC2, 33,84 e 28,74 %, respectivamente).....	228
GRÁFICO 5.16. Gráfico do poder de modelagem de todas as variáveis dos óleos essenciais de <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> .....	228
GRÁFICO 5.17. Gráfico de HCA de todas amostras com índice de similaridade 0,385.....	229

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1. Preparação de Extratos.....	37
ESQUEMA 3.2. Fracionamento do extrato hexânico da raiz terminal de <i>C.limonia</i> até a obtenção das substâncias.....	38
ESQUEMA 3.3. Fracionamento de todo o extrato diclorometânico-hexânico.....	50
ESQUEMA 3.4. Fracionamento do extrato diclorometânico-hexânico até a obtenção das substâncias isoladas.....	51
ESQUEMA 3.5. Fracionamento do extrato metanólico até a obtenção das substâncias isoladas.....	54
ESQUEMA 3.6. Proposta de fragmentação das cumarinas 6-metoxi-7-hidroxicumarina (C6) e 6-hidroxi-7-metoxicumarina (C7).....	101
ESQUEMA 5.1. Etapas desenvolvidas no experimento interação planta-cigarrinha....	177
ESQUEMA 5.2. Proposta de fragmentação do 2-etil-1-hexanol.....	216
ESQUEMA 5.3. Proposta de fragmentação do composto com IR = 1907.....	218
ESQUEMA 5.4. Proposta de fragmentação do composto com IR = 1859.....	219
ESQUEMA 5.5. Fluxograma da metodologia empregada para análise comparativa do teor de Hesperidina em diferentes espécies de <i>Citrus</i> .....	233

## RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *CITRUS*, SUA RESISTÊNCIA A *XYLELLA FASTIDIOSA* E SUA INTERAÇÃO COM *ONCOMETOPIA FACIALIS* - Neste trabalho estão descritas dezesseis substâncias isoladas de *C. limonia*: xantiletina, seselina, xantoxiletina, trans-kelactona, trans-decursidinol, junosmarina, escopoletina, isoescopoletina, demetilsuberosina, xantoarnol, clausarina, limonianina, 5,4'-diidróxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8) flavanona,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol; sendo uma destacada, a 5,4'-diidróxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8) flavanona, por ser inédita na literatura; e duas, a trans-kelactona e trans-decursidinol, não isoladas anteriormente em plantas da família Rutaceae, apenas na família Apiaceae. Uma comparação entre os constituintes químicos isolados da parte superior e inferior da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* e do *C. limonia* não enxertado foi realizada, indicando que a planta enxertada possui um processo de translocação metabólita. São relatadas as Concentrações Mínimas Inibitórias de diversas substâncias, todas isoladas de plantas da família Rutaceae, contra a bactéria causal da Clorose Variegada dos Citros, *Xylella fastidiosa*. As classes promissoras foram as piranocumarinas e flavanonas, sendo a Xantiletina e a Catequina, com MIC igual a 1,0 mg/mL. Foi realizado um estudo de interação planta-inseto, o qual indicou que a planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* apresenta uma alteração na composição química dos seus voláteis e em seus óleos essenciais quando em contato com as cigarrinhas *Oncometopia facialis*, pertencentes a família Cicadellidae, as quais são transmissoras de *Xylella fastidiosa*, correspondendo a uma resposta da planta ao ataque. A modificação dos constituintes químicos e suas porcentagens foi mais perceptível nos voláteis do que nos óleos essenciais das plantas. A planta enxertada também sofreu uma alteração em um metabólito secundário, a Hesperidina, quando foi feita a análise do teor desta substância em diferentes espécies de *Citrus*, *C. limonia* sem CVC, *C. reticulata* sem CVC, *C. sinensis* sobre *C. limonia* com e sem CVC. O *C. limonia* foi a espécie que apresentou menor quantidade de Hesperidina e *C. sinensis*

sobre *C. limonia* foi o que apresentou o maior teor. O estudo comparativo da quantidade de Hesperidina da planta enxertada com e sem sintomas de CVC indicou que esta possui uma maior quantidade da substância quando doente, correspondendo a uma alteração metabólica que ocorre na planta quando infectada pela bactéria.

## ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY OF *CITRUS*, THE RESISTENCE TO *XYLELLA FASTIDIOSA* AND INTERACTION WITH *ONCOMETOPIA FACIALIS* – This work describes sixteen substances isolated by *C. limonia*: xanthyletin, seselin, xanthoxyletin, trans-kellactone, trans-decursidinol, junosmarin, scopoletin, isoscapoletin, demethylsuberosin, xanthoarnol, clausarin, limonianin, 5,4'-dihydroxy-6-(3''-methyl-2''-butenyl)-2'',2''-dimethylpyrano(5'',6''-7,8)flavanone,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol. Three of them are especially important: 5,4'-dihydroxy-6-(3''-methyl-2''-butenyl)-2'',2''-dimethylpyrano(5'',6''-7,8)flavanone that was unknown in the literature, trans-kellactone and trans-decursidinol that weren't found previously in the Rutaceae family but at Apiaceae family. The chemical constituents isolated by the upper and low parts from the grafted plant (*C. sinensis* on *C. limonia*) and from ungrafted *C. limonia* were compared. It indicated that the grafted plant has a metabolic translocation process. The Minimum Inhibitory Concentration of many substances isolated from plants of Rutaceae family was related. The test was against the bacteria *Xylella fastidiosa* that causes Citrus Variegated Chlorosis. The successful classes the pyranocoumarins and flavones whose MIC was 1,0 mg/mL. We have studied the plant-insect interaction and discovered that the grafted plant (*C. sinensis* on *C. limonia*) undergoes chemical alteration of the volatile compounds and essential oils when it is in contact with the sharpshooter. The sharpshooters *Oncometopia facialis* belongs to the Cicadellidae family and carries the *Xylella fastidiosa*. This chemical alteration was greater in the volatile compounds than in the essential oils of the plants. Different amounts of Hesperidin were found in the grafted plant when different species of *Citrus* were analyzed: *C. limonia* without CVC, *C. reticulata* without CVC, *C. sinensis* on *C. limonia* with and without CVC. The *C. limonia* presented the lower amount of the secondary metabolic and the *C. sinensis* on *C. limonia* presents the higher amount. The higher amounts of Hesperidin were found in sick plants which corresponds the metabolic alteration that occurs when the plant is infected by the bacteria.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. CITRICULTURA BRASILEIRA.....	2
1.2. <i>CITRUS LIMONIA</i> .....	3
1.3. FAMÍLIA RUTACEAE.....	4
1.4. ESTUDO INICIAL DO ENXERTO DE <i>C. SINENSIS</i> SOBRE <i>C. LIMONIA</i> .....	5
1.4.1. <i>Compostos isolados da parte superior do enxerto</i> .....	6
1.4.2. <i>Compostos isolados da parte inferior do enxerto</i> .....	7
1.5. DOENÇAS CITRÍCOLAS.....	9
1.6. CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS (CVC).....	9
1.7. <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> .....	12
1.8. CIGARRINHAS VETORES.....	17
1.9. NÍVEIS DE INCIDÊNCIA DE CVC.....	18
1.10. FORMAS DE MANEJO DA CVC.....	23
1.10.1. <i>Obtenção de mudas sadias</i> .....	23
1.10.2. <i>Poda ou erradicação de plantas infectadas</i> .....	24
1.10.3. <i>Monitoramento e controle de cigarrinhas</i> .....	25
1.10.3.1. <i>Métodos de monitoramento</i> .....	25
1.10.3.2. <i>Controle químico</i> .....	25
1.11. INTERAÇÃO <i>CITRUS/XYLELLA FASTIDIOSA</i> /CIGARRINHA.....	26
1.12. ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PLANTAS.....	28
1.10.1. <i>Headspace-SPME</i> .....	28
1.10.1. <i>Arraste à vapor</i> .....	28
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3. CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO DO <i>CITRUS LIMONIA</i>.....</b>	<b>33</b>
3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.1.1 <i>Materiais e métodos</i> .....	34

3.1.1.1	<i>Métodos utilizados para o fracionamento e isolamento das substâncias</i> .....	34
3.1.1.2	<i>Métodos instrumentais para a identificação e/ou elucidação estruturais</i> .....	35
3.1.2	<i>Preparação dos extratos brutos</i> .....	35
3.1.3	<i>Fracionamento dos extratos</i> .....	37
3.1.3.1	<i>Extrato hexânico da R1C</i> .....	38
3.1.3.2	<i>Extrato hexânico e diclorometânico da R1C</i> .....	39
3.1.3.3	<i>Extrato metanólico da R1C</i> .....	52
3.2	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56
3.2.1	<i>Deteminação estrutural dos compostos isolados</i> .....	56
3.2.1.1	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C1</i> .....	59
3.2.1.2	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C2</i> .....	63
3.2.1.3	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C3</i> .....	67
3.2.1.4	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C4 e C5</i> .....	69
3.2.1.5	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C6</i> .....	89
3.2.1.6	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C7</i> .....	96
3.2.1.7	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C8</i> .....	103
3.2.1.8	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C9</i> .....	111
3.2.1.9	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C10</i> .....	118
3.2.1.10	<i>Deteminação estrutural da Cumarina C11</i> .....	128
3.2.1.11	<i>Deteminação estrutural do Flavonóide F1</i> .....	135
3.2.1.12	<i>Deteminação estrutural do Flavonóide F2</i> .....	141
3.2.1.13	<i>Deteminação estrutural dos Esteróides E1, E2 e E3</i> .....	150
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 2: ENSAIOS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>155</b>
4.1.	<b>ENSAIOS BACTERICIDAS CONTRA A XYLELLA FASTIDIOSA</b> .....	<b>156</b>
4.1.1.	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>156</b>
4.1.1.1	<i>Preparação dos Meios de Cultivo</i> .....	156
4.1.1.2	<i>Ensaio das substâncias contra Xylella fastidiosa</i> .....	158
4.1.2.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>163</b>
4.1.2.1	<i>Ensaio contra Xylella fastidiosa em diferentes fases de crescimento</i> .....	163
4.1.2.1.1	<i>Ensaio contra Xylella fastidiosa no início da Fase Estacionária</i> .....	164
4.1.2.1.2	<i>Ensaio contra Xylella fastidiosa na Fase Exponencial e no início da Fase Estacionária</i> .....	167
4.1.2.1.3	<i>Ensaio contra Xylella fastidiosa na Fase Exponencial</i> .....	169
4.2.	<b>ENSAIOS BIOLÓGICOS CONTRA A ENZIMA XYLELLAINA</b> .....	<b>173</b>

<b>5. CAPÍTULO 3: INTERAÇÃO PLANTA – XYLELLA FASTIDIOSA – ONCOMETOPIA FACIALIS.....</b>	<b>175</b>
5.1. EXPERIMENTO INTERAÇÃO PLANTA – CIGARRINHA.....	176
5.1.1 <i>Procedimento Experimental</i> .....	176
5.1.1.1 <i>Determinação da Fibra Ideal</i> .....	178
5.1.1.2 <i>Determinação do Tempo de Exposição Ideal</i> .....	180
5.1.1.3 <i>Determinação do tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos</i> .....	183
5.1.1.4 <i>Extração e Identificação dos Compostos Voláteis</i> .....	185
5.1.1.5 <i>Extração e Identificação dos Óleos Essenciais</i> .....	186
5.2.1 <i>Resultados e Discussão</i> .....	187
5.2.1.1 <i>Compostos Voláteis obtidos do C. sinensis sobre C. limonia</i> .....	187
5.2.1.1.1 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia sem ter sido submetido às cigarrinhas</i> .....	187
5.2.1.1.2 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia com cigarrinhas</i> .....	190
5.2.1.1.2.1 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia logo após a inserção das cigarrinhas</i> .....	190
5.2.1.1.2.2 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia 24 horas após a inserção das cigarrinhas</i> .....	192
5.2.1.1.2.3 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia 48 horas após a inserção das cigarrinhas</i> .....	194
5.2.1.1.3 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia após a remoção das cigarrinhas</i> .....	196
5.2.1.1.2.1 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia logo após a remoção das cigarrinhas</i> .....	197
5.2.1.1.2.2 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia 24 horas após a remoção das cigarrinhas</i> .....	198
5.2.1.1.2.3 <i>Compostos identificados no C. sinensis sobre C. limonia 48 horas após a remoção das cigarrinhas</i> .....	200
5.2.1.1.4. <i>Análise Quimiométria dos dados de CG-EM dos Compostos Voláteis de C. sinensis sobre C. limonia</i> .....	202
5.2.1.1.5. <i>Identificação dos Compostos Majoritários</i> .....	215
5.2.1.2 <i>Óleos essências extraídos C. sinensis sobre C. limonia</i> .....	220
5.2.1.2.1 <i>Óleos essências identificados no C. sinensis sobre C. limonia sem ter sido submetido às cigarrinhas</i> .....	220
5.2.1.2.2 <i>Óleos essências identificados no C. sinensis sobre C. limonia após a remoção das cigarrinhas</i> .....	222
5.2.1.2.3 <i>Análise Quimiométria dos dados de CG-EM dos Óleos Essenciais de C. sinensis sobre C. limonia</i> .....	224

5.2. EXPERIMENTO INTERAÇÃO PLANTA – XYLELLA FASTIDIOSA.....	231
5.2.1. <i>Determinação de Hesperidina em diferentes espécies de Citrus</i> .....	231
5.2.2 <i>Procedimento Experimental</i> .....	231
5.2.2.1 <i>Extração e Isolamento das amostras</i> .....	231
5.2.2.2 <i>Análise das amostras por CLAE</i> .....	232
5.2.3 <i>Resultados e Discussão</i> .....	234
5.2.3.1 <i>Análise dos cromatogramas obtidos</i> .....	234
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>240</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>244</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>253</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1. Citricultura Brasileira

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de citros, correspondendo a 25,1% da plantação mundial, seguido pelos Estados Unidos, com 16,4% (Food and Agriculture Organization, 2003). A cultura encontra-se disseminada por todo o território nacional, com grande importância econômica e social para diversos estados onde se situa entre as dez principais culturas: São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Bahia (RODRIGUEZ *et al.*, 1991). As maiores plantações são de laranja (*Citrus sinensis*, 66%), tangerina (*C. reticulata*, 15,4%), toranja (*C. paradisi*, 8,5%) e o limão (*C. limon*, 6,8%); as menores plantações (3,3%) são de lima (*C. aurantifolia*), cidra (*C. medica*) e alguns híbridos.

Os citros podem ser propagados por quatro métodos: sementes, alporquia, estaquia e enxertia, sendo este último o mais utilizado por apresentar algumas vantagens, entre as quais pode-se citar a uniformidade das mudas, uma vez que os porta-enxertos utilizados são poliembriônicos; precocidade no início de produção e aumento na produtividade; além de obter-se mudas praticamente idênticas à planta-mãe (ANDRADE *et al.*, 2003). Assim, atualmente, a concepção no processo de produção de mudas cítricas, associada às novas tecnologias do manejo da cultura, inclui-se a diversificação do uso de porta-enxertos.

As plantas enxertadas são constituídas por duas partes: copa (parte superior) e porta-enxerto (parte inferior), os quais são provenientes de pé francos distintos. Há uma grande variedade de plantas enxertadas, devido às diversas combinações de copa / porta-enxertos possíveis. A laranja 'Pêra' enxertada sobre o limão 'Cravo' (Figura 1.1, p.3) é a planta mais utilizada na citricultura brasileira nos últimos anos (JUNIOR *et al.*, 2004).

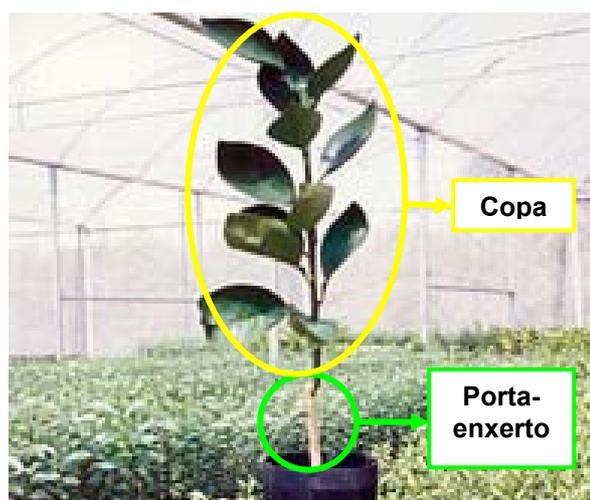


FIGURA 1.1: Laranja Pêra (copa) enxertada sobre Limão Cravo (porta-enxerto).

As principais características que um porta-enxerto deve apresentar são: resistência a pragas e doenças das raízes; compatibilidade com as principais copas comerciais; alta produção de frutos e com ótima qualidade dos mesmos; adaptação às condições de solo e clima da área onde será empregado (devendo ser adaptável às mais diferentes situações); grande quantidade de sementes; alta taxa de poliembrião; facilidade de propagação e enxertia sobre as principais copas comerciais; vigor adequado à indução de bom pegamento dos frutos e de boa maturação; imunidade total ou alta resistência aos patógenos e pragas de importância econômica, incluindo viroses destrutivas e declínios (ANDRADE *et al.*, 2003).

## 1.2. *Citrus limonia*

O limão 'Cravo' (*C. limonia*), também conhecido pelos nomes de Rosa, Bravo, Vinagre, Vermelho, é praticamente o único porta-enxerto sobre o qual foi construída a citricultura brasileira; representando em 99,1% das plantações citrícolas na década de 70, no entanto, esta porcentagem reduziu a 82,9% em 2004 (JUNIOR *et al.*, 2004). A principal inconveniência da utilização de um único porta-enxerto já foi demonstrada pela virose Tristeza que, na década de 40, destruiu quase toda a citricultura brasileira, então apoiada sobre o porta-enxerto laranja azeda. Uma nova doença, o Declínio dos Citrus, constatada na década de 70, causou a morte de milhares de plantas enxertadas sobre o limão cravo. A pesquisa e a experimentação vêm mostrando que a utilização de outros porta-enxertos, como as tangerinas

'Cleópatra', 'Sunki' e o 'Trifoliata', permitem obter frutos de melhor qualidade e maturação mais tardia que podem resultar em benefícios financeiros ao produtor (RODRIGUEZ *et al.*, 1991).

A razão pela preferência ao limão 'Cravo' é sua produtividade alta e precoce, uma vez que plantas enxertadas em limão cravo geralmente têm boas safras a partir dos três anos de idade. Talvez o maior responsável pelo desempenho deste porta-enxerto seja sua resistência à seca, já que mais de 90% de nossa citricultura depende das chuvas para o suprimento de água, e estiagens de 60 a 120 dias durante a florada são comuns. Até os dias atuais nenhum outro porta-enxerto estudado foi encontrado para substituir totalmente o limão 'Cravo', pois nenhum apresentou-se tão resistente a seca. O limão 'Cravo' é resistente à Tristeza, mas suscetível a outras doenças como Exocortis, Xiloporose, Gomose e Declínio.

Plantas enxertadas com limão 'Cravo' apresentam ótimo vigor, adaptando-se bem aos tipos mais comuns de solos, onde podem ter performance excelente com complementação nutricional. As frutas produzidas em plantas sobre este porta-enxerto são de bom tamanho, mas têm qualidade média quanto à concentração de açúcares. O limão 'Cravo' induz maturidade precoce das frutas, permitindo aproveitamento maior dos preços melhores do início da safra. Conclui-se, portanto, que seus defeitos não são limitantes e as vantagens da sua utilização explicam sua preferência na citricultura até os dias de hoje.

### 1.3. Família Rutaceae

O gênero *Citrus* é uma planta classificada na família Rutaceae, ordem Rurales. Segundo a classificação de Dahlgren, Rurales é constituída pelas famílias Rutaceae, Meliaceae, Cneoraceae, Simaroubaceae e Burseraceae. É uma das fontes mais ricas e diversas de metabólitos secundários em Angiospermas.

A quimiosistemática desta família tem sido revisada por Silva *et al.* 1988 baseando-se principalmente nos alcalóides derivados do ácido antranílico, cumarinas e limonóides. Os gêneros da família Rutaceae já foram classificados de acordo com suas características morfológicas e químicas, mas existem ainda controvérsias sobre o posicionamento taxonômico de alguns gêneros, estimulando o estudo de espécies ainda não investigadas. (SILVA *et al.*, 1988).

*Citrus* é o gênero mais importante da família e seu perfil químico corresponde ao da subfamília a que pertence, Citroideae. O *C. limonia*, estudado neste trabalho, é caracterizado por uma proliferação total de cumarinas e limonóides, mas uma escassez em número e diversidade nos alcalóides do ácido antranílico.

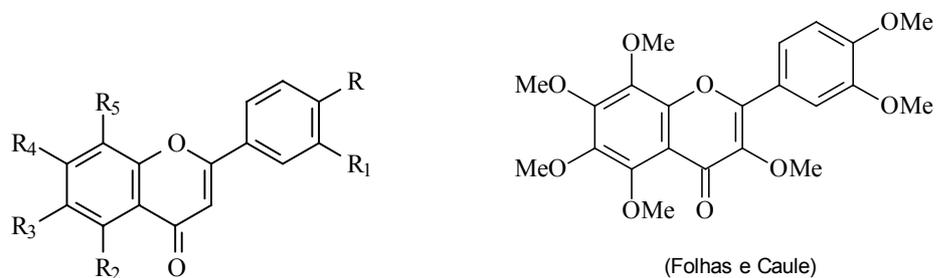
#### **1.4. Estudo inicial do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia***

Visando completar o conhecimento químico de enxertos e entender melhor sobre o mecanismo dos mesmos, o grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar vem estudando enxertos que atinjam o estágio adulto em um tempo bem menor, pois isto facilita os estudos durante o desenvolvimento do mesmo. O limão cravo torna mais precoce o florescimento e a frutificação, em geral 1 ano. Assim, iniciou-se o estudo pelo enxerto de *C. sinensis* (laranja pêra) sobre *C. limonia* (limão cravo).

Dois alunos de doutorado do grupo estudaram a raiz, o porta-enxerto e a parte superior do enxerto separadamente. Neste estudo isolou-se e identificou-se um grande número de metabólitos secundários. O estudo da parte superior levou ao isolamento quase que exclusivamente de flavonóides. Apenas duas cumarinas foram isoladas, xantiletina, das folhas e caule, e xantoxiletina, apenas no caule. Um limonóide, limonina, foi encontrado nas folhas. O triterpeno friedelina foi obtido nas folhas e caule. Os esteróides comuns em planta,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3- $\beta$ -glicopiranosil-sitosterol, também foram isolados do caule.

### 1.4.1. Compostos isolados da parte superior do enxerto

#### ❖ Flavonóides:



R: OMe, R<sub>1</sub>: OMe, R<sub>2</sub>: OH, R<sub>3</sub>: OMe, R<sub>4</sub>: OMe, R<sub>5</sub>: H (folhas)

R: OMe, R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: OMe, R<sub>3</sub>: OMe, R<sub>4</sub>: OMe, R<sub>5</sub>: OMe (folhas e caule)

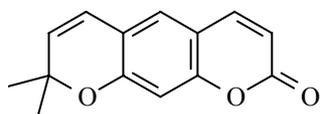
R: OMe, R<sub>1</sub>: H, R<sub>2</sub>: OMe, R<sub>3</sub>: OMe, R<sub>4</sub>: OMe, R<sub>5</sub>: H (folhas)

R: OMe, R<sub>1</sub>: OMe, R<sub>2</sub>: OMe, R<sub>3</sub>: OMe, R<sub>4</sub>: OMe, R<sub>5</sub>: H (folhas e caule)

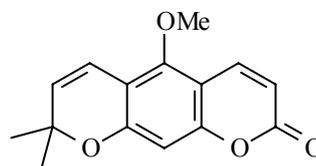
R: OMe, R<sub>1</sub>: OMe, R<sub>2</sub>: H, R<sub>3</sub>: OMe, R<sub>4</sub>: OMe, R<sub>5</sub>: OMe (folhas e caule)

R: OMe, R<sub>1</sub>: OMe, R<sub>2</sub>: OMe, R<sub>3</sub>: OMe, R<sub>4</sub>: OMe, R<sub>5</sub>: OMe (folhas e caule)

#### ❖ Cumarinas:

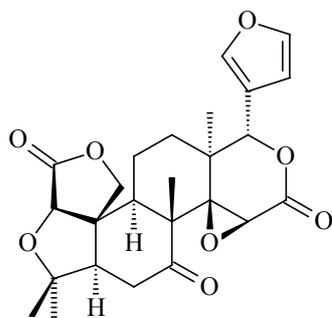


xantiletina (folhas e caule)

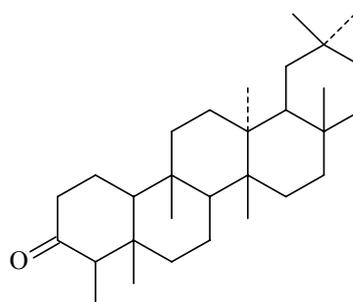


xantoxiletina (caule)

#### ❖ Limonóide e Triterpeno:

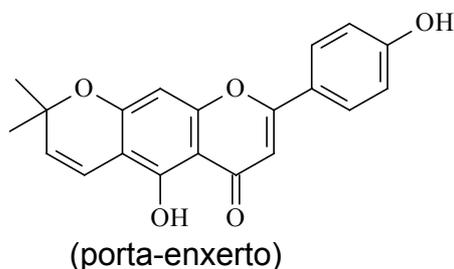


Limonina (folhas)



Friedelina (folhas e caule)

O porta-enxerto da copa se assemelha à parte superior, caracterizado por vários flavonóides, porém, um piranoflavonóide só apareceu nesta parte correspondente ao limão de origem. Quanto as cumarinas, aqui só foram encontrados xantiletina, xantoxiletina e angelical. Contudo, o estudo do porta-enxerto ainda não está concluído.

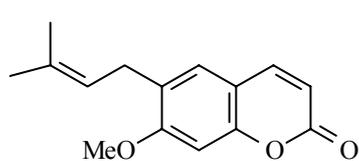


O interessante é que nas raízes a classe de maior representatividade foi a cumarina. Apenas dois limonóide, limonina e acetato de limonina, foram encontrados.

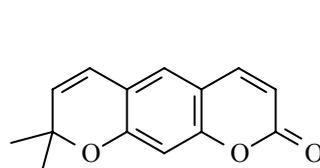
Ao contrário da parte superior, apenas um flavonóide foi localizado, uma flavanona. Os esteróides comuns em planta,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol também foram identificados nas raízes.

#### 1.4.2. Compostos isolados da parte inferior do enxerto

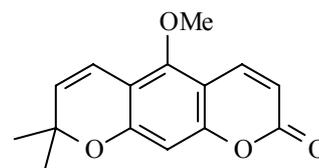
##### ❖ Cumarinas:



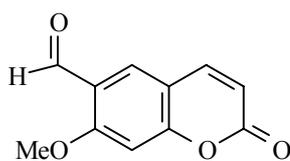
suberosina (raízes)



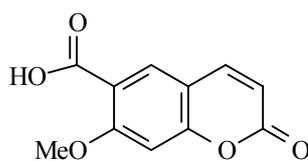
xantiletina (raízes)



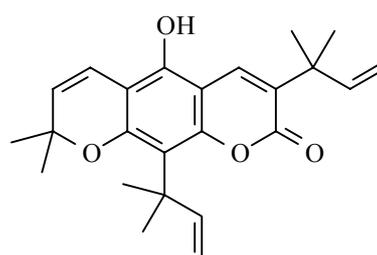
xantoxiletina (raízes)



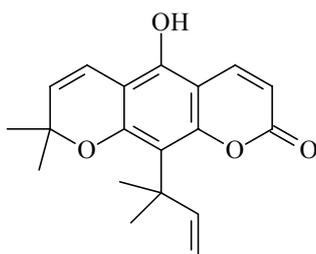
angelical (raízes)



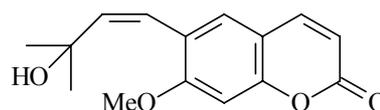
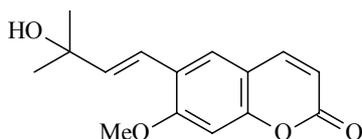
(raízes)



clausarina (raízes)



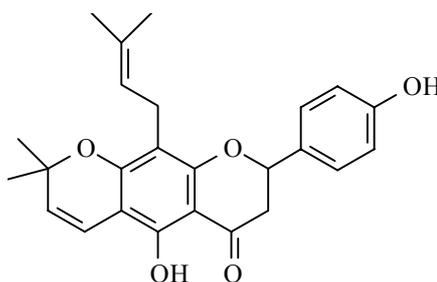
oxanordentina (raízes)



(*E*)-7-metóxi-6-(3-hidróxi-3-metil-1-butenil)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (raízes)

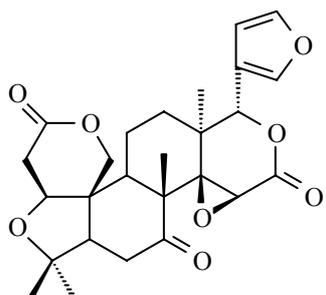
(*Z*)-7-metóxi-6-(3-hidróxi-3-metil-1-butenil)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (raízes)

❖ **Flavonóide:**

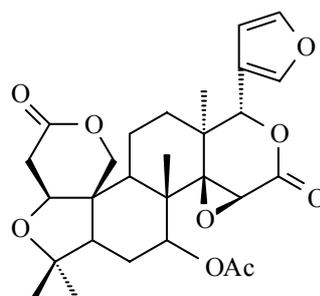


lupnifolina (raízes)

❖ **Limonóides:**



limonina (raízes)



acetato de limonina (raízes)

A composição química obtida de cada parte do enxerto parece ser distinta. O interessante é que no porta-enxerto e nas raízes foram isolados piranoflavonóides, os quais não aparecem na parte superior. Analisando todos os constituintes da parte superior, parece que a reação de prenilação só ocorre nas raízes e porta-enxerto do enxerto.

Na parte superior só foram encontrados dois compostos prenilados, as cumarinas xantiletina e xantoxiletina. A piranocumarina xantiletina foi isolada em grande quantidade (g) nas raízes e apenas em pequenas quantidades (mg) nas partes superiores. Esta observação leva a inferir que a reação de prenilação só ocorre nas raízes e as duas cumarinas teriam sido translocadas para as partes superiores, aparecendo no porta-enxerto e no enxerto originário da laranja.

## 1.5. Doenças Citrícolas

A cultura de citros é um alvo constante de inúmeras pragas e doenças, que, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento são capazes de causar danos irreversíveis. A quantidade e a qualidade das frutas cítricas são freqüentemente ameaçadas devido aos danos deixados na planta, que dependendo da intensidade do ataque, pode torná-la improdutiva ou levar à sua erradicação. As principais doenças e pragas que afetam a citricultura brasileira são: Cancro Cítrico, Clorose Variegada dos Citros (CVC), Declínio, Gomose de *Phytophthora*, Greening, Leprose dos Citros, Mancha *Alternaria*, Morte Súbita dos Citros (MSC), Pinta Preta, Podridão Floral dos Citros, Rubelose, Tristeza – *Citrus Tristeza Virus* (CTV).

## 1.6. Clorose Variegada dos Citros (CVC)

Desde que a Clorose Variegada dos Citros foi encontrada, esta vem constituindo a mais importante doença citrícola no Brasil. Seu progresso se tem dado de tal maneira que só encontra precedente na epidemia da tristeza dos citros ocorrida na década dos quarenta. Em 1994, estimava-se que 26 % das laranjeiras do Estado de São Paulo apresentavam sintomas; em 1997, este número já havia subido para 34%, e 44% em 2004 (LARANJEIRA *et al.*, 2005).

A CVC, também conhecida como “amarelinho dos citros”, foi observada pela primeira vez em 1987, no município de Macaúbal - SP, atacando as principais

variedades de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck), independentemente do porta-enxerto utilizado (ROSSETI *et al.*, 1990). Como em geral acontece quando se descreve a ocorrência de doenças em plantas pela primeira vez, as datas referenciadas indicam a constatação de um problema que provavelmente já ocorria muito tempo antes de ser detectado. Até agora, já foi relatada a ocorrência do patógeno em praticamente todas as regiões onde os citros são explorados comercialmente. A CVC ataca todas as variedades de citros comerciais. As regiões mais afetadas pela doença até hoje são o Triângulo Mineiro e do Norte e Noroeste do Estado de São Paulo, no entanto, a doença já está presente em quase todas as áreas citrícolas do país, com intensidades diferentes.

O agente causal desta doença é uma bactéria gram-negativa denominada *X. fastidiosa* que tem como preferência infectar os vasos do xilema da planta. Restrita ao xilema da planta, a bactéria provoca o entupimento dos vasos responsáveis por levar água e nutrientes da raiz para a copa da planta. A produção do pomar afetado cai rapidamente, os frutos ficam duros, pequenos e amadurecem precocemente. A perda de peso do fruto pode chegar a 75%. A Figura 1.2 mostra a redução dos frutos quando a planta está com CVC.



FIGURA 1.2: Frutos sadios ao lado de frutos de tamanho reduzido devido à CVC. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br), [proteome.ibi.unicamp.br](http://proteome.ibi.unicamp.br))

A transmissão da bactéria se dá através das cigarrinhas da família Cicadellina (DALLA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 1996; ROBERTO *et al.*, 2000; SWALLOW *et al.*, 1985; VET *et al.*, 1983; YAMAMOTO *et al.*, 2001). Até o momento, não se constatou a transmissão mecânica da *X. fastidiosa* a partir de instrumentos cortantes. Sabe-se, porém, que a bactéria pode ser transmitida por enxertia de borbulhas infectadas e que a doença pode ser perpetuada da mesma forma ou por garfagem de ramos afetados (PARRA *et al.*, 2005).

Estima-se que a CVC é responsável por níveis de danos econômicos no Brasil, em cerca de cem milhões de dólares anuais. Embora até o momento só existam estimativas, pesquisadores fazem alguns alertas: a erradicação de uma planta com até dois anos de idade pode significar uma perda entre US\$ 5,00 e US\$ 6,00, além do atraso na produção após replantio e desuniformidade do pomar, o que levará a mais gastos; deverá ocorrer um aumento de cerca de 40 % no custo da produção por hectare, equivalente a um custo de US\$ 14,00 por planta; os testes feitos pelos próprios citricultores e novos resultados de pesquisa poderão ajudar a diminuir os novos custos (LARANJEIRA *et al.*, 2005). Os prejuízos causados poderiam ser ainda maiores não fosse a adoção de medidas conjuntas de controle pelos produtores.

O volume que representa nas exportações, a extensão em área ocupada e o número de empregos diretos e indiretos gerados pelo setor citrícola, associados à rapidez com que a doença se disseminou para os grandes centros produtores de laranja, provavelmente através de mudas contaminadas (TUBELIS *et al.*, 1992), têm feito da CVC o problema mais estudado e, de longe, com maior volume de publicações a respeito.

Levantamentos conduzidos a partir de 1996 mostram que sua incidência na área nobre da citricultura, que compreende 850 mil hectares localizados em 367 municípios das regiões sul, central, norte e noroeste de São Paulo e sul do triângulo mineiro (AYRES *et al.*, 2000), tem-se mantido em níveis médios superiores a 30 % ([www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)). A redução na produção de plantas afetadas pode chegar a 67 e 80 %, respectivamente, no número e peso de frutos normais por planta (AYRES *et al.*, 2000).

As plantas com CVC apresentam sintomas característicos: folhas com manchas amareladas (Figura 1.4, p.12) e frutos miúdos (Figura 1.3, p.12). Os primeiros sintomas são vistos nas folhas, passam posteriormente para os frutos e acabam afetando toda a planta. Os primeiros sintomas da Clorose Variegada dos Citros aparecem nas folhas maduras da copa; em folhas novas, mesmo de plantas severamente afetadas, não há manifestação da doença. Surgem pequenas manchas amareladas, espalhadas na parte lisa da folha (frente) e que correspondem a lesões de cor palha nas costas, essas manchas evoluem para lesões de cor palha dos dois lados da folha. Com o avanço da CVC, observa-se a desfolha dos ramos mais altos da planta, locais mais atacados pelas cigarrinhas. No início, pode-se observar

poucos ramos com frutos pequenos, já em estágio avançado, toda a planta produz frutos miúdos. Quanto mais nova a planta infectada, mais rapidamente ela será totalmente afetada. Com o agravamento da doença, os frutos ficam queimados pelo sol, com tamanho reduzido, endurecido e com maturação precoce. Nesse estágio, são imprestáveis para o comércio.



FIGURA 1.3: Folhas com manchas amareladas, características de CVC. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))



FIGURA 1.4: Plantas com sintomas da CVC. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

### 1.7. *Xylella fastidiosa*

No Brasil, a bactéria *X. fastidiosa* tem causado muita preocupação, principalmente nos últimos 15 anos, e sido alvo de vários estudos, como o que resultou no seqüenciamento completo de seu genoma (SIMPSON *et al.*, 2000), por ser o agente causal de doenças de diversas culturas de importância econômica, como alfafa, ameixeira, laranjeira, videira, pessegueiro e algumas plantas ornamentais. Esta bactéria é responsável pela Doença de Pierce, a qual ataca videiras, e pela Clorose Variegada dos Citros (CVC ou amarelinho), a qual é uma das mais importantes doenças citrícola do Brasil, gerando prejuízos econômicos ao país.

Diferentemente da grande maioria das bactérias fitopatogênicas, a bactéria *X. fastidiosa* é um microrganismo de difícil cultivo em meios de cultura e se limita ao

xilema das plantas infectadas (Figura 1.5) e aparelho bucal dos insetos vetores, as cigarrinhas (PURCELL e HOPKINS, 1996). É através desse grupo de insetos que, no campo, a bactéria é transmitida de uma planta à outra (LOPES *et al.*, 1996, ROBERTO *et al.*, 1996, FUNDECITRUS, 1999, KRÜGNER *et al.*, 1998, YAMAMOTO *et al.*, 2002).



FIGURA 1.5: Vasos do xilema obstruído por células e Células de *X. fastidiosa*. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br); [www.citrolima.com.br](http://www.citrolima.com.br))

Os mecanismos pelos quais a *X. fastidiosa* causa a doença nas plantas não estão esclarecidos ainda, apesar dos esforços feitos neste sentido com base no conhecimento das seqüências de todos os genes que compõem o genoma do agente da CVC (programa Genoma Funcional da *X. fastidiosa* - Fapesp). A maneira que *X. fastidiosa* coloniza o xilema, o que é facilmente observável em imagens feitas com microscopia eletrônica (LOPES *et al.*, 2000, CHAGAS *et al.*, 1992, ROSSETI *et al.*, 1990, ALVES *et al.*, 2003) e óptica, (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1999) e as sintomatologias manifestadas por plantas afetadas, sugerem, no entanto, que os danos resultam principalmente de um bloqueio no fluxo da água do solo para as partes aéreas das plantas e de um constante desvio de nutrientes. Plantas afetadas apresentam sintomas de deficiência hídrica (murchamento de folhas), principalmente nas horas mais quentes do dia e independente do nível de encharcamento do solo, sintomas de deficiência mineral (particularmente zinco) e redução no crescimento da copa e no tamanho dos frutos que em citros se tornam impróprios para o consumo *in natura* ou comercialização. Em geral, plantas de citros afetadas pela bactéria não chegam a morrer, mas a vida útil das plantações costuma ser bastante reduzida.

Estudos feitos com a bactéria que ataca videira nos Estados Unidos demonstraram que aquela linhagem de *X. fastidiosa* apresenta ampla gama de hospedeiros entre plantas invasoras e nativas (PURCELL e HOPKINS, 1996, FREITAG *et al.*, 1951, HOPKINS e ADLERS, 1988, RAJU *et al.*, 1983). Suspeitou-se

que o mesmo poderia estar ocorrendo com as linhagens de citros no Brasil. Isto foi confirmado através de levantamentos de campo (TRAVENSOLO e LEITE 1996, LOPES *et al.*, 2003) e/ou experimentos de inoculação artificial onde essas linhagens, depois de crescidas em meios de cultura, foram injetadas nas principais espécies de plantas invasoras encontradas no campo (LOPES *et al.*, 2003). No caso de citros, onde este estudo foi mais abrangente, incluindo testes de transmissão com vetores, suspeitou-se que tais hospedeiros poderiam servir de reservatório natural do patógeno para as plantas cultivadas, contribuindo assim para o aumento da epidemia, como ocorre com a linhagem que ataca as videiras. Esta hipótese foi, no entanto, praticamente descartada ao se considerar diversos fatores relacionados à resposta das invasoras à inoculação e ao comportamento dos vetores no campo. As plantas inoculadas apresentaram alta resistência à colonização pelo patógeno, impedindo que este atinja altas populações nos vasos do xilema, reduzindo consideravelmente suas chances de ser adquirido pelos vetores e ser transmitido das invasoras para os citros (LOPES *et al.*, 2003). Quanto aos vetores, embora em levantamentos de campo tenha sido detectada a presença de cigarrinhas de invasoras em citros e de cigarrinhas de citros em invasoras (GRAVENA *et al.*, 1998), este número é pequeno, mostrando que deve haver preferência desses insetos por fontes de alimento, o que também reduz as chances de transmitirem *X. fastidiosa* entre invasoras e citros e vice versa (LOPES *et al.*, 2003). Os resultados obtidos com esse estudo ajudam a explicar as observações de campo sobre o avanço da CVC no espaço e no tempo as quais indicam que as plantas de citros infectadas se constituem nas principais fontes de inóculo para as plantas cítricas (LARANJEIRA *et al.*, 2000). Diferentemente da maioria das doenças de plantas, a resistência genética contra *X. fastidiosa* não tem sido explorada com sucesso nessas culturas. Isto se deve a inexistência de variedades com níveis satisfatórios de resistência e com boa aceitação comercial que possam substituir os materiais suscetíveis atualmente plantados ou ao fato de, por falta de estudos, materiais resistentes não terem sido ainda detectados.

Em citros, logo após a primeira descrição da doença e antes mesmo da causa ter sido comprovada em condições experimentais, levantamentos de campo indicavam que todas as variedades de laranjas doces cultivadas, sendo as principais a Pêra Rio, Natal, Hamlim e Valência, eram suscetíveis à doença. As tangerinas Ponkan e tangor Murcote, os limões e a lima ácida Tahiti, de maior expressão

comercial, por não manifestarem os sintomas típicos da CVC foram caracterizados como resistentes. Estes resultados foram confirmados mais recentemente em estudo de campo onde foram avaliados diversos híbridos e espécies dos gêneros *Citrus*, *Fortunela* e *Poncirus* (LARANJEIRA *et al.*, 1998). Neste estudo, também foram observadas diferenças consideráveis no nível de resistência dentro do grupo das laranjas doces que poderia ser explorado comercialmente. É possível que os materiais que não apresentaram sintomas da CVC sejam tolerantes à doença, ou seja, permitindo o crescimento do patógeno em seus tecidos, como observado com a tangerina Cravo e Ponkan por LI *et al.* (1996) e MACHADO *et al.* (1997), porém, não expressando qualquer sintomatologia ou perda de produção. Estas plantas poderiam, no entanto, contribuir para o avanço da CVC nas variedades suscetíveis atuando como fontes de inóculo veiculados pelas cigarrinhas.

Na verdade, a reação dos citros à infecção pela *X. fastidiosa* ainda não foi devidamente caracterizada. Isto se deve à dificuldade que ainda se tem em reproduzir em níveis satisfatórios, sob condições experimentais, os sintomas das doenças observados no campo. Enquanto que em hospedeiros alternativos como o tabaco, inoculações artificiais de *X. fastidiosa* dos citros e cafeeiro resultam, após períodos relativamente curtos de incubação, em sintomas foliares claros e inconfundíveis, expressos pela maioria senão por todas as plantas inoculadas (ALVES *et al.*, 2003, LOPES *et al.*, 2000, 2001 e 2002), em citros a situação tem sido muito diferente. Ainda em citros, a inexistência de um método de inoculação que envolvesse o uso de cultura pura e padronizada do patógeno levou alguns pesquisadores a utilizar a enxertia de borbulhas sadias em plantas doentes (MACHADO *et al.*, 1997) ou a enxertia de ramos doentes em plantas sadias (LI *et al.*, 1996, JAIMES *et al.*, 2002) para estudo de resistência varietal. Os resultados não foram, no entanto, muito satisfatórios. Baixo índice de pegamento e crescimento não uniforme do enxerto, longo tempo para aparecimento ou remissão de sintomas, falta de reprodutibilidade nos resultados obtidos entre laboratórios ou entre dados experimentais com os verificados no campo, foram os principais problemas enfrentados (LARANJEIRA *et al.*, 1998, MACHADO *et al.*, 1997, JAIMES *et al.*, 2002). As causas podem ser várias como efeito do porta-enxerto, incompatibilidade enxerto/porta enxerto, debilidade do ramo doente dificultando o seu pegamento na planta sadia, e variação na quantidade e na qualidade do inóculo, neste caso influenciado pelo número de vasos colonizados, que pode ser diferente entre ramos

dentro de uma mesma planta e entre plantas, e pela viabilidade das células de *X. fastidiosa* presentes nos ramos ou nas plantas doentes. A reação de diversos clones e variedades também foi avaliada sob condições naturais de infecção (LARANJEIRA *et al.*, 1998). Inconsistências nos resultados de algumas variedades com os verificados sob condições experimentais (MACHADO *et al.*, 1997), como mencionado, também foram observadas. Também aqui a causa pode ter sido variação na quantidade de inóculo que as plantas receberam em função do método de inoculação empregado e da não preferência dos insetos vetores por algumas das variedades estudadas (LARANJEIRA *et al.*, 1998).

Dada a importância econômica das culturas dos citros e as perdas que as doenças causadas pela *X. fastidiosa* vêm causando para os setores envolvidos, foi necessário empreendimento de esforços visando um conhecimento mais aprofundado de vários aspectos desses patossistemas de forma que medidas de controle mais apropriadas sejam desenvolvidas. A Figura 1.6 mostra diversas imagens da *X. fastidiosa* observadas em Microscopia Eletrônica.

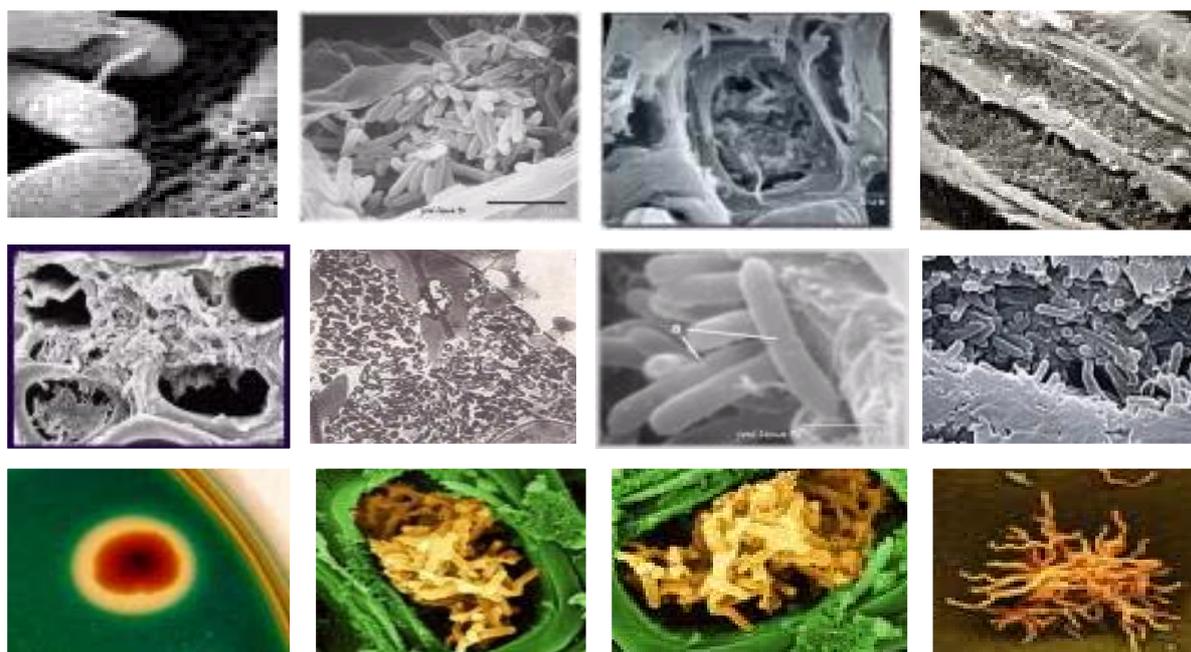


FIGURA 1.6: Imagens de *X. fastidiosa* por Microscopia Eletrônica. (Fonte: watson.fapesp.br, proteome.ibi.unicamp.br, www.ibm.fcav.unesp.br)

## 1.8. Cigarrinhas vetores

As cigarrinhas são insetos sugadores, pertencentes à ordem Hemiptera (subordem Auchenorrhyncha), e podem se alimentar em vários tecidos vegetais, principalmente no sistema vascular dos citros. Existem muitas espécies de diversos grupos taxonômicos de cigarrinhas que ocorrem em pomares de laranja. A maioria das espécies habita a vegetação rasteira dos pomares e pertence a família Cicadellidae, dentro da qual se destacam as subfamílias Cicadellinae, Delcephalinae, Gyponinae e Agalliinae. Embora algumas espécies possam sugar volumes significativos de seiva das plantas cítricas, os danos diretos resultantes da alimentação têm pouca importância econômica. Atualmente, são consideradas pragas-chaves em citros apenas algumas espécies da subfamília Cicadellinae, por serem vetoras da bactéria *X. fastidiosa*, que é o agente causal da CVC (PARRA *et al.*, 2005). Comprovou-se que sob condições experimentais, com maior ou menor eficiência, onze espécies de cigarrinhas são transmissoras (Figura 1.7): *Acrogonia sp.*, *Dilobopterus costalimai*, *Oncometopia facialis*, *Bucephalagonia xanthophis* e *Plesiommata corniculata*, *Acrogonia virescens*, *Ferrariana trivittata*, *Homalodisca ignorata*, *Macugonalia leucomelas*, *Parathona gratiosa* e *Sonesima grossa* (PARRA *et al.*, 2005, YAMAMOTO *et al.*, 2002).

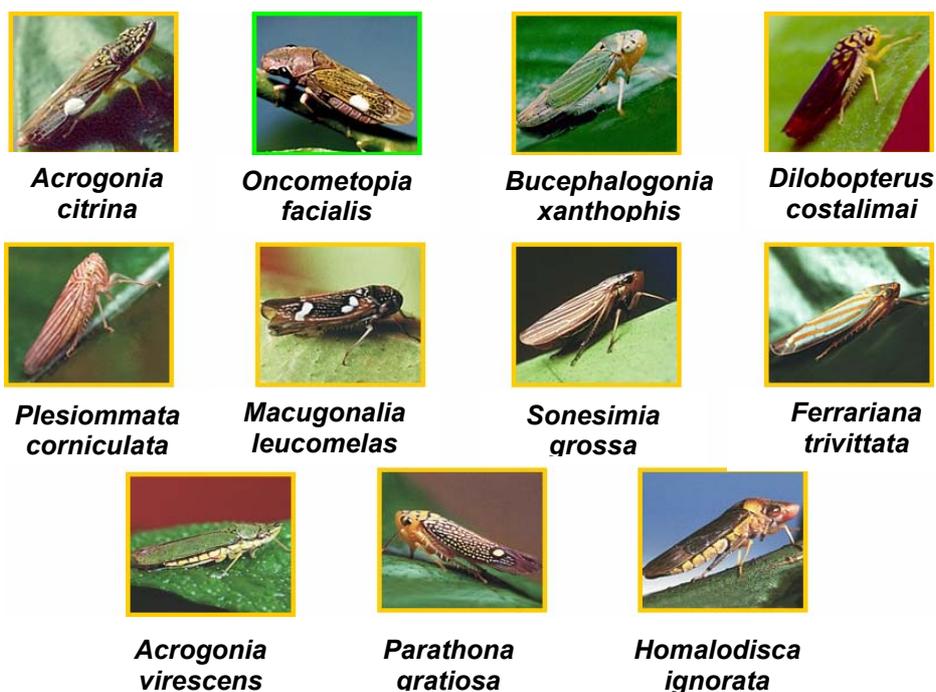


FIGURA 1.7: Cigarrinhas transmissoras de CVC. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

Ao se alimentarem no xilema de árvores contaminadas, as cigarrinhas adquirem a bactéria e passam a transmiti-la para outras plantas saudias. Entre as medidas mais importantes de manejo da CVC está o controle de cigarrinhas no pomar. As principais cigarrinhas vetoras, *A. citriba*, *B. xanthophis*, *D. costalimai* e *O. facialis*, o reconhecimento delas pode ser realizado através de suas características de coloração e tamanho.

As cigarrinhas estudadas neste trabalho são pertencentes a *Oncometopia facialis* (tribo Proconiini); quando adultas geralmente medem de 11 a 12 mm, tendo coloração marrom-arroxeadada, as asas são marrons, com áreas douradas e parte apical transparente e a cabeça tem uma mancha escura característica na face frontal. Os ovos são colocados endofiticamente a face abaxial das folhas, dispostos em fileira, sendo recobertos por um material pulverulento claro. As ninfas recém-eclodidas são escuras, tornando-se mais claras com o decorrer do desenvolvimento. Os adultos são encontrados em brotações ou em ramos mais desenvolvidos de árvores cítricas, alimentando-se na parte mais madura desses ramos (PARRA *et al.*, 2005).

## 1.9. Níveis de Incidência de CVC

Desde 1996, a Fundecitrus realiza anualmente um levantamento para retratar a incidência da Clorose Variegada dos Citros (CVC) nas quatro principais variedades de laranja (Pera Rio, Valência, Natal e Hamlin). O levantamento é realizado nos meses que antecedem a colheita e são consideradas as zonas Norte, Noroeste, Oeste, Centro e Sul, conforme o mapa abaixo.

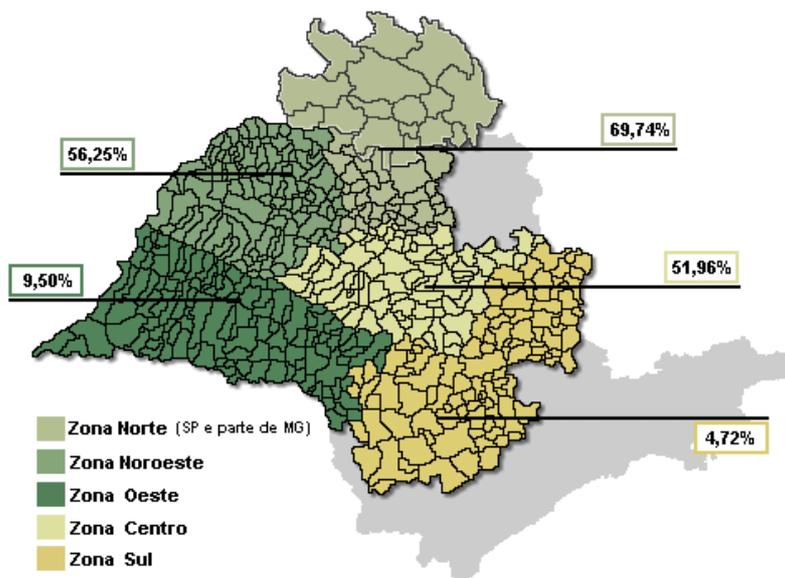
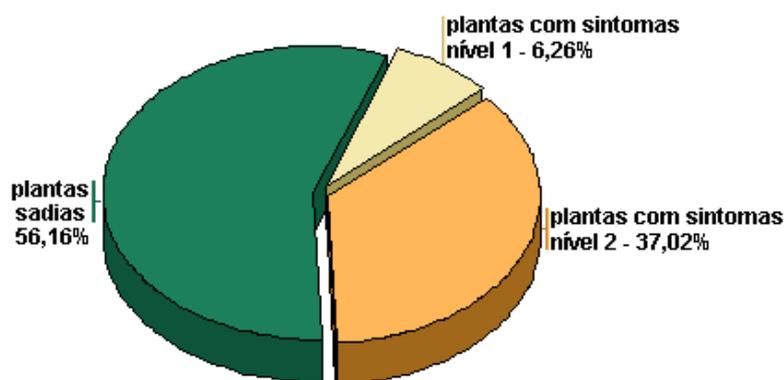


FIGURA 1.8: Zoneamento citrícola considerado no levantamento de CVC em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

Pode-se verificar que a região norte do Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro são as que apresentam maior incidência de CVC (Figura 1.8).

O Gráfico 1.1 apresenta os diferentes níveis de sintomas e porcentagem de plantas saudias de acordo com o levantamento realizado em 2005, ou seja, aproximadamente 44% da plantação total apresentam plantas infectadas.

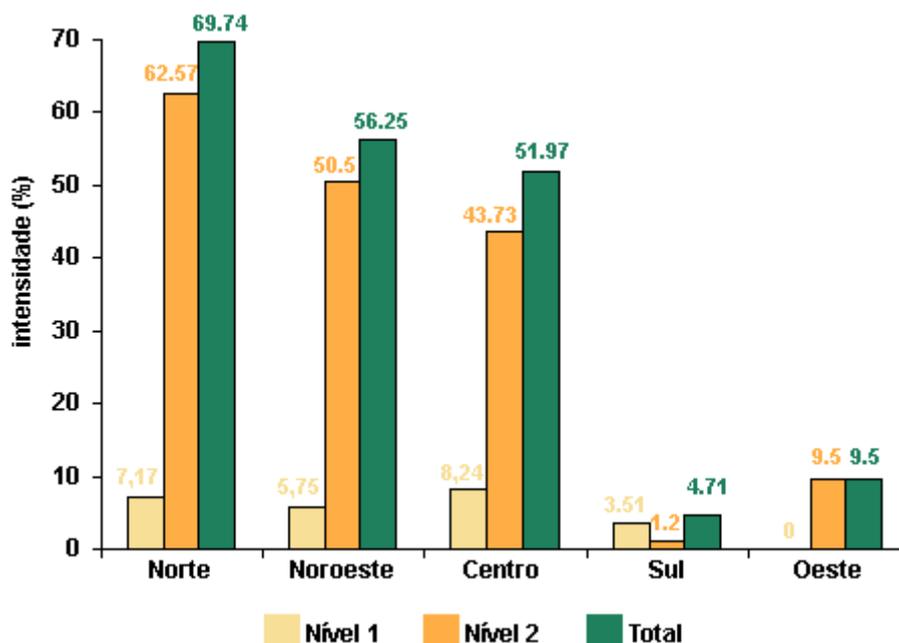


**Nível 1** - plantas com sintomas restritos às folhas.

**Nível 2** - plantas com sintomas foliares e frutos miúdos; a distribuição desses frutos de tamanho reduzido pode ocorrer em parte da copa da planta assim como em toda ela.

GRÁFICO 1.1: Incidência de CVC em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

O Gráfico 1.2 apresenta os diferentes níveis de sintomas observados nas zonas Norte, Noroeste, Centro, Sul e Oeste de acordo com o levantamento realizado em 2005, e representa as porcentagens com os diferentes níveis de sintomas.



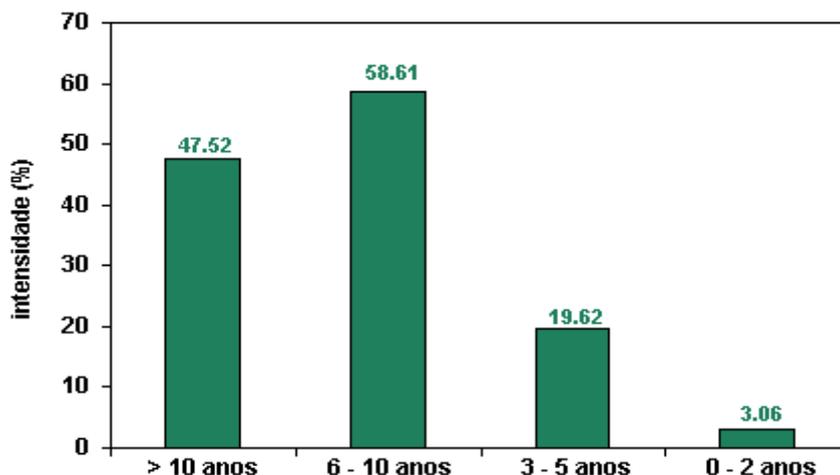
**Nível 1** - plantas com sintomas restritos às folhas.

**Nível 2** - plantas com sintomas foliares e frutos miúdos; a distribuição desses frutos de tamanho reduzido pode ocorrer em parte da copa da planta assim como em toda ela.

GRÁFICO 1.2: Incidência de CVC por zona em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

A região que apresenta maior incidência de CVC é a região norte do Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro e, com exceção da região Sul, as demais regiões apresentam um maior percentual nas plantas com sintomas em nível 2, e isto demonstra que, uma vez a planta contaminada, ela passa a ficar totalmente infectada, tanto suas folhas como seus frutos, ou seja, a doença se alastra por toda planta.

O Gráfico 1.3, p.21, apresenta os diferentes níveis de sintomas observados em plantas com diferentes idades: entre 0 a 2 anos, 3 a 5 anos, 6 a 10 anos e mais que 10 anos, de acordo com o levantamento realizado em 2005.



Nível 1 - plantas com sintomas restritos às folhas.

Nível 2 - plantas com sintomas foliares e frutos miúdos; a distribuição desses frutos de tamanho reduzido pode ocorrer em parte da copa da planta assim como em toda ela.

GRÁFICO 1.3: Incidência de CVC por idade em 2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

Pode-se verificar que plantas com idades entre 6 a 10 são as mais infectadas pela doença.

Os gráficos a seguir apresentam a incidência total de CVC levantada em cada ano, a comparação da incidência de CVC no período de acordo com os níveis de sintomas e a idade das plantas.

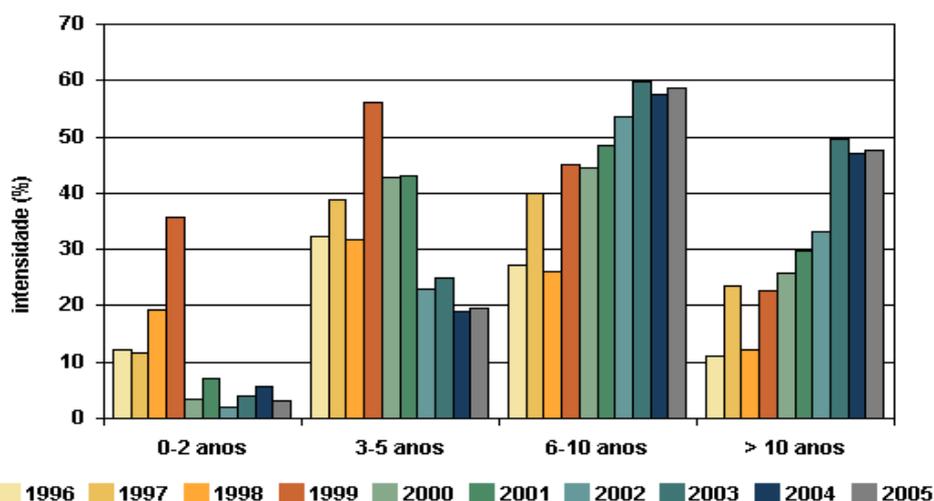
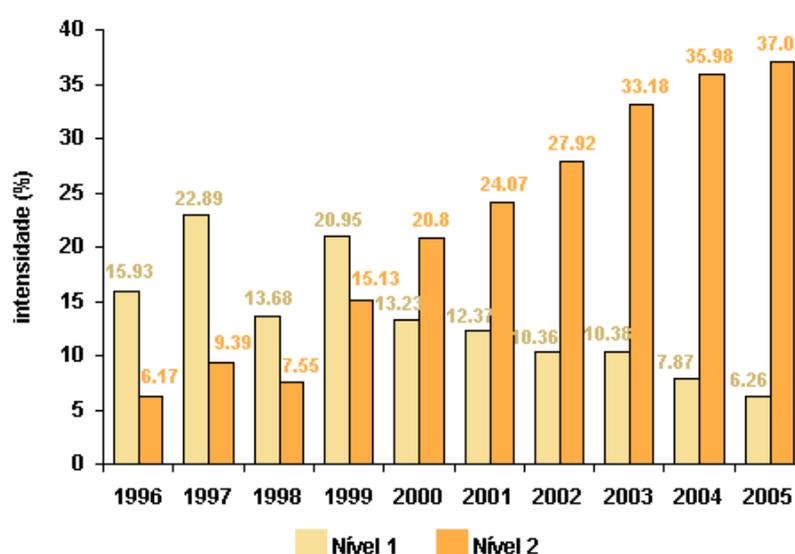


GRÁFICO 1.4: Comparação da incidência de CVC por idade no período de 1996-2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))



**Nível 1** - plantas com sintomas restritos às folhas.

**Nível 2** - plantas com sintomas foliares e frutos miúdos; a distribuição desses frutos de tamanho reduzido pode ocorrer em parte da copa da planta assim como em toda ela.

GRÁFICO 1.5: Comparação da incidência de CVC apresentando os diferentes níveis de sintomas no período de 1996-2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

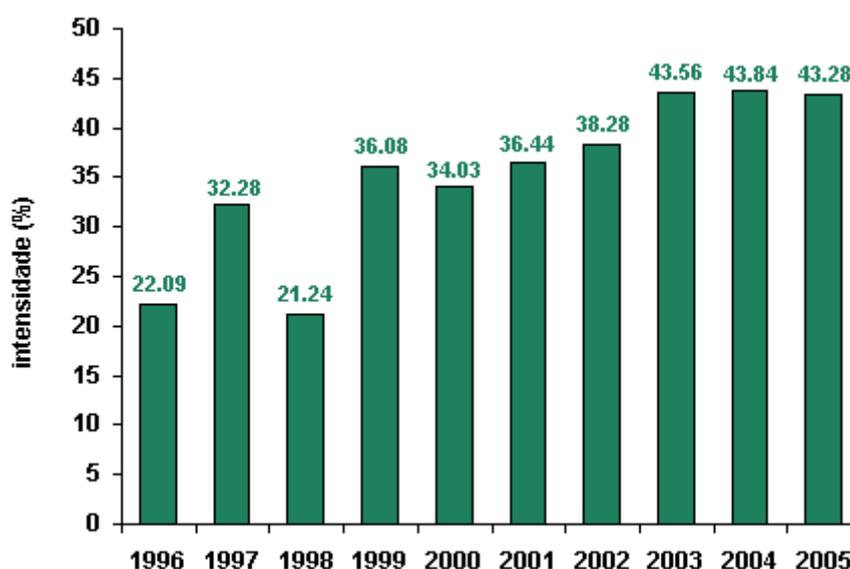


GRÁFICO 1.6: Comparação da incidência de CVC no período de 1996-2005 no Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

A partir destes gráficos e comparando-se os levantamentos realizados no decorrer dos anos pode-se verificar que houve um aumento constante na incidência

de CVC desde 2000. Nos últimos anos, de 2004 a 2005, houve um pequeno decréscimo, porém praticamente insignificante, podendo-se concluir que os métodos de controle da CVC não estão sendo eficazes, ou seja, são necessários empreendimentos para descoberta de novas formas de controle da doença.

## **1.10. Formas de Manejo da CVC**

A bactéria *X. fastidiosa* é transmitida e disseminada nos pomares por insetos vetores. Como ainda não há uma forma específica de controle à *X. fastidiosa*, os citricultores implantam em seus pomares as estratégias de manejo da doença. O manejo da CVC exige cuidados e dedicação por parte do citricultor e está baseado em três estratégias: implantação de pomares com mudas saudáveis para evitar a introdução do patógeno; poda de ramos com sintomas iniciais em plantas com mais de dois anos; erradicação de plantas abaixo dessa idade; e controle químico do vetor, as cigarrinhas. Além dessas medidas, é importante manter os tratamentos culturais exigidos pelo pomar. Deve-se ressaltar que nenhuma das medidas de convivência tem eficiência isoladamente (FUNDECITRUS, 2003, YAMAMOTO *et al.*, 2001).

Atualmente, existe norma governamental que, a partir de janeiro de 2003, proíbe a comercialização em todo o estado de São Paulo de mudas que não tenham sido produzidas em viveiros telados totalmente livres de insetos (FUNDECITRUS, 2003a). Esta exigência deverá contribuir a médio e longo prazo para uma redução da incidência da CVC.

### **1.10.1. Obtenção de Mudas saudáveis**

Para que o citricultor não corra o risco de levar a bactéria *X. fastidiosa* para a sua propriedade e nem perca a árvore antes que ela comece a produzir, é indicado que sejam adquiridas mudas que estejam livres da doença (Figura 1.9, p.24). Recomenda-se que verifique se o viveiro adota todas as medidas de segurança que garantem a produção de mudas saudáveis. Elas devem ser compradas em viveiros certificados, que respeitam uma série de regras sanitárias estabelecidas pela Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. O citricultor precisa dobrar a vigilância na época da colheita, quando se aumenta o trânsito de equipamentos, veículos e frutos por todo o estado.



FIGURA 1.9: Muda Sadia - A base para um pomar sem CVC. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

### 1.10.2. Poda ou Erradicação de plantas infectadas

Essa é uma das mais importantes medidas de controle da CVC. A poda (Figura 1.10) e, em alguns casos a erradicação, evita a proliferação da bactéria na planta e elimina as fontes de inóculo, nas quais as cigarrinhas poderiam adquirir a bactéria e posteriormente transmiti-la. O sucesso da poda ocorre principalmente nos sintomas iniciais da doença. Os melhores resultados são obtidos em pomares com poucas árvores contaminadas. Árvores com sintomas severos apresentam a bactéria distribuída pela planta, chegando até o tronco. Nesses casos, a poda não é eficaz e deve-se fazer a erradicação da planta.



FIGURA 1.10: Poda de ramos doentes em plantas com mais de 2 anos. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

### 1.10.3. Monitoramento e controle de cigarrinhas

Em anos chuvosos as cigarrinhas aparecem na primavera e, em anos secos, surgem mais tarde, no verão. No meio do ano, quando se inicia a seca, elas começam a sumir dos pomares.

#### 1.10.3.1. Métodos de Monitoramento

Existem vários métodos de amostragem da população de cigarrinhas, entre eles: armadilha adesiva amarela, observação visual e por rede entomológica (puçá), as quais estão ilustradas na Figura 1.11. As armadilhas amarelas atraem as cigarrinhas pela cor, quando elas entram chocam-se, são captadas, pois ficam retidas pela cola presente.

Em qualquer dos casos é necessário treinamento para identificar as cigarrinhas que transmitem a doença. O número de plantas inspecionadas deve corresponder a 1% ou 2% do pomar, em locais bem definidos. Deve-se escolher plantas que apresentem vegetações intensas, que são as preferidas pelas cigarrinhas.



FIGURA 1.11. Armadilhas utilizadas na captura de cigarrinhas vetores de CVC: Armadilha adesiva amarela, armadilha com cigarrinhas capturadas e puçá. (Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br))

#### 1.10.3.2. Controle químico

É recomendado que seja feito quando for constatado 10% das plantas de um talhão com cigarrinhas, independente da espécie. Deve-se fazer o controle até as plantas atingirem 6 anos. É aconselhado monitoramentos e pulverizações periódicas

em talhões mais velhos, que estão próximos a talhões novos. A mesma recomendação vale para locais próximos a matas naturais e baixadas.

Em plantas com até três anos de idade, pode-se aplicar inseticidas sistêmicos no início e final do período das águas, com aplicações de inseticidas de contato durante a seca. Caso se opte pela utilização somente de inseticidas de contato no controle do vetor, é recomendada a aplicação mensal do período das águas e, a cada dois meses, durante a seca. Se os pomares forem mais velhos, a recomendação dos técnicos para o controle é basear as aplicações de acordo com a população de cigarrinhas.

As pulverizações devem ser criteriosas. O uso indiscriminado de produtos químicos elimina os inimigos naturais que, sozinhos, são responsáveis pelo controle de 40% da população de cigarrinhas e podem causar surtos de pragas secundárias.

A partir destes dados, verifica-se que não há uma forma eficaz de controle a CVC e sim métodos de prevenção, ou seja, quando a planta contrai a doença, se esta não for controlada rapidamente é necessário erradicá-la. Isto gera grandes prejuízos ao produtor, pois ele perde além de todo o investimento realizado, como plantio, mudas, água, fertilizantes, entre outros; os frutos que seriam vendidos e gerariam lucros, sendo necessário replantar novamente e esperar um tempo maior para obter o retorno financeiro.

### **1.11. Interação Citrus/*Xylella fastidiosa*/Cigarrinha**

Há uma correlação entre citros, bactéria e cigarrinha: a cigarrinha se alimenta da seiva dos citros, no entanto, se a planta estiver infectada, a bactéria é transferida para o aparelho bucal do inseto, o qual, ao se alimentar de outra planta, acaba transmitindo o patógeno, e no caso se a planta for sadia, ela passa a conter a doença. Esta interação está ilustrada na Figura 1.12, p.27.

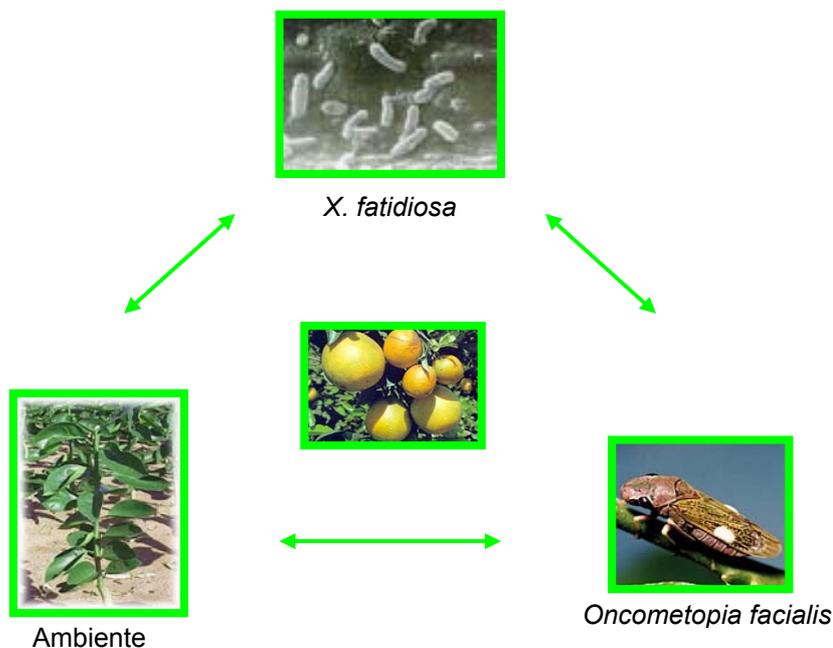


FIGURA 1.12. Interação Citrus / *X. fastidiosa* / Cigarrinhas.

Há dados na literatura relatando a presença de cristais em forma de ráfides (agulhas) no lúmen de alguns vasos do xilema em plantas com sintomas de CVC quando analisadas por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura). Análises em plantas com inoculação natural mostraram que estes cristais se formavam no lúmen a partir das pontuações, indicando que nos mesmos se originavam de células do parênquima do xilema e que, possivelmente, tais cristais sejam de hesperidina, um glicosídeo comum em plantas de laranjeira (GOTTARDI *et al.*, 2004). A presença de cristais dendríticos de hesperidina já havia sido verificada anteriormente com o emprego da luz polarizada, utilizando-se um fotomicroscópio óptico (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1999). A presença dos cristais sugere uma resposta da planta a um possível ataque desta bactéria (GOTTARDI *et al.*, 2004).

Há necessidade de estudos para verificar se realmente o cristal encontrado é a hesperidina e se há um aumento na quantidade do mesmo em plantas infectadas por CVC, para uma melhor compreensão e comprovação de que a planta tem uma resposta frente à infecção. É provável que ocorra uma alteração nos metabólitos secundários da planta quando em contato com agentes vetores ou quando infectada pela bactéria.

## 1.12. Análise de compostos voláteis de plantas

### 1.12.1. Headspace - SPME

Durante a década passada, a microextração por fase sólida foi amplamente utilizada para extração de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras biológicas, ambientais e alimentícias. A SPME (Solid Phase Micro-Extraction) é um procedimento de amostragem simples, rápido e livre de solventes, no qual as amostras presentes na fase líquida (amostragem por imersão direta) ou fase gasosa (amostragem Headspace) são absorvidas por uma fibra com sílica fundida. O Headspace SPME (HS-SPME) em combinação com cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) tem sido amplamente utilizado na análise de aromas (KIM *et al.*, 2003).

A SPME oferece várias vantagens, sobretudo dinâmica na técnica de amostragem headspace usada em investigações prévias. Em particular, SPME requer poucas amostras e um tempo muito curto de análise, o qual pode minimizar a formação de artefatos devido aos danos da planta e contaminações ou perdas de compostos (FLAMINI *et al.*, 2003). Esta técnica pode ser usada para verificar a interação inseto-planta, adquirindo informações referentes à resposta desta quando em contato com agentes vetores. Tal experimento não danifica a planta, obtendo-se um resultado próximo do real.

### 1.12.2. Arraste à vapor

A destilação por arraste a vapor é empregada para destilar substâncias que se decompõem nas proximidades de seus pontos de ebulição e que são insolúveis em água ou nos seus vapores de arraste. Esta operação baseia-se no fato de que, numa mistura de líquidos imiscíveis, o ponto de ebulição será a temperatura na qual a soma das pressões parciais dos vapores é igual à da atmosfera, o que constitui uma decorrência da lei das pressões parciais de Dalton. Se, em geral, o arraste se faz com vapor d'água, a destilação, à pressão atmosférica, resultará na separação do componente de ponto de ebulição mais alto, a uma temperatura inferior a 100°C. Por outro lado, quando uma mistura de dois líquidos imiscíveis é destilada, o ponto de ebulição da mistura permanece constante até que um dos componentes tenha

sido separado, já que a pressão total do vapor independe das quantidades relativas dos componentes. O ponto de ebulição, a partir daí, eleva-se rapidamente, até atingir o do líquido remanescente. O vapor que se separa de tal mistura contém os componentes na mesma proporção, em volume, que suas pressões de vapor relativas.

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado na extração de óleos de plantas frescas.

Os óleos essenciais de citros têm sido usados para criar aromas artificiais e fragrâncias há muitos anos (UMANO *et al.*, 2002). Eles são materiais aromatizantes de importância comercial, sendo utilizados nas indústrias de bebidas, confeitarias, farmacêuticas, cosméticas e perfumarias. A qualidade e refrescância dos óleos de citros são as maiores considerações pertinentes para seu valor e suas aplicações (NJOROGÉ *et al.*, 1996). O aroma de frescor da laranja é derivado a uma mistura complexa contendo ácidos e compostos voláteis.

Compostos voláteis são especialmente importantes para o aroma de citros e inclui álcoois, aldeídos, ésteres e hidrocarbonetos. O efeito de um dado volátil no aroma pode ser fortemente modificado por compostos não voláteis, bem como a partir de efeitos sinérgicos de outros compostos (OBENLAND *et al.*, 1999). A demanda mundial para óleos essenciais, especialmente de citros, tem aumentado durante os anos (CHOI *et al.*, 2000), sendo o Brasil atualmente o maior exportador de óleos essenciais de citros.

## **2. OBJETIVOS**

---

Este trabalho teve como objetivo principal estudar metabólitos secundários com potencial inseticida ou efeito antimicrobiano para *X. fastidiosa* visando o controle da CVC, a qual é uma das doenças mais importantes da citricultura brasileira e com isto tem gerado muitos prejuízos a diversos setores. Vários métodos podem ser empregados, como controle da bactéria causal da doença (*X. fastidiosa*), dos agentes transmissores da bactéria (Cigarrinhas), e a realização de um diagnóstico mais rápido da doença, o que facilita o controle e erradicação da mesma.

Para alcançar tal objetivo foram determinados então outros objetivos específicos:

- a) Isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários de *C. limonia* (limão cravo) visando ampliar o conhecimento da química da família Rutaceae;
- b) A busca de substâncias com potencial inibitório frente a *X. fastidiosa* e a sua enzima “*Xylellaina*”. A partir de ensaios com substâncias isoladas do *C. limonia*, devido este não manifestar os sintomas típicos da CVC e com isto ser caracterizado como resistente à bactéria *X. fastidiosa*; e a partir de ensaios com outras substâncias isoladas de plantas pertencentes à família Rutaceae, uma vez que várias destas são citadas na literatura apresentando ótimas atividades biológicas;
- c) Análise da interação planta-inseto verificando se há uma resposta da planta frente a insetos vetores, a partir da extração e identificação de compostos presentes nos óleos essenciais e de compostos voláteis da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* submetida a diferentes condições com e sem a presença de cigarrinhas vetores da CVC. Com estas informações buscar novas alternativas para o controle das cigarrinhas

vetores, uma vez que a eliminação dos agentes transmissores é uma medida utilizada para o controle da CVC;

- d) Determinar o teor de Hesperidina em diferentes espécies de citros com e sem sintomas de CVC para verificar se realmente há uma resposta da planta frente à infecção manifestada por modificações em seus metabólitos secundários, e conhecer a resposta de uma planta suscetível comparada a uma resistente a *X. fastidiosa* quando infectada pela doença.

### **3. CAPÍTULO 1:**

#### **ESTUDO FITOQUÍMICO DO *C. LIMONIA***

---

### 3.1. Procedimento Experimental

#### 3.1.1. Materiais e Métodos

##### 3.1.1.1. Métodos utilizados para o fracionamento e isolamento das substâncias

a) Fracionamentos por Cromatografia em Coluna (CC), utilizando as seguintes fases estacionárias:

- Sílica (230-400 Mesh ASTM);
- Sílica 60 (70-230 Mesh ASTM);
- Sílica 60G PF254 (70-230 Mesh ASTM);
- Sephadex LH-20.

b) Separação de misturas de substâncias via a Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) utilizando:

- Sílica gel (5-25  $\mu$ );
- Sílica gel 60.

c) Separação de misturas de substâncias via a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando os cromatógrafos:

- Shimadzu modelo LC-10AD (condições analíticas);
- Shimadzu modelo LC-8A (condições preparativas);
- Shimadzu modelo LC-6AD (condições preparativas com válvula de reciclo e "loop" de 2 mL);

Com os seguintes detectores:

- Espectrofotômetro UV-VIS. Modelo SPD-GAV, Shimadzu para CLAE-R;
- Detector de índice de refração Shimadzu VIR-6AV para CLAE-R.

d) Solventes utilizados no fracionamento e identificação dos compostos:

- Solventes comerciais destilados no DQ – UFSCar;
- Solventes grau HPLC da JTB;
- Solventes deuterados da Merk e Aldrich.

### **3.1.1.2. Métodos instrumentais utilizados para a identificação e/ou elucidação estruturas**

a) Ressonância Magnética Nuclear (RMN), utilizando as técnicas RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMBC, HSQC, NOESY, via os seguintes aparelhos:

- DRX 400 Bruker (9,4 Tesla) e ARX 200 Bruker (4,7 Tesla).

b) Espectrometria de Massas, utilizando-se os seguintes aparelhos:

- Cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC-17A, equipado com uma coluna DB<sub>5</sub>, L = 30 m, DI = 0,32 mm e filme = 0,25  $\mu\text{m}$  acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução HP – 2576
- Cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP5000, equipado com coluna HP1, L = 25 m, DI = 0,20 mm e filme = 0,25  $\mu\text{m}$
- Espectrômetro de Massas ESI-MS e DCI-MS de baixa resolução VG Platform II (Fisons).

### **3.1.2. Preparação dos Extratos Brutos**

O material vegetal foi coletado na Estação Experimental de Citricultura do Instituto Agrônomo de Campinas, cuja fazenda experimental encontra-se em Cordeirópolis - SP. Inicialmente foram separados em raiz terminal, raiz, caule, folhas do *C. limonia*; raiz terminal e raiz do enxerto *C. sinensis* sobre *C. limonia*, e posteriormente empacotados. Após seco em estufa de circulação a 40°C, cada parte da planta foi triturada em um moinho tipo *Willey* e em seguida pesada para a

obtenção de suas massas, as quais foram: Raiz terminal - 715,5 g; Raiz - 631,2 g; Folhas - 387,1 g; Caule - 1738,1g; Raiz terminal do enxerto - 509,2 g; Raiz do enxerto - 466,9 g. Os códigos de cada material coletado, os extratos obtidos e as massas correspondentes a cada extrato estão relacionados na Tabela 3.1.

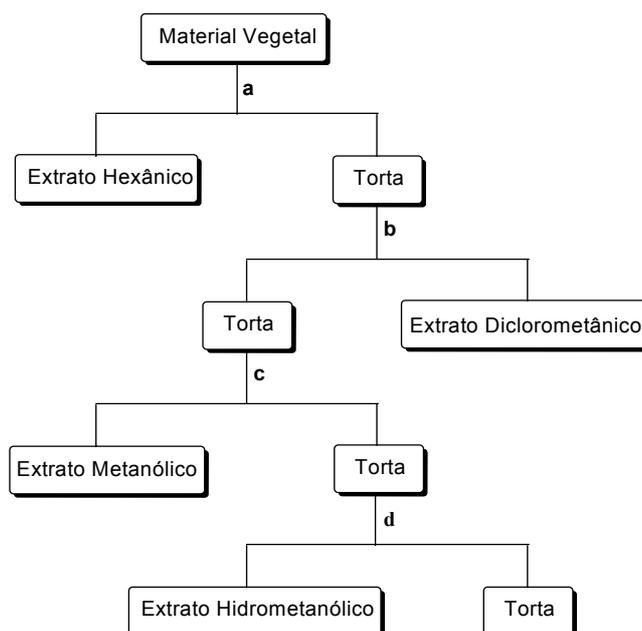
TABELA 3.1: Divisão das plantas *C. limonia* e *C. sinensis* sobre *C. limonia*, extratos obtidos e suas respectivas massas.

Órgão da planta	Código	Extratos	Massa do extrato (g)
Raiz terminal do <i>C. limonia</i>	R1C	H	7,9392
		D	5,7372
		M	13,7204
Raiz do <i>C. limonia</i>	R2C	H	11,2395
		D	10,4279
		M	16,7202
Caule do <i>C. limonia</i>	CCL	H	17,4547
		D	6,7823
		M	34,5471
Folhas do <i>C. limonia</i>	FCL	H	4,5269
		D	5,8883
		M	19,4152
Raiz terminal do <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	R1E	H	3,2745
		D	12,9198
		M	14,3882
Raiz do <i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i>	R2E	H	5,7362
		D	7,6037
		M	17,6471

H: extrato hexânico; D: extrato diclorometânico; M: extrato metanólico

Os extratos foram obtidos a partir da maceração por cinco dias do material moído com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: Hexano, Diclorometano (DCM) e Metanol, durante três vezes consecutivas; como mostrado no Esquema 3.1, p.37.

ESQUEMA 3.1: Preparação de Extratos.



- a) Maceração com Hexano por cinco dias por três vezes;
- b) Maceração com DCM por cinco dias por três vezes;
- c) Maceração com Metanol por cinco dias por três vezes;
- d) Maceração com mistura de Água/Metanol na proporção de 1:1 por cinco dias por duas vezes.

Obteve-se um total de 18 extratos conforme mostrado na tabela 3.1 (p. 36) e todos foram concentrados, após sua maceração, em evaporador rotativo. Trabalhou-se com os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico da raiz terminal de *C. limonia* (R1C); os demais extratos serão posteriormente trabalhados por outros alunos.

### 3.1.3. Fracionamento dos Extratos

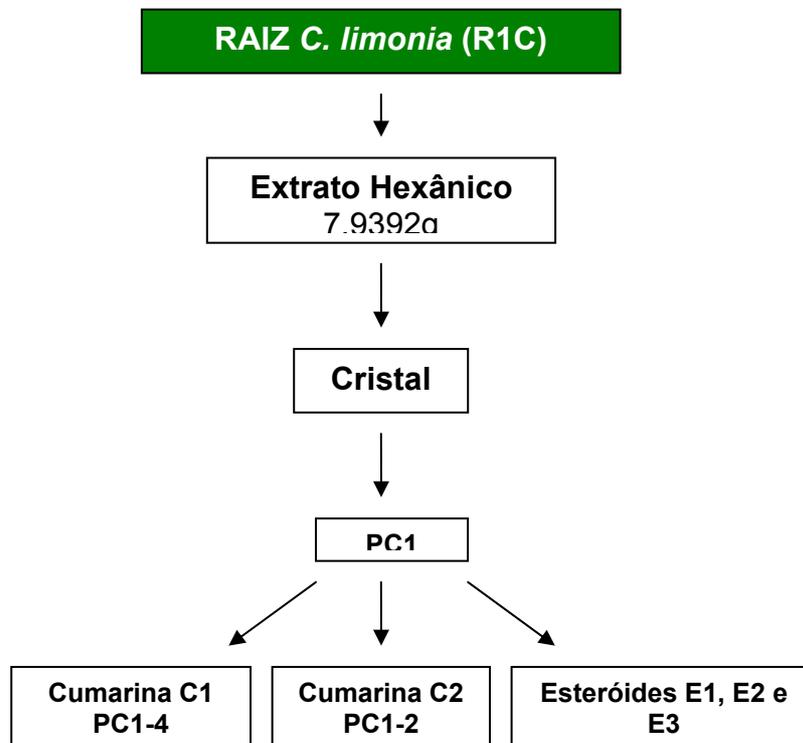
O extrato hexânico da raiz terminal de *C. limonia* (R1C) apresentou cristais, os quais foram removidos e fracionados separadamente. Logo após, os extratos hexânico e diclorometânico da R1C foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), com fase móvel Hexano: Acetato de Etila nas proporções: 9,5 : 0,5; 8,0 : 2,0; 6,0 : 4,0; 1,0 : 1,0; os resultados obtidos foram muito semelhantes, indicando que os compostos presentes nos dois extratos eram similares, então resolveu-se unir os dois extratos e trabalhar com eles agrupados.

### 3.1.3.1. Extrato Hexânico da R1C

Observou-se a formação de cristais neste extrato, então os separou e submeteu-os à Cromatografia em Coluna (CC). A massa obtida de cristais foi 0,0681 g, sendo aplicada em uma coluna de sílica gel (230-400 Mesh) (**PC1**), com diâmetro interno (DI) 2,0 cm e altura (h) 45,0 cm, eluída com: Hexano: Acetato de Etila (9,5 : 0,5), Hexano: Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano: Acetato de Etila (6,0 : 4,0). Foram obtidas 28 frações [PC1,1-28], as quais foram agrupadas de acordo a análise por CCDC.

A partir da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN),  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  - 200 MHz, identificou-se duas cumarinas distintas nas frações **PC1-2** (C2) e **PC1-4** (C1) e uma mistura de três esteróides **PC1-1** (E1, E2 e E3). A seguir encontra-se um esquema dos diversos fracionamentos do extrato hexânico até a obtenção das substâncias identificadas (Esquema 3.2).

ESQUEMA 3.2: Fracionamento do extrato hexânico da raiz terminal de *C. limonia* até a obtenção das substâncias.



### 3.1.3.2. Extrato Hexânico e Diclorometânico da R1C

Inicialmente, partiu-se de uma massa de 715,5 g da raiz terminal do *C. limonia* seca e triturada. Os extratos hexânico e diclorometânico da R1C foram comparados por CCDC e agrupados por apresentarem manchas com  $R_f$  (fator de retenção) semelhantes. Obteve-se 13,6764 g deste extrato, o qual foi submetido a uma coluna Sephadex LH-20 (**PC2**) com DI 4,00 cm e h 130 cm, eluída com DCM : MeOH 1:1, fornecendo 15 frações [PC2,1-15], as quais foram submetidas a outros refrações.

A escolha inicial de qual fração ser trabalhada ocorria a partir de uma análise inicial de RMN,  $^1\text{H}$  - 200 MHz, porém as demais frações não são descartadas devido ao mascaramento de sinais ocorrentes às vezes no espectro de RMN. Este procedimento foi freqüentemente utilizado em todo trabalho.

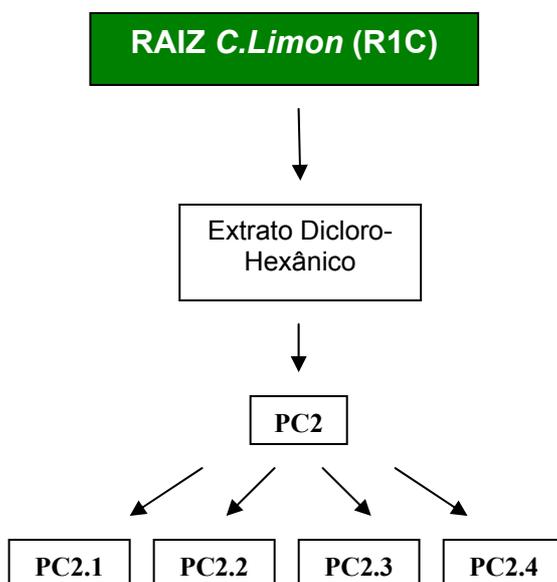
#### ❖ Refrações da fração **PC2**:

⇒ A fração PC2-6 (m = 0,9966 g) foi submetida à Cromatografia em Coluna (CC): Sephadex LH-20 (**PC2.1**), DI 2,5 cm x h 100 cm, eluída com Metanol 100%. Foram obtidas 22 frações [F2.1,1-22], as quais foram agrupadas de acordo a análise por CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refrações posteriormente.

⇒ A fração PC2-8 (m = 0,0463 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh) (**PC2.2**), DI 2,5 cm x h 22 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (9,5 : 0,5), Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,5 : 1,5), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0) , Metanol (100%). Obteve-se 155 frações, as quais foram reunidas por CCDC, segundo a sua similaridade em  $R_f$ , em 17 frações [PC2.2, 1-17]. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2-4 (m = 3,5196 g) foi submetida à CC: Sephadex LH-20 (**PC2.3**), DI 2,5 cm x h 118 cm, eluída com: Metanol : DCM (1,0 : 1,0). Obteve-se 6 frações [PC2.3, 1-6], as quais foram agrupadas de acordo a análise por CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refrações posteriormente.

⇒ A fração PC2-9 (m = 0,0364 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh) (**PC2.4**), DI 2,5 cm x h 61 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0) , Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila: Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol (100%). Obteve-se 18 frações [PC2.4, 1-18], as quais foram agrupadas de acordo a análise por CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.



❖ **Refrações da fração PC2.1:**

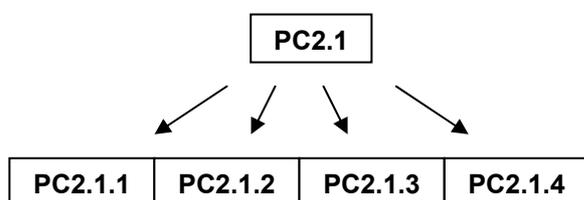
⇒ A fração PC2.1-7 (m = 0,0374 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh) (**PC2.1.1**), DI 1.0 cm x h 40 cm, eluída com: Hexano: Acetona (9,0 : 1,0), Hexano: Acetona (8,0 : 2,0), Hexano: Acetona (7,0 : 3,0), Hexano: Acetona (6,0 : 4,0), Hexano: Acetona (1,0 :1,0), Acetona (100%), Acetona: Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol (100%). Obteve-se 56 frações, as quais foram unidas em 12 outras [PC2.1.1, 1-12] de acordo as semelhanças apresentada na análise por CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refrações posteriormente.

⇒ A fração PC2.1-4 (m = 0,0781 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh) (**PC2.1.2**), DI 2,0 cm x h 35 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : DCM (9,0 : 1,0), Hexano : DCM (8,0 : 2,0), Hexano : DCM (7,0 : 3,0), Hexano : DCM (6,0 : 4,0), Hexano : DCM (1,0 : 1,0), Hexano : DCM (100%), DCM : Metanol (9,0 : 1,0), DCM : Metanol (8,0 : 2,0), DCM : Metanol (7,0 : 3,0), DCM : Metanol (6,0 : 4,0), DCM

: Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol (100%). Obteve-se 36 frações, as quais foram reunidas em 18 frações [PC2.1.2, 1-18], de acordo a similaridade em  $R_f$  apresentada na análise por CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.1-6 (m = 0,4135 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh) (**PC2.1.3**), DI 2,5 cm x h 26,5 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (9,5 : 0,5), Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano: Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Metanol (9,0 : 1,0), Acetato de Etila : Metanol (8,0 : 2,0), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol (100%). Obteve-se 100 frações, as quais foram reunidas por CCDC, segundo a sua similaridade em  $R_f$ , em 24 outras [PC2.1.3, 1-24]. Através dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, identificou-se na fração **PC2.1.3-10** uma flavanona (flavonóide F2) e nas frações **PC2.1.3-4**, **PC2.1.3-7**, **PC2.1.3-17**, **PC2.1.3-19** quatro cumarinas, sendo duas delas a C1 (PC2.1.3-7) e a C2 (PC2.1.3-4), as quais já haviam sido isoladas anteriormente na fração 1, e outras duas, C4 (PC2.1.3-17) e C5 (PC2.1.3-19), não isoladas até o momento.

⇒ A fração PC2.1-8 (m = 0,0182 g) foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (CLAE-R) (**PC2.1.4**), utilizando uma coluna C18 (ODS - octadecilsilano), DI 2,0 cm x h 25,0 cm, eluída com: Metanol : Água (7,0 : 3,0), em uma vazão de fluxo de 5 ml/min, loop 2.000 µL, realizando reciclo na coluna. Obteve-se 14 frações [PC2.1.4, 1-14H], as frações foram agrupadas de acordo a análise por CCDC. A partir dos dados de RMN 400 MHz (1D e 2D), verificou-se que a fração **PC2.1.4-13H** correspondia ao flavonóide F1.



❖ **Refração da fração PC2.1.1:**

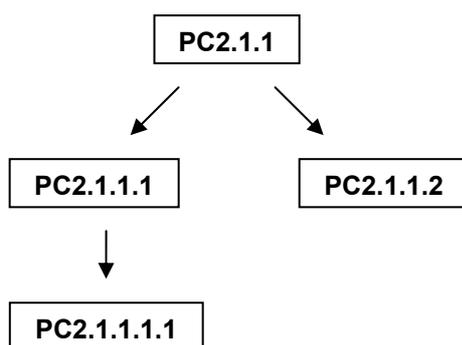
⇒ A fração PC2.1.1-5 (m = 16,1 mg) foi submetida à CLAE-R (**PC2.1.1.1**), utilizando uma coluna fenil, DI 2,5 cm x h 50,0 cm, eluída com: Metanol : Água (7,0 :

3,0), em uma vazão de fluxo de 2 mL/min, loop 400  $\mu$ L, realizando reciclo na coluna. Obteve-se 5 frações [PC2.1.1.1, 1-5H], as frações foram agrupadas de acordo com a CCDC. Através dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  200 MHz, identificou-se na fração **PC2.1.1.1-4** novamente o flavonóide F2.

⇒ A fração PC2.1.1-4 (m = 9,1 mg) foi submetida à CCDC (**PC2.1.1.2**), utilizando uma coluna de sílica, DI 1,5 cm x h 14,0 cm, eluída com: Hexano : Isopropanol (9,5 : 0,5), em uma vazão de fluxo de 2 mL/min, loop 400  $\mu$ L, comprimento de onda: 265 e 354 nm. Obteve-se 4 frações [PC2.1.1.2, 1-4], as frações foram agrupadas de acordo com a CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

❖ **Refração da fração PC2.1.1.1:**

⇒ A fração PC2.1.1.1-2H (m = 2,3 mg) foi submetida à CLAE-R (**PC2.1.1.1.1**), utilizando uma coluna C18, DI 2,0 cm x h 25,0 cm, eluída com: Metanol : Água (7,0 : 3,0) em uma vazão de fluxo de 5 mL/min, loop 2000  $\mu$ L, realizando reciclo na coluna. Obteve-se 6 frações [PC2.1.1.1.1, 1-6H], as frações foram agrupadas de acordo com a análise realizada por CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.



❖ **Refração da fração PC2.1.3:**

⇒ A fração PC2.1.3-11 (m = 0,0067 g) foi submetida à CLAE-R (**PC2.1.3.1**), utilizando uma coluna fenil, DI 2,5 cm x h 50,0 cm, eluída com: Metanol : Água (7,0 : 3,0), em uma vazão de fluxo de 2 mL/min, loop 400  $\mu$ L, realizando reciclo na coluna.

Obteve-se 9 frações [PC2.1.3.1, 1-9H], as quais foram agrupadas de acordo a análise por CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.1.3-5 (m = 26.6 mg) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh) (**PC2.1.3.2**), DI 2,0 cm x h 23,0 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Acetato de Etila : Metanol (9,0 : 1,0), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol (100%). Obteve-se 17 frações, as quais foram reunidas em 11 frações [PC2.1.3.2,1-11], após análise de CCDC. Através do espectro de RMN<sup>1</sup>H da fração PC2.1.3.2-2, verificou-se que esta substância era uma cumarina, C2, a qual já havia sido isolada anteriormente.

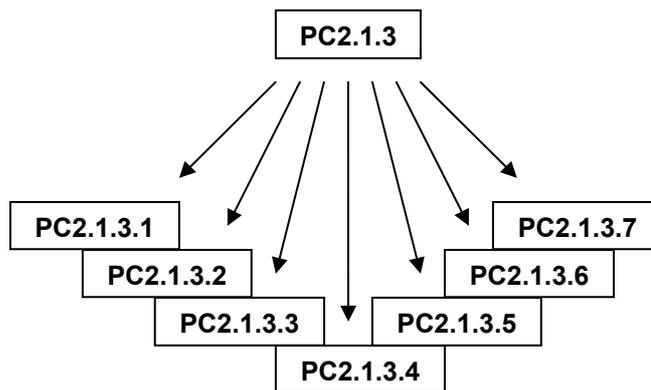
⇒ A fração PC2.1.3-16 (m = 16,0 mg) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), (**PC2.1.3.3**), DI 1,5 cm x h 14,0 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (9,5 : 0,5), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0), Metanol (100%). Obteve-se 24 frações, as quais foram reunidas em 15 outras [PC2.1.3.3,1-15] por análise da CCDC. A partir da análise do espectro de RMN<sup>1</sup>H da subfração PC2.1.3.3-9, identificou-se a cumarina C6.

