

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Utilização da RMN e ferramentas quimiométricas na avaliação
das alterações metabólicas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (var. caipira)
causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

LORENA MARA ALEXANDRE E SILVA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glaucia Braz Alcantara

Goiânia-GO
2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Utilização da RMN e ferramentas quimiométricas na avaliação
das alterações metabólicas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (var. caipira)
causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

LORENA MARA ALEXANDRE E SILVA

Dissertação apresentada
ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Goiás
como exigência parcial para
obtenção do título de Mestre
em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glaucia Braz Alcantara

Goiânia-GO
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

S586u Silva, Lorena Mara Alexandre.
Utilização da RMN e ferramentas quimiométricas na avaliação das alterações metabólicas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (var. caipira) causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [manuscrito] / Lorena Mara Alexandre e Silva. - 2010.

xv, 157 f. : il..

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Braz Alcantara.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas, abreviaturas e símbolos.

Apêndices.

1.RMN 2. Quimiometria 3. *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. – Tratamento I. Título.

CDU: 615.28

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em __/__/__.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Glaucia Braz Alcantara / UFG

Prof. Dr. Luciano Moraes Lião / UFG

Prof. Dr. Andersson Barison / UFG

Dedico este trabalho à minha mãe Maristela,
que sempre me guiou pelos caminhos
da educação e da verdade.
Dedico ainda ao meu pai, José Lino
e irmãos, Diogo e Thiago,
grandes homens da minha vida.

*“Pedras no caminho? Guardo todas,
um dia vou construir um castelo!”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho em muito se deve à colaboração e apoio intelectual e emocional de pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, que foram solidárias, que torceram por mim. A estas eu transmito os meus mais sinceros agradecimentos.

Em especial agradeço à Deus pela força que me transmite, possibilitando o alargamento de meus limites. Agradeço ainda à minha família, pelos momentos de compreensão e solicitude. Ao meu grande companheiro, amigo e amor, Elenilson e à toda sua família. À minha orientadora Glaucia, pelos primorosos esclarecimentos e amizade. Ao professor Luciano Lião, pelos valiosos conselhos e amizade. A todo o grupo de colegas do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFG. À professora Lucila Kato, que mais uma vez colaborou com meu trabalho. À professora Neli Honda, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pelas análises de atividade anti-oxidante. Aos professores Ronaldo Veloso e Marcos Gomes, da Escola de Agronomia da UFG, pelas identificações da espécie vegetal e do material biológico. Agradeço ainda às agências fomentadoras desta pesquisa: CNPq, MCT/FINEP/CT-INFRA e FUNAPE/UFG.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xix
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. LARANJA	1
1.1.1. TAXONOMIA E ORIGEM	1
1.1.2. ASPECTOS ECONÔMICOS	2
1.1.3. ASPECTOS NUTRICIONAIS	2
1.2. O CANCRO CÍTRICO	3
1.2.1. CICLO DA DOENÇA E SEUS SINTOMAS	6
1.3. A RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	10
1.3.1. A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM SOLUÇÃO	11
1.3.2. A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE AMOSTRAS HETEROGÊNEAS (HR-MAS)	12
1.3.2.1. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA DE HR-MAS	13
1.3.2.1.1. O GIRO NO ÂNGULO MÁGICO	13
1.3.2.1.2. ACOPLAMENTO DIPOLAR ENTRE SPINS NUCLEARES	14
1.3.2.1.3. ANISOTROPIA DO DESLOCAMENTO QUÍMICO	15
1.3.2.1.4. DIFERENÇA DE SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA	15

1.3.3. SEQUÊNCIA DE PULSOS	15
1.3.3.1. CPMG	16
1.3.3.2. Zgcppr	17
1.4. QUIMIOMETRIA E RMN	17
1.4.1. PRINCÍPIO DE ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS	18
1.4.1.1. PRÉ-PROCESSAMENTO SOB AS VARÁVEIS E AS AMOSTRAS	19
1.4.1.2. ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	21
1.4.1.3. ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS HIERÁRQUICOS (HCA)	22
1.5. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	23
1.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	24
2. OBJETIVOS	26
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
3.1. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	28
3.2. AQUISIÇÃO DAS MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS DE RMN	30
3.2.1. SONDA DE LÍQUIDOS (RMN EM SOLUÇÃO)	30
3.2.2. SONDA DE HR-MAS	32
3.3. TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO	33
3.4. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA	34
3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1. A ESCOLHA DA SEQUÊNCIA DE PULSOS	38
4.2. VISÃO GERAL E PROCESSAMENTO DOS DADOS	39
4.3. ANÁLISE DE RMN EM SOLUÇÃO	41
4.3.1 AVALIAÇÃO DO SUCO DA FRUTA	41
4.3.2. AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE LARANJEIRA	46
4.4. ANÁLISE POR HR-MAS	57
4.4.1. AVALIAÇÃO DIRETA DAS CASCAS DO FRUTO	57

4.4.2. AVALIAÇÃO DIRETA DAS FOLHAS DE LARANJEIRA	62
4.5. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA	68
4.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	70
5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS IMPORTANTES NA CARACTERIZAÇÃO DAS PCA's	77
5.1. COMPOSTOS DOS SUCOS	77
5.1.1. ALANINA	77
5.1.2. TREONINA	78
5.1.3. ÁCIDO LÁTICO	81
5.1.4. ÁCIDO CÍTRICO	83
5.1.5. ETANOL	84
5.2. COMPOSTOS DOS EXTRATOS	87
5.2.1. PROLINA	87
5.2.2. ÁCIDO α -AMINO BUTÍRICO (AABA)	89
5.2.3. ARGININA	93
5.2.4. ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA)	94
5.2.5. NOBELETINA	96
5.2.6. TANGERETINA E DIMETOXI TANGERETINA	100
5.2.7. HESPERIDINA	103
5.3. COMPOSTOS DAS CASCAS DA LARANJA OBTIDOS POR HR-MAS	105
5.4. COMPOSTOS DAS FOLHAS DE LARANJEIRA OBTIDOS POR HR-MAS	108
6. CONCLUSÃO	111
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8. CURRICULUM VITAE	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Ranking de produção de laranja no mundo e no Brasil. Fonte: FAO, 2007; IBGE/MAPA 2006.	2
Figura 1.2 – Esquema representativo do ciclo do cancro cítrico. Fonte: SCHUBERT <i>et al.</i> , 2001	7
Figura 1.3 – Microscopia eletrônica depois de cinco dias após a infestação por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . Fonte: GRAHAM <i>et al.</i> , 2004.	7
Figura 1.4 – Infestação por cancro cítrico em: A – folhas, B – fruto e C – ramos. Fonte: www.fundecitrus.com.br	9
Figura 1.5 – Ampliação da necrose de cancro cítrico. Fonte: GOTTWALD <i>et al.</i> , 2002	9
Figura 1.6 – Representação do giro no ângulo mágico com inclinação de 54,74° em relação ao campo magnético estático. Fonte: CLARIDGE, 2008.	14
Figura 1.7 – Sequência de pulsos CPMG. Fonte: CLARIDGE, 2008.	16
Figura 1.8 – Programa de pulsos da zgcprr. Fonte: Manual Bruker BioSpin.	17
Figura 1.9 – Esquema representativo da disposição espectral em matrizes e posteriores tratamentos estatísticos empregados.	19
Figura 1.10 – Representação do autoescalamento com: dados originais; b) centrados na média (média correspondendo à zero); c) dados autoescalados: centrados na média e escalados pela	20

variância (média igual a zero e desvio padrão igual a um). Fonte: MATOS, 2003.

Figura 1.11 – Esquema de decomposição da matriz original pela PCA.	22
Figura 3.1 – Esquema de preparação dos frutos de laranja para as análises de RMN.	28
Figura 3.2 – Esquema de preparação das folhas de laranjeira para as análises de RMN.	29
Figura 3.3 – Esquema de separação do material vegetal doente.	29
Figura 3.4 – Rotor utilizado no acondicionamento da amostra (Fonte: Bruker Biospin).	32
Figura 3.5 – Esquema representativo para a metodologia de difusão em ágar.	36
Figura 4.1 – Comparação entre espectros: a) obtido com a sequência zgcppr e b) obtido com a sequência CPMG.	39
Figura 4.2 – Espectros de RMN de ^1H dos sucos de laranja (a) e extratos das folhas (b), e de RMN HR-MAS de ^1H das cascas da fruta (c) e das folhas (d).	40
Figura 4.3 – Espectros de RMN de ^1H dos sucos de laranja: a) Sadia e b) Doente.	41
Figura 4.4 – HCA aplicado para os sucos de laranjas sadia e doente, com diferenciação dos agrupamentos amostrais.	42
Figura 4.5 – Gráfico dos escores da PCA sobre os dados de RMN dos sucos de laranja.	43
Figura 4.6 – Regiões destacadas pelo gráfico de variáveis (<i>loadings</i>) com importância na variabilidade de PC1 com a) 1,10 a 1,50 ppm e b) 4,30 a 5,00 ppm.	44
Figura 4.7 – Conjuntos de sinais que deslocaram em relação à infestação da doença e também contribuíram para a composição de PC1.	45

Figura 4.8 – Laranjas com maturidades intermediárias, utilizadas para as análises de RMN de ^1H em solução do suco de laranja. a) Sadia; b) Doente.	46
Figura 4.9 – HCA aplicado nos extratos resultando nos agrupamentos naturais das amostras: sadia; doente sem as lesões; doente lesionada.	47
Figura 4.10 – Gráfico de escores da PCA dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de laranjeira sadia; doente sem as lesões; doente lesionada.	48
Figura 4.11 – Regiões de 1,76 a 2,4 ppm, destacadas pelo gráfico de variáveis (<i>loadings</i>) como responsáveis por alocar os extratos de folhas doentes lesionadas em escores positivos de PC1.	50
Figura 4.12 – Resistência do tomateiro ao patógeno <i>Phytophthora infestans</i> , com a aplicação de aminoácidos nas folhas. Sequência: água, AABA, BABA e GABA (α , β e γ ácidos aminobutíricos). Fonte: COHEN, 2002.	51
Figura 4.13 – Regiões de 6,48 a 6,69 ppm, destacadas pelo gráfico de variáveis (<i>loadings</i>) como responsáveis por alocar os extratos de folhas doentes lesionadas em escores positivos de PC1.	52
Figura 4.14 – Regiões dos espectros de RMN de ^1H das folhas responsáveis pela variância em PC1, destacadas pelo gráfico de variáveis (<i>loadings</i>): a) 0,7 a 1,08 ppm; b) 7,67 a 8,75 ppm.	54
Figura 4.15 – Regiões dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas apontadas pelo gráfico de variáveis (<i>loadings</i>) como responsáveis pela variância em PC2: a) 1,77 a 2,85 ppm; b) 6,14 a 6,35 ppm e c) 3,75 a 4,12 ppm.	56
Figura 4.16 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das cascas do fruto da laranja: sadia; doente sem as lesões; doentes lesionadas.	57
Figura 4.17 – Gráfico de escores da PCA dos espectros de RMN HR-MAS ^1H das cascas do fruto de laranja sadia; doente sem as lesões; doente lesionada.	58

Figura 4.18 – Regiões dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das 60
cascas do fruto, apontadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*), para a
caracterização de PC1: a) região de 1,25 a 2,45 ppm; b) região de 4,10
a 4,55 ppm e c) região de 5,20 a 5,45 ppm. Legenda: β -gli: β -glicose;
 α -gli: α -glicose; sac: sacarose.

Figura 4.19 – Regiões dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das 62
cascas do fruto apontadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*), para a
caracterização de PC2: a) região de 6,0 a 8,0 ppm; b) região de 2,42 a
3,0 ppm.

Figura 4.20 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das cascas do 63
fruto da laranja: sadia; doente sem as lesões; doente lesionada.

Figura 4.21 – Gráfico das amostras no espaço bidimensional de 64
escores da PCA: sadia; doente sem as lesões; doente lesionada.

Figura 4.22 – Regiões apontadas pelos gráficos de variáveis como 65
responsáveis pela variabilidade em PC1: a) 1,25 a 1,6 ppm; b) 3,53 a
3,77 ppm.

Figura 4.23 – Comparação entre espectros com as sequências de 66
pulsos: a) CPMG, b) zgcprr.

Figura 4.24 – Regiões apontadas pelos gráficos de variáveis como 67
responsáveis pela variabilidade em PC2: a) 2,60 a 3,10 ppm; b) 3,80 a
4,10, c) 0,8 a 1,25 ppm.

Figura 4.25 – Placa da análise biológica por difusão em agar. Legenda: 69
B – Branco (cloranfenicol); S: Sadia; DS: Doente sem lesões; DL:
Doente lesionada.

Figura 4.26 – Espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos 70
utilizados nas análises microbiológicas.

Figura 4.27 – Gráficos de regressão linear com porcentagem de 73
inibição *versus* concentração das amostras: a) sadia; b) doente sem
lesões e c) doente lesionada.

Figura 4.28 – Gráfico das porcentagens de inibição <i>versus</i> concentração da amostra sadia, doente sem lesões e doente lesionada.	74
Figura 5.1 – Espectro de RMN de ^1H da alanina (D_2O , 500 Mzh).	77
Figura 5.2 – a) Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (D_2O , 500 Mhz), da alanina; b) Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (D_2O , 500 Mhz), da alanina.	78
Figura 5.3 – Espectro de RMN de ^1H da treonina (D_2O , 500 Mzh).	79
Figura 5.4 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (D_2O , 500 Mhz) da treonina.	80
Figura 5.5 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> COSY (D_2O , 500 Mhz) da treonina.	80
Figura 5.6 – Espectro de RMN de ^1H do ácido láctico (D_2O , 500 Mzh).	81
Figura 5.7 – a) Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (D_2O , 500 Mhz) do ácido láctico; b) Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (D_2O , 500 Mhz) do ácido láctico.	82
Figura 5.8 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> COSY (D_2O , 500 Mhz) do ácido láctico.	83
Figura 5.9 – Espectro de RMN de ^1H do ácido cítrico (D_2O , 500 Mzh).	83
Figura 5.10 – a) Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (D_2O , 500 Mhz) do ácido cítrico; b) Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> COSY (D_2O , 500 Mhz) do ácido cítrico.	84
Figura 5.11 – Espectro de RMN de ^1H do etanol (D_2O , 500 Mzh).	85
Figura 5.12 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (D_2O , 500 Mhz) do etanol; b) Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (D_2O , 500 Mhz) do	86

etanol.

Figura 5.13 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> COSY (D_2O , 500 Mhz) do etanol.	86
Figura 5.14 - Prolina.	87
Figura 5.15 – Correlações à longa distância ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> TOCSY (MeOD, 500 Mhz) da prolina.	88
Figura 5.16 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (MeOD, 500 Mhz) da prolina.	89
Figura 5.17 – Espectro de RMN de ^1H do ácido α -amino butírico (AABA) (MeOD, 500 Mhz).	90
Figura 5.18 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> COSY (MeOD, 500 Mhz) do ácido α -amino butírico (AABA).	91
Figura 5.19 – Correlações à longa distância ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> TOCSY (D_2O , 500 Mhz) do ácido α -amino butírico (AABA).	91
Figura 5.20 – Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (MeOD, 500 Mhz) do ácido α -amino butírico (AABA).	92
Figura 5.21 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HSQC (MeOD, 500 Mhz) do ácido α -amino butírico (AABA).	92
Figura 5.22 – Arginina.	93
Figura 5.23 – Correlações à longa distância ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> TOCSY (MeOD, 500 Mhz) da arginina.	94
Figura 5.24 – Ácido γ -amino butírico (GABA).	94
Figura 5.25 – Correlações à longa distância ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de <i>g</i> TOCSY (MeOD, 500 Mhz) do ácido γ -amino butírico (GABA).	95
Figura 5.26 – Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de <i>g</i> HMBC (MeOD, 500 Mhz) do ácido γ -amino butírico	96

(GABA).

Figura 5.27 – Espectro de RMN de ^1H da nobeletina (MeOD, 500 Mzh). 97

Figura 5.28 – Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HMBC (MeOD, 500 Mhz) da nobeletina. 98

Figura 5.29 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de *g*COSY (MeOD, 500 Mhz) da nobeletina. 99

Figura 5.30 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HSQC (MeOD, 500 Mhz) da nobeletina. 100

Figura 5.31 – Espectro de RMN de ^1H da tangeretina (T) e da dimetoxi tangeretina (DT) (MeOD, 500 Mzh). 101

Figura 5.32 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de *g*COSY (MeOD, 500 Mhz) da tangeretina (T) e da dimetoxi tangeretina (DT). 102

Figura 5.33 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HSQC (MeOD, 500 Mhz) da tangeretina (T) e da dimetoxi tangeretina (DT). 103

Figura 5.34 – Espectro de RMN de ^1H da hesperidina (MeOD, 500 Mzh). 104

Figura 5.35 – Espectro de RMN de ^1H das cascas de laranja (D_2O , 500 Mhz). 106

Figura 5.36 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HSQC (D_2O , 500 Mhz) das cascas de laranja sadia, com expansão dos sinais em 1,5 a 2 ppm. 107

Figura 5.37 – Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HMBC (D_2O , 500 Mhz) das cascas de laranja doente selecionada. 108

Figura 5.38 – Espectro de RMN de ^1H das folhas de laranjeira. 109

Figura 5.39 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de 110

*g*HSQC (D_2O , 500 Mhz) das folhas de laranjeira, com a expansão da região de 0 a 3 ppm.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis, amostras e regiões analisadas na quimiometria.	34
Tabela 2 – Medidas dos halos de inibição bacteriana pela técnica de difusão em ágar.	68
Tabela 3 - Concentração das soluções ensaiadas, absorbâncias e porcentagens de atividade antioxidante dos extratos de folhas de laranjeira sadia, doente sem lesões e doente lesionada.	71
Tabela 4 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da alanina (D_2O , 500 Mhz).	77
Tabela 5 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da treonina (D_2O , 500 Mhz).	79
Tabela 6 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido láctico (D_2O , 500 Mhz).	81
Tabela 7 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido cítrico (D_2O , 500 Mhz).	84
Tabela 8 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do etanol (D_2O , 500 Mhz).	85
Tabela 9 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do prolina (MeOD, 500 Mhz).	87
Tabela 10 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido α -amino butírico (AABA) (MeOD, 500 Mhz).	90
Tabela 11 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da arginina (MeOD,	93

500 Mhz).

Tabela 12 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido γ -amino butírico (MeOD, 500 Mhz). 95

Tabela 13 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da nobeletina (MeOD, 500 Mhz). 97

Tabela 14 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da tangeretina e da dimetoxi tangeretina (MeOD, 500 Mhz). 102

Tabela 15 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da hesperidina (MeOD, 500 Mhz). 105

Tabela 16 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C dos alcenos não identificados. 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AQ	tempo de aquisição
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
B _{loc}	campo magnético local
B ₀	campo magnético estático
CPMG	<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>
COSY	<i>CORrelated SpectroscopY</i>
D	simbologia para acoplamento dipolar
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazila
d1	tempo de espera entre cada aquisição
d6	tempo de espera de observação à longa distância
F1	primeiro eixo de frequência
F2	segundo eixo de frequência
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HR-MAS	<i>High Resolution - Magic Angle Spinning</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	<i>half maximal Inhibitory Concentration</i>

J	constante de acoplamento entre <i>spins</i> nucleares
lb	Line Broadening; fator de multiplicação exponencial
MeOD	metanol deuterado
NS	Number of Scans; número de varreduras espectrais
PC	<i>Principal Component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
QSINE	<i>SQuared SINE bell weighting function</i>
R	Coeficiente de correlação linear
rf	radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H
RMN de ^{13}H	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C
s	simpleto
SI	<i>Size</i> ; número de pontos usados no processamento espectral
SINE	<i>Sine-bell weighting function</i>
sl	simpleto largo
SSB	<i>Shifted Sine-Bell weighting factor</i>
SWH	<i>Spectral Width in Hz</i>
t	triplete
T	Tesla
TD	<i>Time Domain</i> ; número de pontos utilizados na aquisição
TMS	tetrametilsilano
TMSP-D ₄	2,2,3,3-d ₄ -3-trimetilsilil propionato de sódio
TOCSY	<i>TOTAL Correlation SpectroscopY</i>
T_2	tempo de relaxação transversal
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro

UV/Vis	Ultra Violeta / Visível
<i>Xac</i>	Simbologia para <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
zgcppr	<i>Composite Pulse Presaturation</i>
δ	Simbologia para deslocamento químico
$2\tau_n$	tempo de eco de spin

RESUMO

A utilização da RMN aliada à quimiometria demonstrou ser importante para análises exploratórias de monitoramento e entendimento da ação patogênica causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Assim, nos extratos, as características morfológicas foram mais importantes para a composição da PCA e nas análises de HR-MAS, as variações metabólicas, principalmente de carboidratos, foram mais importantes. Houve portanto, a variação de, principalmente, carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos em regiões de menor deslocamento químico, cujo AABA pode ser considerado um composto inerente à resposta defensiva da planta. Nos sucos, compostos intrínsecos de processos fermentativos tiveram a produção acrescida demonstrando que a bactéria ocasionou um acréscimo na velocidade de apodrecimento do fruto. Os flavonóides também apresentaram variação no seu metabolismo e em alguns casos, houve redução de sua produção, que acarretaram na perda de compostos importantes, os quais conferem atividades farmacológicas importantes para as folhas. Contudo, a naringenina e hesperidina, flavonóides importantes, mantiveram-se constantes durante a infecção causada pela Xac. Os dados obtidos pela HR-MAS corroboraram os obtidos por análises de RMN em solução, demonstrando que as duas técnicas são complementares para análises mais abrangentes, já que diferenças de produção de terpenóides voláteis, por exemplo, são mais facilmente vislumbradas em matrizes com o mínimo de pré-tratamento, concebidas pela a RMN HR-MAS. As avaliações biológicas demonstraram que a RMN pode ser uma ferramenta no delineamento de experimentos com o monitoramento dos extratos. A tendência dos dados de atividade antioxidante foi similar à obtida na PCA dos extratos, possibilitando assim a correlação dos dados de ambas as técnicas na confirmação da contribuição dos aminoácidos como compostos importantes para o sistema defensivo dos *Citrus* frente ao ataque patogênico.

ABSTRACT

The NMR and chemometrics was used and show that is important to exploratory analysis of monitoring and understanding of the pathogenic action caused to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* bacteria. In the extracts, the morphological characteristics were more important in PCA composition and in HR-MAS analysis, the metabolic variations were more important in PCA characterization, especially carbohydrates. Thus, there was the variation especially of carbohydrates, amino acids and organic acids in regions of lower chemical shift, which AABA can be considered an inherent compound of plant defensive response. In orange juices, inherent compounds of fermentation processes have increased their production demonstrating that the bacterial infection has caused an increase in the rate of fruit decay. Flavonoids also have showed the variation of their metabolism and in many cases, there were reduction of their production, which were led to loss of important compounds for farmacologic characteristics of orange leaves. However, important flavonoids like hesperidin and naringenin remained constant during bacterial infection. HR-MAS data corroborated those results obtained in solution NMR analysis, indicating that both techniques are complementary to more comprehensive analysis, since differences in volatile terpenoids production, for example, were easily visualized in matrices without pretreatment through HR-MAS NMR. The biological evaluations have shown that NMR can be a tool in the design of experiments with the extracts monitoring. The trend of antioxidant activity data was similar with PCA of extracts, which the correlation between the results obtained from both techniques confirmed the contribution of amino acids as important compounds to defensive system of *Citrus* against the pathogenic attack.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LARANJA

1.1.1. TAXONOMIA E ORIGEM

A taxonomia do gênero *Citrus* é demasiadamente complexa, já que há um grande número de espécies pertencentes ao gênero, o que pode ser atribuído a alterações cromossômicas (IWAMASA & NITO, 1988). Várias propostas de classificação para o gênero têm sido sugeridas. Essas propostas diferem principalmente quanto ao número de espécies que compõem os diversos gêneros (BASTIANEL, *et al*, 2001). De acordo com USDA (United States Department of Agriculture/Natural Resources Conservation Service), o espécime em estudo é da família Rutaceae, gênero *Citrus* L. e espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (*C. sinensis*), popularmente conhecida como laranja doce que é originária do cruzamento entre *C. máxima* (Burm.) Merrill, conhecida como pumelo e a *C. reticulata* Blanco, conhecida como mandarin (SCORA, 1975; GREEN *et al.*, 1986).

Sobre sua origem, segundo AMARAL (1982), os *Citrus* provém de regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do arquipélago Malaico. Já a laranja teve sua origem ao sul do Himalaia e através da expansão árabe houve a extensão de sua cultura a outros continentes. Na Europa, o primeiro relato da espécie se deu entre os anos de 1139 e 1280, feitos pelo príncipe da igreja, Albertus Magnus. A cultura da laranja doce, mais especificamente, foi descrita por volta de 1178, na China, onde havia relatos do conhecimento de aproximadamente 27 variedades de laranja azeda, doce e tangerina. A

introdução da laranja doce na Europa se deu pelos portugueses entre os anos de 1760 e 1764 (AMARAL, 1982).

1.1.2. ASPECTOS ECONOMICOS

A citricultura desempenha um papel de grande importância na economia brasileira, sendo que o país é o maior produtor mundial de laranja, com aproximadamente 18×10^6 toneladas da fruta (FAO, 2007). Dentre as regiões produtoras, São Paulo é responsável por mais de 80% do montante produzido em 2005 (Figura 1.1) (IBGE/MAPA, 2006), no qual 467 dos 624 municípios existentes são produtores em que grande parte da produção é destinada ao suco concentrado para exportação (IEA, 2005).

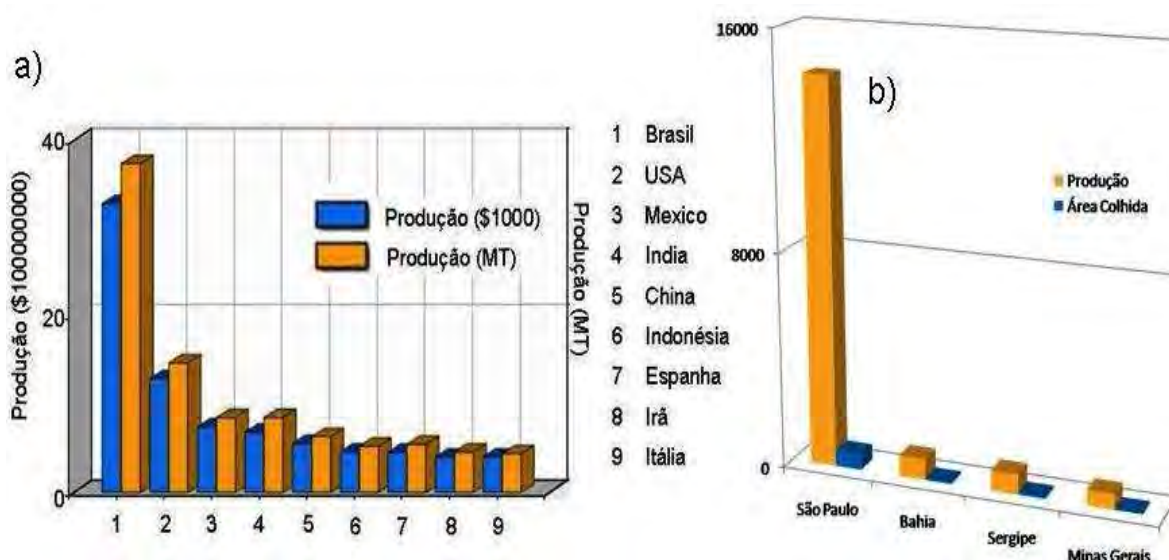


Figura 1.1 – Ranking de produção de laranja no mundo e no Brasil.

Fonte: FAO, 2007; IBGE/MAPA 2006.

A capacidade competitiva brasileira no mercado vem diminuindo com a introdução de problemas fitossanitários, como a bactéria do cancro cítrico, desestimulando produtores com o aumento do custo de produção.

1.1.3. ASPECTOS NUTRICIONAIS

Atualmente estudos nutricionais recomendam o consumo regular de frutas e vegetais para melhoria da qualidade de vida (IZQUIERDO *et al*, 2002). Dentre os benefícios que tal prática auxilia estão a redução de riscos de doenças coronárias (KNEKT, *et al*, 1996) e câncer (YOCHUM, *et al*, 1999; KOYUNCU, *et al*, 1999). Os *Citrus* são uma importante fonte de substâncias que promovem avanços na condição de vida, sendo relatados efeitos positivos contra doenças cardiovasculares (KUROWSKA, *et al*, 2000; BORRADAILE, *et al*, 1999), além de doenças inflamatórias (GALATI, *et al*, 1994), alérgicas (GABOR, 1986) e insuficiência na microcirculação venosa (STRUCKMANN & NICOLAIDES, 1994).

O suco do fruto da laranja apresenta um admirável conteúdo de flavonas, principalmente hesperidina e a naringenina. Altas concentrações de flavonas glicosiladas são raras em outras frutas ou legumes. Apenas outras espécies cítricas como lima, limão e tangerina apresentam tais compostos em concentração semelhante ao suco de laranja (TOMA'S – BARBERA'N & CLIFFORD, 2000). Além destas substâncias, ainda há a ocorrência das antocianinas que tem sua atividade associada à várias doenças como retinopatia diabética, fragilidade capilar (MAZZA & MINIATI apud RAPISARDA *et al*, 2009) e alta capacidade antioxidante (KÄHKÖNEN & HEINONEN, 2003).

1.2. O CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico é uma das mais agressivas e temidas doenças que assolam várias espécies de *Citrus*. Sua procedência é controversa. Existem relatos de que sua origem se deu no sul da China e que a planta hospedeira foi uma Rutaceae chamada de *Fortunella hindsii* comumente conhecida como “kumquat de Hong Kong” (LEE, 1918). No entanto, FAWCETT & JENKINS (1933), reportaram que o cancro foi originado na Índia e Java, e não em regiões do oriente, já que foram detectadas lesões em *Citrus* mantidos em herbários em Kew, Inglaterra, coletados entre os anos de 1827 e 1831 no Noroeste da Índia. Posteriormente, de acordo com a OEPP/EPPO (2004), o mal bacteriano foi relatado pela primeira vez nos

Estados Unidos em meados de 1910, através da introdução de mudas contaminadas providas do Japão (DAS, 2003).

Estudos recentes têm sido realizados com escopo de obtenção de bactericidas eficientes no combate ao cancro cítrico. Há mais de cem anos compostos cúpricos são adotados no combate a bactérias e fungos, todavia bactérias fitopatogências como a *Xac* têm se mostrado resistentes (CANTEROS, 1996). Ainda assim, fungicidas do grupo dos etilenobisditiocarbamatos em mistura com compostos cúpricos e a poda sanitária, em associação, são descritos como alternativas ao combate (DAS, 2003). Contudo, a única forma de eliminação do cancro é por erradicação com a queima da planta, bem como a eliminação de rebrotas na área onde foi realizada a erradicação e pulverização com bactericidas de todos os equipamentos utilizados (enxadas, tratores, etc). Além disto, a área deve ser interditada temporariamente (FUNDECITRUS, 2008). Campanhas de erradicação da doença são constantes nos países detentores do mal. Contudo, somente alguns países como África do Sul, Austrália e Nova Zelândia, conseguiram tal proeza. Nos Estados Unidos, apesar de em 1933, o cancro ter sido declarado erradicado, sua reincidência se tornou constante, principalmente no Estado da Flórida entre os anos de 1986 e 2001, através de mudas contaminadas (SCHUBERT *et al.*, 2001; STALL & CIVEROLO, 1991). Ainda na Flórida, dados recentes mostram que o cancro alcançou dimensões epidêmicas o que levou à adoção de medidas drásticas para sua eliminação, com destruição de mais de 1,5 milhão de árvores cítricas em pomares comerciais e residenciais (GOTTWALD *et al.*, 2002). Entretanto, em virtude de recentes desastres naturais (furacões), que recentemente atingiram tal país, principalmente na Flórida, a disseminação da doença ocorreu para vastas áreas tornando sua erradicação inviável, forçando, portanto, a suspensão dos programas de erradicação no estado (GOTTWALD & IREY, 2007).

A primeira constatação do cancro no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (BITANCOURT, 1957 *apud* BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2005). Na mesma época, relatos da moléstia foram descritos nos Estados de Mato Grosso do Sul, Paraná (AMARAL,

1957 *apud* BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2005) e desde 1996, em Goiás (MASSARI & BELASQUE JÚNIOR, 2006). Atualmente, o cancro está presente nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Roraima e Goiás (NASCIMENTO *et al. apud* BELASQUE JUNIOR, 2005). Além disto, encontra-se também distribuído em dezenas de países localizados nos continentes oceânico, asiático e americano, contaminando em grande parte as plantas da família *Rutaceae* (CIVEROLO, 1984).

Desde a década de 50, programas de erradicação têm sido implementados no Estado de São Paulo objetivando a restrição da disseminação do cancro cítrico. Para o seu controle estão incluídas a produção de mudas sadias, plantio de espécies resistentes, controle da larva-minadora-do-citros (*Phyllocnistis citrella*) devido ao aumento a incidência da doença, e aplicações regulares de bactericidas cúpricos (LEITE JÚNIOR & MOHAN, 1990), que tem sido usados regularmente no controle à praga em todo o mundo. Estes bactericidas, devido à presença do cobre, reduzem a colônia bacteriana na superfície do material contaminado, porém no decorrer das diversas aplicações podem-se criar colônias resistentes, bem como contaminação de solos (GOTTWALD & GRAHAM, 1992; STALL, *et al.*, 1980).

A infestação por cancro em *Citrus* é causada por *Xanthomonas axonopodis* (EPPO/CABI, 1997), uma bactéria fitopatogênica gram-negativa (GUZZO, 2007). Cada variedade do gênero *Xanthomonas* tem um hospedeiro diferente produzindo, portanto, diferentes sintomas e/ou doenças e concomitantemente, uma nova espécie bacteriana. Esta prática, chamada de “novo hospedeiro-nova espécie” gerou um gênero complexo com mais de 100 espécies (STARR, 1981 *apud*, VAUTERIN *et al.*, 2000). Sendo assim, ela é capaz de infectar cerca de 120 diferentes tipos de plantas monocotiledôneas e 270 dicotiledôneas (LEYNS, 1984).

DA SILVA e colaboradores, em 2002, publicaram o seu sequenciamento genético, onde propôs para *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Haase) (VAUTERIN *et al.*, 2000), a abreviatura *Xac*, a qual foi amplamente aceita e será utilizada no presente trabalho. Tal bactéria é extensivamente encontrada em climas tropicais e subtropicais com alto

volume de precipitação e altas temperaturas, mas também pode ocorrer em ambientes secos (POLEK *et al.*, 2007). Na Flórida, em 1984, variações genéticas foram observadas gerando cancroses atípicas, causada por um grupo menos agressivo da *Xac*, a *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe B (*Xaa-B*) (VERNIÈRE *et al.*, 1998), conhecida como “falso cancro”, oriunda da América do Sul e *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe C (*Xaa-C*), detectadas em plantas no Estado de São Paulo, sendo restrita ao Brasil (AMARAL *et al.*, 2003). Sendo assim o grupo asiático (*Xac*) ataca todas as espécies de *Citrus* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e é extremamente agressiva, enquanto que a do grupo sul-americano designado (*Xaa-B*) é restrita ao limão verdadeiro, limão galego, laranja azeda e pomelo é menos agressiva. O grupo restrito ao Brasil, *Xaa-C*, ataca somente o limoeiro galego, mas mesmo assim, pode gerar resposta em outras plantas (GOTTWALD *et al.*, 2002).

1.2.1. CICLO DA DOENÇA E SEUS SINTOMAS

Na Figura 1.2, temos a representação do ciclo do cancro. A bactéria penetra na planta pelos estômatos (GOTTWALD & GRAHAM, 1992; KOIZUMI & GRIERSON, 1979) ou por lesões ocasionais, que possibilitam o contato direto da bactéria com o mesófilo foliar, inativando a resistência natural da folha (PALAZZO, 1984) e assim a colonização restringe-se ao centro de infecção (Figura 1.3). De 4 a 7 dias após a inoculação da bactéria, em condições ótimas, como atividade aquosa e temperatura entre 20 a 30°C, as células de *Xac* multiplicam-se intracelularmente gerando erupções minúsculas ligeiramente levantadas (KOIZUMI, 1985). A taxa de desenvolvimento é de aproximadamente 1 mm por mês durante 6 a 8 meses e quando a incidência é gerada por abertura foliar mecânica (cortes) as lesões crescem mais rapidamente. O crescimento das lesões ocorre abundantemente nos primeiros 30 a 40 dias após a inoculação da doença sendo que a partir do quadragésimo dia, o crescimento decresce até próximo de zero (GRAHAM *et al.*, 1990). Porém, mesmo em ótimas condições, os sintomas podem levar 60 dias ou mais para aparecerem,

sendo que a infestação ocorre mais facilmente em frutos verdes, no último estágio de maturação. (GOTO *et al.*, 1992).