⇒ A fração F2.1.3-15 (m = 128,5 mg) foi submetida à CC: Sephadex LH-20, (**PC2.1.3.4**), DI 2,0 cm x h 54,0 cm, eluída com Metanol. Obteve-se 11 frações, as quais foram reunidas em 7 frações [PC2.1.3.4,1-7] por análise de CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.1.3-13 (m = 50,0 mg) foi submetida à CLAE-R (**PC2.1.3.5**), utilizando uma coluna fenil, DI 2,5 cm x h 50,0 cm, eluída com: Metanol : Água (7,0 : 3,0), em uma vazão de fluxo de 2 mL/min, comprimento de onda 254 e 365 nm. Primeiramente, fez-se a corrida pelo modo analítico e para isto utilizou-se um loop de 20 µL, em seguida utilizou-se o modo preparativo com um loop de 400 µL. Foram necessárias 5 injeções, pois caso contrário haveria possibilidade de saturar a coluna, devido a quantidade de amostra injetada. Obteve-se 7 frações [PC2.1.3.5, 1-7], as quais foram agrupadas de acordo a análise por CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.1.3-20 (m = 54,2 mg) foi submetida à Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) (**PC2.1.3.6**), placa 20 cm x 20 cm, fase móvel: Hexano: Acetato de Etila 8,0 : 2,0. Obteve-se 2 manchas distintas, as quais foram removidas da placa e filtradas separadamente [PC2.1.3.6,1-2]. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.1.3-10 (m = 8,1 mg) foi submetida à CCDP (**PC2.1.3.7**), placa 20 cm x 20 cm, fase móvel: Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0). Obteve-se 4 manchas distintas, as quais foram removidas da placa e filtradas separadamente [PC2.1.3.7,1-4]. Foram realizadas duas aplicações da amostra na placa preparativa, para que não houvesse saturação da mesma. A partir da análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H verificou-se que a fração PC2.1.3.7-3 correspondia ao flavonóide F2 purificado.

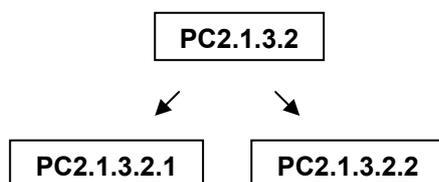


❖ **Refração da fração PC2.1.3.2:**

⇒ A fração PC2.1.3.2-2 (m = 22,9 mg) foi submetida à CCDP (**PC2.1.3.2.1**), placa 20 cm x 20 cm, fase móvel: Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0). Foi realizada duas aplicações. Obteve-se 3 manchas distintas em cada aplicação, as quais foram removidas da placa e filtradas [PC2.1.3.2.1,1-3]. Através do espectro de RMN <sup>1</sup>H da fração PC2.1.3.2.1-2, verificou-se que esta correspondia a cumarina C2 purificada.

⇒ A fração PC2.1.3.2-3 (m = 3,7 mg) foi submetida à CLAE-R (**PC2.1.3.2.2**), utilizando uma coluna C18 preparativa, DI 2,0 cm x h 25,0 cm, eluída com: Metanol : Água (6:4), com uma vazão de fluxo de 5 mL/min, loop 1000 µL, realizando reciclo na coluna, usando os comprimentos de onda 217 e 254 nm. Obteve-se 4 frações [PC2.1.3.2.2, 1-4], as frações foram agrupadas de acordo com a análise realizada

por CCDC. Através do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração PC2.1.3.2.2-1, verificou-se que esta correspondia a cumarina C2 purificada.



❖ **Refracionamento da fração PC2.3:**

⇒ A fração F2.3-4 ( $m = 1,0173$  g) foi submetida à CC: Coluna Sephadex LH-20, (**PC2.3.1**), DI 2,5 cm x h 101,5 cm, eluída com DCM : Metanol (1:1). Obteve-se 20 frações, as quais foram reunidas em 12 frações [PC2.3.1,1-12] por análise de CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refracionadas posteriormente.

⇒ A fração F2.3-5 ( $m = 0,0441$  g) foi submetida à CC: Sephadex LH-20, (**PC2.3.2**), DI 3,2 cm x h 64,0 cm, eluída com DCM : Metanol (1:1). Obteve-se 15 frações, as quais foram reunidas em 8 frações [PC2.3.2,1-8] por análise de CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refracionadas posteriormente.

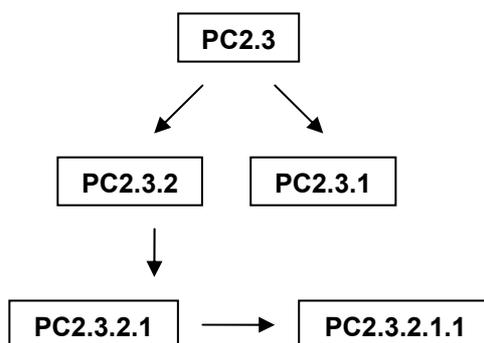
❖ **Refracionamento da fração PC2.3.2:**

⇒ A fração PC2.3.2-3 ( $m = 9,4$  mg) foi submetida à CC: Sephadex LH-20, (**PC2.3.2.1**), DI 2,0 cm x h 55,0 cm, eluída com Metanol 100%. Obteve-se 20 frações, as quais foram reunidas em 6 outras [PC2.3.2.1,1-6] por análise de CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refracionadas posteriormente.

❖ **Refracionamento da fração PC2.3.2.1:**

⇒ A fração PC2.3.2.1-1 ( $m = 7,1$  mg) foi submetida à CLAE-R (**PC23-2.3.2.1.1**), utilizando uma coluna polimérica, DI 2,5 cm x h 50 cm, eluída com Metanol : DCM (9:1), em uma vazão de fluxo de 2 mL/min, loop 1000  $\mu\text{L}$ , realizando reciclo na coluna. Obteve-se 3 frações [PC2.3.2.1.1, 1-3], as quais foram agrupadas de acordo com a análise realizada por CCDC. Estas foram descartadas, pois não

apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.



#### ❖ Refracionamento da fração PC2.3.1:

⇒ A fração PC2.3.1-7 (m = 49,8 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), (**PC2.3.1.1**), DI 2,5 cm x h 28,0 cm, eluída com Hexano 100%, Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila: Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol 100%. Obteve-se 26 frações, as quais foram reunidas em 12 outras [PC2.3.1.1,1-12] por análise de CCDC. A partir da análise dos espectros obtidos por RMN (1D e 2D) verificou-se que a fração PC2.3.1.1-4 correspondia a cumarina C8.

⇒ A fração PC2.3.1-9 (m = 0,2652 g) foi submetida à CC: Sephadex LH-20, (**PC2.3.1.2**), DI 3,0 cm x h 55,0 cm, eluída com Metanol 100%. Obteve-se 40 frações, as quais foram reunidas em 13 outras [PC2.3.1.2,1-13] por análise de CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

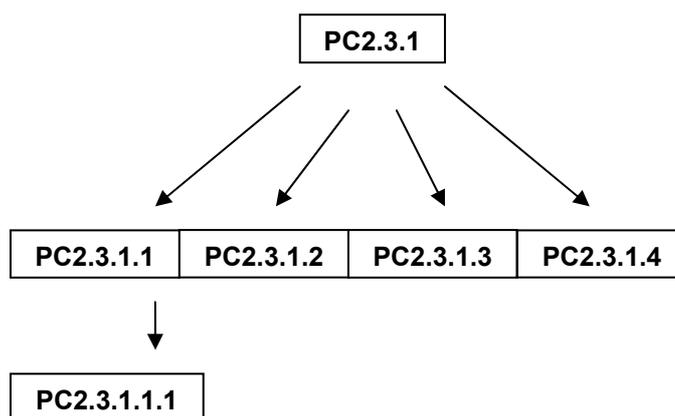
⇒ A fração PC2.3.1-9 (cristais solúveis em DCM e insolúveis em Metanol com m = 0,0678 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), (**PC2.3.1.3**), DI 2,5 cm x h 35,0 cm, eluída com Hexano 100%, Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila: Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol 100%. Obteve-se 17 frações, as quais foram reunidas em 12 outras [PC2.3.1.3,1-12] por análise de CCDC. Estas foram

descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.3.1-8 (m = 0,538 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), (PC2.3.1.4), DI 3,0 cm x h 40,0 cm. Eluída com Hexano 100%, Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila : Metanol (9,0 : 1,0), Acetato de Etila : Metanol (8,0 : 2,0), Acetato de Etila: Metanol (7,0 : 3,0), Acetato de Etila: Metanol (6,0 : 4,0), Acetato de Etila: Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol 100%. Obteve-se 44 frações, as quais foram reunidas em 21 outras [PC2.3.1.4,1-21] por análise de CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refrações posteriormente.

❖ **Refração da fração PC 2.3.1.1:**

⇒ A fração PC2.3.1.1-2 (m = 9,4 mg) foi submetida à CCDP (PC2.3.1.1.1), 20 cm x 20 cm, eluída com Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0). Obteve-se 3 manchas distintas, as quais foram removidas da placa e filtradas [PC2.3.1.1.1,1-3]. Através dos espectros de RMN 200MHz, identificou-se na fração PC2.3.1.1.1-2 a cumarina C1 e na fração PC2.3.1.1.1-1 a cumarina C2.



❖ **Refração da fração PC2.3.1.4:**

⇒ A fração PC2.3.1.4-4 (m = 62,0 mg) foi submetida à CC: Sephadex LH-20, (PC2.3.1.4.1), DI 3,0 cm x h 48,0 cm, eluída com Metanol DCM (1:1). Obteve-se 3 frações [PC2.3.1.4.1,1-3] por análise de CCDC. Estas foram descartadas, pois não

apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.3.1.4-11 (m = 27,3 mg) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh) (**PC2.3.1.4.2**), DI 2,0 cm x h 31,0 cm, eluída com Hexano 100%, Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila : MeOH (1,0 : 1,0) e MeOH 100%. Obteve-se 19 frações, as quais foram reunidas em 12 outras [PC2.3.1.4.2,1-12] por análise de CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.3.1.4-12 (m = 1,0189 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), (**PC2.3.1.4.3**), DI 3,0 cm x h 45,0 cm. Eluída com Hexano 100%, Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila: Metanol (1,0 : 1,0) e Metanol 100%. Obteve-se 9 frações, as quais foram reunidas em 4 outras [PC2.3.1.4.3,1-4] por análise de CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refrações posteriormente.

⇒ A fração PC2.3.1.4-6 (m = 0,1005 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), (**PC2.3.1.4.4**), DI 2,5 cm x h 37,0 cm, eluída com Hexano 100%, Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila 100%, Acetato de Etila : Metanol (1:1) e Metanol 100%. Obteve-se 28 frações, as quais foram reunidas em 14 outras [PC2.3.1.4.4,1-14] por análise de CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

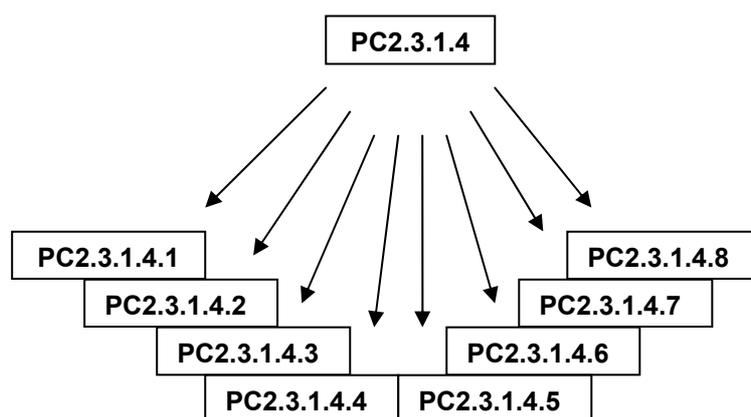
⇒ A fração PC2.3.1.4-10 (m = 8,5 mg) foi submetida à CC: Sephadex LH-20, (**PC2.3.1.4.5**), DI 2,0 cm x h 53,0 cm, eluída com Metanol: DCM (1:1). Obteve-se 8 frações, as quais foram reunidas em 3 outras [PC4.3.1.4.5,3-8] por análise de CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.3.1.4-12 (m = 10,3 g) foi submetida à CC: Sephadex LH-20, (**PC2.3.1.4.6**), DI 2,5 cm x h 37,0 cm, eluída com Metanol : DCM (1:1). Obteve-se 5 frações, as quais foram reunidas em 4 outras [PC2.3.1.4.6,1-4] por análise de

CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

⇒ A fração PC2.3.1.4-5 (m = 10,8 mg) foi submetida à CLAE-R (**PC2.3.1.4.7**), modo analítico, utilizando uma coluna fenil, DI 0,46 cm x h 25,0 cm, eluída com Metanol : Água (7,0 : 3,0) em uma vazão de fluxo de 0,25 mL/min, loop 200 µL. Posteriormente, realizou-se a CLAE-R no modo preparativo, sob mesmas condições, porém utilizando-se uma coluna fenil, DI 0,60 cm x h 25,0 cm. Foram realizadas 5 injeções, das quais obteve-se 16 frações [PC2.3.1.4.7, 1-16], as quais foram agrupadas de acordo com a análise realizada por CCDC. Através dos espectros de RMN<sup>1</sup>H, identificou-se na fração **PC2.3.1.4.7-16** a cumarina C2 e na fração **PC2.3.1.4.7-14** a cumarina C3.

⇒ A fração PC2.3.1.4-16 (m = 26,8 mg) foi submetida à CLAE-R (**PC2.3.1.4.8**), modo analítico, utilizando uma coluna fenil, DI 0,46 cm x h 25,0 cm, eluída com: Metanol : Água (7,0 : 3,0), num fluxo de 0,25 mL/min, loop 200 µL. Posteriormente, realizou-se a CLAE-R no modo preparativo, sob mesmas condições, porém utilizando-se uma coluna fenil, DI 0,60 cm x h 25,0 cm. Foram realizadas 3 injeções, das quais obteve-se 4 frações [PC2.3.1.4.8, 1-4], as quais foram agrupadas de acordo com a análise realizada por CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.



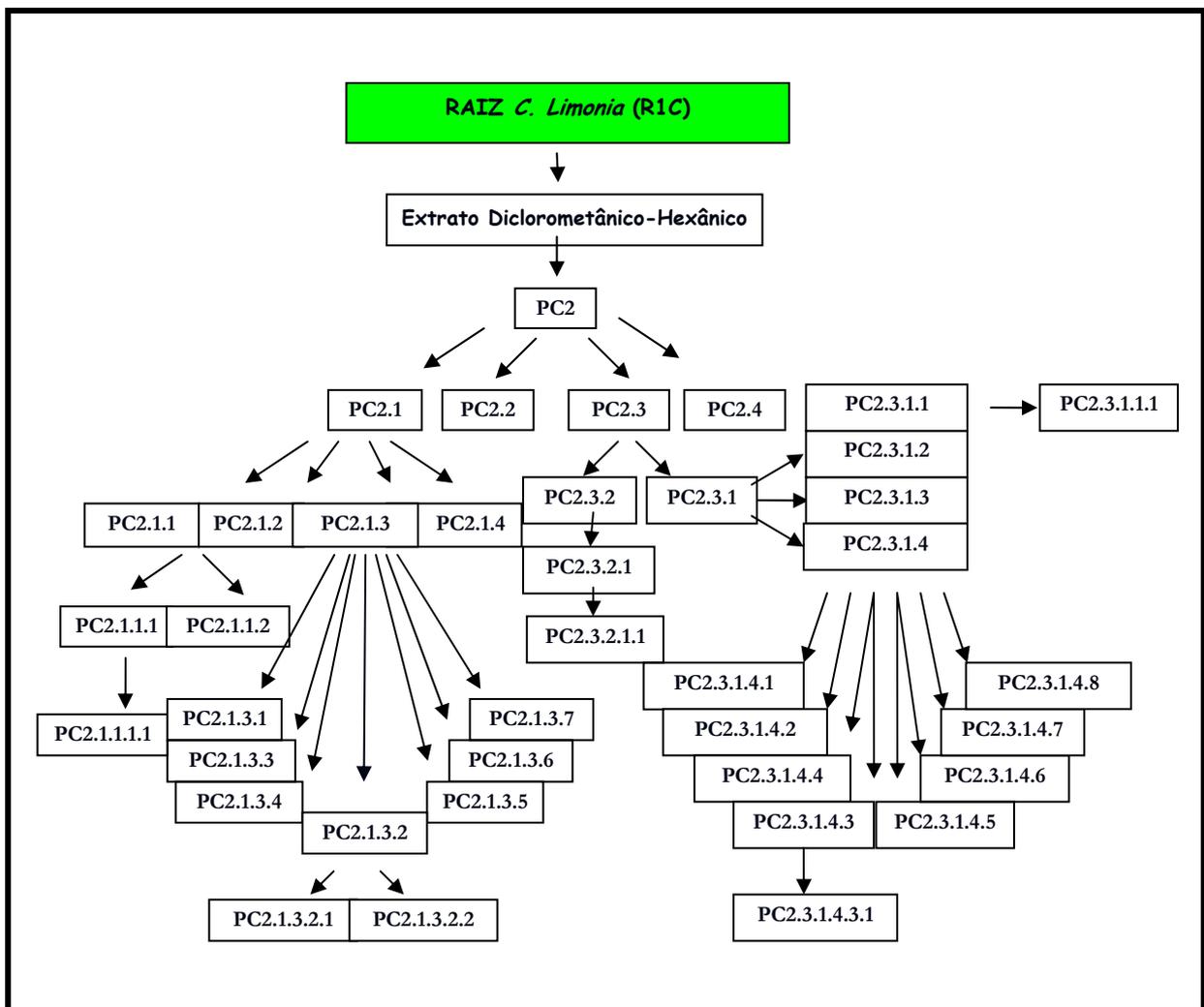
#### ❖ Refracionamento da fração PC2.3.1.4.3:

⇒ A fração PC2.3.1.4.3-4 (m = 63,4 mg) foi submetida à CLAE-R (**PC2.3.1.4.3.1**), modo analítico, utilizando uma coluna fenil, DI 0,46 cm x h 25,0 cm, eluída com: Metanol : Água (7,0 : 3,0), em uma vazão de fluxo de 0,25 mL/min, loop

200 µL. Posteriormente, realizou-se a CLAE-R no modo preparativo, sob as mesmas condições, porém utilizando-se uma coluna fenil, DI 0,60 cm x h 25,0 cm. Foram realizadas 6 injeções, das quais obteve-se 3 frações [PC2.3.1.4.3.1, 1-3], as quais foram agrupadas de acordo com a análise realizada por CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refrações.

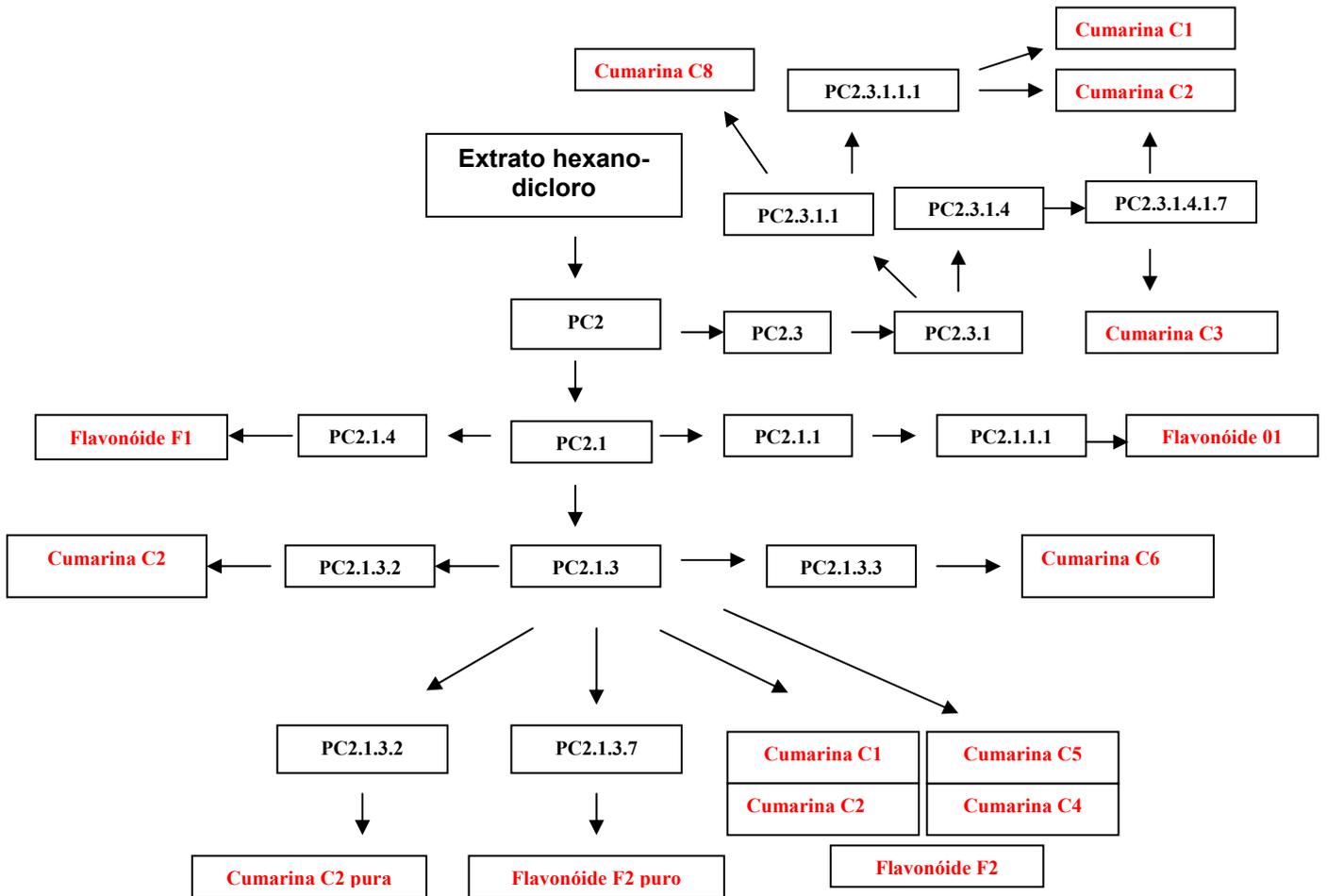
O Esquema 3.3 representa todos os fracionamentos e refrações realizados do extrato R1C.

ESQUEMA 3.3: Fracionamento de todo o extrato diclorometânico-hexânico.



O Esquema 3.4 mostra os refrações realizados até a obtenção das substâncias isoladas.

ESQUEMA 3.4: Fracionamento do extrato diclorometânico-hexânico até a obtenção das substâncias isoladas.



### 3.1.3.3. Extrato Metanólico da R1C

O extrato metanólico da raiz terminal de *C.limonia* (m = 13,7204 g) foi submetido à um fracionamento, utilizando-se uma coluna de Sephadex LH-20, (PC3), com DI 4,5 cm x h 130,0 cm, a qual foi eluída com: Metanol (100%), Metanol:DCM (1:1) e DCM (100%). Obteve-se 61 frações, as quais foram reunidas em 3 outras (PC3,1-3) após a análise de CCDC.

#### ❖ Refracionamento da fração PC3:

⇒ A fração PC3-2 (m = 0,6203 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh) (**PC3.1**), DI 3,5 cm x h 22,5 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (9,5 : 0,5), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0), Metanol (100%). Obteve-se 41 outras, as quais foram reunidas em 24 frações [F16,1-24] por análise de CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refracionadas posteriormente.

#### ❖ Refracionamento da coluna PC3.1:

⇒ A fração PC3.1-22 (m = 12,6 mg) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), (**PC3.1.1**), DI 2,5 cm x h 9,5 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0), Metanol (100%). Obteve-se 41 frações, as quais foram reunidas em 23 outras devido à análise de CCDC. Através dos espectros de RMN 200 MHz, e espectrometria de massas, identificou-se nas frações **PC3.1.1-7** e **PC3.1.1-4** a cumarina C7.

⇒ A fração PC3.1-4 (m = 55,3 mg) foi submetida à CCDP (**PC3.1.2**), 20 cm x 20 cm, eluída com Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0). Obteve-se 4 manchas distintas, as quais foram removidas da placa e filtradas [PC3.1.2,1-3]. Através dos espectros de RMN 200MHz, identificou-se na fração **PC3.1.2-2** a cumarina C1.

⇒ A fração PC3.1-11 (m = 0,3097 g) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), (**PC3.1.3**), DI 2,5 cm x h 38,0 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano :

Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0), Metanol (100%). Obteve-se 26 frações, as quais foram reunidas em 13 outras [PC3.1.3,1-13] devido à análise de CCDC. Algumas destas foram descartadas e outras refractionadas posteriormente.

⇒ A fração PC3.1-5 (m = 42,1 mg) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), **(PC3.1.4)**, DI 2,0 cm x h 30,0 cm. Eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (9,0 : 1,0), Hexano : Acetato de Etila (8,0 : 2,0), Hexano : Acetato de Etila (7,0 : 3,0), Hexano : Acetato de Etila (6,0 : 4,0), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0), Metanol (100%). Obteve-se 32 frações, as quais foram reunidas em 12 outras [PC3.1.4,1-12] devido à análise de CCDC. A partir da análise de RMN (1D e 2D) verificou-se que a fração PC3.1.4-3 correspondia a cumarina C9 e que a fração PC3.1.4-9 referia-se as cumarinas C5 e C11.

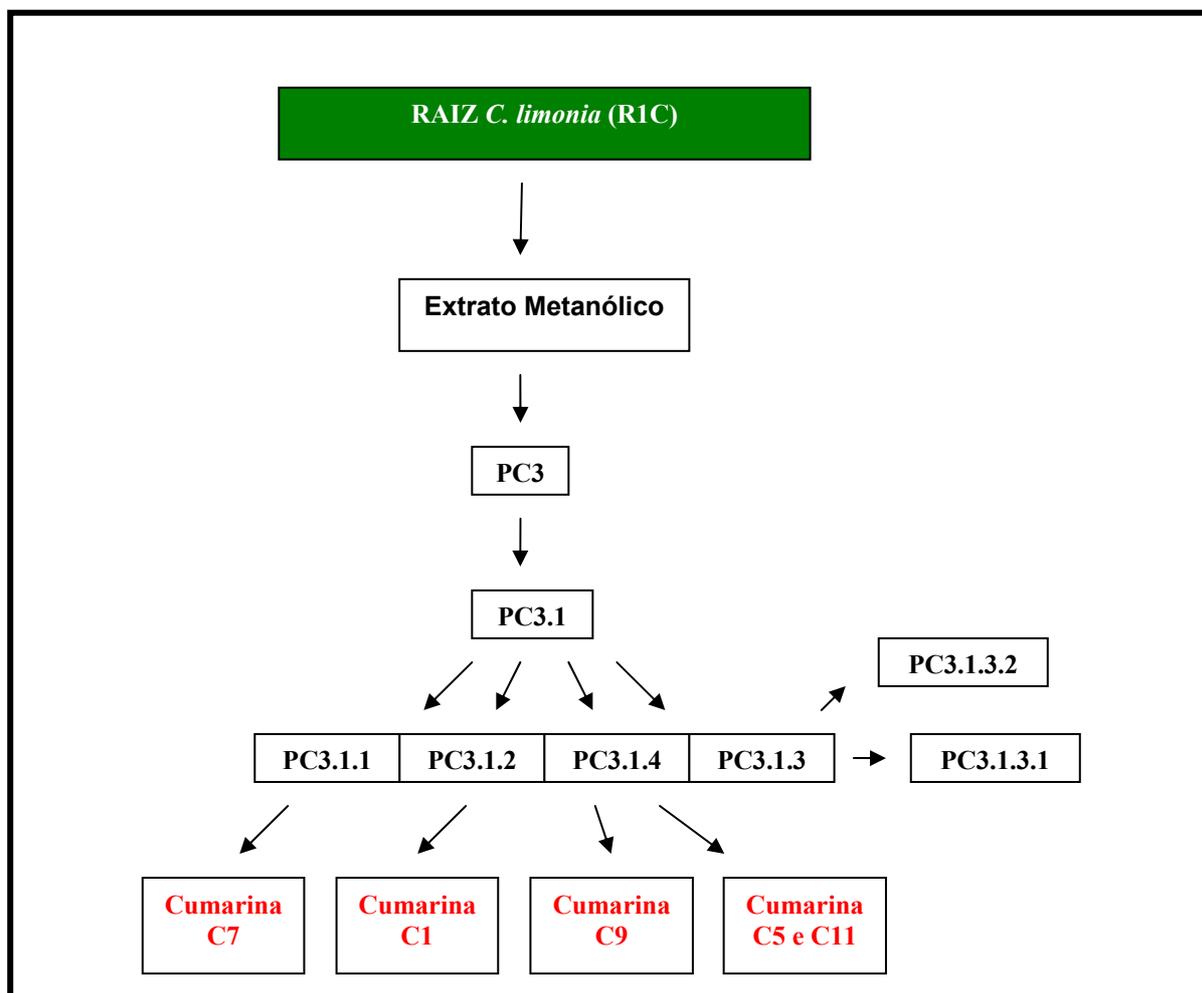
#### ❖ **Refractionamento da fração PC3.1.3:**

⇒ A fração PC3.1.3-7 (m = 51,6 mg) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), **(PC3.1.3.1)**, DI 2,0 cm x h 38,0 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0), Metanol (100%). Obteve-se 24 frações, as quais foram reunidas em 17 outras [PC3.1.3.1,1-17] devido à análise de CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refractionamentos.

⇒ A fração PC3.1.3-9 (m = 44,3 mg) foi submetida à CC: Sílica gel (230-400 Mesh), **(PC3.1.3.2)**, DI 2,0 cm x h 42,5 cm, eluída com: Hexano (100%), Hexano : Acetato de Etila (1,0 : 1,0), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Metanol (1,0 : 1,0), Metanol (100%). Obteve-se 10 frações, as quais foram reunidas em 7 outras [PC3.1.3.2,1-7] devido à análise de CCDC. Estas foram descartadas, pois não apresentaram compostos interessantes em quantidades suficientes para outros refractionamentos.

O Esquema 3.5, p.54, representa todo o fracionamento realizado no extrato metanólico de R1C até a obtenção das substâncias.

ESQUEMA 3.5: Fracionamento do extrato metanólico até a obtenção das substâncias isoladas.



Toda a metodologia empregada no estudo fitoquímico, desde a coleta do material vegetal até a identificação das substâncias, está ilustrada na Figura 3.1 (p. 55).

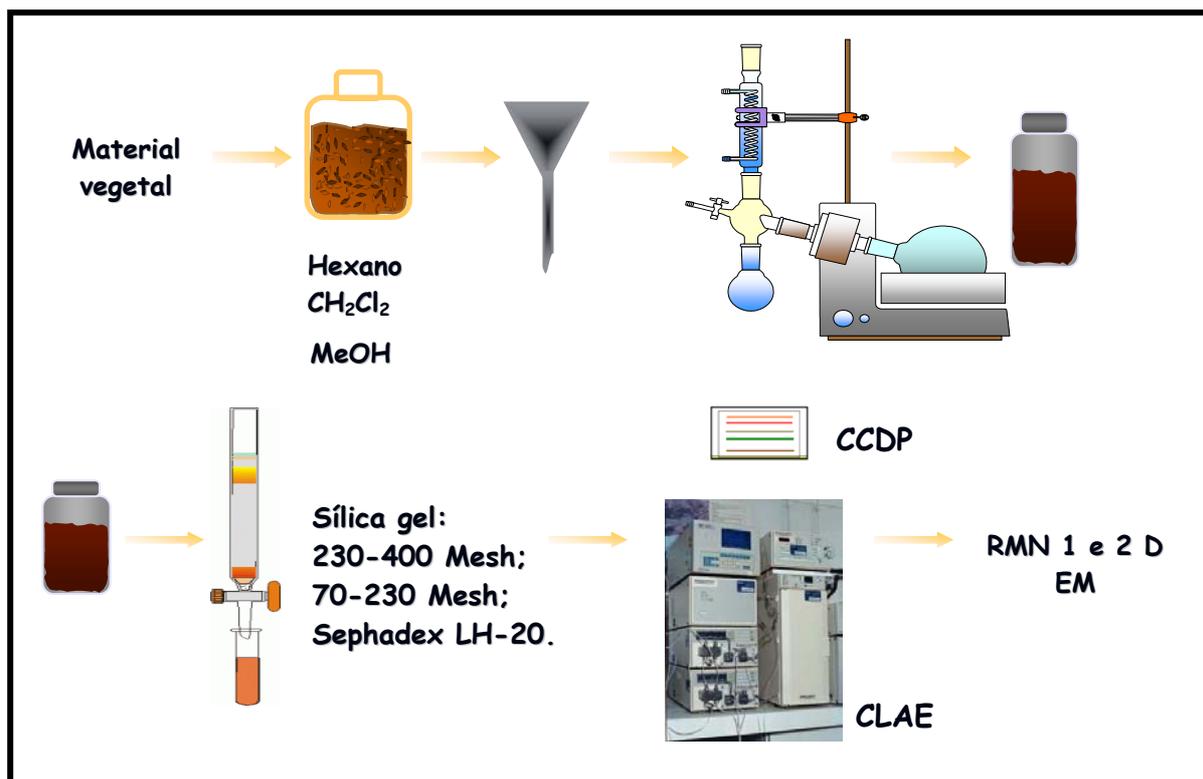
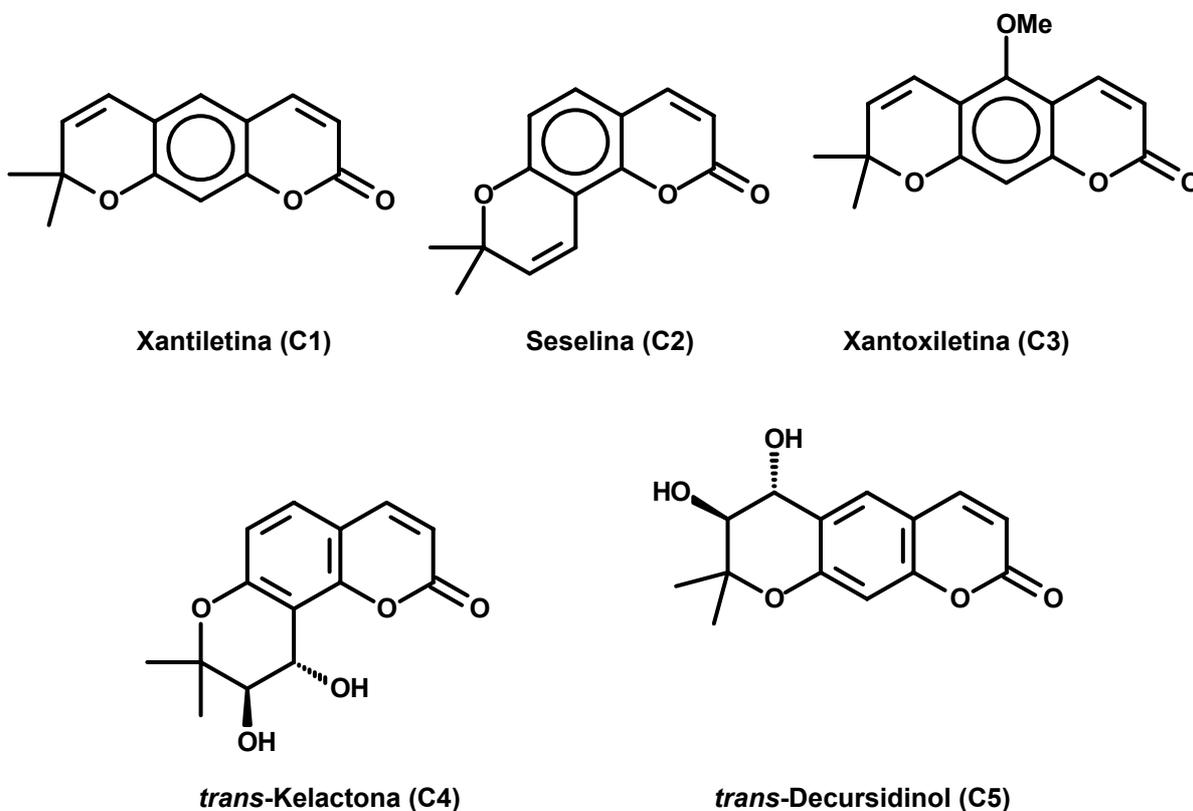


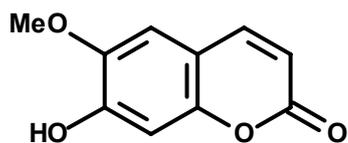
FIGURA 3.1: Metodologia utilizada no Estudo Fitoquímico: extração, purificação e identificação das substâncias isoladas.

## 3.2. Resultados e Discussão

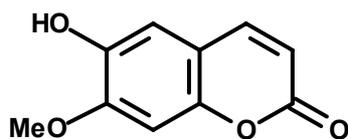
### 3.2.1. Determinação Estrutural dos Compostos Isolados

Foram isolados e identificados estruturalmente dezesseis compostos da raiz do *C. limonia* (Figura 3.2), sendo onze cumarinas: xantiletina (C1), seselina (C2), xantoxiletina (C3), 8-diidroxipiranocumarina: *trans*-kelactona (C4), 6-diidropiranoxicumarina: *trans*-decursidinol (C5), 6-metóxi-7-hidroxicumarina: escopoletina (C6), 6-hidróxi-7-metoxicumarina: isoescopoletina (C7), Éster kellactona: junosmarina (C8), 6-prenil-7-hidroxicumarina: demetilsuberosina (C9), clausarina (C10) e 3-hidróxi-2-(1-hidróxi-1-metiléter)-2,3-dihidrofurano[3,2-g]cromen-7-ona: xantoarnol (C11); dois flavonóides, sendo uma flavona: 4',5'-dihidroxi-2''2''dimetilpirano (5'',6'':7,8)flavona: limonianina (F1) e uma flavanona: 5,4'-diidróxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6'':7,8)(flavanona (F2); e três esteróides,  $\beta$ -sitosterol (E1), estigmasterol (E2) e campesterol (E3).

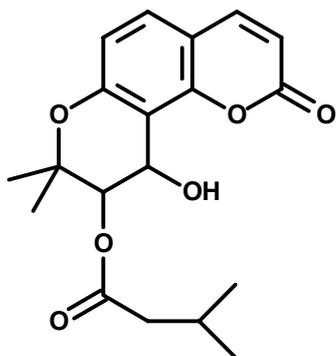




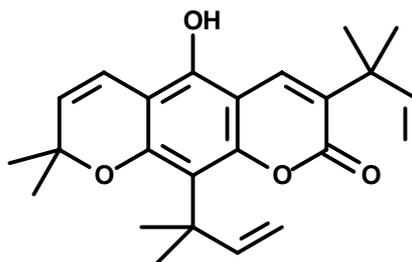
Escopoletina (C6)



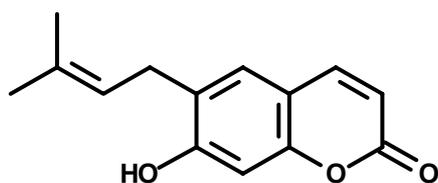
Isoescopoletina (C7)



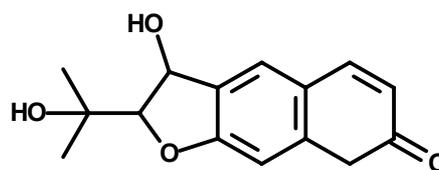
Junosmarina (C8)



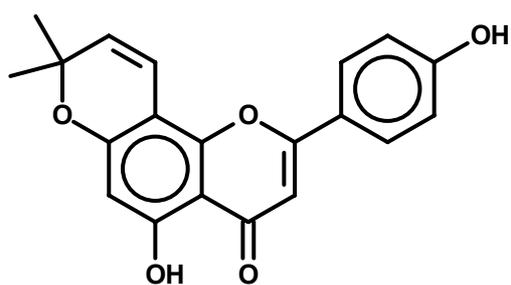
Clausarina (C10)



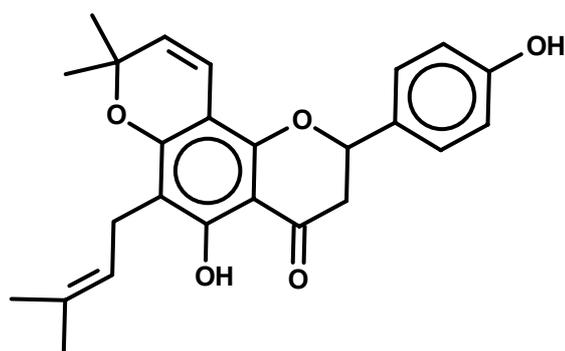
Demetilsuberosina (C9)



Xantoarnol (C11)



Limonianina (F1)



5,4'-diidróxi-6-(3'''-metil-2'''-butenil)-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)flavanona (F2)

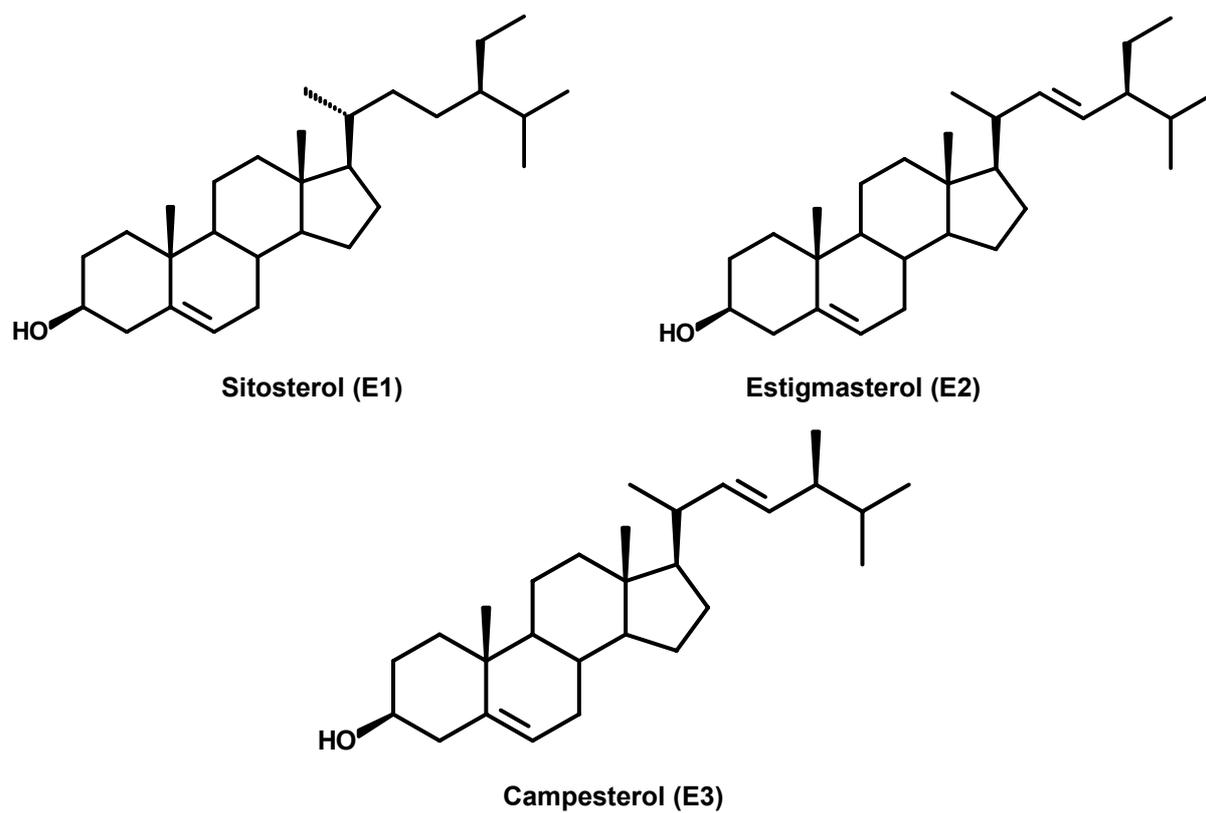


FIGURA 3.2: Substâncias isoladas da raiz terminal de *C. limonia*.

### 3.2.1.1. Determinação estrutural da Cumarina C1

Foi isolado 15,7 mg da cumarina C1 na subfração PC1-4. Analisando-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.4, p.61), observa-se os sinais característicos de cumarinas, como a presença de dois dubletos com deslocamentos químicos ( $\delta$ ) 7,57 ( $J = 9,4$  Hz, 1H) e 6,21 ( $J = 9,4$  Hz, 1H) referentes aos sinais dos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente. O sinal de H-4 encontra-se menos blindado (campo mais alto), devido a conjugação da ligação dupla com a carboxila da lactona.

A presença de dois dubletos em  $\delta$  6,33 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) e  $\delta$  5,67 ( $J = 10,0$  Hz, 1H), e de um singlete em  $\delta$  1,46 (6H), são característicos de um anel pirano. O sinal do H-3' ( $\delta$  5,67) apresenta-se mais blindado, pois há conjugação dos pares de elétrons do sistema aromático com a ligação dupla do anel pirano. Pode-se dizer que este anel encontra-se nas posições 6 e 7, devido à presença de dois singletos com  $\delta$  6,71 (1H) e  $\delta$  7,03 (1H), referentes aos sinais dos hidrogênios 8 e 5, respectivamente. O sinal do H-8 é o mais blindado, pois encontra-se vizinho a dois carbonos contendo oxigênio como substituinte. Os sinais observados no espectro de hidrogênio foram comparados com a literatura (STECK, 1971), conforme ilustrado na Tabela 3.2, p.60.

Realizou-se o experimento de RMN  $\text{C}^{13}$  (Figura 3.6, p.62), onde atribui-se os deslocamentos químicos de cada sinal ao carbono correspondente e verificou-se que os sinais observados são bem próximos aos encontrados na literatura (STECK, 1971). Com estes dados pode-se concluir que a cumarina isolada corresponde a Xantiletina.

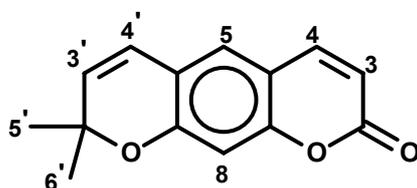


FIGURA 3.3: Estrutura da cumarina Xantiletina.

TABELA 3.2: Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) e  $\text{C}^{13}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1 em comparação com os dados da literatura.

Posição	$\delta\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta\text{C}$	$\delta^*\text{H}$	$J^*$ (Hz)	$\delta\text{C}^*$
2	-	-	161,1	-	-	161,2
3	6,21 (d)	9,4	131,2	6,22 (d)	9,2	131,2
4	7,57 (d)	9,4	143,3	7,59 (d)	9,2	143,4
4a	-	-	112,7	-	-	112,7
5	7,03 (s)	-	124,7	7,05 (s)	-	124,8
6	-	-	118,5	-	-	118,5
7	-	-	156,8	-	-	156,8
8	6,71 (s)	-	120,7	6,72 (s)	-	120,8
8a	-	-	155,4	-	-	155,4
2'	-	-	77,6	-	-	77,7
3'	5,67 (d)	10,0	104,3	5,69 (d)	9,6	104,4
4'	6,33 (d)	10,0	112,9	6,34 (d)	9,6	113,0
5' - 6'	1,46 (s)	-	28,3	1,46 (s)	-	28,3

$\delta^*$  e  $J^*$  são os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos da literatura (STECK, 1971).

A partir da comparação dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da cumarina C1 e das frações PC2.1.3-7, PC2.3.1.1.1-2, PC3.1-4M, PC3.1.2-4M, concluiu-se que todas estas correspondem a Xantiletina, totalizando 0,2922 g desta cumarina, a qual já havia sido isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

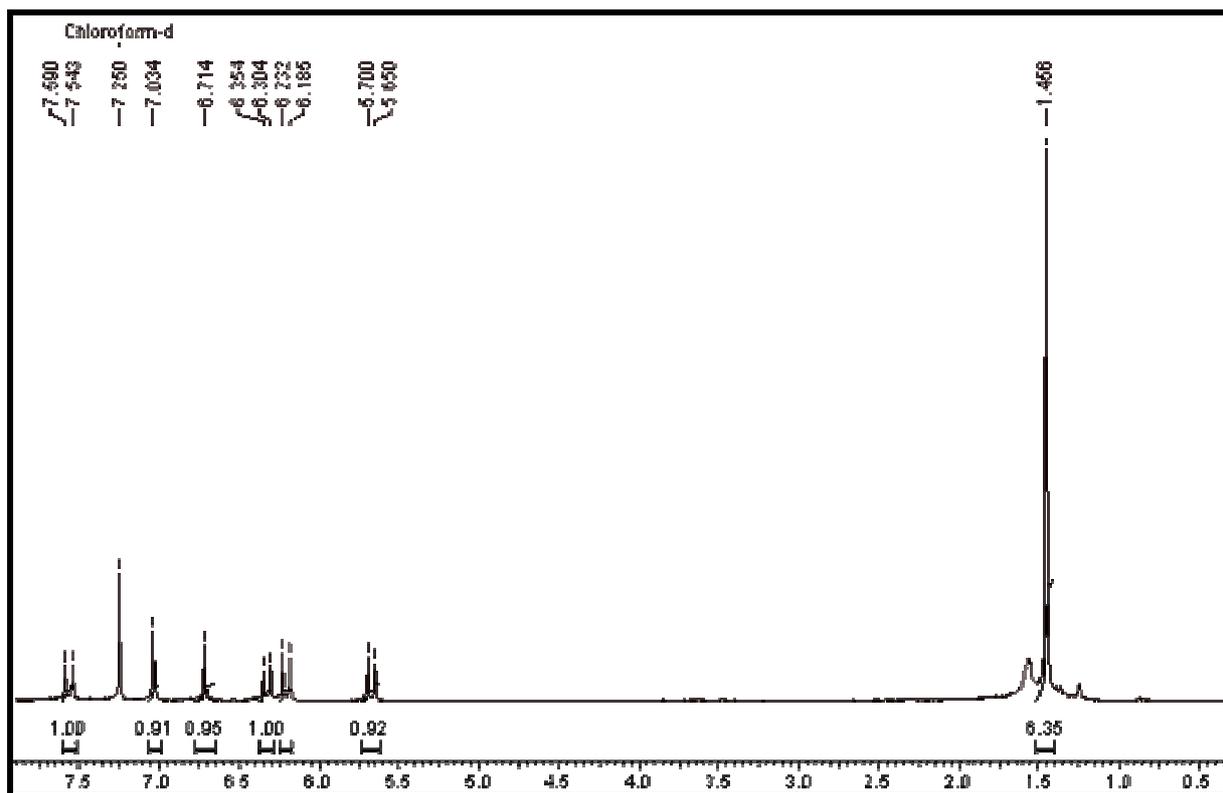


FIGURA 3.4: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1.

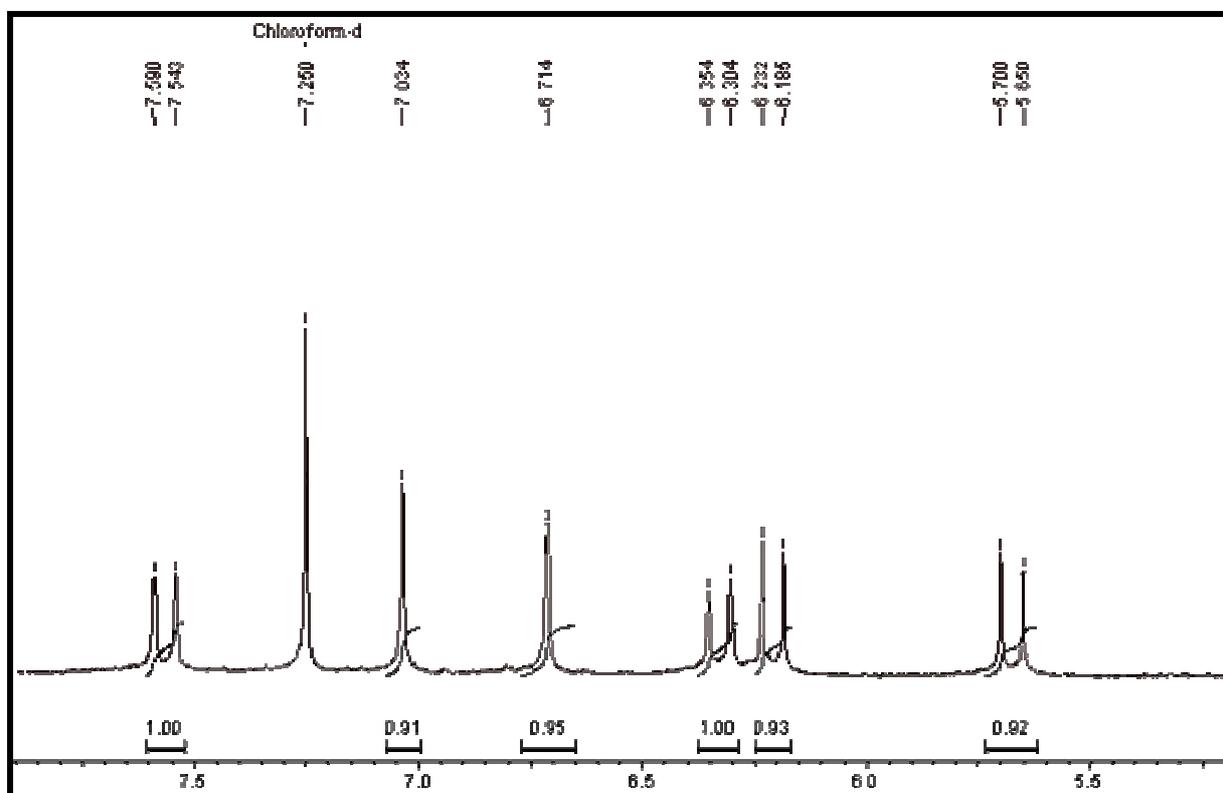


FIGURA 3.5: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1.

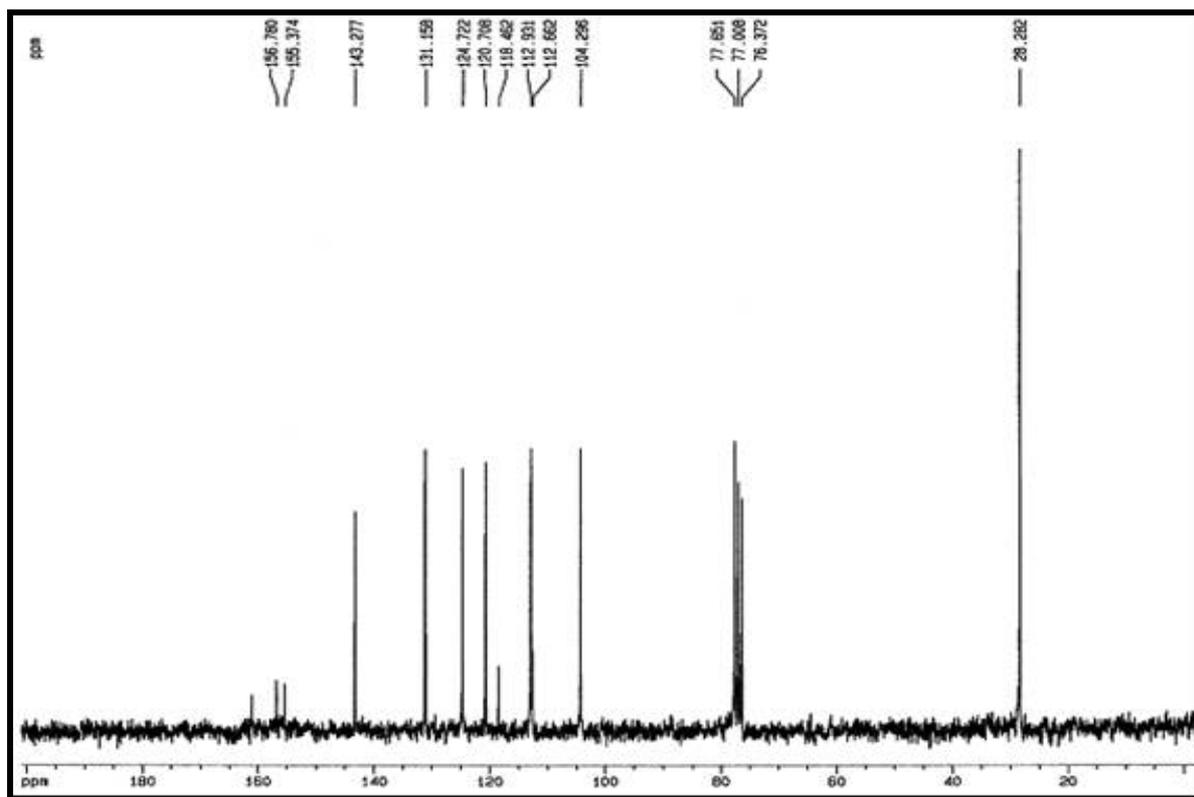


FIGURA 3.6: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1.

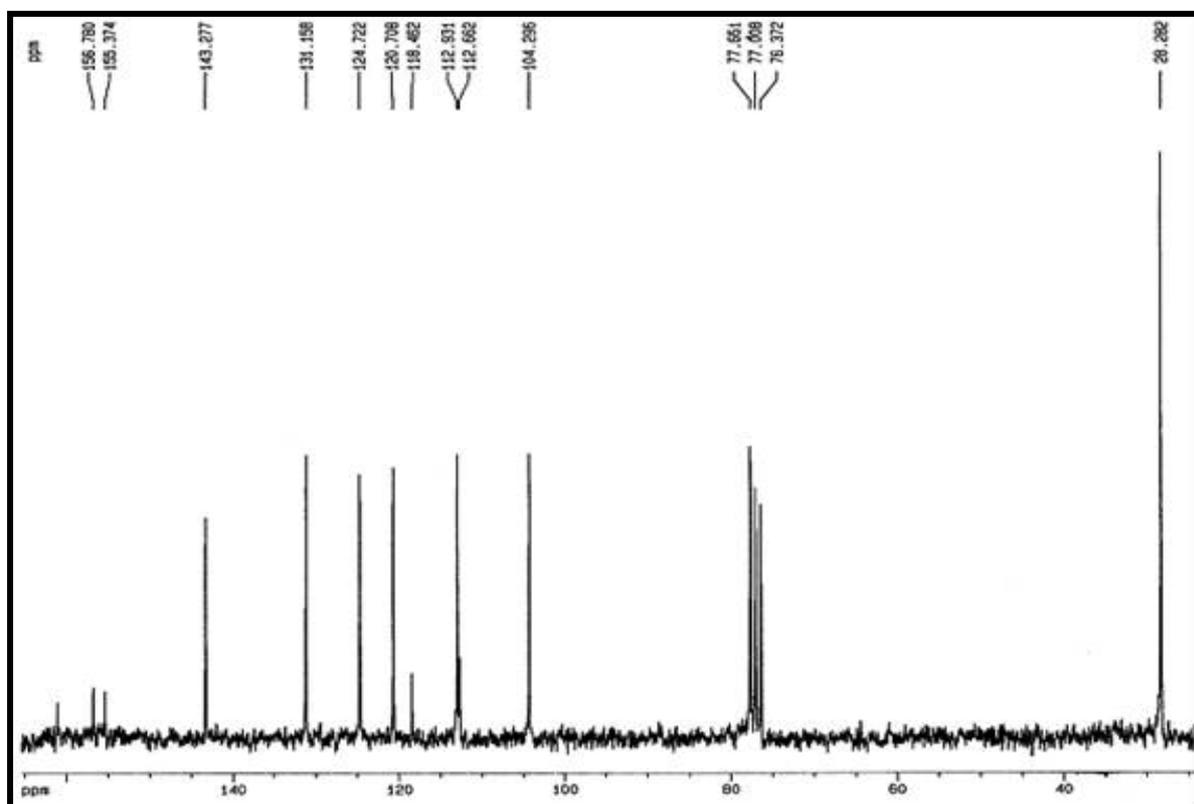


FIGURA 3.7: Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C1.

### 3.2.1.2. Determinação estrutural da Cumarina C2

Oteve-se 4,0 mg da cumarina C2 na subfração PC1-2 e, a partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.9, p.65), verificou-se os sinais de dois dubletos em  $\delta$  7,58 ( $J = 9,6$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,20 ( $J = 9,6$  Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente, os quais são característicos de cumarina. Observou-se também os sinais característicos do anel pirano, dois dubletos em  $\delta$  6,86 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) e  $\delta$  5,71 ( $J = 10,0$  Hz, 1H); e um singleto em  $\delta$  1,45 (6 H). A presença de dois dubletos em  $\delta$  7,19 (H-5, 1H) e  $\delta$  6,70 (H-6, 1H) com constante “orto”  $J = 8,4$  Hz, sugerem que o anel pirano encontra-se na posição 7 e 8. Comparou-se os sinais no espectro de hidrogênio com a literatura (AHMAD, 1984), os quais encontram-se ilustrados na Tabela 3.3, p.64.

Realizou-se o experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 3.11, p.66), onde os sinais observados foram bem próximos aos relatados na literatura (Tabela 3.3, p.64). Com estes dados pode-se concluir que a cumarina isolada corresponde a Seselina.

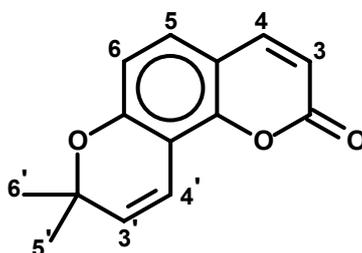


FIGURA 3.8: Estrutura da cumarina Seselina.

TABELA 3.3: Dados de RMN  $H^1$  ( $CDCl_3$ , 200 MHz) e  $C^{13}$  ( $CDCl_3$ , 200 MHz) da cumarina C2 em comparação com os dados da literatura.

Posição	$\delta H$	$J$ (Hz)	$\delta C$	$\delta^* H$	$J^*$ (Hz)	$\delta C^*$
2	-	-	161,0	-	-	161,1
3	6,20 ( <i>d</i> )	9,6	130,7	6,23 ( <i>d</i> )	9,6	130,7
4	7,58 ( <i>d</i> )	9,6	143,9	7,60 ( <i>d</i> )	9,6	143,9
4a	-	-	109,3	-	-	109,4
5	7,19 ( <i>d</i> )	8,4	127,7	7,21 ( <i>d</i> )	8,4	127,7
6	6,70 ( <i>d</i> )	8,4	115,0	6,72 ( <i>d</i> )	8,4	115,0
7	-	-	156,3	-	-	156,4
8	-	-	-	-	-	122,6
8a	-	-	150,1	-	-	150,1
2'	-	-	77,6	-	-	77,6
3'	5,71 ( <i>d</i> )	10,0	112,6	5,73 ( <i>d</i> )	10,0	112,6
4'	6,86 ( <i>d</i> )	10,0	113,5	6,89 ( <i>d</i> )	10,0	113,5
5'-6'	1,45 ( <i>s</i> )	-	28,1	1,48 ( <i>s</i> )	-	28,1

$\delta^*$  e  $J^*$  são os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos da literatura (AHMAD, 1984).

Comparando-se o espectro de RMN  $^1H$  da cumarina C2 com os espectros das frações PC2.1.3-4, PC2.1.3.2-2, PC2.3.1.4.4-2, PC2.3.1.4.7-16 e PC3.1.2-1M, concluiu-se que todas estas frações correspondem a mesma cumarina, portanto, isolou-se um total de 129,4 mg de seselina. Esta substância não havia sido isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

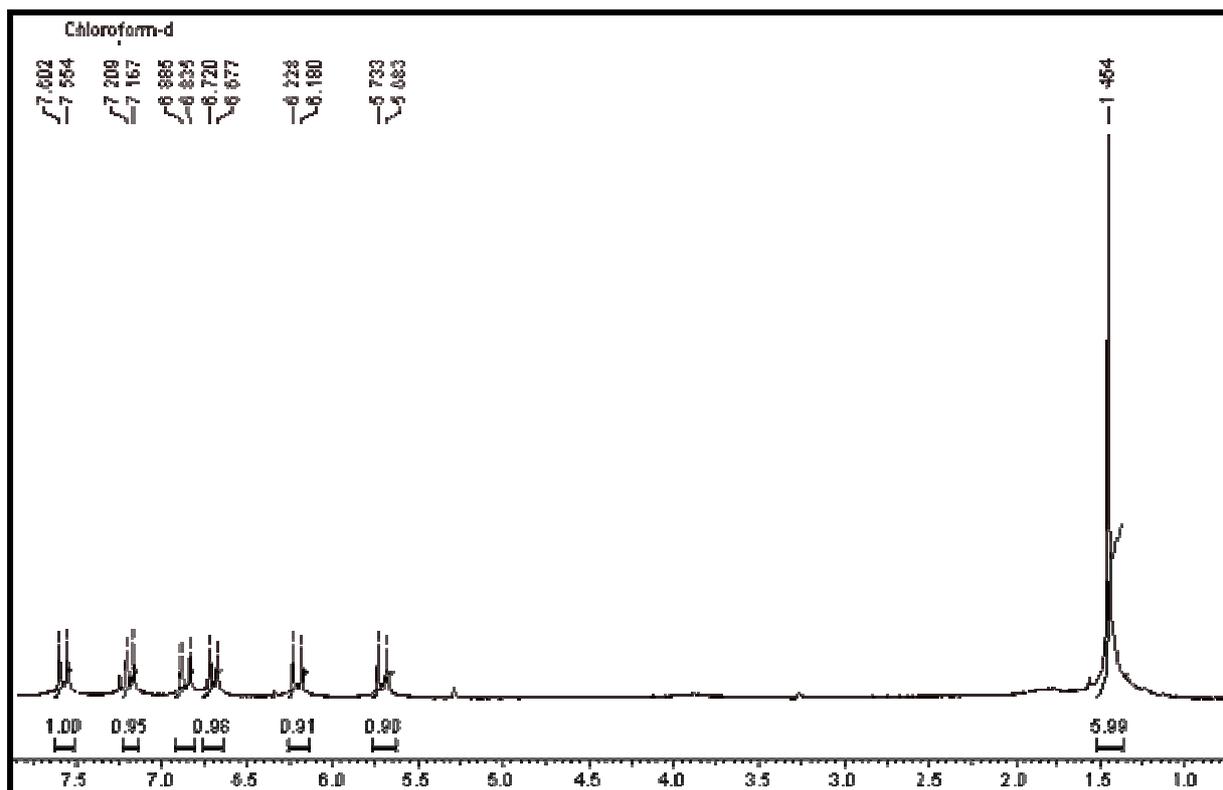


FIGURA 3.9: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) da cumarina C2.

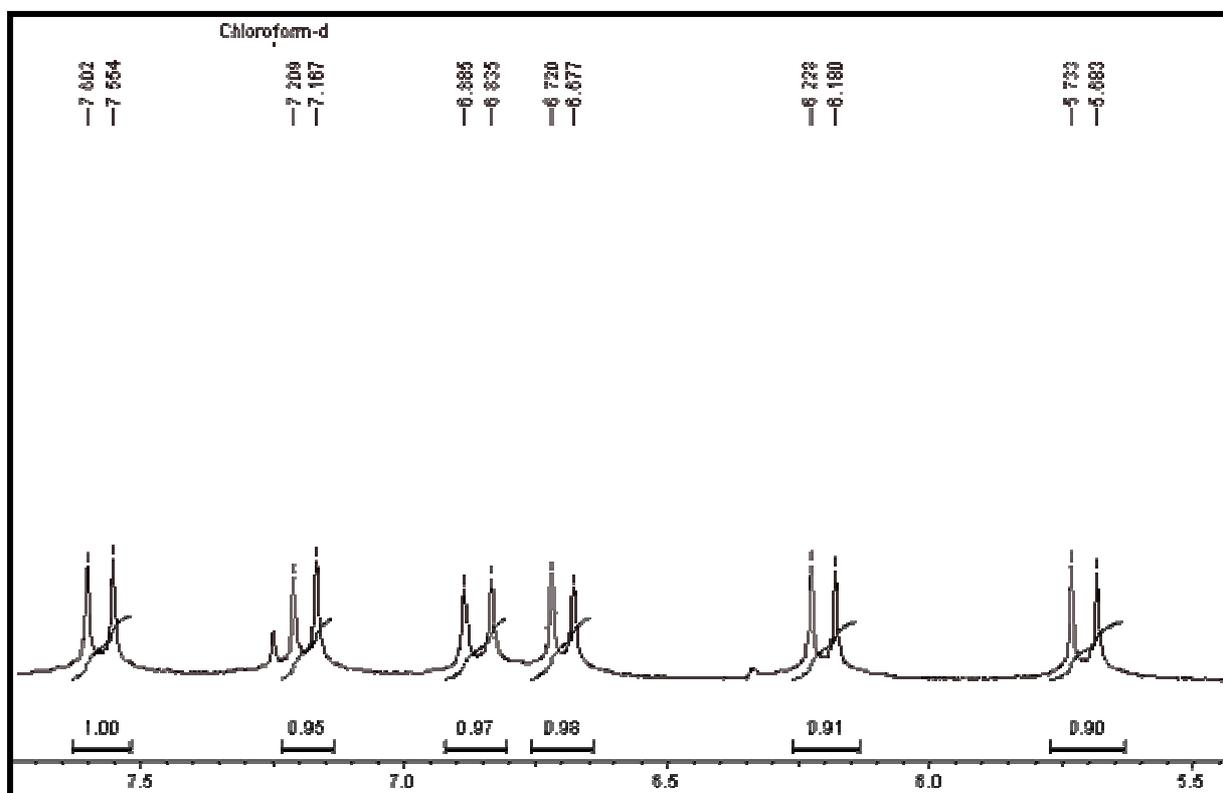


FIGURA 3.10: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) da cumarina C2.

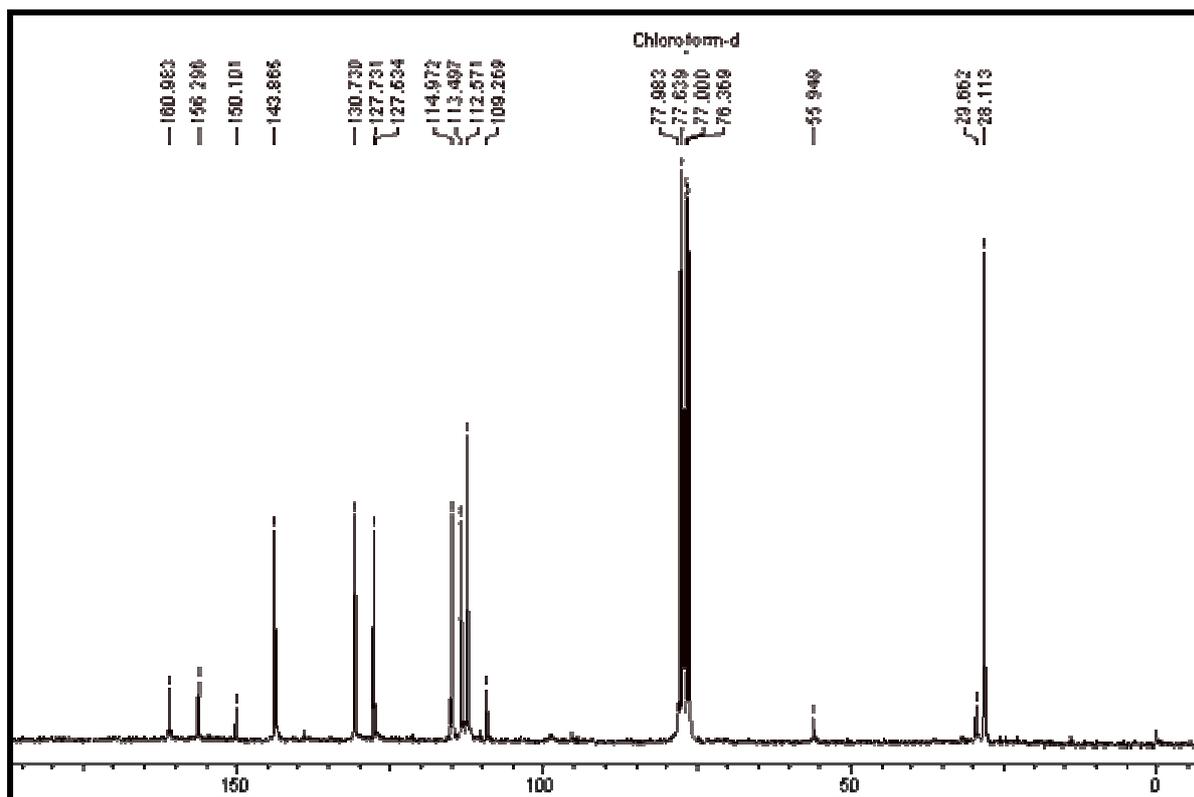


FIGURA 3.11: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) da cumarina C2.

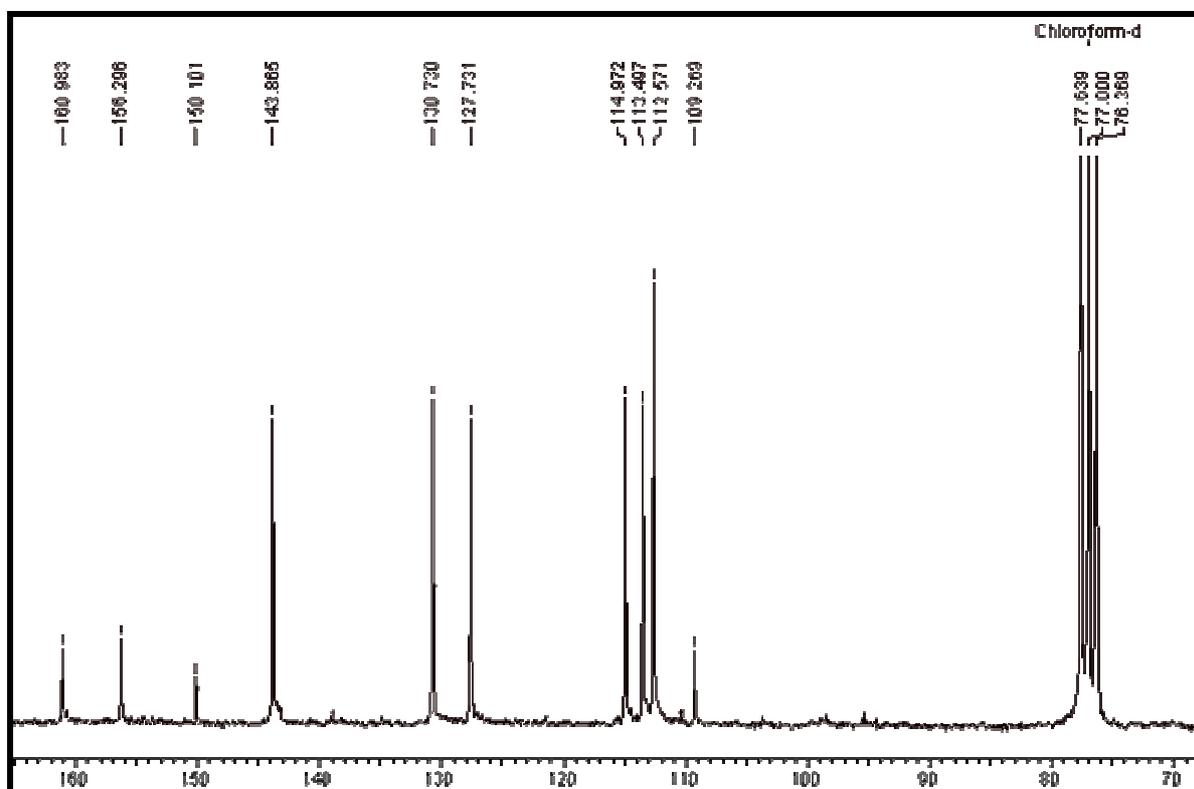


FIGURA 3.12: Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) da cumarina C2.

### 3.2.1.3. Determinação estrutural da Cumarina C3

Foi isolado 0,8 mg da cumarina C3 na subfração PC2.3.1.4.7-14. A partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.14, p.68) observa-se alguns sinais característicos das cumarinas, como a presença de dois dubletos em  $\delta$  7,83 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,19 ( $J = 10,0$  Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente.

A presença de dois dubletos em  $\delta$  6,56 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) e  $\delta$  5,69 ( $J = 10,0$  Hz, 1H), e de um singleto em  $\delta$  1,45 (6H), são característicos de um anel pirano. Pode-se dizer que este anel encontra-se nas posições 6 e 7, devido à presença de um singleto com  $\delta$  6,54 referente ao H 8 e a um outro singleto, integrando para três hidrogênios, com  $\delta$  3,85 característico de uma metoxila, a qual encontra-se na posição 5. O sinal em  $\delta$  6,54 foi atribuído ao H-8 por comparação com os dados da Xantoxiletina, onde este deslocamento é mais blindado em relação a H-5. Os sinais observados no espectro de hidrogênio foram comparados com a literatura, conforme ilustrado na Tabela 3.4, p.68, e indicaram a presença da Xantoxiletina, a qual já havia sido isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

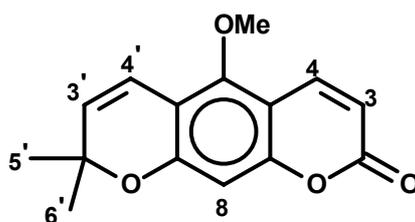
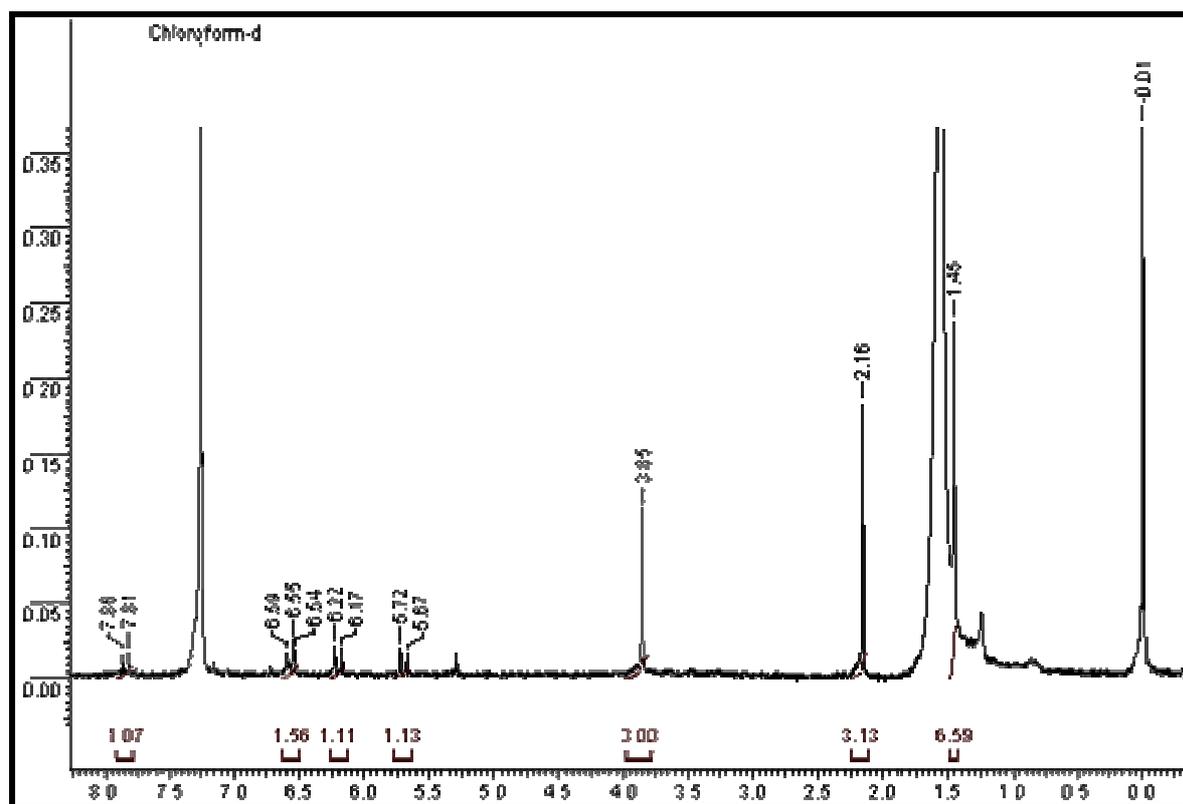


FIGURA 3.13: Estrutura da cumarina Xantoxiletina.

TABELA 3.4: Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da cumarina C3 em comparação com os dados da literatura.

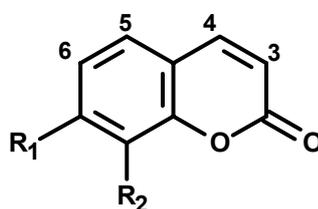
Posição	$\delta\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^*\text{H}$	$J^*$ (Hz)
3	6,19 (d)	10,0	6,19 (d)	9,5
4	7,83 (d)	10,0	7,86 (d)	9,5
5 (OMe)	3,85 (s)	-	3,86 (s)	-
8	6,55 (s)	-	6,56 (s)	-
3'	5,69 (d)	10,0	5,71 (d)	10,2
4'	6,56 (d)	10,0	6,51 (d)	10,2
5'-6'	1,45 (s)	-	1,46 (s)	-

$\delta^*$  e  $J^*$  são os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos da literatura (VRKOC, 1972).

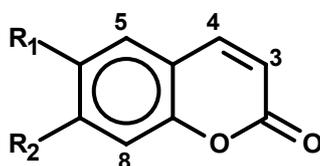
FIGURA 3.14: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da Xantoxiletina.

### 3.2.1.4. Determinação estrutural da Cumarina C4 e da Cumarina C5

A cumarina C4 foi isolada na subfração PC2.1.3-17 e apresentou uma quantidade de massa correspondente a 4,3 mg. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.17, p.81), utilizando-se como solvente  $\text{CDCl}_3$ , apresentou sinais característicos de cumarinas, como os dois dubletos em  $\delta$  7,67 ( $J = 9,5$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,26 ( $J = 9,5$  Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-4 e H-3. Observou-se também a presença de dois dubletos em  $\delta$  7,32 e  $\delta$  6,79 com constante de acoplamento “orto”  $J = 8,6$  Hz, referentes aos hidrogênios 5 e 6, os quais conferem uma cumarina substituída nas posições 7 e 8.



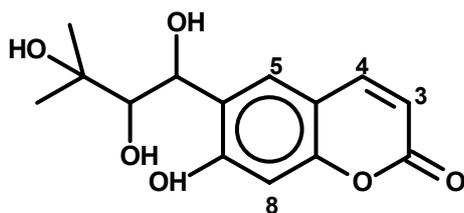
A cumarina C5 foi obtida em pequena quantidade ( $m = 3,6$  mg) na subfração PC2.1.3-19. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.22, p.84) referente a esta cumarina, usando-se como solvente  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , mostrou os dois dubletos característicos de cumarinas em  $\delta$  8,02 ( $J = 9,4$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,31 ( $J = 9,4$  Hz, 1H), referentes aos H-4 e H-3. Observou-se também a presença de dois singletos em  $\delta$  7,85 e  $\delta$  6,75, referentes aos H-8 e H-5, respectivamente, o que indica que a cumarina contém substituintes na posição 6 e 7. Conforme ilustrado na figura seguinte.



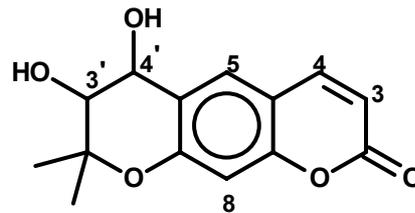
Os demais sinais observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicam que os substituintes  $\text{R}_1$  e  $\text{R}_2$ , presentes em ambas cumarina, podem corresponder aos grupamentos 1',2',3'-trihidroxi-3'-metilbutil e grupo hidroxila; anel diidropirano; ou anel diidrofurano. Fazendo-se o espectro de massas, seria possível prever se o grupo substituinte refere-se a um sistema aberto ou um fechado, pois quando se fecha o anel a partir do substituinte aberto ( $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ ) há uma

perda de dois hidrogênios, ou seja, haveria perda de unidades de massa do pico do íon molecular. Porém, não se realizou este experimento, pois a quantidade do composto isolada era muito pequena, e esta técnica destrói a molécula para identificá-la, e com isso haveria perda de massa dos compostos; portanto, utilizou-se a técnica de RMN 1 e 2D, a qual não é destrutiva.

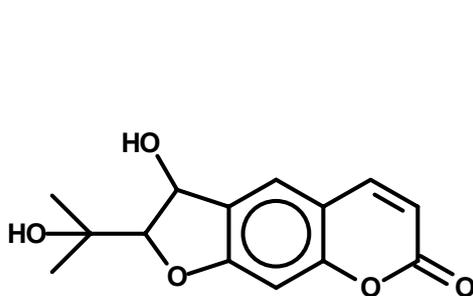
Com estas informações e dados, seis cumarinas diferentes podem ser atribuídas: quatro com a cadeia lateral fechada, duas nas posições 6 e 7 e duas nas posições 7 e 8; e duas cumarinas com cadeia lateral aberta (uma na posição 6 e outra na posição 8) e um grupo hidroxila na posição 7 (cumarinas A, B, C, D, E e F). A seguir encontra-se as seis cumarinas propostas (três angulares e três lineares) e uma tabela com os respectivos deslocamentos químicos dos três tipos de substituintes diferentes (cumarinas A, C e D') (Wu *et al.*, 1994; Vilegas *et al.*, 1993; Toro *et al.*, 1997). O modelo D não foi encontrado na literatura, assim comparou-se com os dados da estrutura D'.



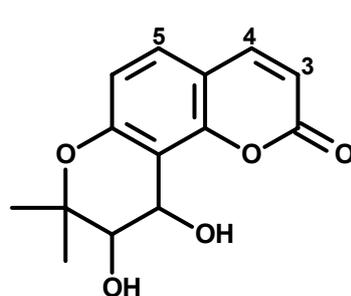
Estrutura A



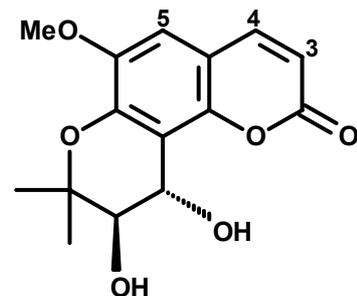
Estrutura B



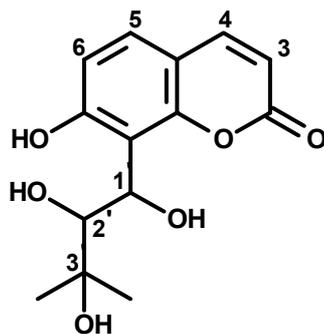
Estrutura C



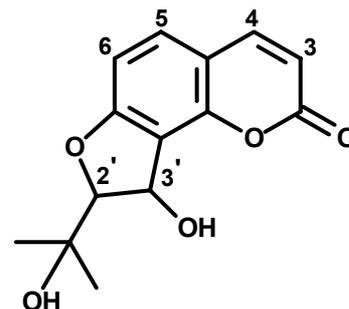
Estrutura D



Estrutura D'



Estrutura E



Estrutura F

TABELA 3.5: Dados de RMN H<sup>1</sup> das cumarinas C4 e C5 em comparação com os dados das cumarinas A, C e D'.

H	A δ, J(Hz)	C δ, J(Hz)	D' δ, J(Hz)	C4* δ, J(Hz)	C5** δ, J(Hz)
3	6,25 (d, J = 9,0)	6,25 (d, J = 9,5)	6,28 (d, J = 9,3)	6,26 (d, J = 9,5)	6,31 (d, J = 9.4)
4	7,67 (d, J = 9,0)	8,00 (d, J = 9,5)	7,64 (d, J = 9,3)	7,67 (d, J = 9,5)	8,02 (d, J = 9.4)
5	7,64 (s)	7,65 (s)	6,81 (s)	7,32 (d, J = 8,6)	7,85 (s)
6	-	-	-	6,79 (d, J = 8,6)	-
8	6,79 (s)	6,91 (s)	-	-	6,75 (s)
1'	5,46 (dl, J = 2,7)	-	-	-	-
2'	3,48 (dd, J = 7,5, 0,9)	-	-	-	-
3'	-	4,32 (d, J = 6,0)	3,86 (d, J = 6,9)	3,85 (d, J = 6,9)	3,69 (d, J = 8,6)
4'	-	5,26 (dd, J = 6.0)	4,99 (d, J = 6,9)	4,98 (d, J = 6,9)	4,70 (d, J = 8.6)
5'	1.37 (s)	1.31 (s)	1,35 (s)	1,30 (s)	1.36 (s)
6'	1.46 (s)	1.35 (s)	1,58 (s)	1,53 (s)	1.58 (s)
1'- OH	3.70 (d, J = 2.7)	-	-	-	-
2'- OH	2.49 (d, J = 7.5)	-	-	-	-
3'- OH	2.35 (s)	6.06 (d, J = 6.0)	-	-	-
4'- OH	-	4.86(s)	-	-	-
OMe	3,90 (s)	-	-	-	-

\* Solvente utilizado: CDCl<sub>3</sub>, \*\* Solvente utilizado: C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O.

TABELA 3.6: Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da estrutura proposta C e das cumarinas isoladas C4 e C5.

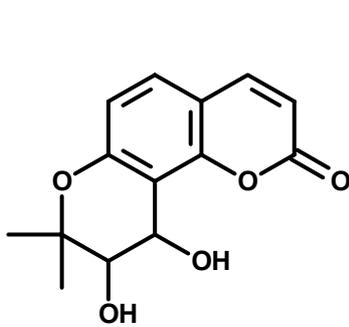
$^{13}\text{C}$	*C	*C4	*C5
2	160.4	157.2	156.9
3	111.9	112.6	103.9
4	144.8	145.2	144.6
5	125.7	129.2	129.6
6	128.5	114.9	123.7
7	162.8	161.1	160.9
8	97.8	112.4	103.7
9	156.2	155.8	155.8
10	112.8	112.9	113.6
2'	91.9	79.4	80.9
3'	71.0	74.4	76.0
4'	70.1	65.7	69.0
5'	26.9	24.9	24.6
6'	26.5	23.4	19.9

\*Solvente utilizado:  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ .

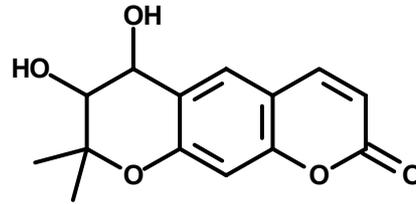
A partir da comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3.6) das substâncias (C4, C5 e C), conclui-se que a substância isolada C5 não corresponde a estrutura C, pois o espectro obtido não contém o sinal em  $\delta$  91,9 correspondente ao C- 2' do anel diidrofurano. Apesar da estrutura F não ser encontrada na literatura, por comparação, pode-se dizer que o composto C4 não possui a estrutura F, pois também não apresenta no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  um deslocamento próximo a 91,9.

A estrutura A apresentou na literatura (Wu *et al.*, 1994) apenas o espectro de RMN  $^1\text{H}$ ; não se encontrou os dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . A referência cita para o H-1' um deslocamento químico  $\delta$  5,46 (*dl*,  $J = 2,7$  Hz) e para o H-2'  $\delta$  3,48 (*dd*,  $J = 7,5$  e  $0,9$  Hz). No entanto, comparando-se com os dois isômeros isolados (compostos C4 e C5), o composto C4 possui um sinal em  $\delta$  4,98 (*d*,  $J = 6,9$  Hz) e outro em  $\delta$  3,85 (*d*,  $J = 6,9$  Hz); e o composto C5 possui um sinal em  $\delta$  4,70 (*d*,  $J = 8,6$  Hz) e outro em  $\delta$  3,69 (*d*,  $J = 8,6$  Hz). A partir destas observações, conclui-se que ambos compostos isolados não possuem um sistema aberto devido ao

deslocamento correspondente ao H-1' na estrutura A apresentar uma desblindagem maior. Como os grupos R1 e R2 são idênticos para as estruturas A e E, os dados de RMN  $^1\text{H}$  também devem ser; portanto, a substância C5 não deve corresponder a esta estrutura E. Assim, sugere-se a presença do anel 3',4'-diidroxidiidropirano linear para a cumarina C5 (estrutura B) e angular para a cumarina C4.

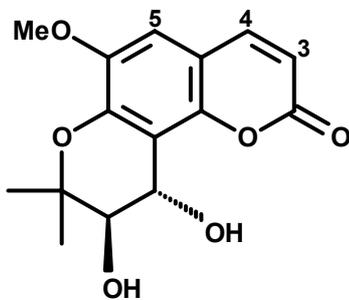


8-diidropiranocumarina (C4)

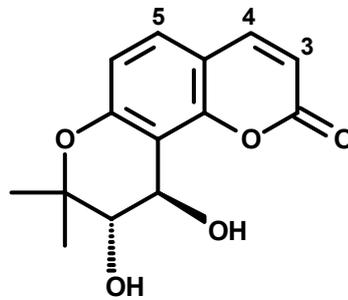


6-diidropiranocumarina (C5)

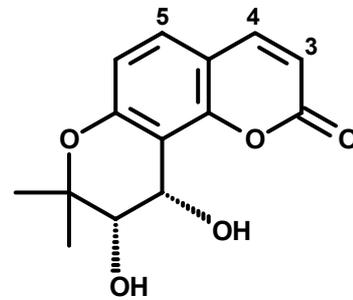
Há dados na literatura referentes a duas diidroxidiidropirano cumarinas angulares com estereoquímica distintas, conforme ilustrado na figura abaixo e na Tabela 3.7, p.74.



Estrutura D'



Estrutura G



Estrutura H

TABELA 3.7: Dados do espectro de RMN <sup>1</sup>H para as estruturas D, G e H obtidos da literatura.

H <sup>1</sup>	C4* δ, J(Hz)	D** δ, J(Hz)	G* δ, J(Hz)	H* δ, J(Hz)
3	6,26 (d, J = 9,5)	6,28 (d, J = 9,3)	6,26 (d, J = 9,5)	6,26 (d, J = 9,5)
4	7,67 (d, J = 9,5)	7,64 (d, J = 9,3)	7,67 (d, J = 9,5)	7,67 (d, J = 9,5)
5	7,32 (d, J = 8,6)	6,81 (s)	7,32 (d, J = 8,6)	7,34 (d, J = 8,6)
6	6,79 (d, J = 8,6)	-	6,79 (d, J = 8,6)	6,81 (d, J = 8,6)
6- OMe	-	3,89 (s)	-	-
3'	3,85 (d, J = 6,9)	3,86 (d, J = 6,9)	3,86 (d, J = 6,6)	3,88 (dd, J = 5,0, 6,0)
4'	4,98 (d, J = 6,9)	4,99 (d, J = 6,9)	5,11 (d, J = 6,6)	5,22 (d, J = 5,0)
5'	1,30 (s)	1,35 (s)	1,31 (s)	1,41 (s)
6'	1,53 (s)	1,58 (s)	1,53 (s)	1,47 (s)

\* Solvente utilizado: CDCl<sub>3</sub>. Literatura: TORO *et al.*, 1997; IKESHIRO *et al.*, 1992.

TABELA 3.8: Dados do espectro de RMN <sup>13</sup>C para as estruturas D, G e H obtidos da literatura.

C <sup>13</sup>	C4**	D*	G*	H*
2	161,1	162,5	161,5	161,2
3	112,6	112,8	112,0	112,1
4	145,2	143,9	144,4	144,3
5	129,2	108,1	128,4	128,6
6	114,9	146,3	114,8	114,9
7	157,2	153,3	156,4	156,6
8	112,4	111,5	111,8	111,1
9	155,8	151,5	154,3	154,6
10	112,9	112,9	112,5	112,2

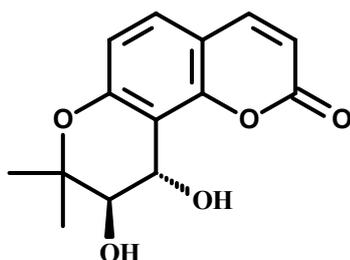
TABELA 3.8: Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para as estruturas D, G e H obtidos da literatura - Continuação.

2'	79,4	79,8	79,5	79,1
3'	74,4	74,7	74,8	71,2
4'	65,7	66,9	66,4	61,1
5'	24,9	25,4	25,4	25,3
6'	23,4	19,9	20,3	21,6
6- OME	-	56,5	-	-

\*Solvente utilizado:  $\text{CDCl}_3$ , \*\* Solvente utilizado:  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ . Literatura: TORO *et al.*, 1997; IKESHIRO *et al.*, 1992.

Comparando-se os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da cumarina C4 (angular) com aqueles publicados para as estruturas D', G e H (Tabela 3.8), verifica-se uma maior proximidade aos dados de D' e G, principalmente a constante de acoplamento dos hidrogênios 3' e 4' com  $J$  próximo a 6,9 Hz e não a 5,0 Hz (estrutura H), indicando que estes hidrogênios do composto C4 são *trans* um ao outro.

A estrutura de C4 está indicada na Figura 3.15, no entanto, a conformação anti é relativa, uma vez que, somente dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  não fornecem a configuração absoluta, para determiná-la é necessário outros experimentos.

FIGURA 3.15: Estrutura da *trans*-kelactona.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  da C4 e C5 foram obtidos em  $\text{CDCl}_3$  em um aparelho de 400 MHz (Figuras 3.19, p.82, e 3.24, p.85, respectivamente). Porém, verificou-se que estas cumarinas não apresentavam boa solubilidade em  $\text{CDCl}_3$ . Assim, visando dissolver uma maior quantidade para se obter um espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , preparou-se as amostras em  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ .

TABELA 3.9: Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) das cumarinas C4 e C5.

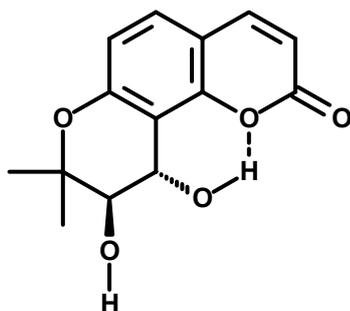
H	C4*	C4**	C5*	C5**
3	6.26 (d, $J = 9.5$ )	6.16 (d, $J = 9.6\text{Hz}$ )	6.23 (d, $J = 9.5$ )	6.31 (d, $J = 9.4$ )
4	7.67 (d, $J = 9.5$ )	7.85 (d, $J = 9.6\text{Hz}$ )	7,63 (d, $J = 9.5$ )	8.02 (d, $J = 9.4$ )
5	7.32 (d, $J = 8,6$ )	7.44 (d, $J = 8,6$ )	7.61 (s)	7.85 (s)
6	6.79 (d, $J = 8,6$ )	6,72 (d, $J = 8,6$ )	-	-
8	-	-	6.73 (s)	6.75 (s)
3'	3.85 (d, $J = 6.9$ )	3,78 (d, $J = 3,0$ )	3.65 (d, $J = 8.9$ )	3.69 (d, $J = 8.6$ )
4'	4,98 (d, $J = 6,9$ )	4,94 (d, $J = 3,0$ )	4.63 (d, $J = 8.9$ )	4.70 (d, $J = 8.6$ )
5'	1,30 (s)	1.36 (s)	1.33 (s)	1.36 (s)
6'	1,53 (s)	1.43 (s)	1.54 (s)	1.58 (s)

\*Solvente utilizado:  $\text{CDCl}_3$ , \*\* Solvente utilizado:  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ .

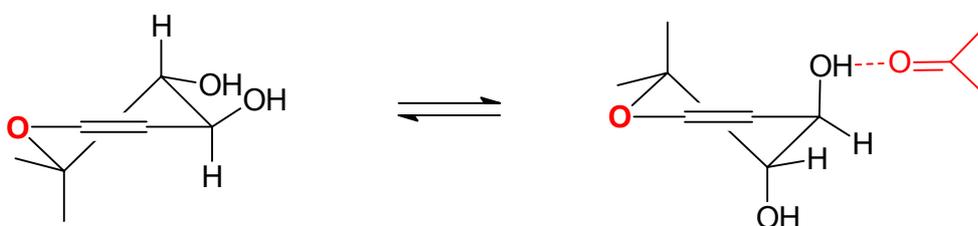
Quando verifica-se os deslocamentos químicos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 3.9) das duas cumarinas nos diferentes solventes, verifica-se uma pequena alteração nos valores, o que é comum ao modificar o solvente utilizado no experimento. Porém, um fato interessante foi observado para a cumarina C4, pois houve uma grande alteração no valor das constantes de acoplamento dos hidrogênios H-3' e H-4' quando trocou-se o solvente de  $\text{CDCl}_3$  ( $J = 6,9$  Hz) para a  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  ( $J = 3,0$  Hz). Não é comum ocorrer uma modificação tão relevante quando se modifica o solvente.

Esta cumarina pode apresentar duas conformações, os hidrogênios nas posições 3' e 4' podem estar trans di-equatoriais ou trans di-axiais um em relação ao outro. Quando os hidrogênios estão trans di-axiais, a constante de acoplamento é maior (aproximadamente  $J = 6,9$  Hz), porém quando estão trans di-equatoriais esta constante é próxima a  $J = 3,0$  Hz. A energia necessária para que a molécula altere sua conformação é relativamente baixa, por isto a molécula possui um equilíbrio, o

qual pode ser deslocado para ambos os lados. Como a cumarina é linear (C4), o hidrogênio da hidroxila na posição 4' faz "Ligação Hidrogênio" com o oxigênio da lactona formando um anel de 6 membros estável. A partir do modelo molecular, verifica-se que a conformação trans di-axiais dos hidrogênios é a mais estável para esta molécula, por isto quando se utiliza clorofórmio como solvente, a constante dos hidrogênios é  $J = 6,9$  Hz.



Porém, quando se altera o solvente para a acetona, esta faz "Ligação Hidrogênio" com a hidroxila da posição 3' e portanto desloca o equilíbrio para a molécula com conformação trans di-equatoriais, pois nesta conformação a hidroxila encontra-se na posição pseudo-axial, portanto acomoda melhor o grupo (acetona) deixando a molécula mais estável, e com isto a constante detectada passa a ser  $J = 3,0$  Hz.



Solvente  $\text{CDCl}_3$   $J = 6,9$

Acetona  $J = 3$

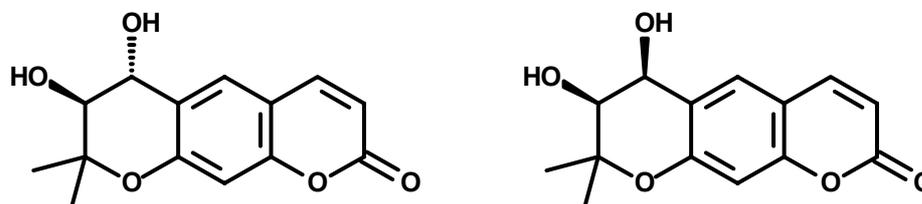
Equilíbrio deslocado para esta conformação Equilíbrio deslocado para esta conformaçãc

$H_a/H_a$

$H_e/H_e$

Para verificar se a alteração nas constantes de acoplamento não ocorreu decorrente a alguma degradação da molécula, realizou-se novamente o experimento de RMN  $^1\text{H}$  da cumarina C4 utilizando como solvente  $\text{CDCl}_3$ . Os valores obtidos foram similares ao primeiro experimento com este solvente, ou seja, as constantes de acoplamento dos H-3' e H-4' foram  $J = 6,9$  Hz, o que reforça a hipótese sugerida acima.

Foram encontrados na literatura (KONG *et al.*, 2000) dados referentes a duas dihidroxiidropirano cumarinas lineares com estereoquímica distintas, conforme ilustrado na figura abaixo e na Tabela 3.10.



Estrutura I

Estrutura J

TABELA 3.10: Dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o composto C5, e para as estruturas I e J obtidos pela literatura.

$^1\text{H}$	C5**	I**	J***
3	6,31 (d, $J = 9.4$ )	6,40 (d, $J = 9,5$ )	6,23 (d, $J = 9,5$ )
4	8,02 (d, $J = 9.4$ )	8,05 (d, $J = 9,5$ )	8,01 (d, $J = 9,5$ )
5	7,85 (s)	7,88 (s)	7,73 (s)
8	6,75 (s)	6,88 (s)	6,67 (s)
3'	3,69 (d, $J = 8.6$ )	3,72 (d, $J = 8,5$ )	3,63 (d, $J = 3,5$ )
4'	4,70 (d, $J = 8.6$ )	4,73 (d, $J = 8,5$ )	4,73 (d, $J = 3,5$ )
5'	1,36 (s)	1,43 (s)	1,25 (s)
6'	1,58 (s)	1,67 (s)	1,40 (s)

\*\* Solvente  $\text{CD}_3\text{OD}$ , \*\*\*Solvente DMSO. Literatura: KONG *et al.*, 2000.

TABELA 3.11: Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o composto C5, e para as estruturas I e J obtidos pela literatura.

$^{13}\text{C}$	C5**	I**	J***
2	160,9	163,5	161,4
3	113,6	113,7	113,1
4	144,6	146,0	144,4
5	129,6	129,7	129,0

6	123,7	124,5	123,8
7	156,9	157,9	156,5
8	103,7	104,8	103,6
9	155,8	156,4	154,9
10	113,9	114,5	112,7
2'	80,9	81,7	81,0
3'	76,0	76,6	75,4
4'	69,0	69,6	68,5
5'	19,9	20,0	20,0
6'	24,6	27,3	27,3

\*\* Solvente CD<sub>3</sub>OD, \*\*\*Solvente DMSO. Literatura: KONG *et al.*, 2000.

O composto C5, assim como a cumarina C4, também apresenta dois centros quirais (posições 3' e 4'), ou seja, a molécula pode apresentar duas estereoquímicas diferentes: *cis* ou *trans*. O que define a estereoquímica do composto é a constante de acoplamento dos hidrogênios; quando estes encontram-se *cis*, a constante de acoplamento é menor do que quando estão *trans*. A partir dos dados de RMN <sup>1</sup>H obtido da cumarina isolada C5, verifica-se que os hidrogênios 3' e 4' apresentam  $J = 8,6$  Hz, ou seja, a cumarina C5 apresenta estrutura similar ao compostos I, e portanto possui configuração relativa *trans* (Figura 3.16).

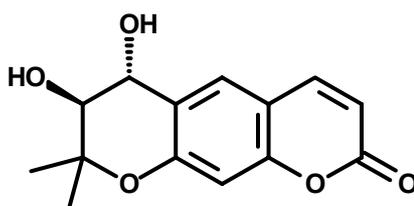
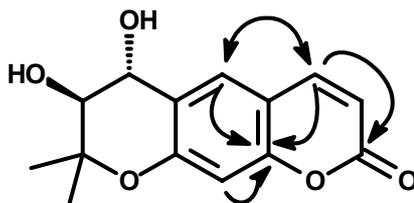


FIGURA 3.16: Estrutura da *trans*-Decursidinol.

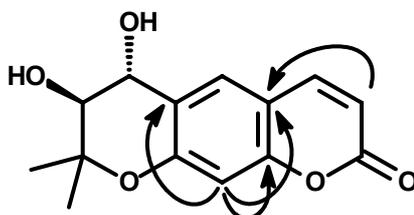
Realizou-se os experimentos de RMN 2D: HMBC, HSQC e COSY para a cumarina C5 visando confirmar a estrutura proposta. O experimento de COSY (Figura 3.30, p.88) apresentou as seguintes correlações: H-4 com H-3; H-4' com H-3'; H3-6' com H3-5'. O espectro de HSQC (Figura 3.28, p.87) mostra os deslocamentos dos carbonos ligados diretamente aos hidrogênios, ou seja, a partir deste pode-se determinar todos os valores de <sup>13</sup>C ligados aos hidrogênios da

molécula: H-4 ( $\delta$  144,6), H-5 ( $\delta$  129,6), H-8 ( $\delta$  103,7), H-3 ( $\delta$  113,6), H-4' ( $\delta$  69,0), H-3' ( $\delta$  76,0), H3-6' e H3-5' ( $\delta$  24,6 e  $\delta$  19,9).

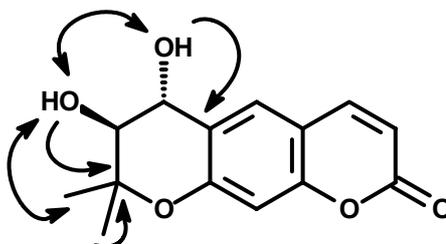
A partir do espectro de HMBC (Figura 3.29, p.87), o qual apresenta correlações entre H e C a três ligações, pode verificar a correlação dos H-4, H-5 e H-8 com o carbono em  $\delta$  155,8, o qual corresponde, portanto, ao carbono 9. O H-4 correlaciona-se com o carbono em  $\delta$  160,9, referindo-se ao C2. O H-4 apresenta correlação ainda com o C5; o H-5 correlaciona-se com o C4.



Observa-se ainda a correlação entre o H-8 com o C6 e com o C9; e dos H-8 e H-3 com o carbono em  $\delta$  115,0, o qual corresponde ao C10. O H-3 correlacionou-se a  $J$  1, ou seja, com o carbono diretamente ligado (C3).



O H-4' correlacionou-se com o C3' e C6; o H-3' correlacionou-se com C4', C5' e C6'. Os hidrogênios metílicos e o H-3' apresentaram correlação com um sinal em  $\delta$  80,9, correspondendo ao C2'. Além desta correlação, os hidrogênios H3-5' e H3-6' correlacionaram-se entre si e com o C3'.



Com estas informações, pode-se confirmar os dados comparados com a literatura, descritos anteriormente, e comprovar que a cumarina C5 é a *trans*-Decursidinol.

As cumarinas C4 e C5 não haviam sido isoladas anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, e segundo levantamento bibliográfico, elas são inéditas em *Citrus* e na família Rutaceae; ambas foram isoladas apenas de Umbeliferae (Apiaceae) (*Peucedanum japonicum* e *Peucedanum decursivum*). Um estudo mais detalhado sobre a estereoquímica dos dióis tanto na estrutura C4 (angular), quanto na C5 (linear) seria necessário para a determinação da configuração absoluta das moléculas.

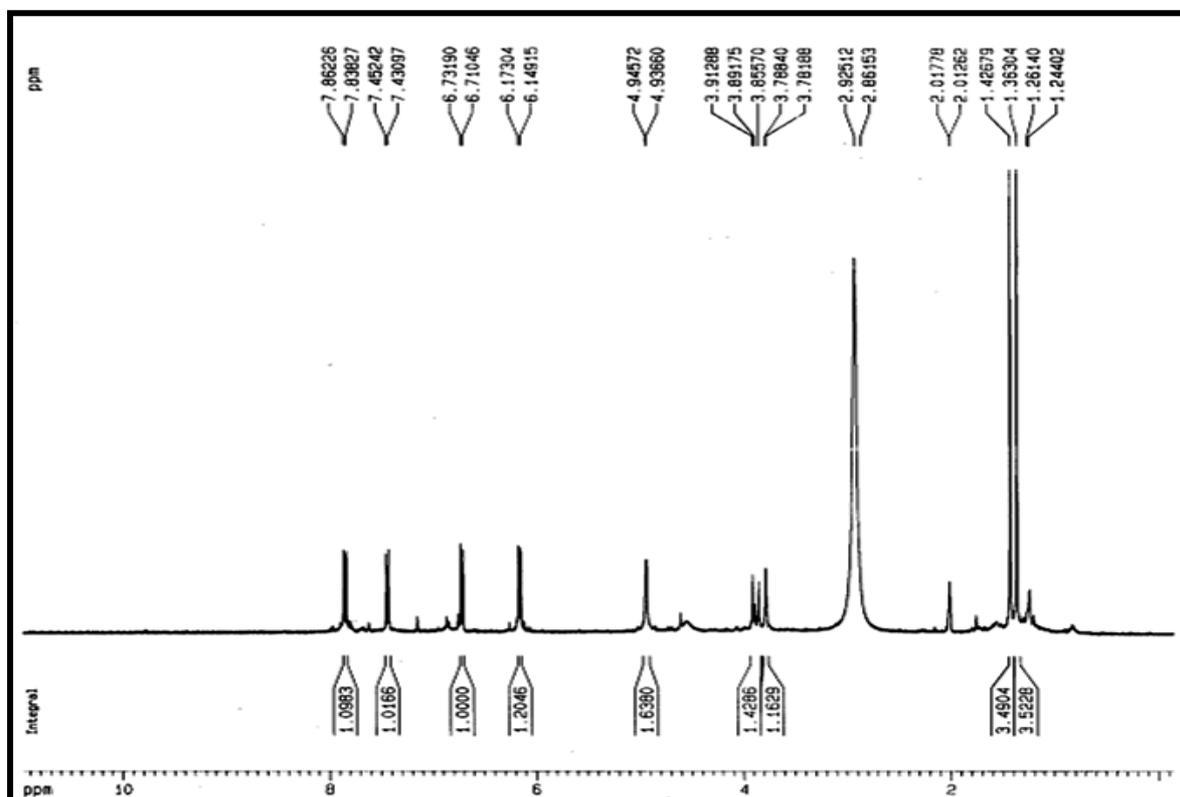


FIGURA 3.17: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C4.

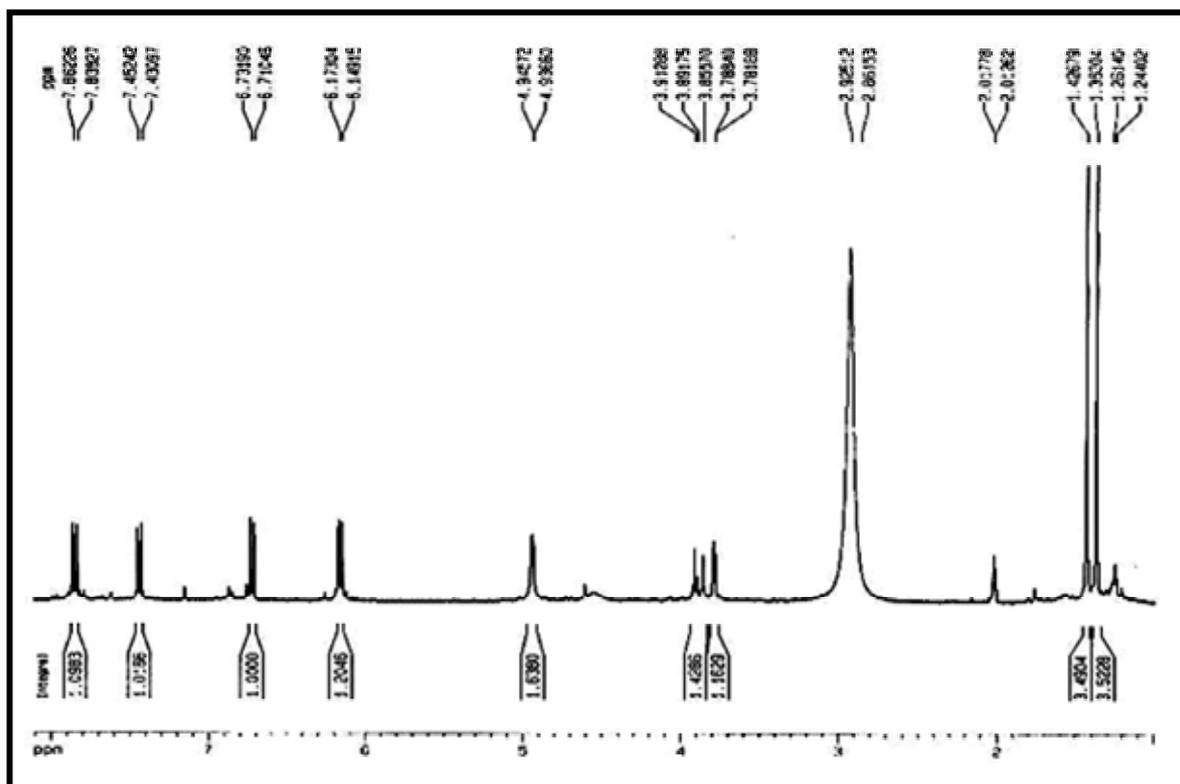


FIGURA 3.18: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C4.

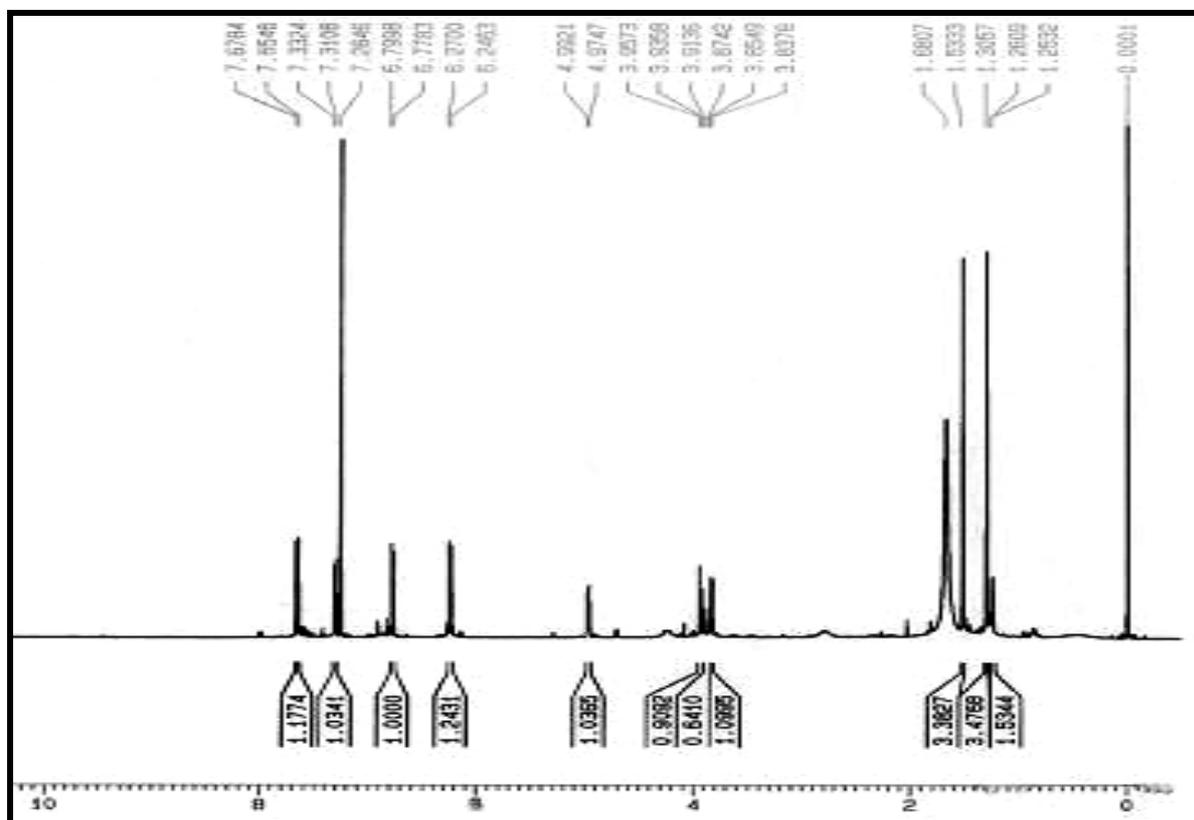


FIGURA 3.19: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C4.

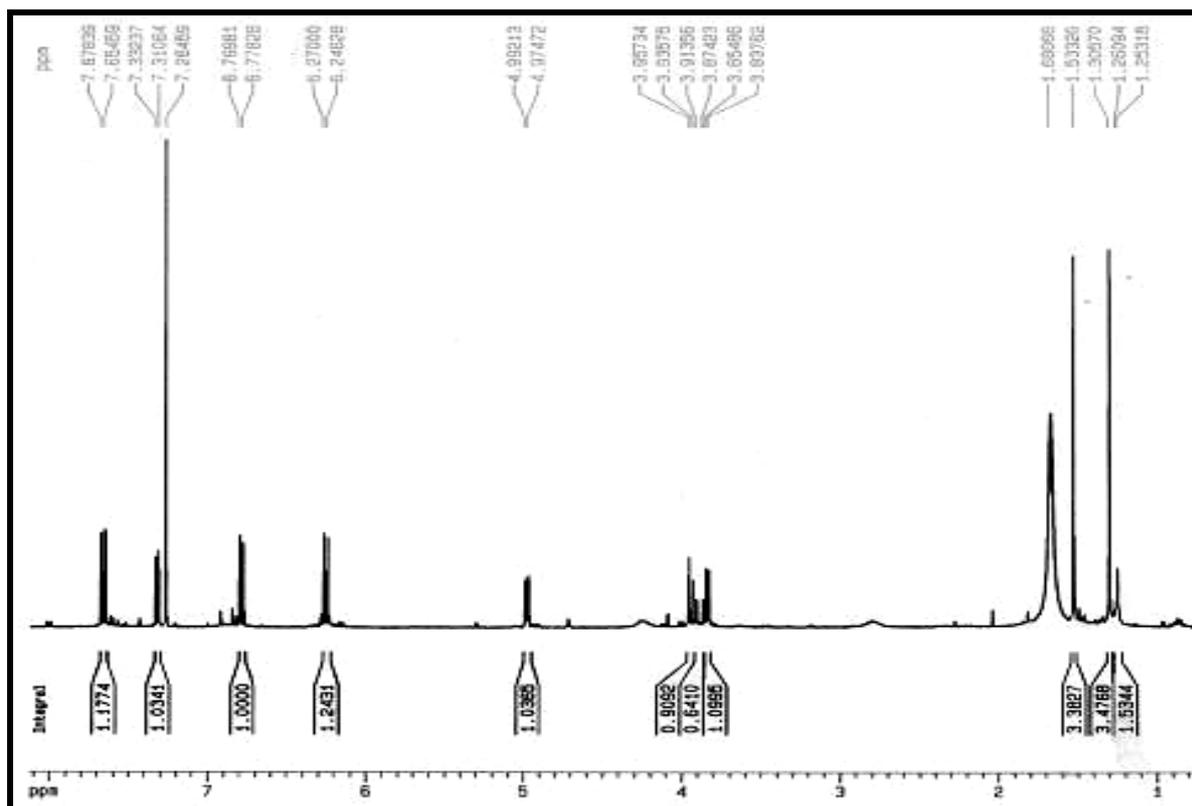


FIGURA 3.20. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da cumarina C4.

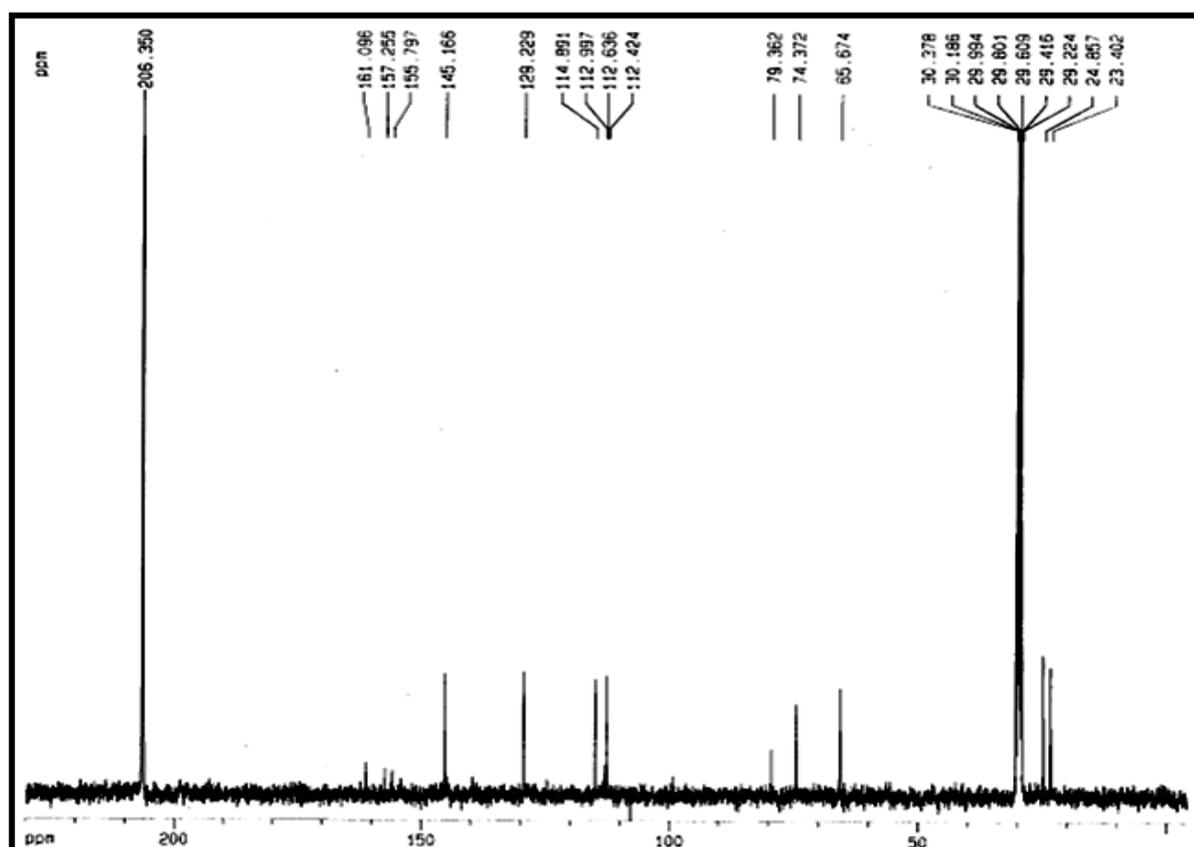


FIGURA 3.21: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 400 MHz) da cumarina C4.

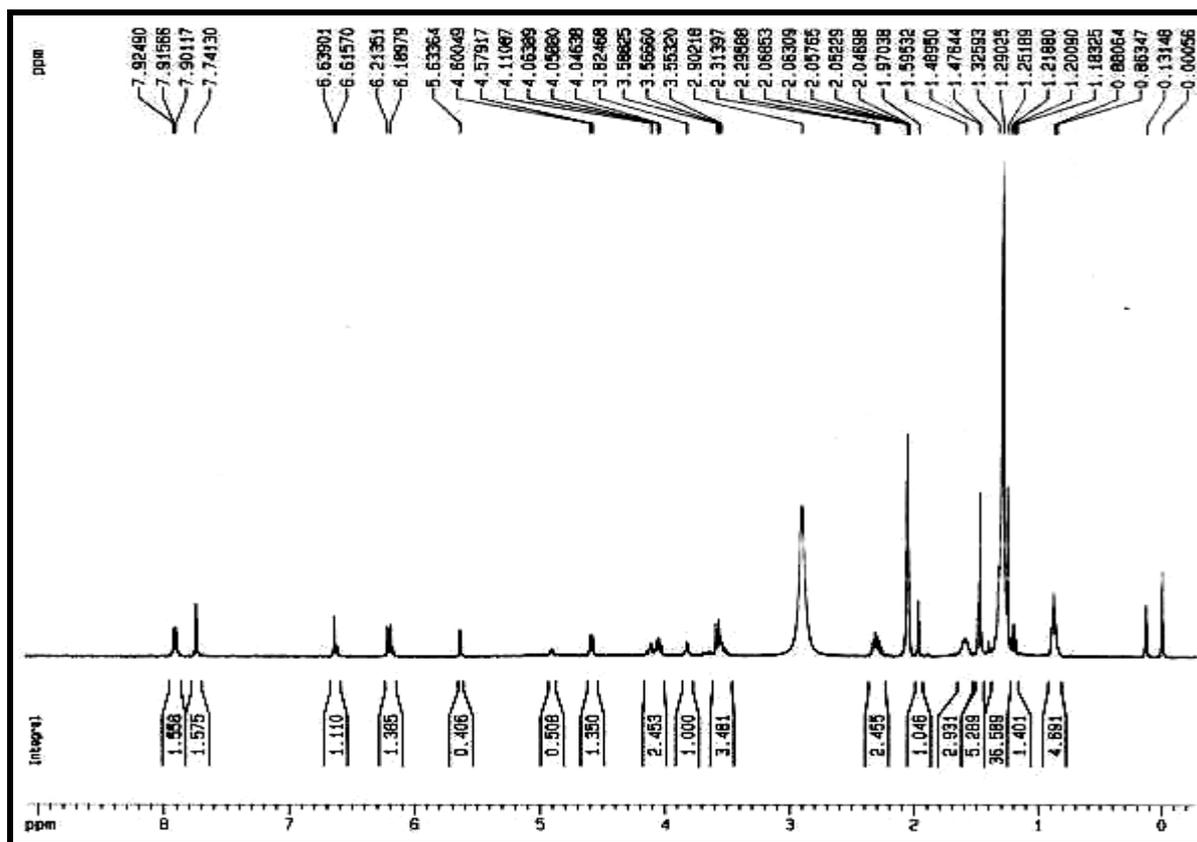


FIGURA 3.22: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C5.

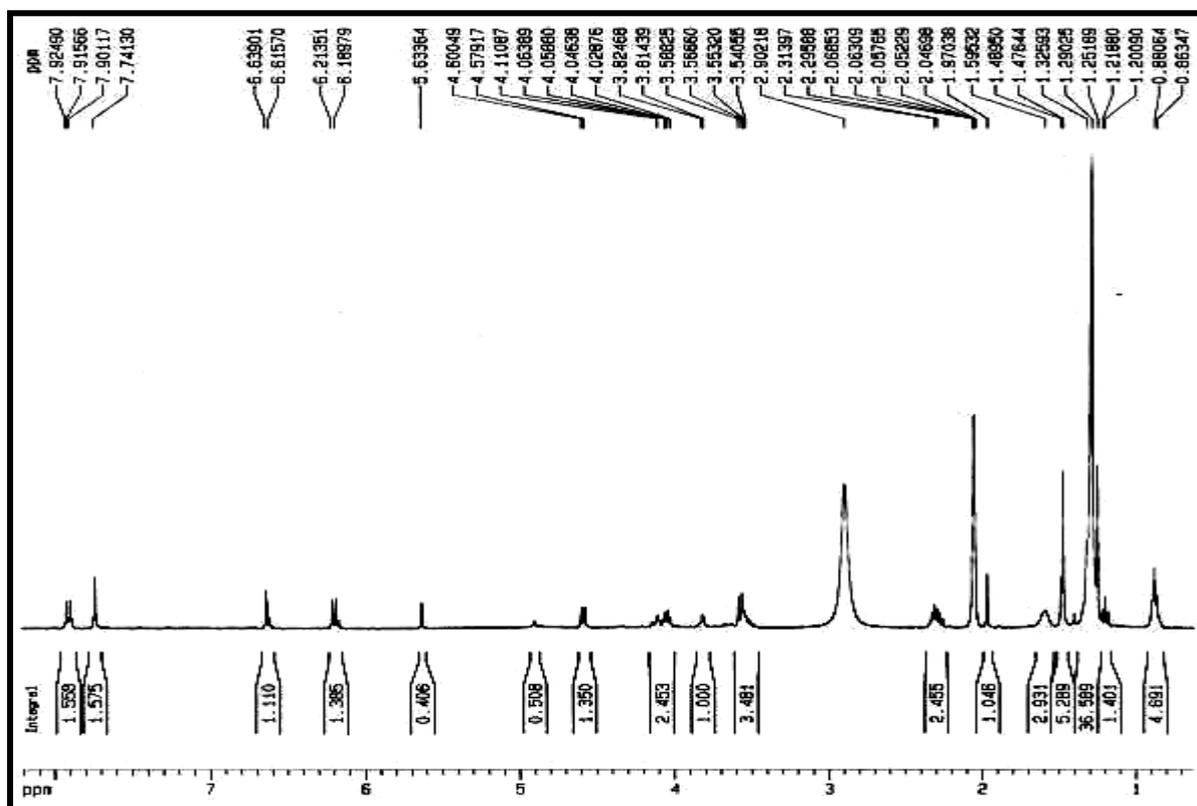


FIGURA 3.23: Ampliação do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C5.

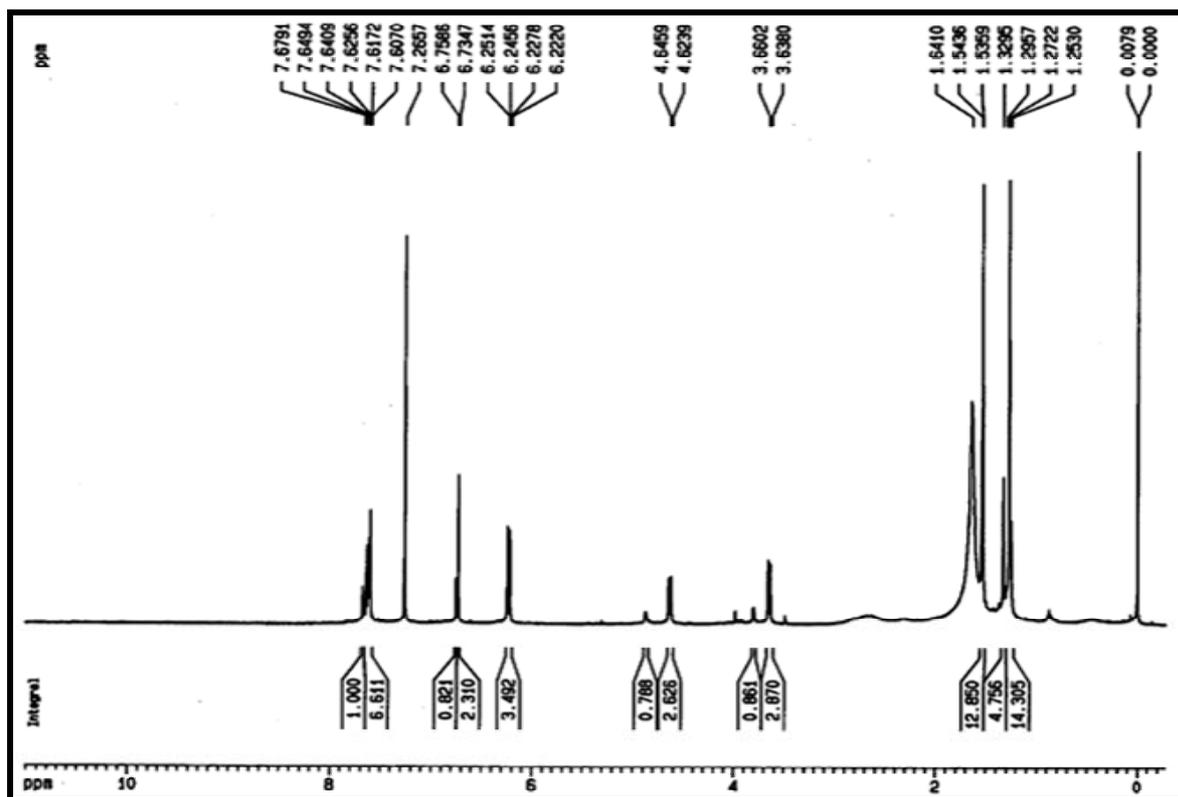


FIGURA 3.24: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C5.

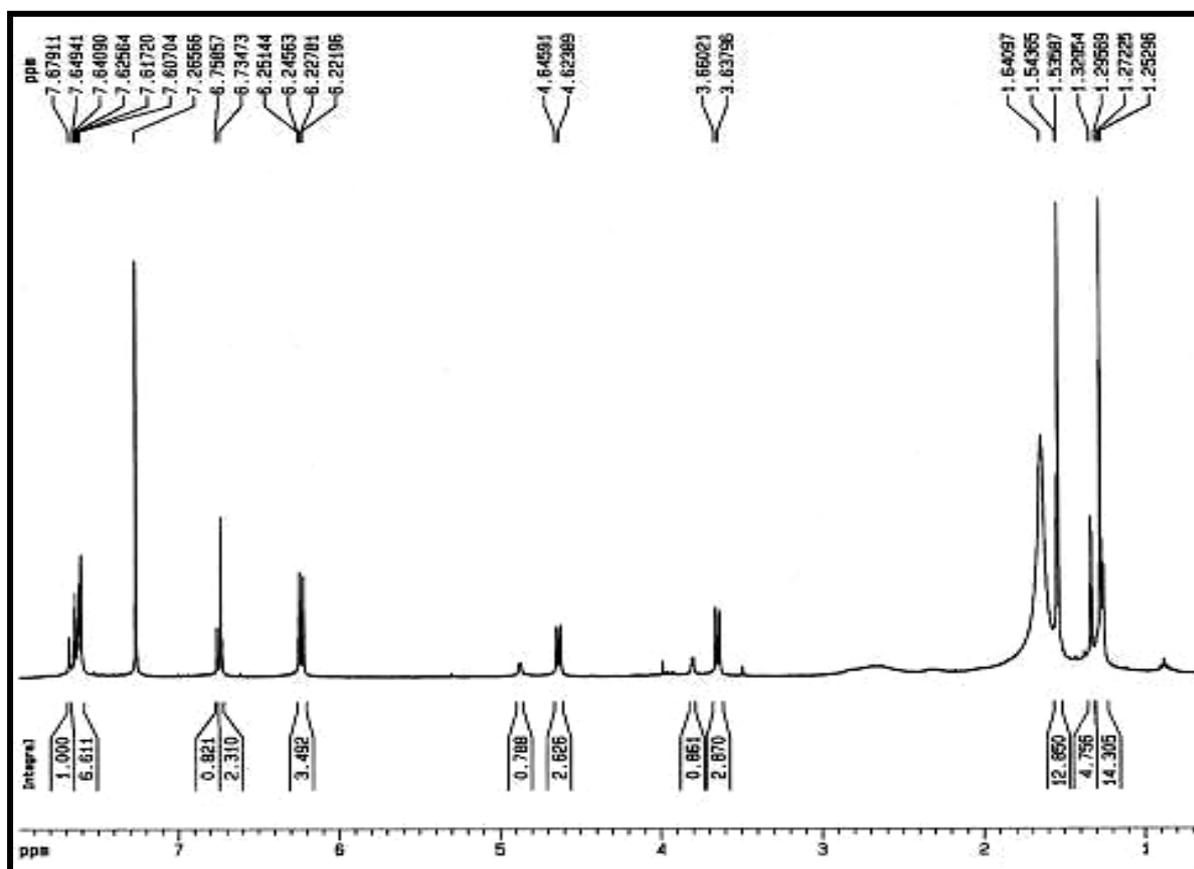


FIGURA 3.25: Ampliação A do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C5.

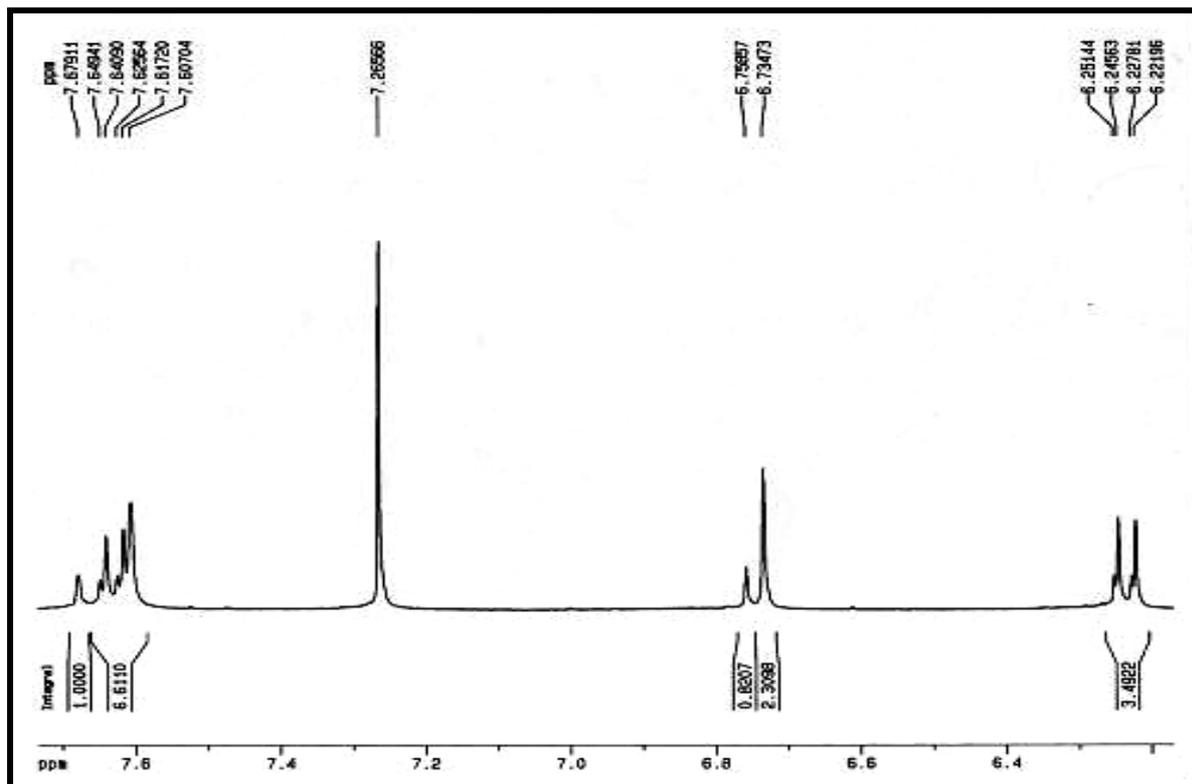


FIGURA 3.26: Ampliação B do Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da cumarina C5.

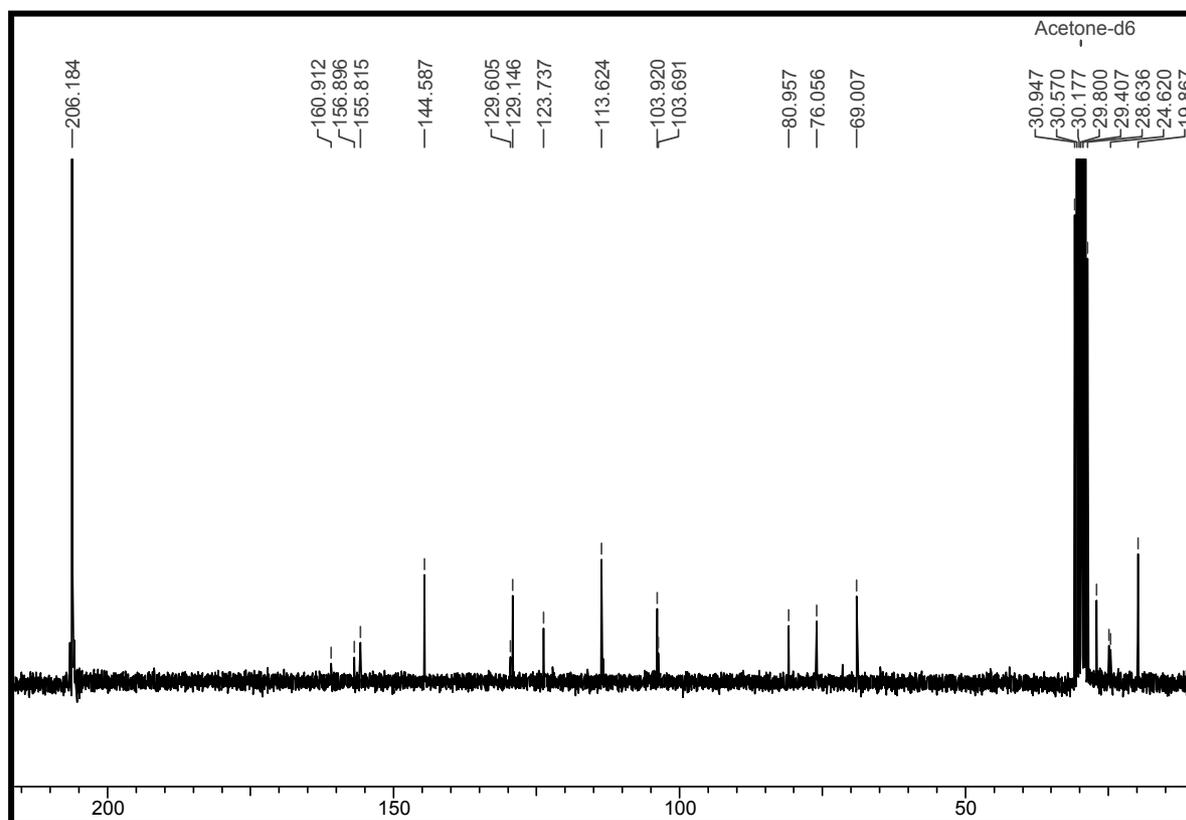


FIGURA 3.27: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 200 MHz) da cumarina C5.

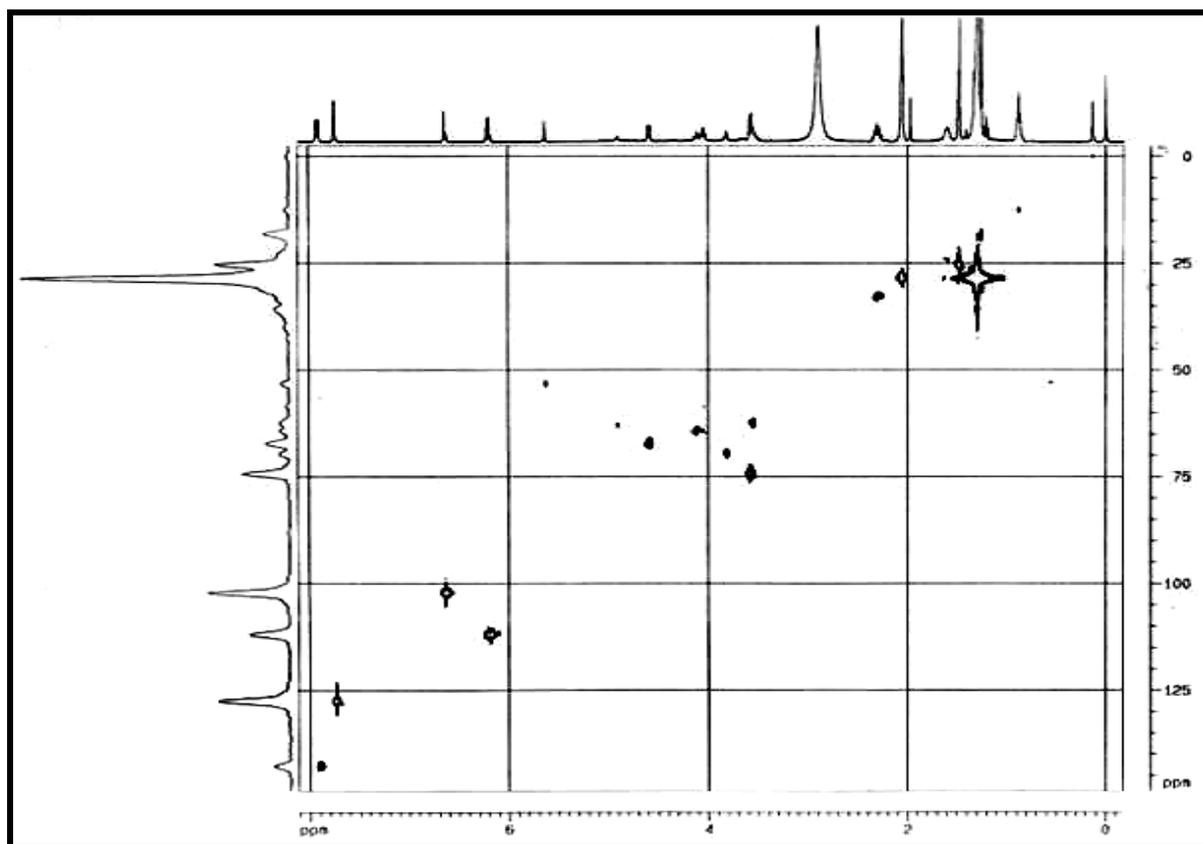


FIGURA 3.28: Espectro de HSQC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C5.

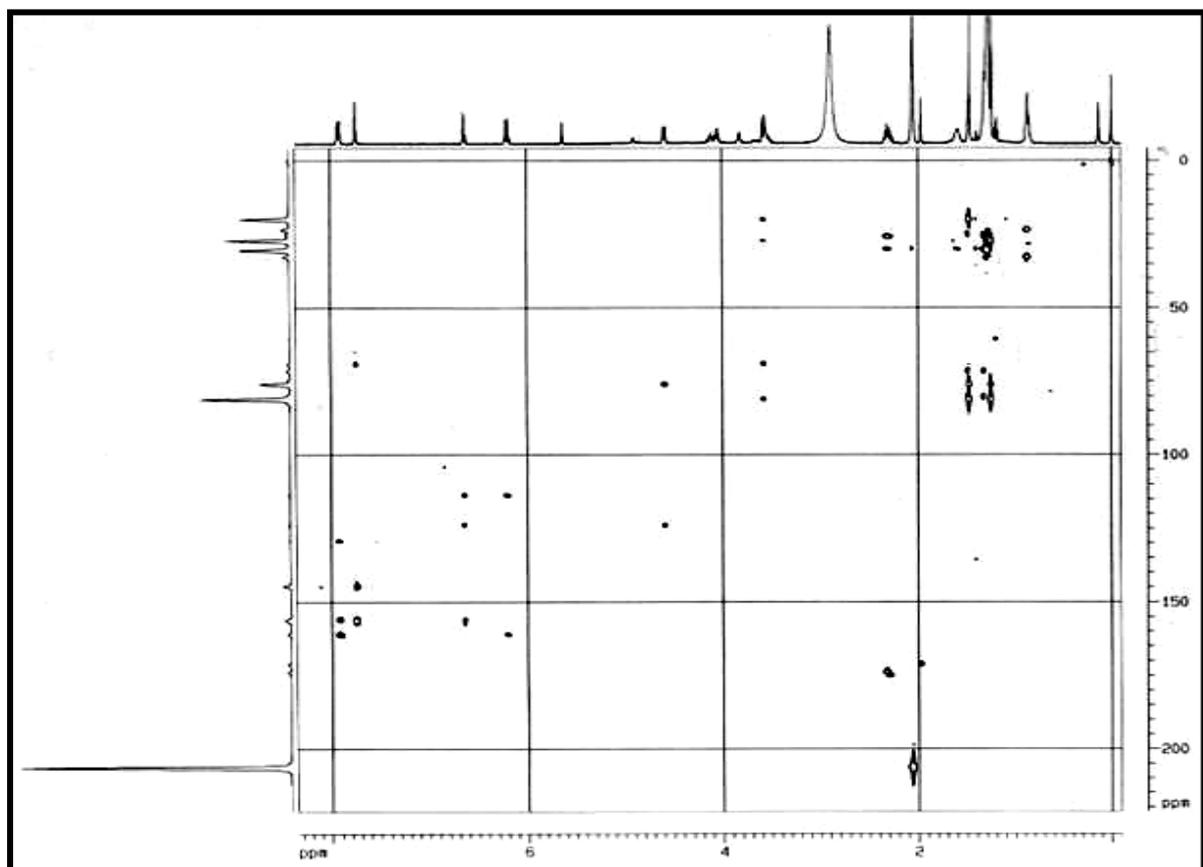


FIGURA 3.29: Espectro de HMBC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C5.

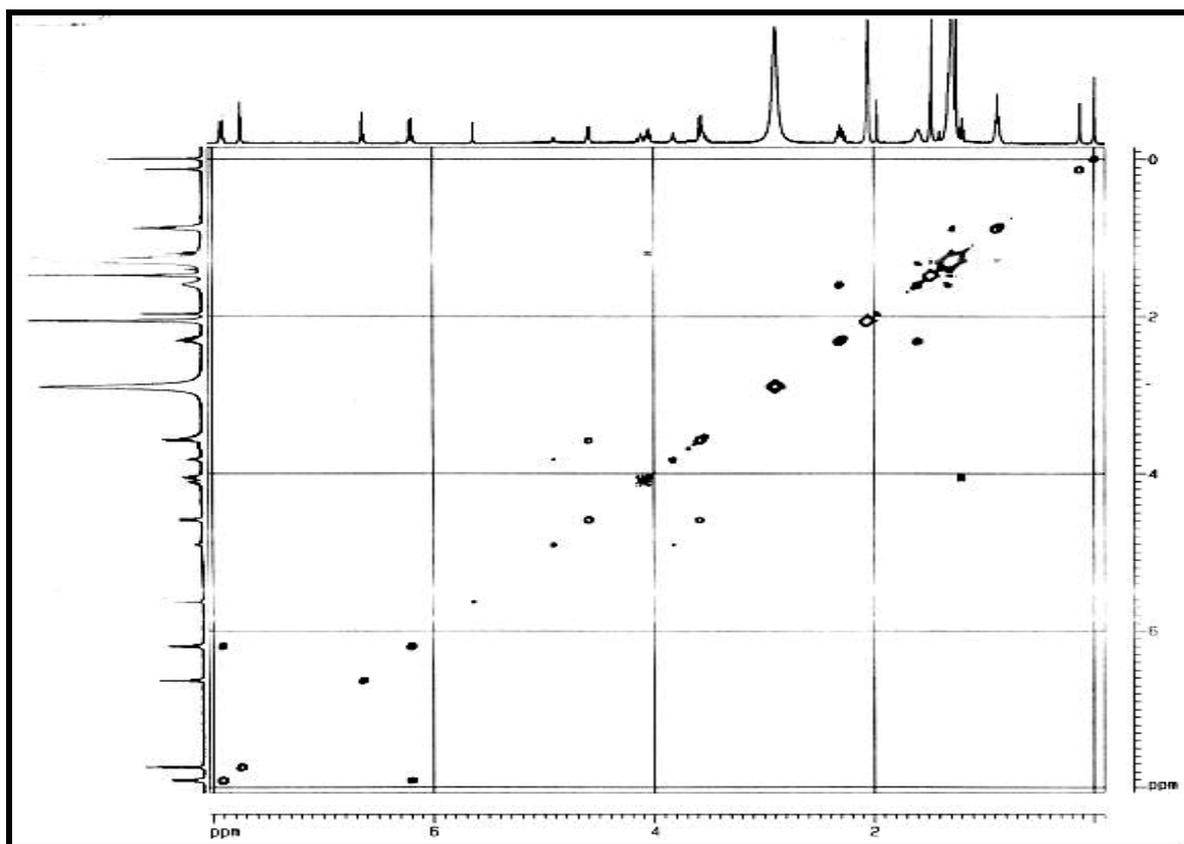


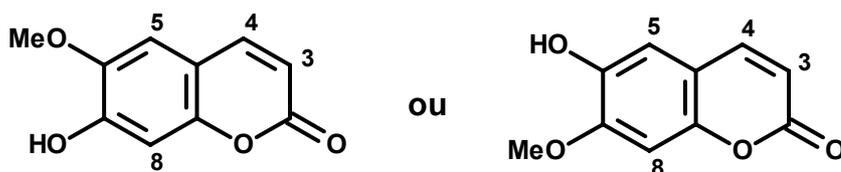
FIGURA 3.30: Espectro de COSY ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C5.

### 3.2.1.5. Determinação estrutural da Cumarina C6

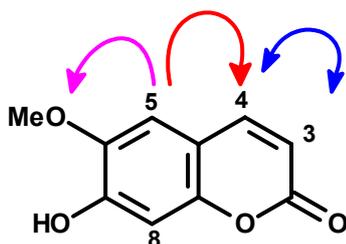
A cumarina C6 foi isolada nas subfrações PC2.1.3.3-9 e apresentou uma massa correspondente a 32,4 mg. Realizou-se para esta amostra experimentos de RMN 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e experimentos de RMN 2D (HMBC, HSQC, NOESY e COSY).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.33, p.92) observou-se a presença de dois dubletos em  $\delta$  6,28 ( $J = 9,50$  Hz, 1H) e  $\delta$  7,61 ( $J = 9,50$  Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-3 e H-4 respectivamente, característicos de cumarinas. Notou-se também a presença de dois singletos em  $\delta$  6,85 e  $\delta$  6,92 correspondentes aos hidrogênios 5 e 8 e um singlete em  $\delta$  3,96 correspondente a uma metoxila.

Os dados não permitem propor a posição exata da metoxila e da hidroxila, portanto a estrutura proposta para a cumarina pode ser:



A análise do espectro de NOESY (Figura 3.39, p.95) forneceu as seguintes correlações:  $\delta_{\text{H-5}}$  6,85 e  $\delta_{\text{OMe}}$  3,96,  $\delta_{\text{H-4}}$  7,61 e  $\delta_{\text{H-3}}$  6,28,  $\delta_{\text{H-3}}$  6,28 e  $\delta_{\text{H-4}}$  7,61,  $\delta_{\text{H-5}}$  6,85 e  $\delta_{\text{H-4}}$  7,61. Através da correlação observada entre o  $\delta_{\text{H-5}}$  e o  $\delta_{\text{OMe}}$ , pode-se concluir que a metoxila está na posição 6 e a hidroxila está em 7.



A partir do espectro de HSQC (Figura 3.36, p.93) pode-se correlacionar os valores dos deslocamentos químicos de hidrogênio ( $\delta_{\text{H}}$ ) com os valores dos deslocamentos químicos de carbono ( $\delta_{\text{C}}$ ) ligados diretamente. Então, os valores de  $\delta_{\text{C}}$  obtidos foram os seguintes:  $\delta_{\text{C-3}}$  113,5,  $\delta_{\text{C-4}}$  143,2,  $\delta_{\text{C-5}}$  107,5,  $\delta_{\text{C-8}}$  103,2 e  $\delta_{\text{C-OMe}}$  56,4.

Com todos os dados obtidos e com o espectro de HMBC (Figura 3.37, p.94) verificou-se que o H-4 correlaciona-se com  $\delta_c$  161,4,  $\delta_c$  150,3 e  $\delta_c$  107,5 (H-5). A partir disto e das correlações obtidas pelo HSQC, confirma-se que o  $\delta_{C-5}$  107,5 é o  $\delta_{H-5}$  6,85 e conseqüentemente que o  $\delta_{C-8}$  103,2 é o  $\delta_{H-8}$  6,2. Observou-se também através do HMBC as correlações do H-3 com o  $\delta_c$  111,5, do H-5 com o  $\delta_c$  149,7, do H-8 com o  $\delta_c$  149,7 e com o  $\delta_c$  111,5 e da OMe com o  $\delta_c$  144,0.

Com a análise do espectro de RMN  $^{13}C$  (Figura 3.35, p.93), verifica-se que a molécula possui realmente 10 carbonos, os quais possuem deslocamentos químicos em 56,4 (OMe), 103,2 (H-8), 107,5 (H-5), 111,5, 113,5 (H-3), 143,2 (H-4), 144,0, 149,7, 150,3 e 161,4. Pode-se dizer que o carbono em  $\delta$  161,4 é o lactônico (posição 2), pois é o mais desblindado. O carbono em  $\delta$  150,3 corresponde ao C-9, pois também encontra-se bastante desblindado devido à presença de um oxigênio adjacente. O carbono em  $\delta$  111,5 foi atribuído ao C-10, pois se correlaciona via HMBC com o H-8 e o H-3, como visto acima. Como a metoxila correlaciona-se com o carbono em  $\delta$  144,0, este foi atribuído ao C-6. Portanto o carbono em  $\delta_c$  149,7 corresponde ao C-7.

Assim, a estrutura da cumarina obtida com os valores dos carbonos determinados é a seguinte:

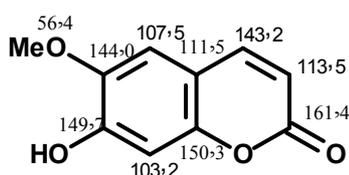


FIGURA 3.31: Deslocamentos químicos de  $^{13}C$  da cumarina C6.

TABELA 3.12: Dados de RMN H<sup>1</sup> e RMN C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz) da cumarina C6.

Posição	H δ, J (Hz)	C δ, J (Hz)
2	-	161,4
3	6,28 (d, J = 9,5)	113,5
4	7,61 (d, J = 9,5)	143,2
5	6,85 (s)	107,5
OMe	3,96 (s)	56,4
7	-	149,7
8	6,92 (s)	103,2
9	-	150,3
10	-	111,5

O espectro de COSY (Figura 3.38, p.94) mostrou apenas as correlações dos hidrogênios H-3 e H-4, o que era esperado, uma vez que estes são os únicos hidrogênios vizinhos da molécula. Através destas correlações e das análises feitas anteriormente dos outros espectros, pode-se concluir que a estrutura da cumarina C6 isolada é a Escopoletina (Figura 3.32). Esta substância não havia sido isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

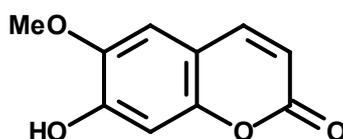
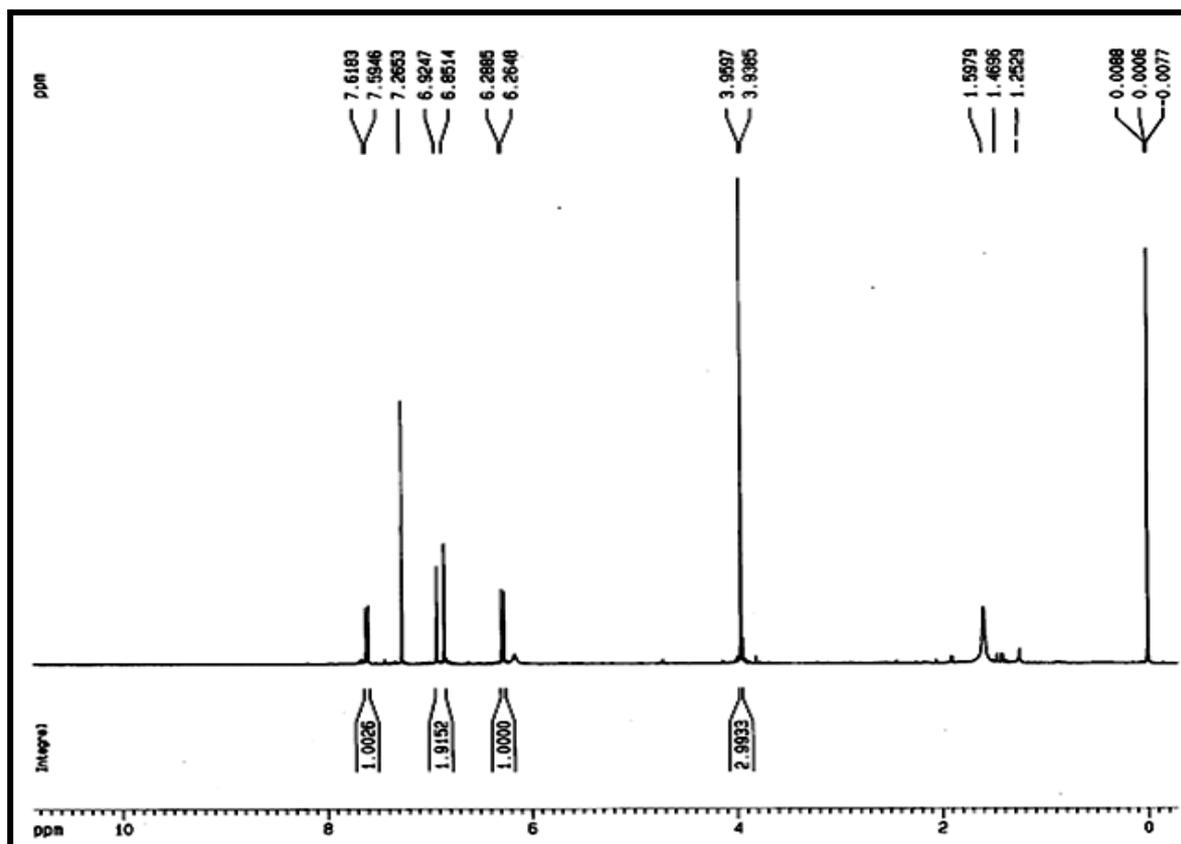
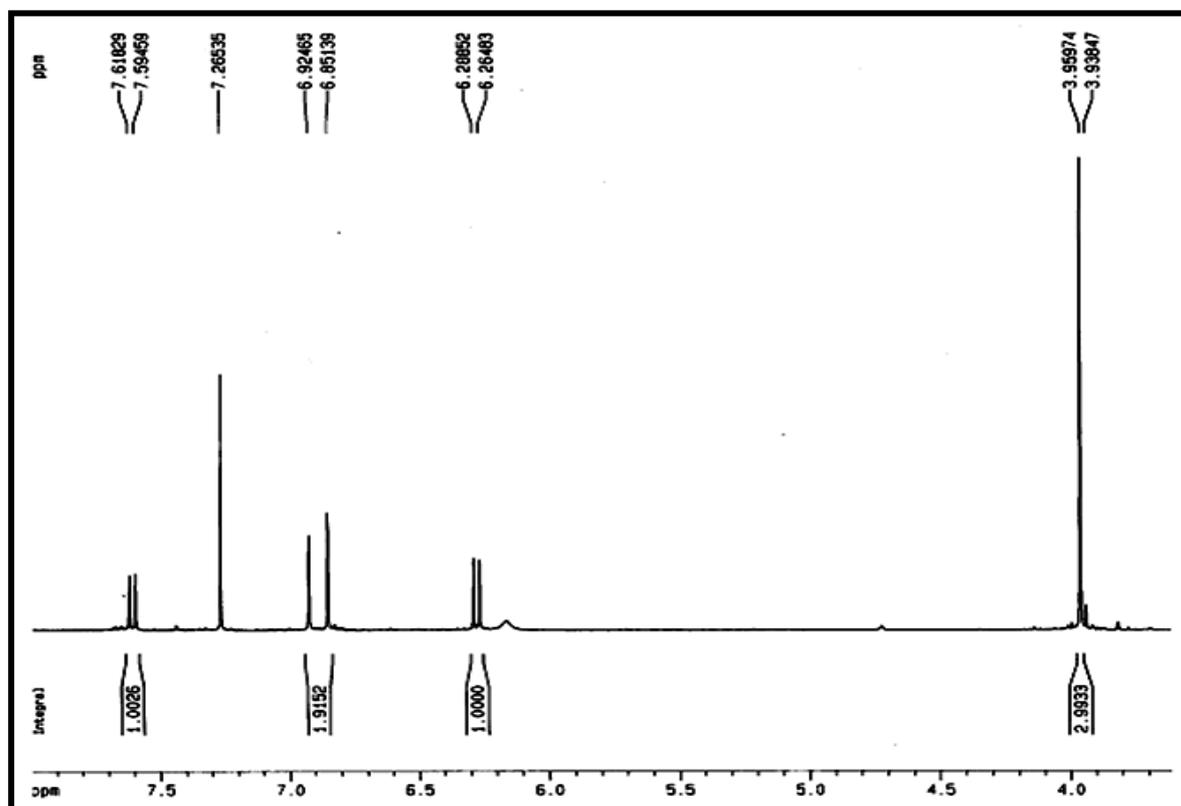


FIGURA 3.32: Estrutura da Escopoletina.

FIGURA 3.33: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.FIGURA 3.34: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.

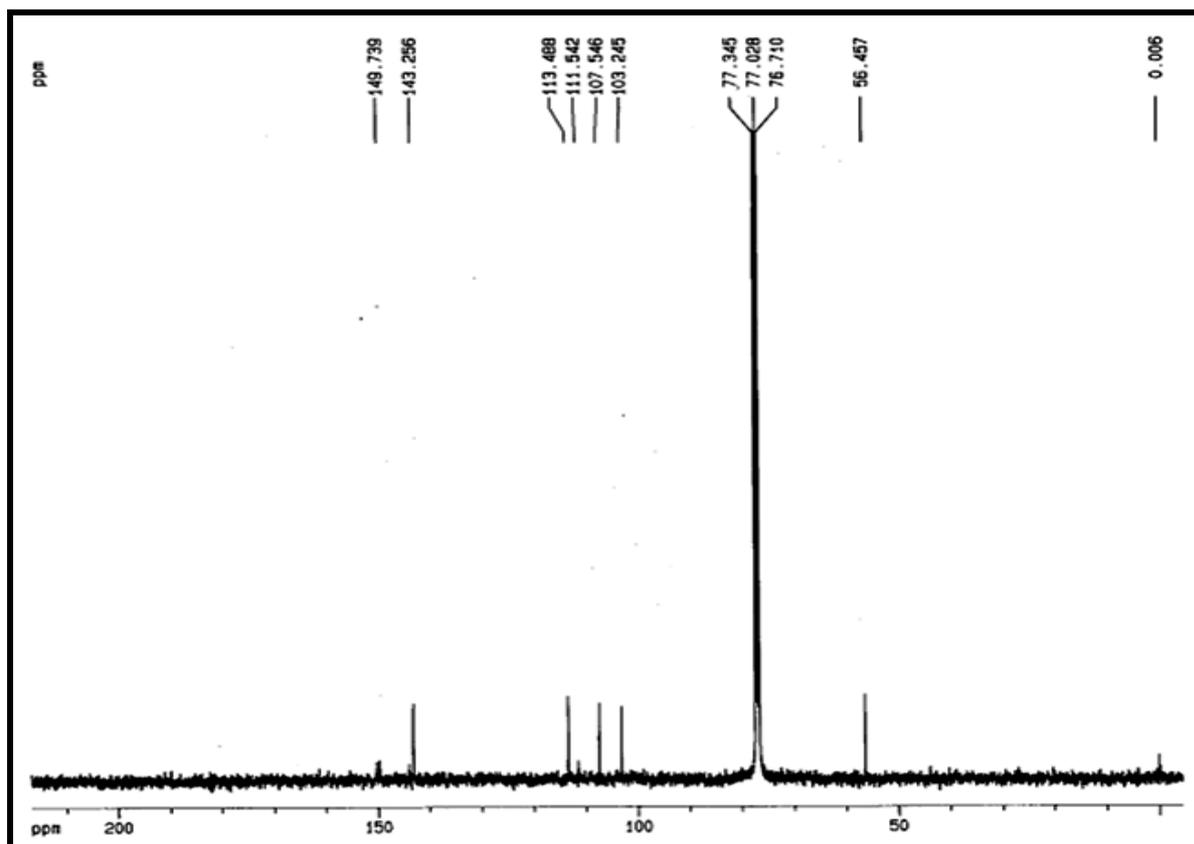


FIGURA 3.35: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.

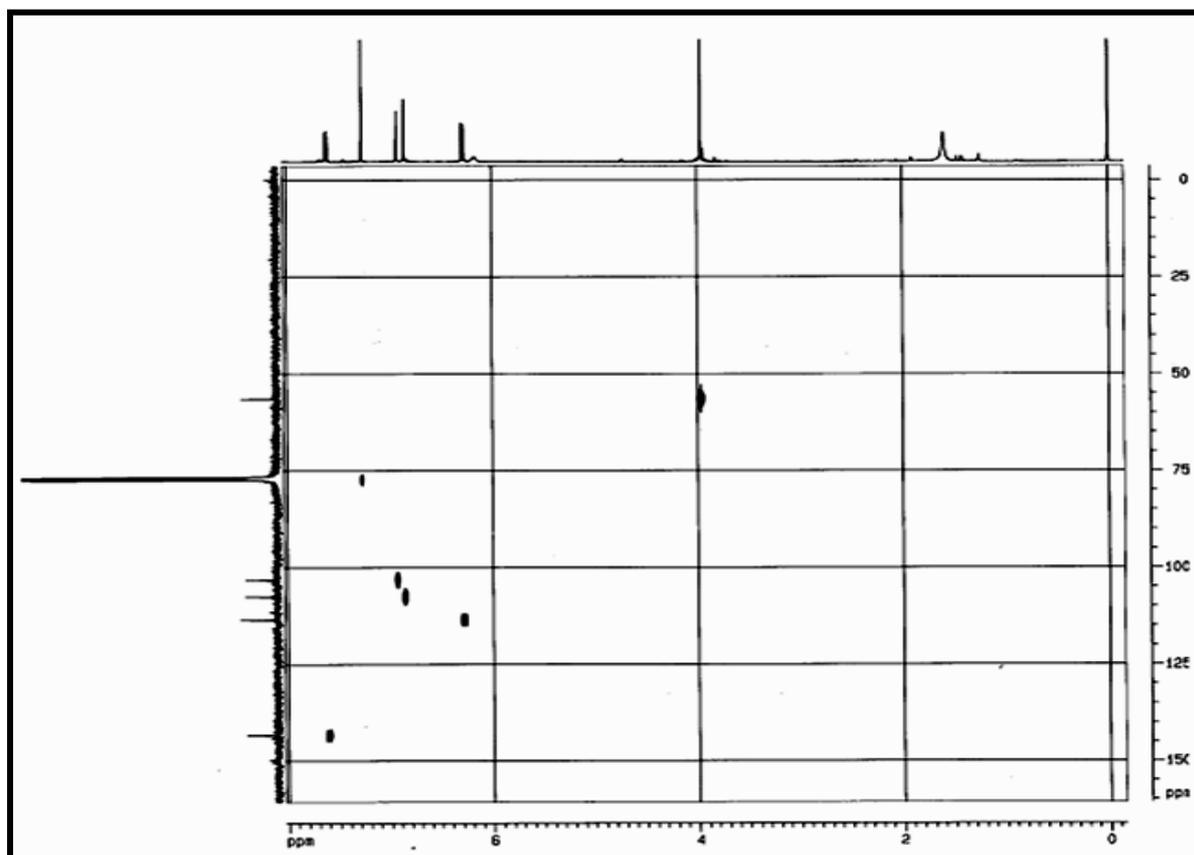


FIGURA 3.36: Espectro de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.

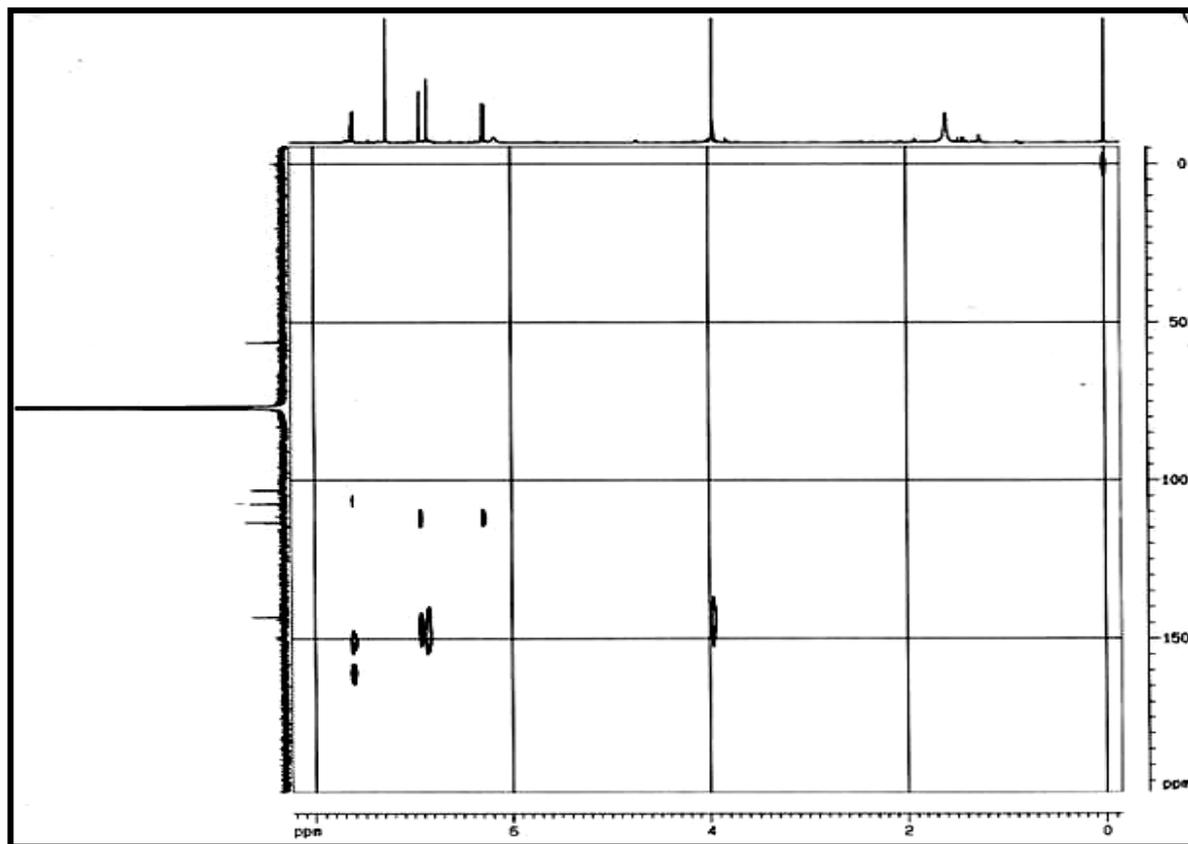


FIGURA 3.37: Espectro de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.

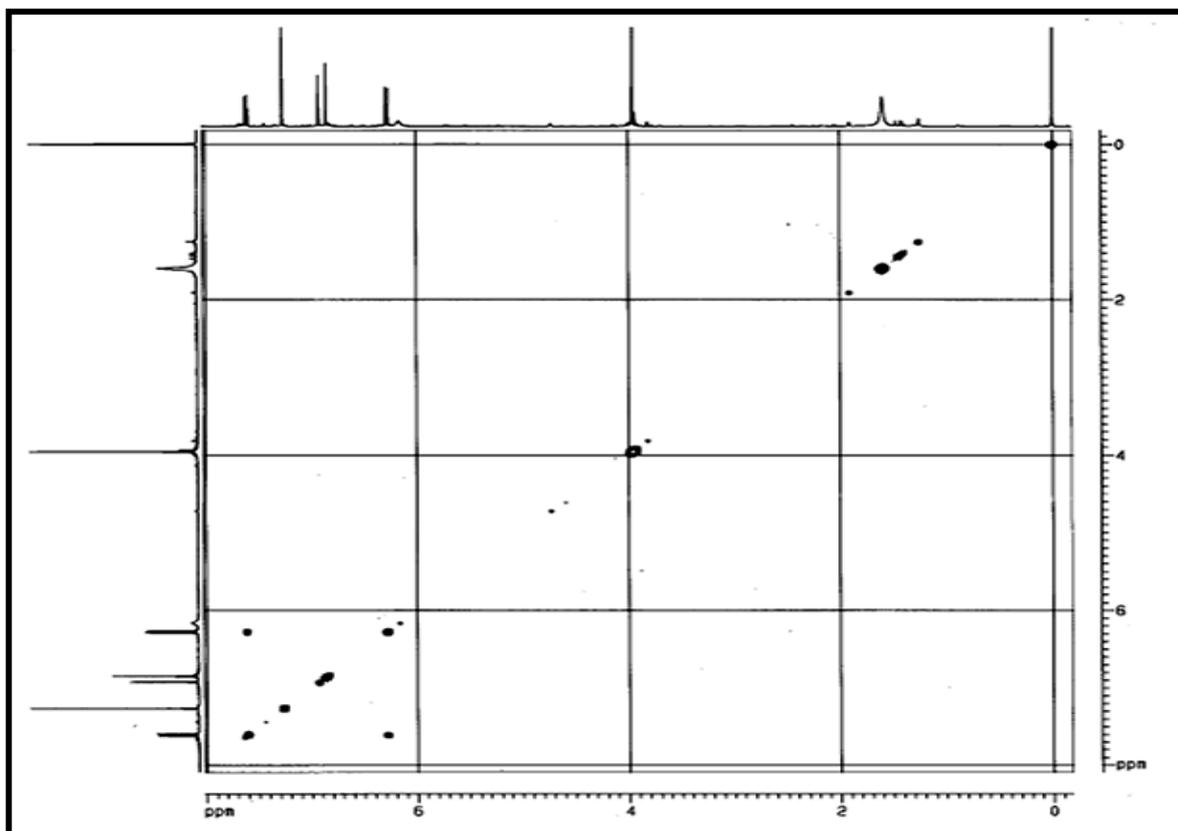


FIGURA 3.38: Espectro de COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.

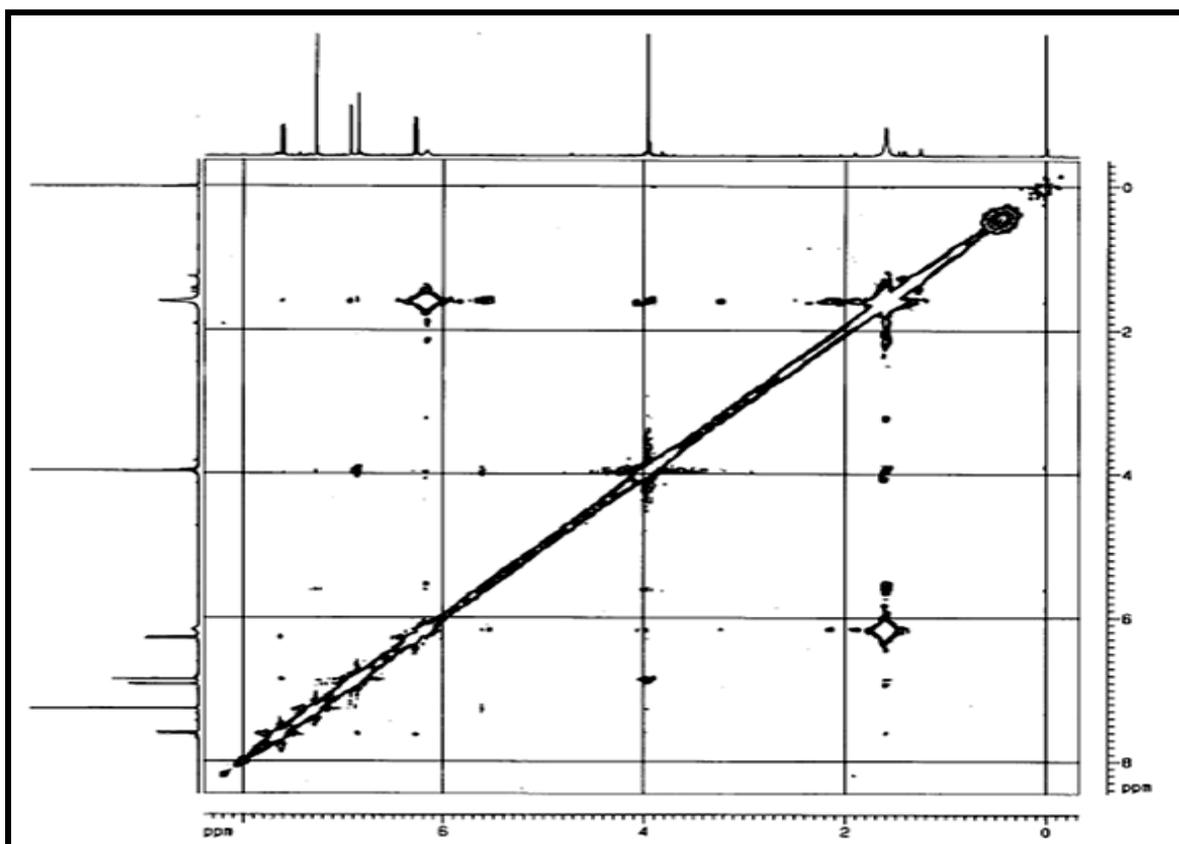


FIGURA 3.39: Espectro de NOESY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.

### 3.2.1.6. Determinação estrutural da Cumarina C7

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das frações PC3.1.1-4M (Figura 3.40) e PC3.1.1-7M (Figura 3.41, p.97) são bastante similar ao da PC2.1.3.3-9 (6-metóxi-7-hidroxicumarina), no entanto, não se pode dizer que correspondem a mesma cumarina, uma vez que as posições da hidroxila em 7 e da metoxila em 6 nesta molécula, podem estar invertidas, e isto não é observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Para tal distinção, é necessário utilizar outras técnicas de RMN, como NOESY e HMBC, conforme foi citado anteriormente, ou então, Espectrometria de Massas de cada fração, pois provavelmente a cumarina 6-metóxi-7-hidroxicumarina irá se fragmentar diferentemente da 6-hidróxi-7-metoxicumarina e, portanto, o espectro resultante terá picos distintos e com intensidades diferentes.

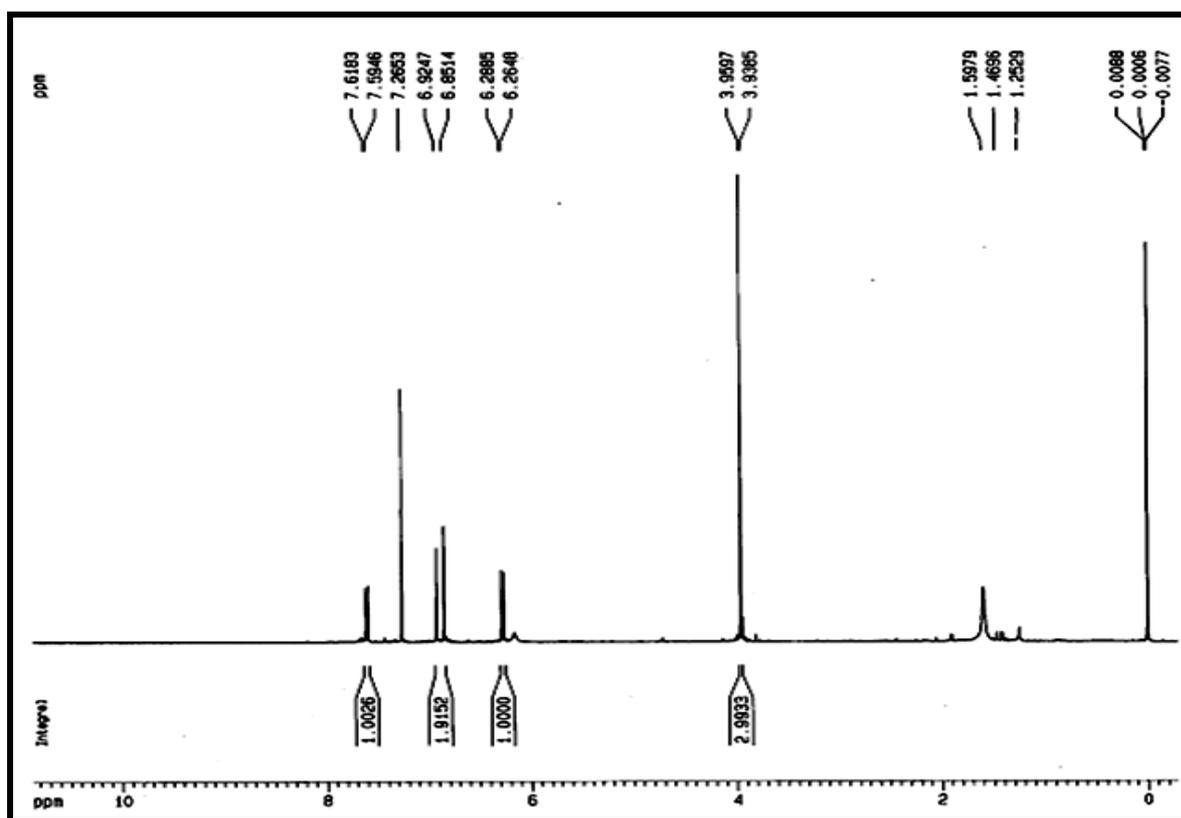


FIGURA 3.40: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da cumarina C6.

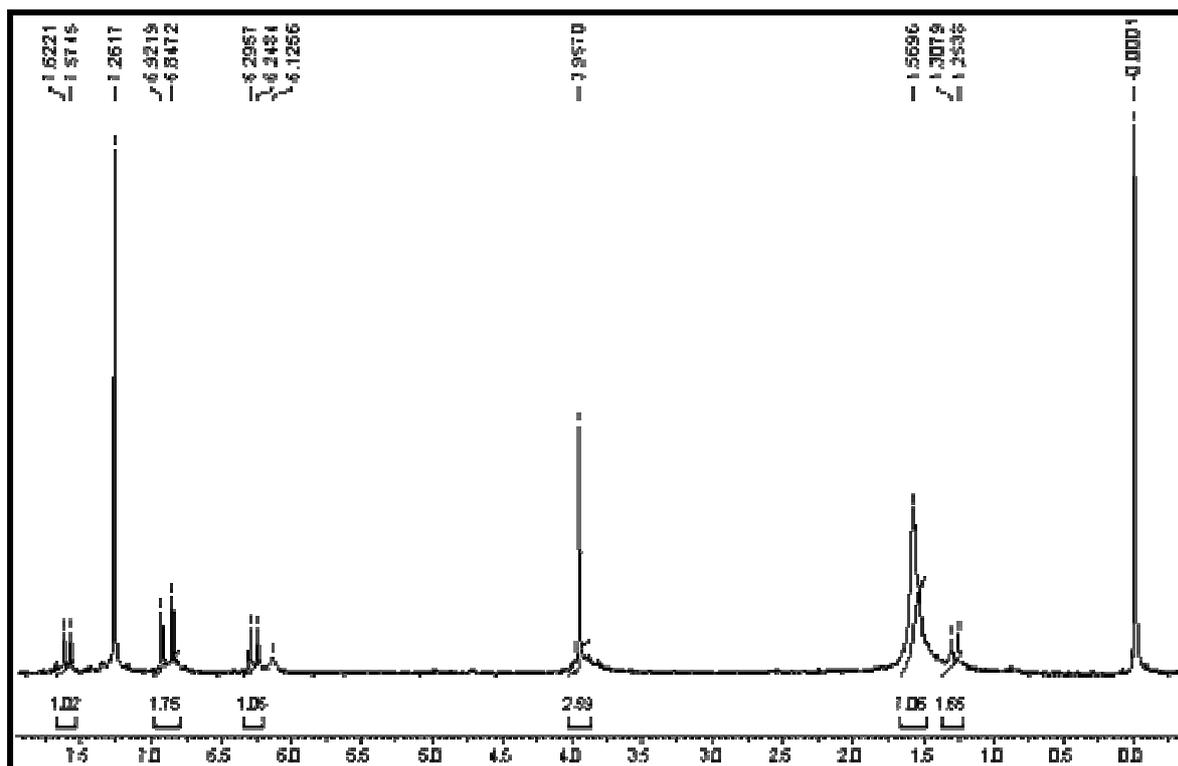


FIGURA 3.41: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) da cumarina C7.

Então, para saber quais das cumarinas correspondia as frações PC3.1.1-4M e PC3.1.1-7M, e para comprovar, por meio de mais uma técnica, que a fração PC2.1.3.3-9 é a 6-metóxi-7-hidroxycumarina, realizou-se experimentos de Espectrometria de Massas para estas frações.

Foi realizado para cada fração o experimento de Electrospray modo negativo (ES-), uma vez que, a molécula possui hidrogênios ácidos, ou seja, são facilmente removidos, não sendo necessário, portanto, energia de colisão muita forte, a qual pode ocasionar uma destruição total da molécula. Fez-se experimentos de íons obtidos a partir do íon de  $m/z$  191 de cada fração (Figuras 3.42, p.98, 3.43, p.98 e 3.44, p.99), para que se possa obter fragmentos da molécula, e com isto suas informações estruturais, e conseqüentemente verificar qual sua estrutura química. Neste caso, o experimento de full-scan não é relevante, pois este mostra apenas qual a massa da molécula, e isto já se sabe. Variou-se a energia de colisão, para comparar-se as diferenças nas fragmentações, pois alguns picos aparecem apenas com energias muito baixas (fragmentos moleculares fáceis de formar), enquanto que outros aparecem com energias muita alta (fragmentos moleculares difíceis de formar). A seguir estão mostrados os Espectros de Massas obtidos para cada

fração: PC2.1.3.3-9 (A), PC3.1.1-4M (B) e PC3.1.1-7M (C), utilizando-se energias de colisão de 30 a 5 eV e o full-scan.

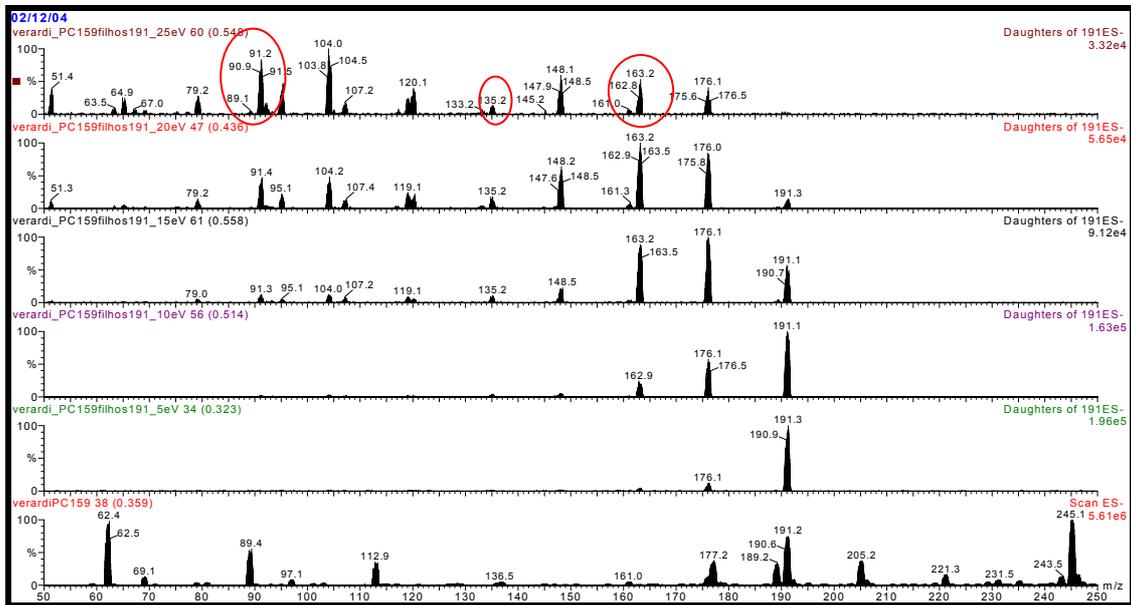


FIGURA 3.42: Espectro de Massas (ES-) dos íons de  $m/z$  191,3 (M-H) da fração A.

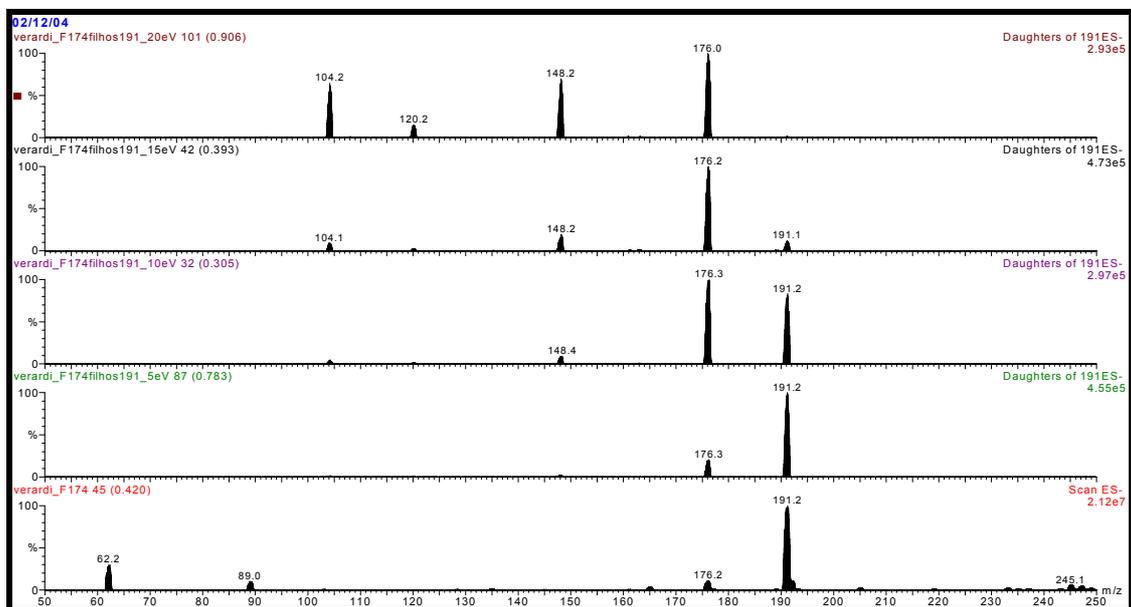


FIGURA 3.43: Espectro de Massas (ES-) dos íons de  $m/z$  191,3 (M-H) da fração B.

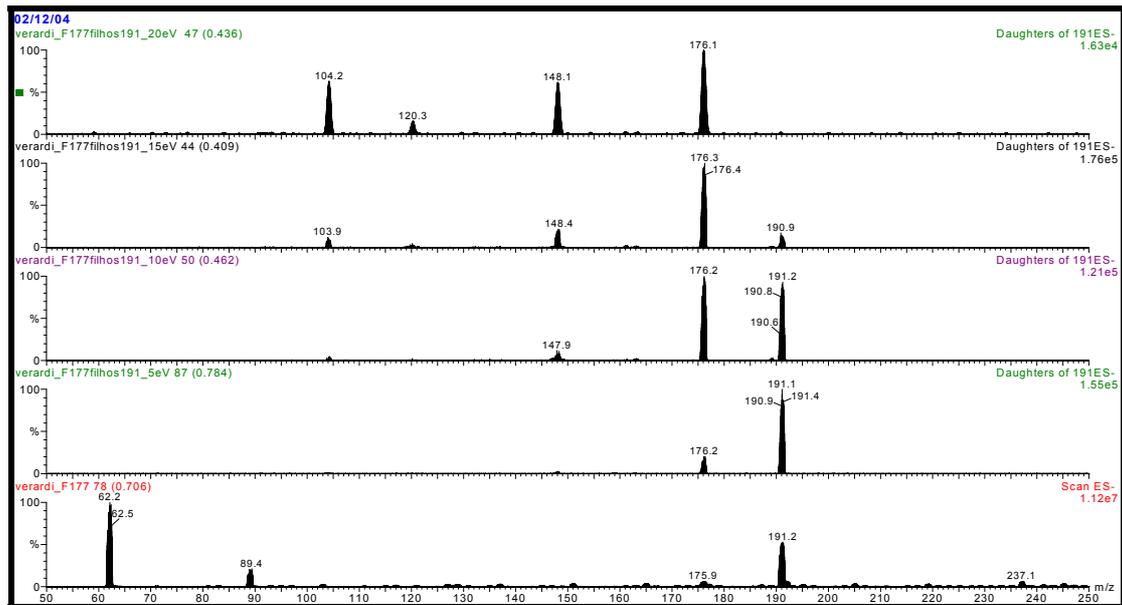
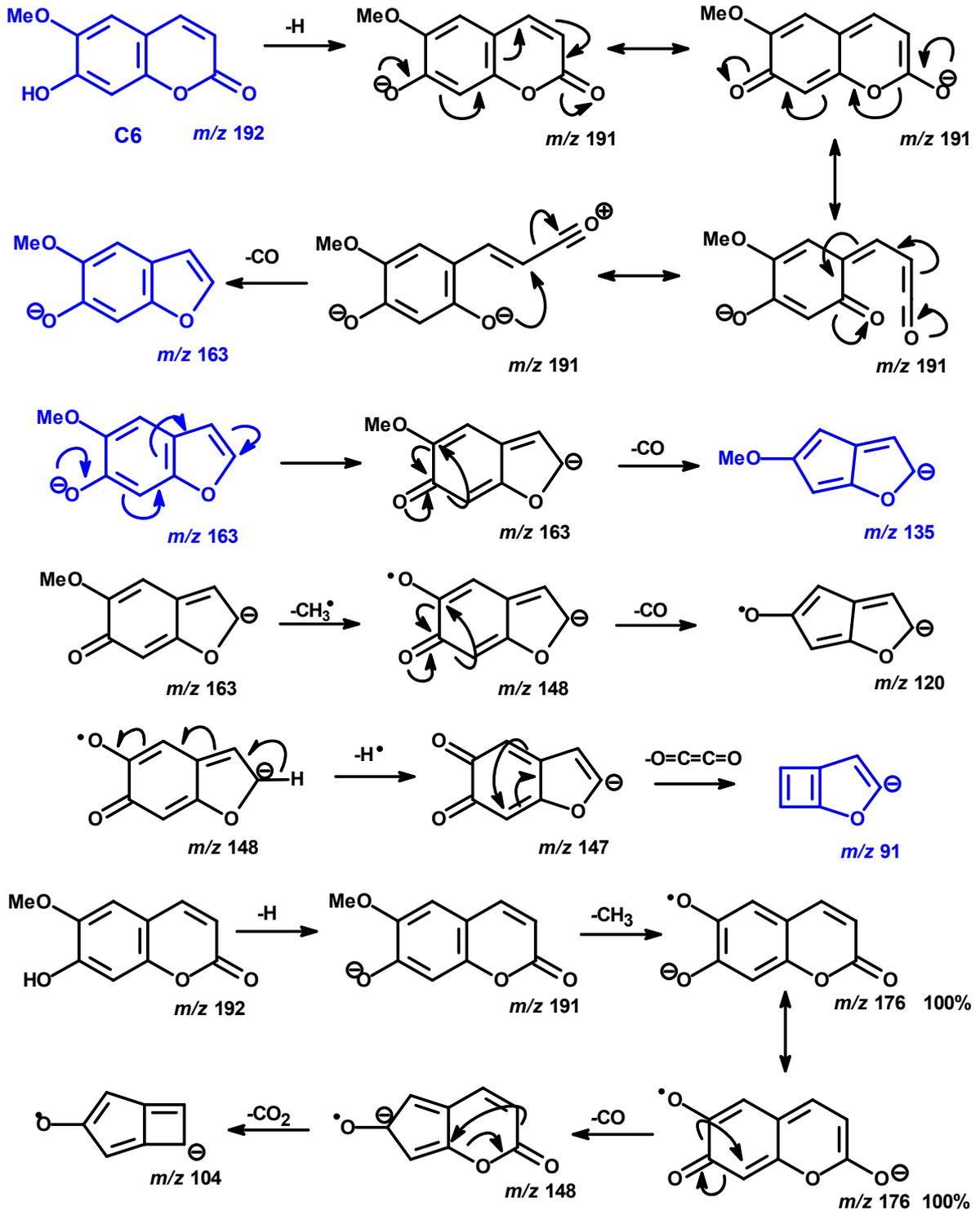
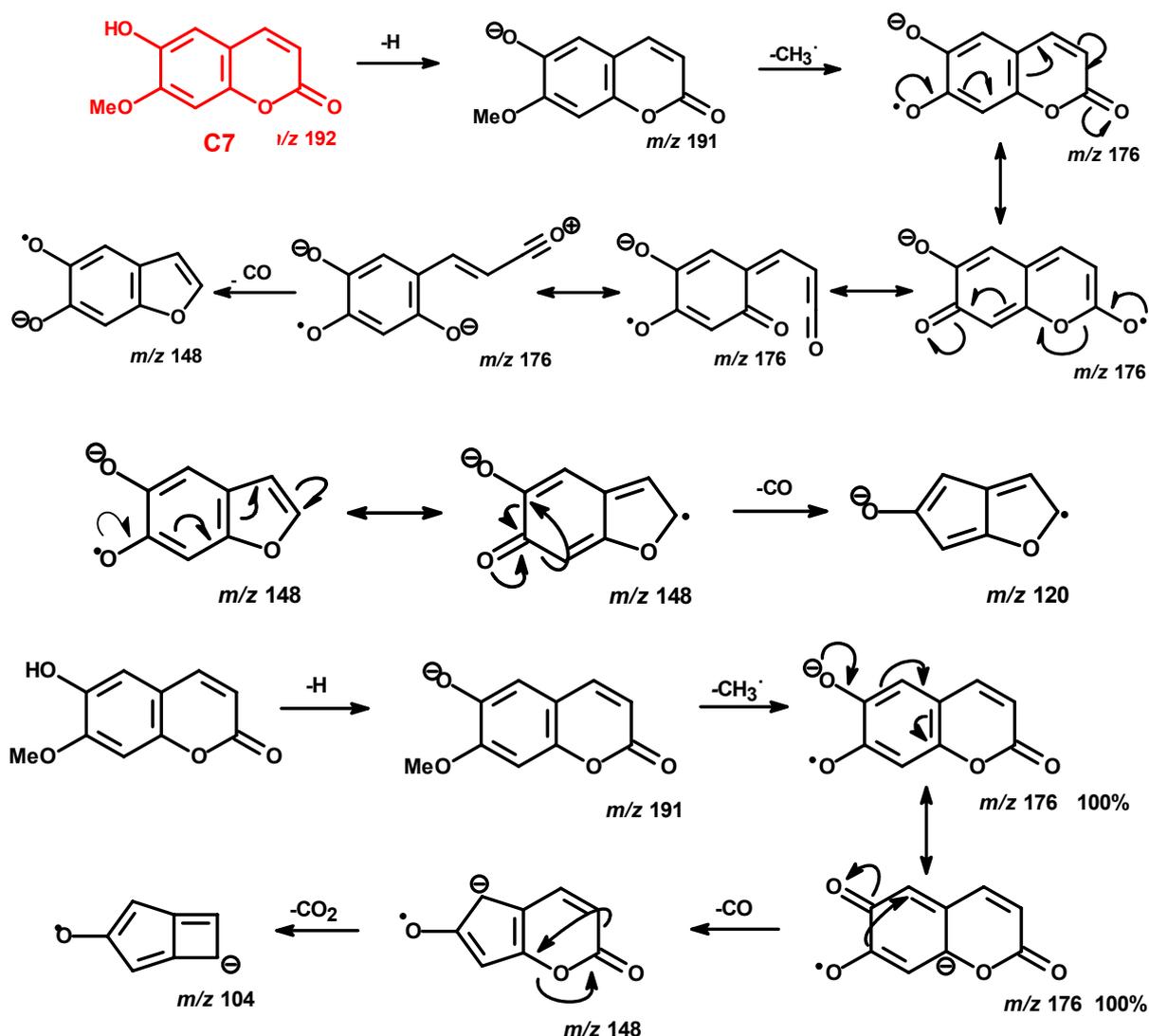


FIGURA 3.44: Espectro de Massas (ES-) dos íons de  $m/z$  191,3 (M-H) da fração C.