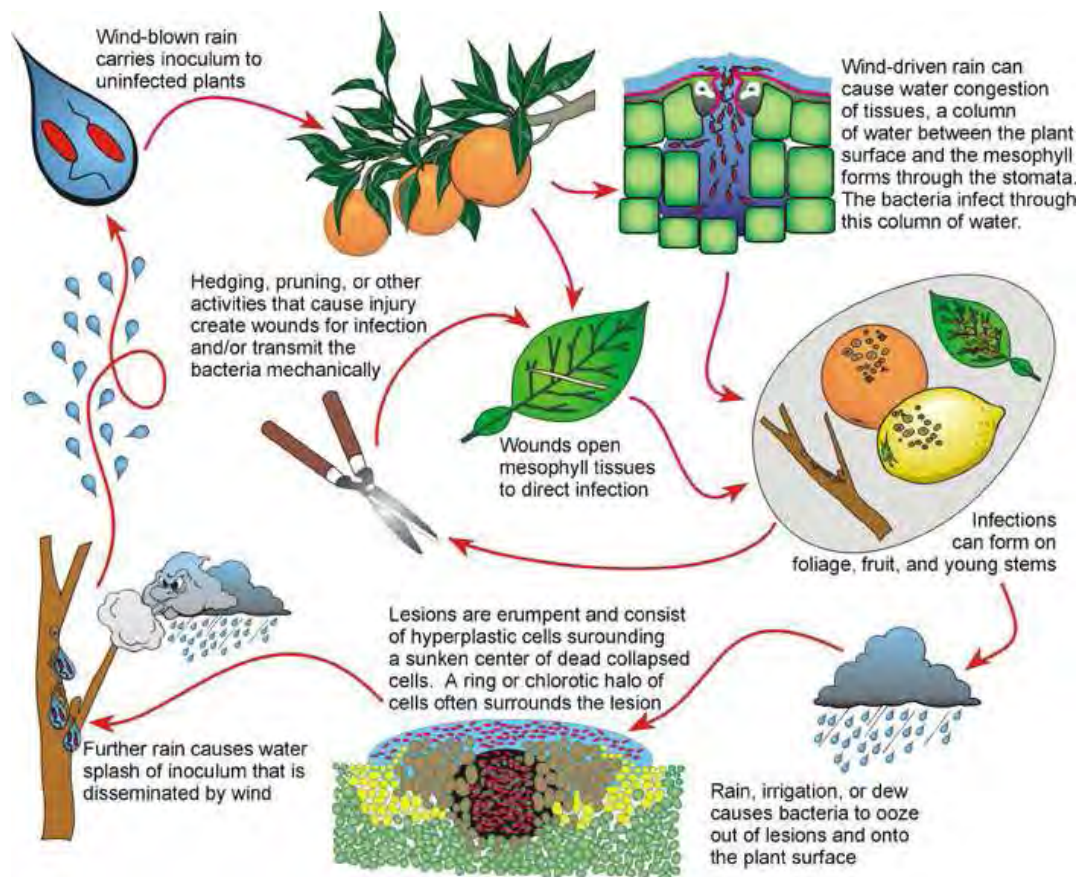


Figura 1.2 – Esquema representativo do ciclo do cancro cítrico.

Fonte: SCHUBERT *et al.*, 2001.

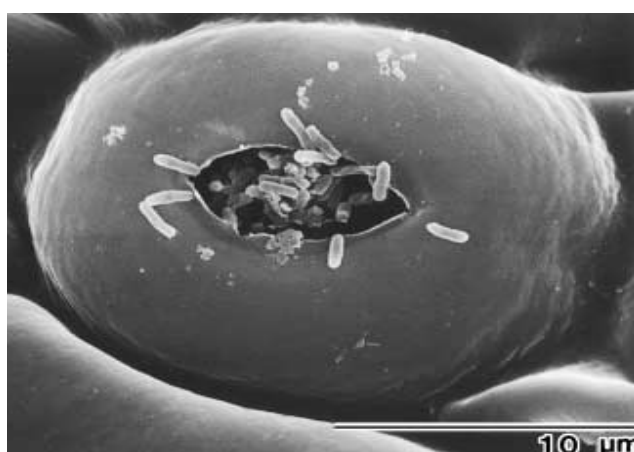


Figura 1.3 – Microscopia eletrônica depois de cinco dias após a infestação por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Fonte: GRAHAM *et al.*, 2004.

Os indícios do cancro aparecem em toda a parte aérea da planta. Primeiramente, as lesões têm aspecto cinzento, tornando-se amarronzadas com margens úmidas e halos amarelos aparecem. A umidade pode desaparecer no decorrer da maturação da doença (SCHUBERT *et al.*, 2001). Nas folhas, são caracterizados por lesões necróticas eruptivas amarronzadas cíclicas e salientes – algumas vezes circundadas por halo amarelo – (BITANCOURT, 1957; DAS, 2003), presentes em ambas as faces, características que não ocorrem na maioria das outras doenças e pragas (FUNDECITRUS, 2009; NETO *et al.*, 2006)

A maior suscetibilidade das folhas ocorre quando estas encontram-se menores que 85% de seu tamanho natural e se tornam mais resistentes quando adquirem tamanho final (GRAHAM & GOTTWALD, 1991).

Eventualmente, o centro da lesão cai, gerando buracos nas folhas e fruto. No fruto ocorre o surgimento de pequenas manchas amareladas circulares que aos poucos vão ficando marrons. São ainda salientes parecidas com “verrugas”. Com o progresso da doença, o fruto pode rachar, acelerando seu processo de apodrecimento (FUNDECITRUS, 2008). Sua maior suscetibilidade ocorre também na fase jovem, quando este está com 2 a 4 cm de diâmetro (GRAHAM & GOTTWALD, 1991). Nos ramos, as deformações também são acentuadas na forma de crostas da cor parda (FUNDECITRUS, 2008). Na Figura 1.4, estão ilustradas as infestações em folhas, fruto e ramos e a Figura 1.5, mostra uma ampliação da necrose.



Figura 1.4 – Infestação por cancro cítrico em: A – folhas, B – fruto e C – ramos. Fonte: www.fundecitrus.com.br



Figura 1.5 – Ampliação da necrose de cancro cítrico. Fonte: GOTTWALD *et al.*, 2002.

O grande problema da cancrose se dá principalmente pela reposta do estresse biológico do hospedeiro à doença, onde há a produção de etileno, o que ocasiona a queda prematura do fruto que, por não estar totalmente maduro, torna-se inaproveitável para a fabricação do suco de laranja (CROZIER *et al.*, 2001; BROWN, 2001 *apud* CARVALHO, 2006; GOTO & YAGUCHI, 1979).

A disseminação da doença é outro problema grave. A ruptura da epiderme a partir da formação do cancro (Figura 1.2) ocasiona a dispersão da bactéria e consequente contaminações de árvores vizinhas. Dispersões a médias distâncias se dão através do vento e água e a longas distâncias se dá por circulação humana com a condução de plantas doentes e/ou expostas ao ambiente contaminado, bem como equipamentos da mesma forma expostos, utilizados, por exemplo, para podas. (CROZIER *et al.*, 2001 & BROWN, 2001 *apud* CARVALHO, 2006). A larva-minadora-dos-citrus, é outra praga a ser controlada em uma citricultura, já que as “minas” que são aberturas dos estômatos das folhas, aumenta em grande parte a incidência bem como a possibilidade de dispersão da doença.

Sendo assim, aliada às características nutricionais e econômicas, a pesquisa em torno de problemas fitossanitários se torna importante e até indispensável, para o conhecimento das mazelas que afetam a espécie e subsequentes propostas de controle e até erradicação do cancro.

1.3. A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é sem dúvida o artifício mais importante para desvendar estruturas moleculares em todos os estados físicos da matéria (WINNING, *et al.*, 2007). Além disto, é uma ferramenta crucial na elucidação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido. Tanto análises qualitativas quanto quantitativas são passíveis de aplicação a diversos sistemas como alimentares, biológicos, de combustíveis, fitoquímicos, dentre outros. A obtenção de sinais de hidrogênio possibilitou a caracterização de ambientes químicos biológicos (tecidos e órgão de seres vivos) imersos em água, culminando no desenvolvimento da imagem de tecidos por ressonância magnética, nos dias de hoje, técnica fundamental para a medicina e outras áreas (HOLZGRABE *et al.*, 2005; TURCZAN & MEDWICK, 1977; MAZZONI *et al.*, 1998).

Em 1902, o físico Pieter Zeeman ganhou o prêmio Nobel pela descoberta de que certos núcleos se comportam diferentemente quando submetidos a um campo magnético externo. Em 1945, dois físicos, Felix

Bloch e Edward Purcell, tentando medir momentos magnéticos nucleares, observaram sinais de absorção de radiofrequência (rf) pela água e parafina, fornecendo bases para a construção do primeiro espectrômetro de ressonância magnética, galgando assim o prêmio Nobel na época (EMSLEY & FEENEY, 2007).

O fenômeno da ressonância magnética nuclear se baseia em medidas de absorção seletiva de radiofrequência ou ondas de rádio por núcleos amostrais imersos em um campo magnético. Com a regressão do núcleo excitado ao estado inicial há a emissão de energia no domínio da radiofrequência que fornece, com a aplicação da Transformada de Fourier, os espectros de atuais (MACOMBER, 1998; GIL & GERALDES, 2002).

Assim, os experimentos de RMN podem ser apresentados em termos de sequências de pulsos que descrevem as séries de pulsos ou gradientes de pulsos utilizados para manipular o núcleo atômico (CLARIDGE, 2008).

1.3.1. A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM SOLUÇÃO

A RMN em solução foi primeiramente explorada em 1948 por Bloembergen e colaboradores com o estudo dos fatores que afetavam o relaxamento (CASTOLO, 2008). Porém somente o apontamento de considerações importantes, em torno de 1949 e 1951, como o deslocamento químico (δ) e a constante de acoplamento spin-spin (J), em que seus valores são dependentes de ambientes químicos distintos, absorvendo energia em frequências ligeiramente diferentes, fizeram da RMN uma técnica de incomparável valor (BLIGNY & DOUCE, 2001).

Diante disto, a RMN tem se mostrado muito importante para a análise de misturas complexas em diversas áreas como a alimentícia, para análise de metabólitos, análise de produtos industriais (WELJIE *et al.*, 2008; LIN & SHAPIRO, 1996; WINDIG, *et al.*, 2002), além do subsídio à classificação taxonômica de espécies do reino vegetal, principalmente, (já que diferentes espécies produzem diferentes metabólitos), estudadas em

grande parte por RMN de líquidos (SCHNEIDER, 2007). Além disto, a RMN fornece tecnologia e recursos suficientes para análises reprodutíveis no quais identificações e quantificação de moléculas podem ser alcançadas (WELJIE *et al*, 2008). Ainda neste sentido, a RMN tem se tornado uma importante ferramenta no controle de qualidade de alimentos como é o caso de estudos já realizados na identificação de origem geográfica de diversos óleos de oliva (MANNINA *et al.*, 2001) e vinhos (BRESCIA *et al*, 2003) e para estabelecer a idade de vinagres balsâmicos (CONSONNI & GATTI, 2004).

1.3.2. A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE AMOSTRAS HETEROGÊNEAS (HR-MAS)

A técnica de HR-MAS ou High Resolution Magic Angle Spinning (Giro no Ângulo Mágico com Alta Resolução) combinou as vantagens de RMN em solução com RMN de amostras sólidas, possibilitando a combinação das características mais importantes destas duas técnicas, como a alta resolução obtida por RMN em solução e a necessidade do mínimo de preparação de amostra inerente a RMN de sólidos (SACCO *et al*, 1998). Além disto, possui alta sensibilidade com a detecção de componentes em um mistura em concentrações de até 1 μ M (GARROD *et al*, 1998) requerendo ainda, poucos segundos para obtenção dos espectros de RMN de ^1H (BROBERG, 1998). Tem sido também, uma técnica de grande relevância em estudos de mecanismo defensivo de plantas através da proteômica estrutural com a determinação das estruturas bem como a elucidação da relação de estrutura-afinidade (AL-HASHIMI & PATEL, 2002).

Inicialmente a HR-MAS foi introduzida com o objetivo de analisar produtos vinculados a matrizes inerentes da síntese heterogênea ou síntese no estado sólido (CILLI *et al.*, 1997; CLARIDGE, 2008; YAN, *et al.*, 1998). No entanto, diversas abordagens alternativas têm sido estudadas como tecidos animais (MILLIS *et al*, 1997; HENG, *et al*, 1998); alimentos (SACCO *et al.*, 1998; GIL, *et al.*, 2000; BROBERG & KENNE, 2000; BRESCIA *et al.*, 2002), análise de entidades ligadas a resinas (BIANCO *et al.*, 2000; RUHLAND *et*

al., 1998; KEIFER *et al.*, 1996), na química combinatorial (SHAPIRO & GOUNARIDES, 2000/2001) e quando aliada a ferramentas matemáticas, possibilita outra gama de aplicações como no auxílio na sistemática de identificação de espécies (ALCANTARA *et al.*, 2007)

1.3.2.1. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA DE HR-MAS

A baixa mobilidade causada pelo movimento restrito das moléculas em sólidos e a heterogeneidade das amostras semi-sólidas, proporciona alargamento dos sinais já que os processos de relaxação da magnetização induzida são causados devido ao movimento molecular e dependem das várias orientações experimentadas pelo núcleo (MACOMBER, 1997; BLOEMBERGEN *et al.*, 1948). Neste sentido, fatores que possibilitam a redução de interações desfavoráveis conduzindo à significativa melhora de resolução espectral foram desenvolvidos.

Se uma amostra for girada sobre um eixo inclinado ao campo aplicado em um ângulo de $54,74^\circ$, o componente da equação geral de ressonância $3\cos^2\Theta - 1$ anula-se. Sendo assim, o giro no ângulo mágico, no qual é atingida altas velocidades de rotação, da ordem de kHz (5 a 15 KHz), possibilita a redução da perda de informação pelo alargamento da linha espectral (LINDON *et al.*, 2009). Tal fato é alcançado, pois há a minimização de fenômenos que causam perda de resolução espectral, dependentes de tal ângulo, tais como acoplamento dipolar e de deslocamento químico anisotrópico, bem como a diferença de susceptibilidade magnética (DUER, 2002; SANDERS & HUNTER, 1987; BROBERG & KENNE, 2000; ANDRONESI *et al.*, 2008).

1.3.2.1.1 O GIRO NO ÂNGULO MÁGICO

Os spins nucleares sofrem influência dos núcleos circunvizinhos, que acarreta na formação de um campo magnético local (B_{loc}). A diferença entre os B_{loc} dos spins contribuem para o acoplamento dipolar. O

acoplamento dipolar (D), contudo, tem uma dependência angular (Figura 1.6) de acordo com a equação (CLARIDGE, 2008):

$$D \approx r^{-3}(3\cos^2 \Theta - 1)$$

Equação 1

Em que r é a separação internuclear e Θ é o ângulo entre o campo magnético estático e o vetor internuclear (Figura 1.6).

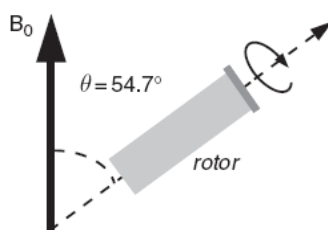


Figura 1.6 – Representação do giro no ângulo mágico com inclinação de 54,74° em relação ao campo magnético estático. Fonte: CLARIDGE, 2008.

Para ambientes isotrópicos, as médias dos acoplamentos dipolares aproximam-se a zero. Em ambientes com movimento restrito, acoplamentos dipolares residuais podem ser observados e alargamentos das linhas de RMN são visualizados. Entretanto, com o giro da amostra no ângulo mágico (54,74°), o termo da Equação 1 torna-se zero e o efeito de acoplamento dipolar é reduzido drasticamente.

1.3.2.1.2. ACOPLAMENTO DIPOLAR ENTRE SPINS NUCLEARES

O valor médio do campo magnético experimentado em cada núcleo depende da rotação dos núcleos vizinhos em que a intensidade do campo magnético local (B_{loc}) pode ser modificada (aumentada ou diminuída), dependendo da posição dos dipolos magnéticos relativos já que os spins nucleares interagem magneticamente através do espaço. Tal fator gera uma

faixa de frequências para determinado núcleo resultando em linhas largas de RMN (CLARIDGE, 2008).

Devido ao movimento restrito em amostras sólidas e/ou semi-sólidas, os efeitos de acoplamento dipolar é visualizado, enquanto que em amostras de livre e rápida rotação dos spins nucleares (líquidos não viscosos), o efeito de acoplamento dipolar é reduzido drasticamente.

1.3.2.1.3. ANISOTROPIA DO DESLOCAMENTO QUÍMICO

A distribuição de elétrons em torno das ligações químicas é assimétrica ou anisotrópica, o que resulta na dependência do campo local sentido por um núcleo, e daí o seu deslocamento químico, com a orientação da ligação em relação ao campo aplicado. Em solução, os movimentos rápidos e aleatórios das moléculas geram valores médios para a anisotropia do deslocamento químico, de modo que se observam frequências diferentes para núcleos de ambiente quimicamente diferente. No entanto, em amostras com mobilidade restrita, existem diversas orientações das ligações em relação ao campo magnético estático (B_0). Tal situação resulta em deslocamentos químicos diferentes para núcleos iguais e consequente alargamento do sinal de RMN (CLARIDGE, 2008).

1.3.2.1.4. DIFERENÇA DE SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA

Amostras heterogêneas resultam na dificuldade de obtenção de homogeneidade do campo magnético local dos núcleos, devido a diferenças de suscetibilidade magnética, o que acarreta alargamento das linhas de ressonância. A susceptibilidade magnética tem também uma dependência com o ângulo, de acordo com a Equação 1. Sendo assim, o giro no ângulo mágico acarreta, da mesma forma, redução de tal efeito e, portanto, melhoria na resolução do sinal analítico (CLARIDGE, 2008).