Observa-se que os espectros das frações B (Figura 3.43, p.98) e C (Figura 3.44) são muito parecidos em número e intensidade dos fragmentos, mesmo em diferentes energias de colisão, com isto podemos inferir que ambas frações correspondem a mesma cumarina. Os espectros da fração A possuem alguns pico semelhantes as demais, no entanto apresenta o pico com  $m/z$  163, 135 e 91, os quais não são observados nos espectros das demais frações. Com isto, há uma evidência de que são cumarinas distintas, uma vez que os espectros possuem picos diferentes. Então se propôs os fragmentos moleculares de cada cumarina e as fragmentações que as diferenciam (Esquema 3.6, p.100 e 101).

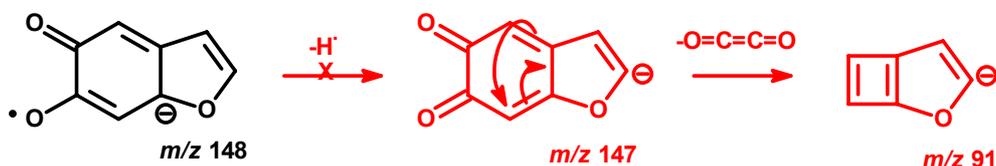




ESQUEMA 3.6: Proposta de fragmentação das cumarinas 6-metoxi-7-hidroxicumarina (C6) e 6-hidroxi-7-metoxicumarina (C7).

Verifica-se que a cumarina C6 quando perde um próton, estabiliza melhor a carga negativa devido a conjugação até o oxigênio presente na lactona, e após sucessivas migrações da carga há perda de CO fornecendo o íon de *m/z* 163. Já a cumarina C7 conjuga a carga negativa somente no sistema aromático do anel, porém a perda da metila radicalar é favorecida, pois o radical migra até o oxigênio da lactona, gerando um ânion-radicalar estável, o qual, por mecanismos similares ao da cumarina C6, perde CO; no entanto, gera-se o íon de *m/z* 148 e não o *m/z* 163, uma vez que teve a perda inicial da metila radicalar. A cumarina C7 não apresenta o íon com *m/z* 135, uma vez que este provém do íon *m/z* 163, o mecanismo está indicado no Esquema 3.6. A partir do *m/z* 148 da cumarina C6, há uma perda de um hidrogênio radicalar, devido a estabilização de um radical da molécula, e

conseqüentemente a perda de um ceteno gerando o íon  $m/z$  91. No entanto, no caso da cumarina C7, não há como perder um hidrogênio radicalar para estabilizar o radical do íon  $m/z$  148, não ocorrendo a formação do íon  $m/z$  91, como mostrado a seguir.



Os três íons  $m/z$  163, 135 e 91, são os íons diagnósticos capazes de distinguir entre estas duas cumarinas isoméricas (6-metóxi-7-hidroxicumarina e 6-hidróxi-7-metoxicumarina).

Com estas observações e propostas de fragmentações pode-se confirmar que a fração A é correspondente a cumarina 6-metóxi-7-hidroxycumarina e que as frações B e C correspondem ao seu isômero, 6-hidroxi-7-metoxicumarina.

Assim, obteve-se um outro composto, o qual não havia sido isolado anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, com massa igual a 3,7 mg: a 6-hidróxi-7-metoxicumarina - Isoescopoletina (C7), a qual está ilustrada a seguir (Figura 3.45).

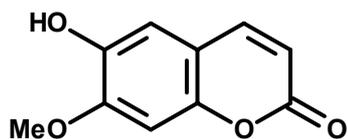
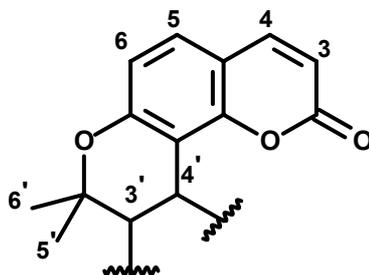


FIGURA 3.45: Estrutura da Isoescopoletina.

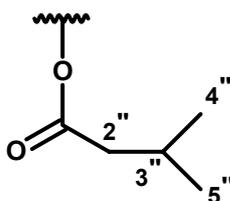
### 3.2.1.7. Determinação estrutural da Cumarina C8

Foram isoladas 3,3 mg da cumarina C8 na subfração PC2.3.1.1-4. Analisando-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.47, p.107), observa-se sinais característicos das cumarinas, como a presença de dois dubletos em  $\delta$  7,91 ( $J = 9,5$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,22 ( $J = 9,5$  Hz, 1H), estes sinais são referentes aos hidrogênios H-4 e H-3 respectivamente.

A presença de outros dois dubletos em  $\delta$  7,55 ( $J = 8,7$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,83 ( $J = 8,7$  Hz, 1H), refere-se aos hidrogênios H-5 e H-6 respectivamente. O espectro ainda indicou outros dois singleto em  $\delta$  1,54 (3H) e  $\delta$  1,41 (3H), referentes a duas metilas em 4' e 5'; e dois dubletos em  $\delta$  5,16 ( $J = 2,8$  Hz, 1H) e  $\delta$  4,97 ( $J = 2,8$  Hz, 1H), referentes aos H-3' e H-4', respectivamente. No entanto, estes valores de deslocamentos químicos e de constantes de acoplamento indicam a presença de um diol.



A molécula, no entanto, apresenta, além dos sinais discutidos, um dubleto com deslocamento químico em  $\delta$  2,21 ( $J = 6,8$  Hz, 2H), referente ao hidrogênio H-2''; dois dubletos em  $\delta$  0,89 ( $J = 6,6$  Hz, 3H) e  $\delta$  0,90 ( $J = 6,6$  Hz, 3H), os quais são característicos de um grupo isovaleril. O multiplete referente ao hidrogênio H-3'' não foi observado, pois este estava bem próximo ao do sinal do solvente ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ ).



Com estes dados, verifica-se que a molécula é uma piranocumarina angular e que possui nas posições 3' e 4' uma hidroxila e um éster; porém, não se sabe qual a posição exata de cada grupo. Portanto, realizou-se, além do experimento de RMN  $^1\text{H}$  400 MHz, os experimentos de RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e COSY.

A partir das correlações observadas no HSQC (Figura 3.51, p.109), o qual mostra a correlação do hidrogênio com o carbono ligado diretamente, atribui-se os sinais dos carbonos correspondentes (Tabela 3.13).

TABELA 3.13: Dados de RMN  $\text{H}^1$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) e RMN  $\text{C}^{13}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C8 em comparação com os dados da literatura\*.

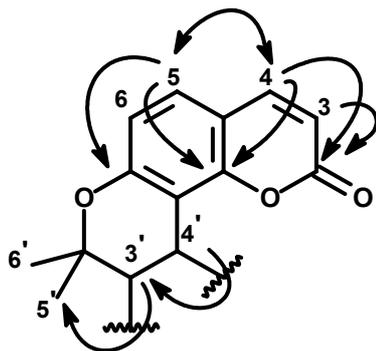
H	$\delta_{\text{H}}$	J (Hz)	$\delta^*_{\text{H}}$	J* (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
3	6,22 (d)	9,5	6,26 (d)	9,5	113,2
4	7,91 (d)	9,5	7,66 (d)	9,5	145,0
5	7,55 (d)	8,7	7,35 (d)	8,6	130,5
6	6,83 (d)	8,7	6,82 (d)	8,6	115,0
3'	5,16 (d)	2,8	5,21 (d)	3,7	74,5
4'	4,97 (d)	2,8	5,02 (d)	3,7	62,4
5'	1,41 (s)	-	1,38 (s)	-	25,1
6'	1,54 (s)	-	1,48 (s)	-	24,2
2''	2,21 (d)	6,8	2,22 (d)	6,3	43,6
4'', 5''	0,90 (d)	6,6	0,94 (d)	6,6	22,5

$\delta^*$  e  $J^*$  são os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos da literatura (JU - ICHI *et al.*, 1986).

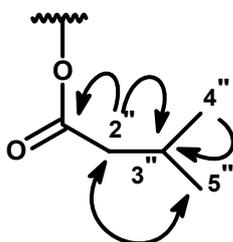
O experimento de HMBC (Figura 3.52, p.109), o qual apresenta correlações até três ligações na molécula, mostrou as seguintes correlações:

H-3 ( $\delta$  6,22) e H-6 ( $\delta$  6,83) com um sinal em  $\delta$  113,3, o qual somente pode corresponder ao C-10, uma vez que este é o único carbono na molécula que pode correlacionar-se até três ligações com os H-3 e H-6.

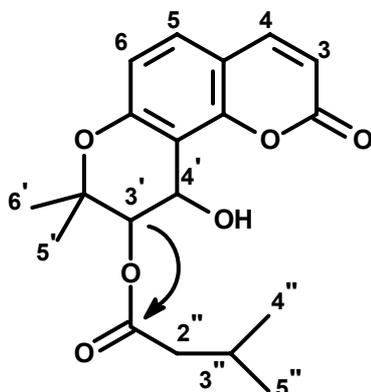
H-4 ( $\delta$  7,91) com  $\delta$  130,5 (H-5),  $\delta$  155,7 (H-9),  $\delta$  160,8 (H-2); o H-5 ( $\delta$  7,55) com  $\delta$  145,0 (H-4),  $\delta$  156,8 (H-7),  $\delta$  155,7 (H-9); o H-3 ( $\delta$  6,22) com o  $\delta$  113,3 (H-10),  $\delta$  160,8 (H-2); o H-6' ( $\delta$  1,54) com o  $\delta$  24,2 (H-6'),  $\delta$  74,5 (H-3'); o H-5' ( $\delta$  1,41) com o  $\delta$  25,1 (H-5'),  $\delta$  74,5 (H-3'); o H-4' ( $\delta$  4,97) com o  $\delta$  74,5 (H-3').



H-2'' ( $\delta$  2,20) com o  $\delta$  22,5 (H-4'' e H-5''),  $\delta$  26,3 (H-3''),  $\delta$  172,2 (H-1''); o H-4'' e H-5'' ( $\delta$  0,90) com o  $\delta$  22,5 (H-4'' e H-5''),  $\delta$  26,3 (H-3'') e  $\delta$  43,5 (H-2'');

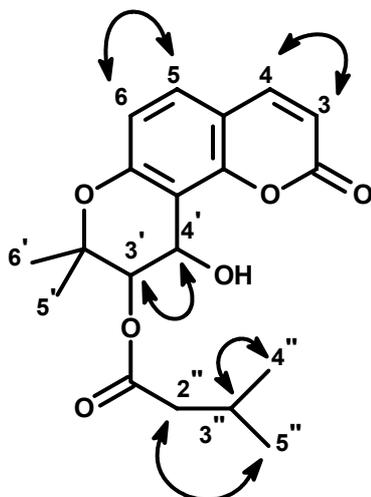


H-3' ( $\delta$  5,16) com o  $\delta$  62,4 (H-4'),  $\delta$  172,2 (H-1''), e esta correlação do H-3' com o H-1'', determina a posição do éster na molécula; como este experimento mostra a correlação de, no máximo, três ligações, o éster somente pode estar na posição 3', e conseqüentemente a hidroxila encontra-se na posição 4'. Com isto determina-se que a molécula isolada é a isovalerilkelactona, conhecida também como Junosmarina.



O experimento de COSY (Figura 3.53, p.110) mostrou as correlações do H-4 ( $\delta$  7,91) com o H-3 ( $\delta$  6,23); o H-5 ( $\delta$  7,55) com o H-6 ( $\delta$  6,83); o H-3' ( $\delta$  5,16) com o H-4' ( $\delta$  4,97); o H-2'' ( $\delta$  2,20) com os H-4'' e H-5'' ( $\delta$  0,90); o H-3'' ( $\delta$  2,10) com os H-

4'' e H-5'' ( $\delta$  0,90); as quais são totalmente possíveis e plausíveis para a estrutura proposta.



Com todos experimentos, pode-se atribuir todos os sinais de carbono da molécula, mesmo dos carbonos não ligados diretamente a hidrogênio. Os carbonos estão mostrados na Figura 3.46.

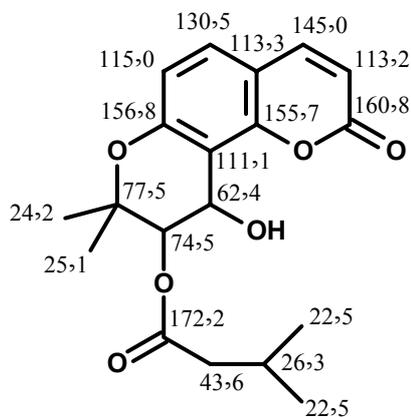


FIGURA 3.46: Deslocamentos químicos dos carbonos da cumarina C8

A partir do conjunto de dados e informações adquiridas, pode-se dizer que a cumarina isolada é o éster Isovalerilkelactona: Junosmarina, a qual não havia sido isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

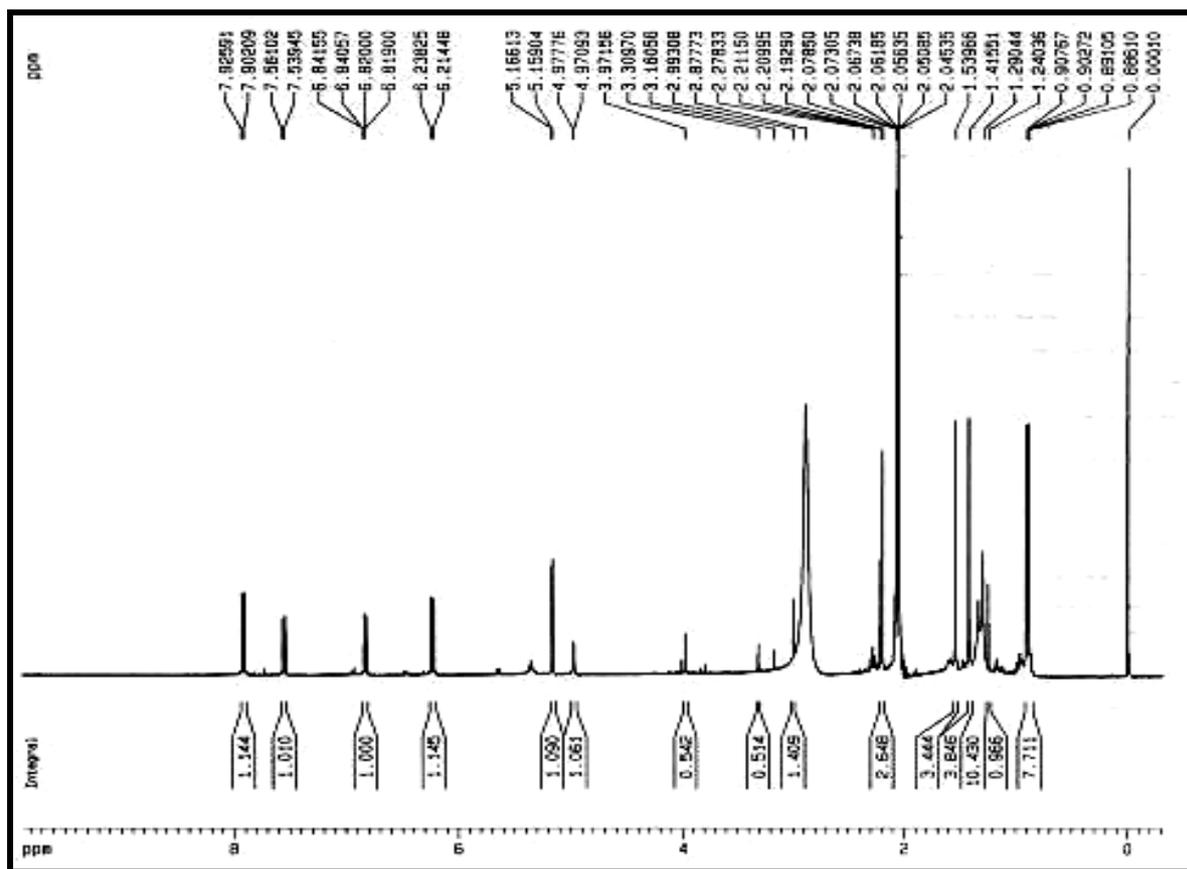


FIGURA 3.47. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C8.

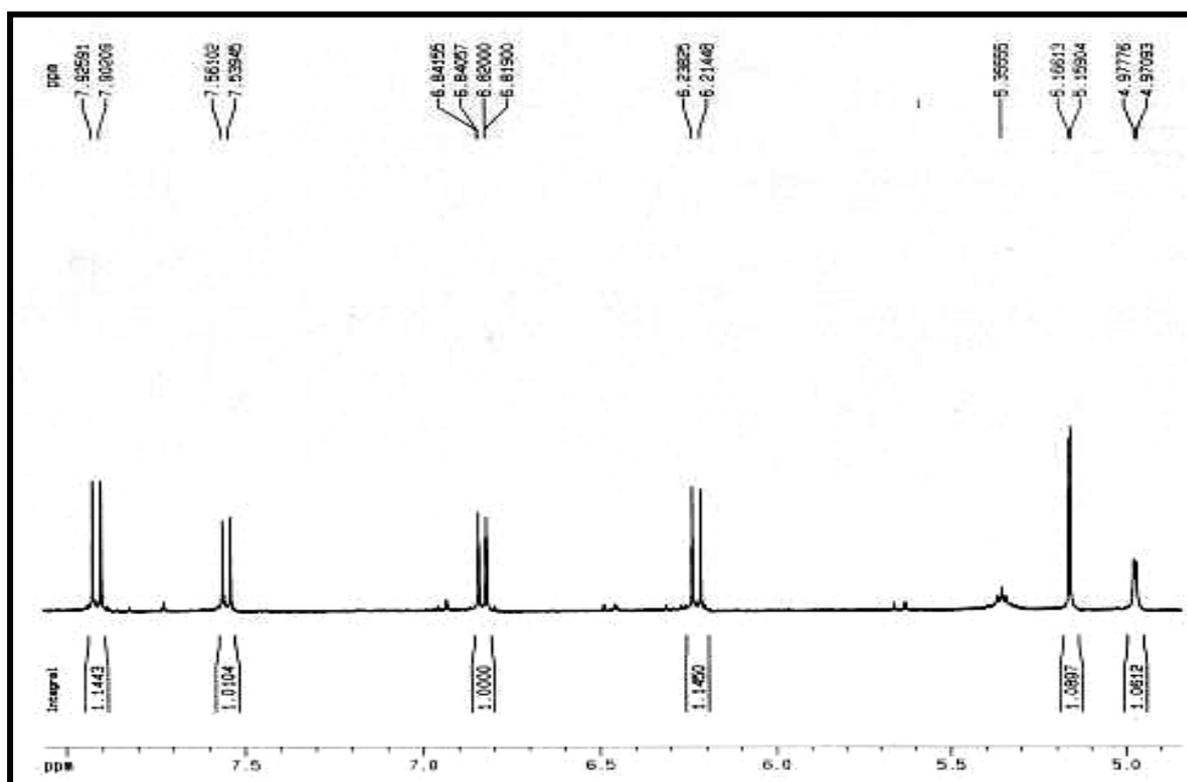


FIGURA 3.48. Ampliação A do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C8.

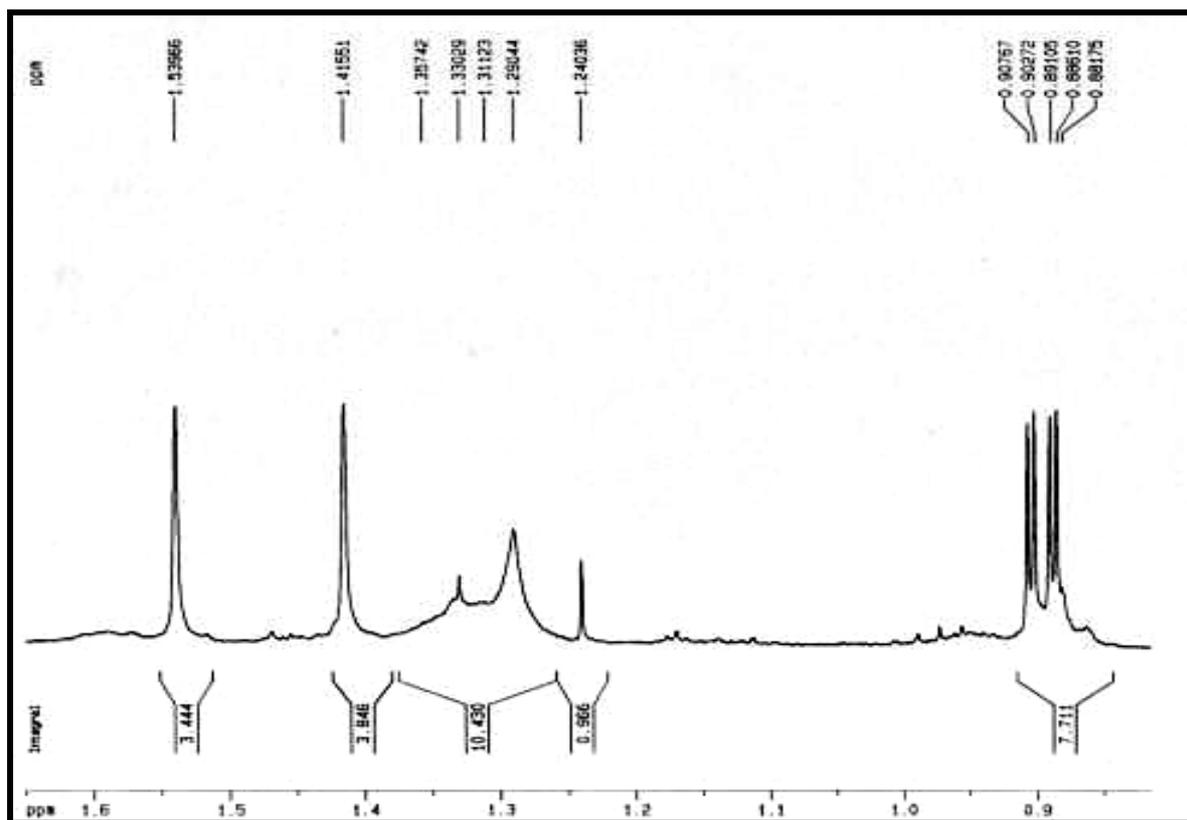


FIGURA 3.49. Ampliação B do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C8.

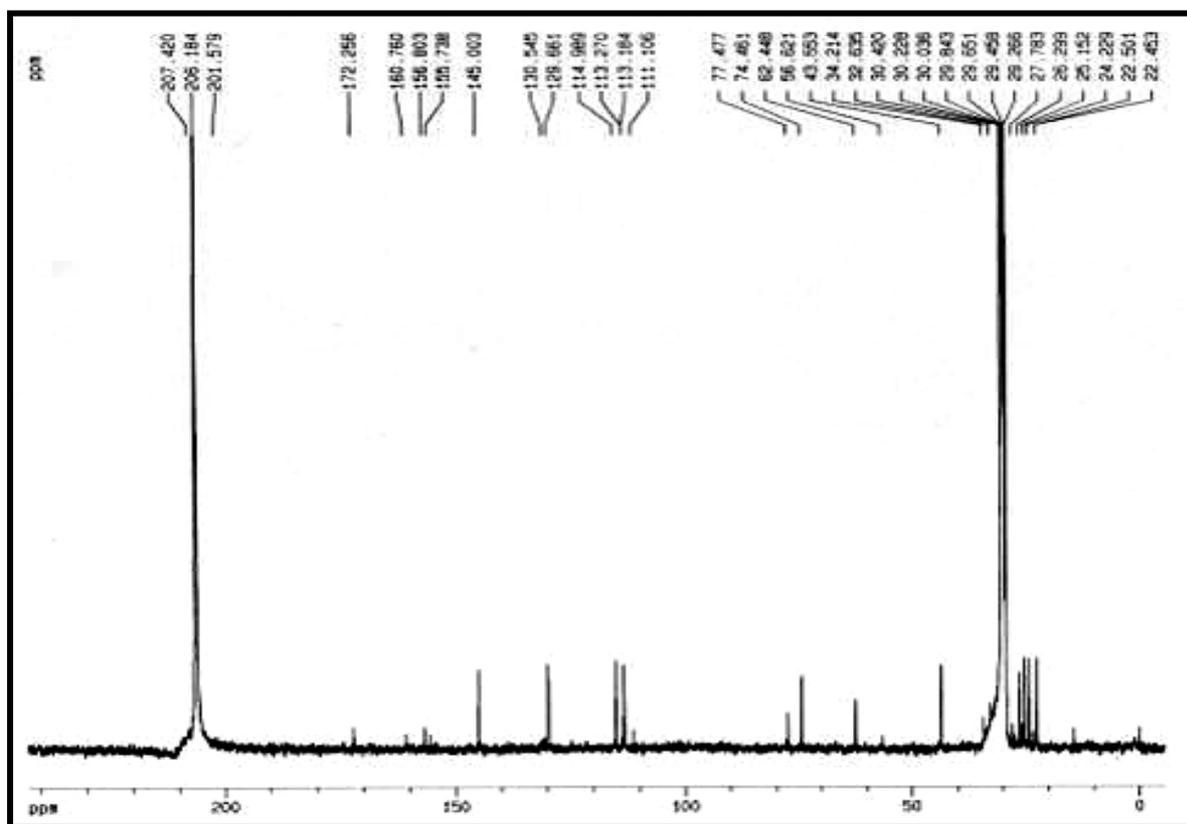


FIGURA 3.50. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C8.

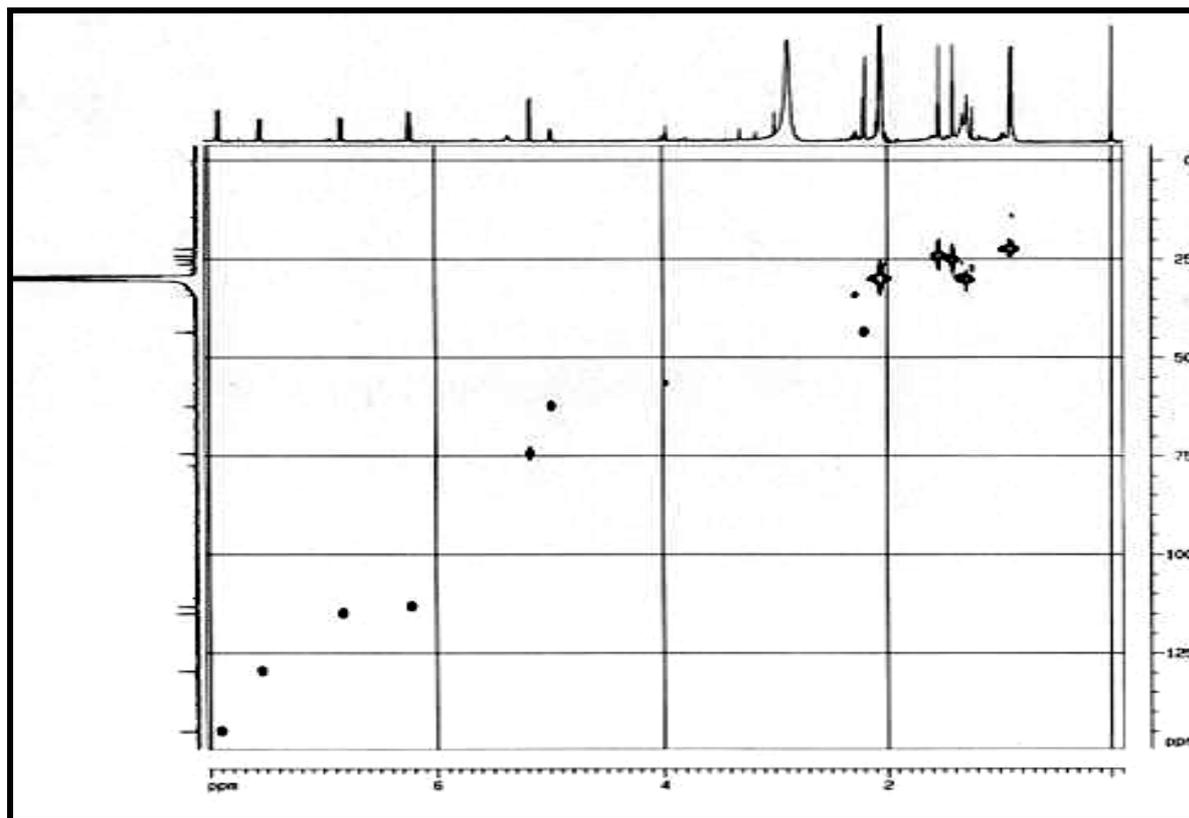


FIGURA 3.51. Espectro de HSQC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C8.

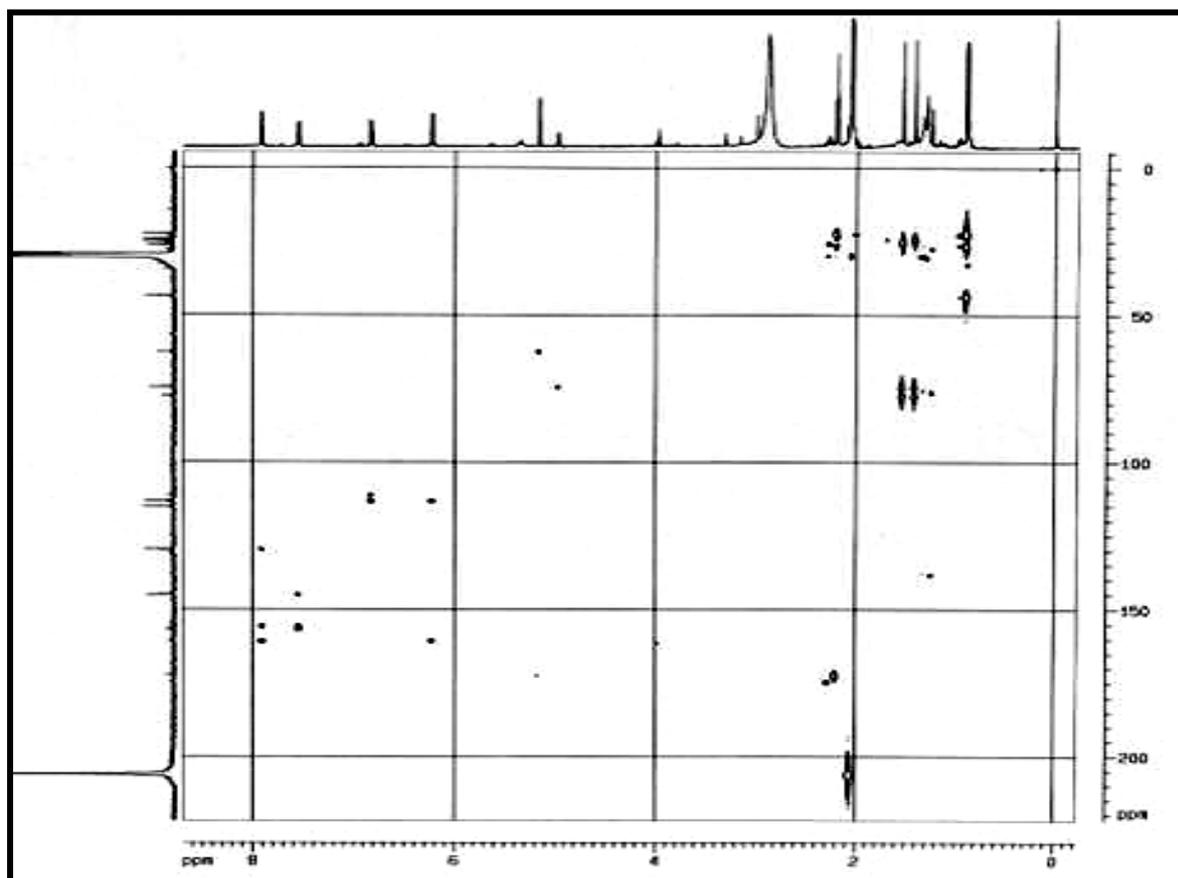


FIGURA 3.52. Espectro de HMBC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C8.

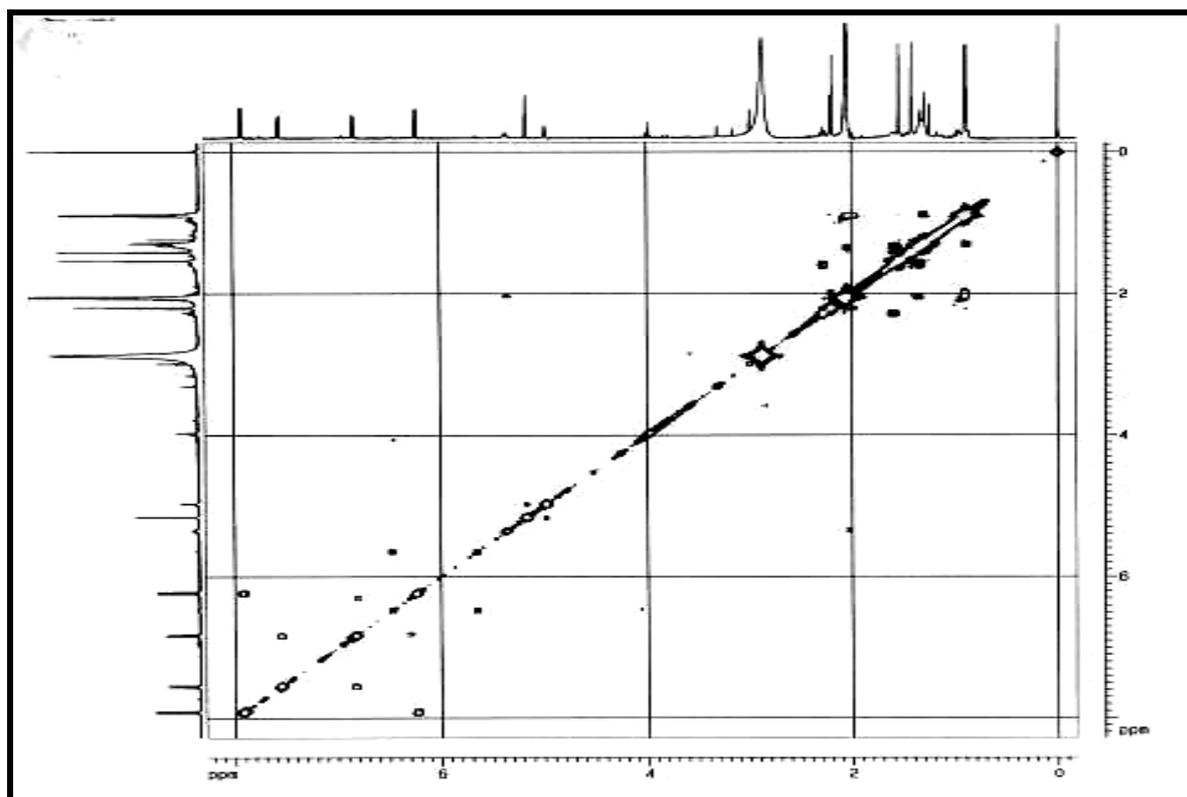


FIGURA 3.53. Espectro de COSY ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C8.

### 3.2.1.8. Determinação estrutural da Cumarina C9

Foram isoladas 2,0 mg da cumarina C9 na subfração PC3.1.4-3. Analisando-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.55, p.115), observa-se alguns sinais característicos das cumarinas, ou seja, dois dubletos em  $\delta$  7,82 ( $J = 9,5$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,12 ( $J = 9,5$  Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente.

A presença de um tripleto em  $\delta$  5,34 ( $J = 7,4$  Hz, 1H), de um dubleto em  $\delta$  3,33 ( $J = 7,4$  Hz, 2H), e dois singletos em  $\delta$  1,71 (3H) e  $\delta$  1,72 (3H), sugere que a molécula contém um grupo prenila em alguma posição. Os sinais de dois singletos em  $\delta$  7,34 (1H) e  $\delta$  6,76 (1H) correspondem aos hidrogênios 5 e 8 respectivamente. Com isto, pode-se afirmar que o grupo prenila encontra-se na posição 6.

Falta verificar se há uma metoxila ou uma hidroxila na posição 7, para isto integrou-se um sinal característico de metoxila em  $\delta$  3,74 presente no espectro e obteve-se um valor correspondente a um hidrogênio, no entanto o valor deveria corresponder a três hidrogênios. Então concluiu-se que esta molécula contém uma hidroxila na posição 7, e que o sinal aparentemente de uma metoxila deve ser proveniente de impurezas presente na amostra. Os sinais observados no espectro de hidrogênio foram comparados com a literatura, conforme ilustrado na Tabela 3.14.

TABELA 3.14: Dados de RMN  $\text{H}^1$  (200 MHz) da cumarina C9 em comparação com os dados da literatura.

H	$\delta$	J (Hz)	$\delta^*$	J* (Hz)
4	7,82 (d)	9,5	7,66 (d)	9,5
3	6,12 (d)	9,5	6,24 (d)	9,5
5	7,34 (s)	-	7,47 (s)	-
8	6,76 (s)	-	7,05 (s)	-
1'	3,33 (d)	7,4	3,37 (d)	7,5
2'	5,34 (t)	7,4	5,32 (d)	7,5
4'	1,71 (s)	-	1,74 (s)	-
5'	1,72 (s)	-	1,78 (s)	-

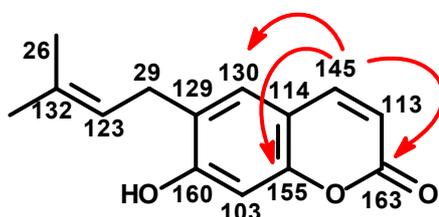
$\delta^*$  e J\* são os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos da literatura (VRKOC, 1972).

Realizou-se experimentos de RMN 2D (COSY, HSQC e HMBC), para comprovação da estrutura proposta. O experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  não foi realizado, uma vez que a substância encontrava-se em uma quantidade muito pequena, e isto demanda um tempo de máquina grande. Como esta molécula é conhecida na literatura, não se achou necessário a realização do experimento de RMN  $^{13}\text{C}$ , pois no experimento de HSQC e HMBC obtém-se os valores de  $^{13}\text{C}$  aproximados, e pode-se confirmar estes por comparação com a literatura.

No experimento de COSY (Figura 3.59, p.117), observou-se as seguintes correlações: o sinal em  $\delta$  7,82 (H-4) com o sinal em  $\delta$  6,12 (H-3); o sinal em  $\delta$  5,34 (H-2') com o sinal em  $\delta$  3,33 (H-1'); o sinal em  $\delta$  5,34 (H-2') com os sinais em  $\delta$  1,72 e  $\delta$  1,71 (H-4' e H-5'); o sinal em  $\delta$  3,33 (H-1') com os sinais em  $\delta$  1,72 e  $\delta$  1,71 (H-4' e H-5').

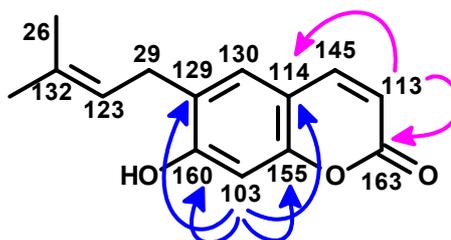
Com o experimento de HSQC (Figura 3.57, p.116), atribuiu-se os sinais aproximados de cada carbono e depois comparou-se com a literatura. A partir do experimento de HMBC (Figura 3.58, p.116) pode-se notar as seguintes correlações:

- O hidrogênio em  $\delta$  145 (H-4) correlacionou-se com os hidrogênios em  $\delta$  130 (H-5),  $\delta$  155 (H-9) e  $\delta$  163 (H-2);

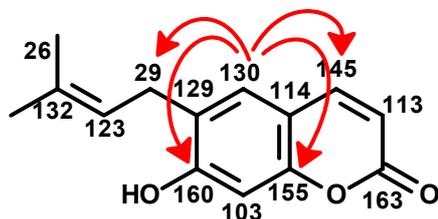


- O hidrogênio em  $\delta$  113 (H-3) correlacionou-se com os hidrogênios em  $\delta$  114 (H-10) e  $\delta$  163 (H-2);

- O hidrogênio em  $\delta$  103 (H-8) correlacionou-se com os hidrogênios em  $\delta$  114 (H-10),  $\delta$  129 (H-6),  $\delta$  155 (H-9) e  $\delta$  160 (H-7);

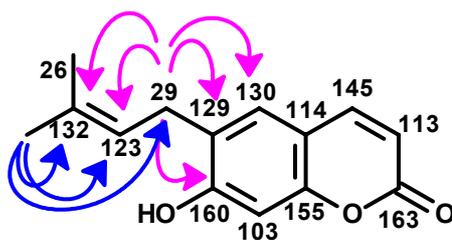


- O hidrogênio em  $\delta$  130 (H-5) correlacionou-se com os hidrogênios em  $\delta$  29 (H-1'),  $\delta$  145 (H-4),  $\delta$  155 (H-9) e  $\delta$  160 (H-7);



- Os hidrogênios em  $\delta$  29 (H-1') correlacionaram-se com os hidrogênios em  $\delta$  123 (H-2'),  $\delta$  129 (H-6),  $\delta$  130 (H-5),  $\delta$  132 (H-3'') e  $\delta$  160 (H-7);

- Os hidrogênios em  $\delta$  26 (H-4',5') correlacionaram-se com os hidrogênios em  $\delta$  26 (H-4',5'),  $\delta$  123 (H-2''), e  $\delta$  132 (H-3').



A partir destes dados pode-se atribuir valores a todos carbonos presentes na molécula e compará-los com a literatura. E pode-se verificar que as correlações obtidas estão totalmente coerentes com a molécula proposta.

TABELA 3.15: Valores de RMN  $^{13}\text{C}$  (200 MHz) obtidos pelas correlações apresentadas no espectro de HMBC e no HSQC.

Posição na molécula	$\delta\text{C}$	$\delta\text{C}^*$
2	~ 163	162,0
3	~ 113	112,7
4	~ 145	143,7
5	~ 130	128,4
6	~ 129	129,0
7	~ 160	158,5
8	~ 103	103,3
9	~ 155	153,5
10	~ 114	112,8
1'	~ 29	28,7
2'	~ 123	120,9
3'	~ 132	130,1
4'-5'	~ 26	25,8

\*valores obtidos pela literatura (MACIAS *et al.*, 1989).

Com estes experimentos conclui-se que a cumarina C9 é realmente a 6-prenil-7-hidroxycumarina (demetilsuberosina). A suberosina foi isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, no entanto esta cumarina não.

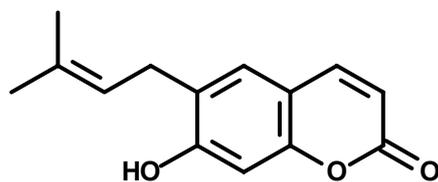


FIGURA 3.54: Estrutura da Demetilsuberosina.

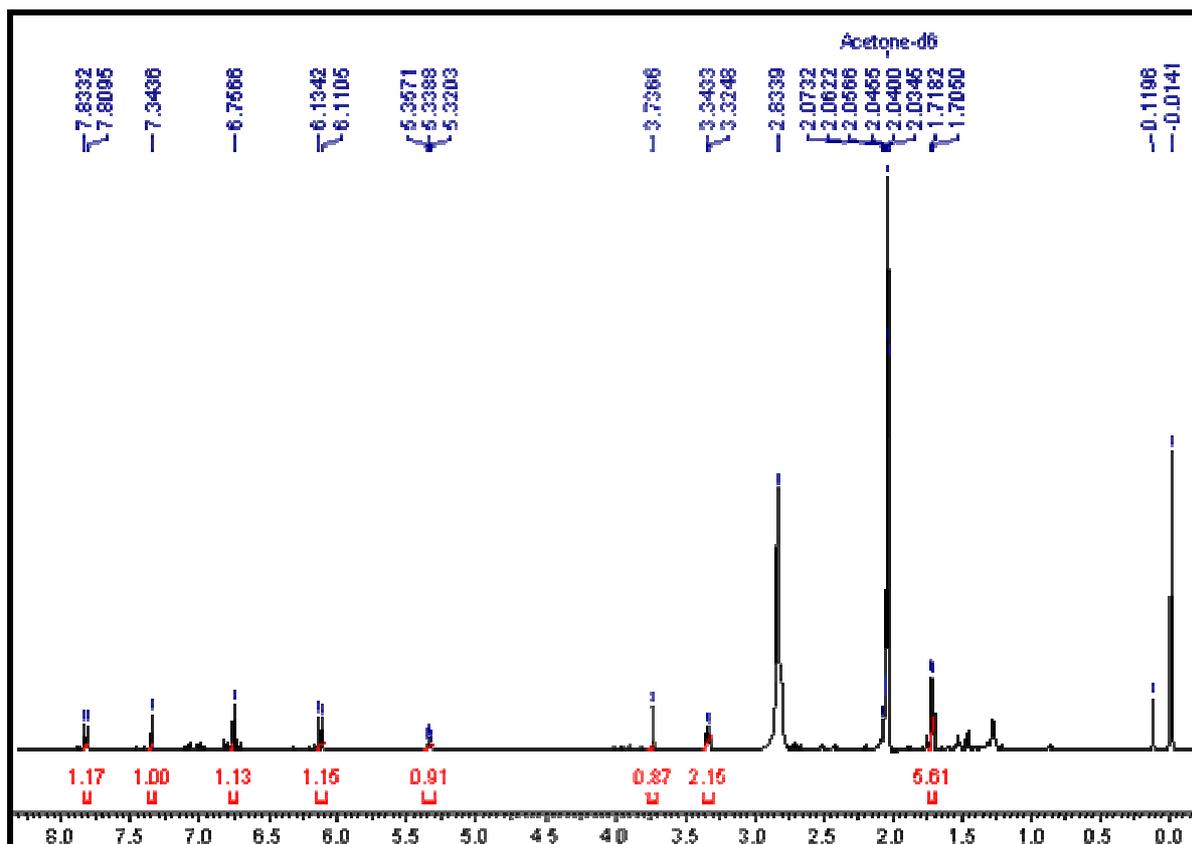


FIGURA 3.55. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 200 MHz) da cumarina C9.

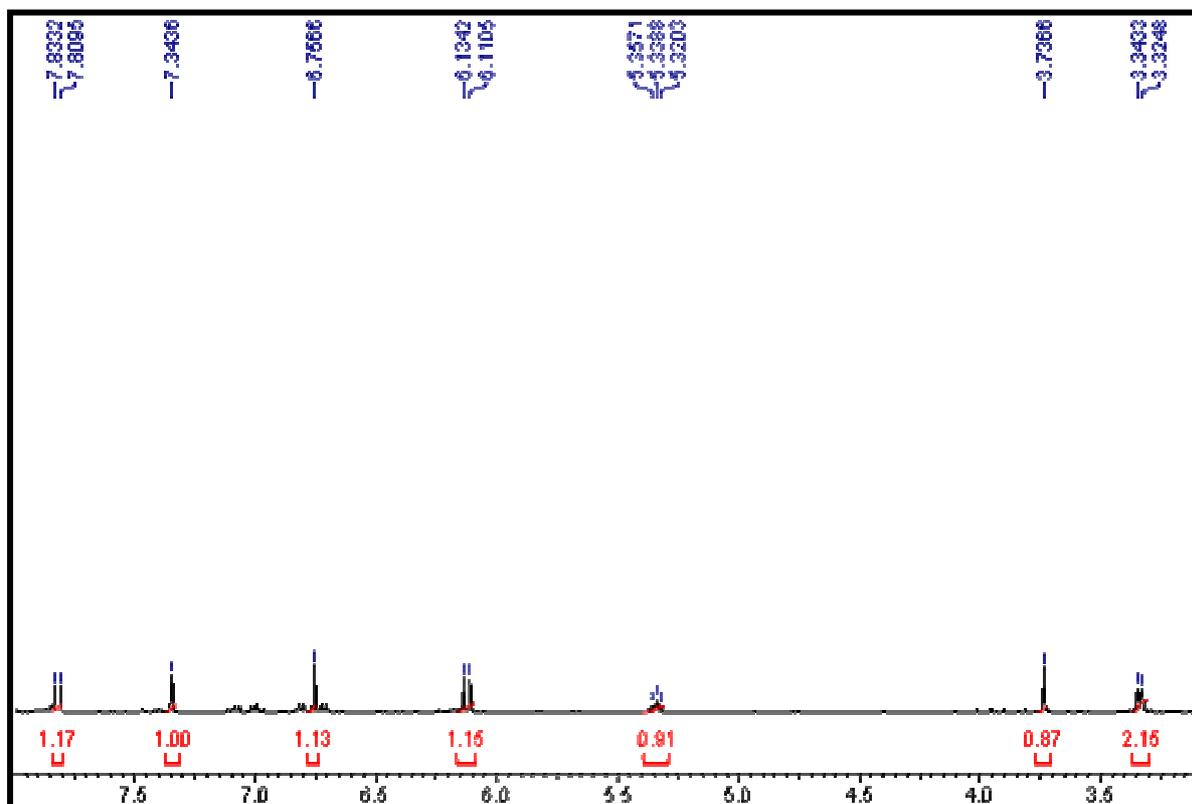


FIGURA 3.56. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 200 MHz) da cumarina C9.

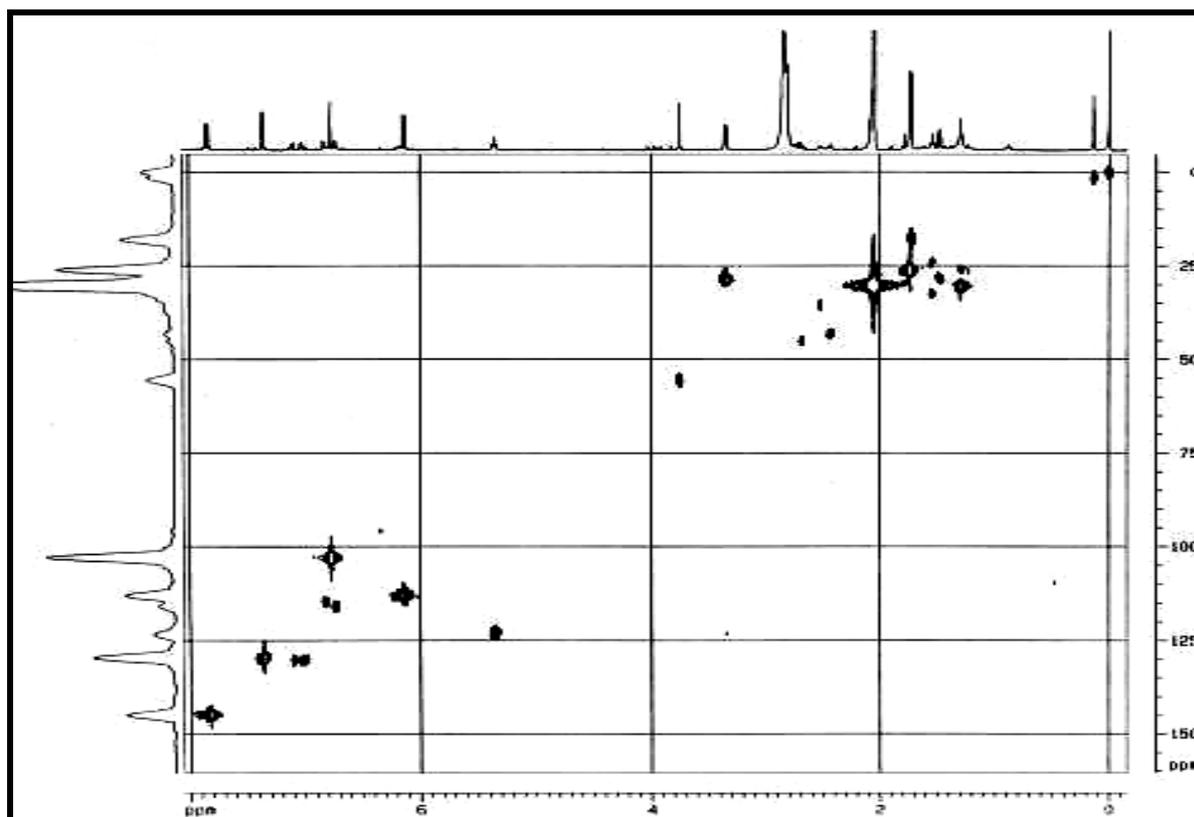


FIGURA 3.57. Espectro de HSQC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C9.

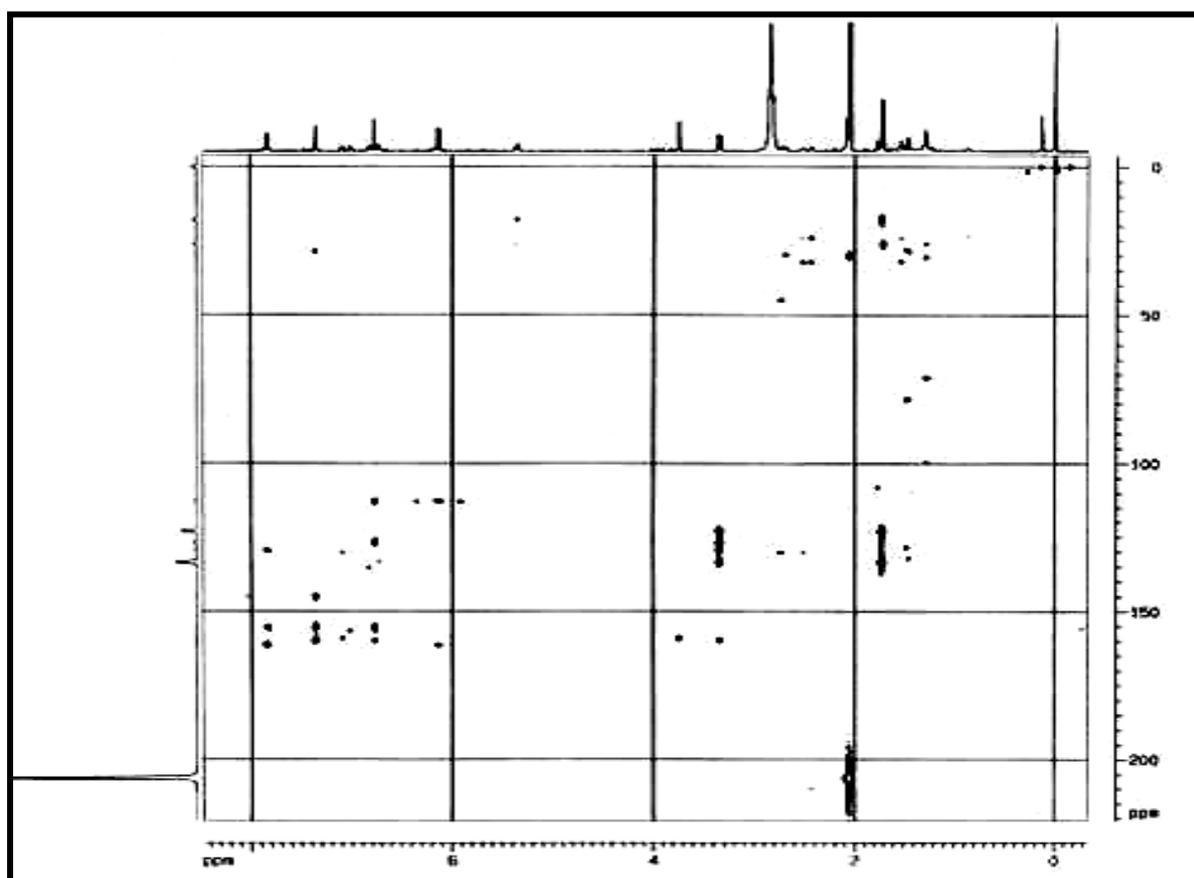


FIGURA 3.58. Espectro de HMBC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C9.

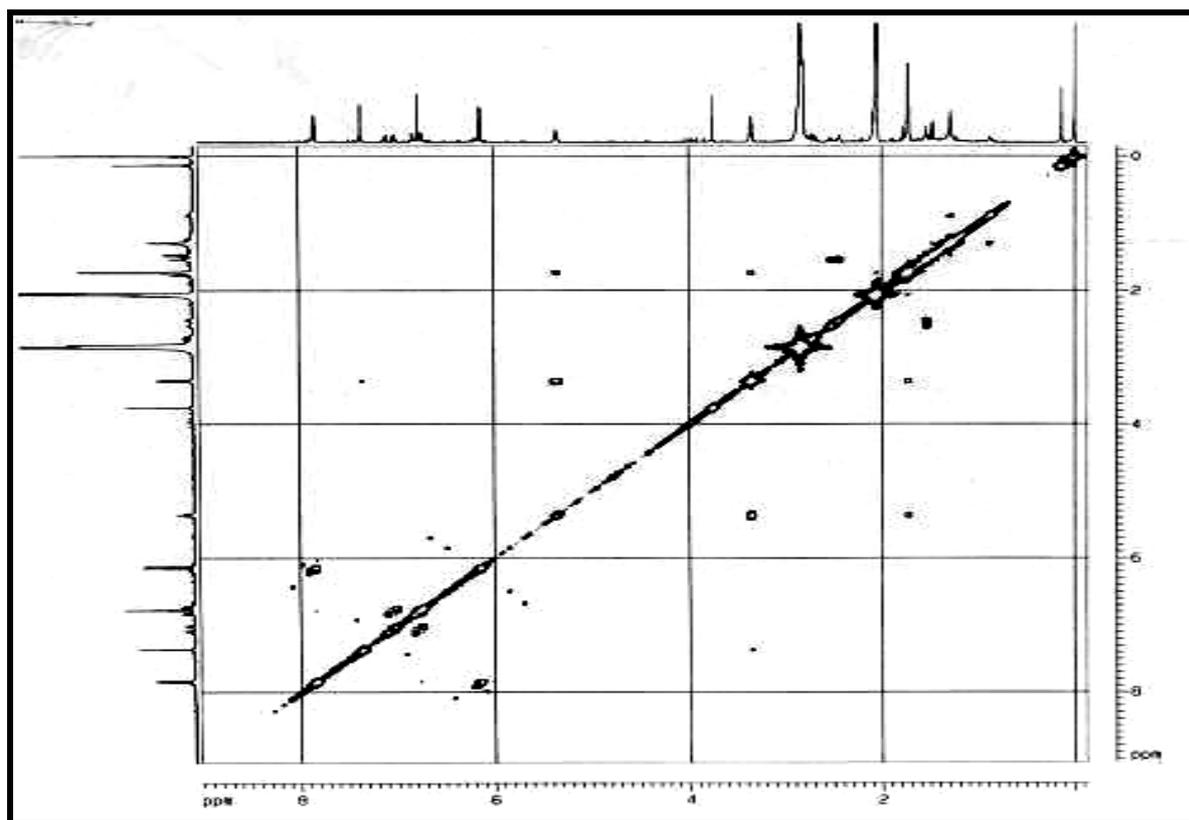
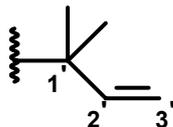


FIGURA 3.59. Espectro de COSY ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) da cumarina C9.

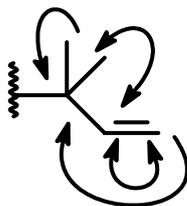
### 3.2.1.9. Determinação estrutural da Cumarina C10

Foram isoladas 5,8 mg de uma mistura da cumarina C10 com a cumarina C3 (Xantoxiletina) na subfração PC2.3.1.4-5. Analisando-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.62, p.124), observa-se sinais idênticos aos da cumarina Xantoxiletina e outros sinais distintos. Sabe-se que se trata de uma mistura e não de um dímero, uma vez que a integral dos sinais da Xantoxiletina encontram-se três vezes menor que a integral dos sinais referentes a cumarina C10.

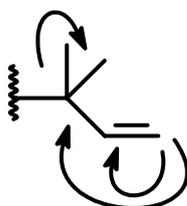
Após detectado que uma das moléculas é a Xantoxiletina, analisou-se os demais sinais para identificar a outra cumarina. Inicialmente, verificou-se a presença de três duplos dubletos em  $\delta$  6,30 (*dd*,  $J = 17,4$  Hz e 10,6 Hz, 1H),  $\delta$  4,86 (*dd*,  $J = 10,6$  Hz e 1,2 Hz, 1H) e  $\delta$  4,93 (*dd*,  $J = 17,4$  Hz e 1,2 Hz, 1H), os quais correspondem as posições 2' e 3', respectivamente, de um grupo prenila modificado.



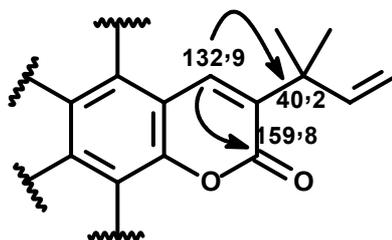
O espectro de HSQC (Figura 3.66, p.126) mostrou a correlação do sinal em  $\delta$  6,30 com o sinal em  $\delta$  150,1 e dos sinais em  $\delta$  4,86 e  $\delta$  4,93 com o sinal em  $\delta$  107,9. A partir do espectro de HMBC (Figura 3.67, p.126), verifica-se que o sinal em  $\delta$  4,86 correlacionou-se com o sinal em  $\delta$  40,9; o sinal em  $\delta$  4,93 com os sinais em  $\delta$  40,9 e  $\delta$  150,1; o sinal em  $\delta$  6,30 com os sinais em  $\delta$  40,9 e  $\delta$  29,4. Observou-se a correlação de um singlete em  $\delta$  1,63 (6H) com um sinal em  $\delta$  150,1,  $\delta$  115,5,  $\delta$  40,9 e  $\delta$  29,4. O espectro de HSQC correlacionou este sinal com o sinal em  $\delta$  29,4. A partir destes dados determina-se que a molécula contém um grupo prenila modificado e atribui-se os valores dos carbonos de cada posição.



Analisando-se ainda o espectro de RMN  $^1\text{H}$ , nota-se a presença de três duplo dubletos em  $\delta$  6,19 (*dd*,  $J = 17,4$  Hz e 10,7 Hz, 1H),  $\delta$  5,07 (*dd*,  $J = 10,7$  Hz e 1,1 Hz, 1H) e  $\delta$  5,09 (*dd*,  $J = 17,4$  Hz e 1,1 Hz, 1H), e um singlete em  $\delta$  1,42 (6H). A partir do espectro de HSQC, observa-se a correlação do sinal em  $\delta$  6,19 com o sinal em  $\delta$  145,6; dos sinais em  $\delta$  5,07 e  $\delta$  5,09 com o sinal em  $\delta$  111,9; e do sinal em  $\delta$  1,42 com o sinal em  $\delta$  26,1. O espectro de HMBC mostra a correlação do sinal em  $\delta$  6,19 com os sinais em  $\delta$  40,2 e  $\delta$  26,1; e os sinais em  $\delta$  5,07 e  $\delta$  5,09 correlacionam-se com os mesmos sinais (em  $\delta$  145,6 e  $\delta$  40,2). Estes dados comprovam a presença de outro grupo prenila modificado na molécula e determina os valores de cada carbono presente na molécula.



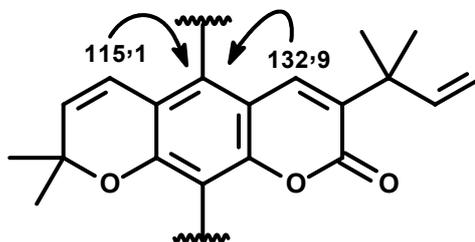
O singlete em  $\delta$  7,86 correspondente a posição 4, apresentou correlação com o sinal em  $\delta$  132,9 no espectro de HSQC. No espectro de HMBC, este mesmo sinal correlacionou-se com os sinais  $\delta$  159,8 (característico de lactona),  $\delta$  153,3,  $\delta$  146,2,  $\delta$  129,1 e  $\delta$  40,2. O sinal em  $\delta$  40,2 foi atribuído a posição 1'' do segundo grupamento prenila identificado acima, ou seja, este encontra-se na posição 3.



A partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , observa-se a presença de um grupo pirano, devido aos sinais característicos: um singlete em  $\delta$  1,47 (6H); dois dubletos em  $\delta$  6,52 (*d*,  $J = 9,9$  Hz) e  $\delta$  5,67 (*d*,  $J = 9,9$  Hz), os quais apresentam correlação com os sinais em  $\delta$  27,2,  $\delta$  115,1 e  $\delta$  129,8, respectivamente, no espectro de HSQC.

Verifica-se no espectro de HMBC a correlação do sinal em  $\delta$  6,52 com os sinais em  $\delta$  146,2,  $\delta$  154,7,  $\delta$  105,8,  $\delta$  77,8. Como o sinal em  $\delta$  132,9 (H-4) também

apresentou correlação com o sinal em  $\delta$  146,2, este corresponde a posição 5. O sinal em  $\delta$  5,67 apresentou correlação com os sinais em  $\delta$  105,8,  $\delta$  77,8 e  $\delta$  27,2.



O outro grupamento prenila encontra-se na posição 8, uma vez que o sinal em  $\delta$  1,63 apresentou correlação com o sinal em  $\delta$  115,5, conforme citado anteriormente. Com este conjunto de dados determinou-se a estrutura da molécula inteira, bem como todos os valores dos sinais de hidrogênio e carbono e comparou-os com os valores citados na literatura (Takemura, 1996).

TABELA 3.16: Dados de RMN  $H^1$  e RMN  $C^{13}$  ( $CDCl_3$  400 MHz) da cumarina C10.

	$\delta_c$	$\delta_H, J$ (Hz)	$\delta^*_c$	$\delta^*_H, J$ (Hz)
<b>2</b>	159,8	-	160,8	-
<b>3</b>	129,1	-	128,5	-
<b>4</b>	132,9	7,86 (s)	134,2	7,85 (s)
<b>4<sup>a</sup></b>	103,9	-	104,4	-
<b>5</b>	146,2	-	147,0	-
<b>6</b>	105,8	-	106,4	-
<b>7</b>	154,7	-	155,1	-
<b>8</b>	115,5	-	115,2	-
<b>8<sup>a</sup></b>	153,3	-	153,2	-
<b>9</b>	77,8	-	79,9	-
<b>9-Me</b>	27,2	1,47 (s)	27,3	1,47 (s)
<b>10</b>	129,8	5,67 (d, 9,9)	129,3	5,67 (d, 9,8)
<b>11</b>	115,1	6,52 (d, 9,9)	115,8	6,50 (d, 9,8)
<b>1'</b>	40,9	-	40,9	-
<b>1'-Me</b>	29,4	1,63 (s)	29,5	1,63 (s)

TABELA 3.16: Dados de RMN H<sup>1</sup> e RMN C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz) da cumarina C10 - Continuação.

<b>2'</b>	150,1	6,30 (dd, 17,4, 10,6)	150,1	6,29 (dd, 17,6, 10,5)
<b>3'</b>	107,9	4,93 (dd, 17,4, 1,2) 4,86 (dd, 10,6, 1,2)	107,9	4,93 (dd, 17,6, 1,2) 4,85 (dd, 10,5, 1,2)
<b>1''</b>	40,2	-	40,2	-
<b>1''-Me</b>	26,1	1,42 (s)	26,2	1,43 (s)
<b>2''</b>	145,6	6,19 (dd, 17,4, 10,7)	145,6	6,18 (dd, 17,6, 10,5)
<b>3''</b>	111,9	5,09 (dd, 17,4, 1,1) 5,07 (dd, 10,7, 1,1)	111,9	5,11 (dd, 17,6, 1,0) 5,07 (dd, 10,5, 1,0)

Assim, conclui-se que a cumarina C10 é a clausarina. Esta cumarina foi isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

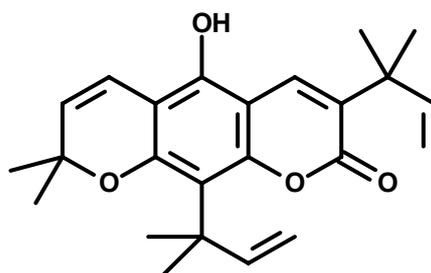
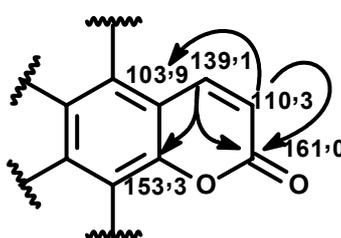


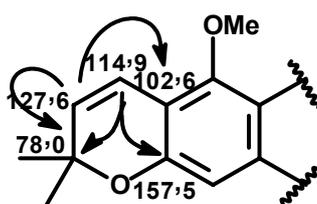
FIGURA 3.60: Estrutura da cumarina Clausarina.

Os demais sinais presentes nos espectros são referentes a uma outra cumarina, a xantoxiletina, a qual já havia sido isolada. No entanto, anteriormente, não havia sido realizado experimentos de HSQC, HMBC e RMN<sup>13</sup>C, os quais foram obtidos para esta mistura. A partir destes dados pode-se confirmar se a cumarina

era realmente a proposta e pode-se obter os valores de cada carbono presente na molécula. A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.62, p.124) mostra os sinais característicos de cumarinas, ou seja, dois dubletos em  $\delta$  7,98 ( $d$ ,  $J = 9,6$  Hz, 1H) e em  $\delta$  6,14 ( $d$ ,  $J = 9,6$  Hz, 1H) correspondentes aos hidrogênios 4 e 3, respectivamente. No espectro de HSQC (Figura 3.66, p.126) verificou-se as correlações do sinal em  $\delta$  7,98 (H-4) com o sinal em  $\delta$  139,1 e do sinal em  $\delta$  6,14 (H-3) com o sinal em  $\delta$  110,3. O espectro de HMBC (Figura 3.67, p.126) mostrou a correlação do sinal em  $\delta$  7,98 (H-4) com os sinais em  $\delta$  153,3 e  $\delta$  161,0, e do sinal em  $\delta$  6,14 (H-3) com os sinais em  $\delta$  161,0 e  $\delta$  103,9.

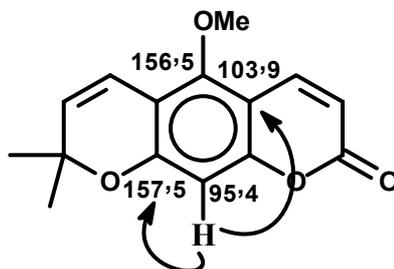


Observa-se ainda a presença dos sinais característicos do anel pirano, um dubleto em  $\delta$  6,77 ( $d$ ,  $J = 10,0$  Hz, 1H), um dubleto em  $\delta$  5,57 ( $d$ ,  $J = 10,0$  Hz, 1H) e um singleto em  $\delta$  1,46 (6H), referentes aos H-4', H-3', H5' e H-6'', respectivamente; os quais correlacionaram-se, no experimento de HSQC, com os sinais em  $\delta$  114,9,  $\delta$  127,6 e  $\delta$  28,1. A análise do espectro de HMBC mostra a correlação do sinal em  $\delta$  6,77 (H-4') com os sinais em  $\delta$  78,0; do sinal em  $\delta$  5,57 (H-3') com os sinais em  $\delta$  102,6 e  $\delta$  78,0.



Por fim, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou um singleto em  $\delta$  6,24 e um singleto intenso em  $\delta$  3,88 (3H), os quais indicam a presença de um hidrogênio e uma metoxila ( $\text{OCH}_3$ ), respectivamente. O sinal em  $\delta$  3,88 correlacionou-se com o sinal em  $\delta$  56,0, no experimento de HSQC e o sinal em  $\delta$  6,24 com o sinal em  $\delta$  95,4. No entanto, não se sabe em qual posição da molécula (5 ou 8) estes grupos encontram-se. A partir do experimento de HMBC, pode-se verificar que o sinal em  $\delta$  6,24 correlaciona-se com os sinais em  $\delta$  157,5 e  $\delta$  103,9, portanto ele só pode

corresponder ao H-8; a metoxila, por sua vez, encontra-se na posição 5 e apresentou correlação apenas com um sinal em  $\delta$  56,0 (J-1).



A partir destes dados pode-se atribuir todos os carbonos à molécula e pode-se concluir que a cumarina isolada em mistura com a clausarina é a Xantoxiletina.

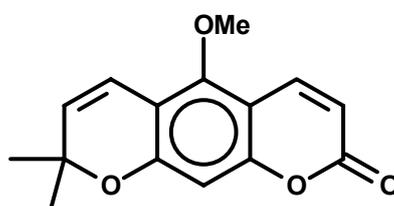


FIGURA 3.61: Estrutura da cumarina Xantoxiletina.

TABELA 3.17: Dados de RMN  $H^1$  ( $CDCl_3$  400 MHz) da cumarina C3.

Posição	$\delta H$	$J$ (Hz)	$\delta C$	$\delta^* H$	$J^*$ (Hz)
2	-	-	161,0	-	-
3	6,14 ( <i>d</i> )	9,6	110,3	6,19 ( <i>d</i> )	9,5
4	7,98 ( <i>d</i> )	9,6	139,1	7,86 ( <i>d</i> )	9,5
4a	-	-	103,9	-	-
5 (OMe)	3,88 ( <i>s</i> )	-	156,5	3,86 ( <i>s</i> )	-
6	-	-	102,6	-	-
7	-	-	157,5	-	-
8	6,24 ( <i>s</i> )	-	95,4	6,56 ( <i>s</i> )	-
8a	-	-	153,3	-	-
2'	-	-	78,0	-	-
3'	5,57 ( <i>d</i> )	10,0	127,6	5,71 ( <i>d</i> )	10,2
4'	6,77 ( <i>d</i> )	10,0	114,9	6,51 ( <i>d</i> )	10,2
5'-6'	1,46 ( <i>s</i> )	-	28,1	1,46 ( <i>s</i> )	-

$\delta^*$  e  $J^*$  são os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos da literatura (VRKOC, 1972);  $\delta^*$  são os deslocamentos químicos obtidos pela literatura (WU, 1983).

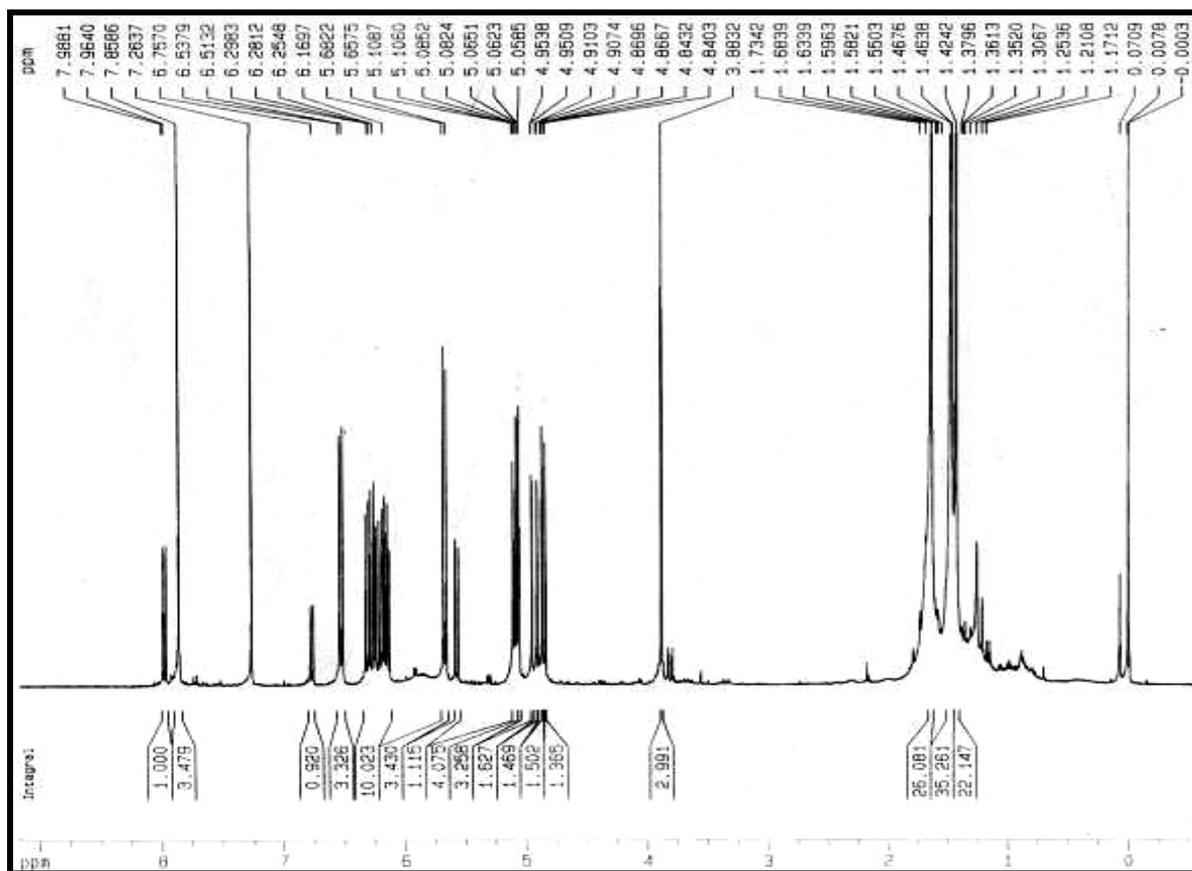


FIGURA 3.62. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.

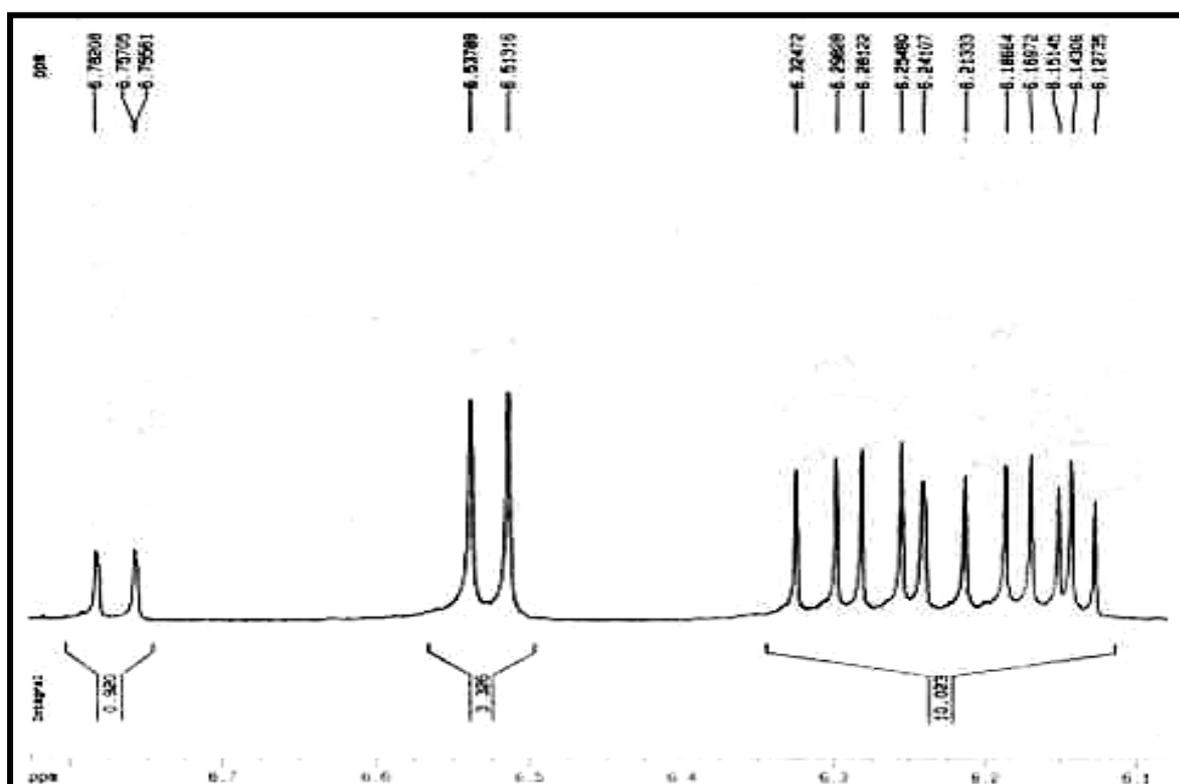


FIGURA 3.63. Ampliação A do Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.

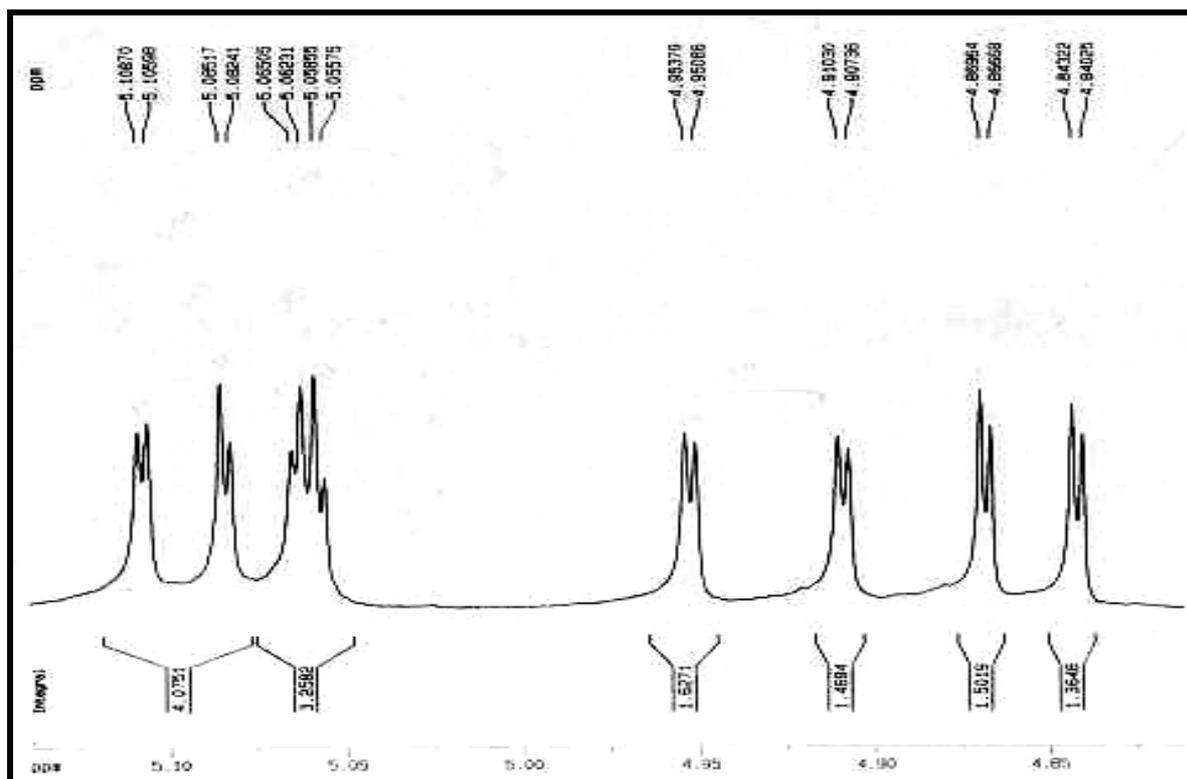


FIGURA 3.64. Ampliação B do Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.

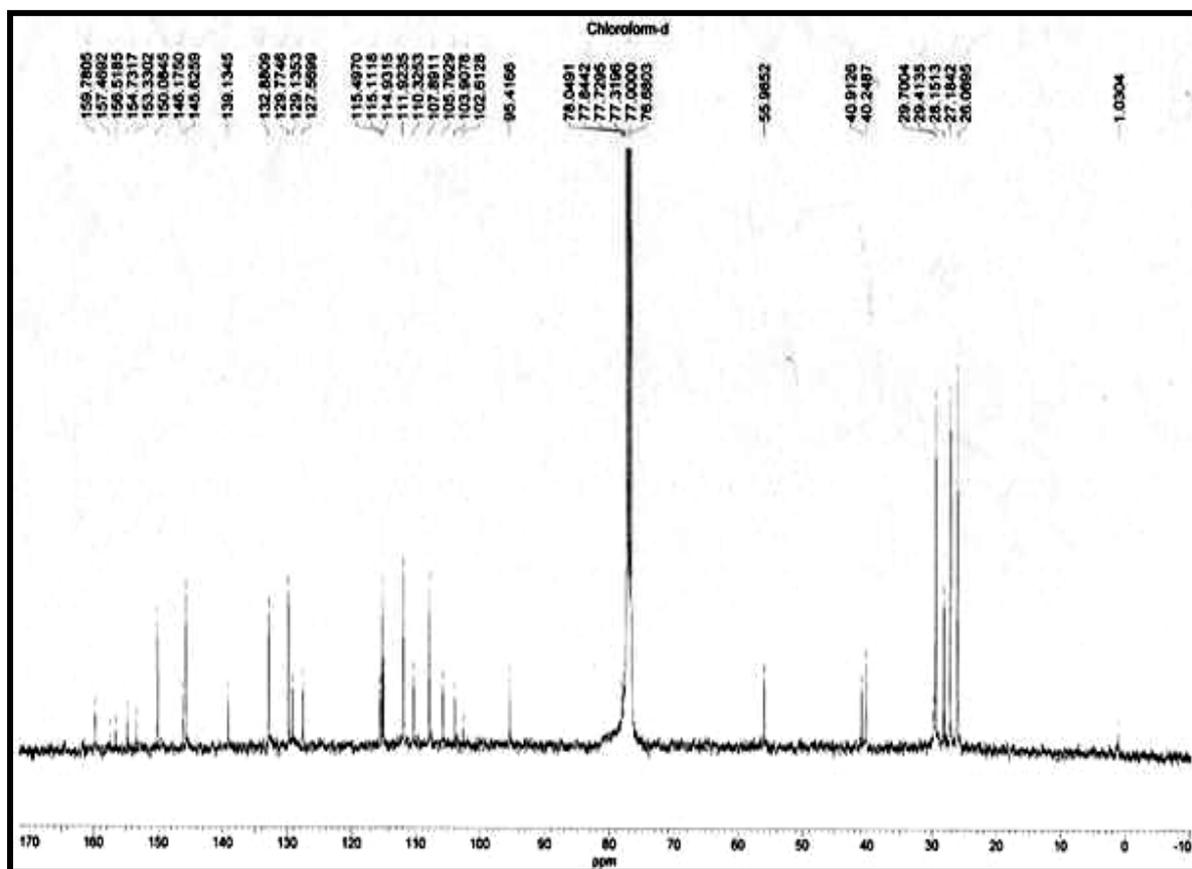


FIGURA 3.65. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.

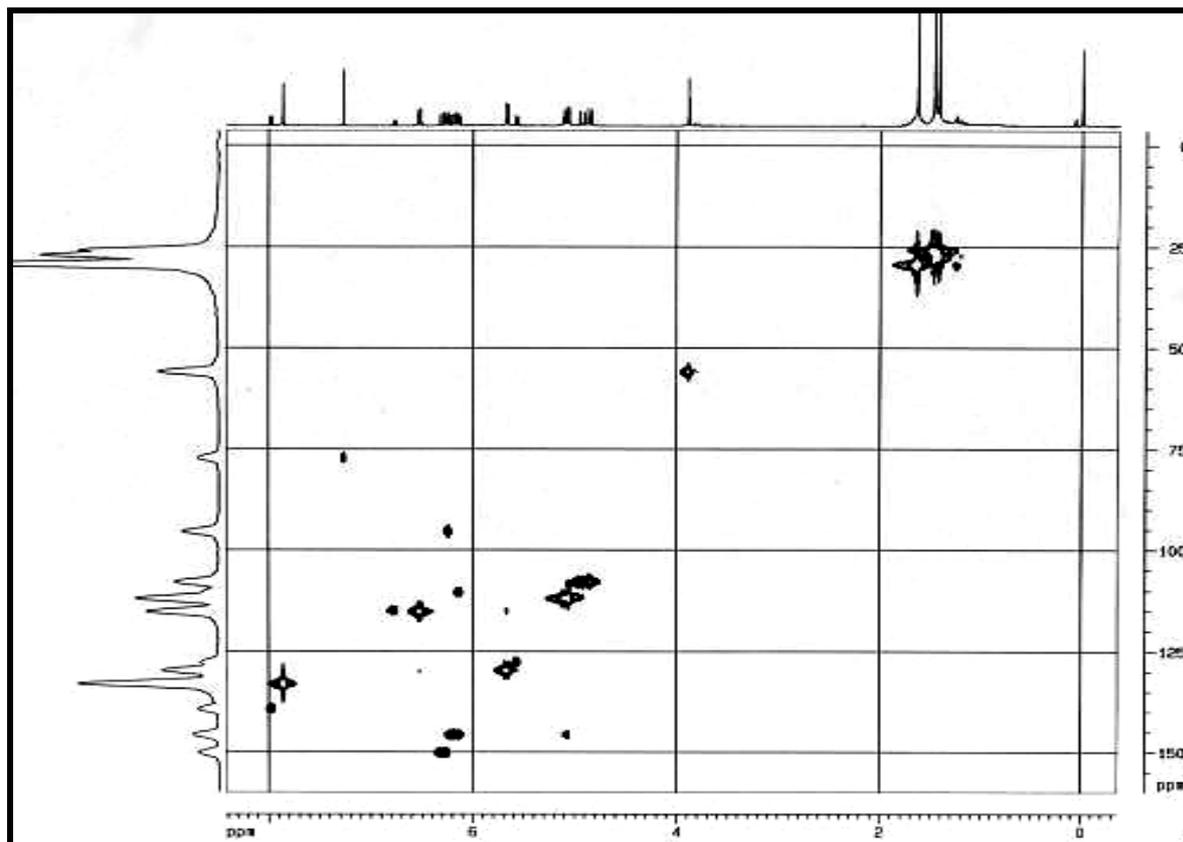


FIGURA 3.66. Espectro de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.

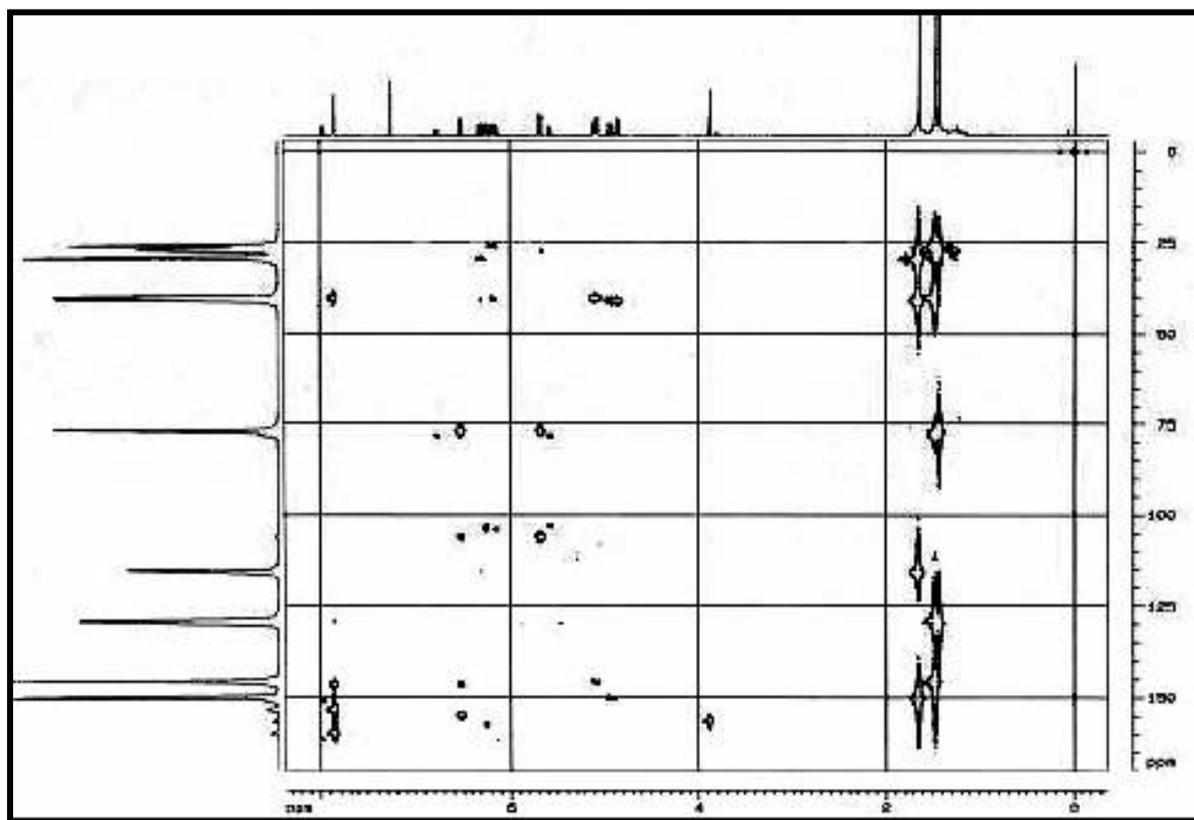


FIGURA 3.67. Espectro de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.

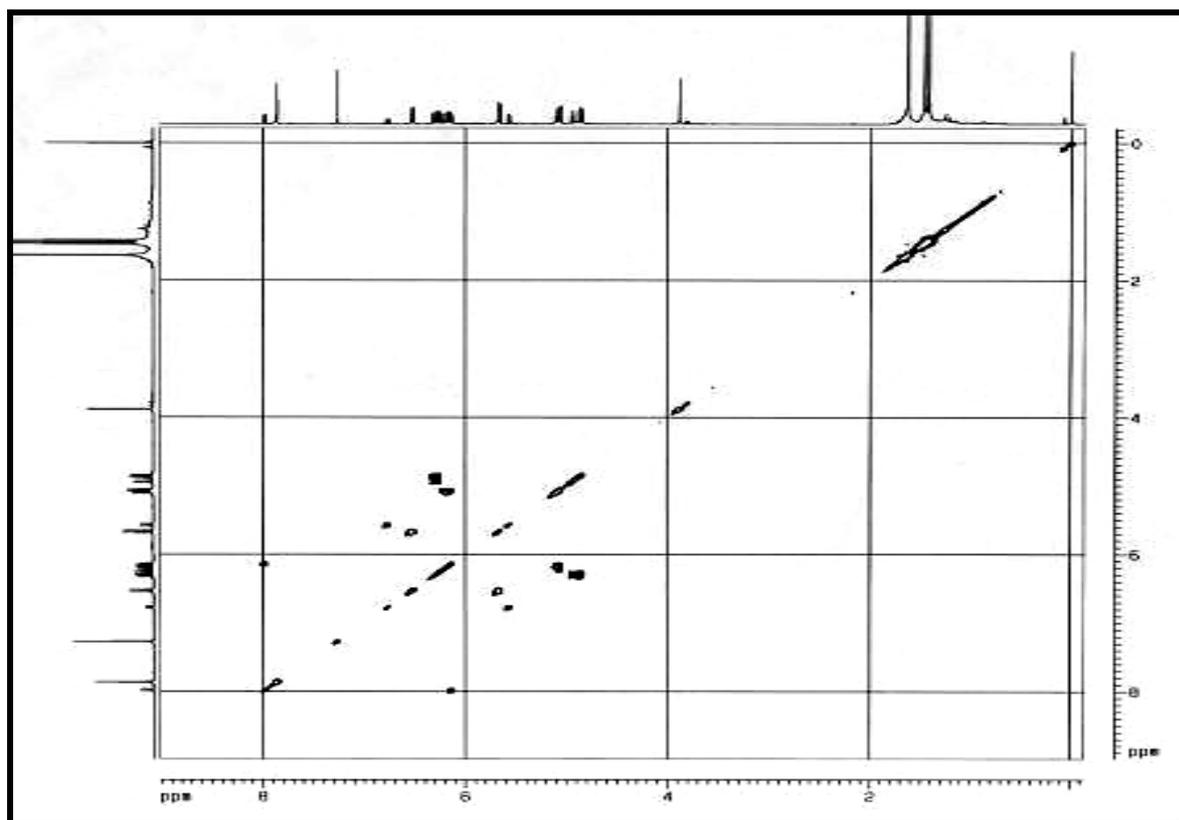


FIGURA 3.68. Espectro de COSY (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) das cumarinas C3 e C10.

### 3.2.1.10. Determinação estrutural da Cumarina C11

A cumarina C11 foi identificada em mistura com a cumarina C5 (*trans*-decursidinol) na subfração PC2.3.1.4-5, em uma quantidade de massa igual a 2,0 mg. A mistura foi observada, uma vez que alguns sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.71, p.131) eram idênticos aos da cumarina C5.

Após detectado que uma das moléculas é a *trans*-decursidinol, analisou-se os demais sinais presentes no espectro e verificou-se que a outra substância presente é uma cumarina. Isto foi observado, uma vez que o espectro apresentou os sinais característicos desta classe, como a presença dos dubletos em  $\delta$  7,91 ( $J = 9,5$  Hz, 1H) e em  $\delta$  6,19 ( $J = 9,5$  Hz, 1H), correspondente aos H-4 e H-3. Obser

vou-se ainda a presença de singletos em  $\delta$  7,62 (1H) e  $\delta$  6,71 (1H), referentes aos H-5 e H-8, o que indica que a cumarina está substituída nas posições 6 e 7.

O espectro apresentou dois dubletos em  $\delta$  5,46 ( $J = 4,2$  Hz, 1H) e em  $\delta$  4,41 ( $J = 4,2$  Hz, 1H) e dois singletos em  $\delta$  1,28 (3H) e em  $\delta$  1,29 (3H), os quais correspondem a duas metilas. Como estes dois dubletos não apresentam os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento próximos aos dos dubletos referentes ao grupo pirano hidroxilado (H-3' e H-4'), então sabe-se que a molécula não contém este grupo e com isto não corresponde a cumarina C5.

Sugere-se que o grupo substituinte seja a prenila formando um anel de 5 membros. Com isto, os dubletos em  $\delta$  5,46 e em  $\delta$  4,41 correspondem ao H-3' e H-2', respectivamente; e a estrutura proposta está representada a seguir.

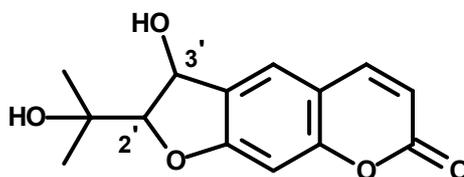


FIGURA 3.69: Estrutura proposta para a cumarina C11.

TABELA 3.18: Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C11 em comparação com os dados da literatura.

H	$\delta$	$J$ (Hz)	$\delta^*$	$J^*$ (Hz)
3	6,19	(d, $J = 9,5$ )	6,18	(d, $J = 9,1$ )
4	7,91	(d, $J = 9,5$ )	7,91	(d, $J = 9,1$ )
5	7,62	(s)	7,62	(s)
6	-	-	-	-
8	6,71	(s)	6,71	(s)
2'	4,41	(d, $J = 4,2$ )	4,41	(d, $J = 4,3$ )
3'	5,46	(d, $J = 4,2$ )	5,46	(d, $J = 4,3$ )
5'	1,28	(s)	1,28	(s)
6'	1,29	(s)	1,29	(s)

Foram realizados experimentos de RMN 2D (HSQC, HMBC e COSY) para verificar se a molécula realmente corresponde a cumarina proposta.

O experimento de HSQC (Figura 3.74, p.133) mostrou a correlação dos hidrogênios e os carbonos ligados diretamente, e a partir disto, obteve-se os deslocamentos químicos de alguns carbonos da molécula: C-4 em  $\delta$  143,7; C-5 em  $\delta$  127,9; C-8 em  $\delta$  96,9; C-3 em  $\delta$  111,3; C-3' em  $\delta$  70,7; C-2' em  $\delta$  98,3; C-5' em  $\delta$  24,4 e C-6' em  $\delta$  25,7. A partir do experimento de COSY (Figura 3.76, p.134) verificou-se que o H-4 correlaciona-se com o H-3 e que o H-2' correlaciona-se com o H-3'.