1.3.3. SEQUÊNCIA DE PULSOS

As sequências de pulsos são de importância fundamental no alcance dos dados a partir de experimentos de RMN. Elas são as chaves para a obtenção das informações adequadas a partir dos experimentos realizados. Os programas de pulsos são derivados das diferentes possibilidades de manipulação nuclear em que, hoje em dia, existem sequências de pulso básicas e a partir destas, todas as outras são derivadas (CLARIDGE, 2008). No presente trabalho, dois programas de pulsos básicos foram testados, para a supressão dos sinais da água: a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) e a zgcppr (composite pulse presaturation).

1.3.3.1. CPMG

CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill, Figura 1.7) é um programa de pulsos que tem como um dos objetivos a medida de tempo de relaxação transversal (T_2) a partir da remoção da não homogeneidade do campo e a eliminação de moléculas com um T_2 curto, que geram sinais alargados, possibilitando a obtenção de melhor visualização dos sinais de moléculas pequenas (T_2 longo) (CLARIDGE, 2008).

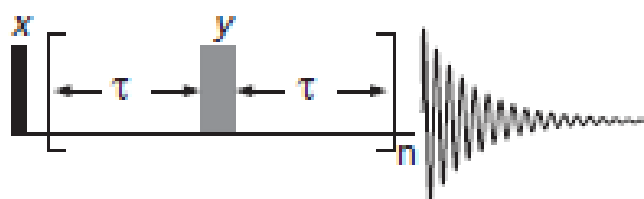


Figura 1.7 – Sequência de pulsos CPMG. Fonte: CLARIDGE, 2008.

Nesta sequência, a magnetização é mantida no plano xy por meio de consecutivos pulsos de 180° , separados por intervalos de tempo τ , durante n vezes, até que os spins com T_2 curto tenham relaxado. Contudo, a magnetização de moléculas com T_2 longo também é perdida, independente da heterogeneidade do campo. Tal fato acarreta uma redução da relação

signal/ruído e, conseqüentemente, a perda de sinais de baixa intensidade que podem se perder no ruído.

1.3.3.2. Zgcppr

A sequência zgcppr, é um programa padrão para aquisição de espectros de hidrogênio com supressão do sinal da água modificado com pulsos compostos (Figura 1.8).

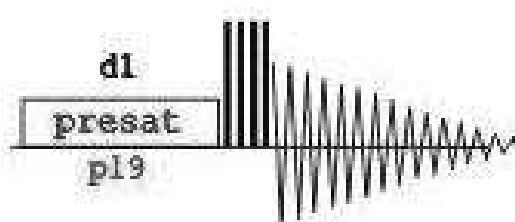


Figura 1.8 – Programa de pulsos da zgcppr. Fonte: Manual Bruker BioSpin.

A supressão do sinal de interesse se dá pela aplicação de um pulso de radiofrequência (rf) fraco e contínuo na frequência de radiação a ser suprimida, seguido de excitação e aquisição. Os spins do solvente apresentam-se saturados e então, não observáveis. Na zgcppr, ainda são aplicados pulsos compostos com duração e fases variáveis, que são utilizados para compensar efeitos de não homogeneidade do campo magnético e imperfeição dos pulsos, em que são realizadas varreduras no ciclo de fases (CLARIDGE, 2008).

1.4. QUIMIOMETRIA E RMN

A maior parte dos fenômenos observáveis nas ciências empíricas é de natureza multivariada (HARDLE & SIMAR, 2007). A análise multivariada consiste de uma coleção de metodologias utilizadas quando dados métricos são obtidos para cada analito em uma ou mais amostras. Inicialmente, a maior parte das aplicações foi em ciências comportamentais e biológicas. No

entanto, com a difusão da tecnologia, o emprego de métodos multivariados tem se espalhado por diversos campos de investigação científica (RENCHEER, 2002).

A quimiometria – termo proposto em meados da década de 70 – é designada para descrever técnicas com aplicação de conhecimentos estatísticos, matemáticos e computacionais que auxiliam no tratamento e interpretação de dados químicos de natureza multivariada (SENA, *et al.*, 2005).

A área da química que a quimiometria contribuiu significativamente foi a de espectroscopia molecular inserindo-se em dados obtidos por experimentos de absorção na região do ultravioleta/visível, no infravermelho, Raman, fluorescência molecular (BRERETON, 2000). Além disto, análises multivariadas têm sido aplicadas a dados obtidos por espectroscopia de RMN em que um dos trabalhos pioneiros, com a identificação automática de estruturas, foi desenvolvido na década de 60 (LINDON, *et al.*, 2001).

Os dados obtidos por RMN geram matrizes complexas de elevada dimensionalidade em que há grande similaridade inerente aos espectros culminando na impossibilidade de análise visual do conjunto de dados (DEFERNEZ & COLQUHOUN, 2002). Sendo assim, a utilização de métodos estatísticos é de grande valia para a assimilação da variabilidade dos dados, tanto com relação à variação de constituintes quanto a diferenças de concentração pela dificuldade de integração e advento de compostos cujos sinais podem estar sobrepostos.

Dentre as técnicas de análise exploratória mais utilizadas para tratamento de dados espectroscópicos tem-se a análise por PCA (Principal Component Analysis) (AMIX-VIEWER, 2002).

1.4.1. PRINCÍPIO DE ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS

Na análise exploratória as informações são organizadas em matrizes $n \times m$ onde os dados dispostos nas linhas são inerentes às amostras e as colunas são as variáveis medidas. No caso de um conjunto de dados de

RMN, as amostras são os espectros obtidos e as variáveis são os pontos em que o conjunto espectral foi processado (SI) (Figura 1.9), que em seguida são submetidos a tratamentos específicos como a análise por componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA).

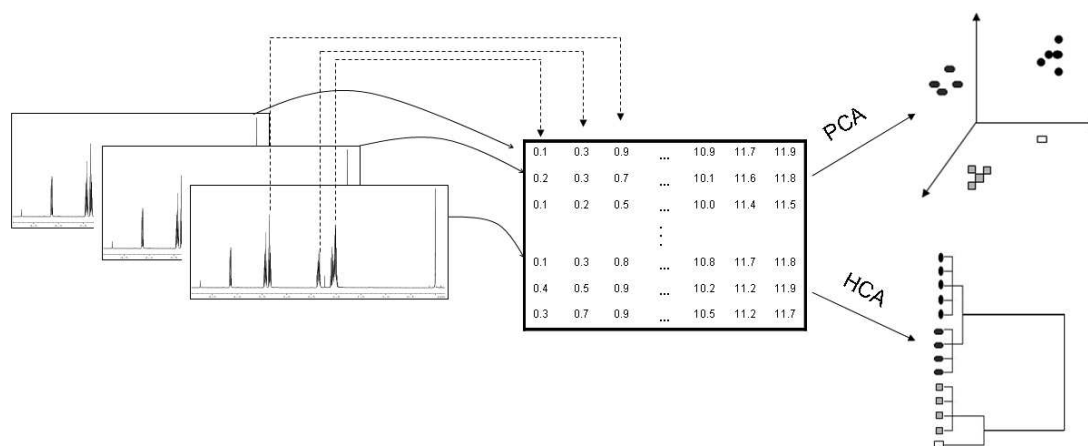


Figura 1.9 – Esquema representativo da disposição espectral em matrizes e posteriores tratamentos estatísticos empregados.

Além da transformação dos dados espectrais em matrizes e antes das análises propriamente ditas, faz-se necessário a aplicação de certas manipulações matemáticas denominadas de pré-processamentos que tem por objetivo a redução ou até remoção de informações irrelevantes (randômicas ou sistemáticas) ao conjunto de dados (BEEBE *et al.*, 1998).

1.4.1.1. PRÉ-PROCESSAMENTO SOB AS VARÁVEIS E AS AMOSTRAS

- Pré-processamento sob as variáveis: autoescalamento

O autoescalamento é um pré-processamento aplicado a cada variável, que envolve o emprego em conjunto de dois outros pré-processamentos, em que primeiramente centra-se os dados e em seguida aplica-se o escalonamento pela variância (BEEBE *et al.*, 1998; BRERETON, 2003). Centrar na média é utilizado principalmente quando há flutuações nas linhas de base espectrais, diminuindo a influência de ruídos espectrais nas

análises quimiométricas. Consiste em subtrair cada variável da coluna pelo vetor média da mesma resultando na soma de seus valores igual a zero e, além disto, o centróide do grupo agora encontra-se na origem do sistema. O escalamento pela variância é aplicado para diminuir influência de peso das variáveis causado por suas escalas. É realizado com a divisão de cada elemento da coluna (vetor variável) pelo desvio padrão da mesma (BEEBE *et al.*, 1998).

Na Figura 1.10a observamos os dados brutos; na Figura 1.10b e 1.10c, verificamos os dados após submissão ao pré-processamento centrado na média e escalamento pela variância, respectivamente. Sendo assim, com a aplicação do autoescalamento são obtidos dados com a média igual a zero e variância igual a um, conduzindo cada variável à mesma influência no modelo.

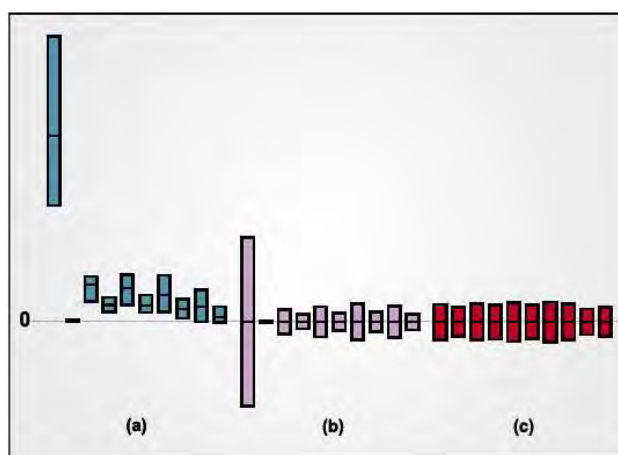


Figura 1.10 – Representação do autoescalamento com: a) dados originais; b) centrados na média (média correspondendo à zero); c) dados autoescalados: centrados na média e escalados pela variância (média igual a zero e desvio padrão igual a um). Fonte: MATOS, 2003.

- Pré-processamento sob as amostras: Normalização e Correção de linha de base

- o Normalização

A normalização trata-se da divisão das variáveis de cada amostra por uma constante. Para unidades de comprimento, a normalização é obtida pela divisão dos dados pela constante designada 2ª-norma, calculada pela raiz quadrada da soma de todos os valores ao quadrado (BEEBE *et al.*, 1998). Este procedimento é importante para a remoção de variações sistemáticas muitas vezes associadas às variações de concentração das amostras.

o Correção de linha de base

A correção de linha de base é realizada através da subtração de uma média de pontos pertencentes às bases de todos os espectros onde, apenas pontos que se encontram acima ou abaixo da linha de base espectral são mantidas como variáveis úteis à construção do modelo.

1.4.1.2. ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

O objetivo da análise por componentes principais é inferir sobre as propriedades da população a partir de variáveis medidas nas amostras estudadas, além de auxiliar na identificação de amostras que fogem do padrão de distribuição normal dos dados (*outliers*). É um artifício matemático de alteração de variáveis em que cada analito medido pode ser considerado como um eixo de variabilidade, estando usualmente correlacionados. Sendo assim, ocorre a transformação dos dados, em que cada vetor é expresso em função de combinações lineares das antigas variáveis, de tal modo a descrever a mesma variabilidade total existente, com o mesmo número de eixos originais. Os eixos resultantes, chamados de componentes principais, são ortogonais e, portanto linearmente independentes, cuja maior retenção de informação é dada no primeiro eixo, seguido pelo segundo e assim sucessivamente, gerando um padrão de distribuição de informações suficiente nos primeiros eixos (BEEBE *et al.*, 1998; OTTO, 1999).

Na formação das componentes principais (PC), ocorre, contudo, a decomposição da matriz original (X) pela PCA, gerando duas matrizes menores, a matriz de escores (amostras) e de variáveis (Equação 2) como esquematizado na Figura 1.11.

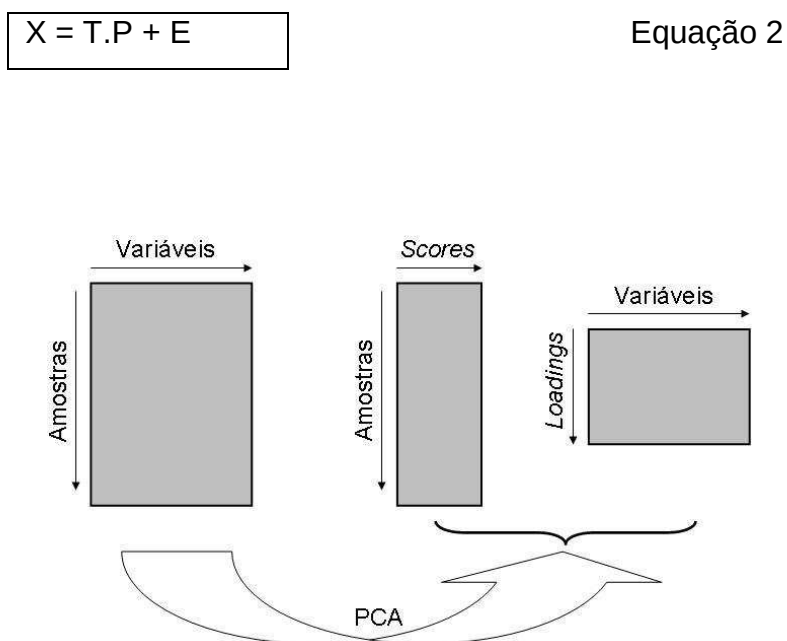


Figura 1.11 – Esquema de decomposição da matriz original pela PCA.

Na equação, X é a matriz original com m linhas (amostras) e n colunas (analito); T representa os *scores* com m linhas e d colunas (componentes principais); P é designado *loadings* com n colunas e d linhas e E é a matriz de resíduos (OTTO, 1999).

A matriz de *scores* relaciona-se com a disposição das amostras no novo espaço vetorial e revela correlações entre as variáveis e a informação de quanto determinada variável contribui para a composição do novo eixo, assim como as relações entre as variáveis originais está embutida nos *loadings* (MARTENS, 1989).

1.4.1.3. ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS HIERÁRQUICOS (HCA)

A análise de agrupamentos hierárquicos (hierarchical clusters analysis - HCA) é um método que foi estabelecido primeiramente por biólogos para determinar semelhança entre organismos e separá-los em grupos (BRERETON, 2003). Tal análise busca reconhecimento de padrões naturais dentro do conjunto de dados, cujos objetos dentro de cada agrupamento sejam semelhantes, mas os agrupamentos, diferentes entre si. Em muitos casos a similitude é baseada em medidas de distâncias interpontuais, em que as informações obtidas são representadas em dendrogramas, os quais exibem os agrupamentos e similaridade entre amostras e variáveis. As distâncias interpontuais (variáveis e amostras) são organizadas, contudo, numa matriz de similaridade que variam entre zero e um, em que um alto índice indica uma distância pequena entre dois agrupamentos e, portanto uma alta similaridade (BEEBE, 1998; RENCHER, 2002).

1.5. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

A terapia antimicrobiana foi iniciada na década de 30 (JAWETZ *et al.*, 1998) e já nas décadas seguintes, grandes mudanças têm ocorrido, tanto nos tipos de infecção bem como a suscetibilidade e resistência das bactérias, inerentes do uso indiscriminado das drogas, culminando numa incessante busca por terapias alternativas cada vez mais eficazes (ANTUNES *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A atividade biológica de um composto se dá quando este exerce uma ação específica sobre um ser vivo sendo ele microorganismo, animal ou vegetal. Existe uma grande variedade de compostos orgânicos originários de vegetais (oriundos do metabolismo primário ou secundário) que são biologicamente ativos, com ações antiinflamatórias, antiviral, citotóxica, fungicida, analgésica, dentre outras (PLETSCH, 1998).

Os extratos obtidos de espécimes vegetais são passíveis a ensaios simples e baratos de atividade biológica permitindo um rápido, porém não definitivo estudo dos mesmos (HOSTETTMANN *et al.*, 1997).

O antibiograma ou teste de suscetibilidade a antimicrobianos é um teste de grande importância clínica e tem o objetivo de determinar a sensibilidade das bactérias quando submetidas à ação dos antimicrobianos (JORGENSEN & FERRERO, 1998). Em 1966, BAUER e colaboradores desenvolveram o método de difusão em disco e desde então é bastante utilizado nos laboratórios de microbiologia no Brasil. Tal teste baseia-se na difusão, através do ágar nutriente, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano (SEJAS *et al*, 2002). Além de ser um método qualitativo bastante empregado, ainda é relativamente econômico, prático, de fácil execução e concebido para bactérias de crescimento rápido (JORGENSEN, 1993), como as utilizadas no presente trabalho, que necessitam de pouco tempo para estabelecer seu nível ótimo de crescimento (HOFFMANN, 2001).

No presente trabalho, para os ensaios biológicos, foi utilizada a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. A *S. aureus* é uma bactéria patogênica que frequentemente é responsável por gastroenterites alimentares (ZECCONI & HAHN, 2000), doenças respiratórias, dentre outras. *E. coli* é proveniente do intestino humano, mas se presente em doses elevadas causa diversas infecções como urinária, colecistite, septicemia, etc. (BIER, 1976).

1.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atividade antioxidante é uma característica de compostos que resguarda o sistema biológico contra o efeito danoso de reações ou processos que podem causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994). O papel de alimentos antioxidantes na prevenção de doenças tem sido cada vez mais reforçado com o aparecimento de evidências que indicam a importância dos radicais livres e outros oxidantes como responsáveis pelo envelhecimento e doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (ATOUI *et al*, 2005; PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006).