Com o espectro de HMBC (Figura 3.75, p.133) atribuiu-se mais alguns deslocamentos químicos de carbonos da molécula. Observou-se que o H-4 e o H-5 apresentam correlação com um sinal em  $\delta$  157,0, o qual corresponde, portanto, ao carbono 9. O H-4 correlacionou-se com um sinal em  $\delta$  159,7, referente ao carbono lactônico da posição 2. O H-5 correlaciona-se com um sinal em  $\delta$  164,0, o qual corresponde ao carbono fenólico 7. O H-3 correlaciona-se um sinal em  $\delta$  112,2, referente ao carbono da posição 10. O espectro apresentou ainda a correlação das metilas (5'' e 6'') com os sinais em 74,6 e em  $\delta$  98,3, os quais correspondem aos carbonos 4' e 2', respectivamente. O único carbono que não apresentou correlação nenhuma nos experimentos foi o C6, no entanto, a partir da literatura (ZOU *et al.*,

2004) e do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 3.73, p.132), verificou-se que o sinal correspondente a este carbono encontra-se em  $\delta$  124,6. Todos os carbonos atribuídos para molécula, e a comparação com os dados da literatura (ZOU *et al.*, 2004) encontram-se na Tabela 3.19.

TABELA 3.19: Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) da cumarina C11 em comparação com os dados da literatura.

C	$\delta$	$\delta^*$
2	161,0	160,1
3	111,3	111,9
4	143,7	144,2
5	127,9	128,4
6	124,6	125,1
7	164,0	163,7
8	96,9	97,4
9	157,0	156,7
10	112,2	112,9
2'	98,3	98,9
3'	70,7	70,2
4'	74,6	71,3
5'	24,4	25,0
6'	25,7	25,0

Verificou-se na literatura (ZOU *et al.*, 2004) que esta molécula com configuração relativa *cis* e *trans* apresenta  $J = 6,7$  Hz e  $J = 4,3$  Hz, respectivamente. Como a substância isolada apresentou  $J = 4,2$  Hz, ela deve possuir configuração relativa *trans*. A partir de todos os dados, verificou-se que molécula identificada em mistura com a cumarina C5 apresenta sinais próximos a (2'S,3'S)-3'-hidróxi-2'-(1-hidróxi-1-metiléter)-2',3'-dihidrofurano[3,2-g]cromen-7-ona, conhecida como Xantoarnol (Figura 3.70, p.131), no entanto, não foi realizado nenhum experimento que confirme a estereoquímica absoluta da molécula. Esta cumarina não havia sido isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

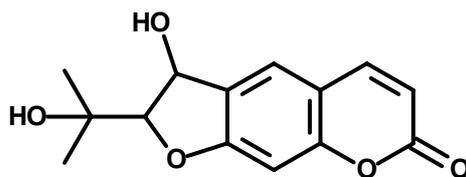
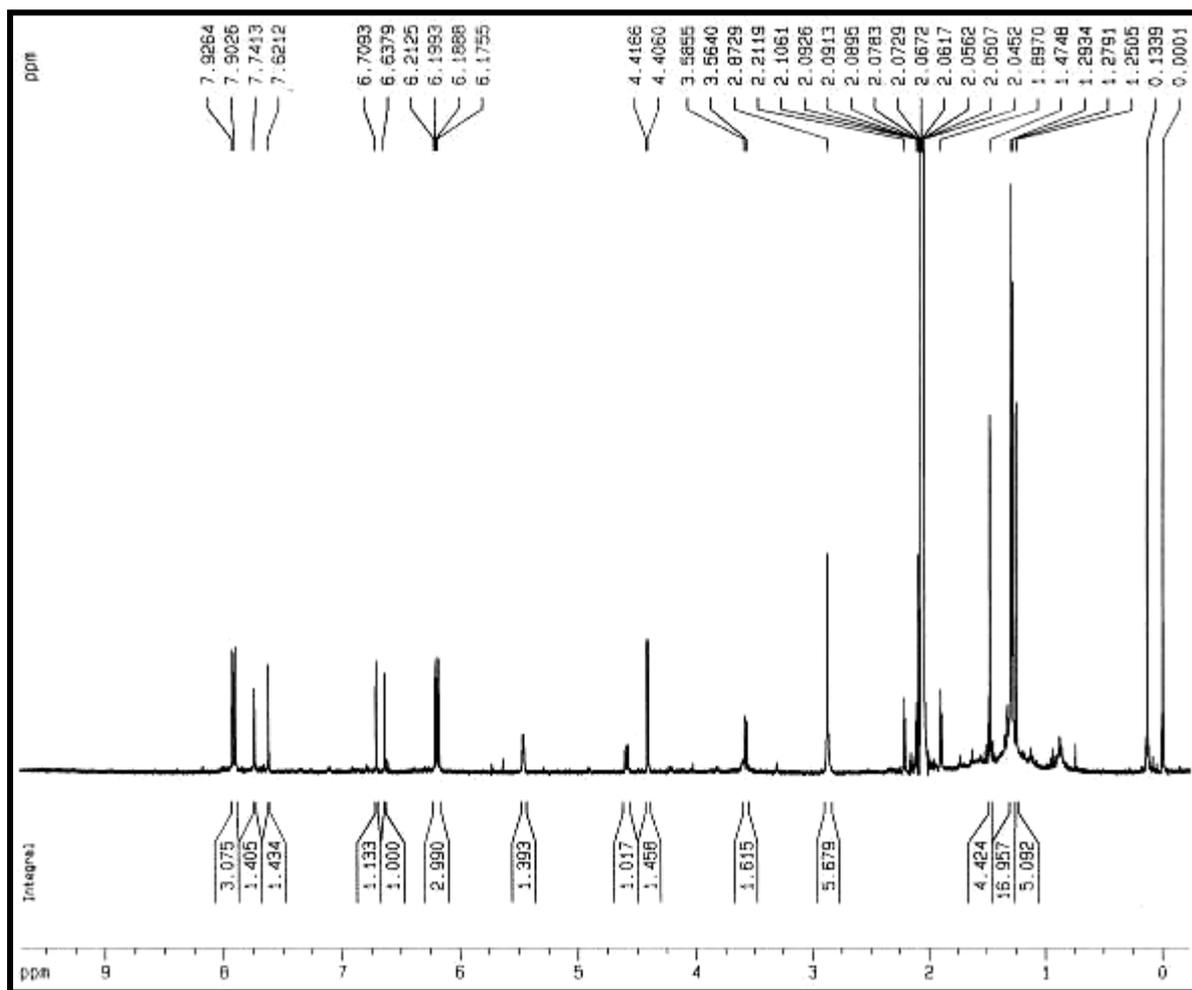


FIGURA 3.70: Estrutura da Cumarina C11 identificada.

FIGURA 3.71: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.

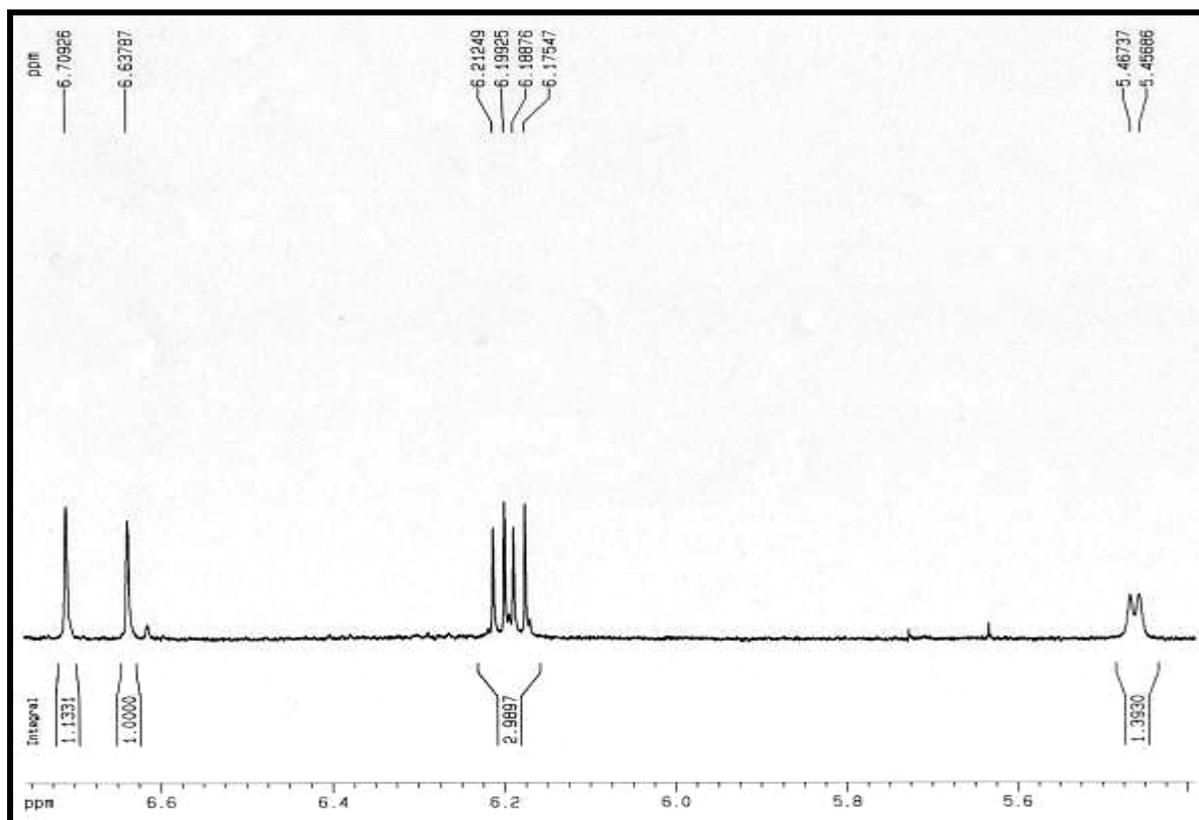


FIGURA 3.72: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.

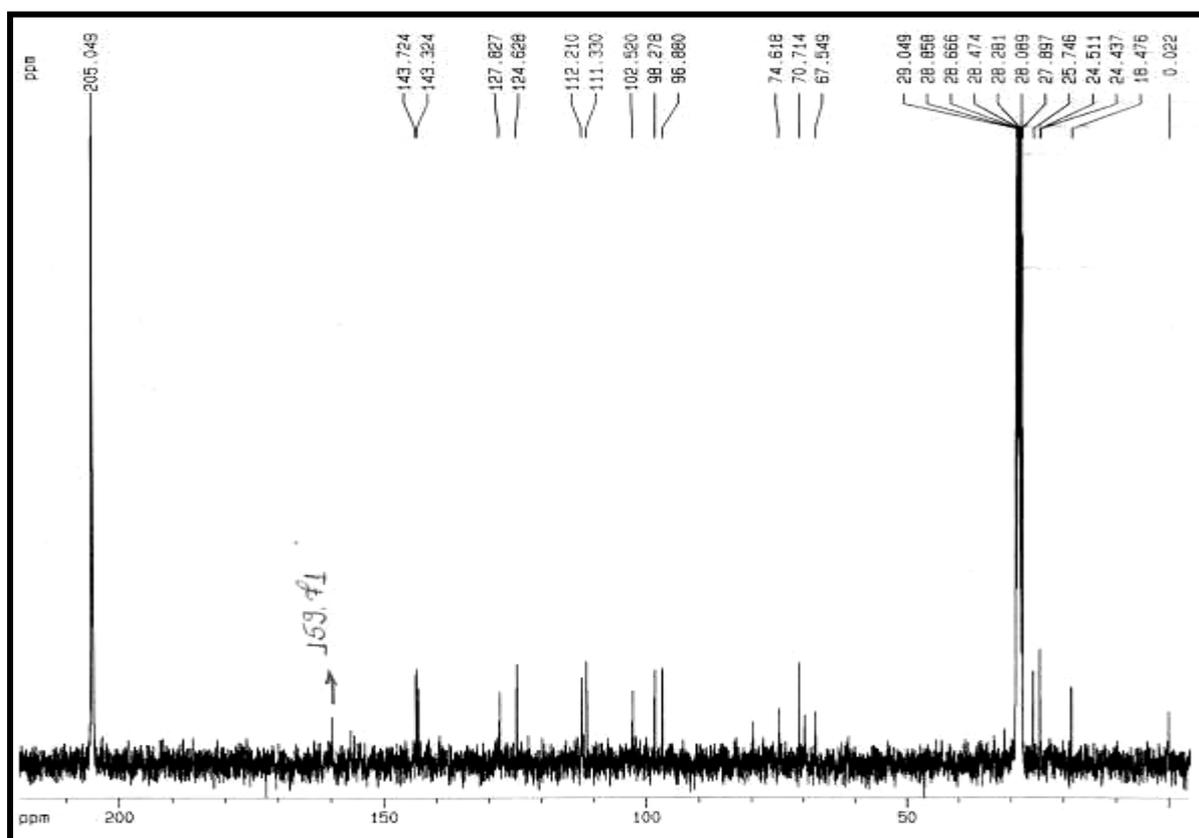


FIGURA 3.73: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.

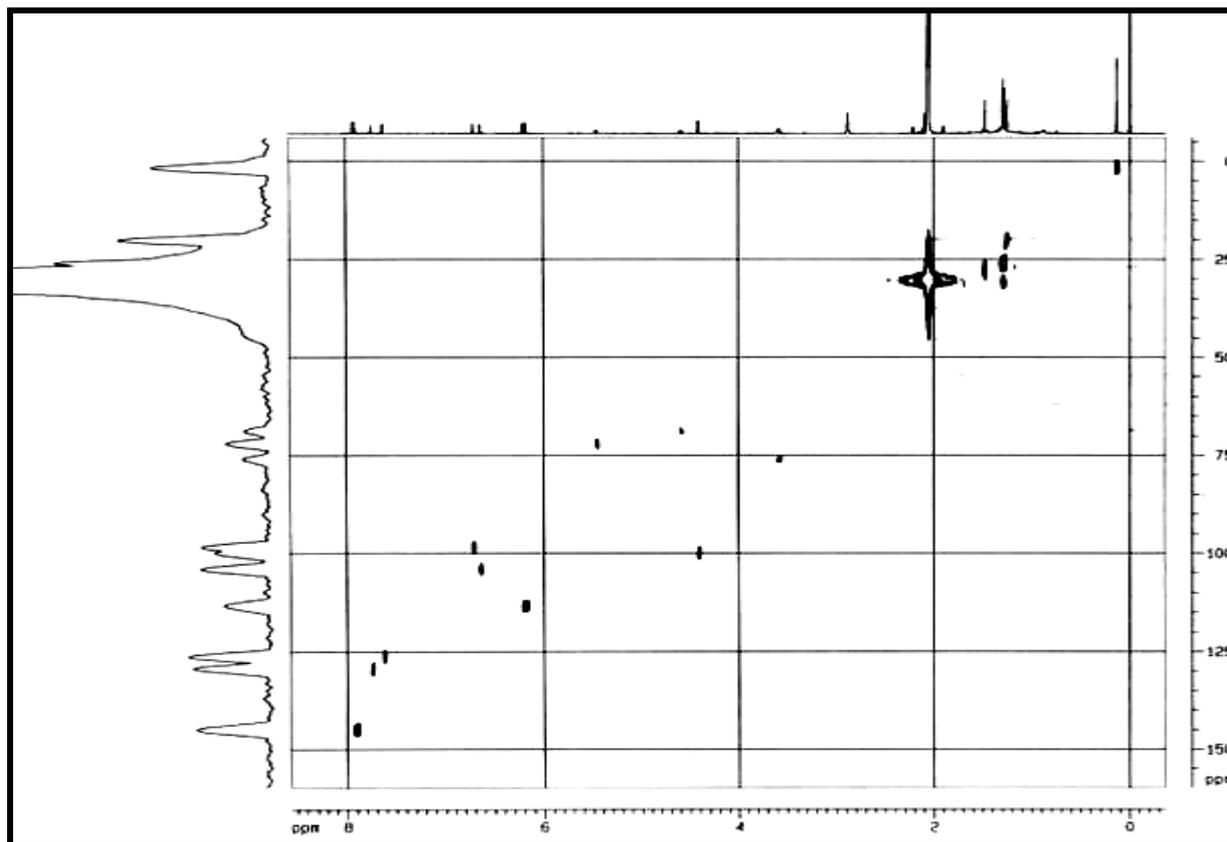


FIGURA 3.74: Espectro de HSQC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.

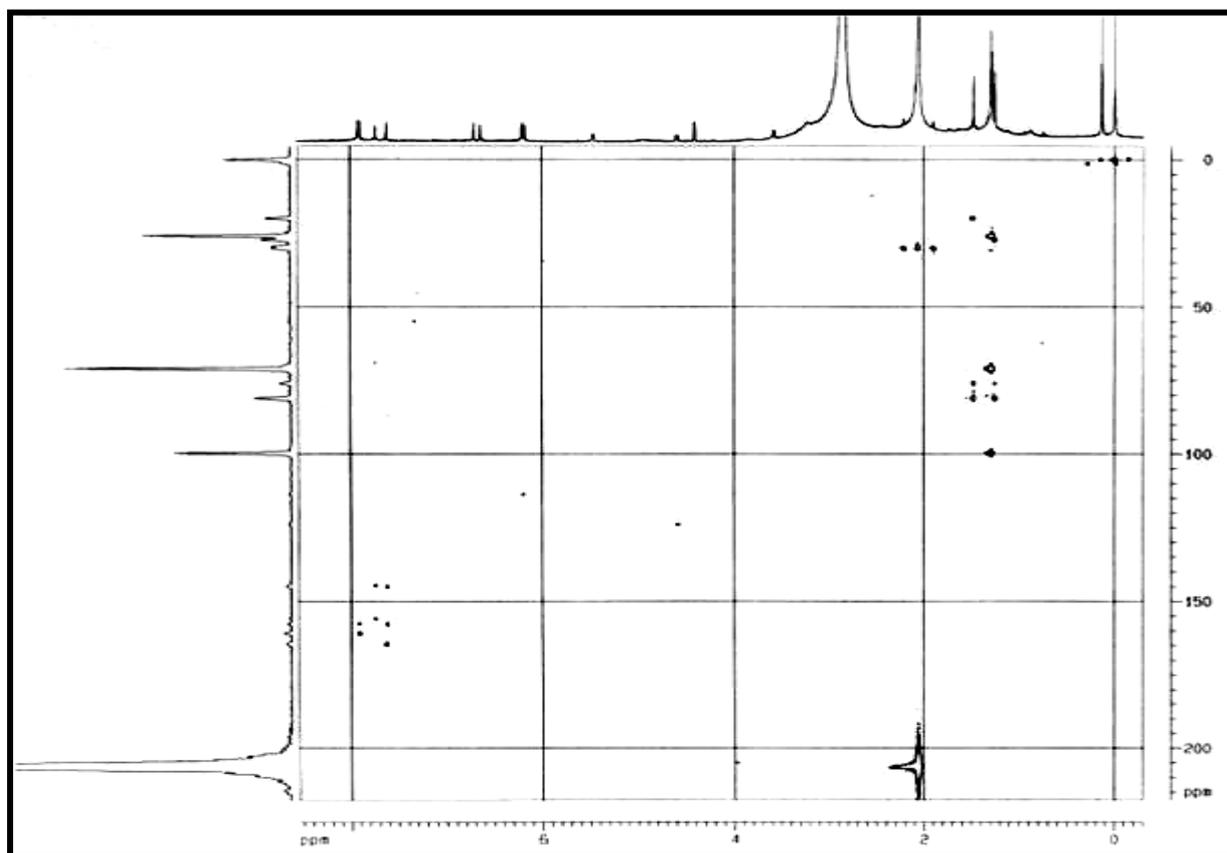


FIGURA 3.75: Espectro de HMBC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.

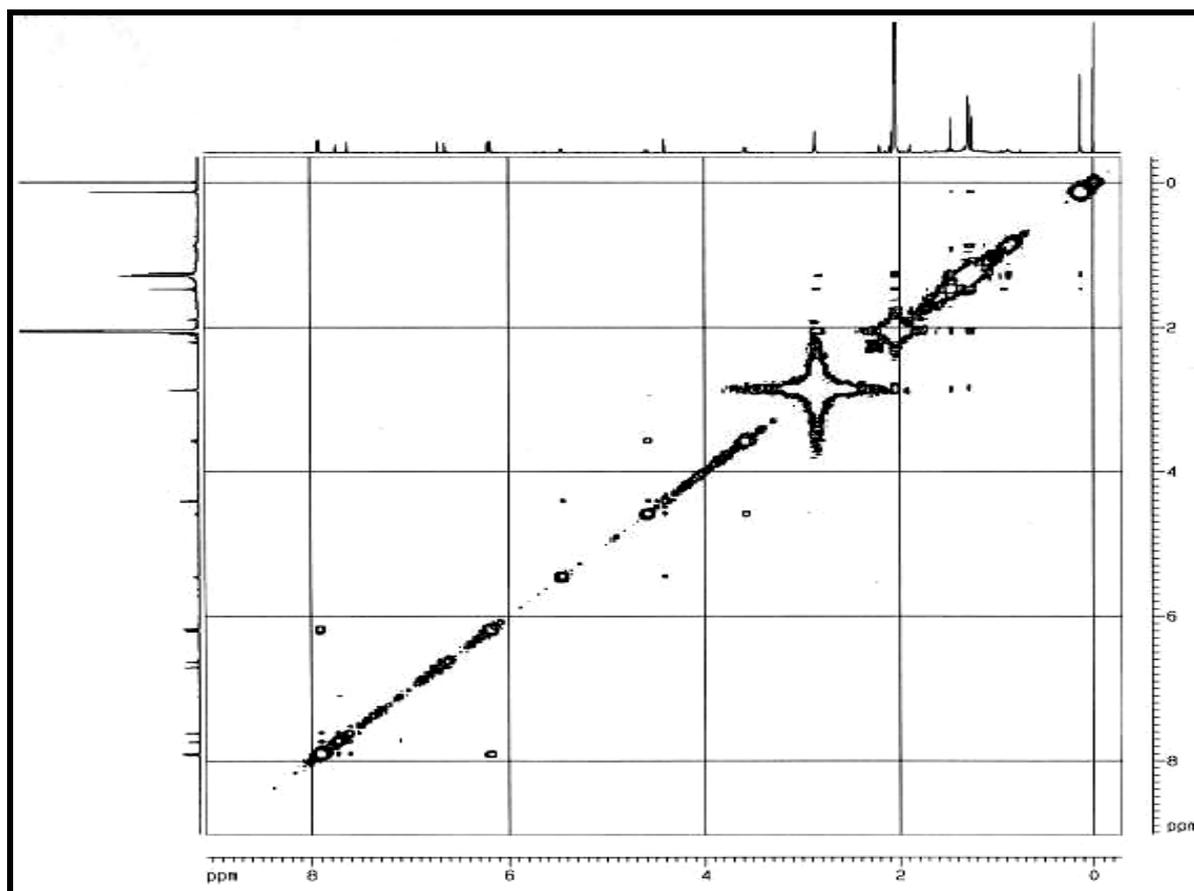


FIGURA 3.76: Espectro de COSY (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 400 MHz) das cumarinas C5 e C11.

### 3.2.1.11. Determinação estrutural do flavonóide F1

Obteve-se 0,9 mg de um composto na fração PC2.1.4-13, o qual, a partir de dados de RMN  $^1\text{H}$ , mostrou-se um flavonóide devido à presença de alguns sinais característicos. No entanto, para determinar sua estrutura completa foi necessário a realização de experimentos RMN 2D (HMBC e HSQC).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.79, p.139) apresentou um singleto em  $\delta$  13,12, o qual corresponde a uma hidroxila quelada, sinal este característico de flavonóides. Também se verificou a presença de dois dubletos em  $\delta$  7,99 ( $J = 8,4$  Hz, 2H) e  $\delta$  7,05 ( $J = 8,4$  Hz, 2H), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-3', H-5' respectivamente. Observou-se sinais característicos do anel pirano, ou seja, dois dubletos em  $\delta$  6,92 ( $J = 10,0$ Hz, 1H) e  $\delta$  5,78 ( $J = 10,0$ Hz, 1H), os quais correspondem aos prótons vinílicos H-4'' e H-3'' respectivamente, um singleto em  $\delta$  1,47 (6H), correspondente a duas metilas na posição 2''. Ainda faltava correlacionar os sinais em  $\delta$  6,70 e 6,18 com os hidrogênios H-3 e H-8, bem como determinar se o anel pirano fecha na posição 6 ou 8. Para tanto foi necessário os experimentos de RMN 2D HMBC e HSQC.

TABELA 3.20: Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtidos experimentalmente e pela literatura do flavonóide (F1).

Posição	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}^*$	$J^*$ (Hz)
5-OH	-	13,12 (s)	-	-
4''	( $J = 10,0$ )	6,92 (d)	6,96 (d)	( $J = 10,0$ )
3''	( $J = 10,0$ )	5,78 (d)	5,79 (d)	( $J = 10,0$ )
2 Me	-	1,47 (s)	1,51 (s)	-
2', 6'	( $J = 8,4$ )	7,99 (d)	8,01 (d)	( $J = 8,0$ )
3', 5'	( $J = 8,4$ )	7,05 (d)	7,10 (d)	( $J = 8,0$ )
3	-	6,70 (d)	6,70 (s)	-
6 ou 8	-	6,18 (s)	6,24 (s)	-

$\delta^*$  e  $J^*$  são os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos da literatura (CHANG *et al.*, 1990).

A partir do experimento de HSQC (Figura 3.80, p.140), o qual oferece a correlação do hidrogênio e o carbono diretamente ligados, pode-se verificar que os hidrogênios 2' e 6' correspondem ao  $\delta$  123,9, enquanto que os hidrogênios 3' e 5' ao  $\delta$  111,5. Os carbonos 3' e 5' encontram-se com um deslocamento químico menor, pois estão mais blindados, uma vez que há uma conjugação do par de elétrons do oxigênio da hidroxila com a dupla ligação do anel aromático e com isto as posições "orto" a hidroxila (3' e 5') possuem uma maior densidade eletrônica do que as posições meta (2' e 6').

O hidrogênio 4" está correlacionado ao carbono em  $\delta$  109,9, e o hidrogênio 3" ao carbono em  $\delta$  123,2. As duas metilas estão correlacionadas com o carbono em  $\delta$  22,7. O hidrogênio em  $\delta$  6,70 correlaciona-se ao  $\delta$  98,6 e o hidrogênio em  $\delta$  6,18 ao  $\delta$  94,8. A tabela abaixo mostra as correlações obtidas no espectro de 2D (HSQC).

TABELA 3.21: Correlações obtidas do HSQC para o flavonóide F1.

Posição	$\delta$ H	$\delta$ C	$\delta$ C*
2', 6'	8,01	128,4	127,7
3', 5'	7,06	117,0	116,0
4"	6,93	114,4	114,4
3"	5,79	128,4	127,2
Me	1,48	28,0	27,8
$\delta$ 6,70	6,70	102,0	103,0
$\delta$ 6,18	6,18	100,1	99,5

$\delta$ H e  $\delta$ C: deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos diretamente correlacionados (Chang *et al.*, 1990).

Fez-se necessário o experimento de 2D HMBC (Figura 3.81, p.140), o qual correlaciona hidrogênios e carbonos ligados a estes com até 3 ligações. A partir do espectro obtido deste experimento, observou-se a correlação dos hidrogênios 2' e 6' com os carbonos em  $\delta$  161,9,  $\delta$  164,8 e  $\delta$  128,4, sendo esta última correlação a mesma apresentada no HSQC, ou seja, correspondente ao carbono diretamente ligado a estes hidrogênios.

Os hidrogênios 3' e 5' correlacionaram-se aos carbonos em  $\delta$  122,9 e  $\delta$  117,0, o qual corresponde àqueles ligados diretamente a estes hidrogênios (C3' e 5'). O sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,70 apresentou correlação com os sinais em  $\delta$  105,6 e  $\delta$  164,8. O sinal em  $\delta$  164,8 também se correlacionou com os hidrogênios 2' e 6', com isto pôde-se afirmar que o hidrogênio em  $\delta$  6,70 corresponde ao H-3 e  $\delta$  164,8 ao C-2

No entanto, o sinal em  $\delta$  6,20 ainda resta ser atribuído ao H-6 ou 8. Este hidrogênio apresentou correlação com os carbonos em  $\delta$  105,6 e  $\delta$  102,0 (sinal apresentado também no HSQC). A hidroxila quelada também apresentou correlação com o sinal em  $\delta$  102,0, com isto conseguiu-se determinar a molécula total, ou seja, o sinal em  $\delta$  6,20 corresponde ao H-6 e  $\delta$  102,0 ao C-6

Outros dados ainda foram observados neste espectro e, portanto, atribuiu-se os deslocamentos químicos de todos carbonos da molécula. A hidroxila quelada apresentou ainda correlação com os carbonos em  $\delta$  100,1,  $\delta$  105,6 e  $\delta$  161,9. Os hidrogênios 4" e 3" correlacionaram-se com o carbono em  $\delta$  78,7.

TABELA 3.22: Correlações obtidas do HMQC para o flavonóide F1.

Posição	C	C correlacionados em até 3 ligações
2', 6'	128,4	128,4; 161,9; 164,8
3', 5'	117,0	117,0; 122,9
4"	114,4	78,6
3"	128,4	78,6
Me	28,0	28,0; 78,6; 128,4
3	102,0	105,6; 164,8
6	100,1	102,0; 105,6
OH quelada	151,4	100,1; 102,0; 105,6; 161,9

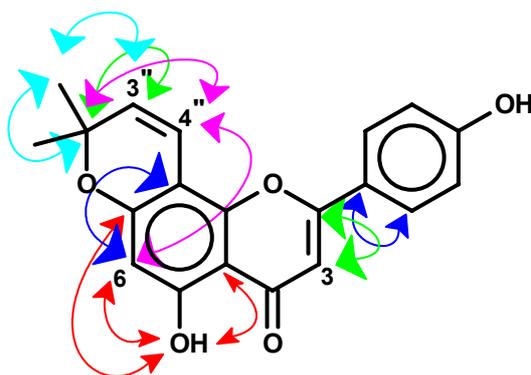


FIGURA 3.77: Correlações observadas pelo HMBC para o flavonóide F1.

TABELA 3.23: Dados obtidos para os carbonos da molécula a partir das correlações obtidas por HMBC e HSQC e comparadas com a literatura.

Posição	C	C*
4	-	189,1
2	164,8	163,8
9 e 7	159,4	161,1
4'	161,9	158,9
5	161,0	151,4
2' e 6'	128,4	127,7
3''	128,4	127,2
1'	122,9	121,4
3' e 5'	117,0	116,0
4''	114,4	114,4
8	102,0	104,7
3	102,0	103,0
10	105,6	101,0
6	100,1	99,5
2''	78,6	77,6
Me	28,0	27,8

\* Literatura: CHANG *et al.*, 1990.

A figura abaixo mostra o flavonóide identificado com os respectivos sinais de cada carbono obtidos por HSQC e HMBC e pela literatura (CHANG *et al.*, 1990), respectivamente.

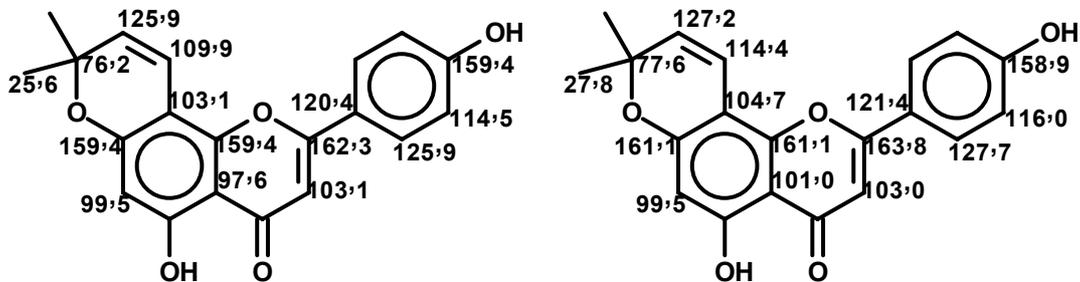


FIGURA 3.78: Estrutura da flavona isolada (F1) e seus respectivos valores de RMN  $^{13}\text{C}$  comparados com a literatura.

Esta flavonóide não foi isolada anteriormente das raízes do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

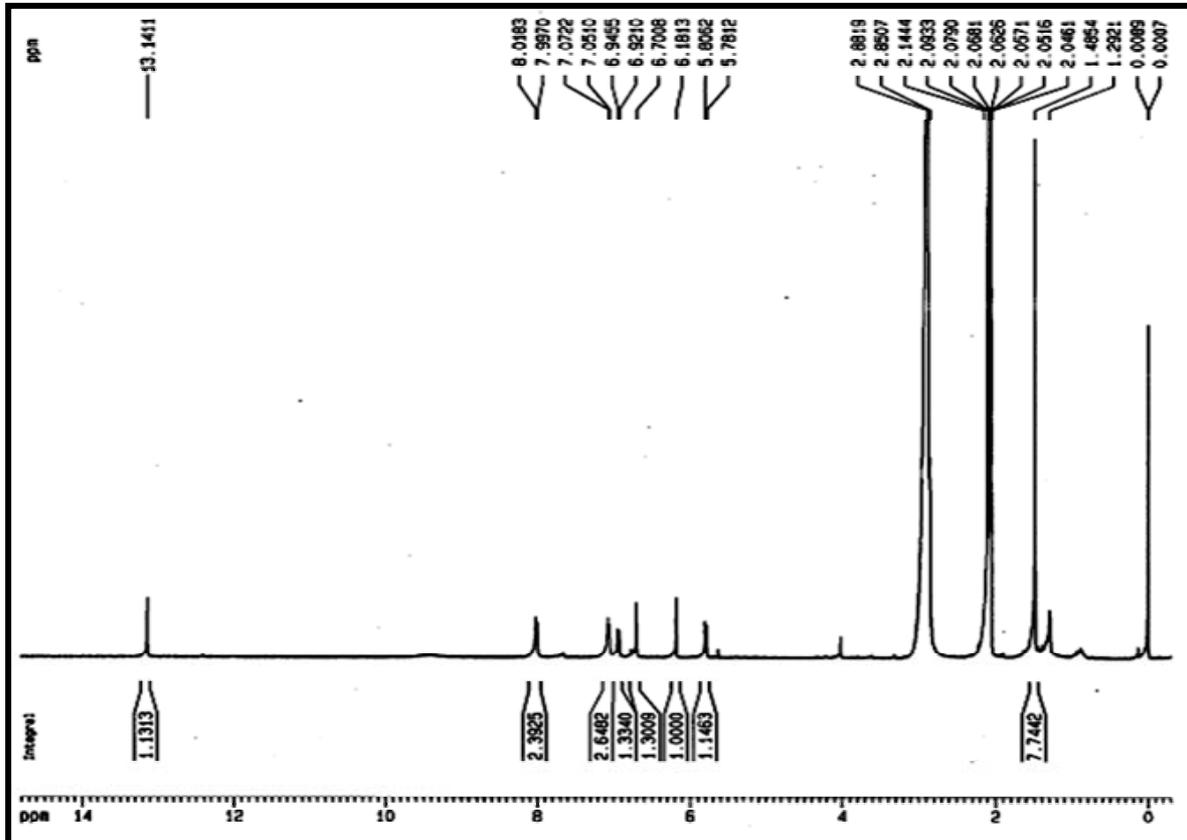


FIGURA 3.79: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 400 MHz) do flavonóide F1.

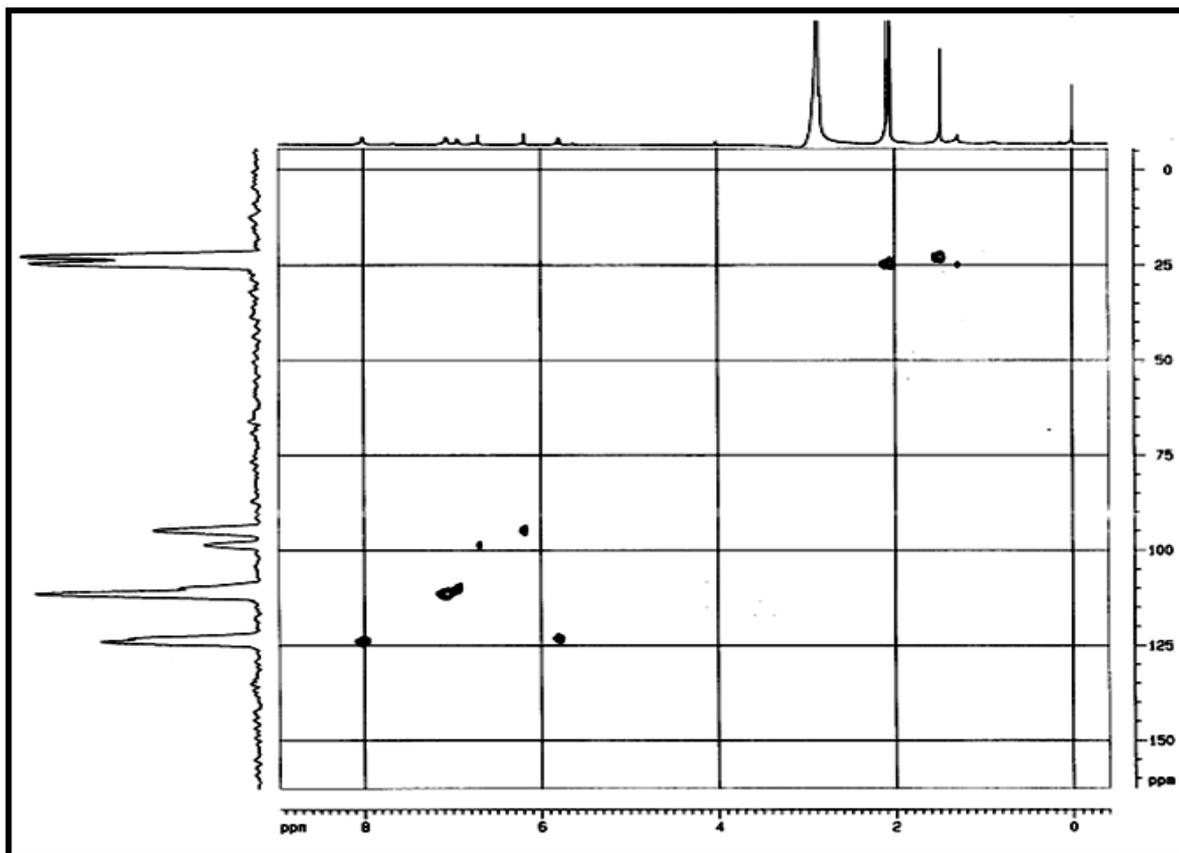


FIGURA 3.80: Espectro de HSQC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) do flavonóide F1.

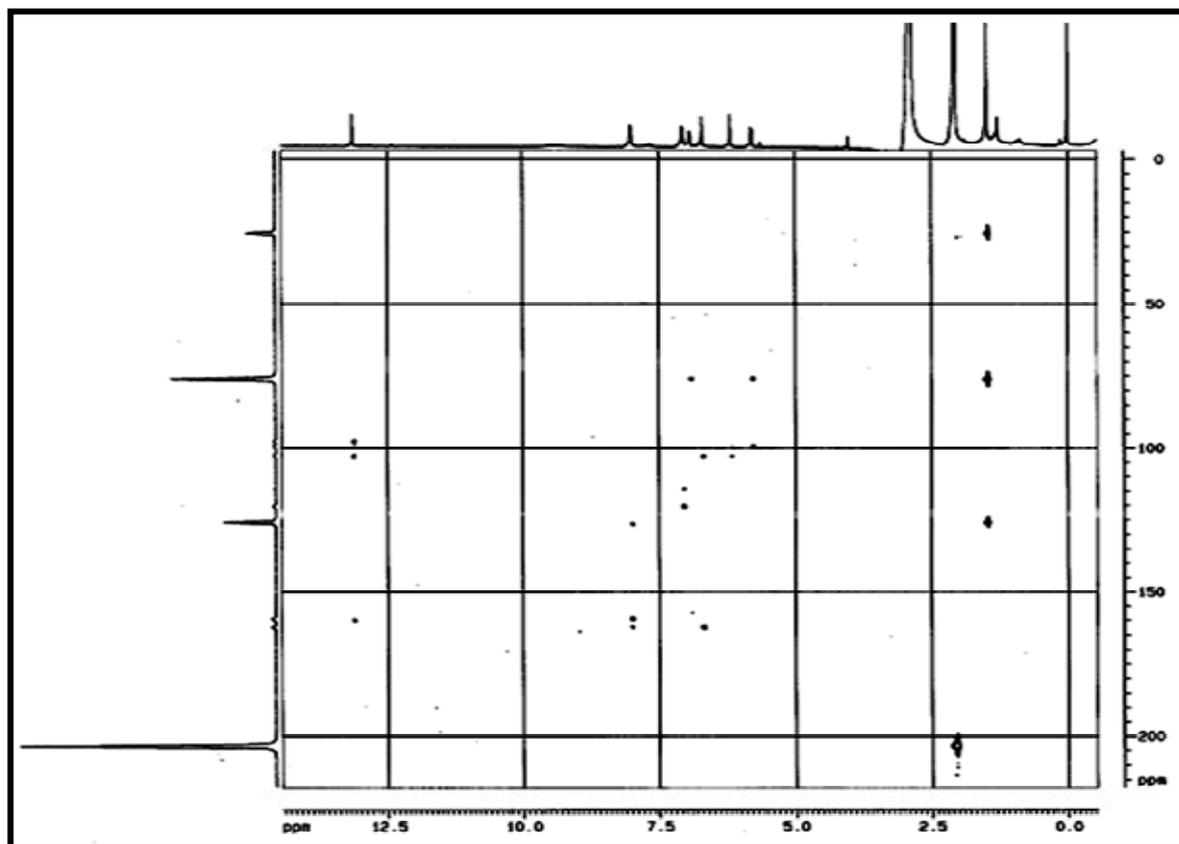


FIGURA 3.81: Espectro de HMBC ( $C_3D_6O$ , 400 MHz) do flavonóide F1.

### 3.2.1.12. Determinação estrutural do flavonóide F2

Obteve-se 10,1 mg do flavonóide F2 nas subfrações PC2.1.3-10, PC2.1.1.1-4 e PC2.1.3.7-3. Para sua determinação estrutural analisou-se os espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , NOESY e HMBC, pois apenas o espectro de  $^1\text{H}$  não foi suficiente para a determinação do composto.

Verificou-se, primeiramente, os sinais característicos do anel pirano, ou seja, dois dubletos em  $\delta$  6,63 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) e 5,50 ( $J = 10,0$  Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H- 3'' e H- 4'' e um singleto em  $\delta$  1,45 (6H), referentes às duas metilas equivalentes nas posições 5'' e 6''.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.86, p.147) revelou, também, a presença de uma hidroxila quelada em  $\delta$  12,25, indicando esta estar na posição 5, três duplo-dubletos, um em  $\delta$  5,34 ( $J = 3,0$ Hz e 12,7Hz), referente ao H-2, outro em  $\delta$  2,80 ( $J = 3,0$  e 17,0 Hz), referente ao H-3a e outro em  $\delta$  3,04 ( $J = 12,7$  e 17,0 Hz), referente ao H-3b.

A presença de dois dubletos em  $\delta$  7,32 ( $J = 8,5$  Hz, 2H) e 6,88 ( $J = 8,5$  Hz, 2H), respectivamente, foram atribuídos aos H-2',6' e H-3',5', respectivamente. Os hidrogênios equivalentes H-3' e H-5' encontram-se mais blindados, devido a maior proximidade à hidroxila.

Observou-se, ainda, a presença de uma prenila devido a alguns sinais característicos, como um dubleto em  $\delta$  3,21 ( $J = 7,4$  Hz, 2H), referentes a dois hidrogênios na posição 1''', um tripleto em  $\delta$  5,15 ( $J = 7,4$  Hz, 1H), referente ao hidrogênio na posição 2''' e um singleto em  $\delta$  1,65 (6H), ou seja, referentes às duas metilas equivalentes nas posições 4''' e 5'''.

TABELA 3.24: Dados de RMN H<sup>1</sup> (400 MHz) do flavanóide F2 comparados com os dados da literatura.

H	$\delta$	J (Hz)	$\delta^*$	J* (Hz)
5-OH	12,25 (s)	-	12,20 (s)	-
2'e 6'	7,32 (d)	8,5	7,28 (d)	8,5
3'e 5'	6,88 (d)	8,5	6,84 (d)	8,5
4''	6,63 (d)	10,0	6,63 (d)	10,0
3''	5,50 (d)	10,0	5,48 (d)	10,0
2	5,34 (dd)	3,0 e 12,7	5,30 (dd)	3,3 e 12,7
3a	3,04 (dd)	12,7 e 17,0	3,03 (dd)	12,7 e 17,3
3b	2,80 (dd)	3,0 e 17,0	2,78 (dd)	3,3 e 17,3
2'''	5,15 (t)	7,4	5,14 (t)	7,0
1'''	3,21 (d)	7,4	3,20 (d)	7,0
4''' e 5'''	1,65 (s)	-	1,64 (s)	-
5''e 6''	1,45 (s)	-	1,44 (s)	-

$\delta^*$  e J\* são os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento obtidos da literatura (SMALBERGER *et al.*, 1974).

A posição do anel pirano e da prenila foram determinados na molécula a partir dos experimentos realizados de RMN 2D 400 MHz.

A partir do espectro de NOESY (Figura 3.88, p.148), pode-se determinar a estrutura da flavanona, devido a correlação entre a hidroxila quelada (em  $\delta$  12,25) e os hidrogênios equivalentes H 4''' e H 5''' (em  $\delta$  1,65) e a correlação entre os hidrogênios equivalentes H 2' e H 6' (em  $\delta$  7,32) e o hidrogênio H-4'' (em  $\delta$  6,63). Para que sejam observadas estas correlações, a prenila somente pode estar na posição 6, e o anel pirano na posição 7-8 (Figura 3.82, p.143). Outras correlações foram atribuídas para a confirmação da estrutura do flavonóide F2 e estão demonstradas na Tabela 3.25, p.143.

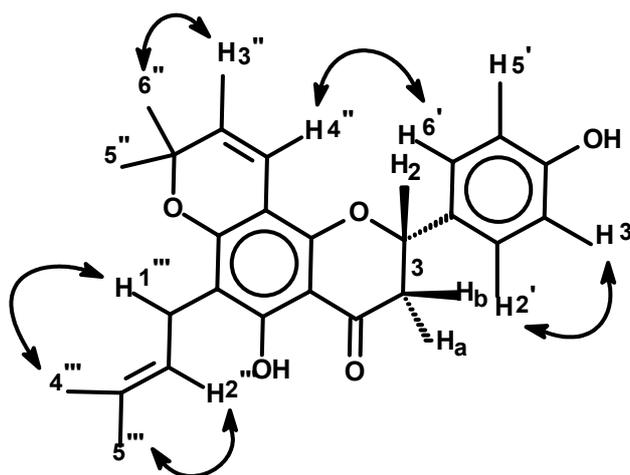


FIGURA 3.82: Correlações obtidas pelo NOESY do flavonóide F2.

TABELA 3.25: Correlações obtidas pelo espectro de NOESY do flavanóide F2.

Hidrogênios	Correlação
5 – 4''',5'''	12,25 – 1,65
2',6' – 4''	7,32 - 6,63
3',5' – 2',6'	6,88 – 7,32
4'' – 3''	6,63 – 5,50
3'' – 5'',6''	5,50 – 1,40
2 – 3 <sup>a</sup>	5,34 – 2,80
2''' – 4''',5'''	5,15 – 1,65
1''' – 4''',5'''	3,21 – 1,65
3b – 3a	3,04 – 2,80
3a - 4''',5'''	2,80 – 1,65
3a - 3b	2,80 – 3,04
3a - 2	2,80 – 5,34
4''',5''' – 1'''	1,65 – 3,21
4''',5''' – 2'''	1,65 – 5,15
5'',6'' – 3''	1,45 – 5,50

Fez-se também espectros de RMN  $C^{13}$  (Figura 3.87, p.147) e HMBC (Figura 3.89, p.148) para a confirmação da estrutura proposta. Os dados de HMBC correlacionam a interação entre os hidrogênios e carbonos separados por 3 ligações. Com isto a partir da análise do espectro tem-se que o hidrogênio presente

na hidroxila em  $\delta$  12,25 (H5) correlaciona-se com os carbonos em  $\delta$  155,8 (C5), 102,6 (C10). Este carbono ( $\delta$  108,6) correlaciona-se com o hidrogênio em  $\delta$  3,21 (H1''), ou seja, com um hidrogênio da prenila, e, portanto, esta somente pode estar na posição 6 da molécula, e o carbono em  $\delta$  108,6 corresponde ao C-6. O espectro apresentou, ainda, a correlação do hidrogênio em  $\delta$  5,50 (H3''), o qual pertence ao anel pirano, com o carbono em  $\delta$  102,8, sendo o C-8, confirmando a posição do anel pirano. Com isto, a estrutura foi determinada.

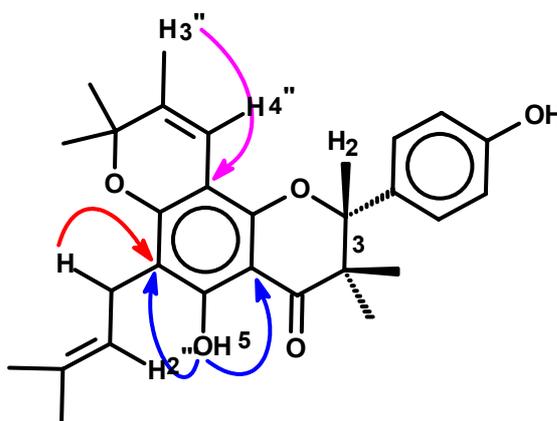


FIGURA 3.83: Correlações obtidas pelo HMBC que determina a estrutura do flavanóide F2.

Outras correlações foram observadas no espectro de HMBC e estão coerentes com a estrutura obtida: os hidrogênios em  $\delta$  7,32 (H2' e H6') correlacionam-se com os carbonos em  $\delta$  78,0 (C2),  $\delta$  127,7 (C2' e C6'), e  $\delta$  156,6 (C4'); enquanto que os hidrogênios em  $\delta$  6,88 (H3' e H5') correlacionam-se com os carbonos em  $\delta$  115,5 (C3' e C5'),  $\delta$  127,7 (C2' e C6') e  $\delta$  156,5 (C4'). Já o hidrogênio em  $\delta$  2,80 (H3a) correlaciona-se com o carbono em  $\delta$  196,4 (C4) e o hidrogênio em  $\delta$  3,04 (H3b) com o carbono em  $\delta$  196,4 (C4). Observou-se também as correlações presentes no anel pirano, ou seja, a correlação do hidrogênio em  $\delta$  6,63 (H4'') com o carbono em  $\delta$  78,4 (C2''); a correlação do hidrogênio em  $\delta$  5,50 (H3'') com o carbono em  $\delta$  78,4 (C2''); e a correlação dos hidrogênios equivalentes em  $\delta$  1,45 (H5'' e H6'') com os carbonos em  $\delta$  78,4 (C2'') e  $\delta$  125,9 (C3'').

Além destas correlações citadas até o momento, pode-se também obter as correlações referentes ao grupamento prenila. As quais foram correlação do hidrogênio em  $\delta$  3,21 (H1'''), com os carbonos em  $\delta$  122,4 (C2'''),  $\delta$  131,0 (C3''') e  $\delta$  159,3 (C7); a correlação dos hidrogênios equivalentes em  $\delta$  1,65 (H4''' e H5''') com os carbonos em  $\delta$  122,4 (C2''') e  $\delta$  131,0 (C3'''). Estas correlações estão melhor representadas na Figura 3.84.

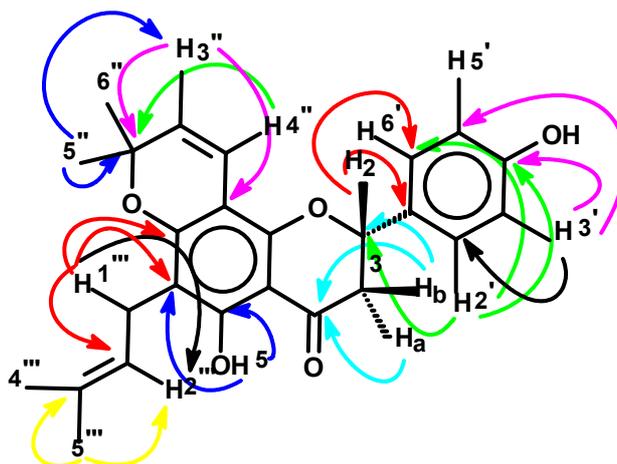


FIGURA 3.84: Correlações obtidas pelo HMBC do flavanóide F2.

Os carbonos foram atribuídos de acordo com as correlações obtidas nos experimentos para a Lupinifolina.

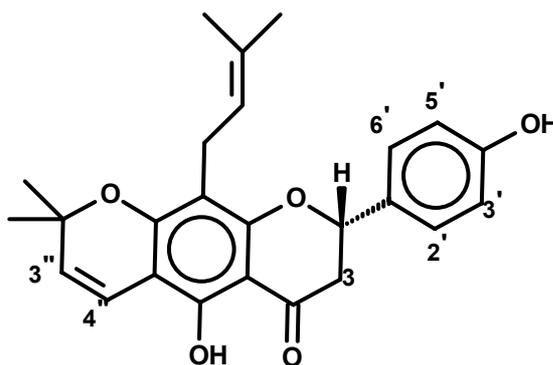


FIGURA 3.85: Estrutura da Lupinifolina.

Então, seguem-se os carbonos e seus respectivos deslocamentos químicos (em  $\delta$ , ppm) presentes no espectro e na molécula: C2-78,0; C3-43,2; C4-196,4; C5-155,8; C6-108,6; C7-159,3; C8-102,8; C9-159,8; C10-102,6; C1'-131,0; C2'-127,7; C3'-115,5; C4'-156,5; C5'-115,4; C6'-127,7; C2''-78,4; C3''-125,9; C4''-115,6; C5''-28,4; C6''-28,3; C1'''-21,4; C2'''-122,4; C3'''-131,0; C4'''-25,7; C5'''-25,7.

Com todos estes dados e valores atribuídos conclui-se que a flavanona isolada é realmente a proposta, e não há dados referentes a ela na literatura, sendo inédita.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração F11.4 possui valores de deslocamento químico muito próximos ao da fração F8.10, podemos portanto dizer que ambas referem-se a mesma flavanona. Se a flavanona da fração F11.4 possui o anel pirano nas posições 7 e 8 e o grupo prenila na posição 6, sendo assim diferente da F8.10, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  não apresentariam todos os deslocamentos químicos muito próximos, haveria alguns em valores distintos.

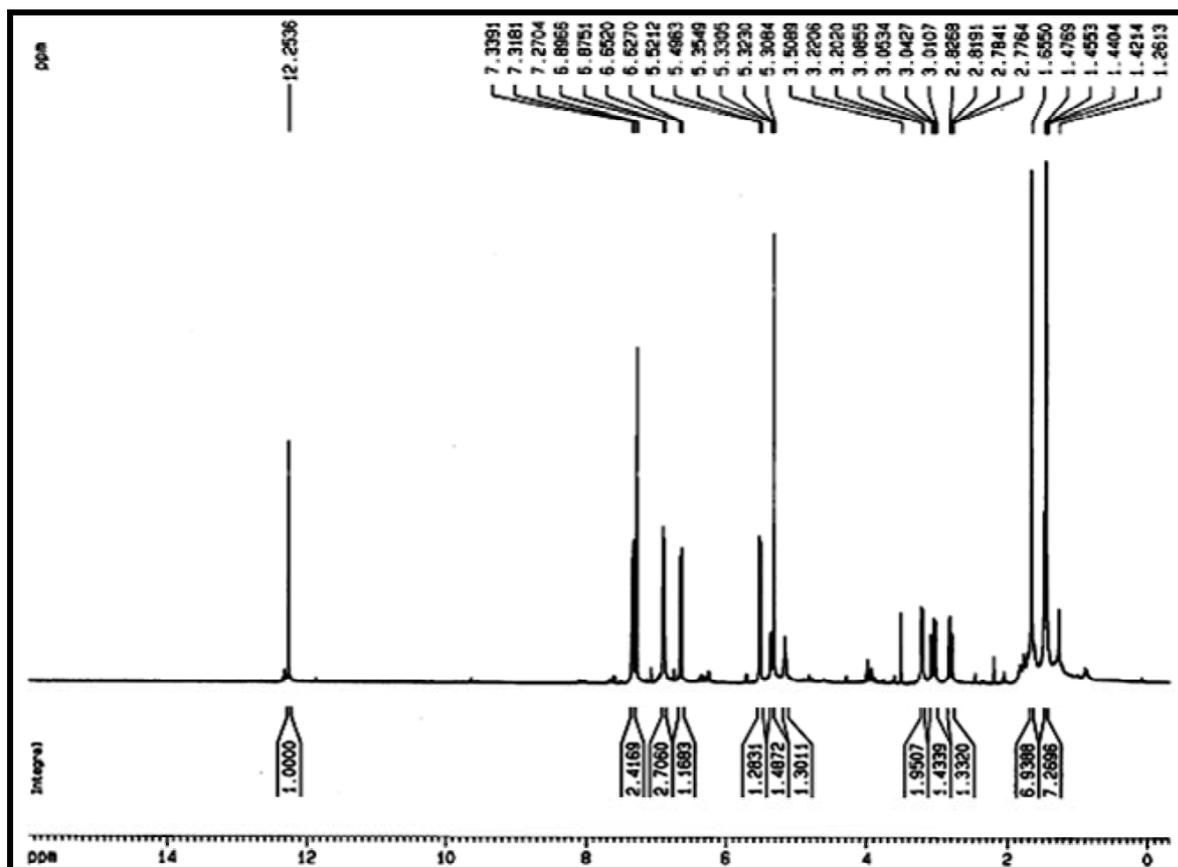


FIGURA 3.86: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do flavonóide F2.

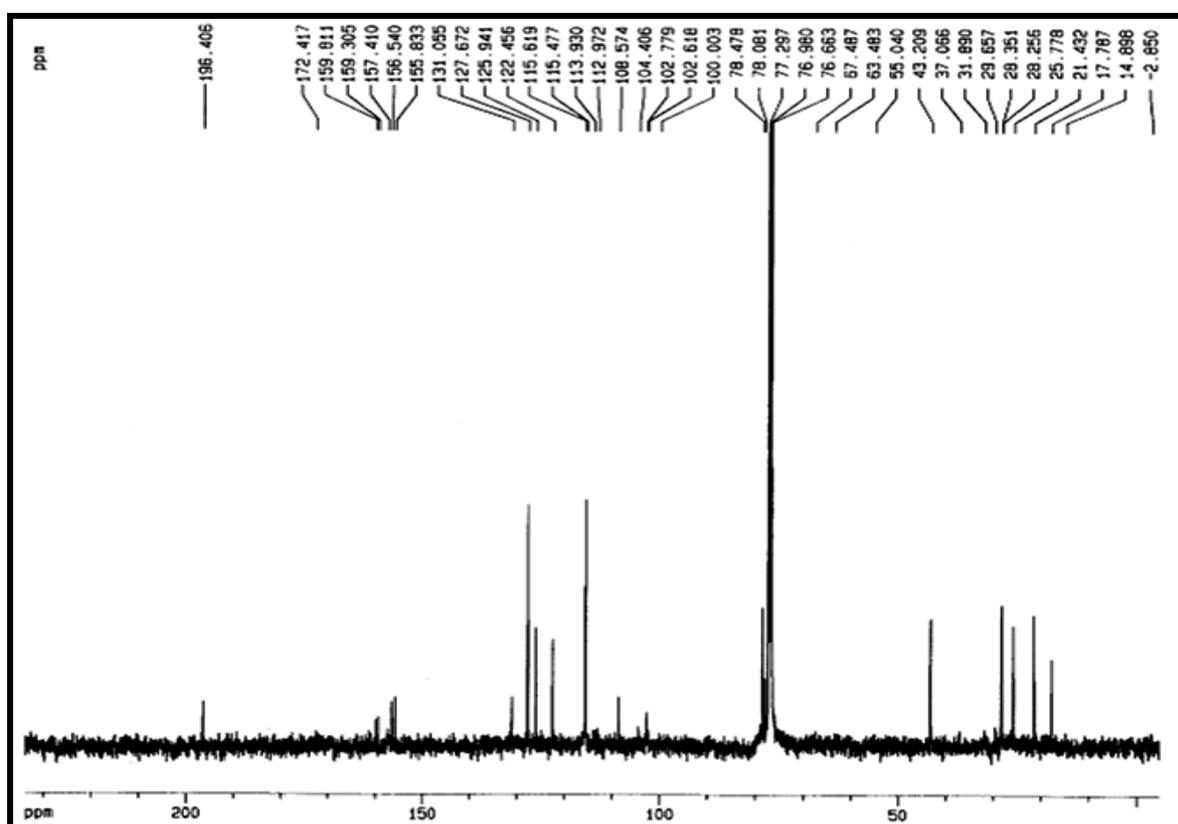


FIGURA 3.87: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do flavonóide F2.

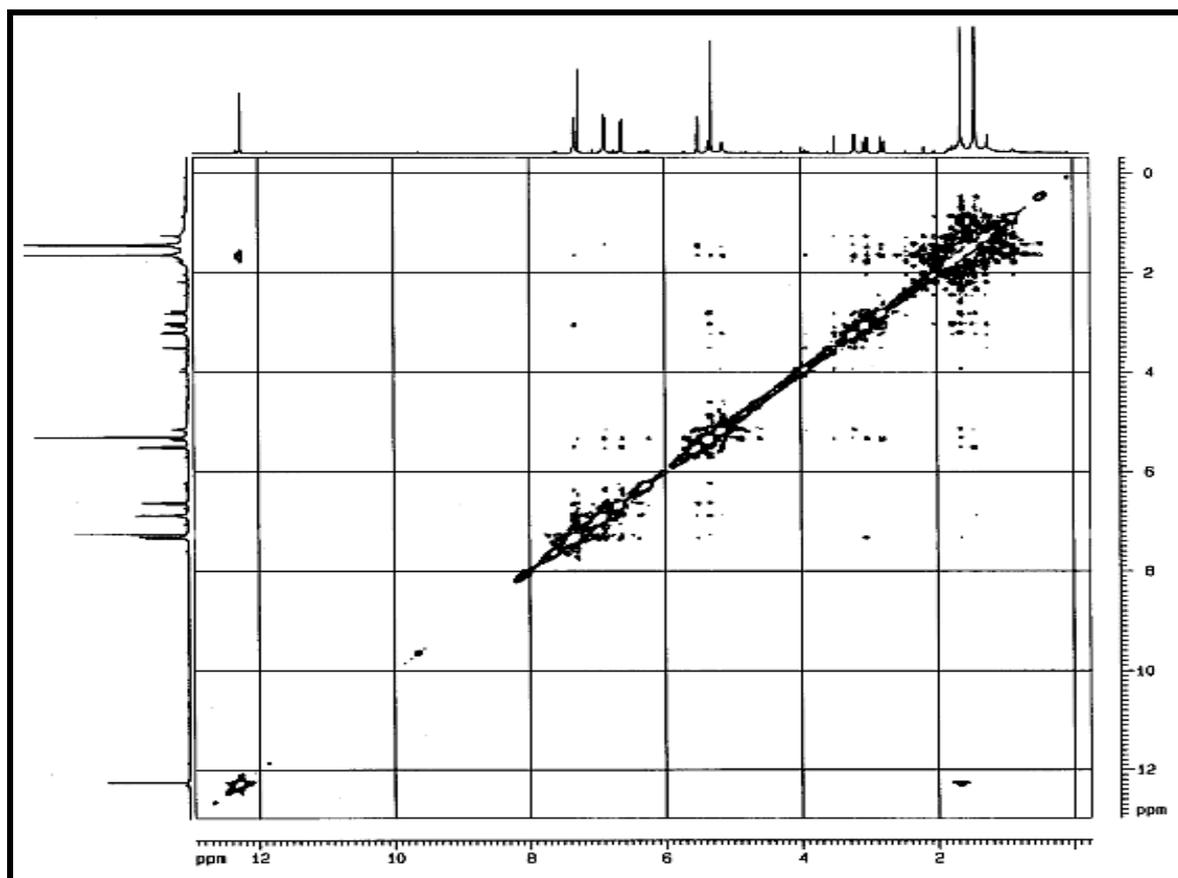


FIGURA 3.88: Espectro de NOESY (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do flavonóide F2.

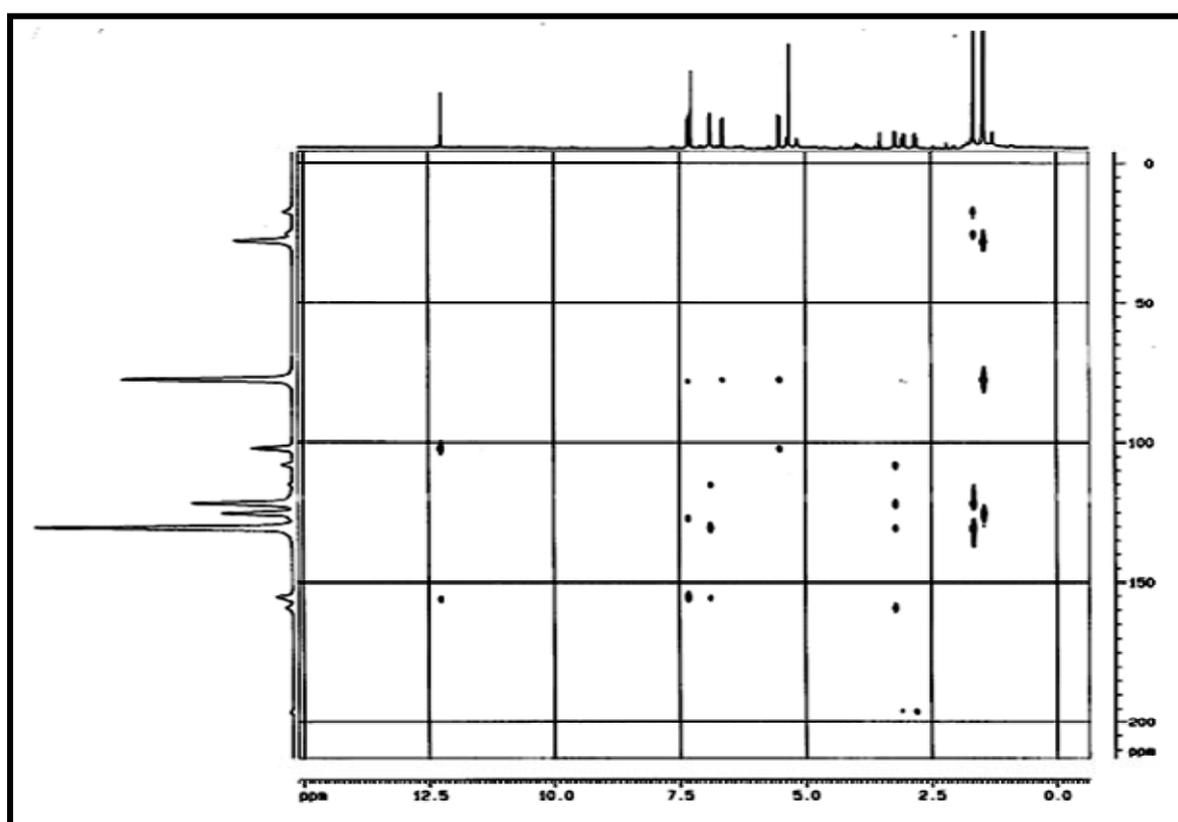


FIGURA 3.89: Espectro de HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do flavonóide F2.

Realizou-se o experimento de massas para o composto F2, para que se obtivesse uma melhor comprovação de sua estrutura (Figura 3.90).

A partir do espectro obtido, verificou-se o pico do íon molecular em  $m/z$  407, o qual era esperado uma vez que a flavanona proposta possui massa molecular 406 g/mol e que o mecanismo de ionização utilizado neste experimento foi ionização química  $[M+H]^+$ . Como o intuito era apenas comprovar a substância proposta, realizou-se apenas o experimento de full-scan para determinar a massa molecular. E, pode-se concluir que a flavanona isolada é realmente a 5,4'-diidróxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona proposta anteriormente.

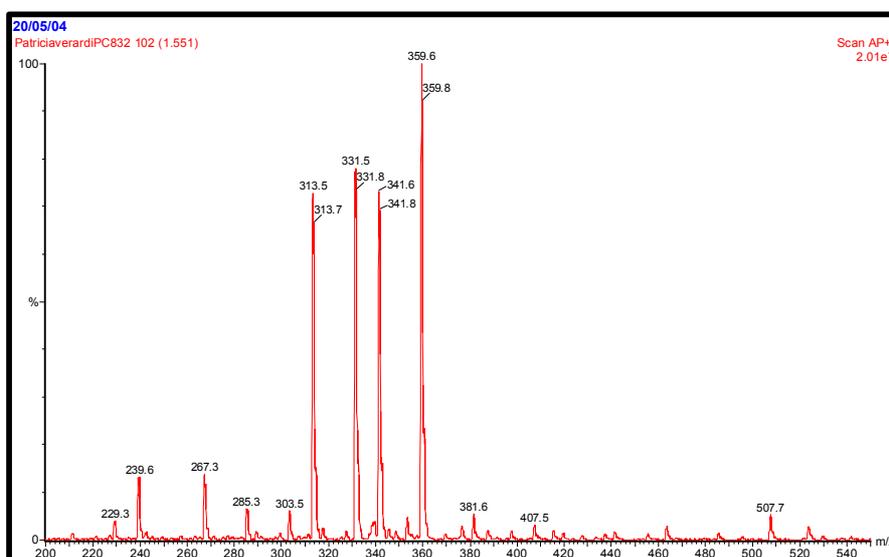


FIGURA 3.90: Espectro de massas do flavonóide F2.

### 3.2.1.13. Determinação estrutural dos Esteróides E1, E2 e E3

Os fitoesteróides, por apresentarem propriedades físico-químicas semelhantes, normalmente estão presentes em uma mistura de difícil separação. Os mais comuns são  $\beta$ -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Isolou-se 3,5 mg da mistura destes três compostos a partir do extrato dicloro-hexânico da raiz de *C. limonia*. Para tal identificação, realizou-se experimentos de RMN 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) e comparou-se os dados com a literatura (ALAM, 1996).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.96, p.154) mostrou um dubleto largo em  $\delta$  5,34, com constante de acoplamento de 5,04 Hz, o qual corresponde ao sinal do hidrogênio olefínico ligado ao carbono 6; o multiplete em  $\delta$  3,51 corresponde ao sinal do hidrogênio ligado ao carbono 3; e os sinais em  $\delta$  0,65 -  $\delta$  2,30 referem-se aos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos. Estes sinais confirmam a presença do  $\beta$ -sitosterol.

A presença do estigmasterol foi caracterizada pelos sinais de dois duplo dubletos, em  $\delta$  5,03, com  $J = 15,4$  Hz e  $J = 8,0$  Hz, referente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 23; e em  $\delta$  5,11, com  $J = 15,4$  Hz e  $J = 8,0$  Hz, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico da posição 22.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 3.97, p.154) mostrou um sinal em  $\delta$  71,9 referente ao carbono carbinólico da posição 3; dois sinais em  $\delta$  143,4 e  $\delta$  122,2, correspondentes aos carbonos 5 e 6, respectivamente; e dois sinais em  $\delta$  129,2 e  $\delta$  138,4 referentes aos carbonos 23 e 22, respectivamente. Estes sinais comprovam a presença do Sitosterol e do Estigmasterol, portanto, foi necessário a análise por CG/EM para verificar se havia apenas estes dois compostos na mistura, ou se havia ainda a presença de outros esteróides.

TABELA 3.26: Dados obtidos de RMN  $^{13}\text{C}$  (200 MHz) da mistura de Sitosterol, Estigmasterol e Campesterol em comparação com a literatura.

<b>Posição</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b>	<b><math>\delta^{*13}\text{C}</math></b>
1	37,2	37,2
2	33,8	33,9
3	71,9	72,9
4	39,3	39,7
5	143,4	140,3
6	122,2	122,1
7	31,7	31,9
8	30,8	31,8
9	50,5	50,1
10	36,4	36,1
11	20,4	21,2
12	40,1	40,4
13	42,1	42,3
14	56,6	56,7
15	24,6	24,2
16	28,5	28,2
17	56,2	56,0
18	11,9	11,9
19	19,6	19,3
20	36,7	36,7
21	18,8	18,7
22	138,4	138,2
23	129,2	129,3
24	29,5	29,1
25	31,9	31,8
26	19,7	19,8
27	19,2	19,0
28	23,6	23,0
29	12,2	11,8

Literatura: ALAM, 1996.

A rampa utilizada para a obtenção do cromatograma foi 100-1-7-250-20. O cromatograma obtido apresentou 3 picos intensos (Figura 3.91), e a partir dos espectros de massas correspondentes de cada pico (Figura 3.92, 3.93 e 3.94, p. 153), pode-se confirmar que os esteróides em mistura referem-se ao Sitosterol (E1), Estigmasterol (E2) e Campesterol (E3).

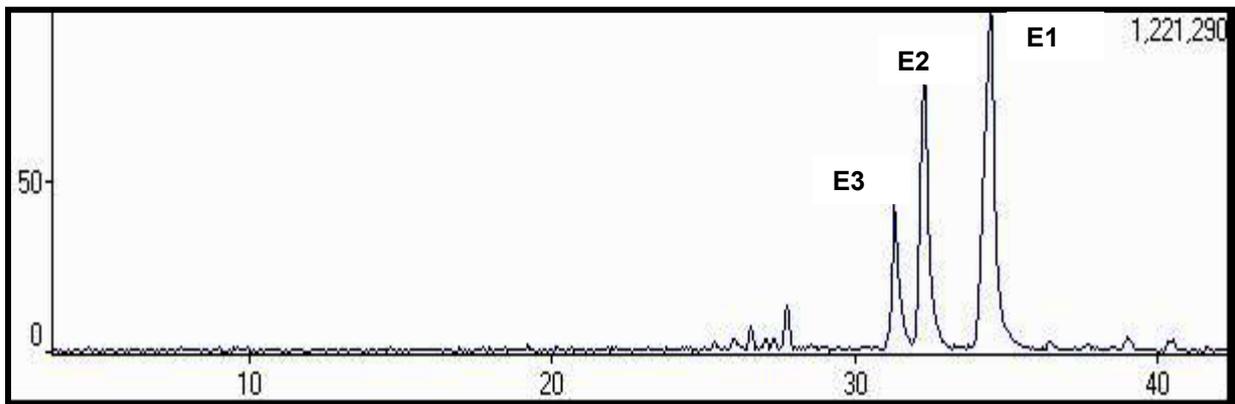


FIGURA 3.91: Cromatograma da mistura dos três esteróides (E1, E2 e E3).

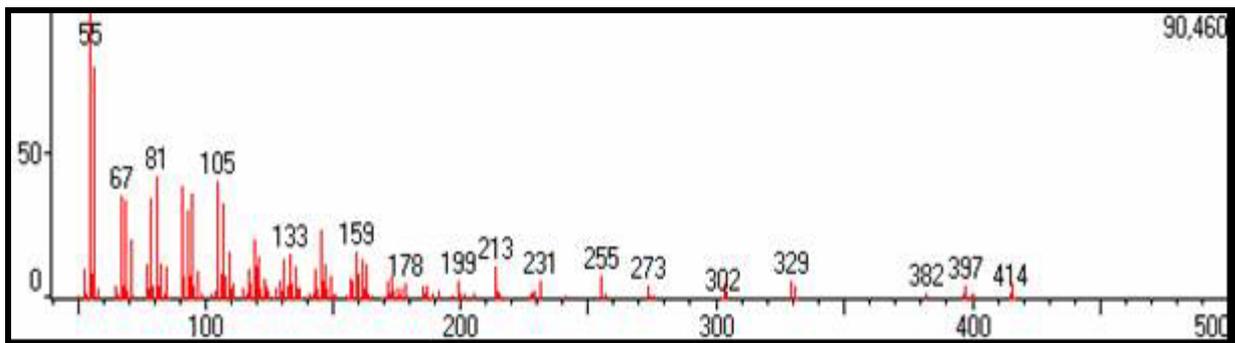


FIGURA 3.92: Espectro de Massas do esteróide E1.

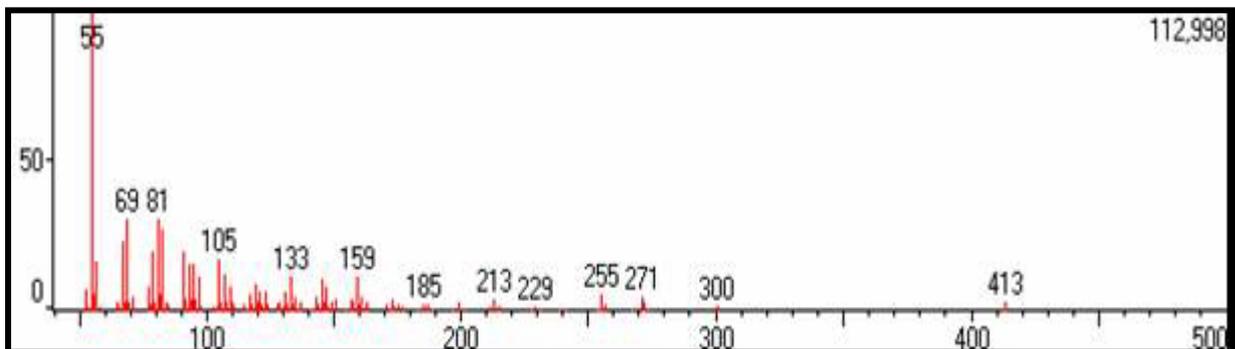


FIGURA 3.93: Espectro de Massas do esteróide E2.

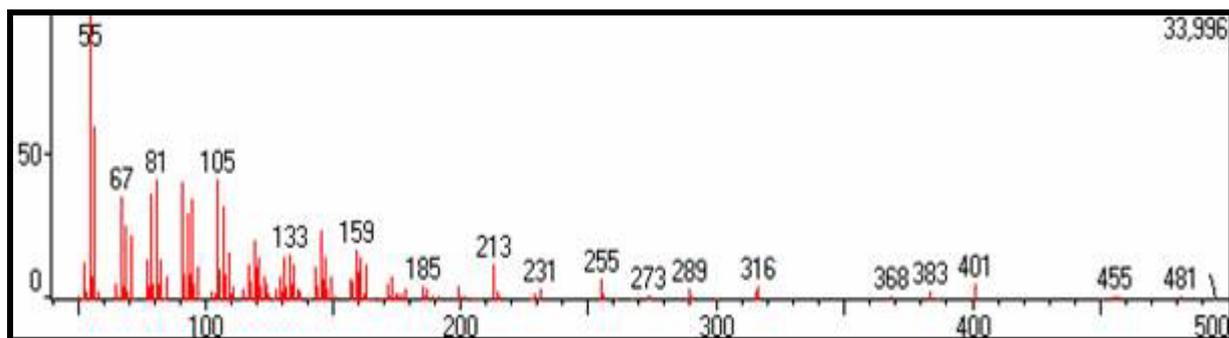


FIGURA 3.94: Espectro de Massas do esteróide E3.

Abaixo, encontra-se ilustrado os três esteróides identificados em mistura.

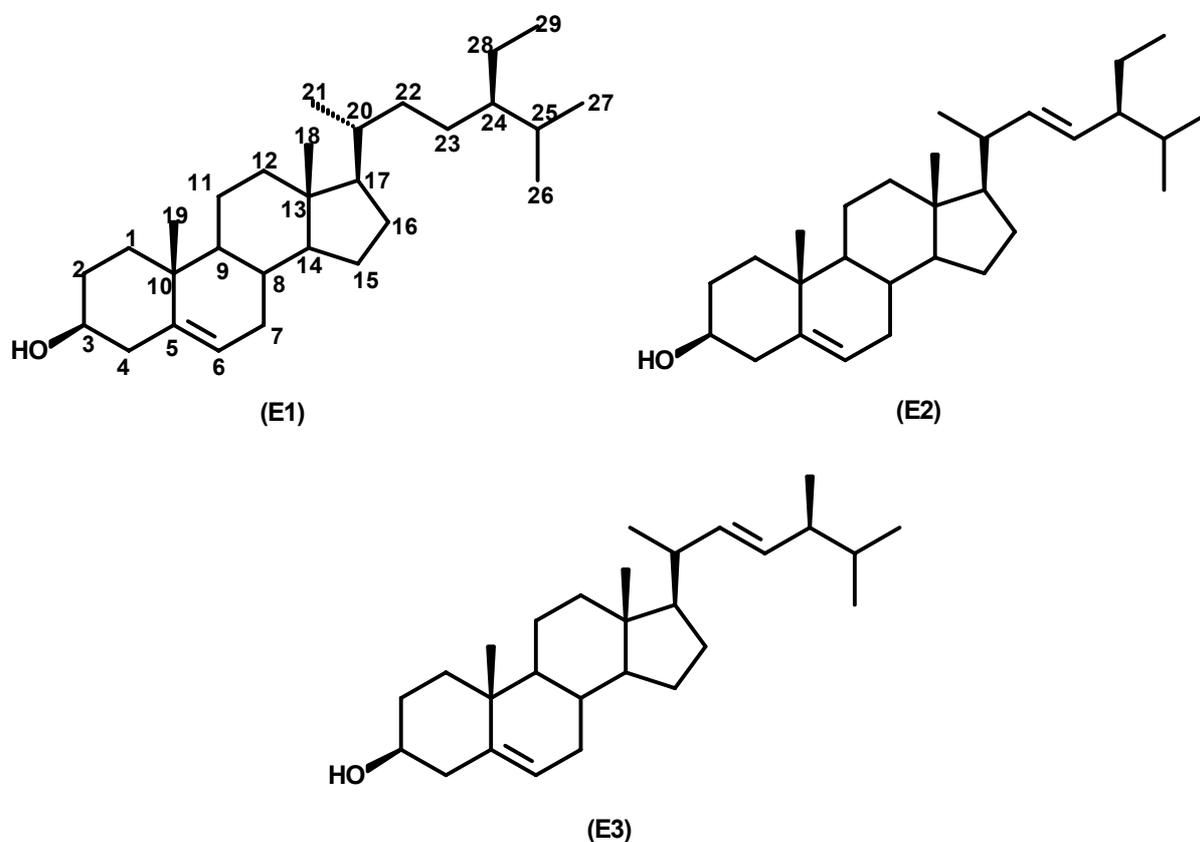


FIGURA 3.95: Estruturas químicas do Sitosterol (E1), Estigmasterol (E2) e Campesterol (E3).

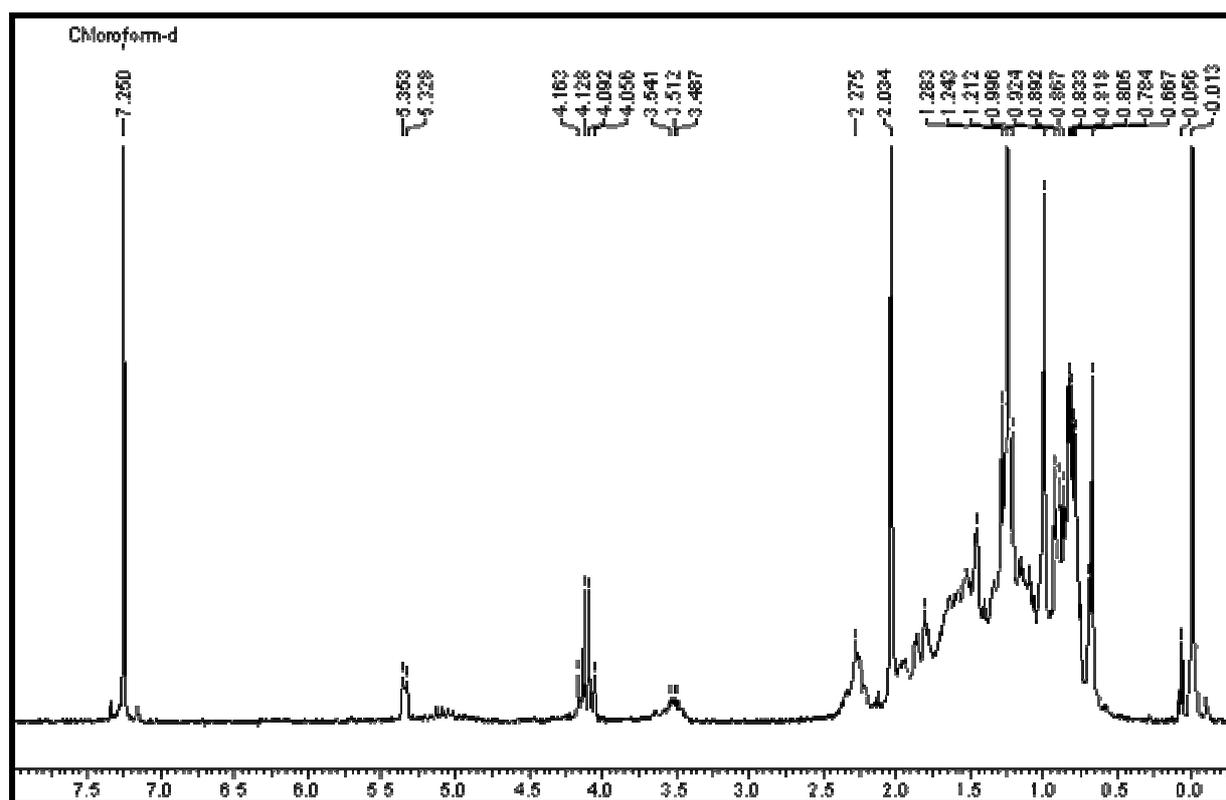


FIGURA 3.96: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) dos esteróides E1, E2 e E3.

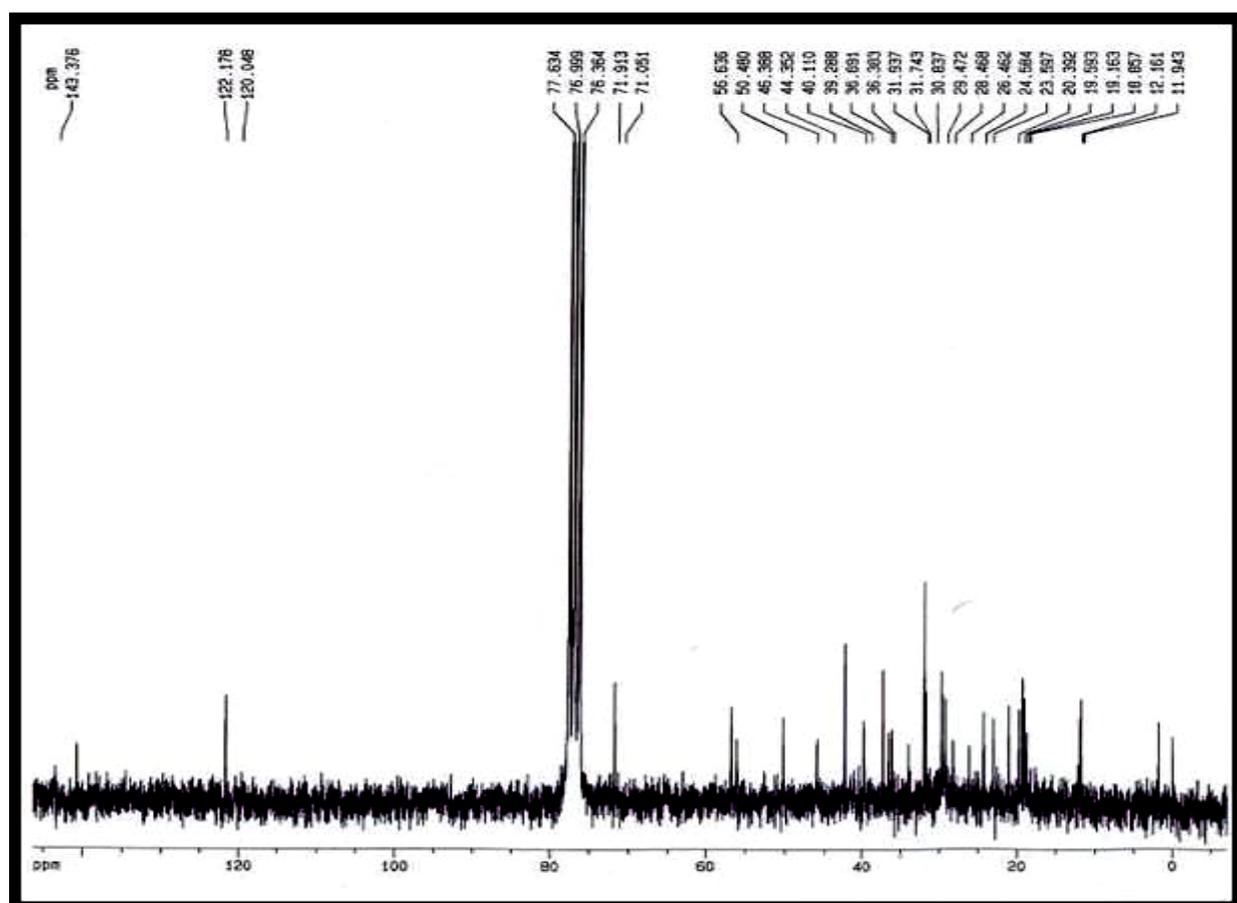


FIGURA 3.97: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) dos esteróides E1, E2 e E3.

**4. CAPÍTULO 2:**  
**ENSAIOS BIOLÓGICOS**

---

## 4.1. Ensaio Bactericidas contra a *Xylella fastidiosa*

Os ensaios foram realizados no Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira', situado na cidade de Cordeirópolis - S.P., com a colaboração da professora Dr<sup>a</sup>. Alessandra Alves de Souza. Utilizou-se meio PW líquido para o cultivo da bactéria e realizou-se experimentos com a bactéria no início da fase estacionária (após 10 dias de crescimento) e exponencial (após 5 dias de crescimento). A solução preparada contendo bactéria e substância ensaiada foi plaqueada em Placas de Petri contendo meio PW sólido. A avaliação da inibição do crescimento bacteriano foi realizada visualmente. A concentração mínima inibitória (MIC) foi considerada quando, no máximo, uma colônia foi obtida após plaqueamento da cultura não diluída.

### 4.1.1 Procedimento Experimental

#### 4.1.1.1. Preparação dos meios de cultivo

Inicialmente, preparou-se o meio de cultura PW (líquido e sólido) para a *X. fastidiosa*, segundo o protocolo de Davis *et al.*, 1981 (Tabela 4.1). Adicionou-se a quantidade específica de cada reagente de acordo com a quantidade total de meio necessário.

TABELA 4.1: Reagentes e suas concentrações necessárias para preparar um determinado volume do meio PW.

	P/ 1000 mL Meio	P/ 200 mL Meio	P/ 150 mL Meio	P/ 100 mL Meio
Phytone peptone	4,00 g	0,80 g	0,60 g	0,40 g
Trypticase peptone	1,00 g	0,20 g	0,15 g	0,10 g
Hemin chloride (0,1%) <sup>*</sup>	10,00 mL	2,00 mL	1,50 mL	1,00 mL
Phenol red (0,2%) <sup>**</sup>	10,00 mL	2,00 mL	1,50 mL	1,00 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,20 g	0,24 g	0,18 g	0,12 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00 g	0,20 g	0,15 g	0,10 g
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,40 g	0,08 g	0,06 g	0,04 g
Agar	12,00 g	2,40 g	1,80 g	1,20 g
H <sub>2</sub> O destilada	800 mL	164 mL	125 mL	92 mL

Preparou-se *Phenol Red* 0,2% a partir da adição de 0,2 g de *Phenol Red* e 10 gotas de NaOH 20% em 100 mL de H<sub>2</sub>O; e *Hemin Chloride* 0,1% a partir da adição de 0,1 g *Hemin Chloride* (Sigma H-1652) e 0,2 g NaOH em 100 mL H<sub>2</sub>O. Os outros reagentes foram obtidos comercialmente. Autoclavou-se a mistura por 20 minutos a 120°C e adicionou-se Glutamina 4% e BSA 10% esterelizado.

Foi necessária uma grande quantidade de meio líquido e sólido para a realização dos experimentos, portanto, preparava-se 1000 mL de cada um toda vez que realizava-se os ensaios.

- Preparação de 1000 mL de meio sólido:

Em um frasco grande, adicionou-se, primeiramente, 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Em seguida, colocou-se 4,0 g de *Phytone peptone* (BBL 4311906), 1,0 g de *Trypticase peptone* (BBL 4311921), 1,2 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 g de MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e 12,0 g de Ágar. Então, sob agitação mecânica, adicionou-se 10 mL de *Hemin chloride* (0,1%) e 10 mL de *Phenol red* (0,2%), após a solução ter ficado homogênea completou-se até 800 mL com água destilada. Colocou-se o meio para autoclavar e, enquanto isso, preparou-se a solução de BSA e Glutamina.

Para o preparo da Glutamina 4% adicionou-se em um erlenmeyer 4 g de Glutamina (Sigma G-5763) e 100 mL de H<sub>2</sub>O autoclavada e deixou-o sob agitação até que todo reagente se dissolvesse. Para o BSA, adicionou-se em outro erlenmeyer 6 g de BSA fração V (Sigma A-9418) e 100 mL de H<sub>2</sub>O autoclavada e deixou-se em banho-maria (50-55 °C) até que todo reagente se dissolvesse. Após autoclavado o meio sólido, resfriou-se um pouco e depois inseriu-se o BSA e a Glutamina através de um filtro. Por fim, verteu-se o meio em placas de Petri com meio PW sólido e deixou-as aberta por alguns minutos para que o vapor liberado evaporasse. Não se pode resfriar muito o meio sólido antes de verter, pois este solidifica rapidamente. Fechou-se as placas e vedou-as. (1000 mL de meio resultou em aproximadamente 23 placas de Petri).

- Preparação de 1000 mL de meio líquido:

Os reagentes utilizados para se preparar o meio líquido foram os mesmos utilizados para preparar o meio sólido, porém no meio líquido não se usa o Ágar,

pois é este o responsável por “solidificar” o meio. O procedimento realizado foi semelhante, porém em vez de autoclavar em um único frasco como no meio sólido, dividiu-se a solução em 10 erlenmeyer contendo 80 mL e depois que todos foram autoclavados, adicionou-se 10 mL de BSA e 10 mL de Glutamina em cada erlenmeyer.

Ambos meios são preparados com o máximo de cautela, toda vidraria usada é autoclavada, o meio é autoclavado, e toda preparação do meio é executada dentro de um fluxo próprio e próximo ao fogo, uma vez que este meio é facilmente contaminável devido ser um meio rico e não conter nenhum antibiótico que possa matar os outros microrganismos, exceto a *X. fastidiosa*. No entanto, o meio líquido é mais facilmente contaminado que o meio sólido, pois há um maior mau uso e transferência de vidrarias. Após este procedimento os meios ficaram sob “quarentena”, que na verdade são apenas alguns dias (aproximadamente 14 dias) para verificar se não houve contaminação. O meio líquido foi utilizado para cultivar a bactéria, enquanto que o meio sólido foi utilizado para plaquear a solução contendo meio *X. fastidiosa* e a substância a ser ensaiada e, portanto, verificar se a bactéria se desenvolveu com a substância em questão.

Preparados os meios de cultivo, colocou-se a bactéria para crescer no meio líquido. Nos primeiros dias, a bactéria se encontra na fase exponencial, nesta fase a bactéria está em estado de multiplicação celular. Aproximadamente no décimo dia, a bactéria encontra-se no início da fase estacionária, ou seja, é neste estágio que a bactéria está mais resistente, pois está em sua maior população. A partir deste estágio, ela pára de se multiplicar e conseqüentemente começa a morrer.

#### **4.1.1.2. Ensaio das Substâncias contra *Xylella fastidiosa***

Os experimentos foram realizados utilizando-se a bactéria no início da fase estacionária, e com o decorrer dos mesmos utilizou-se a bactéria na fase exponencial para comparação dos resultados.

Primeiramente, preparou-se a solução estoque (5 mg/mL) das substâncias a serem ensaiadas utilizando-se como solvente DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1). Calculou-se a quantidade de solução estoque necessária para a obtenção da concentração final utilizando-se 100 µL da bactéria.

$$C_i.V_i = C_f.V_f$$

- $$C_i.V_i = C_f. (0,1+V_i)$$

$$5,0 \text{ mg/mL} . V_i = 0,4 \text{ mg/mL} . (0,1 \text{ mL} + V_i)$$

$V_i = 8,7 \mu\text{L}$  → Para uma concentração de 0,4 mg/mL deve-se usar 8,7  $\mu\text{L}$  da solução estoque (5,0 mg/mL)

- $$C_i.V_i = C_f. (0,1+V_i)$$

$$5,0 \text{ mg/mL} . V_i = 2,0 \text{ mg/mL} . (0,1 \text{ mL} + V_i)$$

$V_i = 67,0 \mu\text{L}$  → Para uma concentração de 2,0 mg/mL deve-se usar 67,0  $\mu\text{L}$  da solução estoque (5,0 mg/mL)

Os cálculos para as outras concentrações foram semelhantes ao descrito acima e estão indicados na Tabela 4.2.

TABELA 4.2: Volumes retirados da solução estoque e a correspondente concentração final.

<b>Volume Solução Estoque (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentração ensaiada (mg/mL)</b>
8,7	0,4
25,0	1,0
31,6	1,2
35,0	1,3
39,0	1,4
43,0	1,5
47,0	1,6
51,0	1,7
56,0	1,8
67,0	2,0

Então retirou-se uma alíquota correspondente da solução estoque e colocou-a em um poço da placa contendo 100  $\mu\text{L}$  da bactéria em meio líquido (Figura 4.1).

Deixou-se as substâncias e bactéria em contato por 24 horas na BOD (Biological Oxygen Demand).

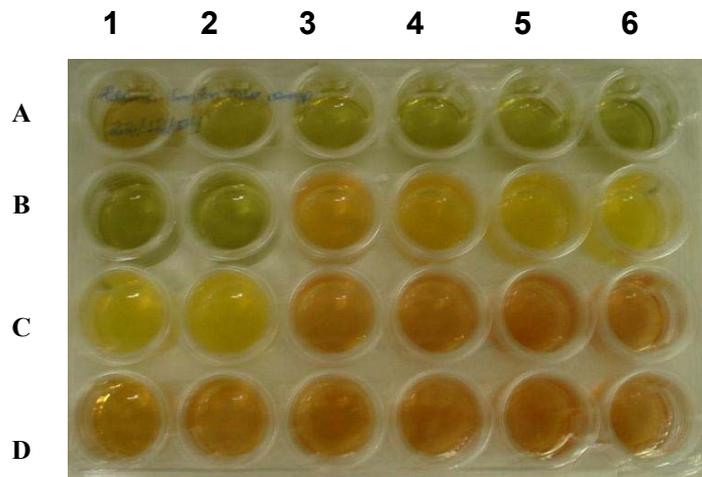


FIGURA 4.1: Placa com a solução de *X. fastidiosa* e as substâncias ensaiadas nas diferentes concentrações.

Após este período, plaqueou-se 100  $\mu$ L destas soluções em placas de Petri e colocou-as na BOD. A partir de 15 dias observou-se se a bactéria cresceu na concentração correspondente ou se esta foi inibida (Figura 4.2, p.161). Quando a bactéria foi totalmente inibida determinou-se a MIC para a substância ensaiada.

Os experimentos foram feitos em triplicata, para obtenção de um resultado confiável e reprodutível. Em todos os experimentos fez-se o branco, ou seja, colocou-se em um poço o solvente (DMSO:H<sub>2</sub>O - 1:1), a bactéria e depois plaqueou-se, para verificar se o solvente não inibia o desenvolvimento desta última. Em outro poço adicionou-se apenas a bactéria e plaqueou-se para confirmar a viabilidade celular.

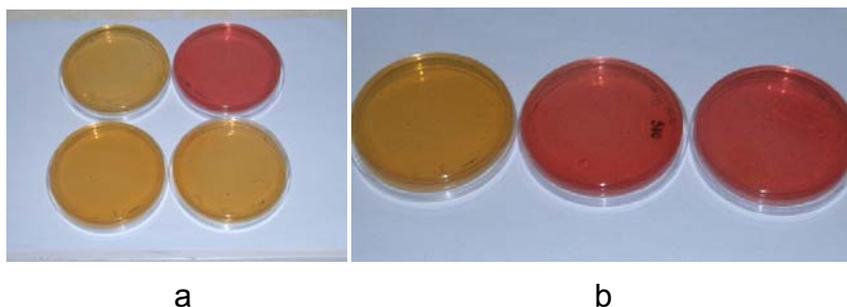


FIGURA 4.2: a- Placas de Petri com as substâncias ensaiadas (Xantiletina, Seselina, Limonia e Flavona 1, nas concentrações de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o controle; b- Placas de Petri com a Xantiletina nas concentrações 1000, 500 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente.

Quando há inibição da bactéria, além de não aparecerem colônias das mesmas, a placa permanece amarelada e não se torna vermelha como no caso em que cresce a bactéria, pois não há uma mudança do pH do meio. Quando se altera o pH do meio, a cor amarelada passa a avermelhada. Então, por exemplo, a partir das placas mostradas na Figura 4.2, pode-se verificar que nas concentrações de 1 mg/mL, todos os compostos ensaiados inibiram a bactéria, exceto o controle.

Iniciou-se os experimentos utilizando-se uma ampla faixa de concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 500,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da substância, uma vez que não havia descrito na literatura ensaios de substâncias isoladas de produtos naturais frente a *X. fastidiosa*. A partir dos resultados obtidos foi alterando-se as concentrações (aumentando e diminuindo) até a determinação da MIC de cada substância. Toda a metodologia empregada no ensaio biológico está representada na Figura 4.3, p. 162.