A determinação da atividade antioxidante pode ser baseada na captura de diversos radicais (ARUOMA, 2003). A atividade captora de radical livre dos extratos será medida utilizando o radical livre 2,2-Difenil-1-picrilidrazila (DPPH). O método baseia-se na captura do radical por antioxidantes presentes na amostra, que acarreta um decréscimo da absorbância a 517 nm (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

2. OBJETIVOS

A perspectiva de compreensão do mecanismo de resposta de *Citrus sinensis* frente ao ataque de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) apresenta-se como uma proposta de grande interesse no cenário de entendimento da atuação do patógeno nos *Citrus*. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivos:

- Avaliação direta das folhas de laranjeira (*C. sinensis*, var. caipira) sadias e doentes e, da mesma forma, das cascas do fruto sadias e doentes, por RMN HR-MAS de ^1H (RMN de amostras heterogêneas) para verificação de possíveis variações metabólicas entre as amostras;
- Avaliação de extratos brutos das folhas, sadias e doentes, da laranjeira (*C. sinensis*, var. caipira) por RMN de ^1H (RMN em solução) para verificação de possíveis variações metabólicas entre as amostras;
- Avaliação dos sucos de laranjas, sadias e doentes, por RMN de ^1H (RMN em solução) para verificação de possíveis variações metabólicas entre as amostras.
- Aplicação de ferramentas quimiométricas para auxiliar a avaliação e determinação dos metabólitos de *C. sinensis*, (var. caipira) importantes no entendimento de mecanismos de infecção e defesa da planta no ataque do patógeno;
- Aplicação de experimentos de RMN bidimensionais homo e heteronucleares para auxiliar na elucidação dos compostos importantes na compreensão do ataque patogênico;
- Fornecimento de subsídios quanto ao entendimento dos possíveis mecanismos de resposta de *C. sinensis* frente ao ataque da bactéria

Xanthomonas axonopodis pv. *Citri*. Pretende-se ainda, avaliar as atividades antibacteriana e antioxidante de plantas sadias e doentes, visando a correlação dessas bioatividades nas duas situações.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A partir da laranjeira, situada no município de Nova Veneza, a 30 km de Goiânia, foram obtidos as folhas e frutos sadios e contaminados com cancro cítrico. Os esquemas de preparação das amostras para posterior análise por RMN dos frutos (Figura 3.1) e folhas (Figura 3.2).

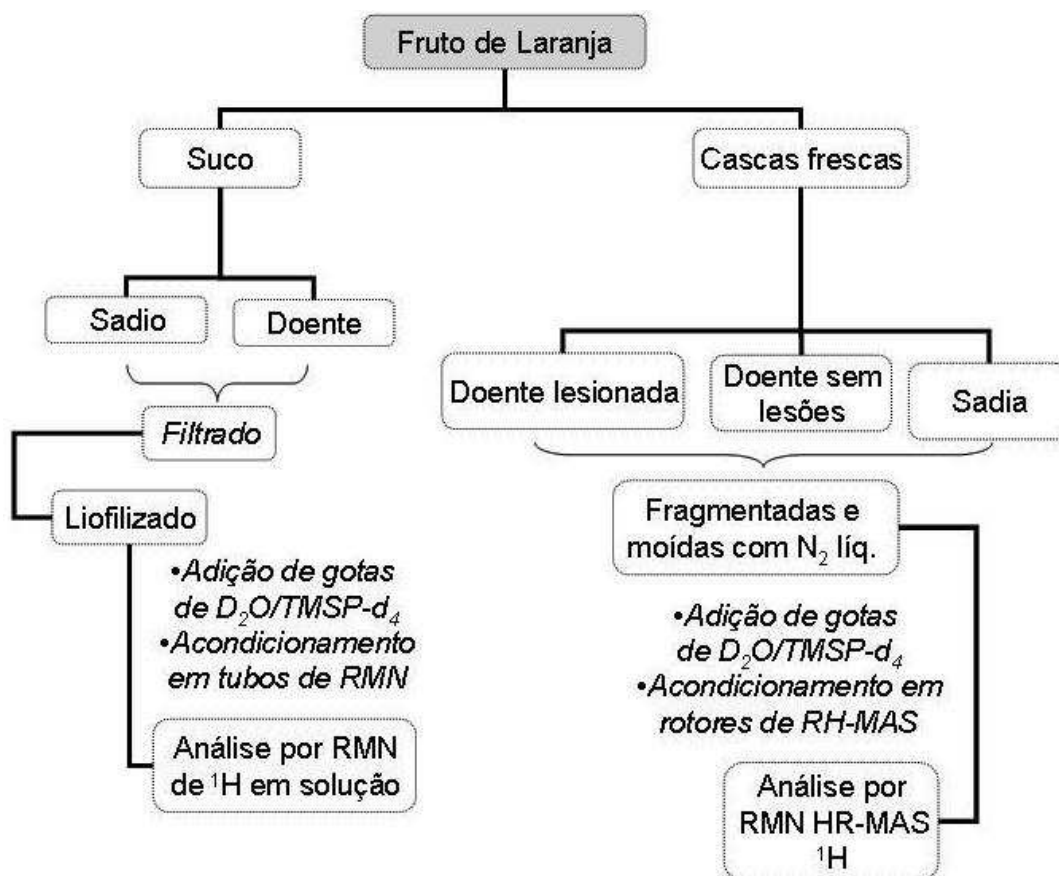


Figura 3.1 – Esquema de preparação dos frutos de laranja para as análises de RMN.

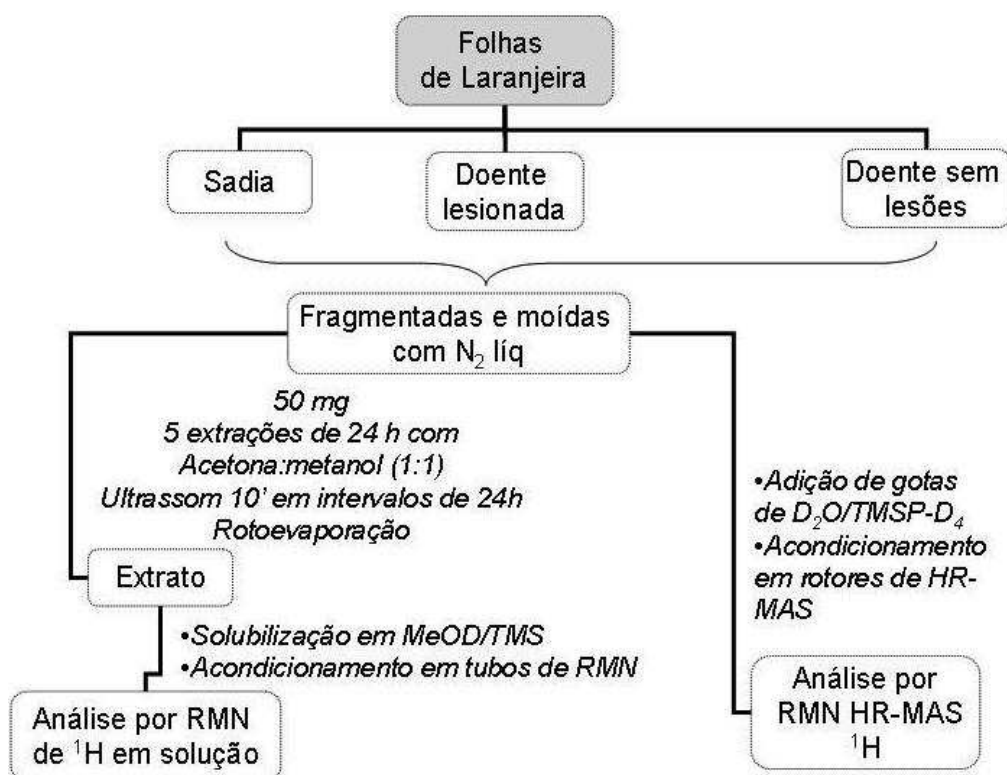


Figura 3.2 – Esquema de preparação das folhas de laranjeira para as análises de RMN.

Inicialmente foram separados os materiais em amostra sadia; doente com a seleção unicamente das lesões (doente lesionada) e doente sem as lesões para as cascas da fruta e as folhas, representados na Figura 3.3. Além disto, foi feito também a separação em sadio e doente, para os sucos de laranja.



Figura 3.3 – Esquema de separação do material vegetal doente.

3.2. AQUISIÇÃO DAS MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS DE RMN

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III 500 (11,75 T), instalado no Laboratório de RMN do Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO, equipado com sonda específica para HR-MAS, provida de bobinas para a detecção de ^1H e $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ e sonda broadband de 5-mm de detecção inversa, ambas com gradiente de campo magnético.

3.2.1. SONDA PARA LÍQUIDOS (RMN EM SOLUÇÃO)

Para as análises de RMN em solução, o solvente inerente da percolação de cada material foi evaporado e o extrato foi então ressolubilizado em aproximadamente 0,6 mL de metanol deuterado (MeOD), acrescido do padrão interno TMS (tetrametilsilano). Os sucos da fruta sadia e doente, após a liofilização, foram ressolubilizados em água deuterada (D_2O), acrescida do padrão interno TMSP- D_4 (2,2,3,3- d_4 -3-trimetilsilil propionato de sódio)

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos foram coletados em três replicatas com três repetições cada, totalizando nove aquisições espectrais para cada amostra, com 128 varredura (NS), 1 s de tempo de espera entre cada aquisição (d1), 4,089 s de tempo de aquisição (AQ) e 64K de pontos na aquisição (TD). O processamento também foi efetuado com 64K pontos (SI), sem o emprego de multiplicação exponencial. Para os espectros dos sucos (sadio e doente), foi coletada uma replicata com quatro repetições, totalizando quatro aquisições espectrais com 64 varreduras (NS) para cada amostra.

Para o auxílio da elucidação dos compostos por RMN em solução foram realizados os experimentos bidimensionais de *g*HSQC, *g*HMBC e

*g*COSY para os extratos e sucos, os experimentos de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ somente para os sucos e o *g*-TOCSY somente para os extratos.

Para o *g*HSQC, foi utilizado o programa de pulsos *hsqcetgp*, com largura espectral de 8012,82 Hz (SWHF2) em F2 e 20831,980 Hz (SWHF1) em F1, tempo de aquisição de 0,2556 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,0 s e números de pontos de aquisição de 4 K pontos em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1). Para o processamento dos dados foram empregados 1 K em F2 (SI2) e F1 (SI1), com utilização da multiplicação de seno quadrado (QSINE) e seno (SSB) igual a 2 em F2 e F1.

Para o *g*HMBC foi utilizado a sequência de pulsos *hmbcgplpndqf*, com largura espectral de 8012,82 Hz (SWHF2) em F2 e 27932,973 Hz (SWHF1) em F1, tempo de aquisição de 0,2556 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,0 s, tempo de espera de observação à longa distância (d6) de 0,065 ms e números de pontos de aquisição de 4 K em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1). Para o processamento dos dados foram empregados 2 K em F2 (SI2) e 1 K em F1 (SI1), com utilização da multiplicação de seno quadrado (QSINE) e seno (SSB) igual a 0 em F2 e F1.

No *g*COSY, foi utilizado o programa de pulsos *cosygpqf*, com largura espectral de 8012,82 Hz (SWHF2) em F2 e em F1, tempo de aquisição de 0,2556 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,0 s, e números de pontos de aquisição de 4 K em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1). Para o processamento dos dados foi empregado 1 K em F2 (SI2) e F1 (SI1), com utilização da multiplicação de seno quadrado (QSINE) seno (SSB) igual a 0 em F2 e F1.

Para o *g*TOCSY, foi utilizada a sequência de pulsos *dipsi2esgpph*, com largura espectral de 8012,82 Hz (SWHF2) em F2 e em F1 (SWHF1), tempo de aquisição de 0,2556 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,0 s, tempo de espera de observação à longa distância (d6) de 0,065 ms e números de pontos de aquisição de 4 K em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1). Para o processamento dos dados foram empregados 4 K em F2 (SI2) e 1 K em F1 (SI1), com utilização da multiplicação de seno quadrado (QSINE) e seno (SSB) igual a 2 em F2 e F1.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram realizados com a sequência de pulsos zgpg30, com um tempo de aquisição de 0,5505 s (AQ), tempo de espera em cada aquisição (d1) de 2 s e números de pontos na aquisição de 32K (TD). O processamento deu-se com 32K pontos (SI), com uma multiplicação exponencial (lb) de 0,3 Hz.

3.2.2. SONDA DE HR-MAS

Parte do material triturado resultante (folhas e cascas) foi, separadamente, suspenso em gotas de água deuterada (D_2O) para ajuste da homogeneidade do campo magnético. O padrão interno TMSP- D_4 (2,2,3,3- D_4 -3-trimetilsilil propionato de sódio), de concentração de 1 mg/mL, foi empregado para a calibração dos espectros e avaliação da qualidade espectral. As amostras foram finalmente acondicionadas em rotores de zircônio específicos para semi-sólidos (Figura 3.4), com 4 mm de diâmetro interno e um intercalador de teflon para conferir um volume esférico ao material.

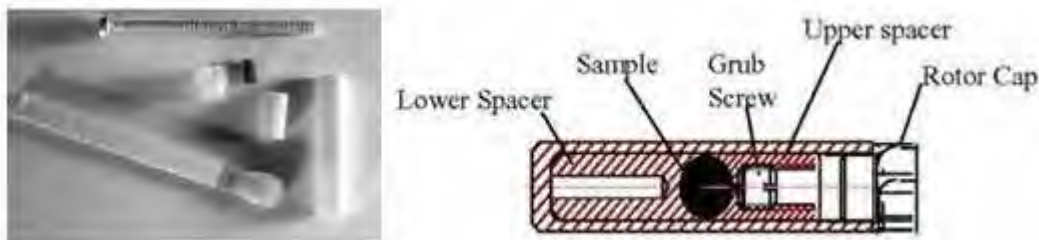


Figura 3.4 – Rotor utilizado no acondicionamento da amostra (Fonte: Bruker Biospin).

Para a otimização dos dados uma amostra proveniente das cascas da fruta doente, sem as lesões, foi utilizada. Os espectros foram adquiridos em duas diferentes sequências de pulsos: a zgcprr (composite pulse presaturation) e CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), sendo a última com um tempo de eco de spin ($2\tau_n$) de 300 μs . Para ambas as sequências, as amostras foram submetidas a um giro de 5 KHz no ângulo mágico (54,74°)

com acúmulo de 128 varreduras (NS), 2 s de tempo de espera entre cada aquisição (d1), 2,044 s de tempo de aquisição (AQ) e 32 K de números de pontos na aquisição (TD). O processamento foi efetuado com 32 K pontos (SI) e um lb – fator utilizado na multiplicação exponencial – igual a 0,3.

Através da verificação da qualidade espectral, optou-se por utilizar a sequência de pulsos zgcppr (composite pulse presaturation) como padrão de análises.

Para o auxílio da elucidação dos compostos por HR-MAS foram realizados experimentos bidimensionais heteronucleares de *g*HSQC, com os mesmos parâmetros citados anteriormente.

3.3. TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO

Inicialmente, os espectros de RMN de ^1H com distorções de fases e linhas de base foram corrigidos com auxílio do programa TopSpin (v 2.1, Bruker Biospin), o qual possibilitou ainda, a transformação automática dos espectros para arquivos ASCII (American Standard Code for Information Interchange), cuja matriz de dados foi gerada e então, calibrada. A matriz resultante foi importada para o programa Pirouette (v 3.11, Infometrix), para o tratamento multivariado dos dados.

Contudo, antes da análise estatística, a fim de eliminar variabilidades indesejadas, algumas regiões, como às intrínsecas da supressão do sinal da água da amostra, regiões que não apresentam sinais (ruídos) e os sinais dos hidrogênios do TMSP-D₄, foram extraídas. Sendo assim, as regiões utilizadas nas análises, bem como o número de amostras e variáveis referentes a cada matriz, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis, amostras e regiões espectrais analisadas na quimiometria.

	Suco	Extrato das folhas	Cascas do fruto	Folhas
Amostras	8	27	24	27
Variáveis	5134	7248	6547	5995
Regiões	0,50 a 4,53	0,38 a 4,50	0,70 a 4,60	0,86 a 4,71
(ppm)	4,95 a 5,32	4,98 a 9,6	5,0 a 5,55	5,20 a 5,60
	6,00 a 7,40		6,0 a 8,5	6,53 a 8,40

A análise quimiométrica foi inicialmente realizada com a aplicação de pré-processamento autoescalamento, que confere mesmo peso das amostras ao modelo. Em seguida foram aplicados os algoritmos de normalização e correção de linha de base, resultando na minimização de efeitos de diferença de concentração amostral e ruídos. Por conseguinte, com base na distribuição das regiões espectrais pré-selecionadas, as análises de PCA, que resultam na retenção da porcentagem de variância acumulada dos dados originais no primeiro plano fatorial, foram empregadas. Por sua vez, para a verificação de similaridade natural entre os indivíduos, a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) foi aplicada.

3.4. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

As amostras utilizadas para as análises antimicrobianas e antioxidantes foram obtidas com a maceração dinâmica do material fragmentado com metanol. A metodologia utilizada foi a de difusão em ágar e os ensaios foram realizados no laboratório microbiológico, disposto no IQ/UFG, em duplicatas e frente a duas cepas de microorganismos:

- *Staphylococcus aureus* (Gram positiva), cepa: ATCC 65389, Fundação Oswaldo Cruz;
- *Escherichia coli* (Gram negativa), cepa: ATCC 10536, Fundação Oswaldo Cruz.

Abaixo estão descritas as etapas de realização da avaliação antimicrobiana, cuja Figura 3.5 há a representação das mesmas.

- Esterilização em autoclave (pressão de 1 Kgf.cm⁻², temperatura de 121 °C, tempo vinte minutos) de todo material utilizado;
- Preparação dos microorganismos com inoculação da bactéria liofilizada no meio “mole” de concentração de 21 g/L (Mueler Hinton Broth – Becton Dickinson) durante 24 h;
- Preparação do meio de cultura “duro” de concentração 35g/L (Mueller Hinton Agar – Sanofi);
- Preparação dos discos (de 6 mm de diâmetro) com aplicação de 5 mg do extrato metanólico, 10 µL do controle de cloranfenicol (5 mg/mL) e posterior esterilização em lâmpada de ultra-violeta;
- Padronização da solução de microorganismos inoculados no meio “mole”, em UV/Vis (Ultravioleta/Visível), no comprimento de onda de 530 nm e absorção de 0,05 originando a concentração de bactéria de 10⁶ UFC/mL;
- Mistura dos meios de cultura na proporção de 20:2 mL (“duro”：“mole”) e levados às placas de Petri;
- Aplicação dos discos com as amostras e com o controle de cloranfenicol no meio já endurecido;
- Inoculação por 16 a 18 h e leitura do halo de inibição utilizando a inibição ótima inerente ao antibiótico cloranfenicol como referência.

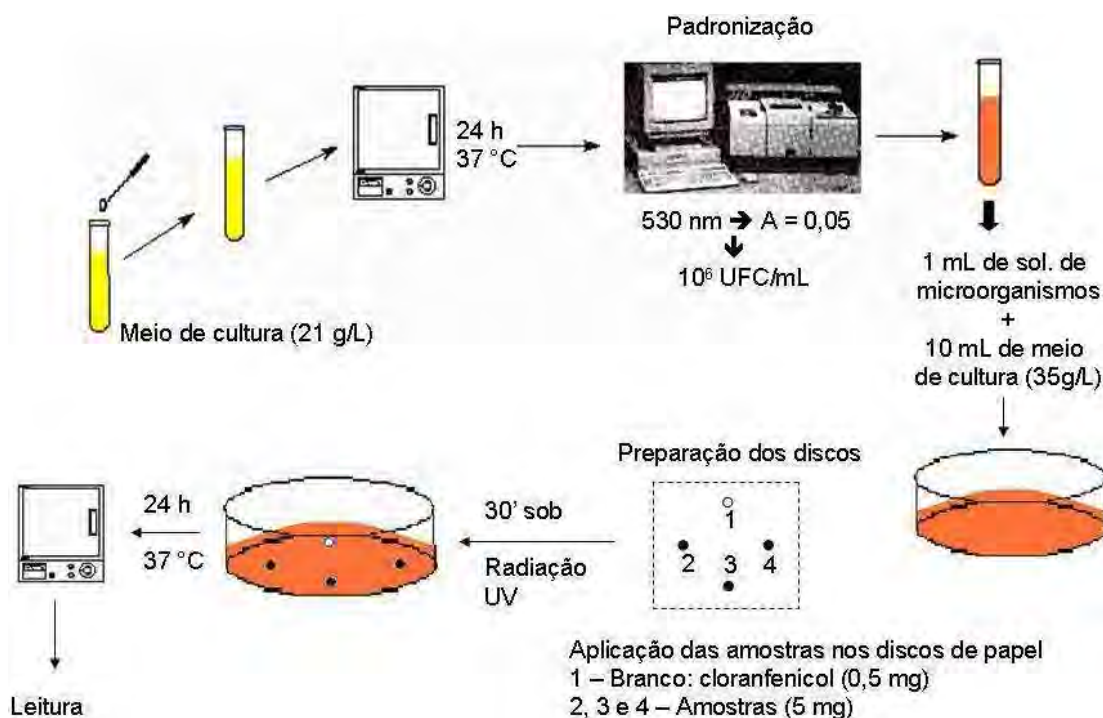


Figura 3.5 – Esquema representativo para a metodologia de difusão em ágar.

3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os extratos metanólicos das amostras (laranja doente com as lesões; laranja doente sem lesões e laranja sadia) foram ensaiados frente ao radical livre DPPH nas faixas de concentrações de 400 a 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para as duas primeiras amostras e 800 a 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a amostra subsequente.

Na forma de radical, DPPH absorve em 517 nm, mas após redução por um antioxidante ou uma espécie radicalar sua absorção decresce. A solução de tal reagente foi preparada na concentração de 0,004% (4 mg/100 mL).

O sistema reacional foi preparado pela mistura de 1 mL de solução da amostra e 2 mL da solução de DPPH. Após incubação por 30 minutos, a temperatura ambiente, as leituras foram efetuadas em Espectrofotômetro SP 220 Spectrum a 517 nm. A dissolução das amostras e do reagente foi realizada em metanol. O controle foi preparado substituindo a amostra por uma solução contendo 1 mL de metanol e 2 mL da solução de DPPH. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O efeito “sequestro” de radical (%) foi calculado usando a Equação 2, onde A_0 é a absorbância do DPPH (controle) e A é a absorbância da amostra com DPPH:

$$\text{Efeito seqüestro de radical (\%)} = (A_0 - A)/(A_0) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Os resultados obtidos foram comparados com o padrão quercetina e entre si. Por conseguinte os dados são plotados em gráficos de % de inibição *versus* concentração de solução e a partir da regressão linear foi possível efetuar o cálculo da IC_{50} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. A ESCOLHA DA SEQUÊNCIA DE PULSOS

Visando a otimização dos experimentos, com a aplicação de sequências de pulsos satisfatórias para supressão do sinal da água e obtenção dos sinais amostrais, os programas de pulso CPMG e zgcppr foram testados. Como verificado na Figura 4.1, a CPMG apresentou uma redução da relação sinal/ruído em função da diminuição da intensidade dos sinais correspondentes aos analitos. Tal fato ocorre a partir da utilização do "eco de spin" na sequência de pulsos que resulta na redução parcial da magnetização oriundos das moléculas de massa molecular pequena e, portanto tempo de relaxação transversal (T_2) longo. Contudo, o uso da CPMG culmina ainda na perda de sinais de baixa intensidade que se perdem no ruído, já que a relação sinal/ruído diminui. Sendo assim, o programa de pulsos escolhido como padrão para análises foi a zgcppr, já que os sinais perdidos podem representar uma informação importante na distinção entre as diferentes matrizes.

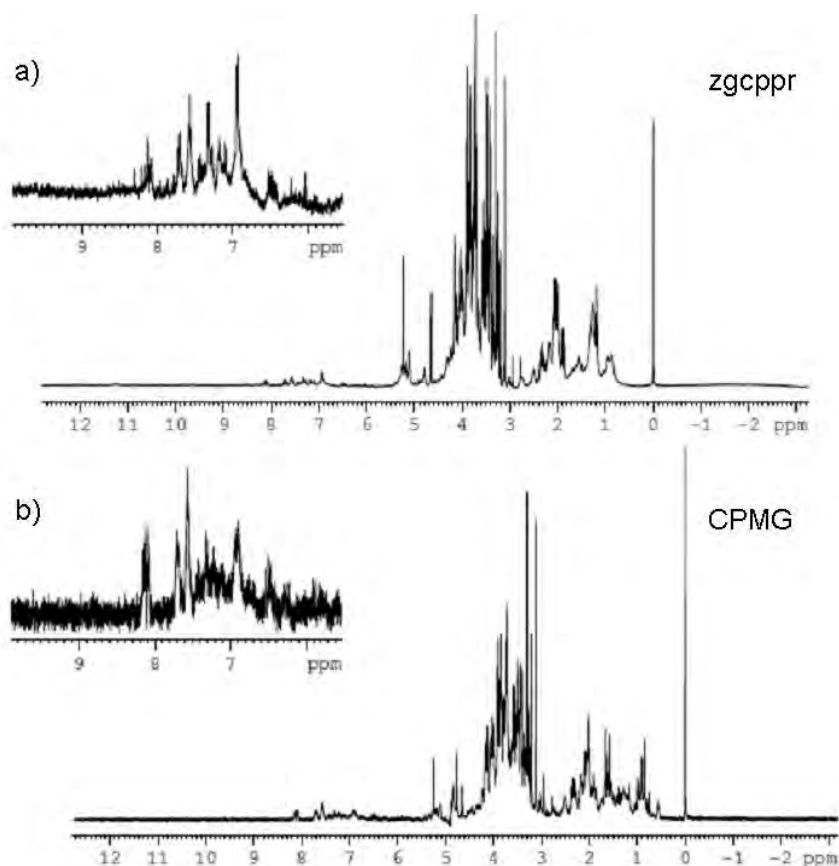


Figura 4.1 – Comparação entre espectros: a) obtido com a sequência zgcprr e b) obtido com a sequência CPMG.

4.2. VISÃO GERAL E PROCESSAMENTO DOS DADOS

A Figura 4.2 mostra os espectros de RMN de ^1H dos conjuntos de dados obtidos para as diferentes matrizes e todos com supressão do sinal da água. Nos espectros podem ser observadas três diferentes regiões: a de hidrogênios aromáticos (6,0 a 9,0 ppm), a região de hidrogênios carbinólicos (3,0 a 6,0 ppm) e a região de hidrogênios carbinólicos, alílicos, de resíduos alquílicos, dentre outros (1,0 a 3,0 ppm) (LE GALL *et al*, 2008).

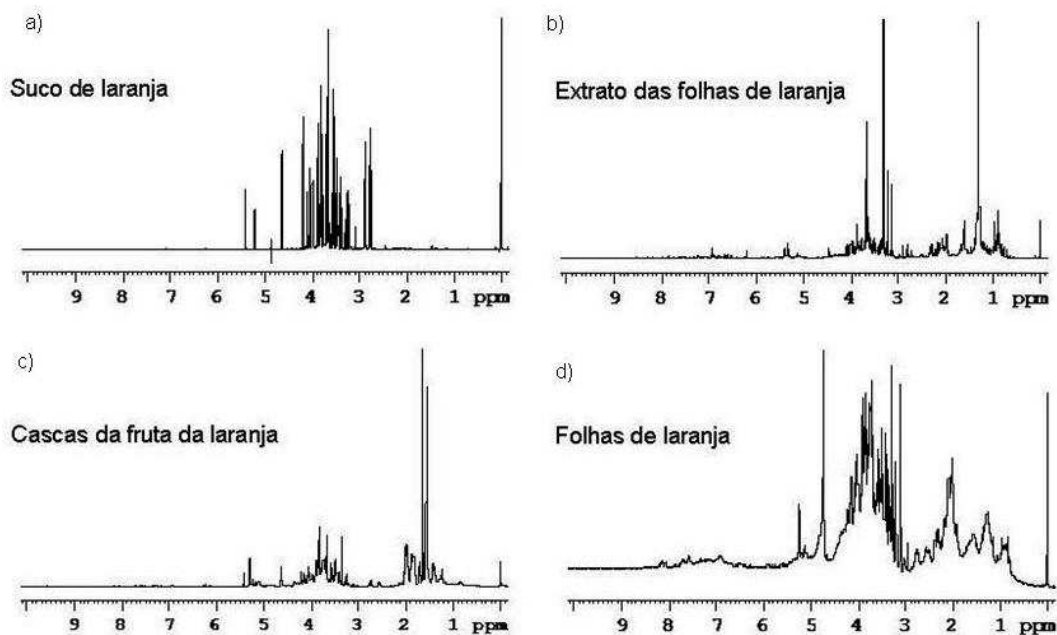


Figura 4.2 – Espectros de RMN de ^1H dos sucos de laranja (a) e extratos das folhas (b), e de RMN HR-MAS de ^1H das cascas da fruta (c) e folhas (d).

Através da análise visual dos espectros, provenientes das amostras de suco de laranja sadia e doente (Figura 4.3), percebe-se uma grande similaridade entre os conjuntos de sinais, inviabilizando a distinção entre os mesmos. Sendo assim, o auxílio da quimiometria tornou-se indispensável a fim de captar tendência geral dos dados.

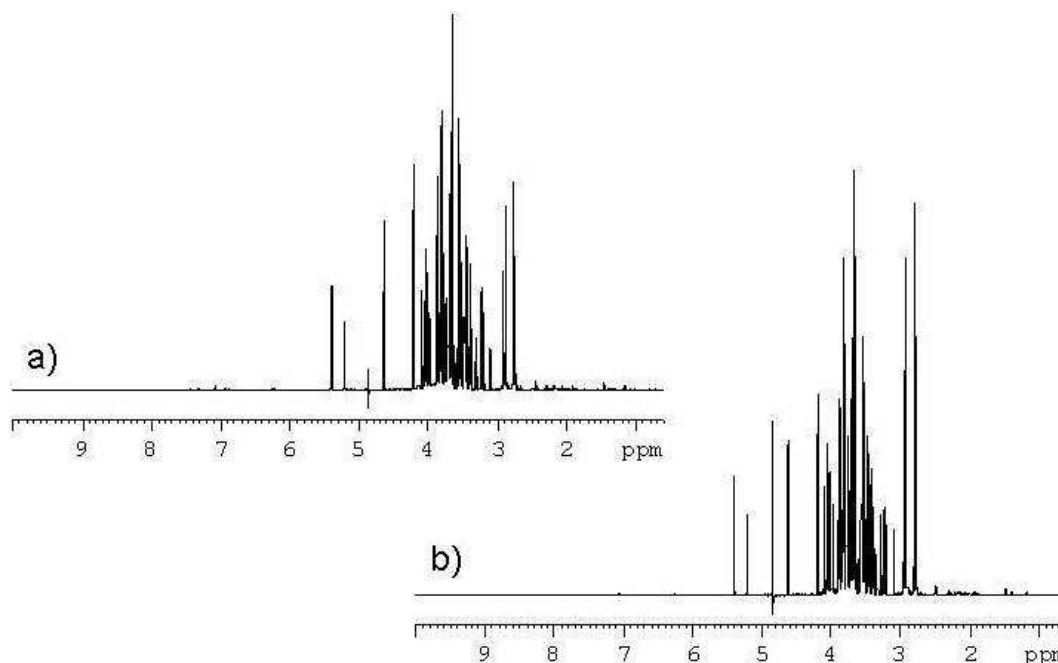


Figura 4.3 – Espectros de RMN de ^1H dos sucos de laranja: a) Sadia e b) Doente.

Desta forma, os espectros, transformados em matrizes, foram submetidos a transformações algorítmicas de pré-tratamentos sobre as colunas e linhas através do autoescalonamento (conduzindo as variáveis a uma mesma influência no modelo) e a utilização da normalização concomitante com a correção de linha de base (minimizando variações sistemáticas associadas às variações de concentração das amostras e redução da influência de ruídos). Os processamentos utilizados resultaram numa melhor distinção e agrupamento amostral em todos os conjuntos de dados, visualizados através do sistema diaxial originado pela PCA na forma pontos em que, cada um, representa uma amostra (score) e absorção (variável) na RMN.

4.3. ANÁLISE DE RMN EM SOLUÇÃO

4.3.1. AVALIAÇÃO DO SUCO DA FRUTA

Inicialmente, visando examinar a estrutura geral dos dados, foram aplicados métodos aglomerativos não-supervisionados, que representados em um espaço bidimensional (dendrogramas), enfatizam os agrupamentos e padrões naturais (FERREIRA *et al.* 2002). Na Figura 4.4, verifica-se o dendrograma resultante que foi organizado com as amostras no eixo y e o índice de similaridade no eixo x, de modo que as amostras são dispostas em função da sua proximidade. Contudo, os agrupamentos iniciam-se introduzindo as amostras mais próximas (similares), terminando com as amostras mais distantes (diferentes). Não obstante, podem ser observadas duas aglomerações amostrais: uma contendo amostras de suco oriundo da laranja doente e outra contendo amostras de suco de laranja sadias com índice de similaridade próximo de zero, que reflete diferenças naturais entre os grupos amostrais, já que valores próximos de zero, representam tal situação (CORREIA & FERREIRA, 2007).

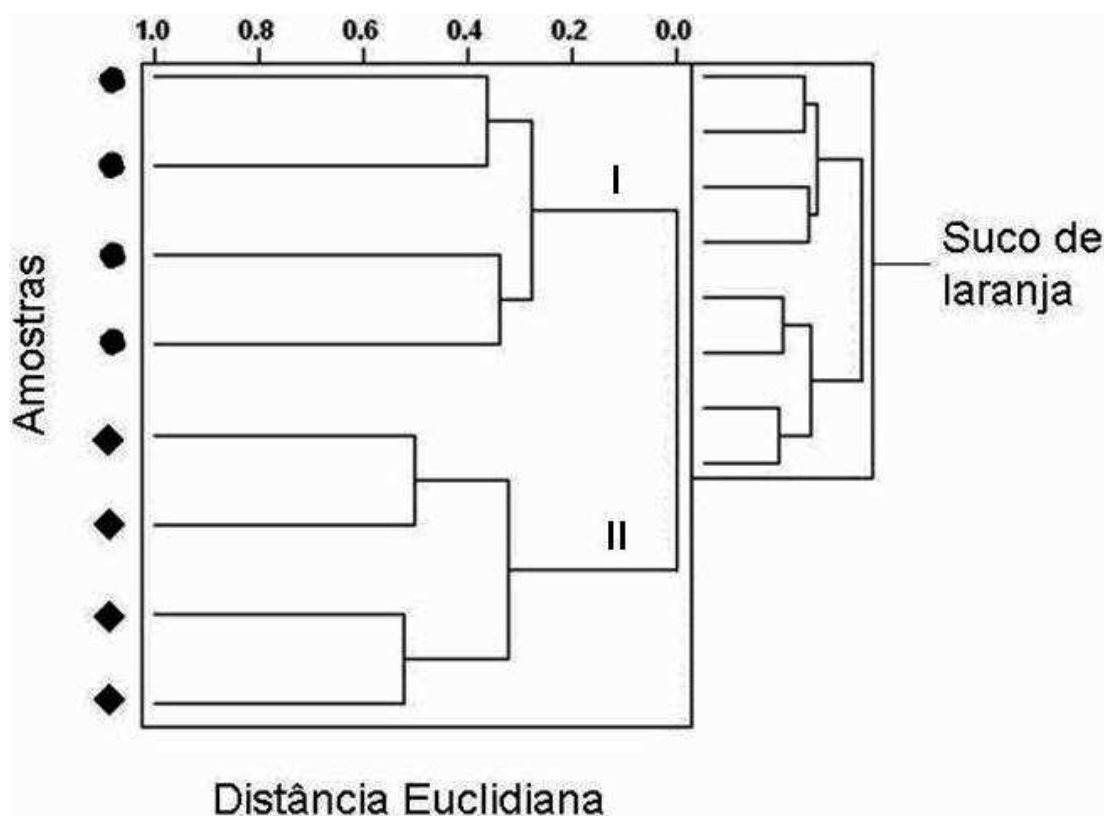


Figura 4.4: HCA aplicado para os sucos de laranjas sadia e doente, com diferenciação dos agrupamentos amostrais. Legenda: sadia (●); doente (◆).

Para avaliar a contribuição das absorções em RMN na separação das amostras e facilitar na interpretação dos dados multivariados, uma análise por componentes principais foi realizada. Os escores da PCA, que representam o agrupamento das replicatas em relação ao novo espaço vetorial, separaram as amostras de sucos de laranja em dois grupos: sadia e doente (Figura 4.5), com 64,1% de retenção de informação nos dois primeiros eixos fatoriais, corroborando assim, os resultados obtidos com a HCA.