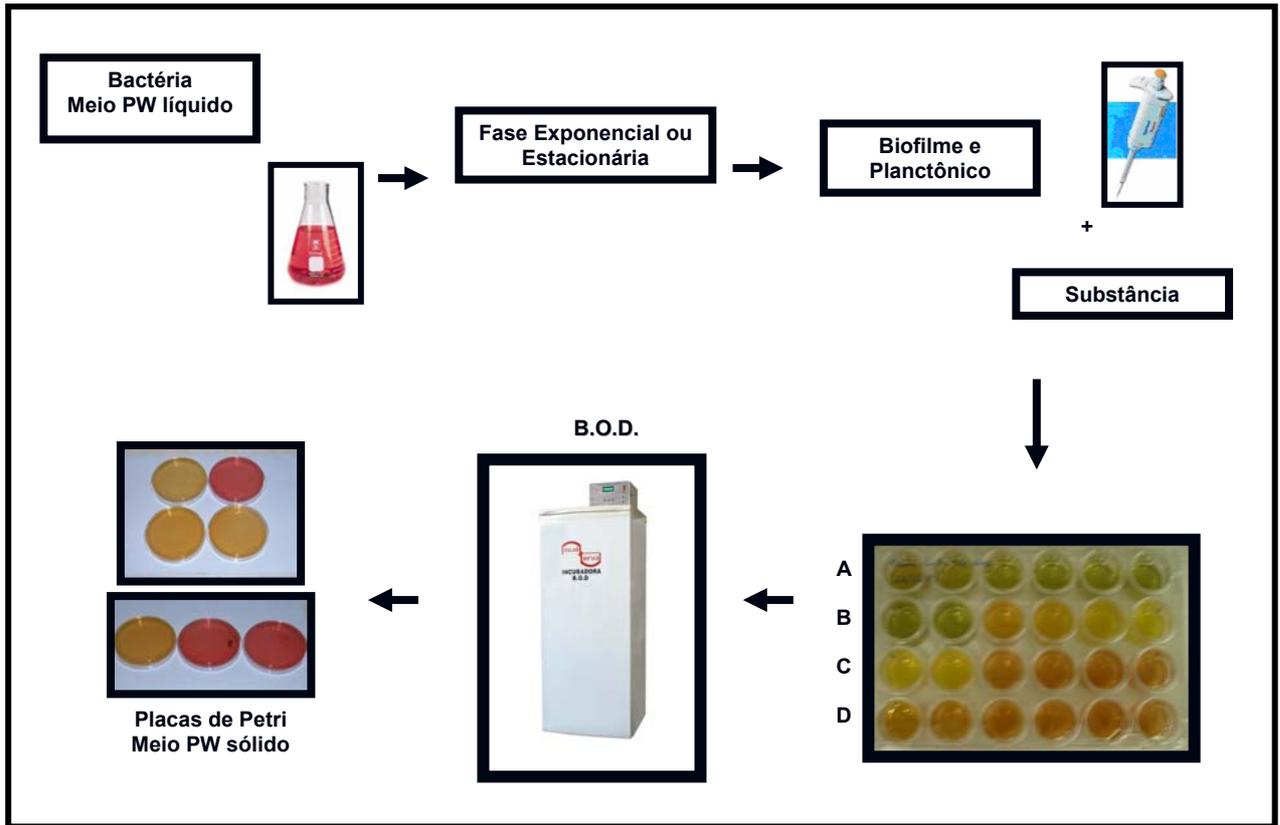


FIGURA 4.3: Fluxograma da metodologia empregada nos ensaios bactericida contra *X. fastidiosa*.

## 4.1.2. Resultados e Discussões

### 4.1.2.1 Ensaio contra *Xylella fastidiosa* em diferentes fases de crescimento

Não há atualmente um método eficaz e comercial disponível para o controle da bactéria *X. fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC) e de outras doenças, como por exemplo, a Doença de Pierce. Esta bactéria tem causado enormes prejuízos tanto para a citricultura brasileira, como para outras diversas culturas distribuídas mundialmente.

Iniciou-se, então, estudos para a obtenção de substâncias naturais com alto potencial bactericida, as quais não são agressoras ao meio ambiente e ao ser humano. No entanto, não há dados na literatura sobre ensaios contra *X. fastidiosa* com substâncias naturais, então, primeiramente ensaiou-se substâncias que estavam disponíveis em grande quantidade e que são fáceis de se isolar, caso fosse necessário posteriormente mais quantidade das mesmas para os ensaios.

A *X. fastidiosa* é uma bactéria de difícil cultivo em meios. O meio ideal para seu crescimento é rico em nutrientes, e por isto é facilmente contaminado por demais microrganismos, como fungo, o que dificulta os ensaios. Um trabalho citado na literatura (Campanharo, et.al., 2003) compara o crescimento da bactéria em diferentes meios e demonstra que, independente deste, a *X. fastidiosa* possui três fases de crescimento: Fase lag, na qual bactéria ainda não se multiplica; Fase log (exponencial), onde a bactéria se multiplica, aumentando sua população; e Fase estacionária, na qual a bactéria pára de se multiplicar. Nos ensaios realizados foi utilizada a bactéria cultivada em meio PW líquido; a partir da Figura 4.4, p. 164, verifica-se que, para este meio, a bactéria nas primeiras 24 horas de crescimento encontra-se na Fase lag; do 1º ao 10º dia na Fase log e a partir do 10º dia na Fase estacionária.

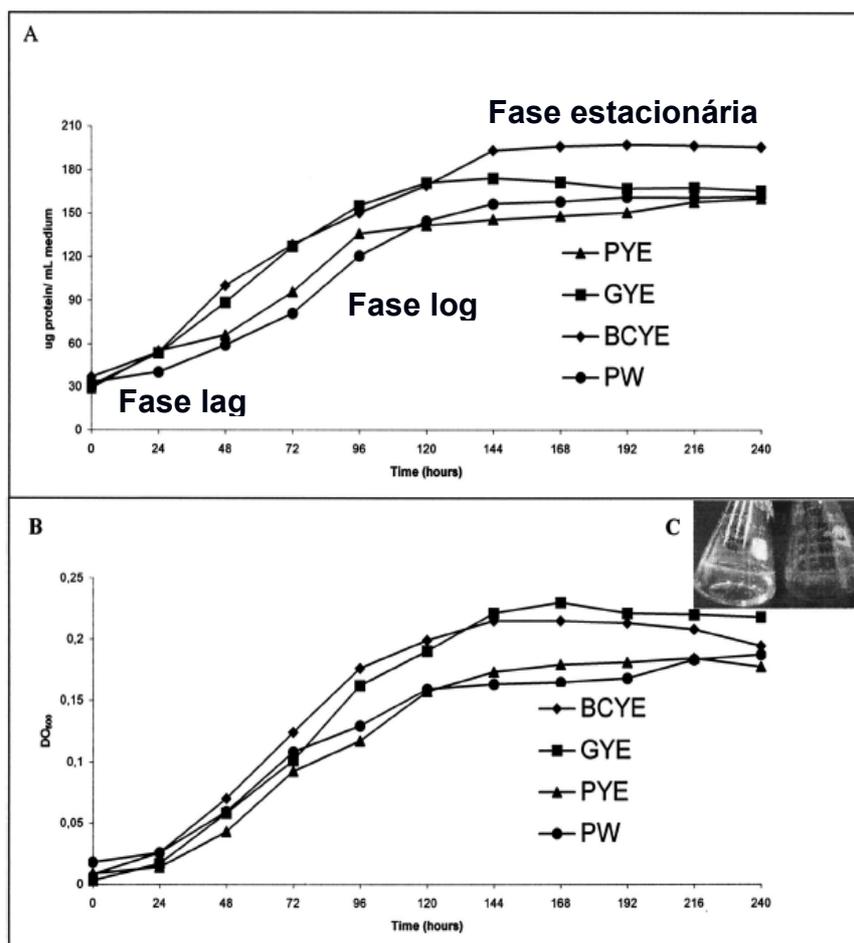


FIGURA 4.4: Crescimento de *X. fastidiosa* em diferentes meios líquidos: A) Medida da concentração total de proteína, B) Medida por Densidade ótica (OD) a A600 nm. (Fonte: )

#### 4.1.2.1.1. Ensaio contra a *Xylella fastidiosa* no início da Fase Estacionária

Os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se quatro substâncias: um flavonóide - 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (Flavona 1), um limonóide (Limonina), duas cumarinas (Xantiletina e Seselina); e a bactéria no início da Fase Estacionária (10 dias de crescimento após inoculação). Estas substâncias são facilmente obtidas por métodos de extrações convencionais, e além disto, as duas cumarinas foram isolados em grande quantidade do *C. limonia*, o qual é resistente a CVC, como comentado na introdução. Ou seja, é um indício que estes compostos possam apresentar alguma atividade inibitória considerável frente a *X. fastidiosa* e estarem

contribuindo possivelmente com a resistência à bactéria. O limonóide foi isolado em grande quantidade do enxerto de *C. sinensis* sobre *C. limonia* e o flavonóide, embora não isolado deste último, apresenta grande semelhança estrutural com os flavonóides isolados da parte superior desta planta. Com isto, os ensaios preliminares foram realizados utilizando-se substâncias isoladas (ou semelhantes às isoladas) de *Citrus*.

Realizou-se ensaios com diversas concentrações das substâncias, as quais estão descritas na Tabela 4.3, até que a bactéria fosse totalmente inibida.

TABELA 4.3: Colônias observadas nas diferentes concentrações de substâncias ensaiadas contra *X. fastidiosa* na Fase Estacionária.

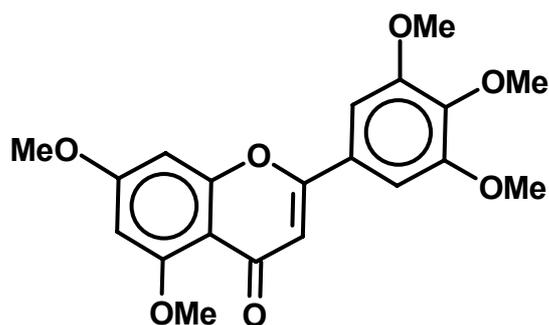
<b>C mg/mL</b>	<b>Flavona 1</b>	<b>Limonina</b>	<b>Xantiletina</b>	<b>Seselina</b>
0,001	+++	++	++	++
0,005	+++	++	++	++
0,010	+++	+	++	++
0,015	+++	+	+	++
0,020	++	++	+	++
0,050	+++	++	+	N
0,400	++	++	+	+
0,500	+	+	+	+
0,600	+	+	+*	+
0,700	X	X	N	+
0,800	X	X	N	+
0,900	X	X	+*	N
1,000	+	+	-	+
1,100	X	X	-	+
1,200	+	+	-	+
1,300	X	X	-	N
1,400	-	+	-	-
1,500	-	X	-	-
1,600	-	-	-	-
1,700	X	-	X	X

TABELA 4.3: Colônias observadas nas diferentes concentrações de substâncias ensaiadas contra *X. fastidiosa* na Fase Estacionária - Continuação.

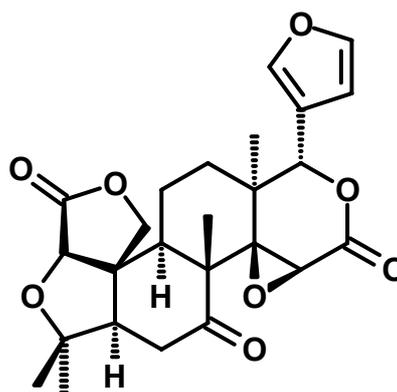
1,800	-	-	-	-
2,000	-	-	-	-
4,000	N	-	-	-

+++ : Crescimento intenso, semelhante ao controle; ++ : Redução parcial do crescimento; + : Redução do crescimento, visualização de colônias isoladas; +\* : Redução quase total de crescimento; - : Não cresceu bactéria; N : não determinado, X : não foi realizado experimento.

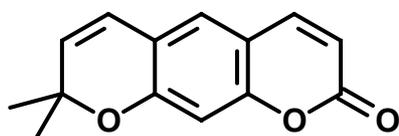
A partir destes resultados pode-se determinar a MIC de cada substância (Figura 4.5):



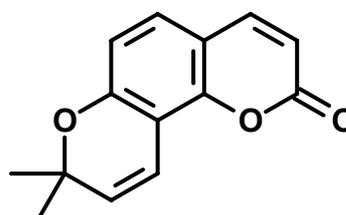
Flavona 1: MIC = 1,4 mg/mL



Limonina: MIC = 1,6 mg/mL



Xantiletina: MIC = 1,0 mg/mL



Seselina: MIC = 1,4 mg/mL

FIGURA 4.5: MIC da 3',4',5',5',7-pentametoxiflavona (Flavona 1), Limonina, Xantiletina e Seselina contra a *X. fastidiosa* no início da Fase Estacionária.

#### 4.1.2.1.2. Ensaio contra *Xylella fastidiosa* na Fase Exponencial e no início da Fase Estacionária

Os ensaios iniciais foram realizados com a bactéria no início da Fase Estacionária, pois é citado na literatura que é nesta fase que a bactéria encontra-se em maior densidade celular e por isto mais resistente. Então seria interessante a inibição da bactéria nesta fase, pois a MIC determinada seria suficiente para inibir a bactéria em qualquer uma das fases. No entanto, resolveu-se fazer os ensaios em ambas as fases para verificar se as mudanças nas MICs são discrepantes ou discretas. As concentrações utilizadas para o experimento foram 0,5, 0,6, 1,0 e 2,0 mg/mL.

Antes de iniciar o experimento, mediu-se o OD<sub>600nm</sub> de cada meio para verificar qual a fase em que as bactérias se encontravam em cada meio. Um meio apresentou OD<sub>600nm</sub> igual a 0,080 (Meio 1), e o outro OD<sub>600nm</sub> igual a 0,281 (Meio 2). Comparando-se os dados com a literatura, verifica-se que no primeiro meio as bactérias encontram-se na Fase Exponencial (5 dias após a inoculação) e no segundo elas estão no início da Fase Estacionária (10 dias após a inoculação). Fez-se então os experimentos (Figura 4.6, p.168) utilizando-se primeiramente a bactéria na Fase Exponencial (Meio 1) e posteriormente no início da Fase Estacionária (Meio 2).

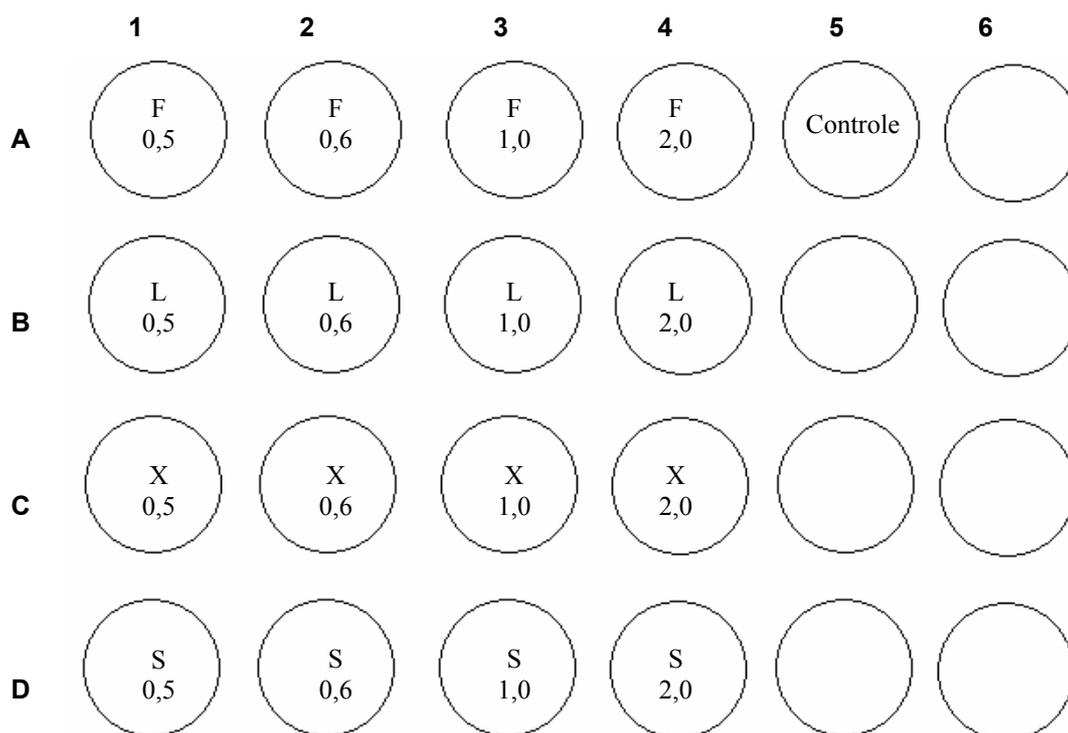


FIGURA 4.6: Concentrações utilizadas, em mg/mL, no experimento para comparação das fases de crescimento da *X. fastidiosa*.

Obeve-se o seguinte resultado nas placas (Tabela 4.4):

TABELA 4.4: Colônias observadas com a *X. fastidiosa* na Fase Exponencial e no início da Fase Estacionária.

Substância Ensaída	C mg/mL (Fase Exponencial)				C mg/mL (Fase Estacionária)			
	0,5	0,6	1,0	2,0	0,5	0,6	1,0	2,0
<b>Flavona 1</b>	+	N	+	-	+	+	+	-
<b>Limonina</b>	N	N	N	-	+	+	+	-
<b>Xantiletina</b>	+	+	+	-	+	+	-	-
<b>Seselina</b>	+	+	+	-	+	+	-	-

+: Redução do crescimento, visualização de colônias isoladas; +\*: Redução quase total de crescimento; -: Não cresceu bactéria; N: não determinado.

Pode-se verificar que os resultados são relativamente próximos e que, portanto não há diferenças discrepantes entre as duas fases. No entanto, é mais interessante realizar os ensaios com a Fase Exponencial, já que o tempo necessário

para que a bactéria atinja esta fase é menor (5 dias) do que o necessário para atingir o início da Fase Estacionária (10 dias), ou seja, consegue-se fazer um número maior de ensaios em um tempo menor, o que torna o experimento mais prático. A partir destes dados começou-se a realizar os experimentos utilizando-se apenas a Fase Exponencial.

#### 4.1.2.1.3. Ensaio contra a *Xylella fastidiosa* na Fase Exponencial

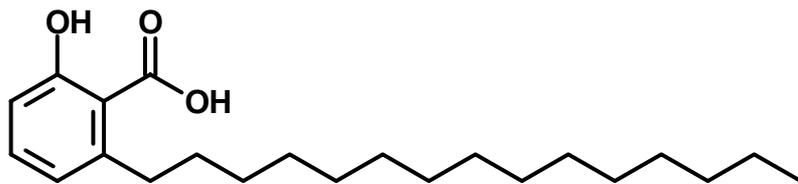
Continuou-se os ensaios com diferentes substâncias visando obter compostos cada vez mais potentes, por isto utilizou-se uma ampla variedade das mesmas pertencentes a diversas classes, como cumarinas, flavonóides, limonóides, porém todas isoladas de diferentes plantas da família Rutaceae, uma vez que esta família possui uma gama de compostos com atividades biológicas. Realizou-se ensaios com substâncias: Odoratol (ODL), Azadirachtina (AZ), Hesperidina (HS), Ácido Anacárdico (AC), Rauianina (RAU), 3'-(1',1'-dimetilalil)-isoescopoletina (C1), metiléter-graveliferona (C2), 7,8,3',4'-tetrametóxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano)flavona (FLA2), Catequina (CAT), Gedunina (GED) e Odoratona (ODN). O resultado obtido está ilustrado na Tabela 4.5.

TABELA 4.5: Colônias observadas nas diferentes concentrações de substâncias ensaiadas contra *X. fastidiosa* na Fase Exponencial.

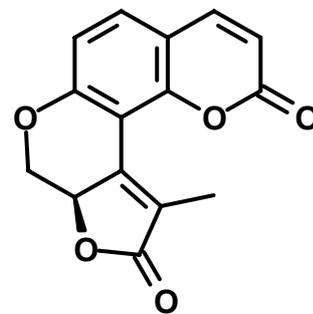
C mg/mL	ODL	AZ	HS	AC	RAU	C1	C2	FLA2	CAT	GED	ODN
0,4	+	+	+	X	+	+	+	+	N	+	N
1,0	+	N	N	X	+	+	+	+	-	+	+
1,1	X	X	X	X	X	X	X	X	-	+	-
1,2	X	X	X	X	+	X	X	+	-	+	-
1,3	X	X	X	X	+	X	X	-	N	-	-
1,4	X	X	X	X	+	X	X	N	-	-	-
1,5	X	X	X	X	-	X	X	X	X	-	-
1,6	-	+	+	+	-	+	N	-	-	-	-
1,7	-	X	+	-	X	X	X	X	X	X	X
1,8	N	X	N	N	X	X	X	X	X	X	X
2,0	-	X	-	N	-	+	N	-	-	-	-

+: Redução do crescimento, visualização de colônias isoladas; +: Redução quase total de crescimento; -: Não cresceu bactéria; N: não determinado, X: não foi realizado experimento.

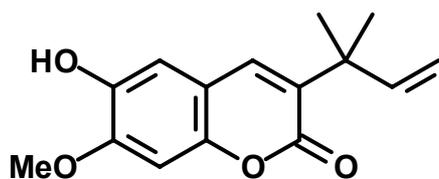
Com estes experimentos, determinou-se a MIC de algumas substâncias e verificou-se para outras que a MIC está muito maior que a última concentração ensaiada (Figura 4.7), não sendo interessante determiná-lo, pois deseja-se obter MIC cada vez menores, ou seja, substâncias com maiores potenciais de inibição contra *X. fastidiosa*.



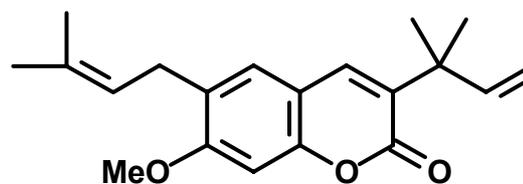
Ácido Anacárdico: MIC = 1,7 mg/mL



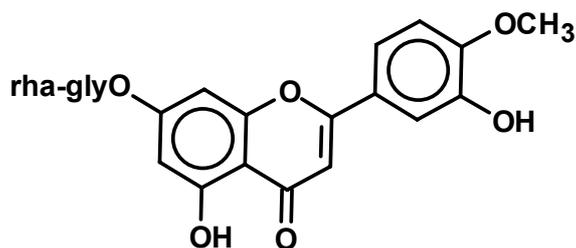
Raunina: MIC = 1,5 mg/mL



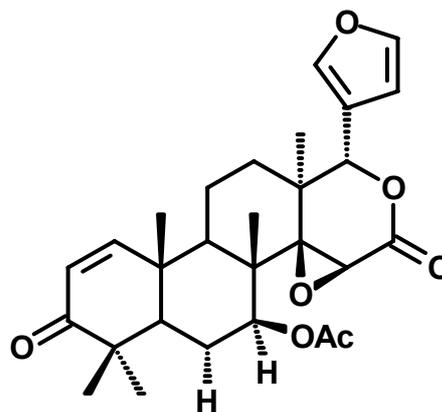
C1: MIC = 2,0 mg/mL



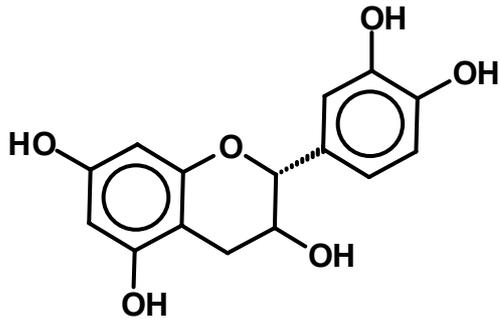
C2: MIC = 2,0 mg/mL



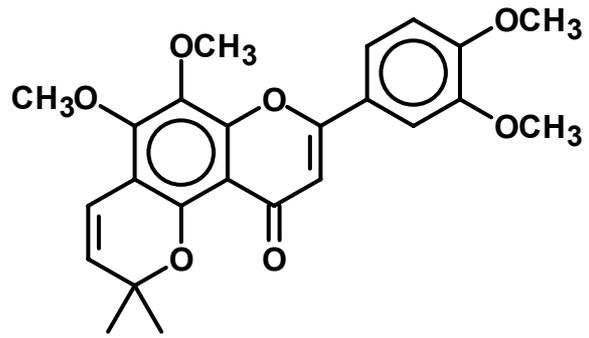
Hesperidina: MIC = 2,0 mg/mL



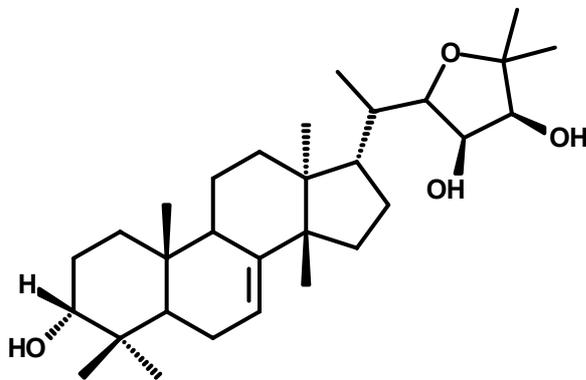
Gedunina: MIC = 1,3 mg/mL



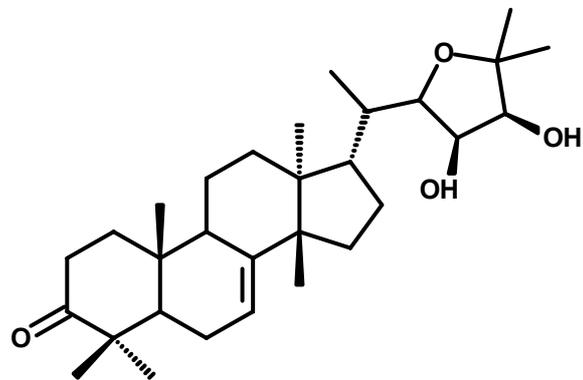
Catequina: MIC = 1,0 mg/mL



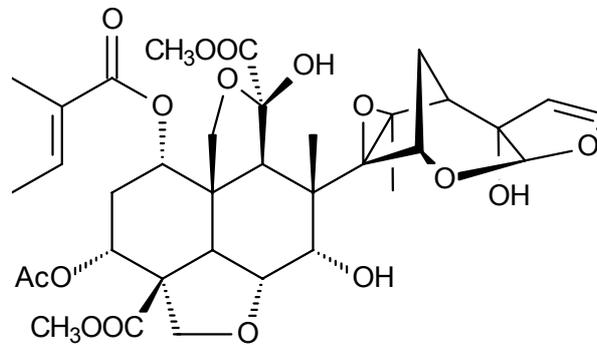
Flavona 2: MIC = 1,3 mg/mL



Odorotol: MIC = 1,8 mg/mL



Odoratona: MIC = 1,1 mg/mL



Azadirachtina: MIC >> 1,6 mg/mL

FIGURA 4.7: MIC do Ácido Anacárdico, Rauanina, 3'-(1',1'-dimetilalil)-isoescopoletina (C1), metiléter-graveliferona (C2), Hesperidina, Odorotol, Catequina, 7,8,3',4'-tetrametóxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano) flavona (Flavona 2), Gedunina, Odoratona, Azadirachtina, ensaiadas contra a *X. fastidiosa* na Fase Exponencial.

Ao total foram determinados as MICs de 15 substâncias, todos estão listados em ordem crescente na Tabela 4.6. As substâncias que apresentaram uma menor MIC, ou seja, um maior potencial inibitório foram a Xantiletina e a Catequina.

TABELA 4.6: MICs das substâncias ensaiadas frente a *X. fastidiosa*.

Substância Ensiada	MIC (mg/mL)
Xantiletina	1,0
Catequina	1,0
Odoratona	1,1
Gedunina	1,3
7,8,3',4'-tetrametóxi-6,5-(2'',2''-dimetilpirano) flavona	1,3
Seselina	1,4
3',4',5',5,7-pentametoxiflavona	1,4
Raunina	1,5
Limonina	1,6
Ácido Jasmônico	1,7
Odoratol	1,8
Hesperidina	2,0
3'-(1',1'-dimetilalil)-isoescopoletina	> 2,0
Metiléter-graveliferona	> 2,0
Azadirachtina	>> 1,6

## 4.2. Ensaio biológico de inibição da enzima Xylellaina

O genoma completo da *X. fastidiosa* foi publicado recentemente (SIMPSON *et al.*, 2000). Analisando o genoma pose-se identificar um gene que codifica uma, ainda não caracterizada, cisteína protease (MW de aprox. 30 kDa), similar à papaína, talvez envolvida na patogenicidade da *X. fastidiosa*. A expressão recombinante e purificação desta proteína, a qual denominou-se “Xylellaina”, foram realizadas no laboratório de Biologia da UFSCar (Figura 4.8). Testes de atividade utilizando substratos fluorescentes e inibidores específicos para cisteína proteases foram realizados e mostraram que a proteína é realmente uma cisteína protease. A Xylellaina recombinante é mais ativa em pHs ácidos, dependente de Dithioerythritol (DTE) ou Dithiothreito (DTT) e foi eficientemente inibida por E-64 e cistatinas. Desde que cisteína proteases são utilizadas por patógenos para invasão de plantas, talvez a inibição da Xylellaina possa ser uma boa opção para prevenir a invasão da planta pela *X. fastidiosa*.

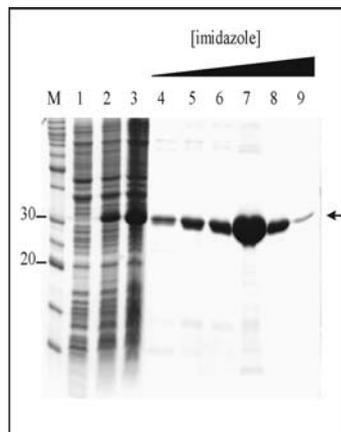


FIGURA 4.8: Análise da expressão e purificação da proteína Xylellaina em *E. coli*: Purificação da Xylellaina por cromatografia de afinidade em resina de níquel. A seta indica a proteína expressa.

Foram realizados alguns ensaios de compostos naturais contra a Xylellaina e verificou-se que a cumarina Xantiletina, a qual é encontrada em grande quantidade nas raízes de *C. limonia*, inibiu a atividade da enzima em 80% a uma concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$ . A pirano cumarina angular 5-metóxi-seselina mostrou-se um pouco menos ativa, inibindo a atividade da enzima em 70% a uma concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ . A isopimpinellina, mostrou-se um inibidor fraco, com um valor de 40% a uma concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 4.9).

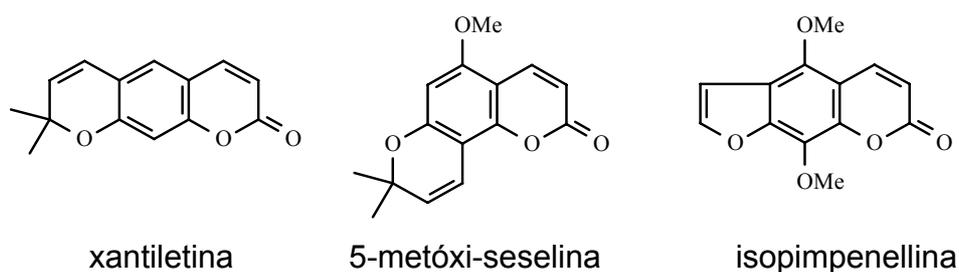


FIGURA 4.9: Algumas das substâncias ensaiadas frente a enzima Xylellaina.

Estes resultados indicam que as cumarinas, principalmente as piranocumarinas, possuem uma boa atividade frente a enzima da *X. fastidiosa*, e isto também foi observado nos ensaios realizados frente a bactéria, onde esta classe de substâncias foram as que apresentaram um melhor potencial inibitório. A cumarina Xantiletina foi a substância ensaiada que apresentou maior potencial inibitório frente a bactéria *X. fastidiosa* e sua enzima Xylellaina.

**5. CAPÍTULO 3:**

**INTERAÇÃO PLANTA –**

***XYLELLA FASTIDIOSA –***

***ONCOMETOPIA FACIALIS***

---

## 5.1 Experimento Interação Planta - Cigarrinha

O estudo da interação Planta - Cigarrinha foi realizado a partir de plantas enxertadas *C. sinensis* sobre *C. limonia* e cigarrinhas da espécie *Oncometopia facialis*, uma vez que estas plantas são suscetíveis a CVC e estas cigarrinhas são transmissores da doença.

### 5.1.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento consistiu na análise dos óleos essenciais e dos constituintes voláteis da planta com e sem a presença de cigarrinhas para verificar se haveria uma resposta química da planta frente ao vetor da *X. fastidiosa*. Foram feitas três condições diferentes de análise:

- **condição 1** – planta sem ter sido submetida às cigarrinhas
- **condição 2** – planta com cigarrinhas
- **condição 3** – planta após removida as cigarrinhas

Realizou-se o seguinte experimento em triplicata, para maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados:

Partiu-se de 6 amostras de plantas enxertadas;

Extraíu-se os óleos essenciais de três plantas (a1, a2 e a3);

Extraíu-se os constituintes voláteis das outras três (b1, b2 e b3);

Colocou-se as cigarrinhas em contato com estas três últimas (b1, b2 e b3) e extraíu-se os voláteis em diferentes intervalos de tempo, visando observar se o tempo de permanência das cigarrinhas altera os voláteis da planta:

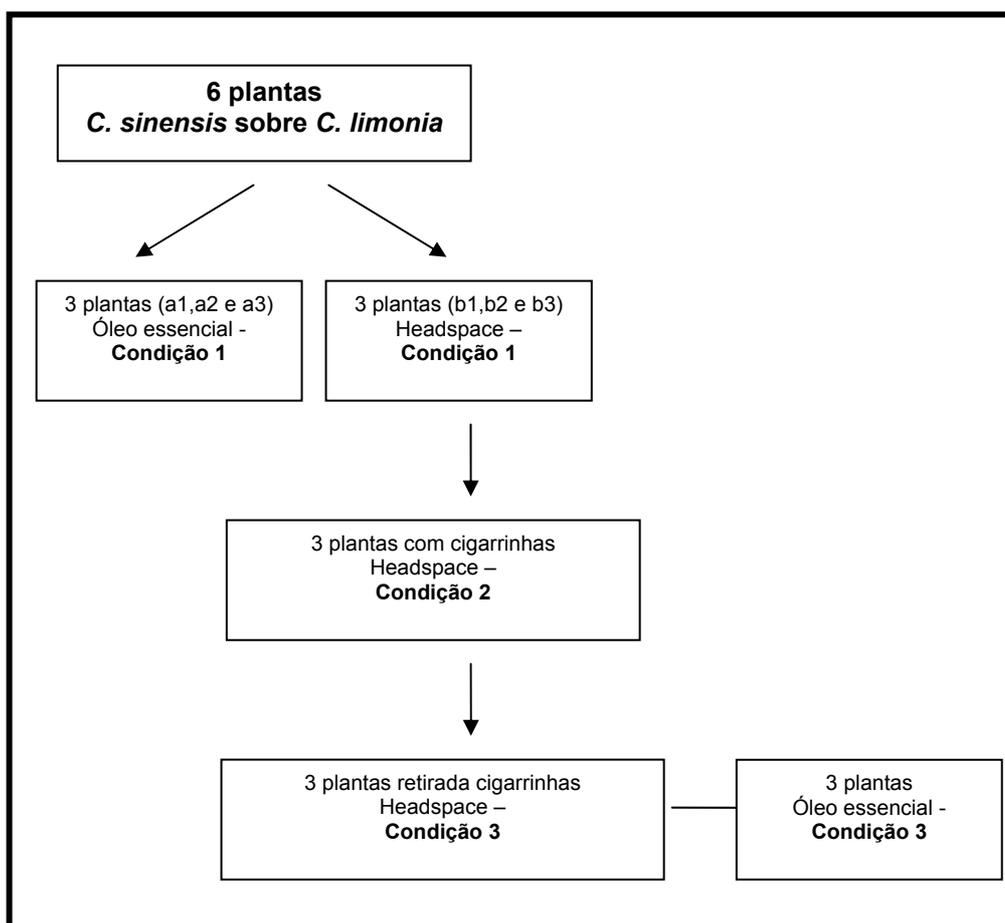
- **condição 2a:** Extração logo após a inserção das cigarrinhas
- **condição 2b:** Extração 24 horas após a inserção das cigarrinhas
- **condição 2c:** Extração 48 horas após a inserção das cigarrinhas

Removeu-se as cigarrinhas destas três plantas (b1, b2 e b3), extraíu-se os voláteis em diferentes intervalos de tempo:

- **condição 3a:** Extração logo após a remoção das cigarrinhas
- **condição 3b:** Extração 24 horas após a remoção das cigarrinhas
- **condição 3c:** Extração 48 horas após a remoção das cigarrinhas

Por fim, extraiu-se os óleos essenciais das plantas (b1, b2 e b3), após 24 horas da última extração dos voláteis, ou seja, 72 horas após a remoção das cigarrinhas.

ESQUEMA 5.1: Etapas desenvolvidas no experimento interação planta-cigarrinha.



Para a realização da extração dos voláteis foi necessário, inicialmente, determinar a condição ideal de análise. Portanto, otimizou-se alguns parâmetros, como a fibra ideal para a extração dos voláteis, o tempo ideal de exposição da mesma e a injeção de hidrocarbonetos conhecidos para posterior identificação dos compostos.

### 5.1.1.1. Determinação da Fibra Ideal

Foram testadas três tipos de fibra: CW/DVB – Carbowax Divinilbenzeno 65  $\mu\text{m}$  (laranja), PDMS/DVB – Polimetilsiloxano Divinilbenzeno 65  $\mu\text{m}$  (azul), e CAR/PDMS - Carboxen Polimetilsiloxano 75  $\mu\text{m}$  (preta). Condicionou-as antes de iniciar o experimento em um cromatógrafo a gás utilizando condições específicas catalogadas para cada fibra (Tabela 5.1).

TABELA 5.1: Condições de condicionamento para as fibras utilizadas.

Fibra*	T injetor ( $^{\circ}\text{C}$ )	T coluna ( $^{\circ}\text{C}$ )	T detector ( $^{\circ}\text{C}$ )	t condicionamento (min)
CAR/PDMS	250	260	270	100
CW/DVB	220	260	270	30
PDMS/DVB	250	260	270	30

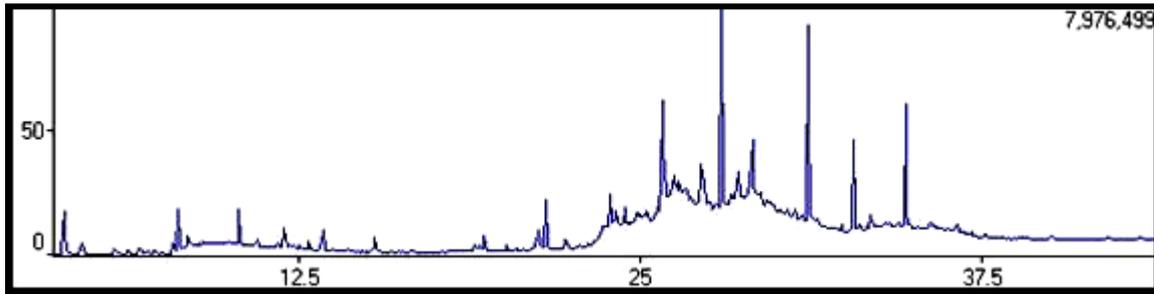
\* Supelco.

Inseriu-se as três fibras em um sistema fechado contendo três plantas enxertadas, e deixou-se expostas por sete horas. Após este período, injetou-se as fibras diretamente em um Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM), aparelho Shimadzu QP 5000, sob as seguintes condições:

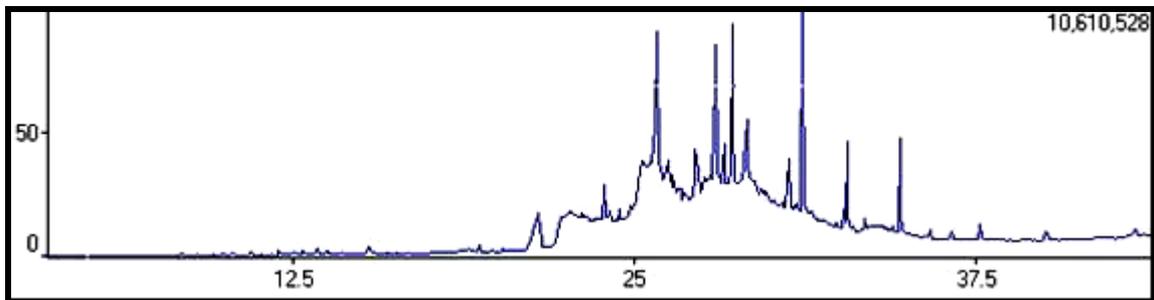
- temperatura do injetor: 250 $^{\circ}\text{C}$ ;
- temperatura do detector: 280 $^{\circ}\text{C}$ ;
- coluna: DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu\text{m}$ );
- rampa: 50/3-5/150/10/260/10;
- pressão da cabeça da coluna: 100 kPa;
- fluxo de gás: 1,6 mL/min (à 60 $^{\circ}\text{C}$ );
- tempo entre as varreduras: 0,50 s;
- intervalo de massas: 40,5 a 500 uma;

Os cromatogramas obtidos para as diferentes fibras estão apresentados a seguir (Figura 5.1, p. 179).

- PDMS/DVB (Fibra Azul)



- CW/DVB (Fibra Laranja)



- CAR/PDMS (Fibra Preta)

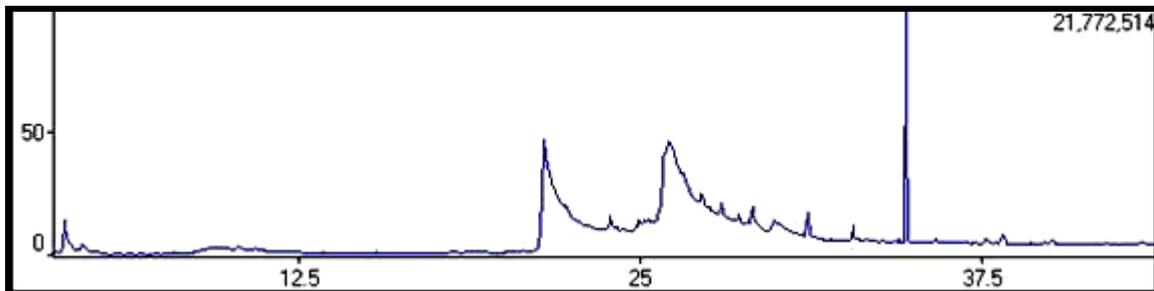


FIGURA 5.1: Cromatogramas das fibras PDMS/DVB, CW/DVB e CAR/PDMS quando expostas durante sete horas a plantas enxertadas *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

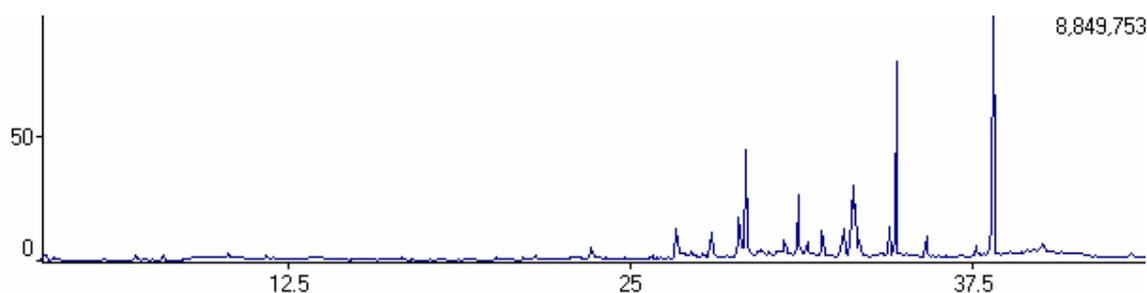
Observando-se os três cromatogramas, verifica-se que a fibra CAR/PDMS foi a que apresentou uma pior adsorção dos compostos e o cromatograma encontrou-se com péssima resolução. As fibras PDMS/DVB e CW/DVB apresentaram cromatogramas muito similares, no entanto, a fibra laranja adsorveu poucos compostos com tempo de retenção abaixo de 20 minutos. Portanto, determinou-se a

fibra PDMS/DVB como ideal para este experimento, pois esta adsorveu um número maior de compostos voláteis quando comparada às outras nas mesmas condições.

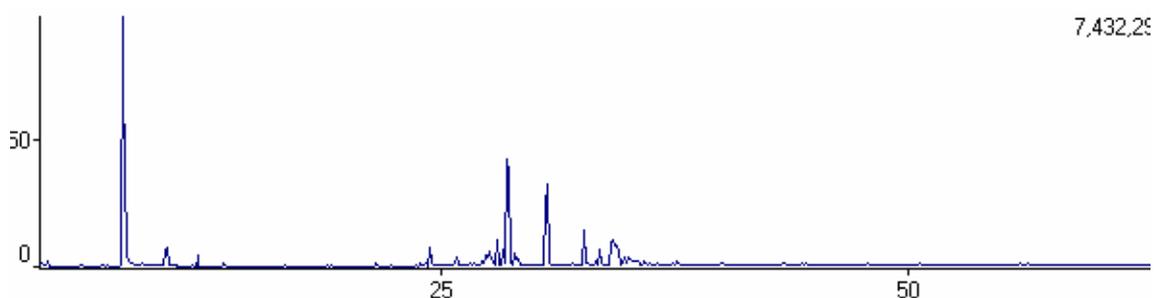
### 5.1.1.2. Determinação do Tempo de Exposição Ideal

Utilizando-se a fibra ideal, PDMS/DVB, variou-se o tempo de exposição da mesma, em um sistema fechado contendo três plantas para a verificação de um tempo ideal para o experimento. Os tempos de exposição testados para a fibra foram 1, 3, 6, 9, 10, 12, 14, 18, 22 e 24 horas. As fibras foram injetadas diretamente em um CG-EM sob as mesmas condições utilizadas anteriormente (Seção 5.1.1.1, p. 177). Os cromatogramas obtidos estão indicados a seguir.

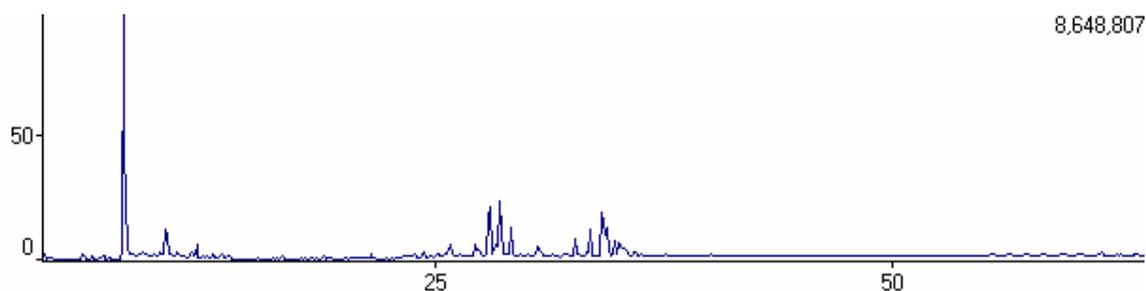
#### 1 hora



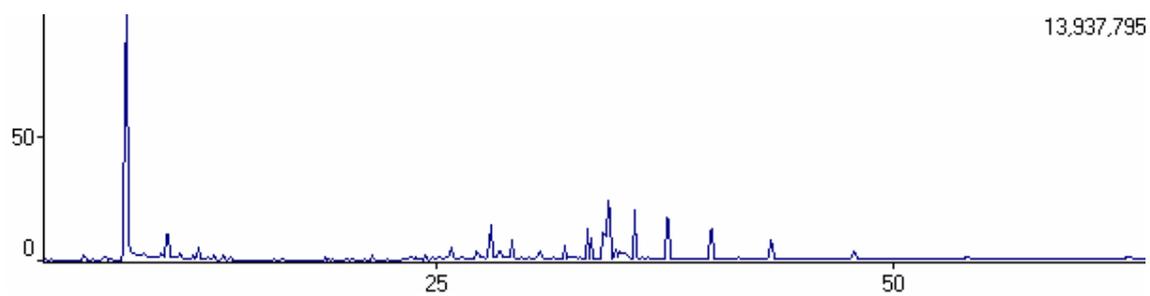
#### 3 horas



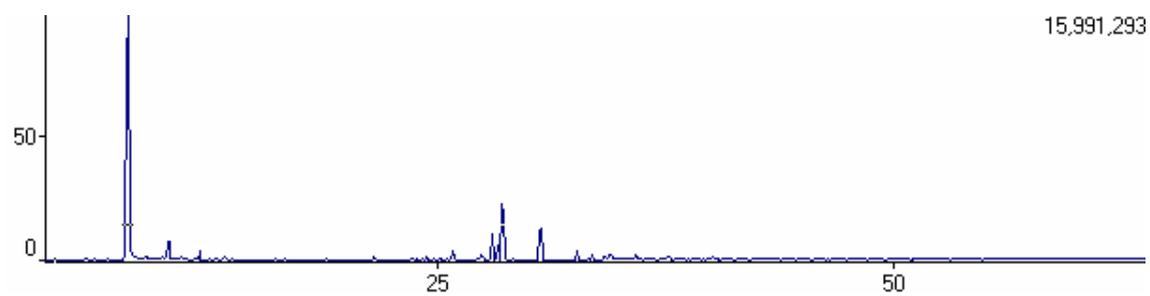
#### 6 horas



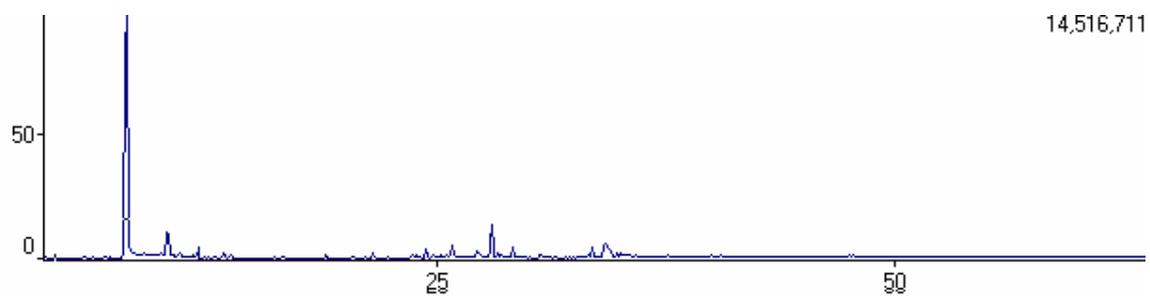
9 horas



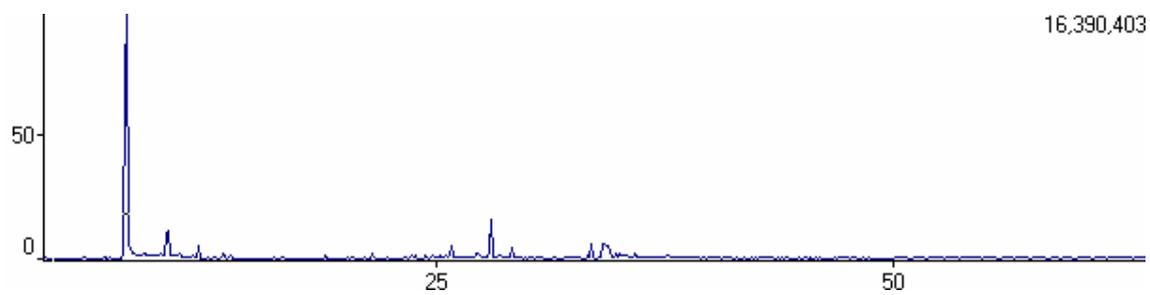
10 horas



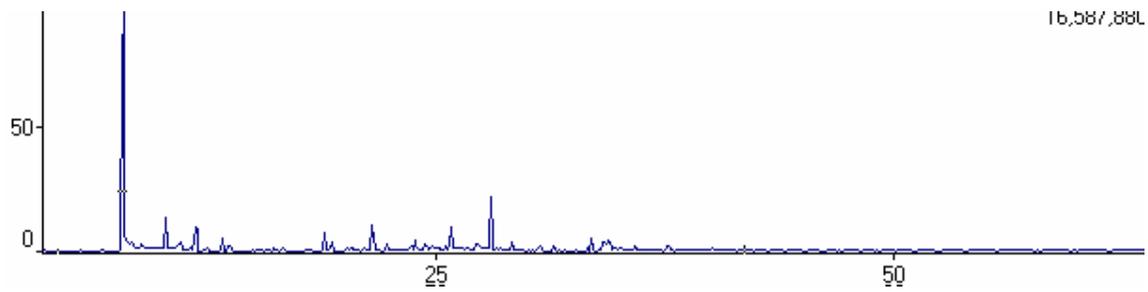
12 horas



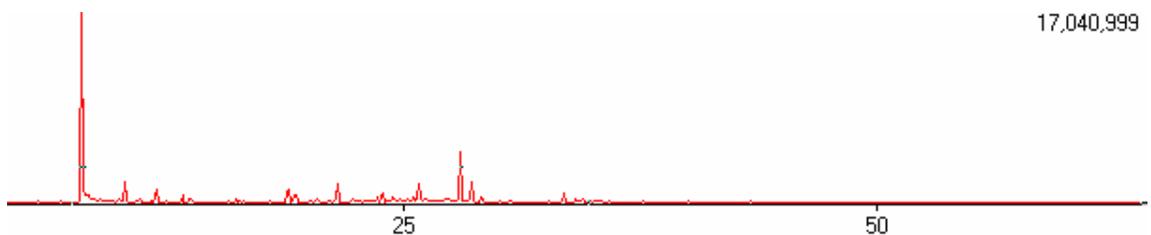
14 horas



18 horas



22 horas



24 horas

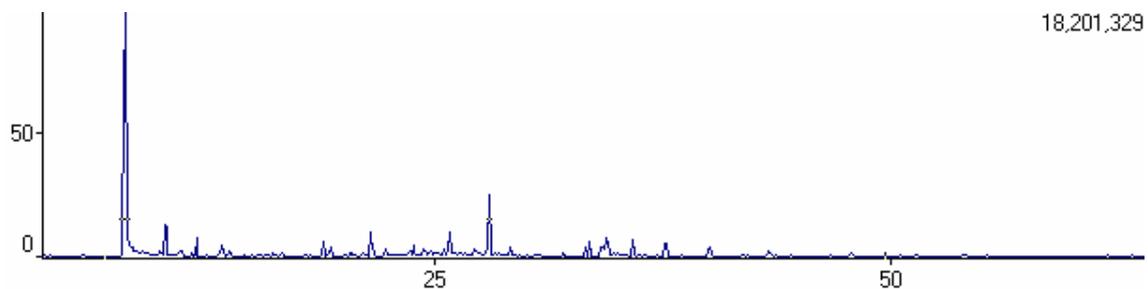


FIGURA 5.2: Cromatogramas da fibra PDMS/DVB quando expostas a plantas enxertadas *C. sinensis* sobre *C. limonia* em diferentes tempos.

Verificou-se que para estas condições empregadas, o tempo de exposição de 3 horas é o tempo ideal, uma vez que a partir deste a fibra começa a ficar saturada, não apresentando uma grande alteração nos constituintes adsorvidos e detectados. Além disto, o interesse é identificar os compostos mais voláteis, e, portanto, os que são liberados primeiramente pela planta, e com isto muitas horas de adsorção não são satisfatórias para o experimento.

### 5.1.1.3. Determinação do tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos

Injetou-se uma série de hidrocarbonetos conhecidos, C9/10/12/14/16/18/20/22/24/26/28, para posterior identificação dos compostos, a partir do cálculo do Índice de Kovats. Foram realizados dois tipos de injeção:

- Injeção da mistura de hidrocarbonetos por meio de uma seringa para posterior identificação dos óleos essenciais.
- Injeção da fibra (HS-SPME) contendo a mistura de hidrocarbonetos para posterior identificação dos voláteis.

Realizou-se estes dois procedimentos de injeção para a obtenção de resultados mais exatos, uma vez que esperava-se que o tempo de retenção dos hidrocarbonetos deveria ser diferente quando injetados diretamente ou quando injetados pela fibra. Pois, neste último caso, além dos compostos precisarem volatilizar no CG para serem analisados por EM, é necessário primeiramente a desorção dos compostos da fibra. No entanto, quando se injeta diretamente pela seringa deve-se considerar que o tempo para a volatilização dos compostos é maior devido à presença de solventes, no entanto no caso dos compostos presentes na fibra, estes encontram-se livres de solvente. Devido a estes fatores, não é possível prever em qual dos dois modos de injeções os compostos terão maior ou menor tempo de retenção.

A seguir, encontram-se os cromatogramas para ambas injeções e a tabela com os tempos de retenção dos picos e os hidrocarbonetos correspondentes.

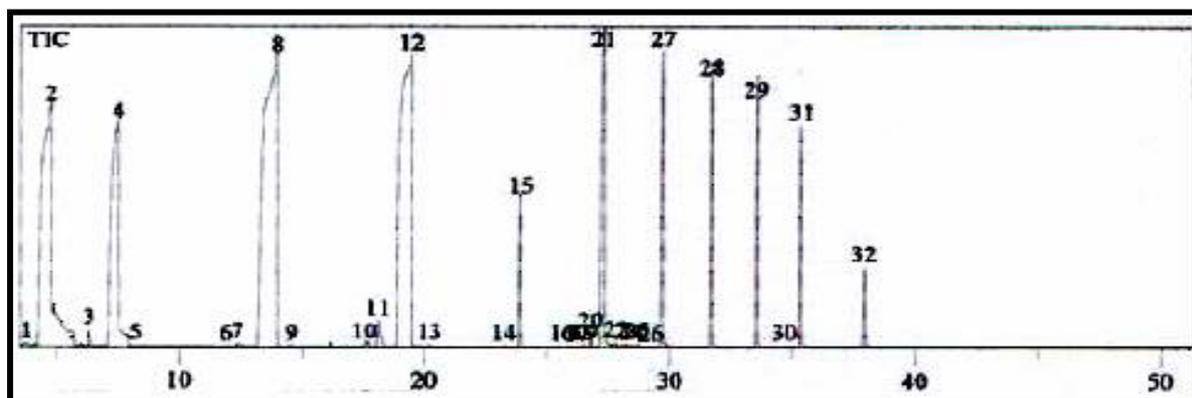


FIGURA 5.3: Cromatograma dos hidrocarbonetos injetados diretamente por seringa.

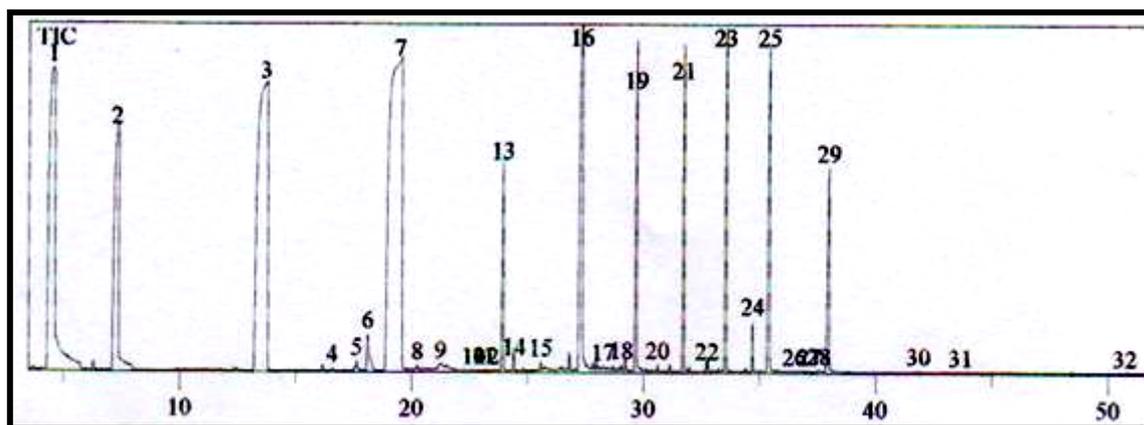


FIGURA 5.4: Cromatograma dos hidrocarbonetos injetados após serem adsorvidos pela fibra PDMS/DVB.

TABELA 5.2: Número de carbonos de cada hidrocarboneto e seus respectivos tempos de retenção obtidos a partir da injeção por seringa e por fibra (PDMS/DVB).

Número de Carbonos	Tempo de retenção (min.) injeção seringa	Tempo de retenção (min.) injeção fibra
9	4,762	4,542
10	7,510	7,297
12	13,992	13,701
14	19,459	19,477
16	23,906	23,929
18	27,294	27,297
20	29,692	29,662
22	31,704	31,700
24	33,511	33,524
26	35,356	35,400
28	37,907	37,967

A partir dos resultados pode-se observar que não há uma linearidade nos resultados, ou seja, não se pode afirmar que quando há injeção por um tipo específico, os tempos se deslocam para um mesmo sentido, isto é devido ao tamanho das moléculas de cada hidrocarboneto ser variável. Para moléculas pequenas, as quais são mais voláteis, o tempo de desorção da fibra é menor que o tempo para volatilização do solvente, gerando tempos de retenção menores. Já para

moléculas maiores, o tempo de desorção da fibra é maior que a volatilização do solvente, resultando assim em tempos de retenção maiores. Com isto, há uma variação nos tempos de retenção obtidos nas diferentes injeções, e, portanto os resultados tornam-se mais exatos e precisos quando se utiliza os hidrocarbonetos extraídos e injetados nas mesmas condições que os compostos analisados.

#### 5.1.1.4. Extração e Identificação dos Compostos Voláteis

Determinada as condições ideais para a fibra, iniciou-se a extração e identificação dos voláteis da planta para cada condição estipulada: condição 1, 2 e 3, respectivamente. Realizou-se a extração dos compostos voláteis a partir da inserção de fibra de Carboxen Polimetilsiloxano (CAR/PDMS) com poros de 75µm, em um sistema fechado, o qual continha a planta enxertada (Figura 5.5a), sob as diferentes condições. Os voláteis foram extraídos em triplicata para cada condição e o sistema onde foram inseridas as fibras continha três amostras de plantas enxertadas, para que se obtivesse um resultado populacional e não único.

Deixou-se a fibra neste sistema por 3 horas, e então a injetou em um CG-EM (Figura 5.5b), com as mesmas condições descritas anteriormente (Seção 5.1.1.1, p. 177). Em seguida, injetou-se uma série de hidrocarbonetos conhecidos extraídos também por HS-SPME, porém utilizando um sistema minimizado. Calculou-se o Índice de Kovats para cada pico presente em cada cromatograma e comparou-se os espectros de massas dos mesmos com a literatura; a partir destes dados em conjunto, determinou-se os constituintes voláteis para cada condição estipulada.

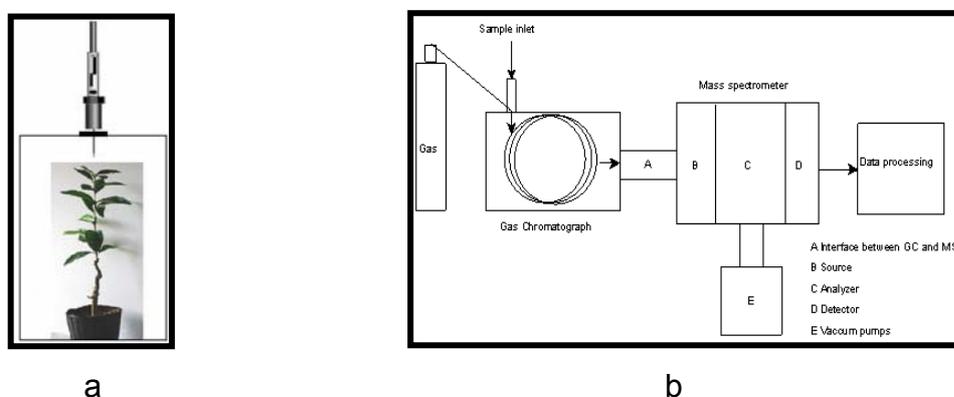


FIGURA 5.5: a: Sistema utilizado para extração de voláteis: cuba e fibra; b: CG-EM utilizado para análise dos voláteis extraídos.

### 5.1.1.5. Extração e Identificação dos Óleos Essenciais

Extraíu-se os óleos essenciais das folhas das plantas, submetidas nas condições 1 e 3, respectivamente, a partir da técnica de extração por arraste a vapor d'água, utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado (Figura 5.6). Inicialmente, montou-se o sistema de extração com o aparelho tipo Clevenger, uma manta de aquecimento e um balão de 500 mL de duas bocas. Em uma das saídas do balão, adaptou-se um termômetro e uma rolha, para que a temperatura fosse controlada e mantida a 100<sup>o</sup>C. Adicionou-se água destilada até a metade do balão, ou seja, até o nível da manta, e 10 g de folhas previamente picadas. Antes de começar a aquecer o sistema, adicionou-se éter de petróleo no extrator para que todo composto volatilizado permanecesse miscível ao óleo e não retornasse ao balão e nem saísse do sistema, para evitar a perda do mesmo. O sistema foi mantido em refluxo a 100<sup>o</sup>C por uma hora. Após coletado, o óleo foi mantido em um congelador para que não houvesse evaporação do mesmo.

Extraídos os óleos, injetou-se cada um separadamente no CG-EM, sob as mesmas condições citadas anteriormente (seção 5.1.1.1, p.177). Injetou-se, também, uma série de hidrocarbonetos conhecidos. A partir do cálculo do Índice de Kovats de cada pico presente em cada cromatograma e da comparação dos espectros de massas dos mesmos com a literatura, determinou-se os constituintes químicos de cada óleo essencial extraído nas diferentes condições realizadas.

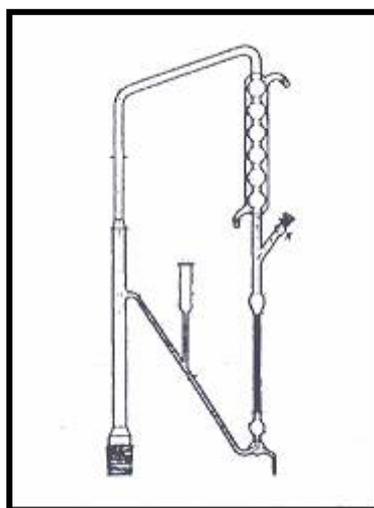


FIGURA 5.6: Sistema utilizado para extração de óleos essenciais por arraste a vapor: Aparelho tipo Clevenger modificado.

## 5.2.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2.1.1. Compostos voláteis obtidos do *C. sinensis* sobre *C. limonia*

A seguir encontram-se os tempos de retenção dos picos observados nos cromatogramas obtidos pelas extrações dos voláteis nas diferentes condições. Obteve-se a média dos tempos das replicatas, e aplicou-se a equação de Van Den Dool e Kratz, que considera o tempo de retenção de cada composto, e os tempos de retenção e os números de carbono dos hidrocarbonetos injetados no CG:

$$IR = 100 \cdot N \cdot \frac{(t_x - t_{n-1})}{(t_n - t_{n-1})} + 100 \cdot C_{n-1}$$

IR = índice de retenção de Kovats

$N = C_n - C_{n-1}$

$C_n$  = número de carbonos do n-alcano que elui após a substância analisada

$C_{n-1}$  = número de carbonos do n-alcano que elui antes a substância analisada

$t_x$  = tempo de retenção da substância analisada

$t_n$  = tempo de retenção do n-alcano que elui após a substância analisada

$t_{n-1}$  = tempo de retenção do n-alcano que elui antes da substância analisada

Com isto, determinou-se o índice de retenção de Kovats para cada pico. Os compostos foram identificados, comparando-se seu índice e seu espectro de massa com a literatura (ADAMS, 2001).

#### 5.2.1.1.1 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem ter sido submetida às cigarrinhas

Realizou-se o experimento de extração dos voláteis do *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem ter sido submetida às cigarrinhas por HS-SPME, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.3. Compostos voláteis identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem ter sido submetido às cigarrinhas.

tr 1(3h2)	tr 1(3h3)	tr 1(3h4)	tr M	IR M	IR*	Composto
5,762	5,771	5,766	5,766	944	ni	ni
6,917	6,926	6,918	6,920	986	ni	ni
7,209	7,224	7,225	7,219	997	1002	( $\Delta$ -2)-careno
8,021	8,027	8,027	8,025	1023	ni	ni
9,125	9,932	9,033	9,363	1065	1065	Acetofenona
9,985	9,998	9,991	9,991	1084	ni	ni
10,313	10,326	10,319	10,319	1094	1101	Nonanal (n)
10,896	-	10,908	10,902	1113	1122	Ácido etil hexanóico
11,688	11,688	11,688	11,688	1137	ni	ni
11,992	12,017	12,002	12,004	1147	1162	Nonen-1-al (2Z)
13,396	-	13,403	13,400	1191	1202	Decanal-dn
13,754	-	13,766	13,760	1202	ni	ni
-	-	16,173	16,173	1286	1300	Tridecano (n)
16,631	16,637	16,632	16,633	1301	ni	ni
18,921	18,93	18,931	18,927	1381	1400	Tetradecano (n)
19,126	19,342	19,137	19,202	1390	1409	Dodecanal
21,547	21,552	21,553	21,551	1493	1516	Tridecanona (2)
23,639	23,644	23,645	23,643	1587	ni	ni
23,913	23,917	23,914	23,915	1599	1600	Hexadecano (n)
24,149	-	24,149	24,149	1613	ni	ni
24,423	24,434	24,382	24,413	1629	ni	ni
24,846	24,851	24,796	24,831	1654	ni	ni
25,263	25,267	25,275	25,268	1680	ni	ni
25,826	25,753	25,832	25,804	1711	ni	ni
-	27,233	27,231	27,232	1796	1800	Octadecano (n)
27,45	27,567	27,452	27,490	1816	1774	Pentadecanol (n)
27,993	27,995	27,988	27,992	1859	ni	ni
28,3	28,342	28,302	28,315	1886	ni	ni
28,583	28,509	28,585	28,559	1907	ni	ni

TABELA 5.3. Compostos voláteis identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem ter sido submetido às cigarrinhas - Continuação.

28,992	29,153	29,145	29,097	1952	ni	ni
30,654	30,786	30,662	30,701	2102	ni	ni
32,042	32,028	32,028	32,033	2237	ni	ni
32,681	-	32,684	32,683	2308	ni	ni
33,272	33,292	-	33,282	2373	ni	ni
33,466	33,477	33,468	33,470	2394	ni	ni
34,124	34,135	34,133	34,131	2465	ni	ni
34,266	34,277	34,271	34,271	2480	ni	ni
34,458	34,461	34,463	34,461	2500	ni	ni
34,853	34,86	34,875	34,863	2543	ni	ni
35,081	35,085	35,084	35,083	2566	ni	ni
35,269	35,278	-	35,273	2586	ni	ni
35,376	-	35,381	35,378	2598	ni	ni
-	35,517	35,508	35,513	2609	ni	ni
35,865	35,878	35,871	35,871	2637	ni	ni
37,658	37,669	37,672	37,666	2777	ni	ni

Tempo de retenção (tr); Tempo de retenção médio (tr M); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats de ADAMS, 2001 (IR<sup>\*</sup>). 1(3h2) – Experimento realizado sem cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a primeira replicata; 1(3h3) – Experimento realizado sem cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a segunda replicata; 1(3h4) – Experimento realizado sem cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a terceira replicata; ni- não identificados.

No total detectou-se 45 compostos, no entanto, identificou-se apenas 13 compostos, uma vez que alguns deles não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura. Comparou-se todos os espectros de massas obtidos nos experimentos em triplicata e todos foram semelhantes, independente dos compostos terem sido identificados ou não, ou seja, os constituintes voláteis presentes na planta enxertada planta sem ter sido submetida às cigarrinhas são estes apresentados, porém alguns não estão descritos na literatura.

O número de compostos não identificados foi relativamente alto, pois o livro utilizado para a comparação do índice de Kovats e os espectros de massa (Adams, 2001) foi elaborado para identificação de compostos presentes em óleos essenciais e não para compostos mais voláteis como foi o caso deste experimento. É esperado que os compostos voláteis sejam diferentes dos presentes em óleos essenciais. Esta observação repetiu-se em todos os experimentos com voláteis.

### 5.2.1.1.2 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* com cigarrinhas

A extração dos voláteis das plantas foi realizada com *C. sinensis* sobre *C. limonia* com cigarrinhas, 0 horas, 24 horas e 48 horas após a inserção das mesmas.

#### 5.2.1.1.2.1 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* logo após a inserção das cigarrinhas

Realizou-se o experimento de extração dos voláteis do *C. sinensis* sobre *C. limonia* 0 horas após a presença das cigarrinhas por HS-SPME, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.4: Compostos voláteis identificados na planta 0h após a inserção das cigarrinhas.

tr2a(3h2)	tr2a(3h3)	tr2a(3h4)	tr M	IR M	IR*	Composto
4,562	4,557	4,556	4,558	901	909	Butilpropanoato
4,975	4,971	4,967	4,971	916	ni	ni
5,757	5,752	5,748	5,752	944	ni	ni
6,243	6,236	6,234	6,238	962	975	Sabineno
6,921	6,907	6,905	6,911	986	ni	ni
7,21	7,285	7,282	7,259	999	1002	$\Delta$ -2-Careno
8,004	7,997	7,996	7,999	1022	ni	ni
8,455	8,454	8,451	8,453	1036	ni	ni

TABELA 5.4: Compostos voláteis identificados na planta 0h após a inserção das cigarrinhas - Continuação.

-	8,821	8,825	8,823	1048	ni	ni
9,98	9,983	9,98	9,981	1084	ni	ni
-	10,166	10,161	10,164	1090	ni	ni
10,304	10,306	10,303	10,304	1094	1101	Nonanal (n)
11,676	11,675	11,674	11,675	1137	ni	ni
11,992	11,994	11,991	11,992	1147	1149	Nonen-1-al (2Z)
12,517	12,525	12,517	12,520	1163	1181	Naftaleno
13,384	13,392	13,387	13,388	1190	1202	Decanal-dn
16,158	16,163	16,155	16,159	1285	1300	Tridecano (n)
-	16,619	16,618	16,619	1301	ni	ni
-	18,919	18,912	18,916	1381	1400	Tetradecano (n)
21,529	21,533	21,542	21,535	1492	1496	Tridecanona (2)
23,63	23,636	23,63	23,632	1587	ni	ni
23,917	23,906	23,909	23,911	1599	1600	Hexadecano (n)
24,427	24,43	24,431	24,429	1630	ni	ni
24,692	24,838	24,834	24,788	1651	ni	ni
-	25,825	25,82	25,823	1712	ni	ni
27,187	27,24	27,235	27,221	1795	1800	Octadecano (n)
27,974	27,994	27,987	27,985	1858	ni	ni
28,517	28,52	28,525	28,521	1904	1900	Nonadecano (n)
29,131	29,151	29,147	29,143	1956	ni	ni
33,292	33,272	33,269	33,278	2373	ni	ni
33,457	33,469	33,466	33,464	2393	ni	ni
34,146	34,133	34,129	34,136	2467	ni	ni
-	-	34,275	34,275	2482	ni	ni
34,467	34,46	34,458	34,462	2500	ni	ni
34,867	34,856	34,853	34,859	2542	ni	ni
35,075	35,078	35,077	35,077	2566	ni	ni
35,267	35,269	35,269	35,268	2586	ni	ni

TABELA 5.4: Compostos voláteis identificados na planta 0h após a inserção das cigarrinhas - Continuação.

-	35,500	35,483	35,491	2607	ni	ni
35,858	35,875	35,86	35,864	2636	ni	ni
37,656	37,663	37,654	37,658	2776	ni	ni

Tempo de retenção (tr); Tempo de retenção médio (tr M); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats ADAMS, 2001 (IR<sup>\*</sup>). 2a(3h2) – Experimento realizado 0 h após a inserção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a primeira replicata; 2a(3h3) – Experimento realizado 0 h após a inserção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a segunda replicata; 2a(3h4) – Experimento realizado 0 h após a inserção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a terceira replicata; ni- não identificados.

No total detectou-se 40 compostos, no entanto identificou-se apenas 13, uma vez que alguns deles não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura. Comparou-se todos os espectros de massas obtidos nos experimentos em triplicata e todos foram semelhantes, independente dos compostos terem sido identificados ou não.

#### **5.2.1.1.2 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a inserção das cigarrinhas**

Realizou-se o experimento de extração dos voláteis do *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a inserção das cigarrinhas por HS-SPME, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.5: Compostos voláteis identificados na planta 24 h após a inserção das cigarrinhas.

tr2b(3hi)	tr2b(3hii)	tr2b(3hiii)	tr M	IR M	IR*	Composto
4,568	4,563	4,57	4,567	901	901	Butilpropanoato
5,757	5,759	5,753	5,756	944	ni	ni
-	6,246	6,247	6,246	962	975	Sabineno
6,921	6,906	6,907	6,911	986	ni	ni
7,216	7,203	-	7,209	997	1002	$\Delta$ -2-Careno
8,003	7,999	7,999	8,000	1022	ni	ni
8,542	8,558	8,475	8,525	1038	ni	ni
9,989	9,992	9,988	9,990	1084	ni	ni
10,309	10,314	10,311	10,311	1094	1101	Nonanal
11,669	11,671	11,67	11,670	1137	ni	ni
12	12,008	12,003	12,004	1147	1149	Nonen-1-al (2Z)
-	13,402	13,4	13,401	1191	1202	Decanal-dn
-	-	16,172	16,172	1286	1300	Tridecano (n)
16,626	-	16,622	16,624	1301	ni	ni
18,919	18,922	18,919	18,920	1381	1400	Tetradecano (n)
21,539	21,535	21,537	21,537	1493	1496	Tridecanona (2)
23,632	23,575	23,634	23,614	1586	ni	ni
23,9	23,899	23,886	23,895	1598	1600	Hexadecano (n)
24,375	24,442	24,426	24,414	1629	ni	ni
24,838	-	24,858	24,848	1655	ni	ni
25,823	25,827	25,823	25,824	1713	ni	ni
27,23	27,238	27,236	27,235	1796	1800	Octadecano (n)
27,986	27,994	27,988	27,989	1859	ni	ni
28,514	28,521	28,584	28,540	1905	1900	Nonadecano (n)
29,145	29,153	29,149	29,149	1957	ni	ni
30,725	30,659	30,654	30,679	2100	ni	ni
32,633	32,683	32,684	32,667	2306	ni	ni
33,27	33,275	33,269	33,271	2372	ni	ni

TABELA 5.5: Compostos voláteis identificados na planta 24 h após a inserção das cigarrinhas – Continuação.

33,466	33,468	33,467	33,467	2394	ni	ni
34,124	34,133	34,125	34,127	2466	ni	ni
34,275	34,269	34,267	34,270	2482	ni	ni
34,455	34,458	34,457	34,457	2499	ni	ni
34,858	34,866	34,861	34,862	2543	ni	ni
35,145	35,089	35,08	35,105	2569	ni	ni
35,269	35,269	35,275	35,271	2586	ni	ni
35,408	35,418	35,492	35,439	2603	ni	ni
35,861	35,875	35,86	35,865	2636	ni	ni
37,662	-	37,639	37,651	2775	ni	ni

Tempo de retenção (tr); Tempo de retenção médio (tr M); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats ADAMS, 2001 (IR<sup>\*</sup>). 2b(3hi) – Experimento realizado 24 h após a inserção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a primeira replicata; 2b(3hii) – Experimento realizado 24 h após a inserção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a segunda replicata; 2b(3hiii) – Experimento realizado 24 h após a inserção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a terceira replicata; ni- não identificados.

No total detectou-se 38 compostos, no entanto identificou-se apenas 12, uma vez que alguns deles não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura. Comparou-se todos os espectros de massas obtidos nos experimentos em triplicata e todos foram semelhantes, independente dos compostos terem sido identificados ou não.

### 5.2.1.1.2.3 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a inserção das cigarrinhas

Realizou-se o experimento de extração dos voláteis do *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a inserção das cigarrinhas por HS-SPME, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.6: Compostos voláteis identificados na planta 48 h após a inserção das cigarrinhas.

tr2c(3hiv)	tr2c(3hvi)	tr M	IR M	IR*	Composto
4,592	-	4,592	902	909	Butilpropanoato
4,99	-	4,990	916	ni	Ni
5,819	5,753	5,786	945	ni	Ni
6,246	6,238	6,242	962	975	Sabineno
6,913	6,907	6,910	986	ni	Ni
7,295	7,288	7,292	1000	1002	$\Delta$ -2-careno
7,999	7,995	7,997	1022	ni	ni
8,535	8,531	8,533	1039	ni	ni
8,831	8,817	8,824	1048	ni	ni
9,991	9,99	9,991	1084	ni	ni
10,171	-	10,171	1090	ni	ni
10,325	10,313	10,319	1094	1101	Nonanal (n)
11,677	11,67	11,674	1137	ni	ni
12,008	12,011	12,010	1147	1149	Nonen-1-al (2Z)
13,401	13,406	13,404	1191	1202	Decanal-dn
16,175	-	16,175	1286	1300	Tridecano (n)
16,631	16,628	16,630	1301	ni	ni
18,927	-	18,927	1381	1400	Tetradecano (n)
21,529	21,528	21,529	1492	1496	Tridecanona (2)
23,634	23,637	23,636	1587	ni	ni
23,9	23,902	23,901	1599	1600	Hexadecano (n)
-	24,433	24,433	1630	ni	ni
24,839	-	24,839	1654	ni	ni
25,825	25,83	25,828	1713	ni	ni
27,224	-	27,224	1796	1800	Octadecano (n)
27,985	27,998	27,992	1859	ni	ni
28,502	-	28,502	1902	1900	Nonadecano (n)
29,14	29,155	29,148	1957	ni	ni
33,27	-	33,270	2372	ni	ni

TABELA 5.6: Compostos voláteis identificados na planta 48 h após a inserção das cigarrinhas - Continuação.

33,475	-	33,475	2395	ni	ni
34,122	34,135	34,129	2464	ni	ni
34,265	-	34,265	2479	ni	ni
34,453	34,465	34,459	2500	ni	ni
34,745	34,725	34,735	2529	ni	ni
34,854	34,857	34,856	2542	ni	ni
35,077	35,083	35,080	2566	ni	ni
35,271	-	35,271	2586	ni	ni
35,498	35,417	35,458	2605	ni	ni
35,864	35,865	35,865	2636	ni	ni
37,661	38,008	37,835	2790	ni	ni

Tempo de retenção (tr); Tempo de retenção médio (tr M); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats ADAMS, 2001 (IR<sup>\*</sup>). 2c(3hiv) – Experimento realizado 48 h após a inserção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a primeira replicata; 2b(3hvi) – Experimento realizado 48 h após a inserção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a segunda replicata; ni- não identificados.

No total detectou-se 40 compostos, no entanto identificou-se apenas 12, uma vez que alguns deles não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura. Comparou-se todos os espectros de massas obtidos nos experimentos em triplicata e todos foram semelhantes, independente dos compostos terem sido identificados ou não.

### 5.2.1.1.3 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* após a remoção das cigarrinhas

A extração dos voláteis das plantas foi realizada com *C. sinensis* sobre *C. limonia* após removidas as cigarrinhas, 0 horas, 24 horas e 48 horas após a remoção das mesmas.

### 5.2.1.1.3.1 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* logo após a remoção das cigarrinhas

Realizou-se o experimento de extração dos voláteis do *C. sinensis* sobre *C. limonia* 0 horas após a retirada das cigarrinhas por HS-SPME, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.7: Compostos voláteis identificados na planta 0 h após a remoção das cigarrinhas.

tr3a(3h2)	tr3a(3h3)	tr3a(3h4)	tr M	IR M	IR*	Composto
5,761	5,737	5,749	5,749	944	-	ni
-	6,225	6,233	6,229	961	975	Sabineno
-	-	6,9	6,900	986	-	ni
-	7,279	7,308	7,294	1000	1002	( $\Delta$ -2)-careno
7,997	7,973	7,986	7,985	1021	-	ni
10,323	10,301	10,311	10,312	1094	1101	Nonanal (n)
11,679	11,656	11,665	11,667	1136	-	ni
-	15,271	15,289	15,280	1255	-	ni
-	16,608	16,617	16,613	1599	1600	Hexadecano (n)
-	23,888	23,912	23,900	1629	-	ni
-	24,414	24,423	24,419	1712	-	ni
25,823	25,822	25,807	25,817	1859	-	ni
27,996	27,983	27,987	27,989	1957	-	ni
29,159	29,142	-	29,151	2372	-	ni
-	33,268	33,272	33,270	2466	-	ni
34,179	34,123	34,133	34,145	2479	-	ni
34,274	34,258	34,275	34,269	2500	-	ni
34,47	34,456	34,462	34,463	2636	-	ni
35,865	35,851	35,86	35,859	2776	-	ni
37,663	-	37,66	37,654	-	-	ni

Tempo de retenção (tr); Tempo de retenção médio (tr M); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats ADAMS, 2001 (IR\*). 3a(3h2) – Experimento realizado 0 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a primeira replicata; 3a(3h3) – Experimento realizado 0 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a segunda replicata; 3a(3h4) – Experimento realizado 0 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a terceira replicata; ni- não identificados.

No total detectou-se 19 compostos, no entanto identificou-se apenas 4, uma vez que alguns deles não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura. Comparou-se todos os espectros de massas obtidos nos experimentos em triplicata e todos foram semelhantes, independente dos compostos terem sido identificados ou não.

### 5.2.1.1.3.2 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a remoção das cigarrinhas

Realizou-se o experimento de extração dos voláteis do *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a retirada das cigarrinhas por HS-SPME, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.8: Compostos voláteis identificados na planta 24 h após a remoção das cigarrinhas.

tr3b(3hi)	tr3b(3hii)	tr M	IR MÉDIA	IR*	Composto
5,308	-	5,308	928	-	ni
5,754	5,748	5,751	944	-	ni
6,246	6,234	6,240	962	975	Sabineno
6,917	6,904	6,911	986		ni
7,29	7,281	7,286	1000	1002	( $\Delta$ -2)-careno
8,028	7,998	8,013	1022	-	ni
9,113	9,125	9,119	1057	-	ni
9,994	9,981	9,988	1084	-	ni
10,315	10,304	10,310	1094	1101	Nonanal (n)
10,897	-	10,897	1112	1122	Ácido etil hexanóico
11,679	11,67	11,675	1137	-	ni
12,01	11,998	12,004	1147	1149	Nonen-1-al (2Z)
-	13,246	13,246	1186	-	ni

TABELA 5.8: Compostos voláteis identificados na planta 24 h após a remoção das cigarrinhas – Continuação.

13,403	13,389	13,396	1190	1202	Decanal-dn
15,292	15,287	15,290	1255	-	ni
-	16,177	16,177	1286	1300	Tridecano (n)
16,63	16,62	16,625	1301	-	ni
18,921	18,919	18,920	1381	1400	Tetradecano (n)
21,101	-	21,101	1473	-	ni
21,525	-	21,525	1492	1496	Tridecanona (2)
23,892	23,902	23,897	1599	1600	Hexadecano (n)
24,43	24,375	24,403	1628	-	ni
25,824	25,821	25,823	1712	-	ni
27,236	27,236	27,236	1796	1800	Octadecano (n)
27,987	27,985	27,986	1858	-	ni
28,3	-	28,300	1885	-	ni
29,149	29,139	29,144	1956	-	ni
30,652	-	30,652	2097	-	ni
32,023	-	32,023	2235	-	ni
33,27	-	33,270	2372	-	ni
33,468	-	33,468	2394	-	ni
34,134	-	34,134	2465	-	ni
34,275	-	34,275	2480	-	ni
34,463	-	34,463	2500	-	ni
37,662	-	37,662	2776	-	ni

Tempo de retenção (tr); Tempo de retenção médio (tr M); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats ADAMS, 2001 (IR<sup>\*</sup>). 3b(3hi) – Experimento realizado 24 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a primeira replicata; 3b(3hii) – Experimento realizado 24 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a segunda replicata, ni- não identificados.

No total detectou-se 35 compostos, no entanto, identificou-se apenas 11, uma vez que alguns deles não apresentaram espectros de massas semelhantes aos

descritos na literatura. Comparou-se todos os espectros de massas obtidos nos experimentos em triplicata e todos foram semelhantes, independente dos compostos terem sido identificados ou não.

### 5.2.1.1.3.3 Compostos identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a remoção das cigarrinhas

Realizou-se o experimento de extração dos voláteis do *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a retirada das cigarrinhas por HS-SPME, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.9: Compostos voláteis identificados na planta 48 h após a remoção das cigarrinhas.

tr(3hiv)	tr(3hv)	tr(3hvi)	t(3hvii)	tr M	IR M	IR*	Composto
5,764	5,765	5,76	5,757	5,761	944	-	ni
6,254	6,254	6,251	6,244	6,251	962	975	Sabineno
6,925	6,917	6,921	6,914	6,919	986	-	ni
-	7,299	7,296	7,295	7,297	1000	1002	( $\Delta$ -2)-careno
8,031	8,039	8,031	8,019	8,030	1023	-	ni
9,090	9,105	9,099	9,125	9,105	1057	-	ni
9,983	-	9,987	9,991	9,987	1084	-	ni
10,313	10,320	10,313	10,316	10,315	1094	1101	Nonanal (n)
-	10,900	10,898	10,878	10,892	1112	1122	Ácido etil hexanóico
11,683	11,687	11,674	11,681	11,681	1137	-	ni
11,996	12,024	12,001	-	12,007	1147	1149	Nonen-1-al (2Z)
16,633	16,633	16,623	16,632	16,630	1301	-	ni
18,923	-	18,921	18,925	18,923	1381	1400	Tetradecano (n)
21,113	21,111	-	21,108	21,111	1473	-	ni

TABELA 5.9: Compostos voláteis identificados na planta 48 h após a remoção das cigarrinhas - Continuação.

23,902	-	23,875	23,895	23,891	1598	1600	Hexadecano (n)
24,422	-	24,45	24,434	24,435	1630	-	ni
25,829	25,834	25,818	25,833	25,827	1713	-	ni
27,245	27,250	27,23	27,247	27,243	1796	1800	Octadecano (n)
27,995	27,998	27,981	27,995	27,992	1858	-	ni
29,150	29,155	29,138	29,152	29,149	1956	-	ni
-	30,664	30,65	30,653	30,656	2097	-	ni
-	-	32,019	32,027	32,023	2235	-	ni
-	-	33,266	33,272	33,269	2372	-	ni
33,469	33,470	33,463	33,468	33,467	2394	-	ni
34,134	34,134	34,12	34,134	34,130	2464	-	ni
-	34,275	34,275	-	34,275	2480	-	ni
34,466	34,467	34,455	34,464	34,463	2500	-	ni
35,873	35,866	35,858	35,864	35,865	2636	-	ni
37,668	-	37,653	37,660	37,660	2776	-	ni

Tempo de retenção (tr); Tempo de retenção médio (tr M); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats ADAMS, 2001 (IR<sup>\*</sup>). 3c(3hiv) – Experimento realizado 48 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a primeira replicata; 3c(3hv) – Experimento realizado 48 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a segunda replicata; 3c(3hvi) – Experimento realizado 48 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a terceira replicata; 3c(3hvii) – Experimento realizado 48 h após a remoção das cigarrinhas, com 3 horas de exposição da fibra no sistema, sendo a quarta replicata, ni- não identificados.

No total detectou-se 31 compostos, no entanto identificou-se apenas 9, uma vez que alguns destes não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura. Comparou-se todos os espectros de massas obtidos nos experimentos em triplicata e todos foram semelhantes, independente dos compostos terem sido identificados ou não.

#### **5.2.1.1.4. Análise Quimiométrica dos dados de CG-EM dos Compostos Voláteis de *C. sinensis* sobre *C. limonia***

Para uma melhor visualização e interpretação dos dados obtidos nos experimentos com os voláteis, utilizou-se a técnica de Quimiometria, a qual vem sendo amplamente aplicada em diversas áreas visando planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos. O programa utilizado para este tratamento estatístico foi o Pirouette versão 2.02, da Infometrix.

Inicialmente, montou-se uma matriz com as áreas dos picos dos cromatogramas, obtidos nas diferentes condições, relacionando os seus índices de Kovats. A matriz gerada apresentou dezessete linhas e sessenta colunas, correspondentes às amostras e às variáveis, respectivamente. Ao total foram analisadas sete amostras em replicatas.

A análise de componentes principais (PCA – *Principal Components Analysis*) foi realizada utilizando um número máximo de componentes principais igual a 10, onde nenhum pré-processamento foi empregado, aplicando-se apenas a normalização dos dados. Com estes parâmetros, verificou-se que a componente principal 1 (PC1) apresentou quase 98% da informação total do sistema, o que é muito bom; então utilizou-se posto 3, ou seja, considerou-se as informações obtidas até PC3, pois com esse número de componentes principais tem-se toda a informação relevante sobre o sistema, correspondendo a quase 99,5% da informação total (Tabela 5.10, p.203).

TABELA 5.10: Porcentagens das componentes principais do sistema (voláteis extraídos de *C. sinensis* sobre *C. limonia*) sem pré-processamento.

	Variância	Porcentagem	Porcentagem Cumulativa
<b>PC1</b>	166404.28125	97.88487	97.88487
<b>PC2</b>	1845.67749	1.08569	98.97057
<b>PC3</b>	866.69928	0.50982	99.48039
<b>PC4</b>	263.60513	0.15506	99.63545
<b>PC5</b>	213.68086	0.12569	99.76115
<b>PC6</b>	189.79399	0.11164	99.87279
<b>PC7</b>	55.44279	0.03261	99.90540
<b>PC8</b>	39.72471	0.02337	99.92877
<b>PC9</b>	35.06353	0.02063	99.94939
<b>PC10</b>	31.06989	0.01828	99.96767

O gráfico de scores de PC1xPC2 obtido (98,97% de informação total do sistema) está apresentado no gráfico 5.1, a seguir.

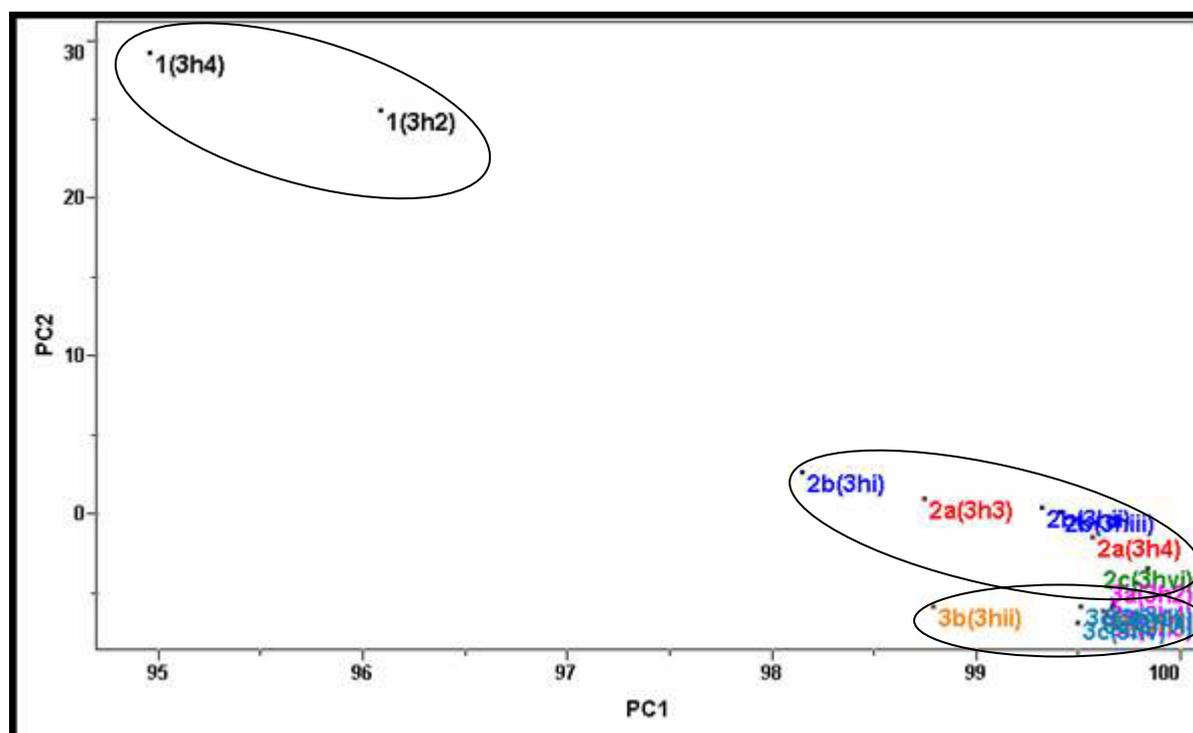


GRÁFICO 5.1: Gráfico de scores de todas as amostras dos voláteis de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC2, 97,88 e 1,09 %, respectivamente).

A partir do gráfico pode-se verificar que as replicatas estão próximas em todas condições e que há uma diferença nas plantas quando estão nas diferentes condições; principalmente comparando-se sem ter sido submetidas às cigarrinhas (condição 1) e na presença ou após a remoção da mesmas (condições 2 e 3, respectivamente). Com isto, pode-se verificar que a planta tem uma modificação em seus voláteis, composição e quantidade exalada, logo quando se coloca as cigarrinhas em contato (0 horas). Observa-se também que após a remoção das cigarrinhas (Condição 3), a planta não retorna ao seu estado anterior ao ataque (Condição 1), ela sofre outra alteração, distinta da condição 2.

A partir do gráfico de *loadings* de PC1XPC2 (Gráfico 5.2), o qual indica as variáveis importantes para a discriminação, pode-se notar que o composto com IK = 1907 é o maior responsável pela distinção da condição 1, e que o composto com IK = 1022 é o responsável pela distinção das condições 2 e 3. Os compostos com IK = 2100, 2466, 2306 e 1859 também são importantes para a discriminação dos grupos.

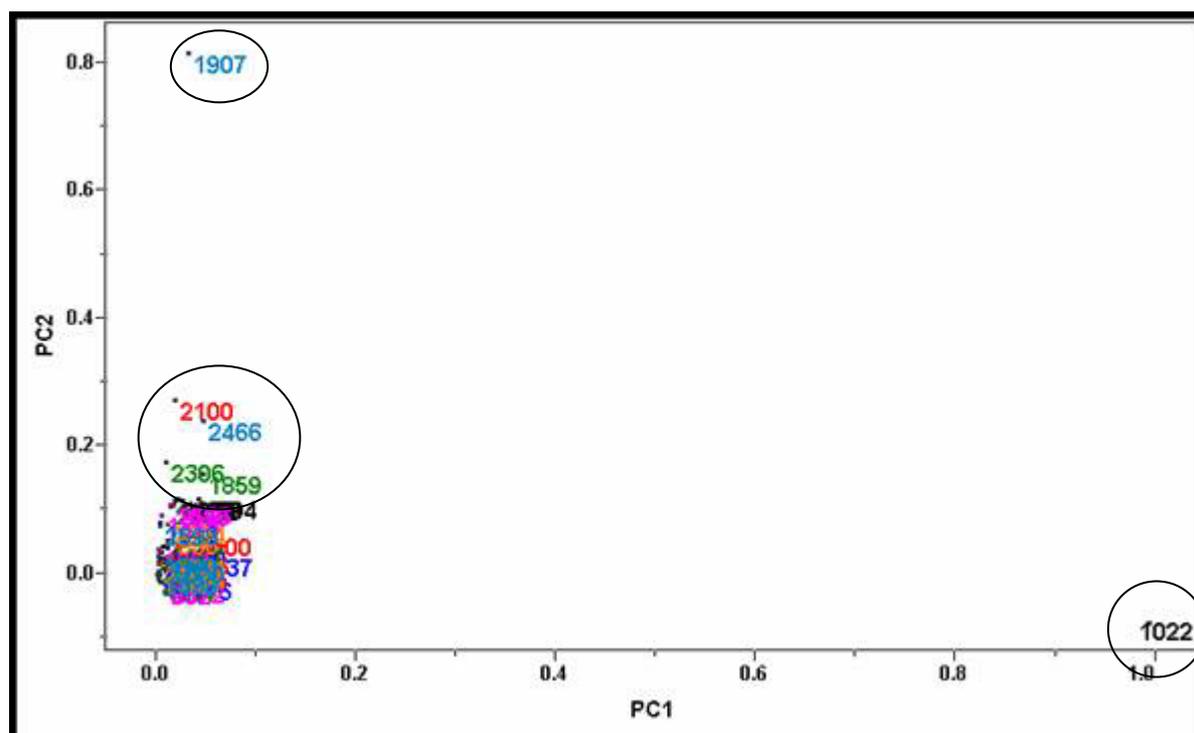


GRÁFICO 5.2: Gráfico de *loadings* de todas as amostras dos voláteis *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC2, 97,88 e 1,09 %, respectivamente).

Analisou-se também os dados considerando-se PC1XPC3 (Gráfico 5.3), o que corresponde a 98,39 % da informação total do sistema, para verificar a resposta quimiométrica obtida em uma outra dimensão espacial.

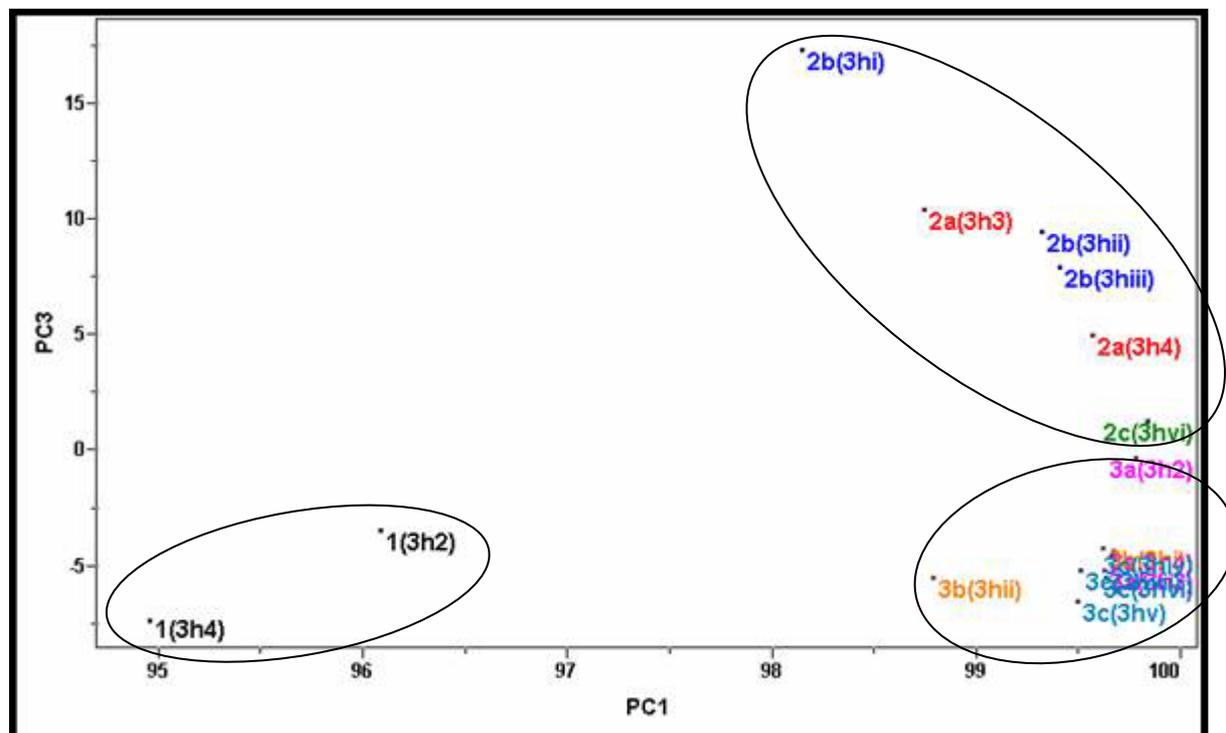


GRÁFICO 5.3: Gráfico de scores de todas amostras dos voláteis *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC3, 97,88 e 0,51 %, respectivamente).

Observa-se novamente uma similaridade entre as replicatas e uma distinção entre as três condições, reforçando que a planta sofre modificações com a presença das cigarrinhas, como citado anteriormente. Outra observação interessante apresentada nos dois gráficos (5.1 e 5.3) é que os grupos 1, 2 e 3 estão bem separados, no entanto, os subgrupos 2a e 2b estão agrupados, o que demonstra que não há grandes variações nos voláteis da planta quando as cigarrinhas estão em contato por 0 horas (Condição 2a) ou por 24 horas (Condição 2b); porém a condição 2c está próxima à condição 3a o que está coerente, uma vez que a primeira foi coletada 48 horas após a inserção das cigarrinhas, e a segunda logo após a remoção das cigarrinhas. As condições 3b e 3c também não apresentaram grandes diferenças, concluindo que não há uma grande variação nos voláteis da planta 24 horas ou 48 horas após a remoção das cigarrinhas.

No gráfico de *loadings* de PC1XPC3 (Gráfico 5.4) observou-se os mesmos resultados que no gráfico PC1XPC2, no entanto, verificou-se também que os compostos com IK = 1137, 2466, 1859 e 1094 são responsáveis por deslocar as condições 2a e 2b para cima.

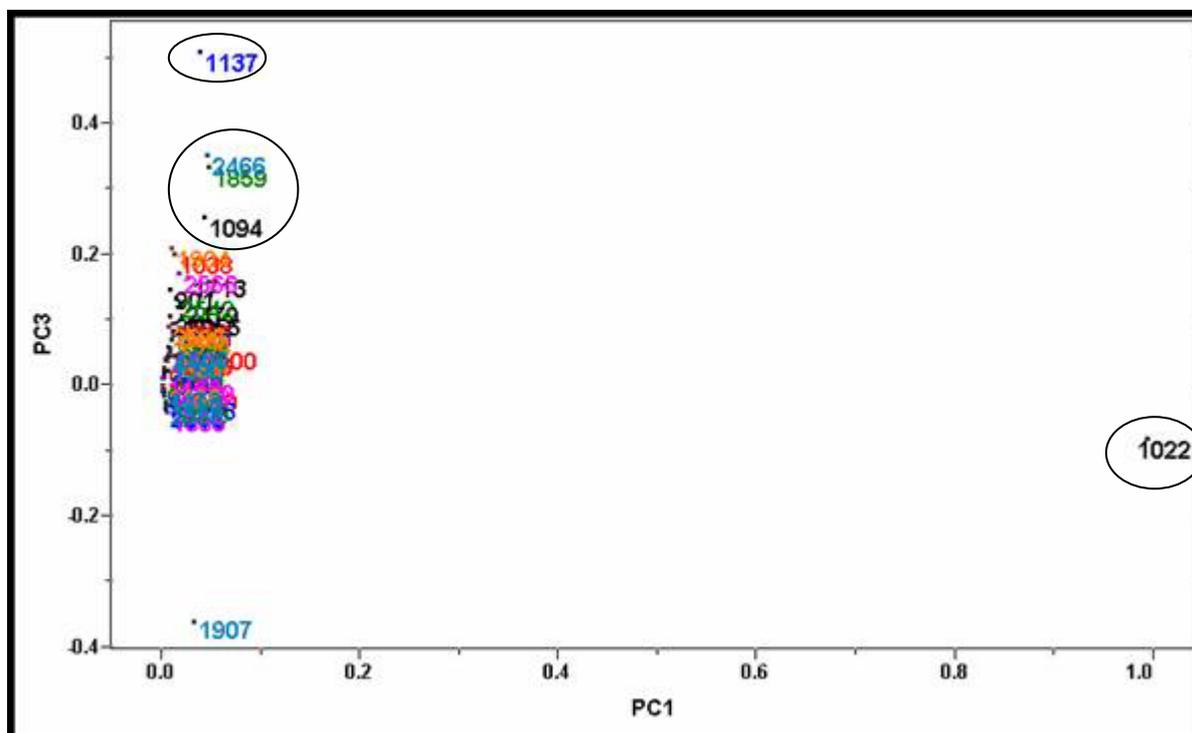


GRÁFICO 5.4: Gráfico de *loadings* de todas amostras dos voláteis *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC3, 97,88 e 0,51 %, respectivamente).

O gráfico do poder de modelagem indica a habilidade da variável em modelar a informação contida nos dados, ou seja, o poder de modelagem varia entre zero e um, indicando que quanto mais alto for esse valor mais relevante é a variável. No presente trabalho, o gráfico de poder de modelagem mostra quais os índices de Kovats são os mais importantes para os agrupamentos, desta forma, observa-se que os compostos com IK = 1022, 1094, 1137, 1859, 1907, 2100, 2306 e 2466, destacados anteriormente pelos gráficos de *loadings*, encontram-se entre as variáveis com maior poder de modelagem, contribuindo para os agrupamentos das diversas condições.

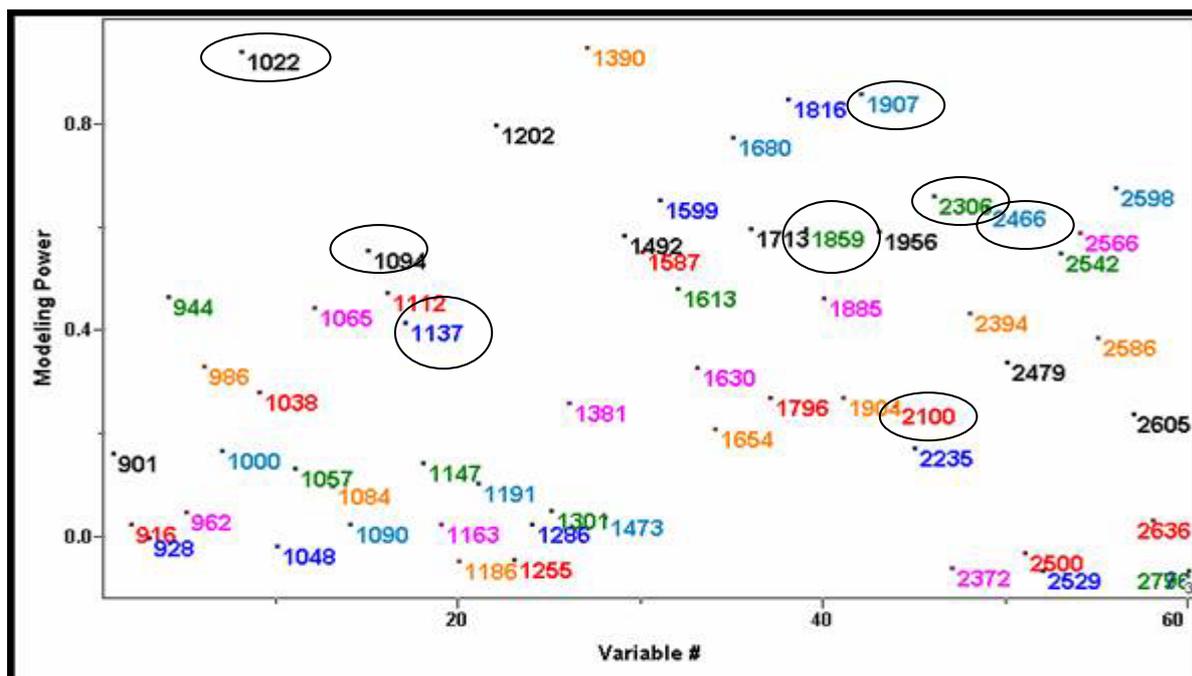


GRÁFICO 5.5: Gráfico do poder de modelagem de todas as variáveis dos voláteis *C. sinensis* sobre *C. limonia*, obtido para a análise de PCA sem nenhum pré-processamento.

Outra análise realizada, sob as mesmas condições descritas, foi a Análise Hierárquica dos Agrupamentos (HCA – *Hierarchical Clusters Analysis*), a qual indica a similaridade entre os grupos (Gráfico 5.6).

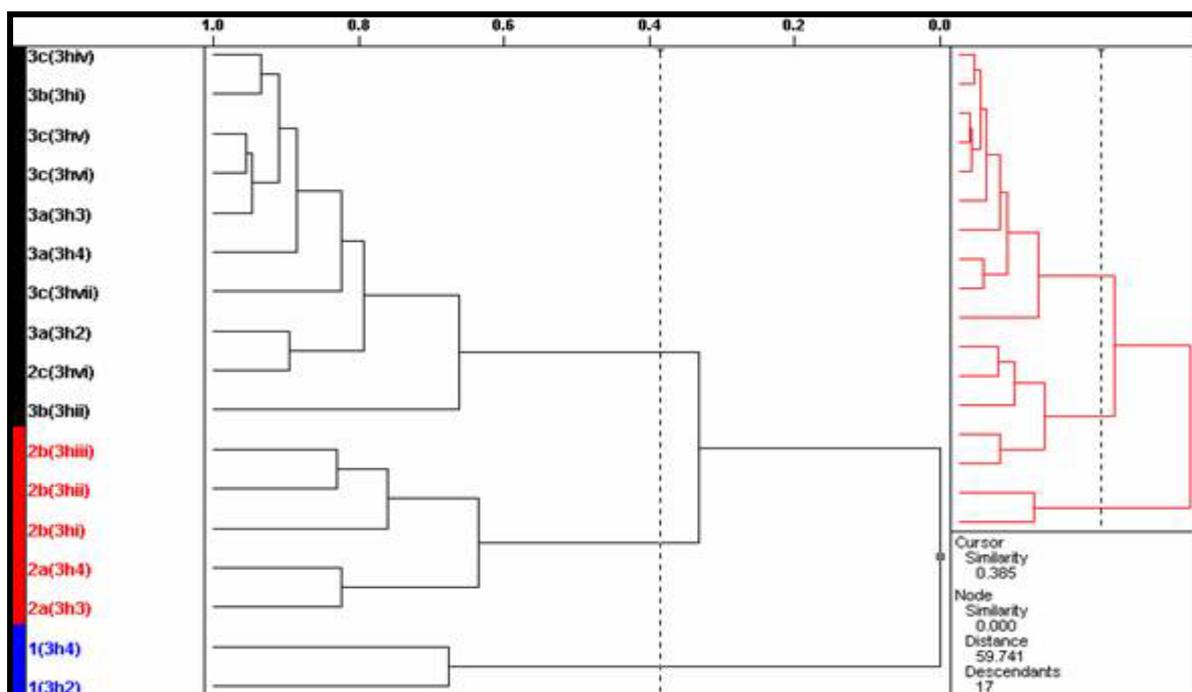


GRÁFICO 5.6: Gráfico de HCA de todas amostras com índice de similaridade 0,385.

O gráfico de HCA mostrou a similaridade das replicatas de todas condições e a distinção entre as condições 1, 2 e 3. A condição 2c está inclusa no grupo da condição 3, uma vez que é similar a condição 3a, conforme já observado anteriormente.

Realizou-se outra análise com os mesmos parâmetros que as anteriores, no entanto, agora utilizando pré-processamento autoescalado, para verificar se há alteração nos resultados. Quando se utiliza o pré-processamento autoescalado consideram-se todas as intensidades dos picos como informações importantes, e não apenas as majoritárias, como no caso da análise sem pré-processamento. Utilizou-se posto 6 (informações obtidas até PC6), o que corresponde a 83,35% da informação total do sistema (Tabela 5.11).

TABELA 5.11: Porcentagens das componentes principais do sistema (voláteis extraídos de *C. sinensis* sobre *C. limonia*) com pré-processamento.

	<b>Variância</b>	<b>Porcentagem</b>	<b>Porcentagem Cumulativa</b>
<b>PC1</b>	366.51480	38.17863	38.17863
<b>PC2</b>	207.89069	21.65528	59.83391
<b>PC3</b>	83.49155	8.69704	68.53094
<b>PC4</b>	60.32357	6.28371	74.81465
<b>PC5</b>	43.46993	4.52812	79.34277
<b>PC6</b>	38.45486	4.00571	83.34849
<b>PC7</b>	36.17560	3.76829	87.11678
<b>PC8</b>	29.52071	3.07507	90.19185
<b>PC9</b>	24.15252	2.51589	92.70773
<b>PC10</b>	20.01783	2.08519	94.79292

Obteve-se o gráfico de *scores* e o gráfico de *loadings* de PC1xPC2 (59,83% de informação total do sistema), os quais estão apresentados a seguir.



O resultado obtido no gráfico de *scores* foi o mesmo observado quando não se fez nenhum pré-processamento, no entanto, o gráfico de *loadings* apesar de apresentar os mesmos resultados para os índices de Kovats IK = 1022 e 1907, mostrou mais índices de Kovats importantes para os agrupamentos, pois esta análise considera também picos menos intensos.

Para verificar a resposta quimiométrica obtida por uma outra dimensão espacial, adquiriu-se o gráfico de PC1XPC3 (Gráfico 5.9), o que corresponde a 46,57 % da informação total do sistema.

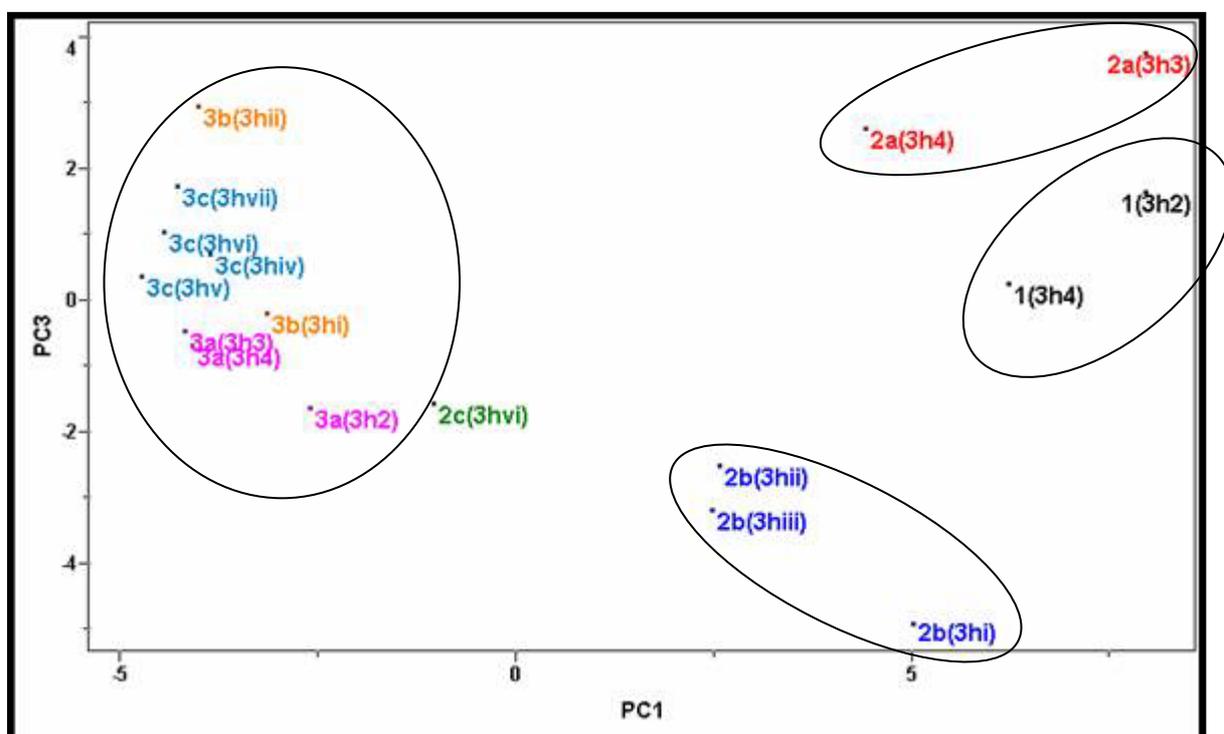


GRÁFICO 5.9: Gráfico de *scores* de todas amostras dos voláteis *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC3, 38,18 e 8,70 %, respectivamente).

Os resultados são muito similares aos obtidos anteriormente. O gráfico de *loadings* de PC1XPC3 dos índices de Kovats (Gráfico 5.10), correspondente a 46,88% da informação total, relata resultados próximos aos do gráfico PC1XPC2.



Com todas estas análises quimiométricas, verifica-se que os resultados foram muito coerentes e similares entre si. Comprova-se que a planta realmente sofre alteração quando em contato com as cigarrinhas, e após a remoção das mesmas não retornam ao seu estado inicial (antes do ataque), mesmo após 48 horas sem a presença dos vetores. A planta sofreu grande alteração logo quando adiciona-se cigarrinhas ao meio, porém não sofre uma alteração tão abrupta logo após a remoção das mesmas.

Os compostos que apresentaram maior importância e influência na separação dos grupos foram os compostos com IK = 1022, 1094, 1137, 1859, 1907, 2100, 2306 e 2466. As áreas destes picos estão listadas na Tabela 5.12.

TABELA 5.12: Áreas dos picos dos compostos importantes na separação dos grupos 1, 2 e 3, observados na análise quimiométrica.

IK	Área						
	1	2a	2b	2c	3a	3b	3c
<b>1022</b>	31035037	20629663	18778202	22222573	19106711	53738158	69991884
<b>1094</b>	1925364	1679794	1225946	960561	313686	1307622	1278884
<b>1137</b>	533969	460178	2278589	849125	478090	631977	533007
<b>1859</b>	2324668	1376538	1591389	1209153	512804	1170085	1127564
<b>1907</b>	91867595	-	-	-	-	-	-
<b>2100</b>	3008270	404307	594618	-	-	364646	266794
<b>2306</b>	1924392	-	216456	-	-	-	926352
<b>2466</b>	2996005	1769940	1468408	1237992	428171	494778	776044

1: *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem sofrer nenhuma alteração; 2a: *C. sinensis* sobre *C. limonia* logo após a inserção das cigarrinhas; 2b: *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a inserção das cigarrinhas; 2c: *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a inserção das cigarrinhas; 3a: *C. sinensis* sobre *C. limonia* logo após a remoção das cigarrinhas; 3b: *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a remoção das cigarrinhas; 3c: *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a remoção das cigarrinhas.

Para verificar se houve um aumento ou uma diminuição na quantidade dos compostos nas diferentes condições, adotou o pico majoritário da condição 1 (IK = 1022) como 100%, e toda a análise comparativa foi realizada em relação a esta condição, uma vez que, corresponde a planta sem ter sido submetida aos vetores.

As porcentagens relativas dos demais compostos estão apresentadas na Tabela 5.13.

TABELA 5.13: Porcentagens relativas dos picos dos compostos importantes na separação dos grupos (1, 2 e 3) observados na análise quimiométrica.

IK	Porcentagem (%)						
	1	2a	2b	2c	3a	3b	3c
1022	100,00	66,47	60,51	71,60	61,56	173,15	225,50
1094	6,20	5,40	3,95	3,09	1,01	4,20	4,10
1137	1,72	1,48	7,34	2,73	1,54	2,04	1,72
1859	7,49	4,43	5,13	3,89	1,65	3,77	3,63
1907	29,60	-	-	-	-	-	-
2100	9,69	1,30	1,91	-	-	1,17	0,86
2306	6,20	-	0,70	-	-	-	2,98
2466	9,65	5,70	4,73	3,99	1,38	1,59	2,50

1: *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem sofrer nenhuma alteração; 2a: *C. sinensis* sobre *C. limonia* logo após a inserção das cigarrinhas; 2b: *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a inserção das cigarrinhas; 2c: *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a inserção das cigarrinhas; 3a: *C. sinensis* sobre *C. limonia* logo após a remoção das cigarrinhas; 3b: *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a remoção das cigarrinhas; 3c: *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a remoção das cigarrinhas.

Deve-se notar que a resposta da planta logo após a remoção das cigarrinhas está mais próxima daquela após 48 horas em contato com estes vetores do que 24 horas após a remoção dos mesmos, isto ocorre, uma vez que, a planta nesta condição comporta-se como se estivesse ainda com a presença das cigarrinhas.

Verificou-se que o composto com IK = 1137 teve um aumento considerável em seu percentual na condição 2b, ou seja, após 24 horas em contato com as cigarrinhas, mas depois decresce e permanece praticamente o mesmo. Isto indica que a planta libera este composto em maior quantidade em resposta ao ataque pelo inseto. Este ao ferir a planta afeta seu metabolismo, o qual envolve uma rede metabólica em equilíbrio. Para não afetar processos vitais para a planta (como síntese proteica), ela retorna ao equilíbrio metabólico variando seus constituintes secundários. A planta varia a concentração de alguns constituintes presentes e/ou

sintetiza outros. Estes compostos em maior concentração ou novos podem servir como alomônios para inseto. Como a cigarrinha é um predador de *Citrus*, estes compostos podem servir como alomônios de agregação, ou seja, indicando a presença de alimento e atraindo um número maior destes insetos no campo. Estes efeitos serão avaliados em trabalhos futuros.

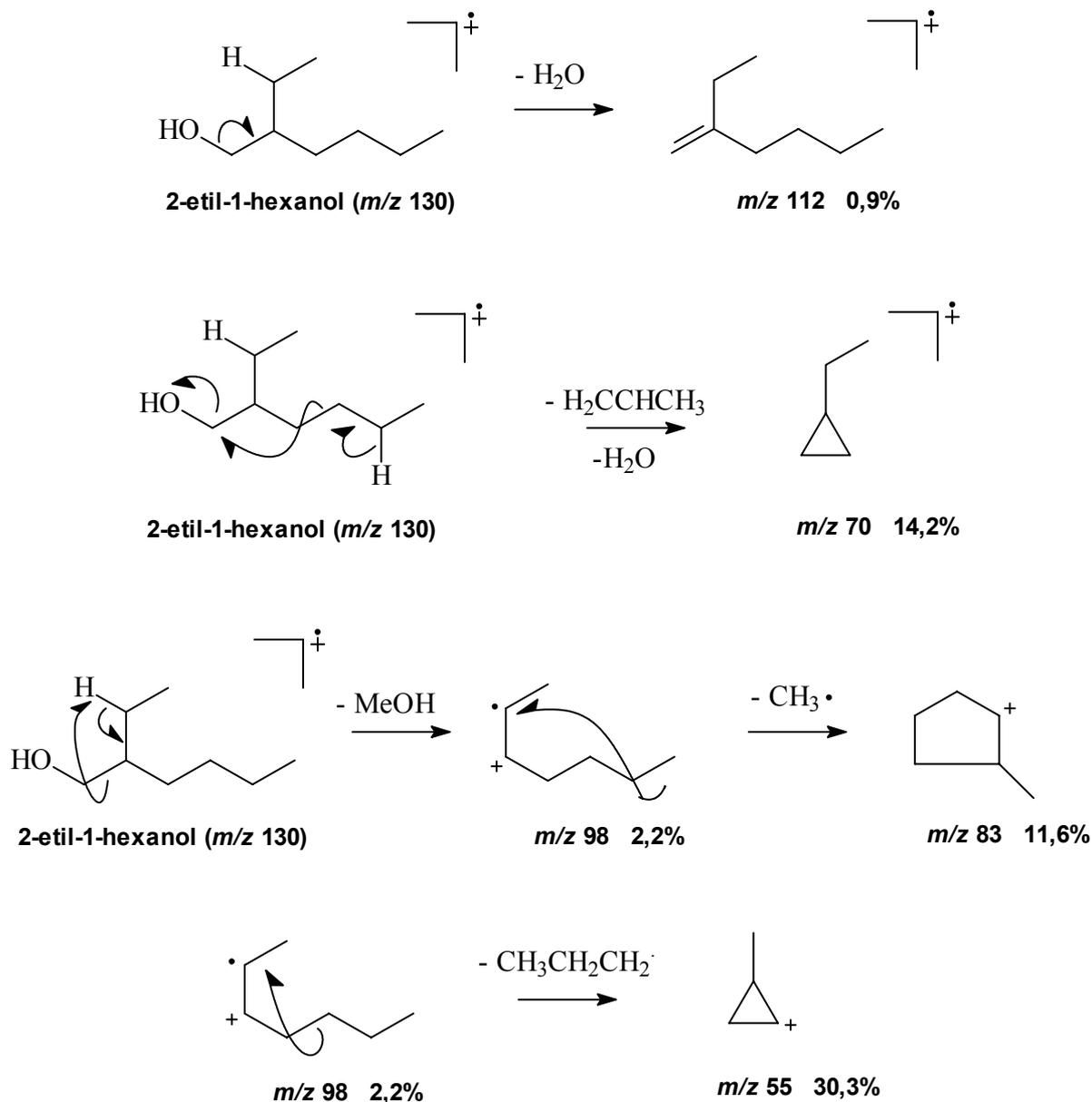
Os compostos com IK = 1094, 1859, 2100, 2306, 2466 diminuem seu percentual até a condição 3a, indicando que a permanência das cigarrinhas faz com que a planta pare de liberá-los. O composto com IK = 1022, apresenta um decréscimo de aproximadamente 35 % quando a planta entra em contato com as cigarrinhas, porém aumenta quase 75 %, em relação a condição 1, e continua aumentando consideravelmente seu percentual, após a remoção das cigarrinhas. Quando compostos são liberados em grande quantidade após a remoção dos vetores, pode ser um sinalizador para que o seu metabolismo retorne ao equilíbrio.

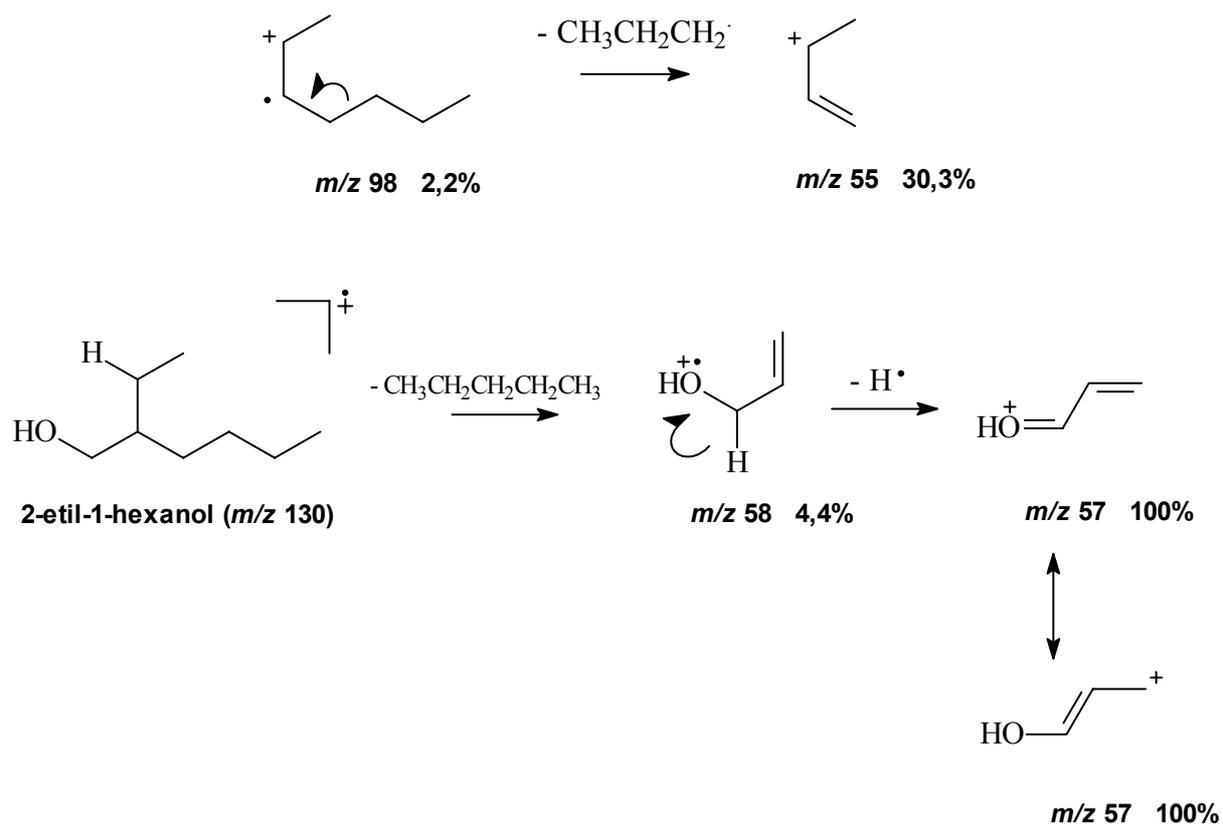
O composto com IK = 1907 pára totalmente de ser exalado pela planta logo após a inserção dos vetores e mesmo após a remoção dos mesmos. Quando a planta diminui ou pára de liberar um composto, sugere-se que estes compostos sejam os responsáveis por atrair os vetores, então eles não são mais exalados, como um mecanismo de defesa da planta, para que outros insetos não sejam mais atraídos.

As duas alterações mais discrepantes observadas foram as últimas discutidas (IK = 1022 e 1907), devido seus valores de percentuais serem os mais altos. Destes compostos relevantes, o único que foi identificado por comparação com a literatura foi o com IK =1094 (nonanal); os demais não foram encontrados.

### 5.2.1.1.5 Identificação dos compostos majoritários

O composto majoritário presente em todas as condições foi o composto com IR = 1022. No entanto, este não foi identificado a partir da comparação do seu índice de Kovats e seu espectro de massas com os dados presentes na literatura (Adams, 2001). Então analisou-se o seu espectro de massas e a partir das fragmentações atribuídas foi proposto que o composto obtido é o 2-etil-1-hexanol (Esquema 5.2).





ESQUEMA 5.2: Proposta de fragmentação do 2-etil-1-hexanol.

Fez-se então a simulação do espectro de massas deste composto (Figura 5.7), e o espectro foi muito similar ao obtido experimentalmente (Figura 5.8, p.217).

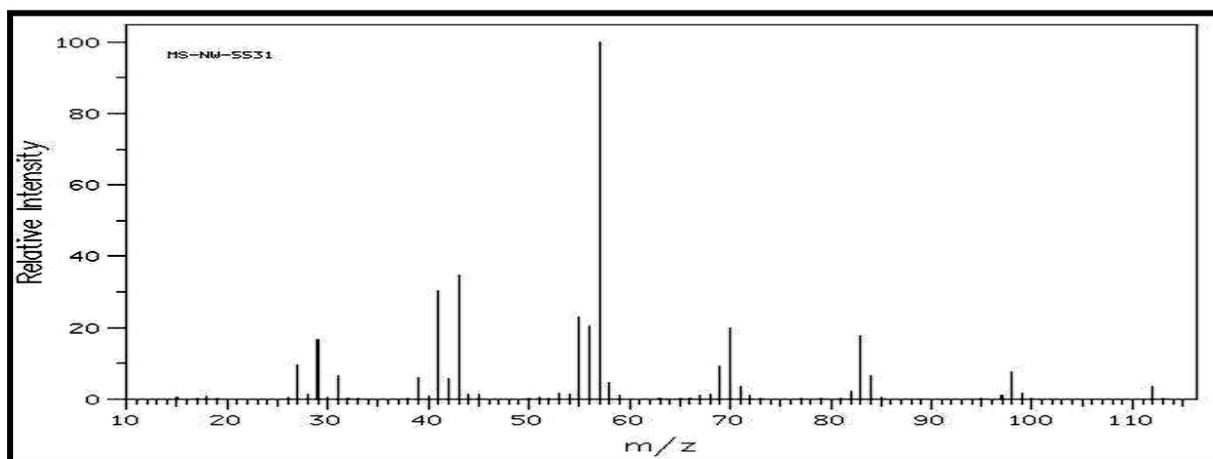


FIGURA 5.7: Espectro de Massas teórico (Spectral Database System for Organic Compounds) do 2-etil-1-hexanol.

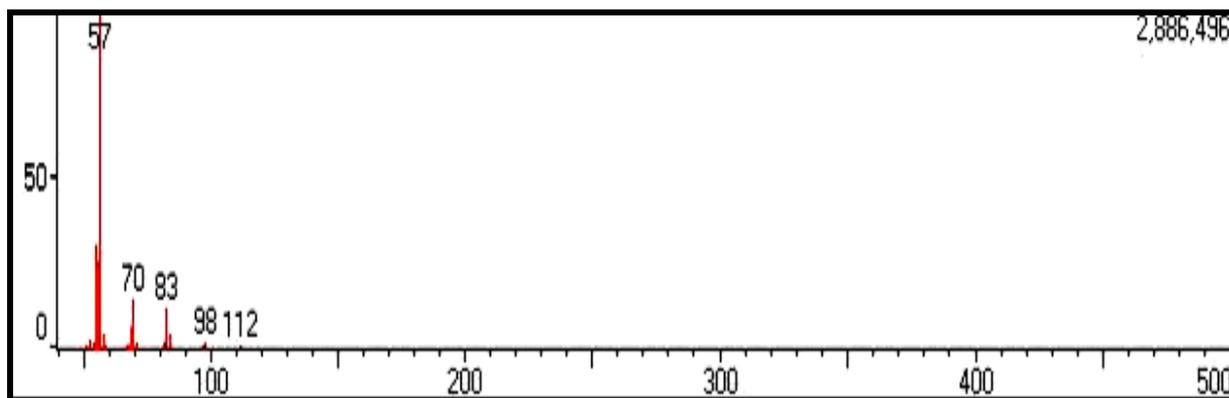


FIGURA 5.8: Espectro de Massas experimental do 2-etil-1-hexanol.

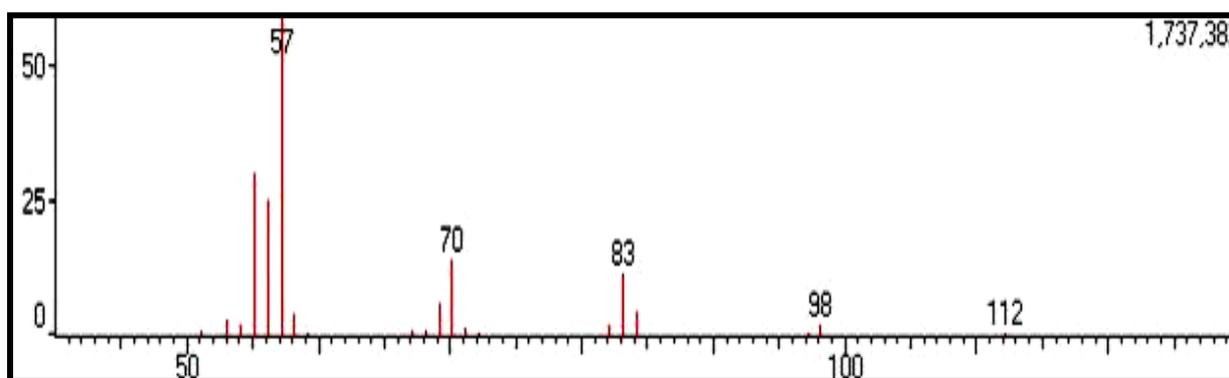


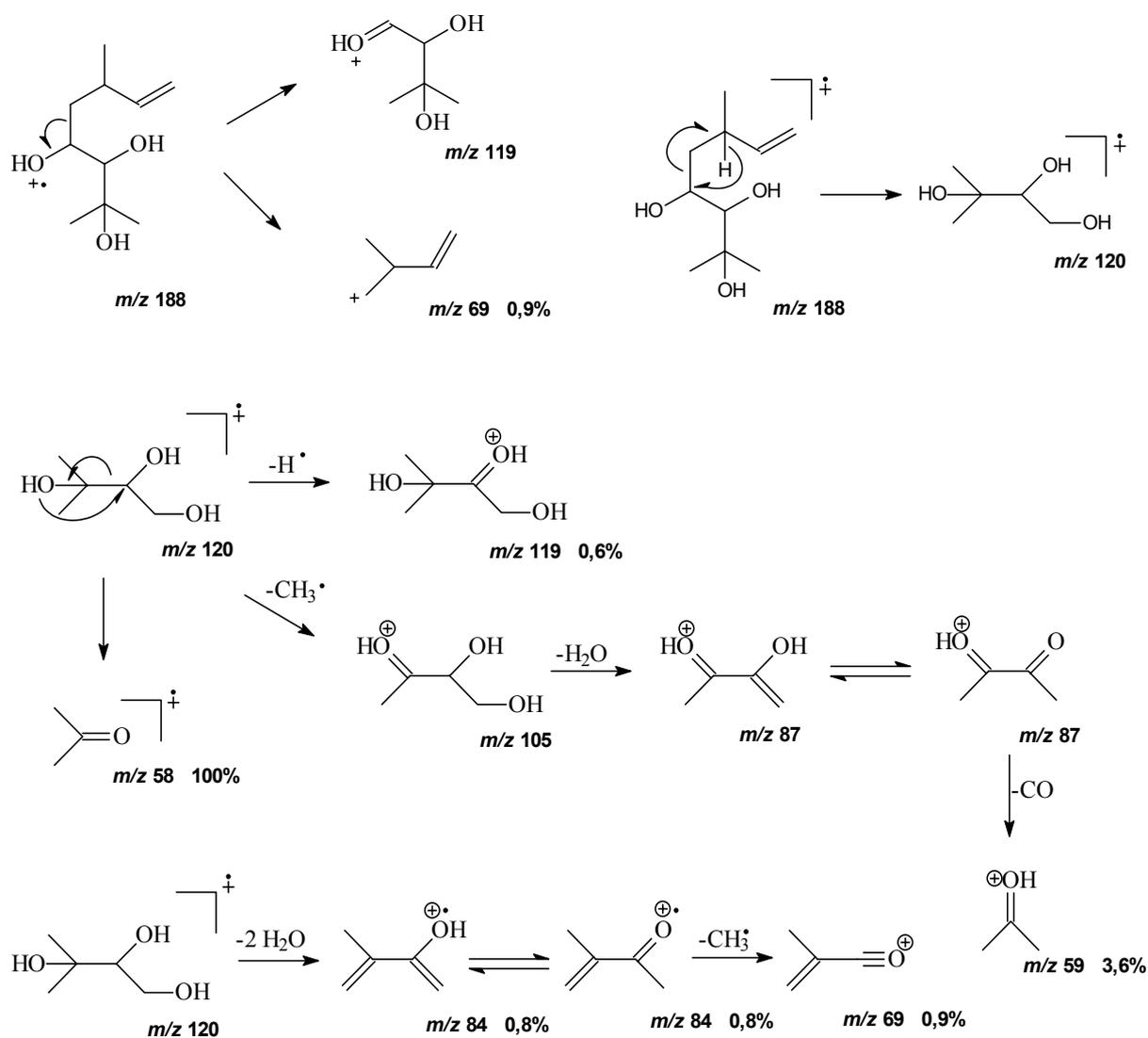
FIGURA 5.9: Ampliação do Espectro de Massas experimental do 2-etil-1-hexanol.

Além disto, comparou-se os dados com a biblioteca fornecida pelo equipamento e os resultados conferiram com os demais. A partir deste conjunto de informações, conseguiu-se identificar que o composto com IR = 1022 é o 2-etil-1-hexanol.

O composto com IR = 1907 foi o segundo composto majoritário quando a planta não havia sido submetida à presença de cigarrinhas, e teve uma modificação muito abrupta e interessante, pois não foi mais liberado nas demais condições, ou seja, após a inserção das cigarrinhas no sistema. Este composto não foi identificado a partir da comparação de seu índice de Kovats e espectro de massas com a literatura. No entanto, a análise de seu espectro de massas (Figura 5.10, p.218) sugeriu-se algumas fragmentações, indicando que o composto corresponde ao indicado no Esquema 5.3, p.218.

O composto com IR = 1859 também não foi encontrado na literatura, mas a partir de seu espectro de massas (Figura 5.11, p.219) e de algumas propostas de fragmentações, sugeriu-se como sendo o indicado no Esquema 5.4, p.219. Os espectros de massas simulados para estas propostas não foram encontrados no

banco de dados (Spectral Database System for Organic Compounds), e com isto não se pode comprovar quais os compostos, apenas sugere-se tais hipóteses.



ESQUEMA 5.3: Proposta de fragmentação do composto com IR = 1907.

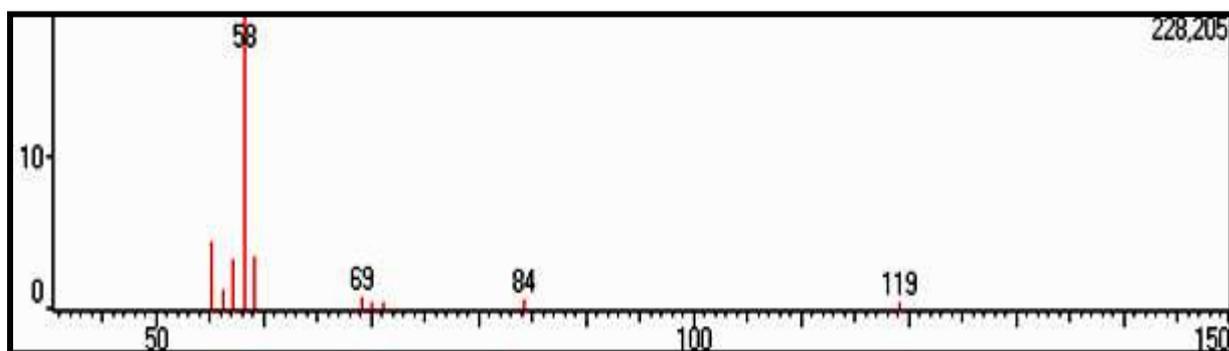
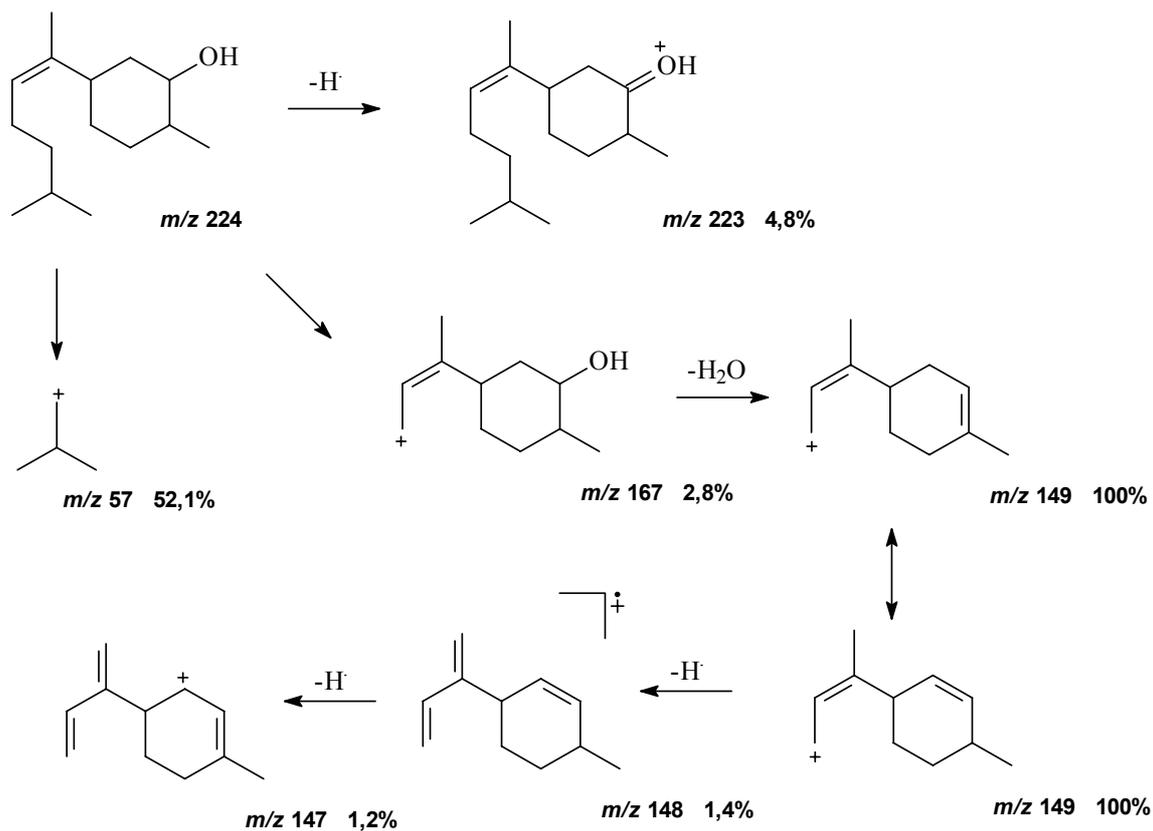


FIGURA 5.10: Espectro de Massas experimental do composto com IR = 1907.



ESQUEMA 5.4: Proposta de fragmentação do composto com IR = 1859.

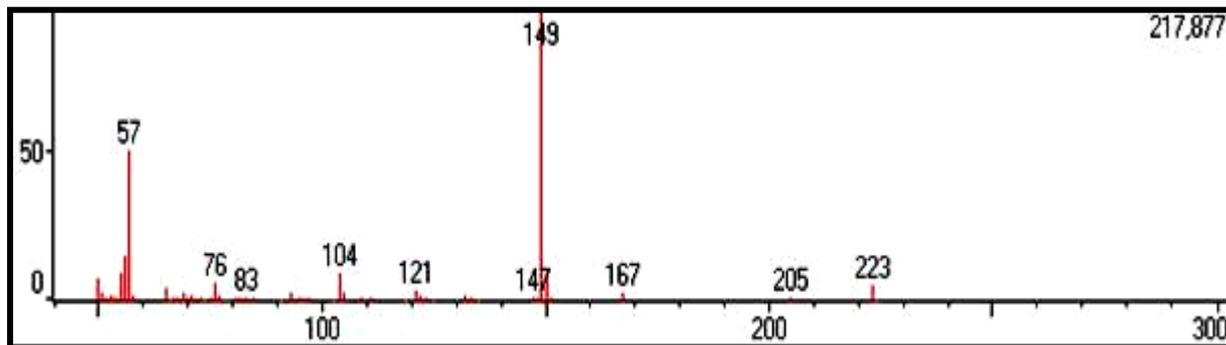


FIGURA 5.11: Espectro de Massas experimental do composto com IR = 1859.

### 5.2.1.2. Óleos essenciais extraídos de *C. sinensis* sobre *C. limonia*

Os óleos essenciais das folhas das plantas enxertadas foram extraídos, em triplicata, utilizando-se a técnica de arraste a vapor. A identificação dos compostos presentes nos óleos foi realizada a partir do Índice de retenção de Kovats e dos espectros de massas de cada pico comparados com a literatura (Adams, 2001). A equação empregada no cálculo do índice foi a equação de Van Den Dool e Kratz, a mesma utilizada para os voláteis, no entanto, os tempos de retenção dos hidrocarbonetos, neste caso, foi o obtido a partir da injeção direta da seringa (Seção 5.1.1.3, p.183).

#### 5.2.1.2.1. Óleos essências identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem ter sido submetida às cigarrinhas

Realizou-se o experimento de extração dos óleos essenciais do *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem ter sido submetida às cigarrinhas através da técnica de araste à vapor, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.14: Compostos identificados no óleo essencial das folhas de *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem ter sido submetido às cigarrinhas.

tr OEPPA	tr OEPPB	tr OEPPC	tr M	IR M	IR*	Composto
5,002	4,987	4,982	4,990	908	930	$\alpha$ -tujeno
5,159	5,148	5,144	5,150	914	939	$\alpha$ -pineno
5,533	5,517	5,509	5,520	928	-	ni
6,279	6,281	6,248	6,269	955	975	sabineno
6,822	6,813	6,8	6,812	975	991	mirceno
7,314	7,313	7,285	7,304	993	1002	$\Delta$ -2-careno
7,555	7,547	7,542	7,548	1001	1017	$\alpha$ -terpineno
-	7,782	7,771	7,777	1008	1025	p-cimeno
7,931	7,926	7,906	7,921	1013	1029	limoneno

TABELA 5.14: Compostos identificados no óleo essencial das folhas de *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem ter sido submetido às cigarrinhas - Continuação.

8,233	8,221	8,217	8,224	1022	1037	(Z)- $\beta$ -ocimeno
8,55	8,548	8,526	8,541	1032	1050	(E)- $\beta$ -ocimeno
8,831	8,822	8,814	8,822	1040	1060	$\gamma$ -terpineno
9,669	9,664	9,653	9,662	1066	1089	terpinoleno
10,197	10,201	10,168	10,189	1083	1097	linalool
11,771	11,796	11,751	11,773	1132	1153	citronelal
12,506	12,508	12,508	12,507	1154	1177	terpinen-4-ol
12,956	13,01	13,117	13,028	1170	1189	$\alpha$ -terpineol
14,329	14,342	14,299	14,323	1212	1238	neral
15,198	15,23	15,176	15,201	1244	1267	geranial
16,706	16,717	-	16,712	1299	1325	Metil-decanoato
17,518	17,532	17,525	17,525	1329	1353	Citronelil acetato
17,77	17,79	17,777	17,779	1339	1362	neril acetato
18,311	18,321	18,318	18,317	1358	1381	geranil acetato
18,534	18,55	18,542	18,542	1366	1391	$\beta$ -elemeno
19,248	19,266	19,257	19,257	1393	1419	(E)-cariofileno
20,171	20,194	20,185	20,183	1433	1455	$\alpha$ -humuleno
25,584	25,612	25,604	25,600	1700	1700	$\beta$ -sinensal
26,463	26,487	26,516	26,489	1752	1757	$\alpha$ - sinensal
-	27,719	27,718	27,719	1835	-	ni
27,967	27,989	28,003	27,986	1858	-	ni
28,233	28,265	28,265	28,254	1880	-	ni
31,102	31,137	31,144	31,128	2143	-	ni
31,825	31,853	31,863	31,847	2384	-	ni

Tempo de retenção (tr – min.); Tempo de retenção médio (tr M – min.); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats ADAMS, 2001 (IR<sup>+</sup>). OEPPA – Experimento realizado sem a presença de cigarrinhas, sendo a primeira replicata; OEPPB – Experimento realizado sem a presença de cigarrinhas, sendo a segunda replicata; OEPPC – Experimento realizado sem a presença de cigarrinhas, sendo a terceira replicata; ni- não identificados.

Nota-se que foram identificados 27 compostos presentes no óleo essencial das folhas da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem esta ter sido submetida às cigarrinhas, sendo o sabineno o composto majoritário do óleo, seguido do  $\Delta$ -2-careno. No total detectou-se 33 compostos, porém seis destes não foram identificados, uma vez que não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura.

### 5.2.1.2.2. Óleos essenciais identificados no *C. sinensis* sobre *C. limonia* após a remoção das cigarrinhas

Realizou-se o experimento de extração dos óleos essenciais do *C. sinensis* sobre *C. limonia* após a remoção das cigarrinhas através da técnica de araste à vapor, e identificou-se os mesmos por CG-EM através de seus índices de Kovats em comparação com a literatura (ADAMS, 2001).

TABELA 5.15: Compostos identificados no óleo essencial das folhas de *C. sinensis* sobre *C. limonia* após a remoção das cigarrinhas.

tr OEPCA	tr OEPCB	tr OEPCC	tr M	IR M	IR*	Composto
5,001	5,013	5,006	5,007	909	930	$\alpha$ -tujeno
5,16	5,171	5,164	5,165	915	939	$\alpha$ -pineno
5,536	5,551	5,54	5,542	928	-	ni
6,265	6,332	6,286	6,294	956	975	sabineno
6,818	6,846	6,828	6,831	975	991	mirceno
7,303	7,359	7,318	7,327	993	1002	$\Delta$ -2-careno
7,554	7,571	7,562	7,562	1002	1017	$\alpha$ -terpineno
7,789	-	7,798	7,794	1009	1025	p-cimeno
7,921	7,968	7,937	7,942	1013	1029	limoneno
8,232	8,247	8,238	8,239	1022	1037	(Z)- $\beta$ -ocimeno
8,539	8,593	8,552	8,561	1032	1050	(E)- $\beta$ -ocimeno
8,827	8,847	8,835	8,836	1041	1060	$\gamma$ -terpineno
9,665	9,684	9,673	9,674	1067	1088	terpinoleno

TABELA 5.15: Compostos identificados no óleo essencial das folhas de *C. sinensis* sobre *C. limonia* após a remoção das cigarrinhas - Continuação.

10,177	10,235	10,192	10,201	1083	1097	linalool
11,754	11,821	11,778	11,784	1132	1153	citronelal
12,498	12,518	12,508	12,508	1154	1177	terpinen-4-ol
12,958	12,964	12,96	12,961	1168	1189	$\alpha$ -terpineol
-	13,972	13,952	13,962	1199	1230	nerol
14,301	14,378	14,319	14,333	1212	1238	neral
15,181	15,275	15,196	15,217	1245	1267	geranial
17,512	17,522	17,522	17,519	1329	1353	citronelil acetato
17,759	17,775	17,774	17,769	1338	1362	neril acetato
18,302	18,314	18,318	18,311	1358	1381	geranil acetato
18,514	18,54	18,529	18,528	1366	1391	$\beta$ -elemeno
19,234	19,252	19,25	19,245	1392	1419	(E)-cariofileno
20,162	20,208	20,173	20,181	1432	1455	$\alpha$ -humuleno
25,575	25,597	25,585	25,586	1699	1700	$\beta$ -sinensal
26,66	26,462	26,472	26,531	1755	1757	$\alpha$ - sinensal
27,751	27,636	27,695	27,694	1833	-	ni
27,955	27,967	27,975	27,966	1856	-	ni
28,23	28,242	28,236	28,236	1879	-	ni
31,128	31,104	31,109	31,114	2141	-	ni
34,388	34,373	34,378	34,380	2494	-	ni

Tempo de retenção (tr – min.); Tempo de retenção médio (tr M – min.); Índice de Retenção de Kovats médio calculado (IR M) e Índice de Retenção de Kovats ADAMS, 2001 (IR<sup>\*</sup>). OEPCA – Experimento realizado após a remoção de cigarrinhas, sendo a primeira replicata; OEPCB – Experimento realizado após a remoção de cigarrinhas, sendo a segunda replicata; OEPCD – Experimento realizado após a remoção de cigarrinhas, sendo a terceira replicata; ni- não identificados.

Identificou-se 27 compostos presentes no óleo essencial das folhas da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* sob a Condição 3, sendo o sabineno o composto majoritário, seguido do  $\Delta$ -2-careno. No total detectou-se 33 compostos, no entanto seis destes não foram identificados, pois não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos na literatura.

### 5.2.1.2.3. Análise Quimiométrica dos dados de CG-EM dos Óleos Essenciais de *C. sinensis* sobre *C. limonia*

Para uma melhor visualização e interpretação dos dados utilizou-se a técnica de Quimiometria, com o programa Pirouette versão 2.02, da Infometrix. A matriz de dados foi gerada com as áreas dos picos dos cromatogramas dos óleos essenciais obtidos nas diferentes condições, apresentando-se 6 linhas e 36 colunas, correspondentes às duas amostras em replicatas e às variáveis, respectivamente.

A análise quimiométrica foi realizada utilizando um número máximo de componentes principais igual a 5, com pré-processamento autoescalado e normalização dos dados. Com estes parâmetros, verificou-se que a PC1 apresentou 33,8 % da informação total do sistema; utilizou-se posto 5 para considerar todas informações fornecidas (Tabela 5.16).

TABELA 5.16: Porcentagens das componentes principais do sistema (óleos essências extraídos de *C. sinensis* sobre *C. limonia*) com pré-processamento.

	<b>Variância</b>	<b>Porcentagem</b>	<b>Porcentagem Cumulativa</b>
<b>PC1</b>	59.22814	33.84465	33.84465
<b>PC2</b>	50.28913	28.73665	62.58130
<b>PC3</b>	33.79891	19.31366	81.89496
<b>PC4</b>	19.72628	11.27216	93.16711
<b>PC5</b>	11.95754	6.83288	99.99999

O gráfico de *scores* de PC1xPC3 (53,15 % de informação total do sistema) está apresentado a seguir.

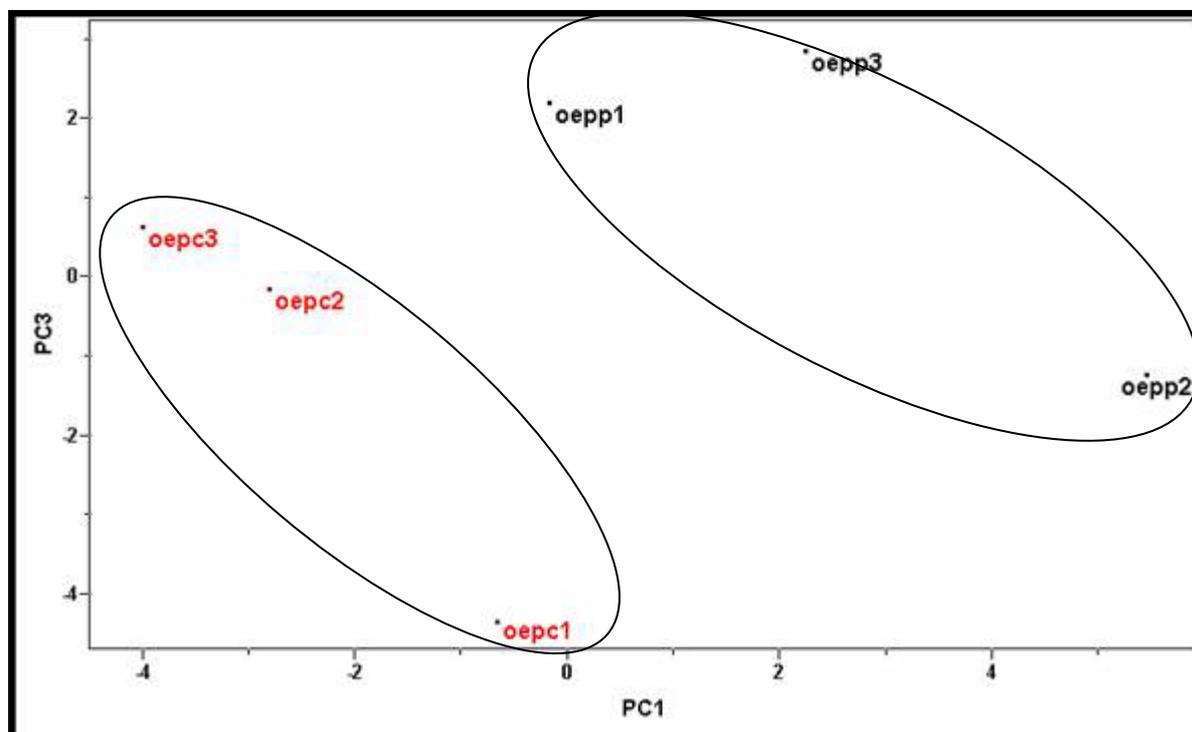


GRÁFICO 5.12: Gráfico de *scores* de todas amostras dos óleos essenciais de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC3, 33,84 e 19,31 %, respectivamente).

O gráfico apresentou agrupamentos distintos para cada condição, separando-as em dois grupos, com proximidade das replicatas, no entanto, deve-se notar que neste caso, a escala do eixo y está mais próxima que no caso dos experimentos com os voláteis, o que indica que não há grande diferença nas duas condições empregadas.

A partir do gráfico de *loadings* de PC1XPC3 (Gráfico 5.13, p. 226), observou-se que diferentemente dos experimentos com voláteis, não há apenas poucos compostos que fazem a distinção de cada condição e sim um grande número destes. Verificou-se, também, que os compostos com IK = 1299, 2384, 1199 e 2494 são alguns dos responsáveis pela distinção das amostras, sendo os dois primeiros responsáveis pelos óleos essenciais da planta enxertada sem ter sido submetida à presença de cigarrinhas (OEPP) estarem na parte superior e direita, e os dois últimos responsáveis pelos óleos essenciais do enxerto após a remoção dos vetores (OEPC) estarem na parte esquerda inferior no gráfico 5.12.

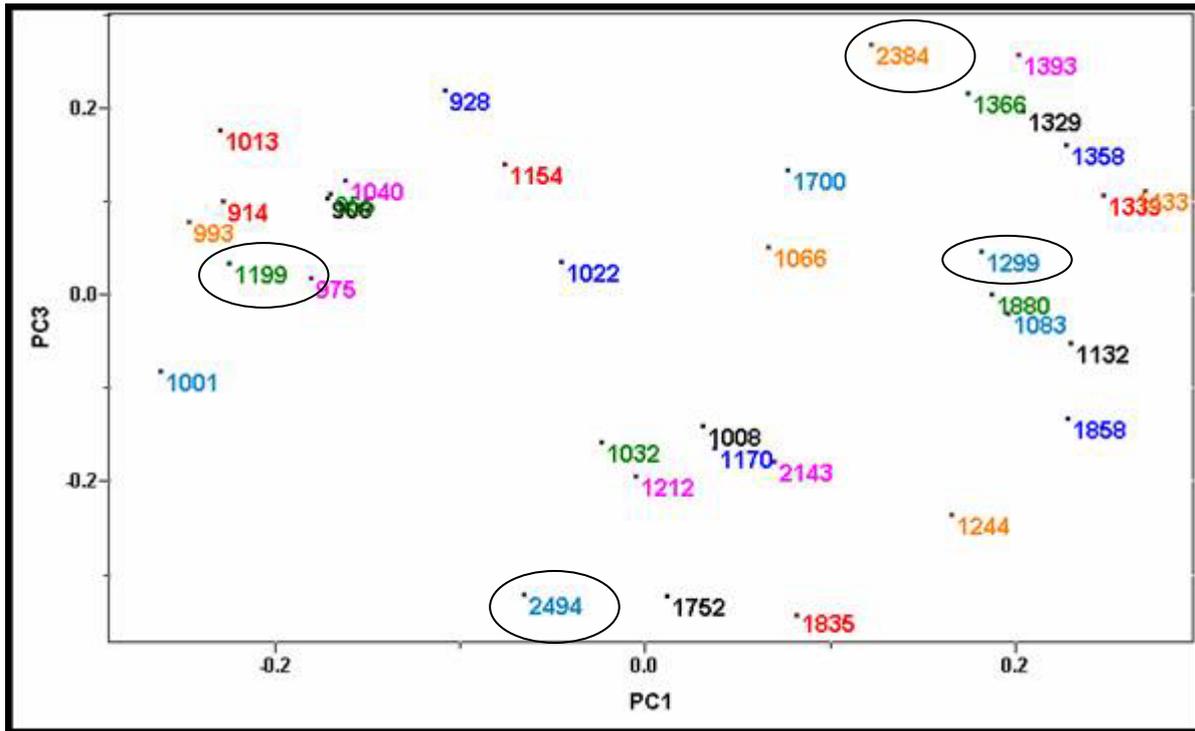


GRÁFICO 5.13: Gráfico de *loadings* de todas amostras dos óleos essenciais de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC3, 33,84 e 19,31 %, respectivamente).

Analisou-se os dados considerando-se PC1xPC2 (Gráfico 5.14, p. 227), o que corresponde a 62,58 % da informação total do sistema, para verificar se as observações eram semelhantes.

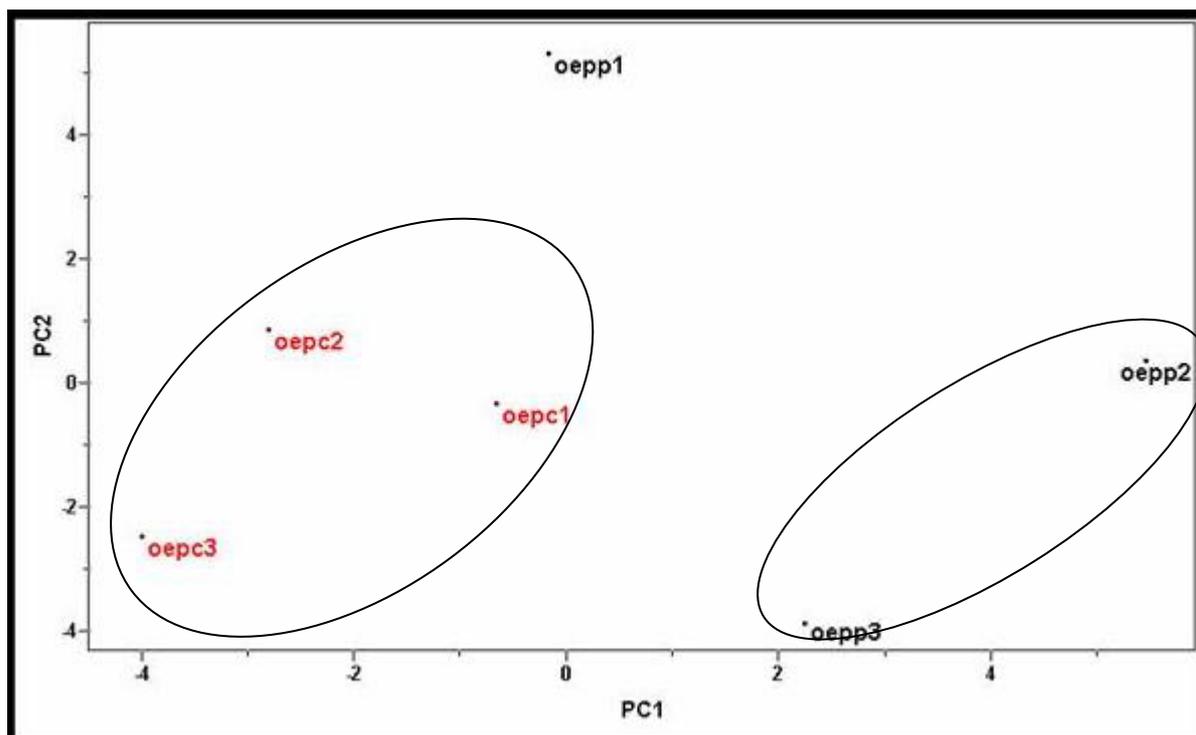


GRÁFICO 5.14: Gráfico de *scores* de todas amostras dos óleos essenciais de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC2, 33,84 e 28,74 %, respectivamente).

Observa-se, novamente, a separação dos dois grupos e a similaridade entre as replicatas, porém, novamente verifica-se que a escala no eixo y é menor que as obtidas nos experimentos com voláteis.

A partir do gráfico de *loadings* de PC1xPC2 (Gráfico 5.15, p. 228) observou-se os mesmos resultados que o gráfico PC1xPC3. Neste caso, os compostos com IK = 1199 e 2494 deslocam as amostras oepc para o lado esquerdo, enquanto os compostos com IK = 1299 e 2384 são os responsáveis pelas amostras oepp estarem deslocadas para o lado direito do gráfico de PC1xPC2.

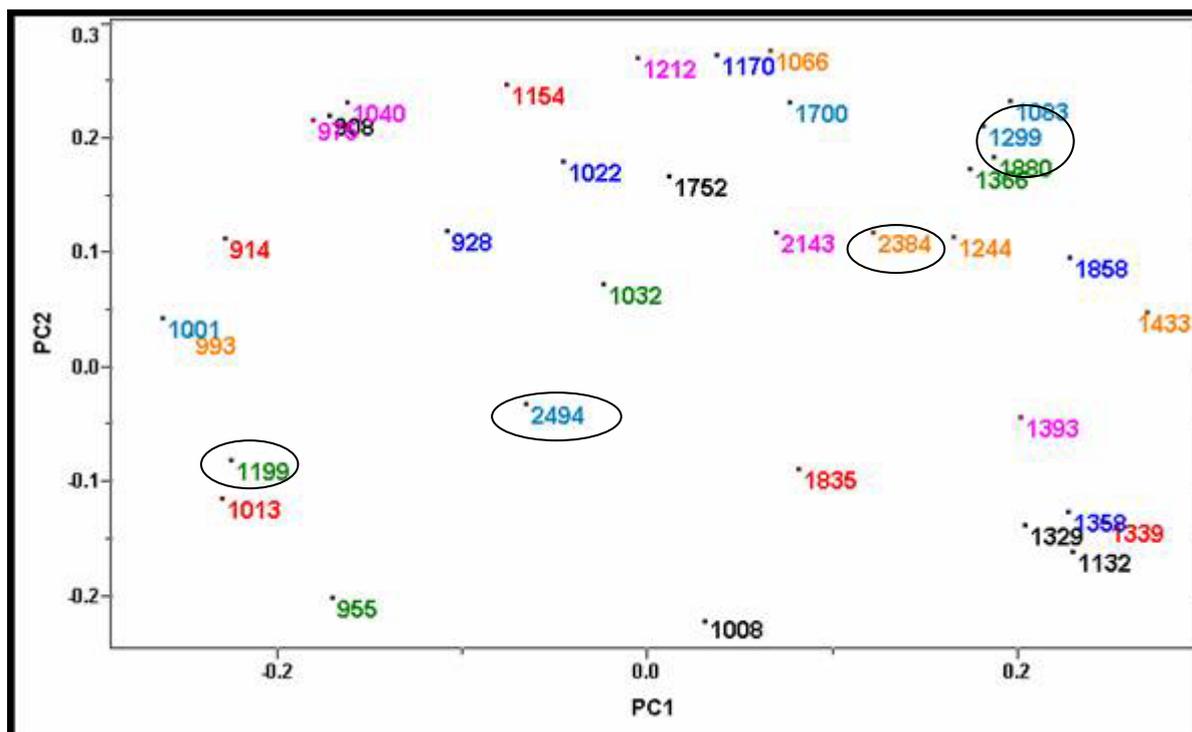


GRÁFICO 5.15: Gráfico de *loadings* de todas amostras dos óleos essenciais de *C. sinensis* sobre *C. limonia* (PC1 x PC2, 33,84 e 28,74 %, respectivamente).

O gráfico do poder de modelagem mostrou que todos as variáveis apresentam mesma importância na distinção das condições.

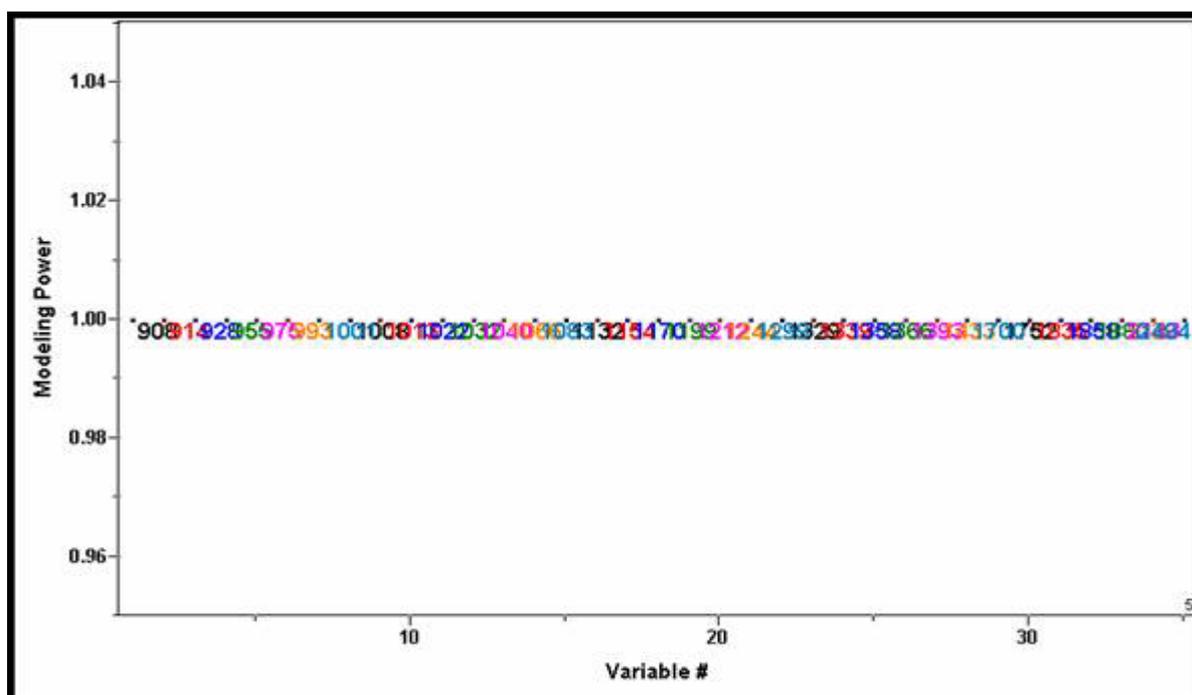


GRÁFICO 5.16: Gráfico do poder de modelagem de todas as variáveis dos óleos essenciais de *C. sinensis* sobre *C. limonia*.

Os compostos com IK = 1199, 1299, 2384 e 2494 foram uns dos mais importantes para a distinção dos óleos essenciais das plantas nas diferentes condições. Quando observa-se os cromatogramas das diferentes amostras, verifica-se que os compostos com IK = 1199 (nerol) e 2494 (ni) estão presentes apenas quando a planta foi submetida a cigarrinhas (condição 3); e os compostos com IK = 1299 (metildecanoato) e 2384 (ni) estão presentes apenas na planta sem ter tido contato com as cigarrinhas condição 1; o que justifica a discriminação obtida com as análises quimiométricas.

A Análise Hierárquica dos Agrupamentos (HCA) mostra que os compostos estão separados nas diferentes condições, e que suas replicatas estão agrupadas, com exceção da 1ª triplicata do óleo essencial extraído da planta sem ser submetida as cigarrinhas (oepp1), a qual apresentou um comportamento um pouco diferente das demais replicatas, podendo ser considerado um “desvio” (*outlier*).

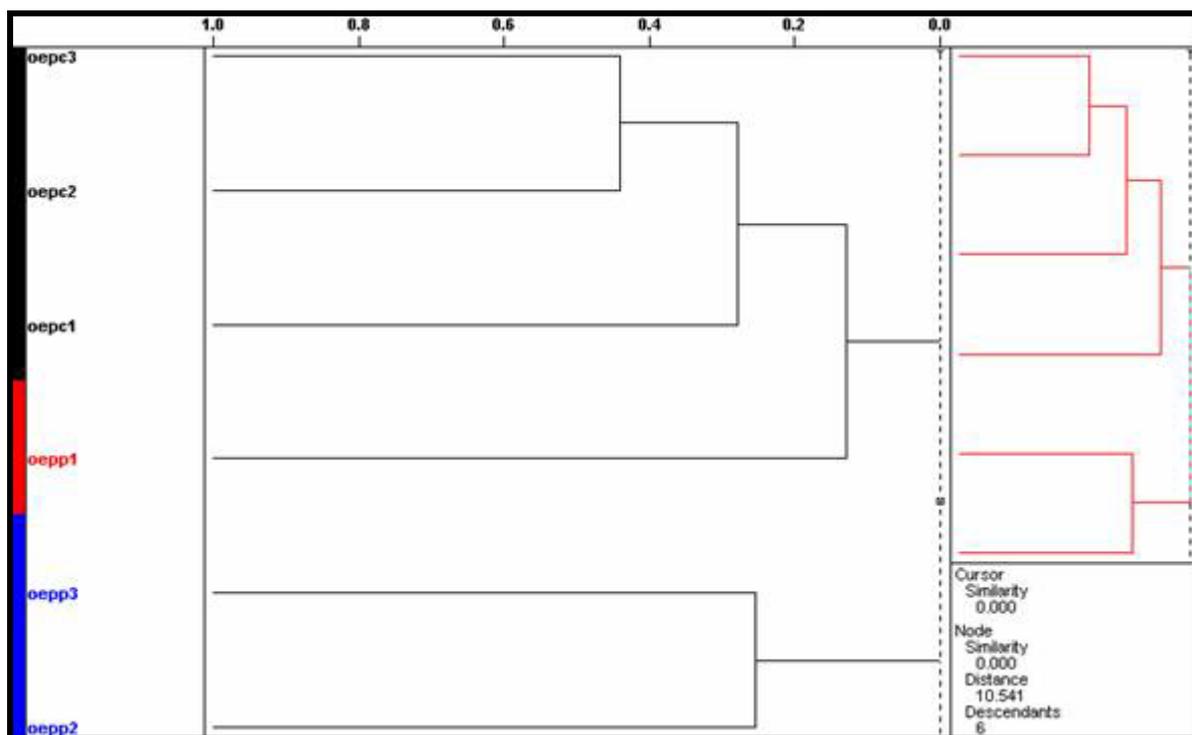


GRÁFICO 5.17: Gráfico de HCA de todas amostras com índice de similaridade 0,385.

A partir de todas estas análises quimiométricas, observa-se que os resultados obtidos com os óleos essenciais da planta sem a presença das cigarrinhas e após a remoção das mesmas não foi tão evidente com no caso dos voláteis das plantas. Isto ocorre, pois quando o óleo essencial é extraído da planta pela técnica de arraste

à vapor, não se extrai apenas os voláteis e sim compostos mais polares que são “arrastados” pela água; no caso dos compostos coletados por Headspace – SPME, estes são necessariamente voláteis, pois precisam volatilizar até a fibra acoplada no recipiente para serem adsorvidos. Isto é muito interessante, pois demonstra que a planta tem uma modificação química perceptível apenas em seus voláteis e não em seu óleo essencial.

## 5.2 Experimento Interação Planta – *Xylella fastidiosa*

### 5.2.1. Determinação de Hesperidina em diferentes espécies de *Citrus*

Há dados na literatura, conforme mencionado na introdução, que sugerem uma resposta da planta quando infectada pela bactéria *X. fastidiosa* através do aumento na quantidade de um metabólito secundário que ela mesma produz, a Hesperidina. No entanto, esta observação trata-se apenas de uma suposição, não é comprovado se há um acréscimo considerável da substância quando a planta está infectada, e se realmente a substância é a Hesperidina. Então, foram realizados experimentos de análise de teor de Hesperidina, utilizando-se a técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), em diversas espécies de *Citrus* com e sem sintomas de CVC para comprovar tais hipóteses.

### 5.2.2. Procedimento Experimental

Analisou-se as espécies: *C. limonia* sem sintomas de CVC (CLS); *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintomas de CVC (CSC); *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem sintomas de CVC (CSS); *C. reticulata* sem sintomas de CVC (CRS); as quais foram coletadas do Centro APTA Citros “*Sylvio Moreira*”. Foram analisados separadamente os extratos dos pecíolos das plantas, uma vez que é descrito na literatura que este é o local na planta onde se armazena uma maior quantidade de Hesperidina.

A otimização das condições de extração, de isolamento e de análise é necessária para a obtenção de um resultado satisfatório. Todas as etapas do experimento foram realizadas em duplicata para uma maior confiabilidade e reprodutibilidade dos dados.

#### 5.2.2.1. Extração e Isolamento das Amostras

Triturou-se 47,0 mg de pecíolos da planta e colocou-se em um tubo Falcon com 1 mL de MeOH com alto grau de pureza. Agitou-se por 30 segundos e logo após centrifugou-se a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 20°C. Retirou-se a parte líquida e secou-a. Repetiu-se este procedimento por mais duas vezes.

Realizou-se o isolamento a partir da técnica de SPE (Extração por Fase Sólida), utilizando-se cartuchos de Cyano (Bakerbond spe 7021-01). Dissolveu-se a amostra em 2 mL de hexano e passou-a pelo cartucho pré-condicionado com hexano. Passou-se 5 mL de hexano para que toda substância solúvel em hexano fosse removida do cartucho. Essa fração coletada foi descartada, pois contém apenas interferentes e não a substância de interesse. Por fim, dissolveu-se o restante da amostra em 1 mL de MeOH e passou-a no cartucho. Passou-se mais 600  $\mu$ L de MeOH. Secou-se a amostra, para posterior análise. Esta fração deve conter a Hesperidina (Figura 5.12), um flavonóide polar e que apresenta duas unidades de açúcares em sua molécula.

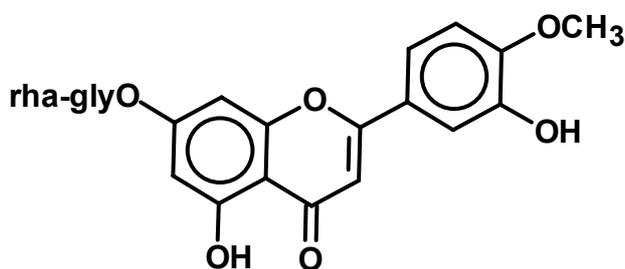


FIGURA 5.12: Estrutura da Hesperidina.

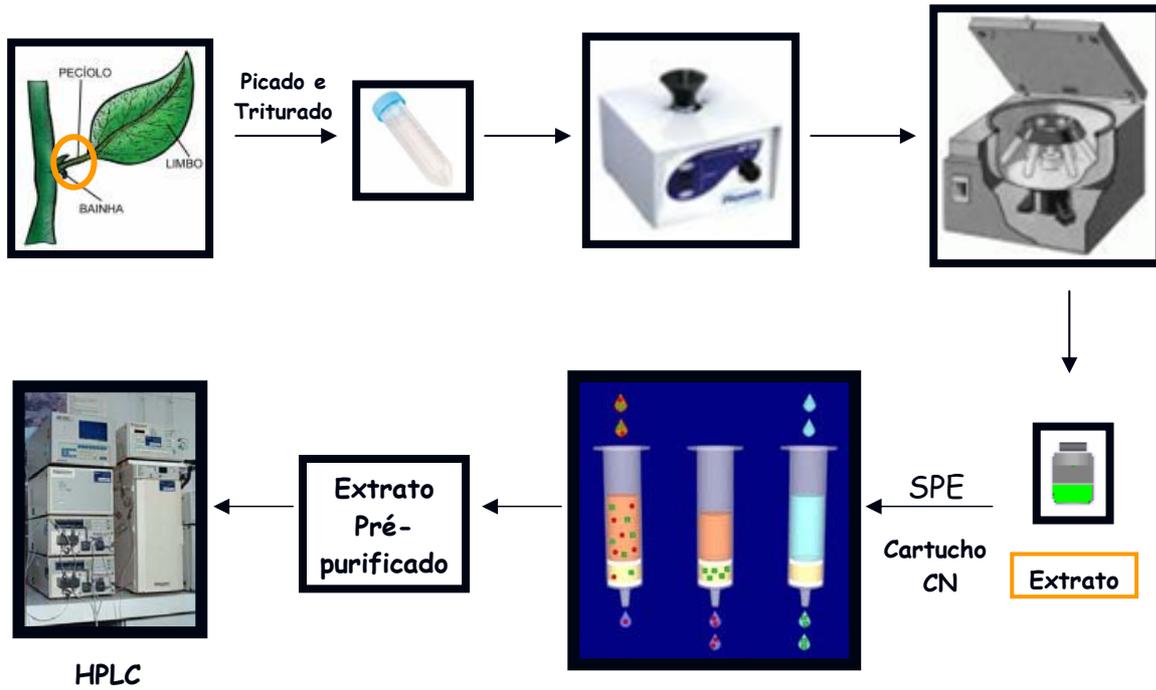
### 5.2.2.2. Análise das Amostras por CLAE

Cada fração obtida foi dissolvida em 500  $\mu$ L de MeOH e colocada em um frasco para análise por injeção automática, evitando-se assim, erros devido a injeção não uniforme, e com isto a obtenção de um resultado mais preciso.

As condições otimizadas utilizadas para análise por CLAE foram: fase estacionária: coluna semi-preparativa C18- phenomenex: gemini (150 x 4,60mm / 5  $\mu$ m) e um holder com pré-filtro, fase móvel: H<sub>2</sub>O:MeOH:ACN (67,0:21,1:11,9), vazão de fluxo: 1 mL/min, volume da injeção: 20  $\mu$ L, comprimentos de onda: 282 nm. Nestas condições o padrão de Hesperidina (Aldrich) apresentou um pico em aproximadamente 13 minutos após a injeção.

Inicialmente condicionou-se a coluna para que não houvesse desvios nos resultados. As injeções foram programadas para 30 minutos de corrida, 10 minutos de limpeza e 12 minutos para recondicionamento da coluna. Injetou-se a série de extratos coletados, um branco contendo o solvente em que foi dissolvida a amostra (MeOH), e o padrão nas concentrações de 50 e 200  $\mu$ g/mL.

A seguir está representado um esquema de toda metodologia otimizada para a análise do teor de Hesperidina em diferentes espécies de citros.



ESQUEMA 5.5: Fluxograma da metodologia empregada para análise comparativa do teor de Hesperidina em diferentes espécies de *Citrus*.

## 5.2.3. Resultados e Discussão

### 5.2.3.1. Análise dos cromatogramas obtidos

A primeira análise foi realizada injetando-se o padrão de Hesperidina em duas diferentes concentrações: 200  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ ; os cromatogramas obtidos (eixo x = Abs e eixo y = minutos) estão mostrados nas Figuras 5.13 e 5.14, respectivamente. Observa-se que o cromatograma do padrão injetado em maior concentração possui o pico da Hesperidina com maior área, o que é coerente, pois contém uma maior quantidade da mesma. A partir das ferramentas do software, obteve-se o tempo de retenção do pico da Hesperidina dos padrões injetados.

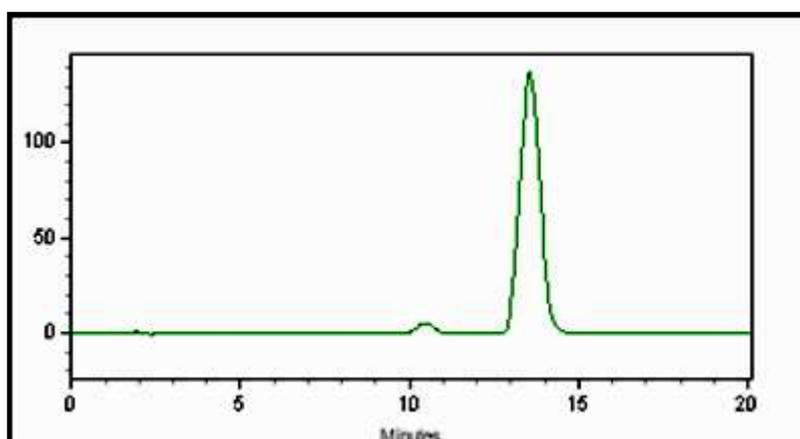


FIGURA 5.13: Cromatograma obtido a partir da injeção do padrão de Hesperidina 200  $\mu\text{g/mL}$ .

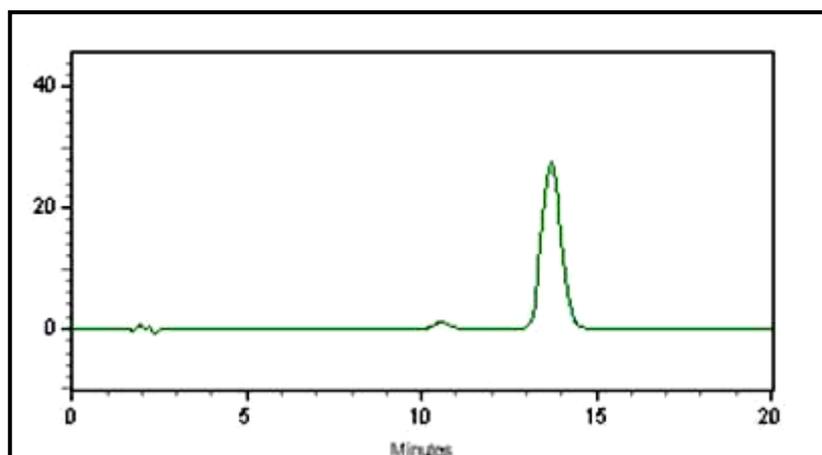


FIGURA 5.14: Cromatograma obtido a partir da injeção do padrão de Hesperidina 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Injetou-se o extrato pré-purificado do *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintomas de CVC e obteve-se os cromatogramas contendo o pico próximo a 12,9 minutos de corrida cromatográfica (Figura 5.15 e 5.16), o qual, devido a comparação com o tempo pico do padrão, corresponde a Hesperidina.

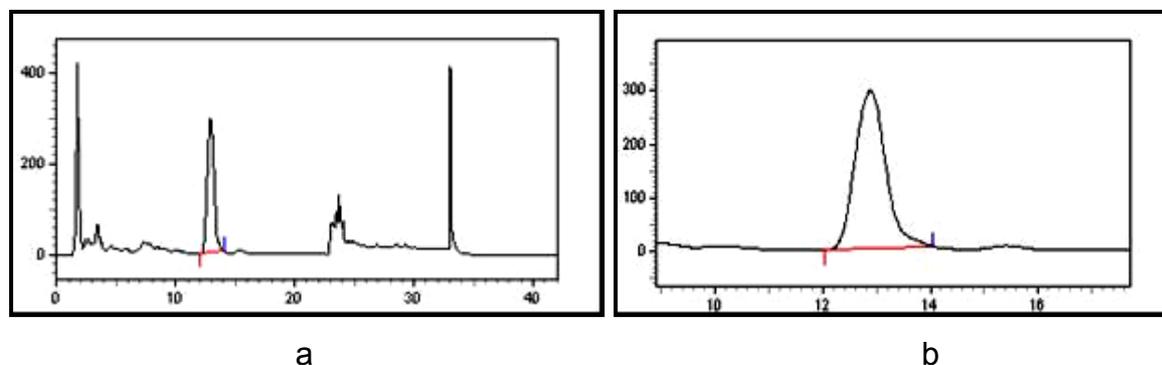


FIGURA 5.15: Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CSC (A).

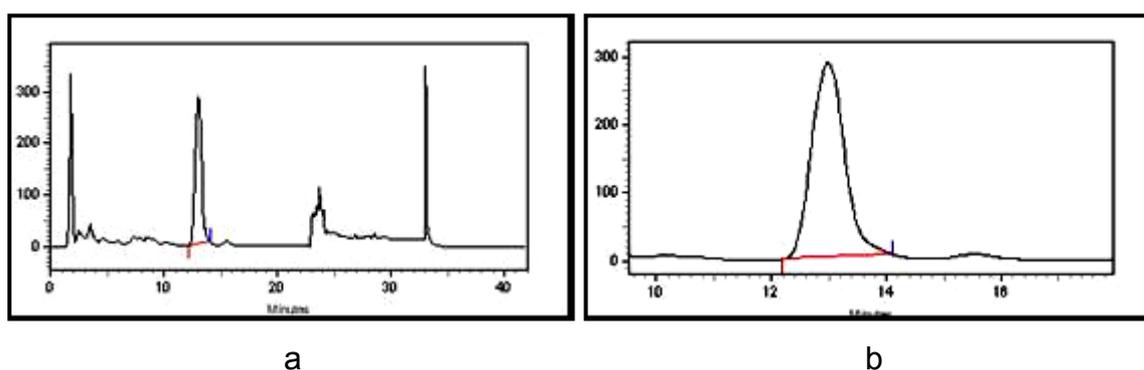
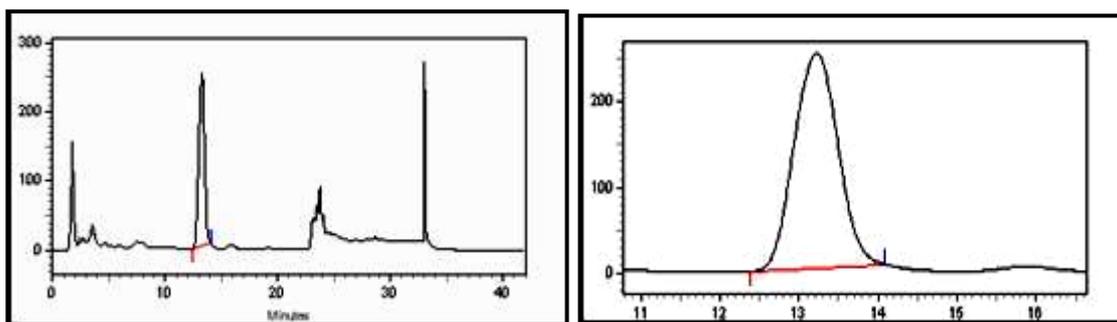


FIGURA 5.16: Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CSC (B):

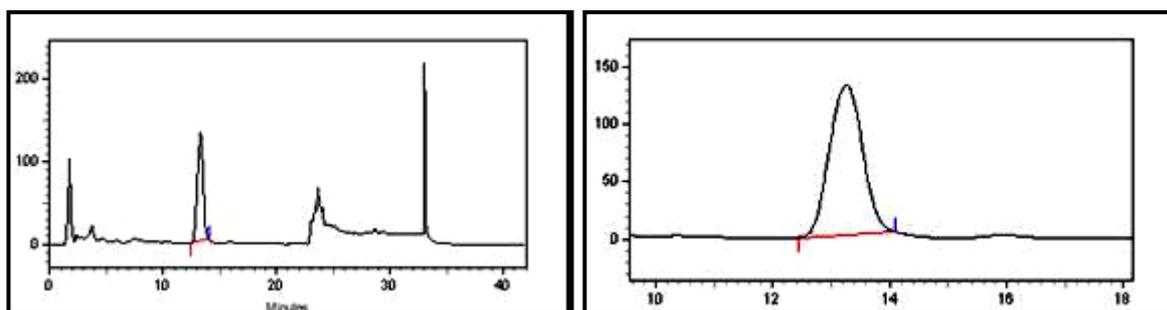
Os extratos analisados do *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem sintomas de CVC apresentaram também o pico correspondente a Hesperidina, próximo a 13,2 minutos de corrida cromatográfica (Figura 5.17 e 5.18, p. 236); porém as áreas dos picos da Hesperidina foram bem menores comparando-se com as dos *C. sinensis* sobre *C. limonia* doentes.



a

b

FIGURA 5.17: Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CSS (A).

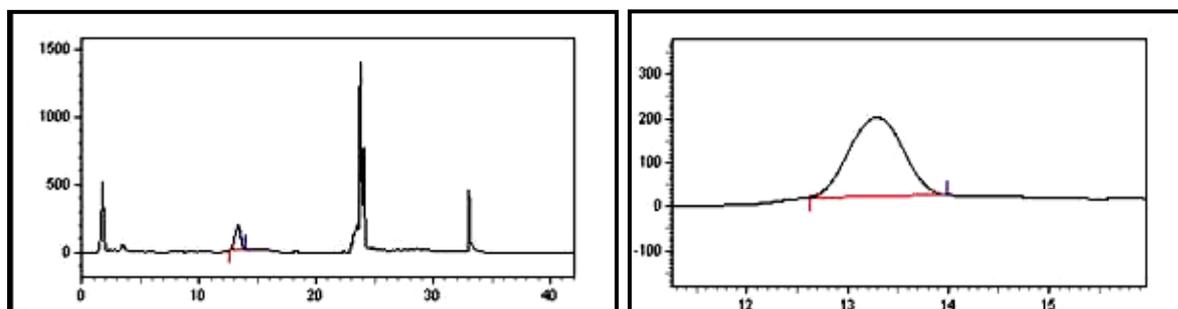


a

b

FIGURA 5.18: Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CSS (B).

Os extratos de *C. reticulata* sem a bactéria apresentaram o pico referente a Hesperidina, próximo a 13,2 minutos de corrida cromatográfica (Figura 5.19 e 5.20, p. 237). A área foi relativamente próxima a do extrato de *C. sinensis* sobre *C. limonia* sadia.



a

b

FIGURA 5.19: Cromatograma total (a) e ampliado (b) de injeção de CRS (A).

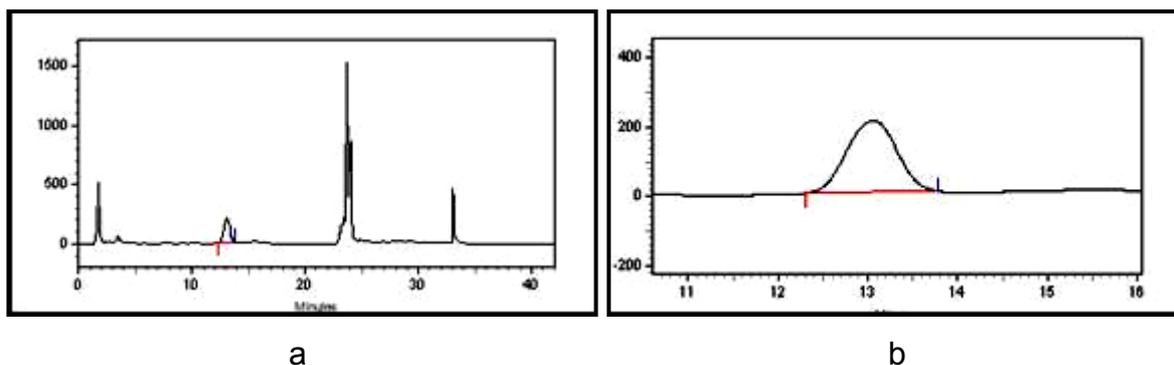


FIGURA 5.20: Cromatograma total (a) e ampliado (b) de injeção de CRS (B).

O extrato do *C. limonia* sem sintomas de CVC apresentou o pico de Hesperidina em aproximadamente 13,1 minutos de corrida cromatográfica. As áreas dos picos dos extratos referentes a esta planta foram bem menores que as dos demais extratos.

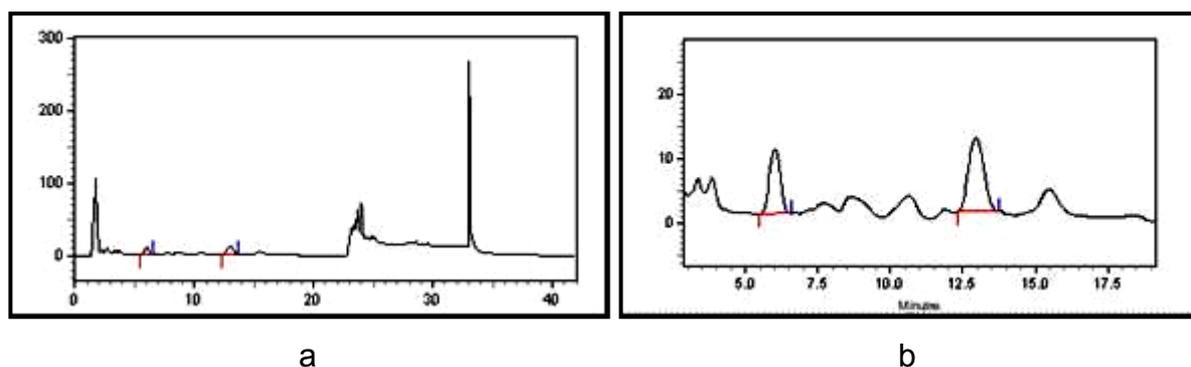


FIGURA 5.21: Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CLS (A).

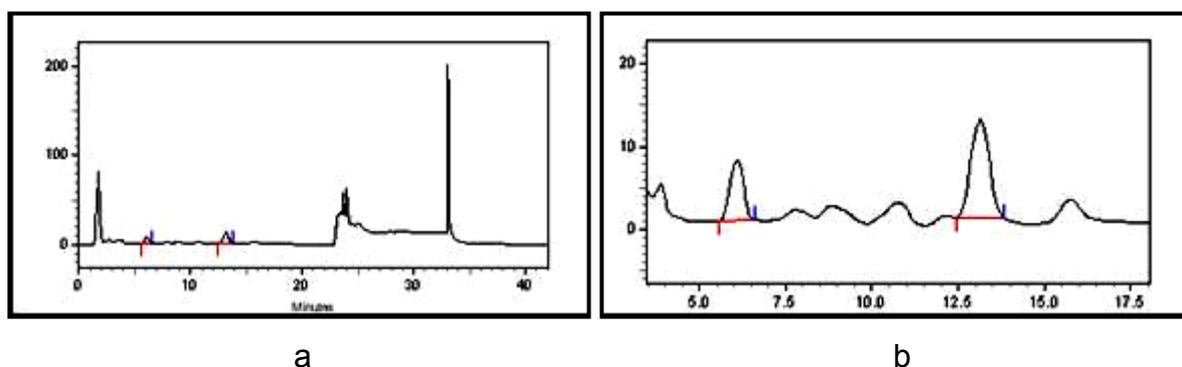


FIGURA 5.22: Cromatograma total (a) e ampliado (b) da injeção de CLS (B).

Pode-se verificar que todos os extratos apresentaram o pico referente a Hesperidina; e para comprovar se houve um aumento ou diminuição de quantidade, obteve-se, a partir do software do equipamento, a área de cada pico referente a substância de interesse em cada fração e calculou-se a área relativa entre elas. Como os experimentos foram realizados em replicatas, calculou-se a média dos tempos de retenção e das áreas dos picos dos extratos semelhantes (Tabela 5.17).