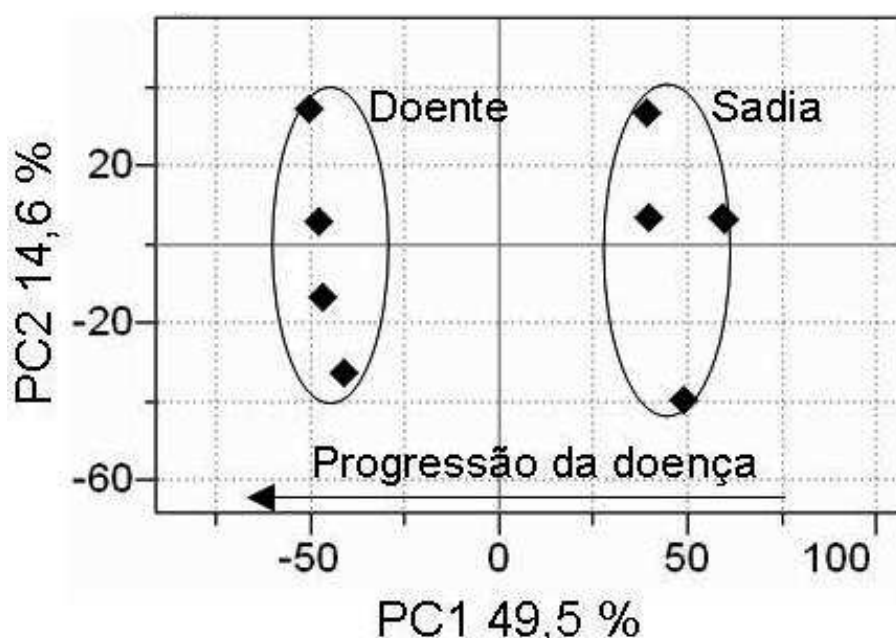


Figura 4.5: Gráfico dos escores da PCA sobre os dados de RMN dos sucos de laranja.

O espectro de RMN de ^1H do suco (Figura 4.2a) indica sinais na região de δ 0,5 a 8,0, atribuídos aos constituintes associados aos sucos de laranja, como carboidratos, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, terpenóides, pigmentos, antocianinas e flavonóides (LADANIYA, 2008). Entretanto, com base na análise do gráfico das variáveis, a região entre de 1,1 a 1,5 ppm e 4,3 a 4,5 ppm (Figura 4.6 a e b) contribuíram majoritariamente para a composição de PC1 com 49,5 % da variância total, permitindo diferenciar os sucos provenientes das laranjas sadia e doente.

Tais regiões podem ser atribuídas aos resíduos alquílicos de aminoácidos livres, ácidos orgânicos, álcoois e compostos terpênicos (BERREGI *et al.*, 2007), que são considerados importantes no desenvolvimento e defesa da planta. Contudo, através das análises dos experimentos uni e bidimensionais (item 5), foram feitas atribuições dos sinais responsáveis pela variabilidade de PC1. Deste modo, com base nos sinais de referência atribuídos à alanina (item 5.1.1.) e à treonina (item 5.1.2.) que não tem variação de intensidade, verifica-se uma ampliação da intensidade dos sinais referente ao etanol (item 5.1.6.) em δ 1,16 (t, $J = 7,10$ Hz) e ao ácido láctico (item 5.1.3.) δ 1,36 (d, $J = 6,95$ Hz) (Figura 4.6a e 3.12b).

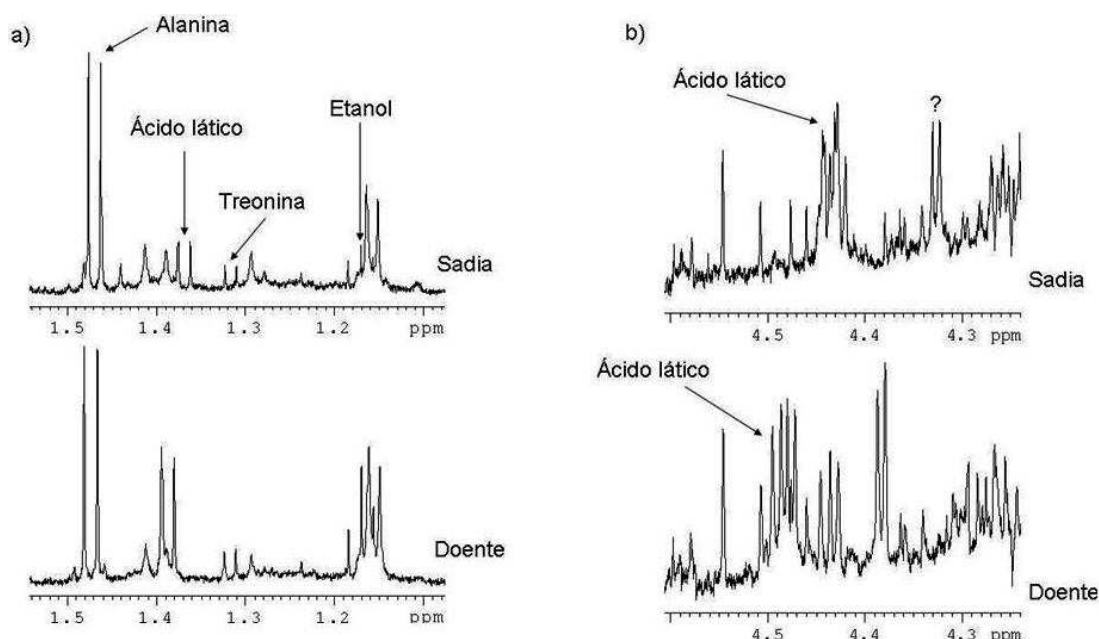


Figura 4.6 – Regiões destacadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*) com importância na variabilidade de PC1 com a) 1,10 a 1,50 ppm e b) 4,30 a 5,00 ppm.

Na literatura, existem relatos da presença de ácido láctico em frutas cítricas (GROHMANN *et al.*, 1999; LANDANYIA, 2008), no entanto verifica-se uma ampliação em sua produção quando a laranja é acometida pelo cancro cítrico. Sabe-se que o ácido láctico é um produto de fermentação bacteriana e deste modo, a Xac pode estar aumentando taxas fermentativas do suco ou

induzindo uma intensificação da ação de bactérias responsáveis pela fermentação e deterioração de alimentos (STERR *et al.*, 2009; UBOLDI EROA, 1989 *apud* CAMPOS & CRISTIANINI, 2007), justificando o apodrecimento e queda prematura do fruto acometido pela Xac (FUNDECITRUS, 2008).

Existe ainda um conjunto de sinais (t, 2,42 ppm; d, 2,8 ppm e d, 4,33 ppm) também citados por Le GALL *et al* (2001), para uma substância desconhecida, bem como dois dupletos inerentes ao ácido cítrico (Figura 4.7) que deslocaram em relação à infestação da doença e também contribuíram para a composição de PC1.

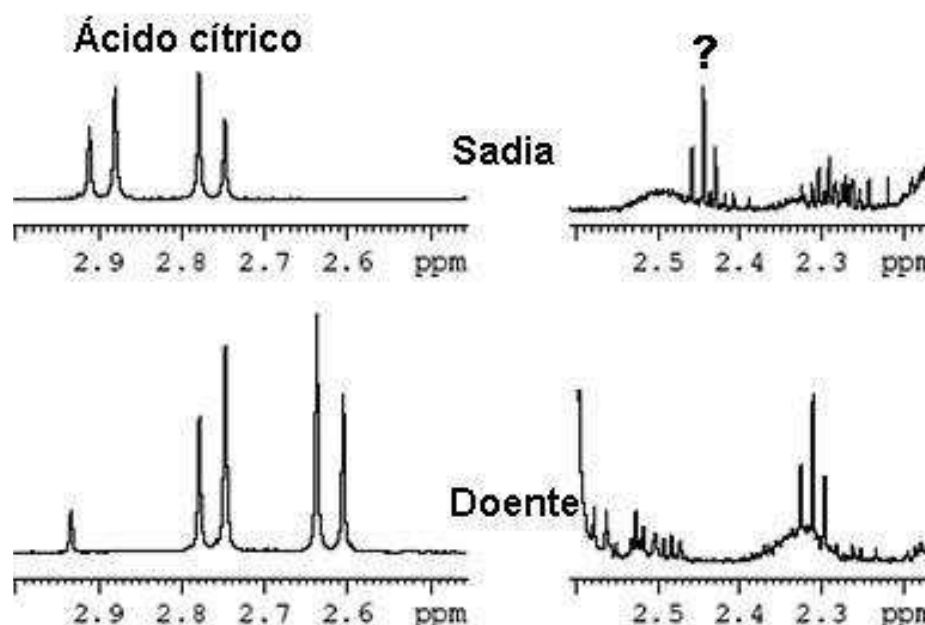


Figura 4.7 – Conjuntos de sinais que deslocaram em relação à infestação da doença e também contribuíram para a composição de PC1.

Tal fato pode ser atribuído às diferenças de acidez resultantes do aumento da concentração principalmente do ácido cítrico e/ou de outros ácidos cujos sinais podem estar sobrepostos pelos sinais da região dos açúcares ou ainda a redução da acidez com estágios avançados de maturidade do fruto. No entanto, os frutos utilizados (sadio e doente) para a composição dos resultados apresentavam-se com maturidade visualmente similar e intermediária (Figura 4.8), assegurando mais uma vez que os

deslocamentos dos sinais devem ser em função do aumento da concentração dos ácidos no suco da fruta, após a infestação da doença.

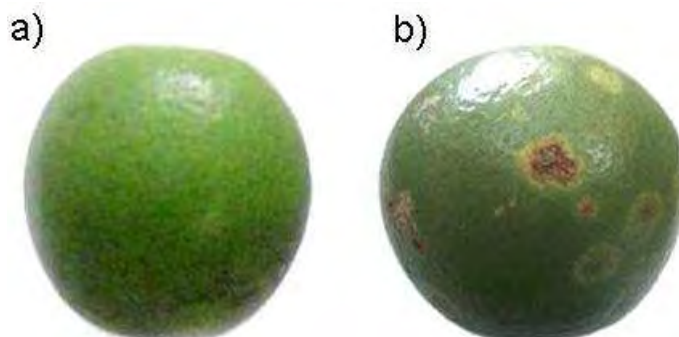


Figura 4.8 – Laranjas com maturidade intermediárias, utilizadas para as análises de RMN de ^1H em solução do suco de laranja. a) Sadia; b) Doente.

A PC2 foi considerada irrelevante para a interpretação dos dados do suco, já que sua variância é relativa às alterações do equipamento, como o *shimming*.

4.3.2. AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE LARANJEIRA

Os espectros de RMN de ^1H , obtidos a partir dos extratos das folhas de laranjeira, forneceram uma matriz composta basicamente por metabólitos secundários, cuja análise quimiométrica e de elucidação, foram conduzidas para a obtenção de informações sobre as variações metabólicas ocasionadas pela ação da Xac. Sendo assim, a formação dos agrupamentos naturais das variáveis, podem ser visualizados no dendrograma obtido com a aplicação da HCA (Figura 4.9). Contudo, há inicialmente a formação de dois grupos principais, em que, o primeiro (I), é formado por extratos das folhas de laranjeira sadia (●) e doente sem as lesões (◆) e o segundo (II), pelos extratos das lesões cancrosas selecionadas das folhas (◇). Em seguida, com um índice de similaridade de aproximadamente 0,3, o primeiro grupo (I) é subdividido em um grupo de indivíduos sadio (Ia) e outro de

indivíduos doente sem as lesões (Ib), de acordo portanto, com níveis de incidência da doença.

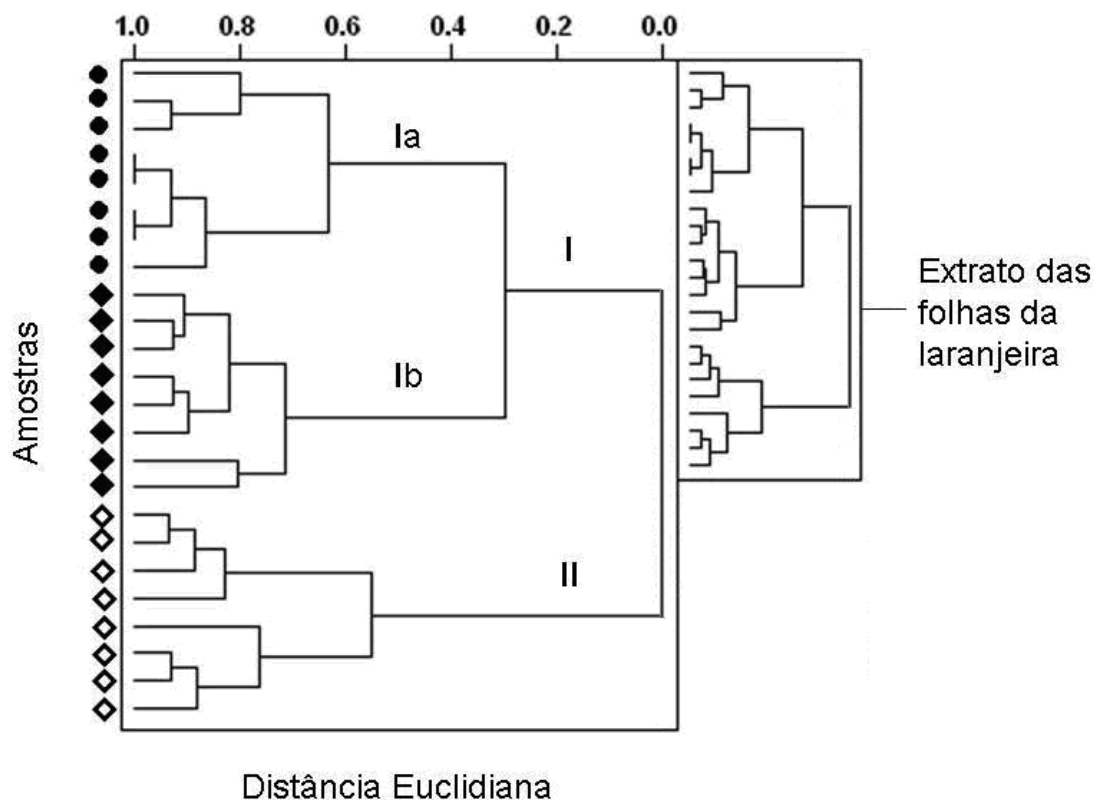


Figura 4.9: HCA aplicado nos extratos resultando nos agrupamentos naturais das amostras: sadia (●); doente sem as lesões (◆); doente lesionada (◇).

A fim de diminuir a dimensionalidade dos dados originais e auxiliar na modelagem e interpretação dos dados multivariados, a PCA foi aplicada. A formação inicial de dois grupos na HCA, foi de grande importância para a interpretação da disposição das amostras no gráfico de escores obtido com a PCA. Sendo assim, o agrupamento das replicatas em relação ao novo espaço vetorial é apresentado na Figura 4.10 e exibe uma nítida separação das amostras para as duas primeiras componentes principais, com retenção de 89,6 % da variância total dos dados.

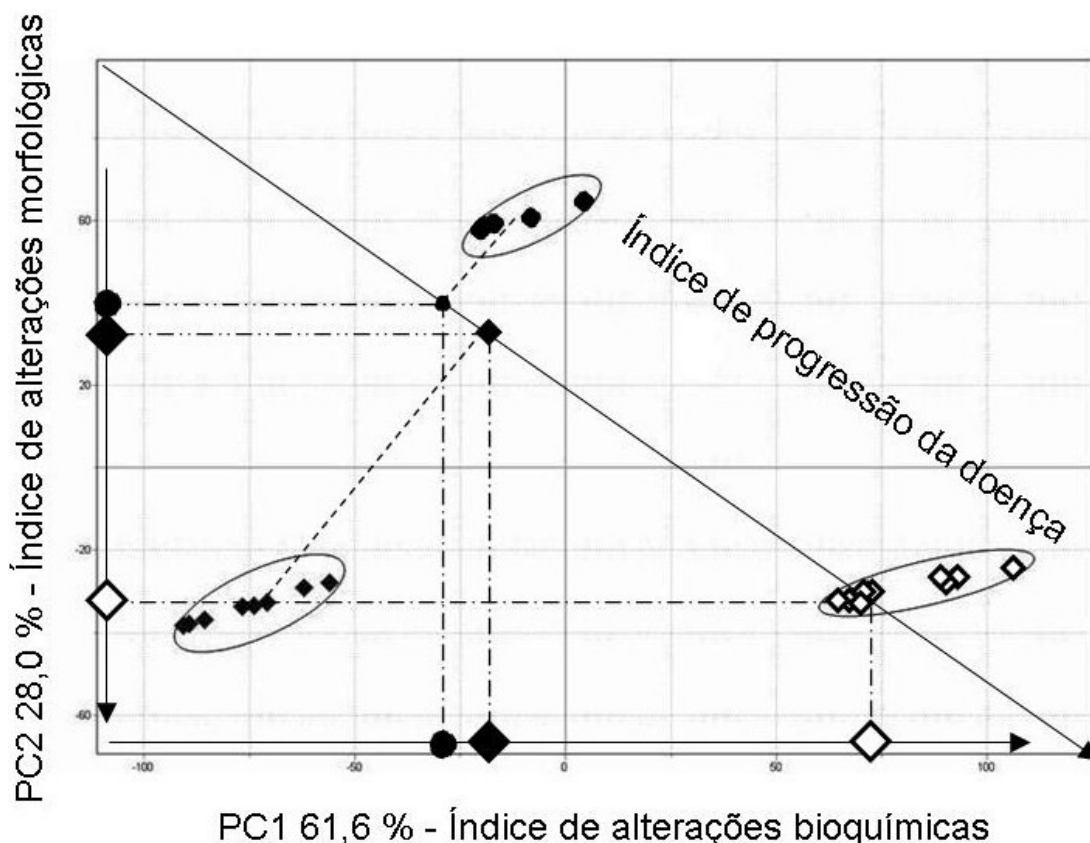


Figura 4.10: Gráfico de escores da PCA dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de laranjeira sadia (●); doente sem as lesões (◆); doente lesionada (◇).

Os agrupamentos obtidos pelo dendrograma da HCA são visualizados na PCA quando uma bisetritz sob os eixos fatoriais é traçada. As projeções perpendiculares das amostras sob a bisetritz resultam na progressão da doença com amostra sadia no primeiro quadrante e doente lesionada no terceiro quadrante. Não obstante, observa-se ainda a amostra de laranjeira sadia (●) e doente sem as lesões (◆) mais semelhantes quando comparadas com a doente lesionada (◇).