TABELA 5.17: Extratos analisados, e suas respectivas áreas dos picos e tempos de retenção.

<b>Extrato</b>	<b>Área do Pico</b>	<b>Tempo de retenção</b>
<i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> com bactéria (A)	11.777.376	12,880
<i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> com bactéria (B)	11.462.249	12,982
<i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> com bactéria (Média)	11.619.812,5	12,931
<i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> sem bactéria (A)	9.709.505	13,219
<i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> sem bactéria (B)	5.166.934	13,258
<i>C. sinensis</i> sobre <i>C. limonia</i> sem bactéria (Média)	7.537.152,3	13,226
<i>C. reticulata</i> sem bactéria (A)	6.649.392	13,286
<i>C. reticulata</i> sem bactéria (B)	8.011.598	13,054
<i>C. reticulata</i> sem bactéria (Média)	7.330.495	13,170
<i>C. limonia</i> sem bactéria (A)	415.316	12,959
<i>C. limonia</i> sem bactéria (B)	446.201	13,139
<i>C. limonia</i> sem bactéria (Média)	430.758,5	13,049

A partir das áreas obtidas de cada extrato, verificou-se que há uma alteração na quantidade de Hesperidina nas diferentes espécies de citros, uma vez que cada espécie analisada, sem sintomas da doença, apresentou uma quantidade diferente da substância. O extrato do *C. limonia* foi o que conteve menor teor de Hesperidina.

E os extratos de *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem bactéria e de *C. reticulata* apresentaram um teor de Hesperidina próximos.

Quando considera-se o extrato da planta doente (*C. sinensis* sobre *C. limonia* com bactéria), nota-se que esta apresentou maior teor de Hesperidina, pois o pico referente a esta substância foi o que mostrou uma maior área.

Uma análise comparativa foi realizada utilizando-se as áreas médias de cada extrato. Considerou-se a área média do *C. sinensis* sobre *C. limonia* com bactéria como ponto de comparação, pois esta é a planta que apresenta diferença em relação às outras:

$$\frac{\text{CSS}}{\text{CSC}} = \frac{7.537.152,3}{11.619.812,5} = 0,65 \times 100\% = 65 \%$$

$$\frac{\text{CRS}}{\text{CSC}} = \frac{7.330.495}{11.619.812,5} = 0,63 \times 100\% = 63 \%$$

$$\frac{\text{CLS}}{\text{CSC}} = \frac{430.758,5}{11.619.812,5} = 0,04 \times 100\% = 4 \%$$

A partir desta análise comparativa, pode-se dizer que realmente o *C. sinensis* sobre *C. limonia* com bactéria apresentou uma maior quantidade Hesperidina em relação ao *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem bactéria, aproximadamente 35% a mais; e entre todos os extratos analisados o *C. limonia* foi o que apresentou menor teor de Hesperidina, apenas 4% da quantidade que o *C. sinensis* sobre *C. limonia* com sintoma. Estes resultados estão coerentes e compatíveis com a análise visual realizada anteriormente considerando apenas a absorbância dos picos.

O estudo fitoquímico das raízes de *C. limonia* proporcionou o isolamento e identificação de 16 metabólitos secundários: as cumarinas, escopoletina, isoescopoletina, demetilsuberosina, clausarina, xantoarnol; as piranocumarinas, xantiletina, seselina, xantoxiletina, trans-kelactona, trans-decursidinol, junosmarina; os piranoflavonóides, limonianina e 5,4'-diidróxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona; e os esteróides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol. As cumarinas trans-kelactona e trans-decursidinol, não são comuns em *Citrus* e na família Rutaceae, sendo relatada pela literatura apenas na família Apiaceae. A 5,4'-diidróxi-6-(3''-metil-2''-butenil)-2'',2''-dimetilpirano(5'',6''-7,8)flavanona é uma flavanona inédita. Este estudo fitoquímico do *C. limonia* contribuiu para a ampliação do conhecimento químico da família Rutaceae, ajudando na compreensão e classificação do gênero.

Verificou-se que o perfil químico das raízes de *C. limonia* é muito similar ao das raízes de *C. sinensis* sobre *C. limonia*, principalmente devido a grande quantidade de cumarinas e de substâncias preniladas isoladas. No entanto, quando compara-se estes perfis químicos com a parte superior da planta enxertada, correspondente a *C. sinensis*, observa-se uma grande distinção entre os metabólitos secundários, uma vez que esta possui uma grande quantidade de compostos não prenilados e poucas cumarinas.

As únicas substâncias isoladas em comum nas diferentes plantas foram as piranocumarinas Xantiletina e Xantoxiletina. Porém, estas foram isoladas em quantidades ínfimas na parte superior da planta enxertada e em grande quantidade na parte inferior desta última e da planta não enxertada. Isto é muito interessante, pois sugere que a planta enxertada não produza estas substâncias e sim que ocorre um mecanismo de translocação de metabólitos secundários da parte inferior para a parte superior da planta enxertada. Estudos enzimáticos vêm sendo realizados a fim de comprovar tal hipótese.

Os ensaios contra o agente causal da CVC, *X. fastidiosa*, possibilitou a determinação da MIC de diversas classes de substâncias químicas, como cumarinas, limonóides e flavonóides, isoladas de produtos naturais, as quais ainda não haviam sido ensaiadas. Verificou-se que não há grande variação na inibição da bactéria quando esta encontra-se na fase exponencial ou no início da fase estacionária; sugerindo a utilização da fase exponencial para estes

ensaios, uma vez que obtém-se resultados com maior rapidez, o que favorece a dinâmica dos experimentos.

As substâncias que apresentaram maior potencial inibitório foram a Catequina e a Xantiletina, sendo esta última isolada em grande quantidade de *C. limonia*, o que sugere estar associada ao mecanismo de resistência deste frente a CVC, uma vez que é isolada em pouquíssima quantidade do *C. sinensis* sobre *C. limonia*, o qual é suscetível a doença. Pode-se concluir que as piranocumarinas e as flavanonas são classes promissoras contra *X. fastidiosa*.

A análise comparativa de Hesperidina em diferentes espécies de citros determinou quantidades próximas de Hesperidina em *C. sinensis* sem CVC e em *C. reticulata* sem CVC; o *C. limonia* foi o gênero que apresentou menor teor de Hesperidina. Verificou-se que há um aumento no teor deste flavonóide glicosilado em plantas de *C. sinensis* sobre *C. limonia* contendo a CVC quando comparadas com estas sadias, o que mostra uma resposta das mesmas frente a infecção; esclarecendo o que estava duvidoso na literatura e comprovando algumas hipóteses sugeridas. A partir da quantidade de Hesperidina que uma planta possui pode-se também detectar se esta possui ou não a bactéria, possibilitando um método alternativo de diagnóstico da doença.

O estudo de interação planta / inseto mostrou que a planta tem uma resposta nítida quando em contato com cigarrinhas transmissoras de CVC, alterando seus voláteis emitidos, e que esta não retorna aos seus componentes químicos iniciais, mesmo após 48 horas da remoção dos vetores.

Há compostos voláteis que são exalados em maior quantidade quando em contato com as cigarrinhas, indicando que a planta libera-os em resposta ao ataque pelo inseto, alterando seu metabolismo. Para não afetar seus processos vitais, ela retorna ao equilíbrio metabólico variando seus constituintes secundários, aumentando suas concentrações ou sintetizando novos; estes podem servir como alomônios de agregação, indicando a presença de alimento e atraindo um número maior destes insetos no campo. Alguns voláteis são exalados em maior quantidade após a remoção das cigarrinhas, assim como o 2-etil-1-hexanol, agindo como um sinalizador para que o seu metabolismo possa retornar ao equilíbrio. Outros páram de ser liberados, ou diminuem de percentual, como observado para o composto com

IK = 1907, sendo um mecanismo de defesa da planta contra as cigarrinhas, não atraindo mais agentes vetores. Isto sugere que estes últimos atraem os insetos e, portanto, possam ser utilizados como cairômonios, proporcionando um método ecologicamente correto, o qual não agride o meio ambiente e nem o ser humano, no controle de cigarrinhas nos pomares, diferentemente dos inseticidas utilizados atualmente. Esta é uma nova alternativa no controle da CVC, uma vez que eliminando os vetores, a doença não será mais transmitida.

Houve também uma alteração nos compostos identificados nos óleos essenciais da planta em diferentes condições, no entanto, não foi tão pronunciada como nos casos dos voláteis.

A análise quimiométrica foi fundamental para a obtenção de resultados claros e confiáveis, mostrando que todas as replicatas e experimentos estavam coerentes, podendo-se concluir que a planta realmente sofre modificações, principalmente em seus voláteis quando atacada por um agente, neste caso a cigarrinha vetor da CVC. Pode-se dizer também que a técnica de HS-SPME além de muito rápida, prática, livre de solventes e não destrutiva é altamente aplicável e reproduzível para experimentos com plantas e insetos, e juntamente com a quimiometria pode fornecer resultados muito interessantes do ponto de vista ecológico e econômico.

Como conclusão geral, este trabalho indicou novas perspectivas para o controle da CVC até então não utilizadas, como a inibição direta do microrganismo causal da doença a partir de produtos naturais e a utilização de métodos ecologicamente corretos na eliminação dos agentes vetores e um método alternativo de diagnóstico para plantas com esta doença.

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

AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R. S.; BANSAL, M. C.; *Flavonoids*. cap. 3, p.106-110, 1983.

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

ALVES, E. *Xylella fastidiosa* - adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 122p., 2003.

ANDRADE, R. A.; Martins, A. B. G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros, *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol.25, no.1, 2003

AYRES, A. J. Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP, 59p., 2000.

CHAGAS, C. M; ROSSETI, V.; BERETTA, M. J. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 134, 306-312, 1992.

CHANG, S.H. Flavonoids, coumarins and acridone alkaloids from the root bark of *Citrus limonia*. *Phytochemistry*, vol.29,no.1,99.351-353,1990.

DALLA PRIA JR, W.; LACAVA, P.M.; LI, W.; MIRANDA, V.S.; COSTA, P.I.; FARIAS, P.R.S.; HARTUNG, J.S.; PEREIRA, E.O.; FRANCISCHINI, F.J. *Xylella fastidiosa* em frutos e sementes de laranja-doce afetados pela clorose variegada dos citros. *Laranja*, v.23, n.1, p.183-202, 2002.

DAVIS, M. J.; FRENCH, W. J.; SCHAAD, N. W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology*, 6 (5), p.309-314, 1981.

FLAMINI, G.; CIONI P. L.; MORELLI I. Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. *Journal of Chromatography A*, 998, p.229–233, 2003.

FREITAG, J. H. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathology*, 41, 920-934, 1951.

FUNDECITRUS. Descobertos mais seis vetores da CVC. *Revista Fundecitrus* 94:8, 41999.

FUNDECITRUS. Manual de CVC. 13p., 2003.

FUNDECITRUS. Manual de viveiros. 10p., 2003a.

GRAVENA, S.; LOPES, J. R. S.; PAIVA, P. E. B.; YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R. p. 36-53 in: *Citrus Variegated Chlorosis*. L. C. Donadio; C. S. Moreira. Estação Experimental de Bebedouro, Bebedouro, SP, Brazil, 1998.

HOPKINS, D. L.; ADLERZ, W. C. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. *Plant Disease*, 72, 429-431, 1988.

IKESHIRO, Y.; MASE, I.; TOMITA, Y. Dihydropyranocoumarins from roots of *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry*, v.31, p. 4303-4306, 1992.

JAIMES, E. P. G.; SOUZA, P. S.; WICKERT, E.; DONADIO, L. C. Avaliação da resistência à *Xylella fastidiosa* em germoplasma de tangerina e híbridos introduzidos da Itália e Córsega. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24, 579-582, 2002.

JANG, D.S.; CUENDET, M.; HAWTHORNE, M.E.; KARDONO, L.B.S.; KAWANISHI, K.; FONG, H.H.S.; MEHTA, R.G.; PAZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Phytochemistry*, v.61, p.867-872, 2002.

JU – ICHI, M.; INOVE, M.; TSUDA, R.; SHIBUKAWA, N. Junosmarin, a new khellactone ester from *Citrus Junos tanaka*. *Heterocycles*, 24 (10), p. 2777-2779, 1986.

KIM, T. H.; LEE, S.M.; KIM, Y.S.; KIM, K.H.; OH, S.; LEE, H.J. Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. *Food Chemistry*, v.83, p.151-158, 2003.

KRÜGNER, R., LOPES; M. T. V. C.; SANTOS, J. S.; BERETTA, M. J. G.; LOPES, J. R. S. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species. Page 81 in: Proc. 14th Conf. Int. Org. *Citrus Virol. Brazil*, 1998.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIM-F<sup>o</sup>, A.; VILDOSO, C. I. A.; DELLA-COLETTA F<sup>o</sup>, H. Fungos, procariontas e doenças abióticas. *Citros*, 1<sup>a</sup> Edição, FAPESP, 2005.

LARANJEIRA, F. F.; POMPEU Jr., J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J. O.; CARVALHO, S. A.; COLETTA FILHO, H. D. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira*, 23, 147-154, 1998.

LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R.P.P.; KRÜGNER, R.; GARCIA JUNIOR, A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21(Suplemento), p.343, 1996.

LOPES, S. A.; RIBEIRO, D. M.; ROBERTO, P. G.; FRANÇA, S. C.; SANTOS, J. M. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant - *Xylella fastidiosa* interactions. *Plant Disease*, 84, 827-830, 2000.

LOPES, S. A.; BERIAM, L. O. S.; GRABERT, E.; TORRES, S. C. Z.; CAMPERONI, G.; GARCIA, A. L.; FRANÇA, S. C. Populações distintas e patologicamente homogêneas de *Xylella fastidiosa* colonizam plantas de citros e café no campo. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 392, 2003.

LOPES, S. A.; TEIXEIRA, D. C.; PEREIRA, E. O.; TORRES, S. C. Z.; FERNANDES, N. G.; LI, W. Progressos no desenvolvimento de método de inoculação de *Xylella fastidiosa* em plantas cítricas. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 286, 2003.

LOPES, S. A.; MARCUSSI, S.; TORRES, S. C. Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C.; FRANÇA, S. C.; FERNANDES, N. G.; LOPES, J. R. S. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. *Plant Disease*, 87, 544-549, 2003.

LOPES, S. A. Reação diferencial de plantas de fumo à *Xylella fastidiosa* de citros e café. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 305, 2001.

LOPES, S. A., SOUZA, V. Colonização de plantas de fumo pela *Xylella fastidiosa* dos citros e transmissão do patógeno por cigarrinhas (*Ferrariana trivittata*). *Fitopatologia Brasileira*, 26, 305, 2001.

LOPES, S. A.; TEIXEIRA, D. C.; PEREIRA, E. O.; ROCHA, S. R. P.; SANTOS, M. A.; CAMPERONI, G.; SOUZA, V.; TORRES, S. C. Z. Otimização de testes de patogenicidade de *Xylella fastidiosa* em plantas de tabaco. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 62, 2002.

LI, W.; DONADIO, L. C.; HE, C.; SEMPIONATO, O. R. Método de avaliação de resistência à clorose variegada dos citros. *Laranja*, 17, 56-67, 1996.

MACHADO, M. A.; TARGON, M. L.; BERETTA, M. J. G.; LARANJEIRA, F. F.; CARVALHO, S. A. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre-enxertadas em laranja pêra com clorose variegada dos citros (CVC). *Fitopatologia Brasileira*, 22, 30-33, 1997.

MACIAS, F. A.; MASSANET, G. M.; RODRIGUEZ-LUIZ, F.; SALVA, I. <sup>13</sup>C NMR of coumarins I: 3-(1,1-dimethylallyl)derivatives. *Magnetic resonance in chemistry*, 27, 892-904, 1989.

NIELSEN, B.E. Coumarins of Umbelliferous plants. May, 1970.

PARRA, J. R. P.; LOPES, J.R.S.; ZUCCHI, R. A.; GUEDES, J. V. C.; Biologia de insetos-praga e vetores. *Citros*, 1ª Edição, FAPESP, 2005.

PATRA, A.; MITRA, A. K. Carbon-13 NMR signals of some natural coumarins and their derivatives. *Organic Magnetic Resonance*, 17 (3), 1981, 222-224.

PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 131-51, 1996.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. *Laranja*, 20(1), 55-76, 1999.

RAJU B. C.; GOHEEN A. C.; FRAZIER N. W. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plant and vectors in California. *Phytopathology*, 73,1309-13, 1983.

ROBERTO, S. R.; COUTINHO, A.; LIMA, J. E. O. de; MIRANDA, V. S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, n.4, p.517-518, 1996.

ROBERTO, S. R.; DALLA PRIA JR., W.; YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; FREITAS, E. P. Espécie e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiro de citros, em Gavião Peixoto (SP). *Laranja*, v.21, n.1, p.65-79, 2000.

RODRIGUEZ, O.; VÉGAS, F.; POMPEU, JR; AMARO, J.; A.A.; SEMPIONATO, O.R.; *Citricultura Brasileira*, Segunda Edição , Fundação Cargil, 1991.

ROSSETTI, V. ; GARNIER, M. ; BOVE, J. M. ; BERETTA, M. J. G. ; TEIXEIRA, A. R. R. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégué, une nouvelle maladie des agrumes au Bresil. *C. R. Acad. Sci.* 310, 345-349, 1990.

SILVA, M. F. G. F. da; GOTTLIEB, O. R.; EHRENDORFER, F. *Plant Systematics and Evolution*, 161:67,1988.

SIMPSON, A. J.; *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature*, 406(6792), 151-7, 2000.

SMALBERGER, T. M.; VLEGGAR, R.; WEBER, J. C. Flavonoids from *Tephrosia* – VII. *Tetrahedron*, v.30, p.3927-3931, 1974.

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

SWALLOW, W. H. Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. *Phytopathology*, St.Paul, v.75, n.8, p.882-889, 1985.

TORO, M. J. U.; MULLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C. Alkaloids and coumarins from *Ticorea longiflora*. *Phytochemistry*, 45 (4), p. 851-853, 1997.

TRAVENSOLO, R. F.; LEITE Jr., R. P. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de citros com clorose variegada. *Fitopatologia Brasileira*, 21, 336, 1996.

TUBELIS A. Difusão da clorose em pomares de São Paulo e Minas Gerais. *Inf. Coopercitrus*, 72, 24-30, 1992.

VILEGAS, W.; POZETTI, G. L. Coumarins from *Brosimum gaudichaudii*. *Journal of Natural Products*, 56 (3), p.416-417, 1993.

VET, L. E. M.; LENTEREN, J. C. V.; HEYMANS, M.; MEELIS, E. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiological Entomology*, v.8, p.97-106, 1983.

VRKOC, J.; SEDMERA, P. Extractives of *Chloroxylon Swietenia*. *Phytochemistry*, 11, 2647-2648, 1972.

YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R.; DALLA PRIA JR, W.; FELIPPE, M. R.; MIRANDA, V. S.; TEIXEIRA, D. C.; LOPES, J. R. S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. *Summa Phytopathologica*, 28, 178-181, 2002.

YAMAMOTO, P.T.; DALLA PRIA JR., W.; ROBERTO, S.R.; FELIPPE, M.R.; FREITAS, E.P. de. Flutuação Populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação. *Neotropical Entomology*, v.30, n.1, p.175-177, 2001.

WU, T.S.; HUANG, S.C.; LAI, J.S. Stem bark coumarins of *Citrus grandis*. *Phytochemistry*, 36 (1), p.217-219, 1994.

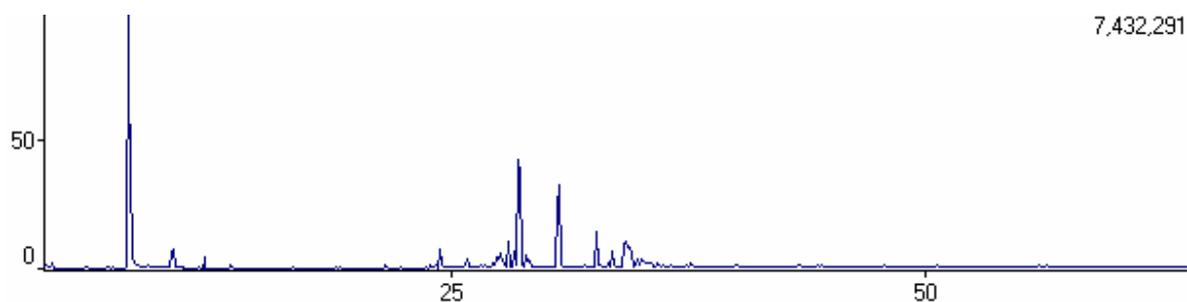
WU, T.S.; FURUKAMA, H. Acridone Alkaloids. VII. Constituents of *Citrus sinensis* Osbeck var. *Brasiliensis* TNAKA. Isolation and Characterization of Three New Acridone Alkaloids, and a New Coumarin. *Chemical Pharmacological Bulletin*, 31 (3), 901-906, 1983.

ZOU, Y.; LOBERA, M.; SNIDER, B. B. Synthesis of 2,3-Dihydro-3-hydroxyalkylbenzofurans from Epoxy Aldehydes. One-Step Syntheses of Brosimacutin G, Vaginidiol, Vaginol, Smyrindiol, Xanthoarnol, and Avicenol A. Biomimetic Syntheses of Angelicin and Psiralen. *Journal of Organic Chemistry*, 70 (5), 1761-1770.

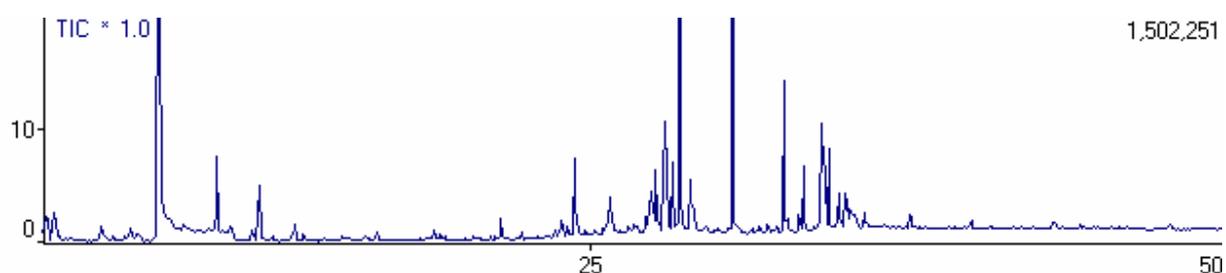
**Anexo:**

Cromatogramas obtidos sob as diferentes condições empregadas no experimento  
interação planta-inseto

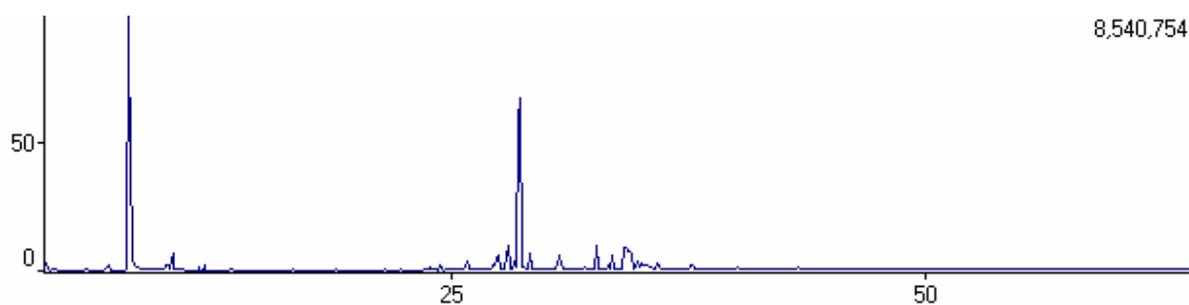
**1. Cromatogramas obtidos em replicata (1-3h2 e 1-3h4) dos compostos voláteis extraídos da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem sofrer nenhuma alteração:**



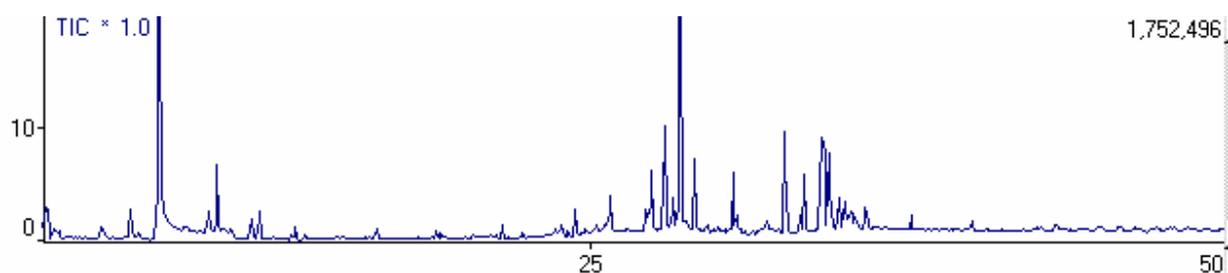
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (1-3h2).



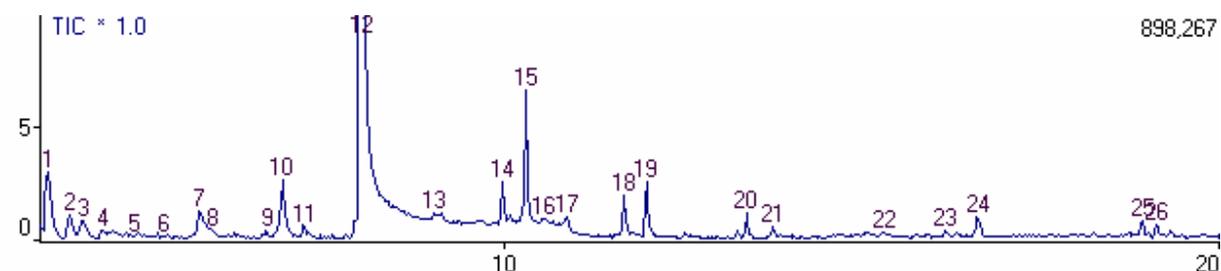
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (1-3h2), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



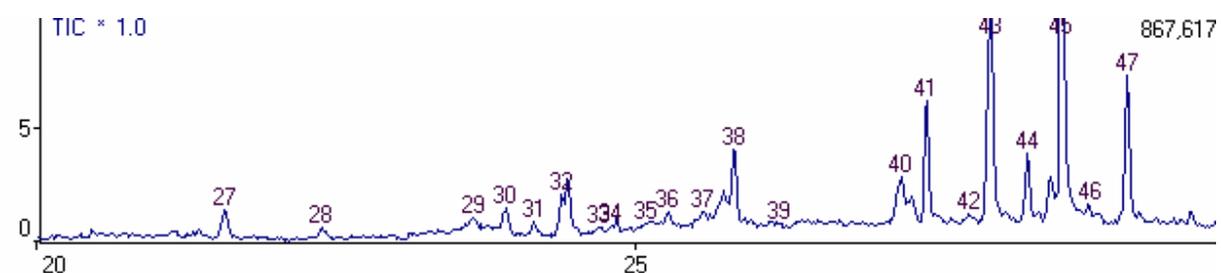
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (1-3h4).



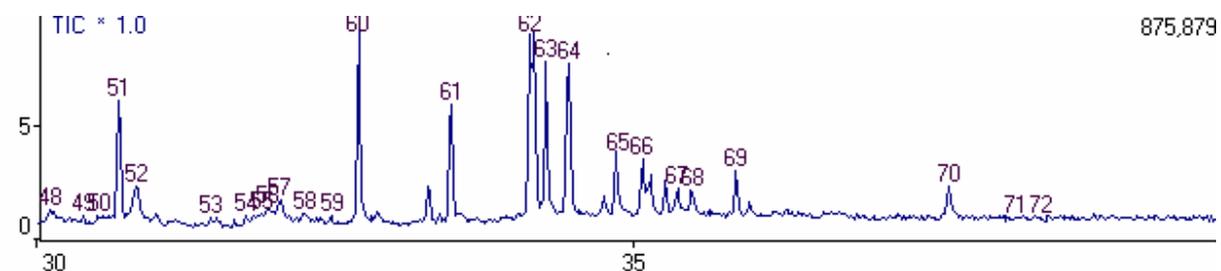
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (1-3h4), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



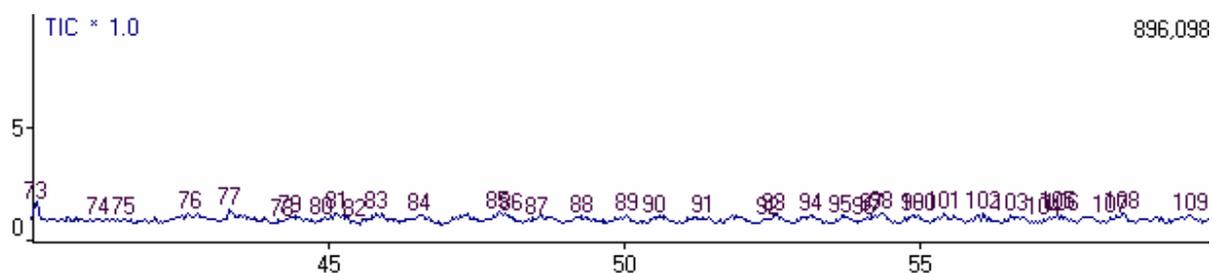
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (1-3h4), 0 a 10 de altitude e de 0 a 20 min.



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (1-3h4), 0 a 10 de altitude e de 20 a 30 min.

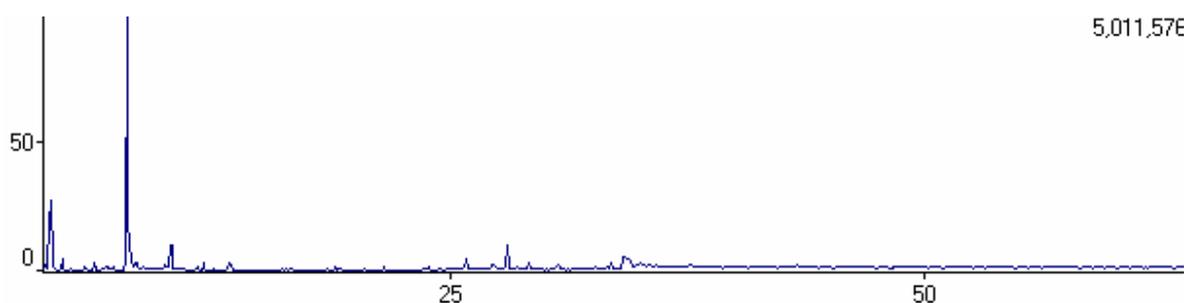


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (1-3h4), 0 a 10 de altitude e de 30 a 40 min.

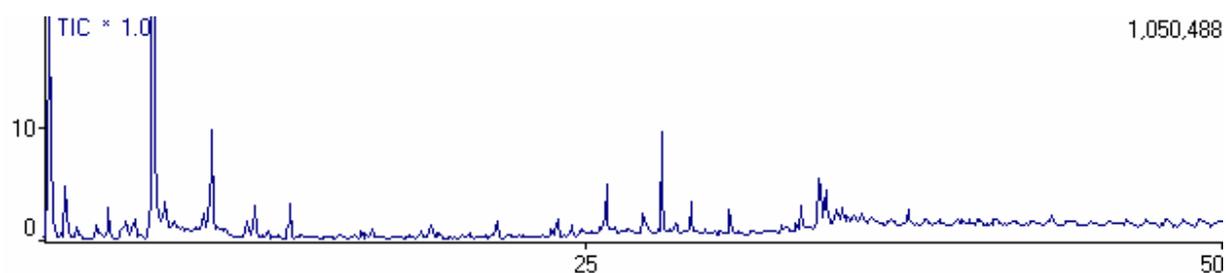


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (1-3h4), 0 a 10 de altitude e de 40 a 60 min.

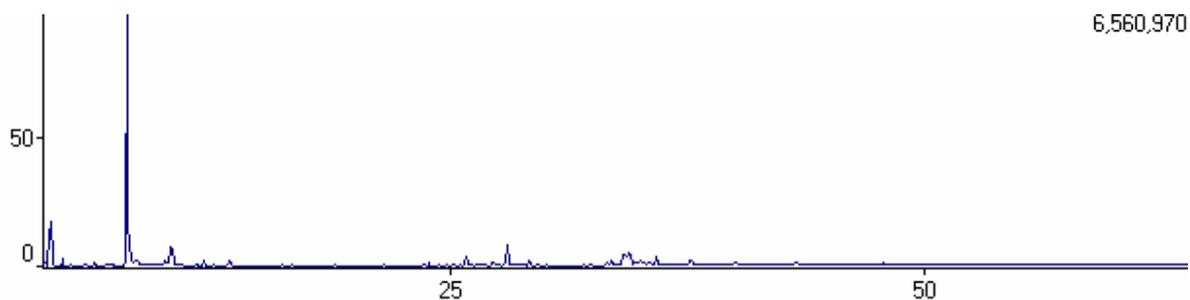
**2. Cromatogramas obtidos em replicata (2a-3h3 e 2a-3h4) dos compostos voláteis extraídos da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* logo após a inserção de cigarrinhas:**



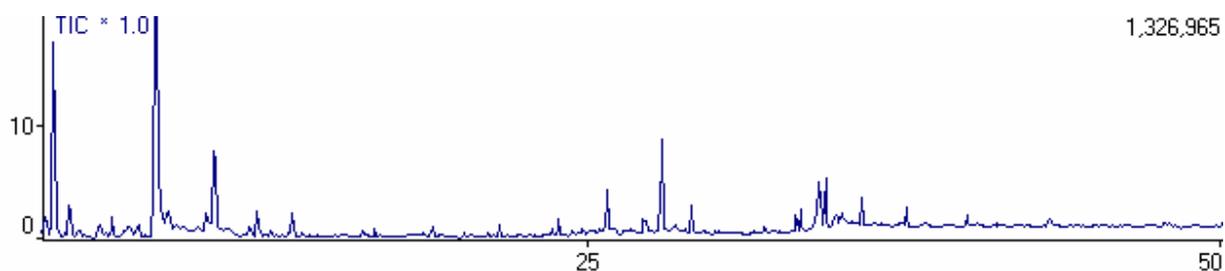
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2a-3h3).



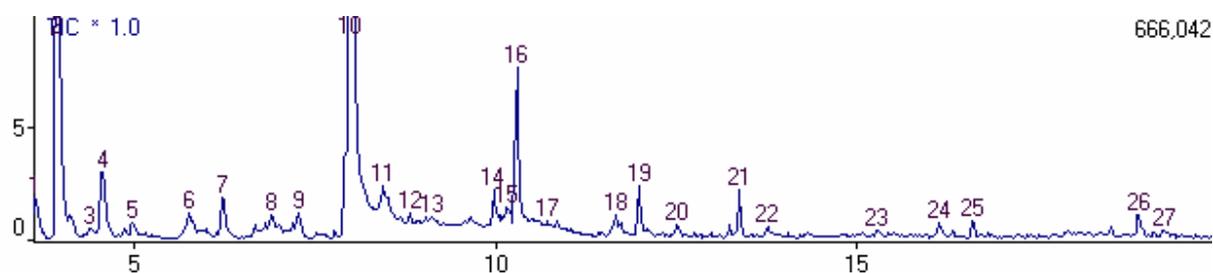
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2a-3h3), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



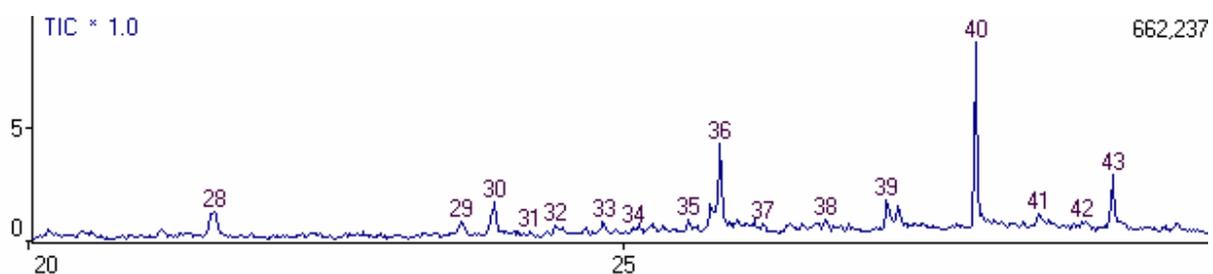
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2a-3h4).



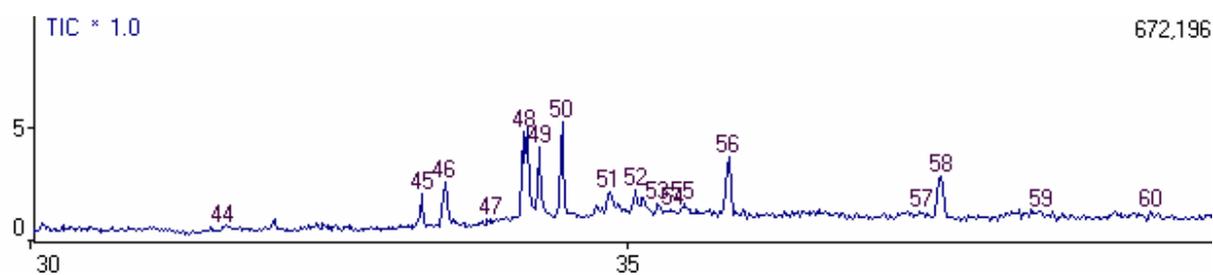
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2a-3h4), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



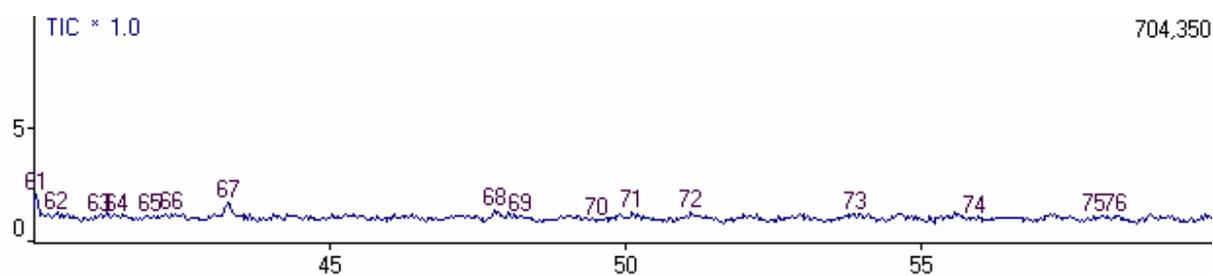
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2a-3h4), 0 a 10 de altitude e de 0 a 20 min.



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2a-3h4), 0 a 10 de altitude e de 20 a 30 min.

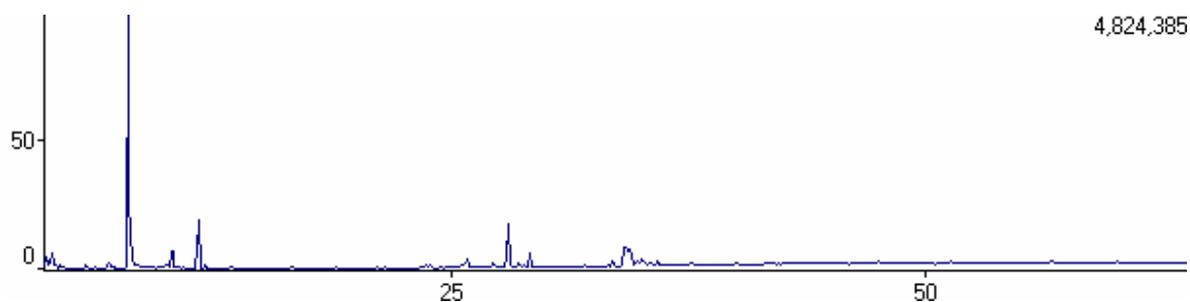


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2a-3h4), 0 a 10 de altitude e de 30 a 40 min.

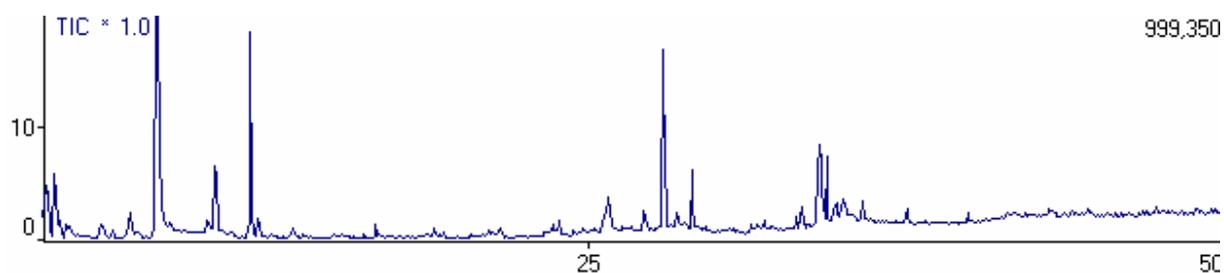


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2a-3h4), 0 a 10 de altitude e de 40 a 60 min.

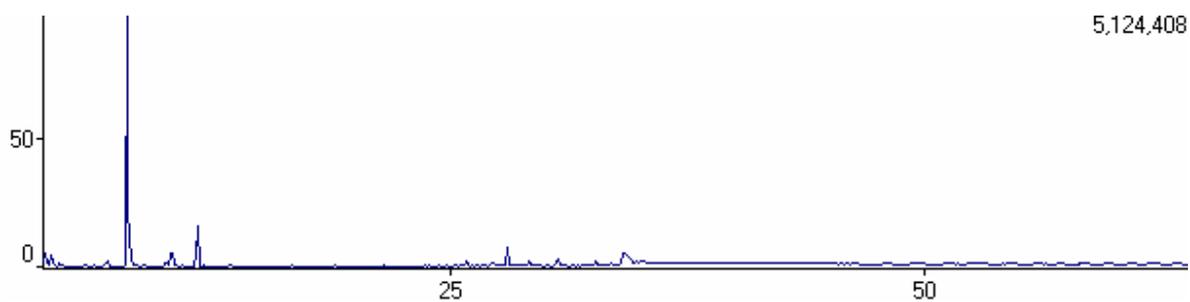
**3. Cromatogramas obtidos em triplicata (2b-3hi, 2b-3hii e 2b-3hiii) dos compostos voláteis extraídos da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a inserção das cigarrinhas:**



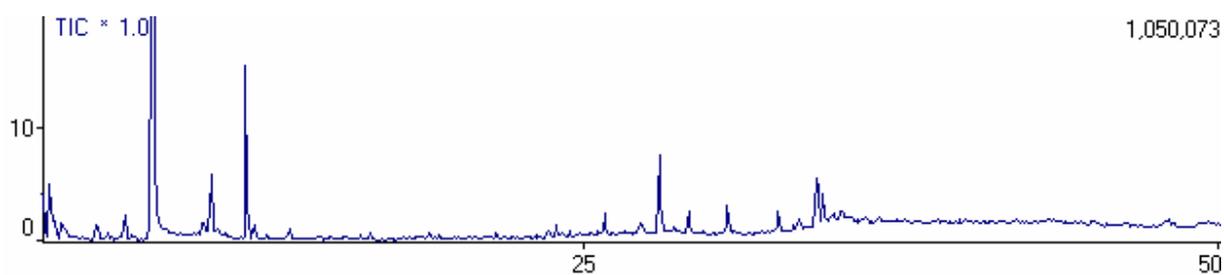
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2b-3hi)



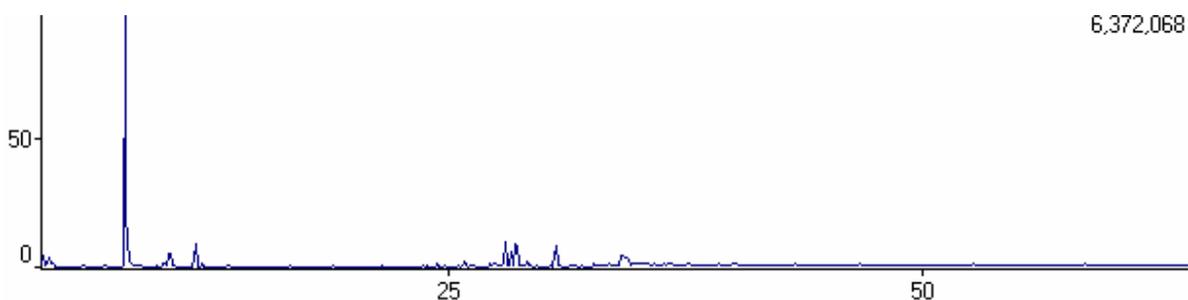
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2b-3hi), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



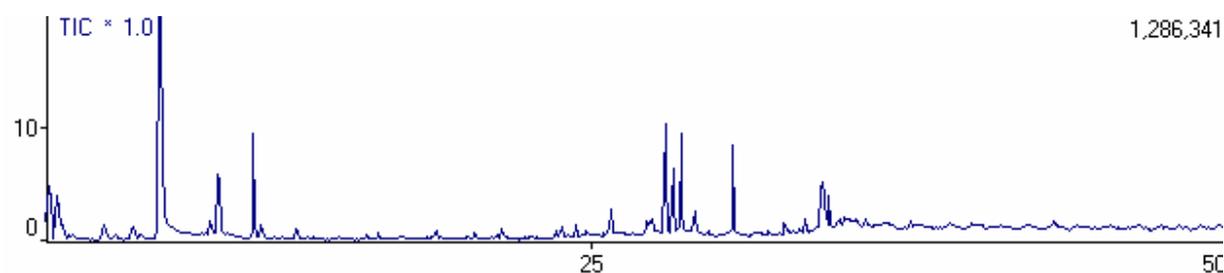
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2b-3hii).



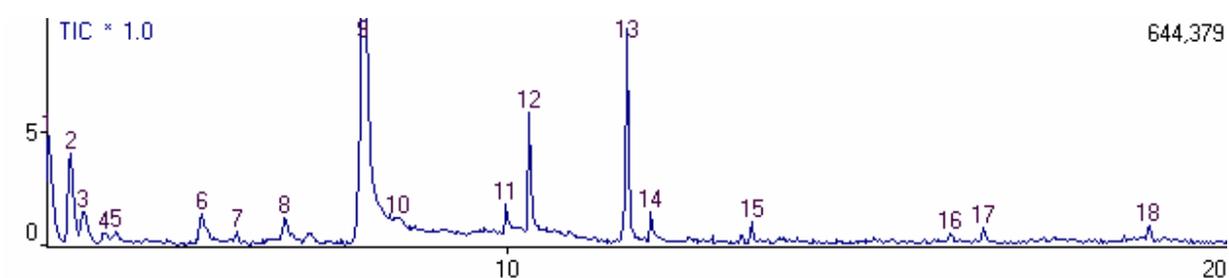
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2b-3hii), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



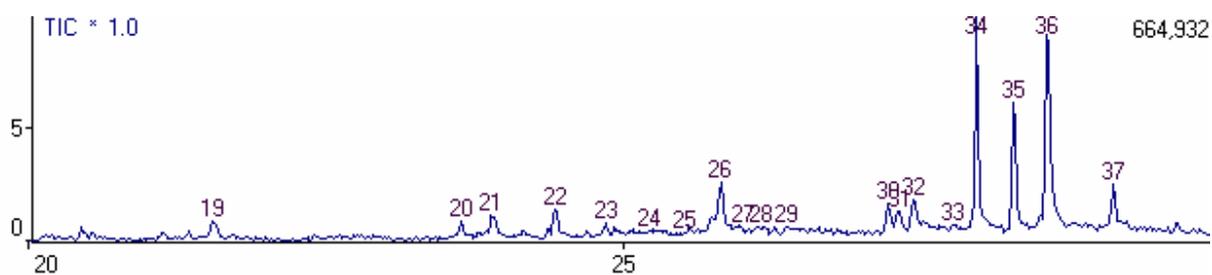
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2b-3hii).



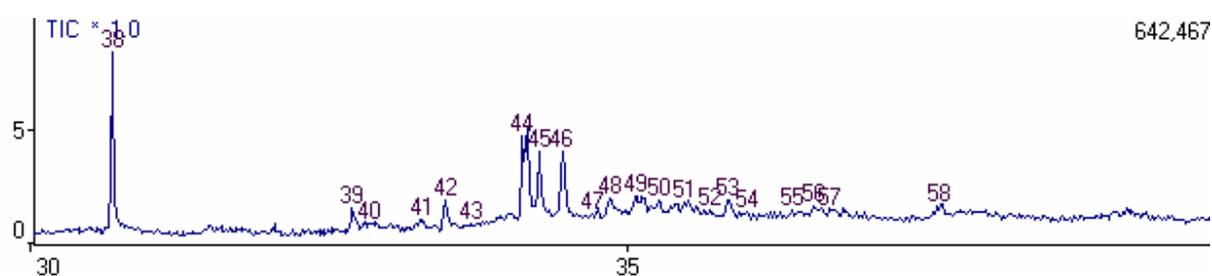
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2b-3hiii), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



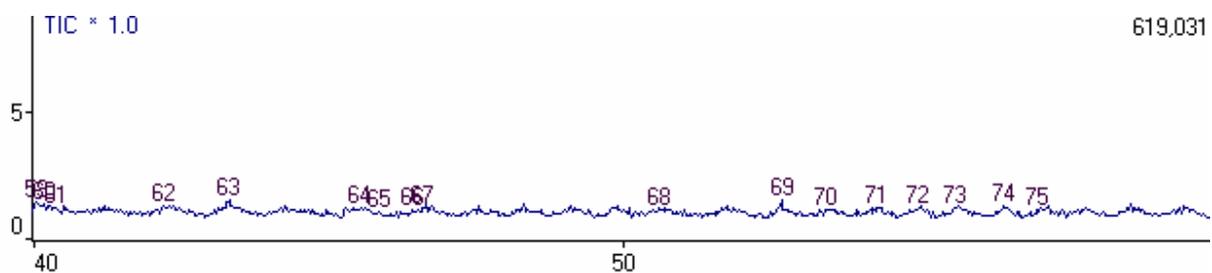
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2b-3hiii), 0 a 10 de altitude e de 0 a 20 min.



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2b-3hiii), 0 a 10 de altitude e de 20 a 30 min.

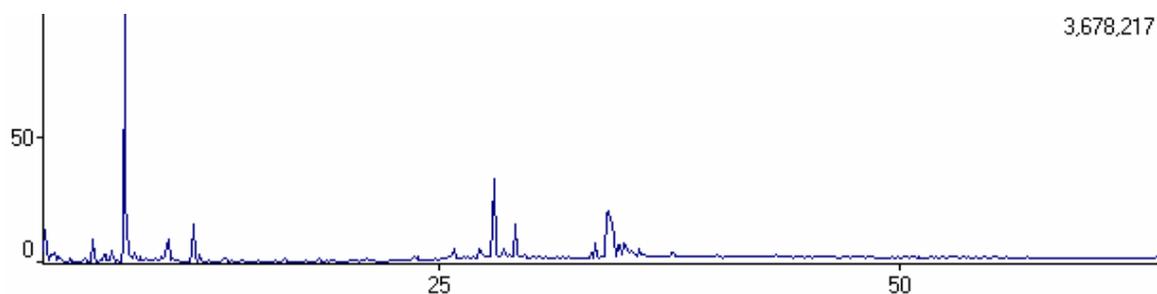


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2b-3hiii), 0 a 10 de altitude e de 30 a 40 min.

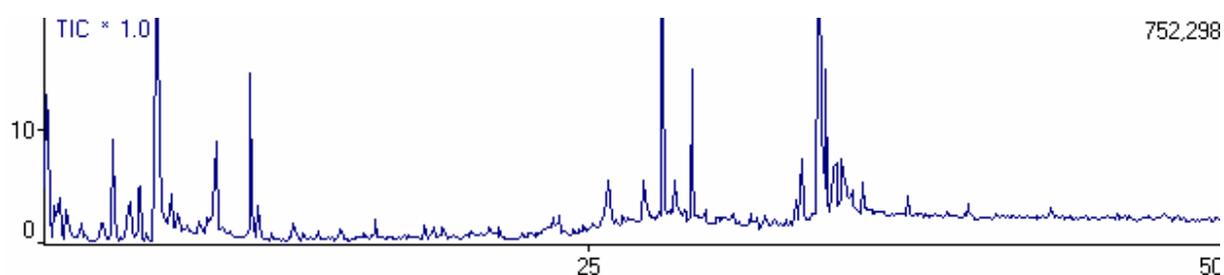


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2b-3hiii), 0 a 10 de altitude e de 40 a 60 min.

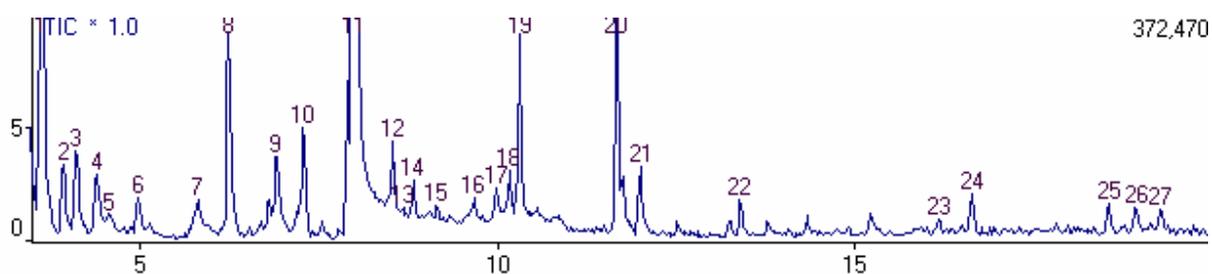
**4. Cromatograma obtido (2c-3vi) dos compostos voláteis extraídos da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C.* 48 horas após a inserção das cigarrinhas:**



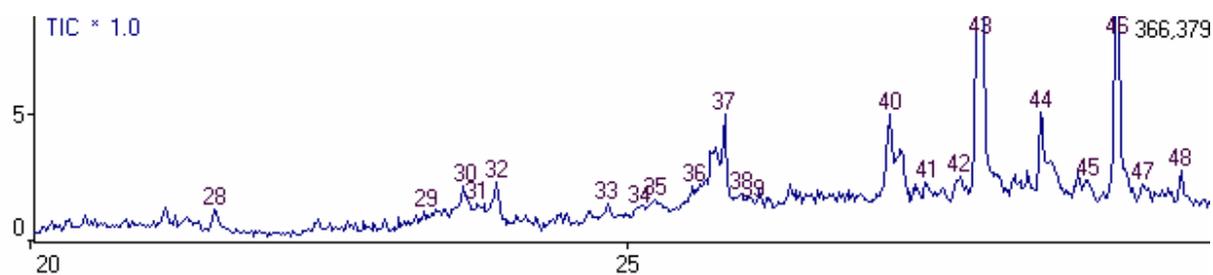
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2c-3vi).



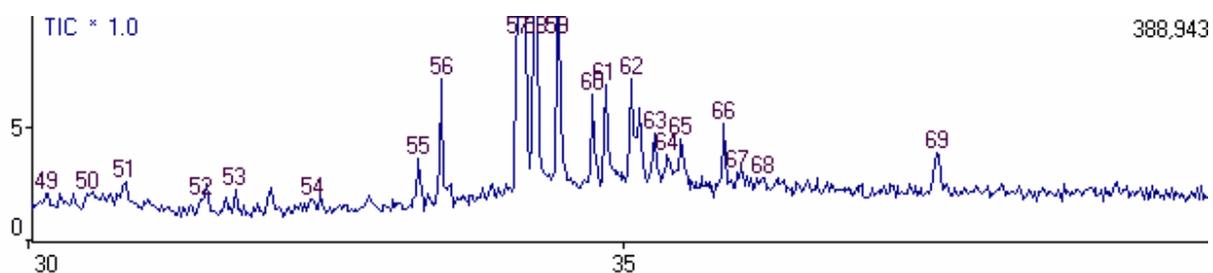
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas com as cigarrinhas (2c-3vi), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



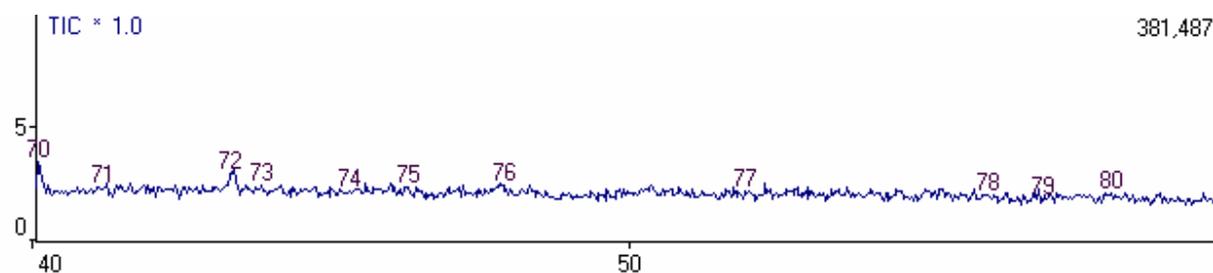
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2c-3vi), 0 a 10 de altitude e de 0 a 20 min.



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2c-3vi), 0 a 10 de altitude e de 20 a 30 min.

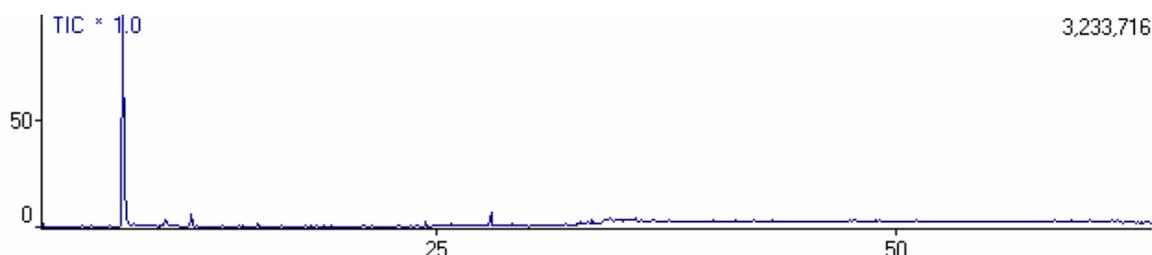


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2c-3vi), 0 a 10 de altitude e de 30 a 40 min.

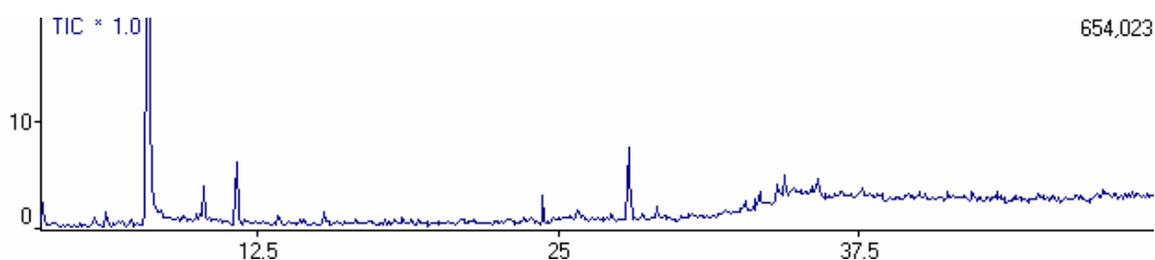


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas sem sofrer nenhuma alteração (2c-3vi), 0 a 10 de altitude e de 40 a 60 min.

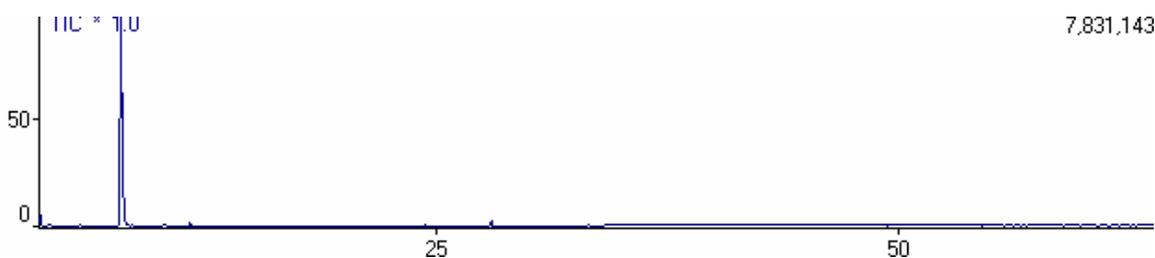
**5. Cromatogramas obtidos em triplicata (3a-3h2, 3a-3h3 e 3a-3h4) dos compostos voláteis extraídos da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* logo após a remoção de cigarrinhas:**



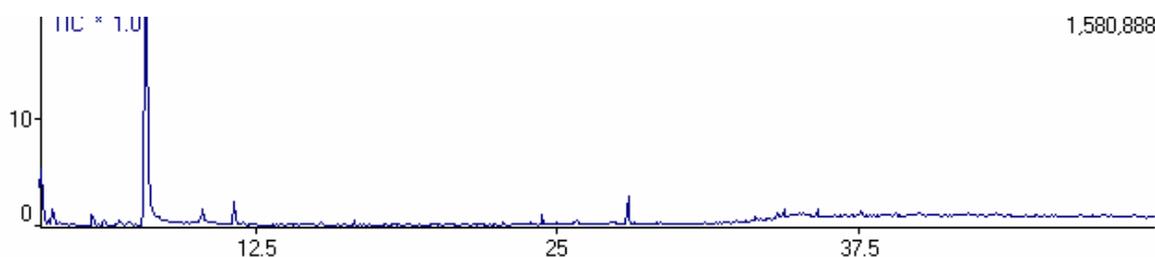
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h2).



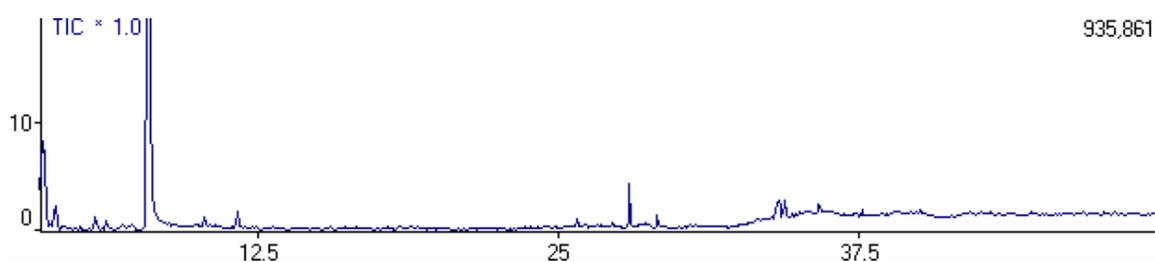
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h2), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



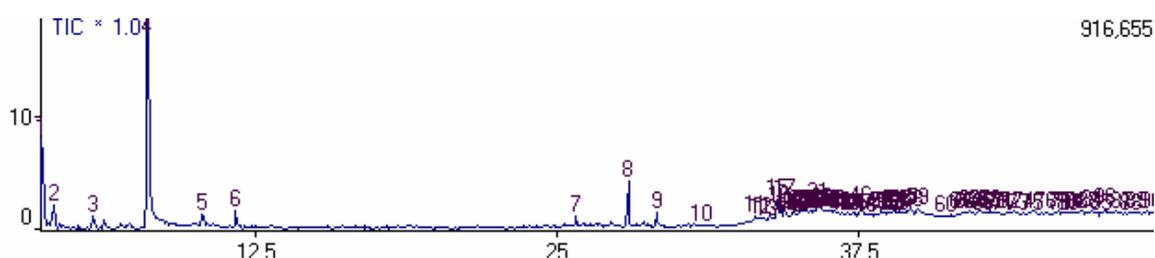
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h3).



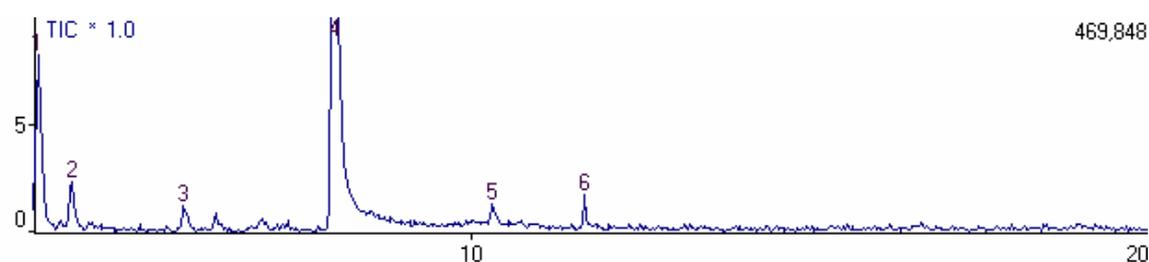
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h3), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



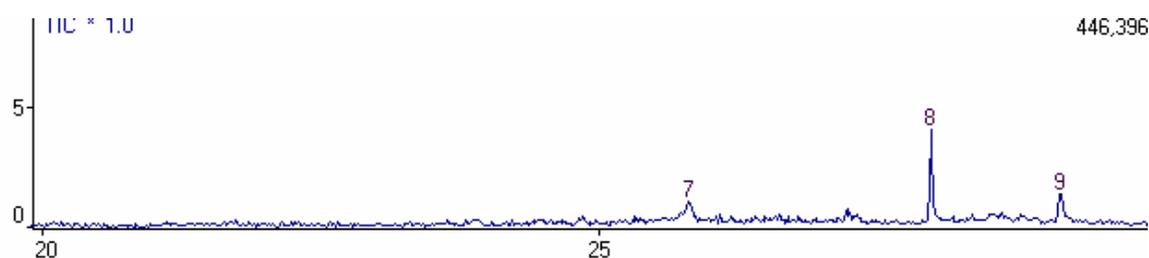
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h4).



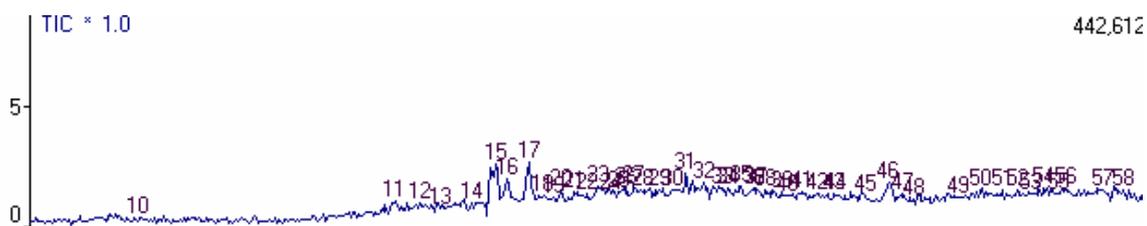
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h4), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



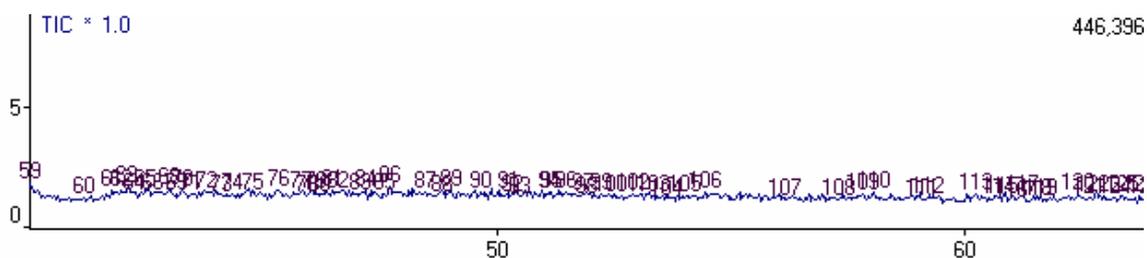
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h4), 0 a 10 de altitude e de 0 a 20 min.



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h4), 0 a 10 de altitude e de 20 a 30 min.

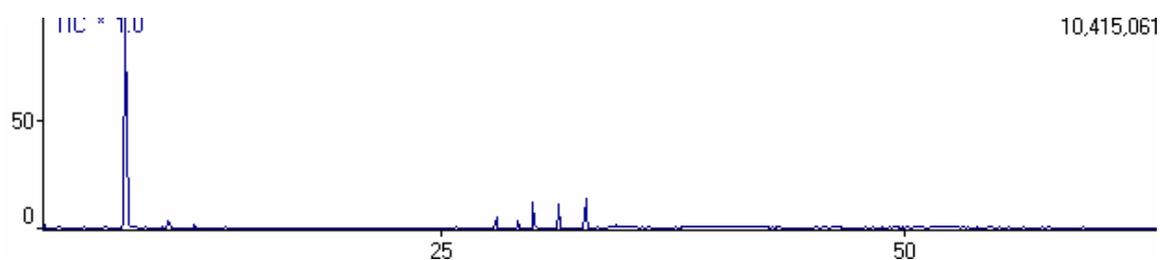


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h4), 0 a 10 de altitude e de 30 a 40 min.

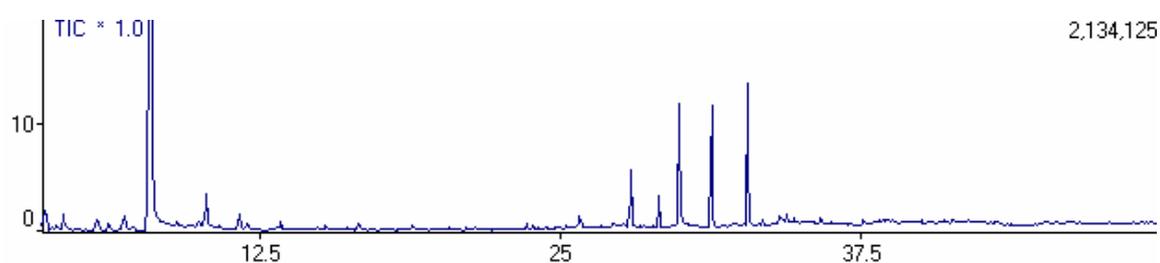


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após a remoção das cigarrinhas (3a-3h4), 0 a 10 de altitude e de 40 a 60 min.

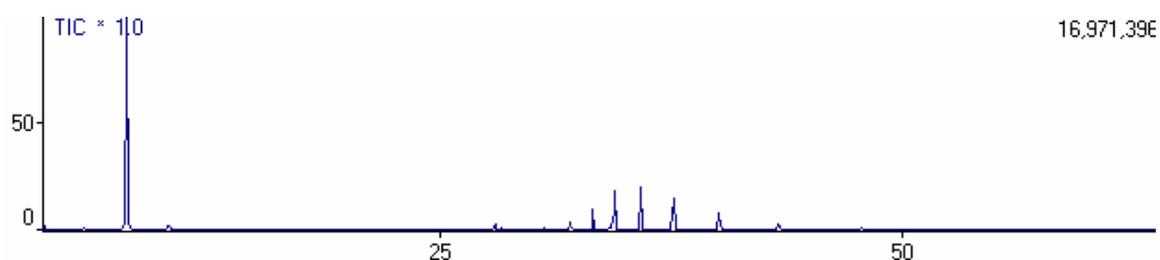
**6. Cromatogramas obtidos em replicata (3b-3i e 3b3ii) dos compostos voláteis extraídos da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* 24 horas após a remoção de cigarrinhas:**



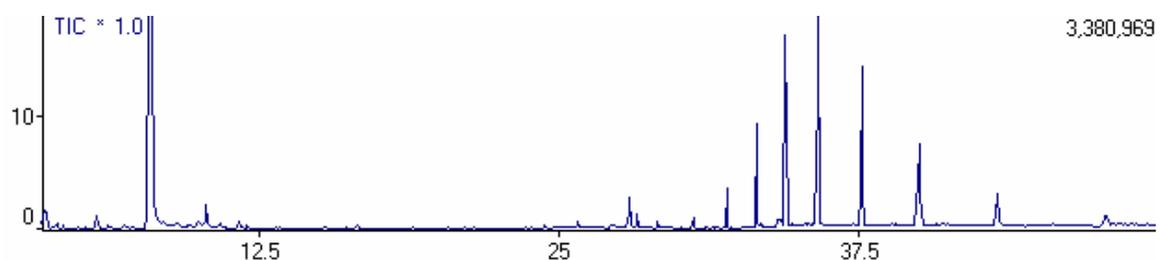
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 24 h da remoção das cigarrinhas (3b-3i).



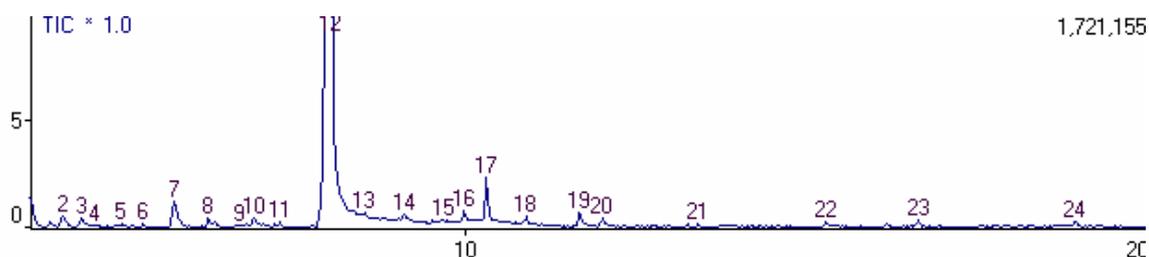
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 24 h da remoção das cigarrinhas (3b-3i), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



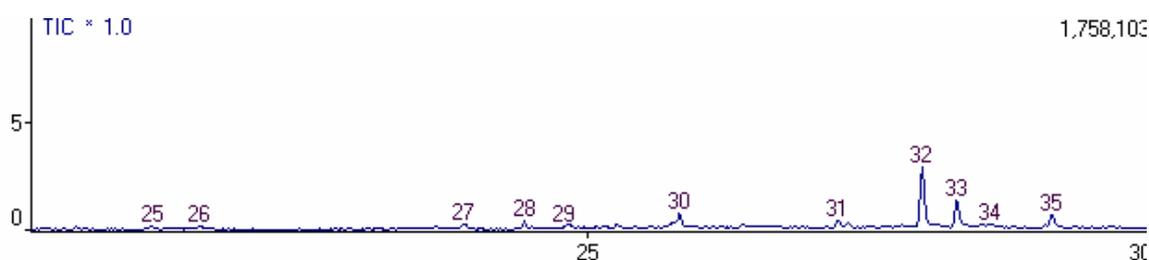
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 24 h da remoção das cigarrinhas (3b-3ii).



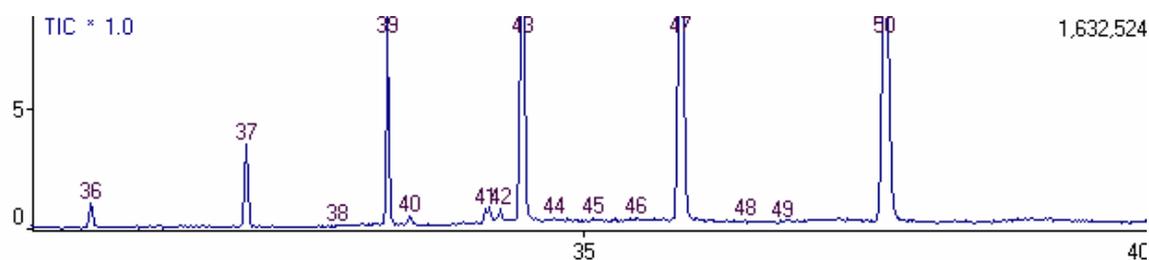
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 24 h da remoção das cigarrinhas (3b-3ii), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



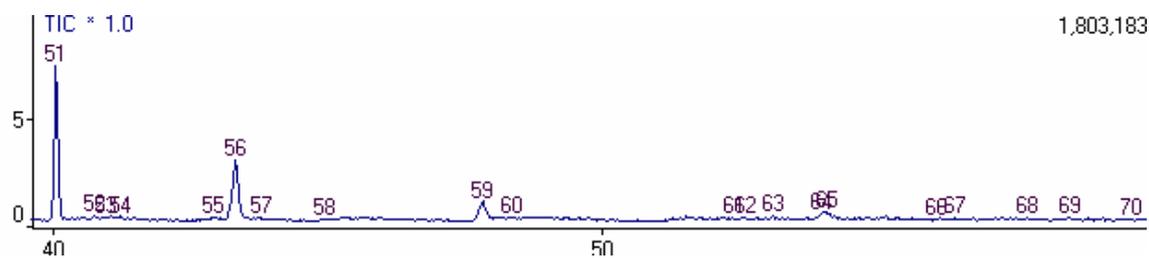
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 24 h da remoção das cigarrinhas (3b-3ii), 0 a 10 de altitude e de 0 a 20 min.



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 24 h da remoção das cigarrinhas (3b-3ii), 0 a 10 de altitude e de 20 a 30 min.

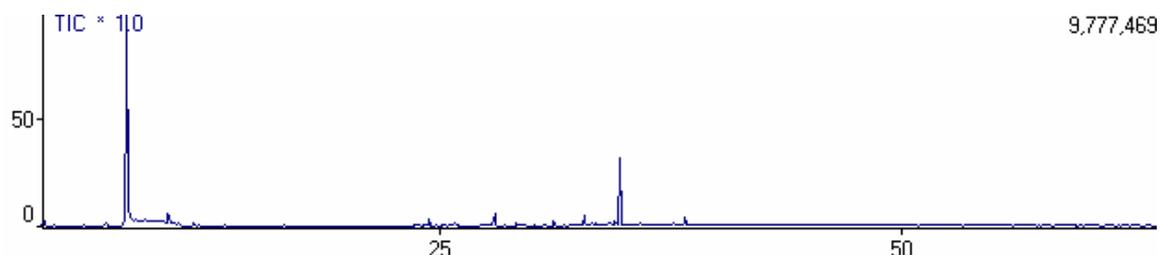


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 24 h da remoção das cigarrinhas (3b-3ii), 0 a 10 de altitude e de 30 a 40 min.

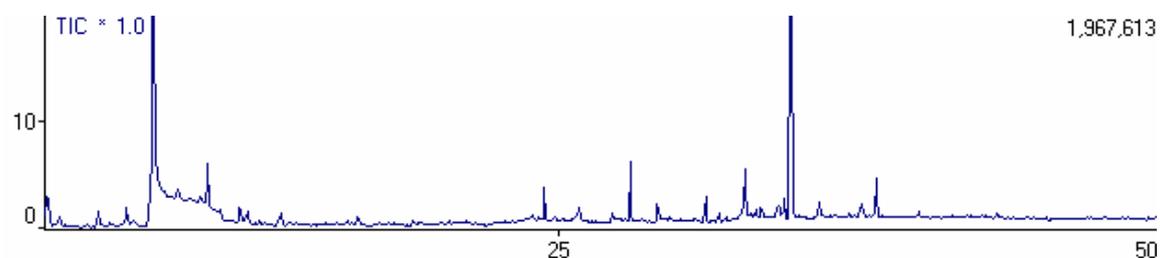


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 24 h da remoção das cigarrinhas (3b-3ii), 0 a 10 de altitude e de 40 a 60 min.

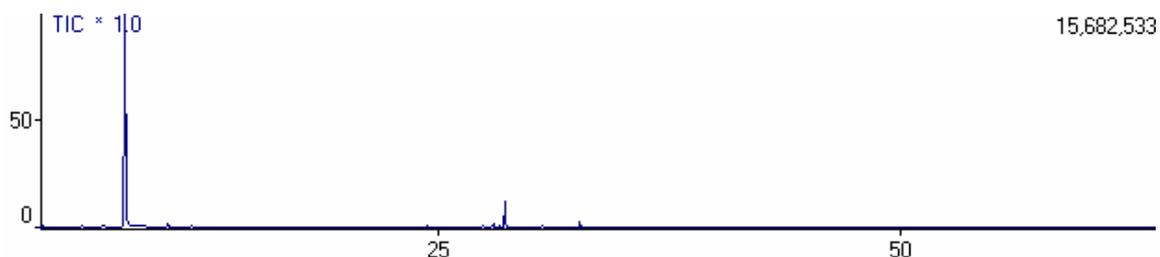
**7. Cromatogramas obtidos em replicata (3c-3hiv, 3c-3hv, 3c-3hvi e 3c-3hvii) dos compostos voláteis extraídos da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* 48 horas após a remoção de cigarrinhas:**



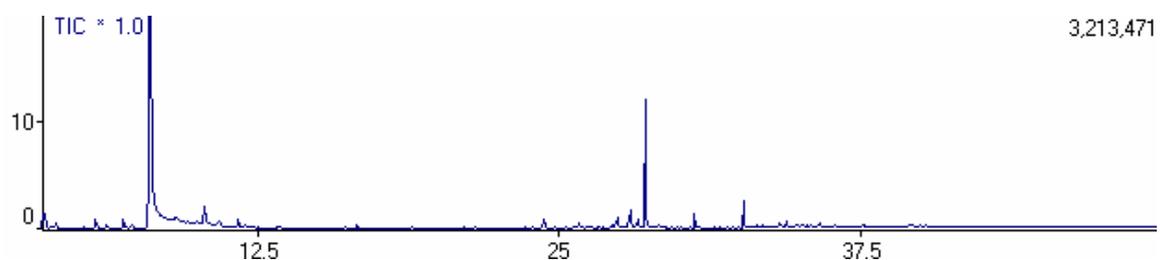
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hiv).



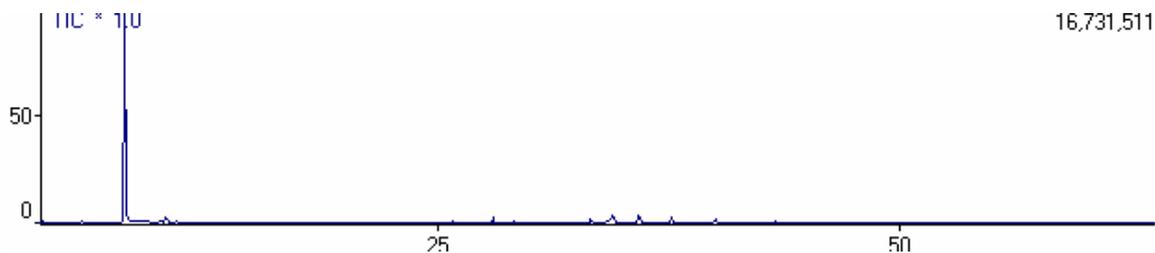
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hiv), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



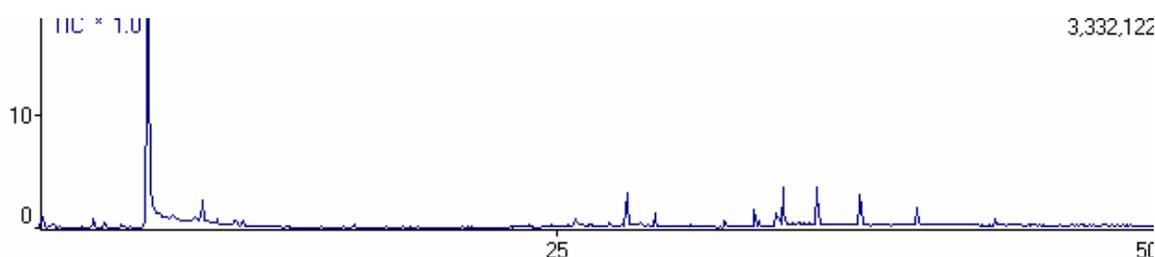
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hv).



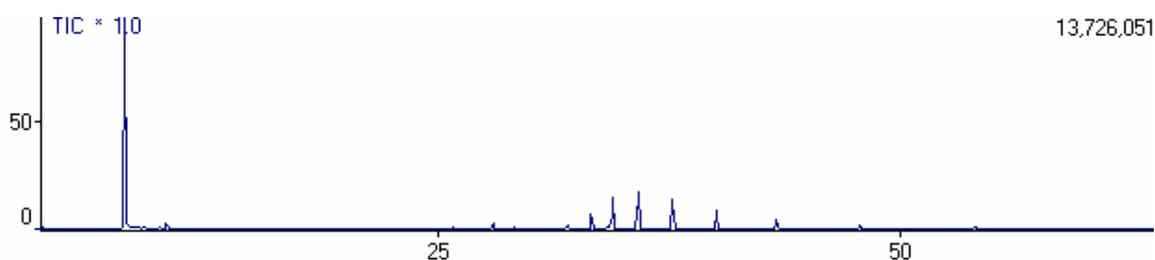
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hv), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



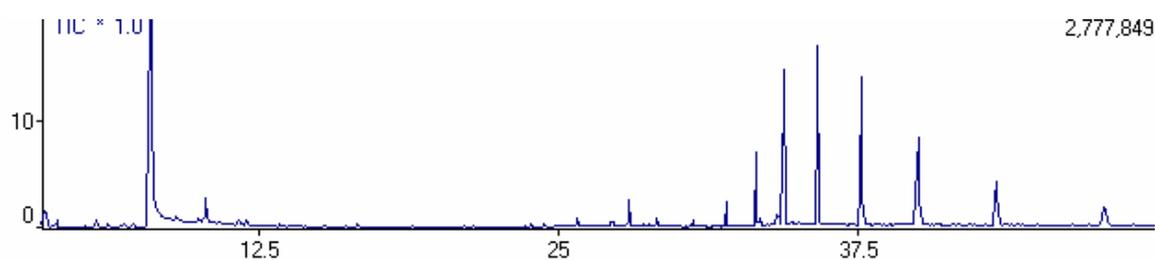
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hvi).



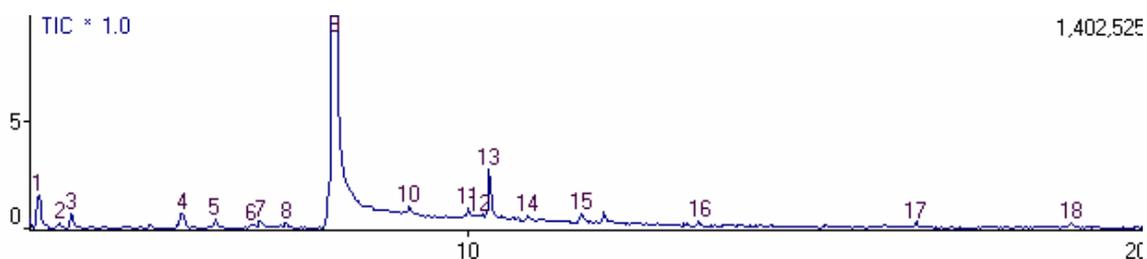
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hvi), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



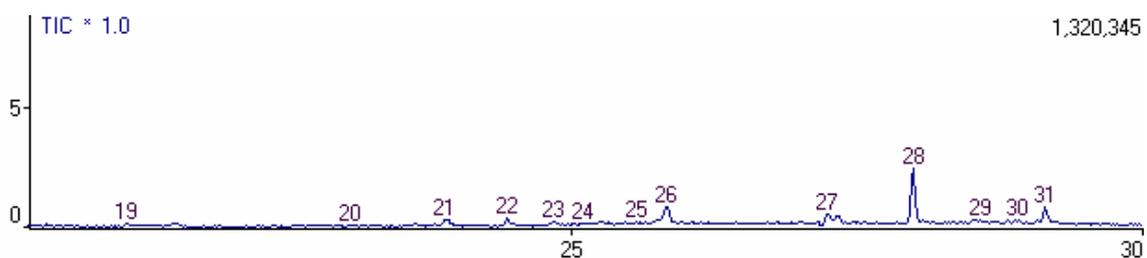
Cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hvii).



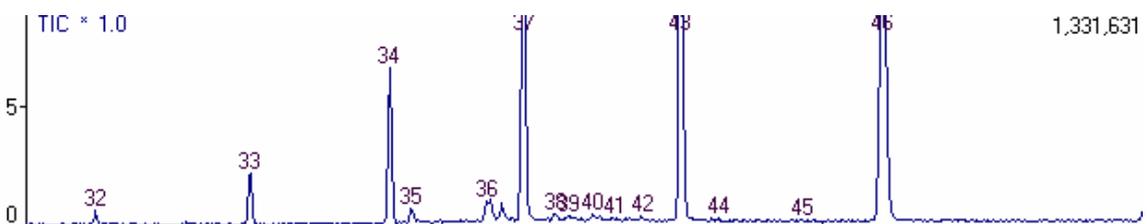
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hvii), 0 a 20 de altitude e de 0 a 50 min.



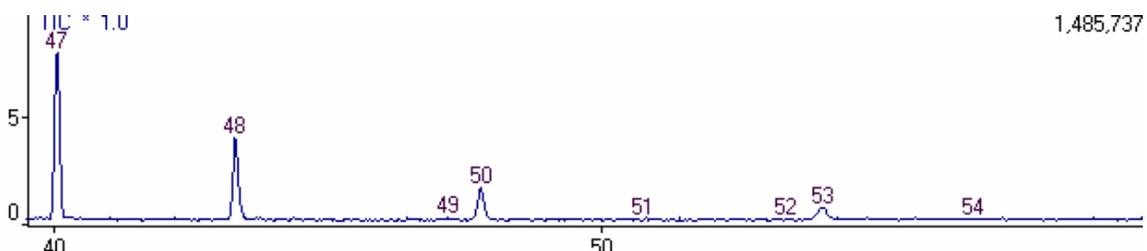
Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hvii), 0 a 10 de altitude e de 0 a 20 min.



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hvii), 0 a 10 de altitude e de 20 a 30 min.

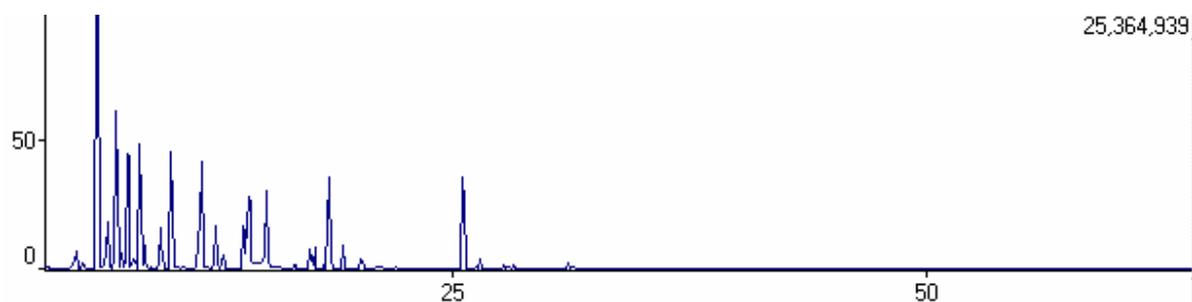


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hvii), 0 a 10 de altitude e de 30 a 40 min.

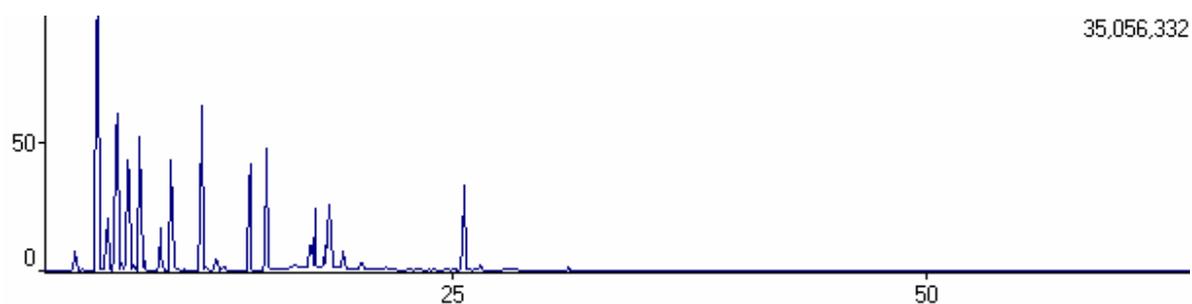


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos das plantas após 48 h da remoção das cigarrinhas (3c-3hvii), 0 a 10 de altitude e de 40 a 60 min.

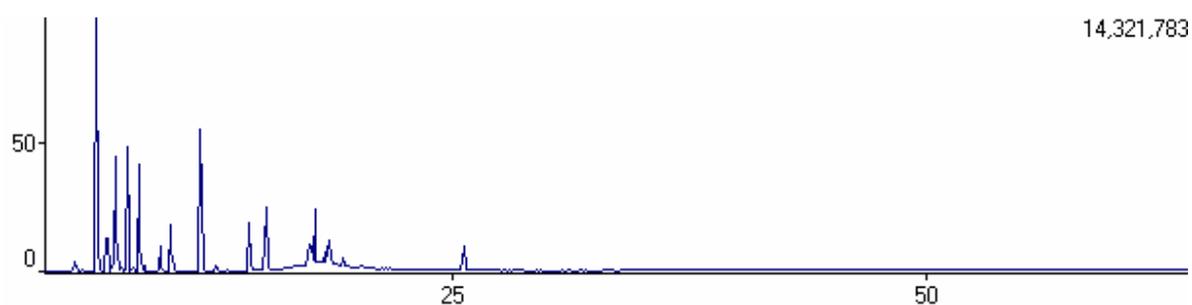
**8. Cromatogramas obtidos em triplicata (oepp1, oepp2 e oepp3) dos compostos extraídos dos óleos essenciais da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C. limonia* sem sofrer nenhuma alteração:**



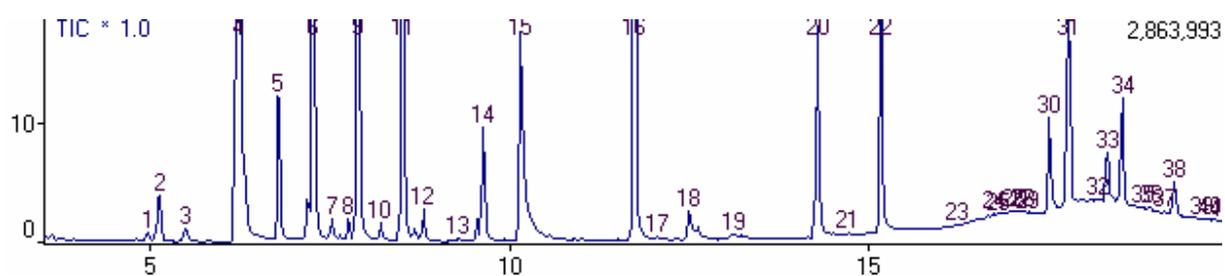
Cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas com as cigarrinhas (oepp1).



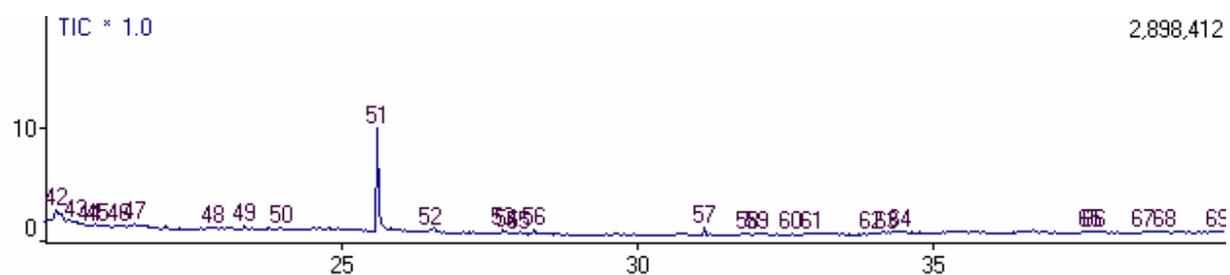
Cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas com as cigarrinhas (oepp2).



Cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas com as cigarrinhas (oepp3).

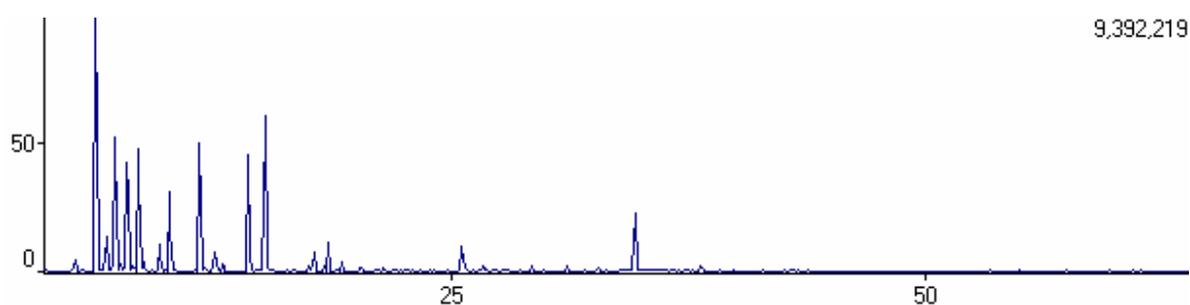


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas sem sofrer nenhuma alteração (oepp3), 0 a 20 de altitude e de 0 a 20 min.

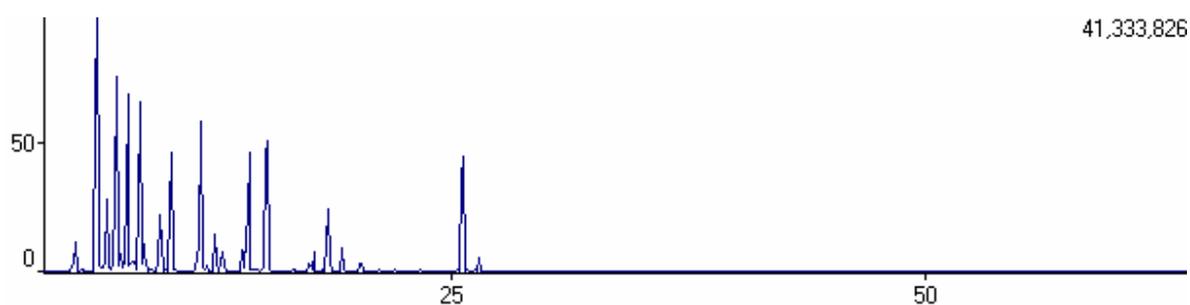


Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas sem sofrer nenhuma alteração (oepp3), 0 a 20 de altitude e de 20 a 40 min.

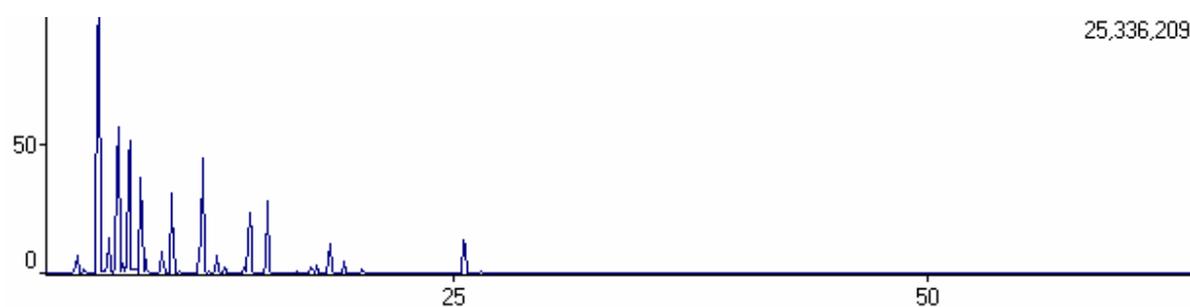
**9. Cromatogramas obtidos em triplicata (oepc1, oepc2 e oepc3) dos compostos extraídos dos óleos essenciais da planta enxertada *C. sinensis* sobre *C.* após a remoção das cigarrinhas:**



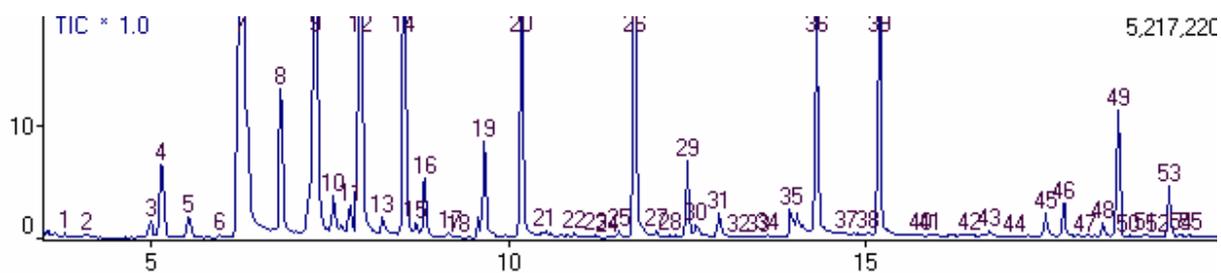
Cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas com as cigarrinhas (oepc1).



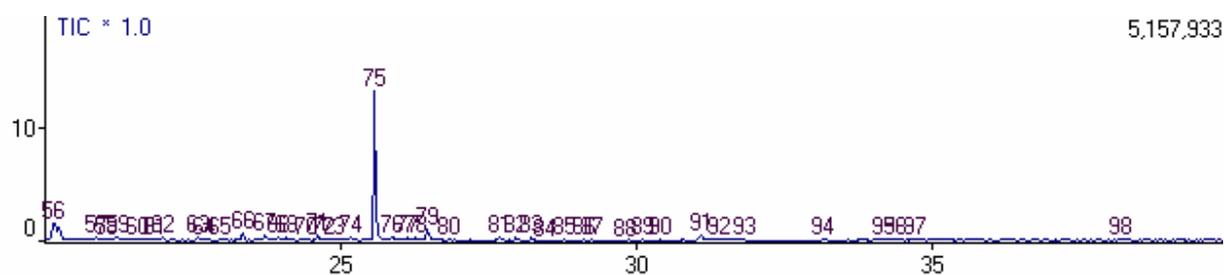
Cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas com as cigarrinhas (oepc2).



Cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas com as cigarrinhas (oepc3).



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas após removidas as cigarrinhas (oepc3), 0 a 20 de altitude e de 0 a 20 min.



Ampliação do cromatograma dos voláteis extraídos dos óleos essenciais das plantas sem após removidas as cigarrinhas (oepc3), 0 a 20 de altitude e de 20 a 40 min.