Todavia, a projeção das amostras sob a PC1 foi impetrada para o entendimento do eixo, que reteve 61,6% da variabilidade dos dados. Sendo assim, verifica-se a sequência de incidência da doença seguindo o sentido de escores positivos de PC1 de forma que pode ser interpretada como o índice de alterações bioquímicas das amostras em função do patógeno. De

acordo com a literatura (FUJIKAWA *et al.*, 2006; CERNADAS *et al.*, 2008) a bactéria induz a transcrição de genes relacionados à resistência, defesa e resposta ao estresse patológico representados pela produção de alcalóides, terpenos e compostos voláteis. No entanto, durante o desenvolvimento da lesão, há a supressão das respostas defensivas e a indução da mobilização de nutrientes na direção dos sítios de infecção. Porquanto, tais alterações podem ser mais bem entendidas em PC1.

Buscando entender o mecanismo de infecção, bem como os compostos responsáveis pelas alterações bioquímicas em PC1, o gráfico de variáveis (*loadings*) foi verificado. A região de 1,76 a 2,4 ppm e 6,48 a 6,69 ppm, foram responsáveis por alocar o conjunto de tecido doente lesionado em escores positivos de PC1. De acordo com a literatura a *Xac* induz a alteração de diversos genes relacionados com o metabolismo de carbono e hidrogênio (CERNADA *et al.* 2008). Pode-se inferir, portanto, que estes compostos são majoritariamente produzidos no sítio da infecção em que a primeira região é intrínseca de aminoácidos e ácidos orgânicos e a segunda de compostos flavonoídicos. Na Figura 4.11 há a representação da região entre 1,76 a 2,4 ppm e na Figura 4.12 há a região entre 6,48 a 6,69 ppm, revelando as disparidades entre eles.

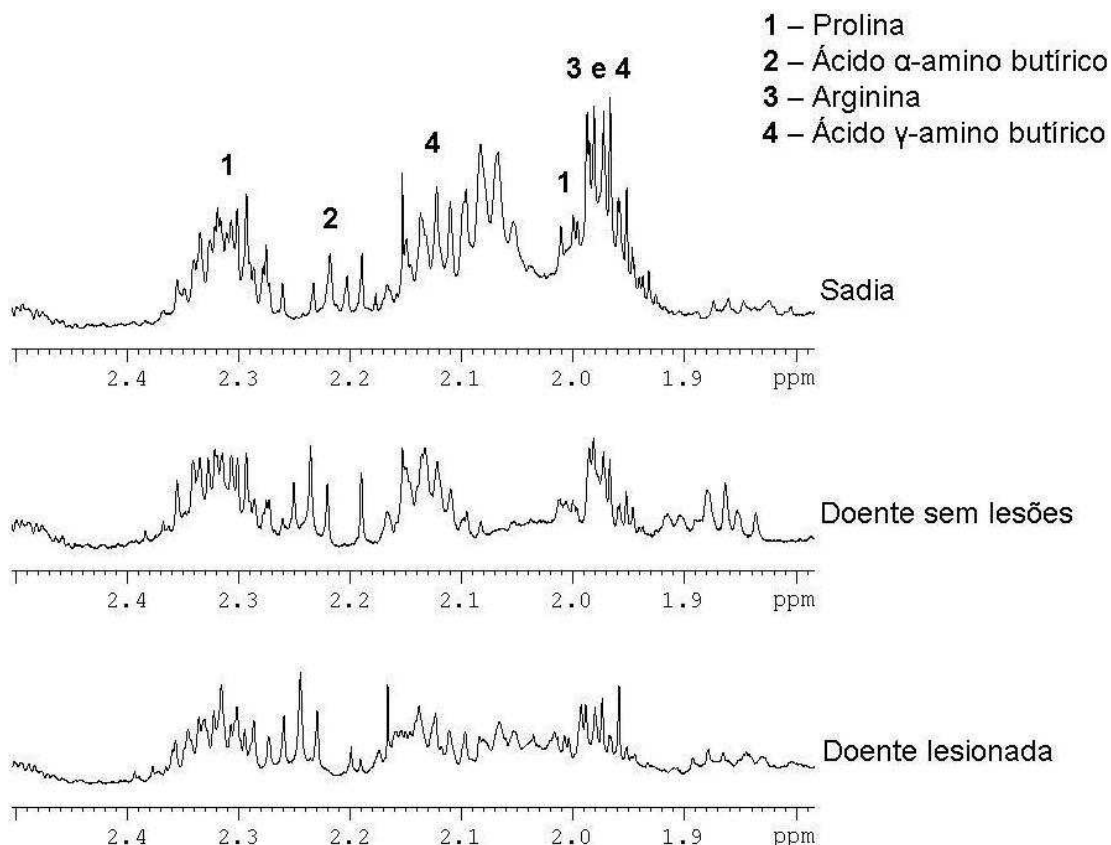


Figura 4.11 – Regiões de 1,76 a 2,4 ppm, destacadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*) como responsáveis por alocar os extratos de folhas doente lesionada em escores positivos de PC1.

Na Figura 4.11, percebe-se uma variação no teor dos aminoácidos e ácidos orgânicos presentes nos extratos das folhas de laranjeira em que há uma redução inicial na produção de prolina (doente sem as lesões), seguida de um aumento nas lesões. De acordo com a literatura, a prolina e a arginina são aminoácidos importantes na resposta das plantas ao estresse, já que serve como precursor de metabólitos secundários e hormônios (GALILI *et al.*, 2008). Sendo assim, como resposta ao estresse, há a formação de metabólitos de defesa à custa da manutenção e/ou produção de prolina e possivelmente da arginina, apesar de não ser visível sua redução, sobreposta pelos demais sinais. Contudo sabe-se que a *Xac* induz o acréscimo da mobilização de nitrogênio na lesão (CERNADA, *et al.*, 2008) e que tal mobilização pode ser associada com o fornecimento de energia requerida para reações de defesa ou como sinalizadores de metabolismo

defensivo (SWARBRICK *et al*, 2006), justificando o acréscimo na lesão, não só de prolina, mas de outros compostos nitrogenados como o aminoácido ácido alfa aminobutírico (AABA) e o ácido gama aminobutírico (GABA) que apesar de não ser um aminoácido essencial, é encontrado na laranja.

O catabolismo de aminoácidos pode gerar compostos relacionados com o sabor (ARDO, 2006) e aroma (NIMITKEATKAI & UEDA, 2005) de diversas matrizes em que os isômeros dos ácidos aminobutíricos, particularmente, podem ser produzidos. Estudos demonstram a resistência induzida de plantas a determinados patógenos, quando nos indivíduos são tratados com certos aminoácidos (KUC, 2001; VAN ANDEL, 1958). As atividades dos ácidos aminobutíricos e seus isômeros foram testadas e demonstraram aumento da resistência das plantas em diversos sistemas planta/patógenos. Um exemplo pode ser verificado no aumento da resistência do tomateiro após a inoculação de tais isômeros (Figura 4.12), em que o composto mais ativo foi o AABA (COHEN, 2002).



Figura 4.12 – Resistência do tomateiro ao patógeno *Phytophthora infestans*, com a aplicação de aminoácidos nas folhas. Sequência: água, AABA, BABA e GABA (α , β e γ ácidos aminobutíricos). Fonte: COHEN, 2002.

Como notado na Figura 4.11, nos indivíduos doentes sem as lesões e doente lesionado dos extratos, há o aumento contínuo da produção do AABA. Sendo assim, este composto por estar relacionado com a defesa da planta em que há a sua produção como resposta defensiva ao estresse bacteriano.

A região característica de flavonóides, com deslocamentos de 6,48 a 6,69 ppm, também foi importante na composição da PCA (Figura 4.13). Diversos flavonóides são encontrados nos *Citrus* (TRIPOLI *et al*, 2007), no entanto os que contribuíram e foram passíveis de identificação foram polimetoxi-flavonóides como a tangeretina, nobeletina e a 6-dimetoxi tangeretina. Como vislumbrado na Figura 4.13, o teor desses compostos é reduzido drasticamente no decorrer da manifestação da doença o que gera uma situação de redução do potencial terapêutico das folhas já que, de acordo com a literatura, a tangeretina além de induzir a apoptose de células leucêmicas humanas, ainda não demonstra citotoxicidade para tecido sanguíneo (HIRANO *et al*, 1995). Além disso, testes da nobeletina em ratos indicam que tal substância tem ação na melhora da memória e em problemas de aprendizado (ONOZUKA, 2008).

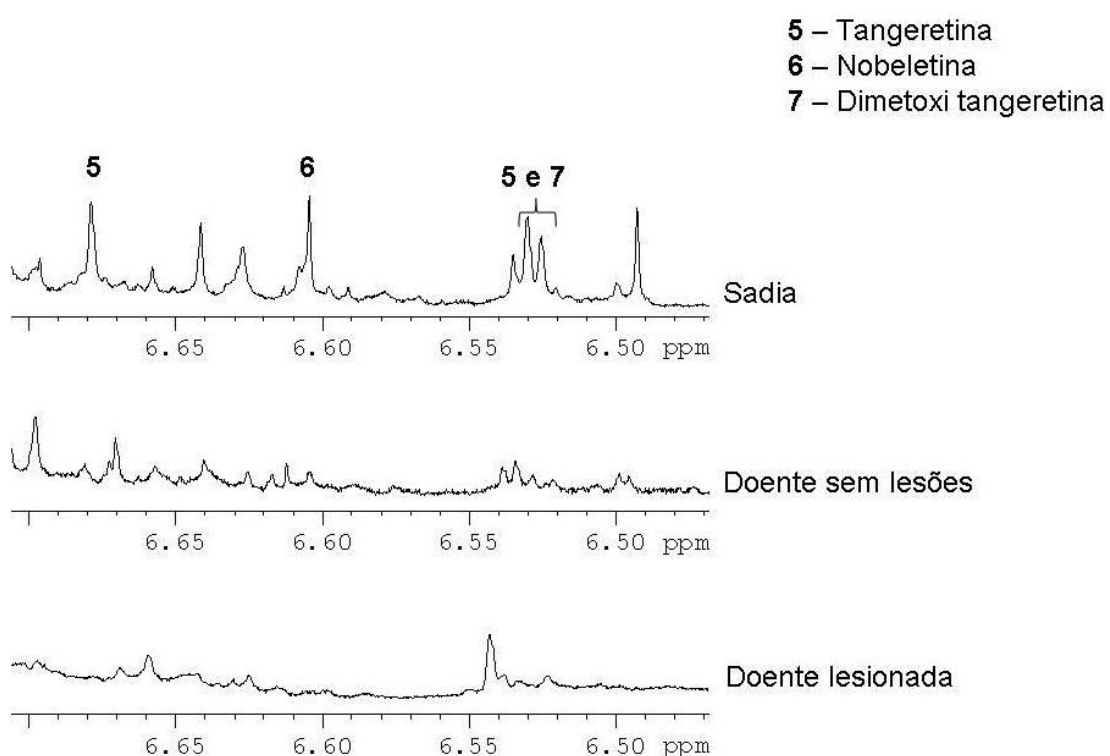


Figura 4.13 – Regiões de 6,48 a 6,69 ppm, destacadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*) como responsáveis por alocar os extratos de folhas doente lesionada em escores positivos de PC1.

As regiões de 0,7 a 1,08 ppm e 7,67 a 8,75 ppm (Figura 4.14 a e b) foram responsáveis pelo posicionamento dos extratos das folhas de laranjeira sadia e doente sem as lesões, em escores negativos de PC1, demonstrando que os componentes inerentes a tais regiões são produzidos/consumidos durante as alterações bioquímicas provocadas pelo estresse bacteriano. Sendo assim, a região destacada pela Figura 4.14a, representa a variação entre sinais de hidrogênios de segmentos alifáticos que por estar em baixa intensidade, sua identificação ficou comprometida, mas ainda assim, podem ser relacionados às cadeias de aminoácidos alifáticos. Na Figura 4.14b, verifica-se uma mudança do perfil metabólico na região, em que há a supressão de dois dupletos em 7,84 ppm alusivos aos compostos tangeretina e dimetoxi tangeretina na ocasião da manifestação da doença, corroborando os dados obtidos em escores positivos de PC1. Nota-se também, a mudança de aspecto dos sinais em 8 ppm, além do advento de dois dupletos, 8,45 ppm e em 8,30 ppm quando há o aparecimento das lesões no indivíduo doente e que por estarem em intensidade muito baixa, tiveram a identificação comprometida, já que não apareceram nos experimentos de correlação uni e bidimensionais.

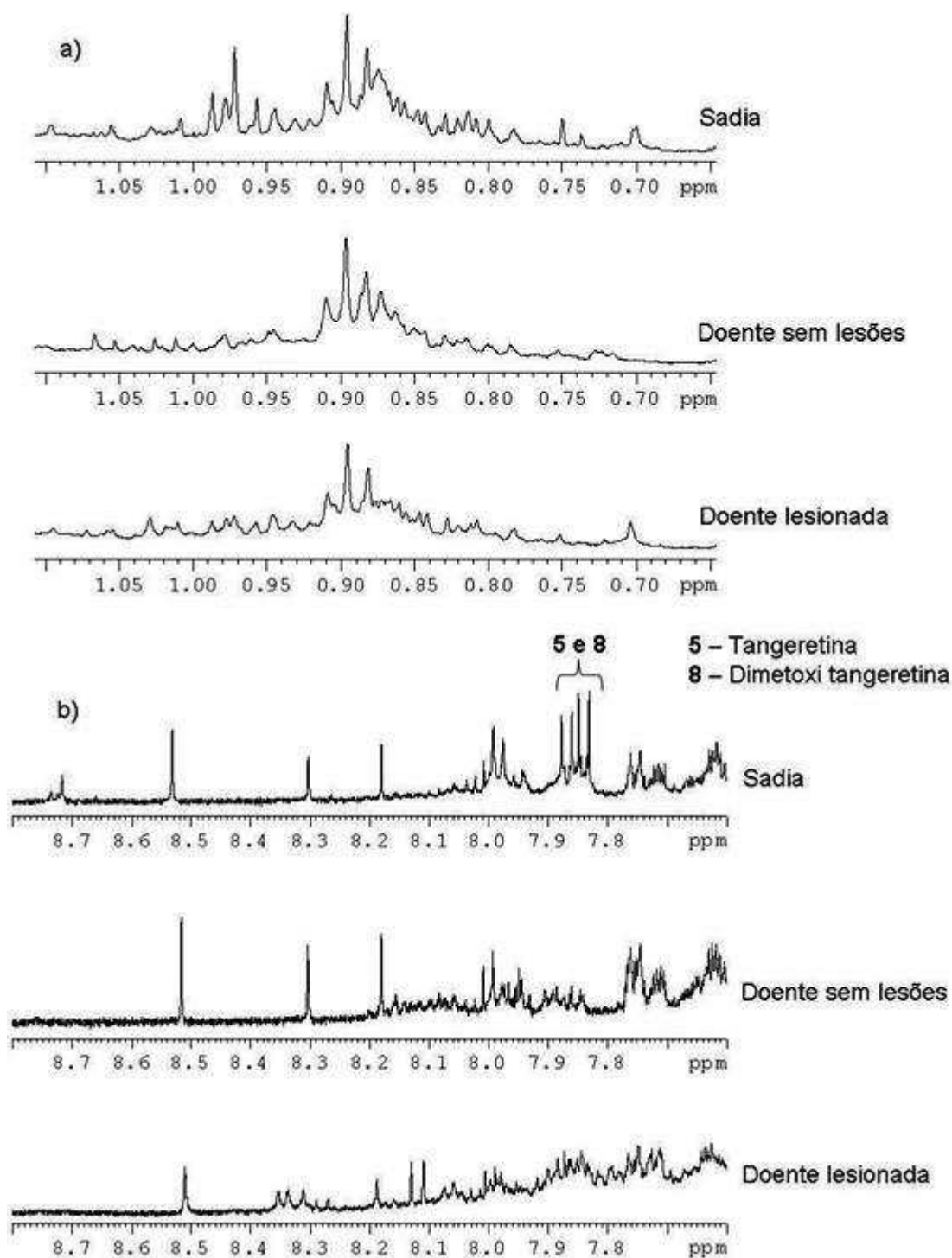


Figura 4.14 – Regiões dos espectros de RMN de ^1H das folhas responsável pela variância em PC1, destacadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*): a) 0,7 a 1,08 ppm; b) 7,67 a 8,75 ppm.

A partir das projeções perpendiculares das amostras sob a bissetriz e conseqüente refocagem sob a PC2 – que retém 28,0 % da variabilidade total dos dados – é corroborada a seqüência observada no primeiro eixo

(Figura 4.10). Contudo pode-se verificar que existe uma proximidade maior dos agrupamentos em PC2 do que em PC1 o que reflete a maior similaridade inter grupos no segundo eixo (PC2). Por conseguinte, tal semelhança pode ser atribuída às alterações morfológicas dos indivíduos já que as amostras de folha sadia e doente sem as lesões se agrupam demonstrando que as características morfológicas são mais importantes na caracterização da PC2, em que a amostra de doente lesionada é composta da lesão que acomete a folha. Logo, no sentido de escores negativos de PC2, ocorrem as alterações morfológicas das amostras.

De acordo com os gráficos das variáveis, as regiões de 1,77 a 2,85 ppm que também contribuíram para a variação em PC1 (com exceção da região de 2,4 a 2,85 ppm) e 6,14 a 6,35 ppm, são responsáveis pela disposição dos indivíduos sadios e doentes sem as lesões, em escores positivos de PC2, além da região de 3,75 a 4,12 ppm como preponderante na alocação dos indivíduos doente lesionado em escores negativos de PC2 (Figura 4.15).

Os sinais entre 1,76 e 2,4 ppm, segue a variação verificada em PC1. É visível, contudo, o aparecimento de um simpleto em 2,52 ppm e outro conjunto de sinais de 2,58 a 2,70 ppm, que embora mostrem-se importantes já que apareceram somente no momento em que a folha é acometida pelo cancro, não apareceram nos experimentos bidimensionais e portanto não foram identificados. No outro conjunto de sinais (Figura 4.15b), inerente à região de 6,14 a 6,35 ppm, percebe-se que não há variação de um importante flavonóide da laranja, a hesperidina, mas é perceptível ainda sinais que aparecem entre 6,15 a 6,20 ppm somente nos extratos de folhas de laranjeira doente lesionada. Nessa região incide sinais de sistemas aromáticos, o que nos indica que estes compostos podem estar sendo produzidos no sítio da lesão.

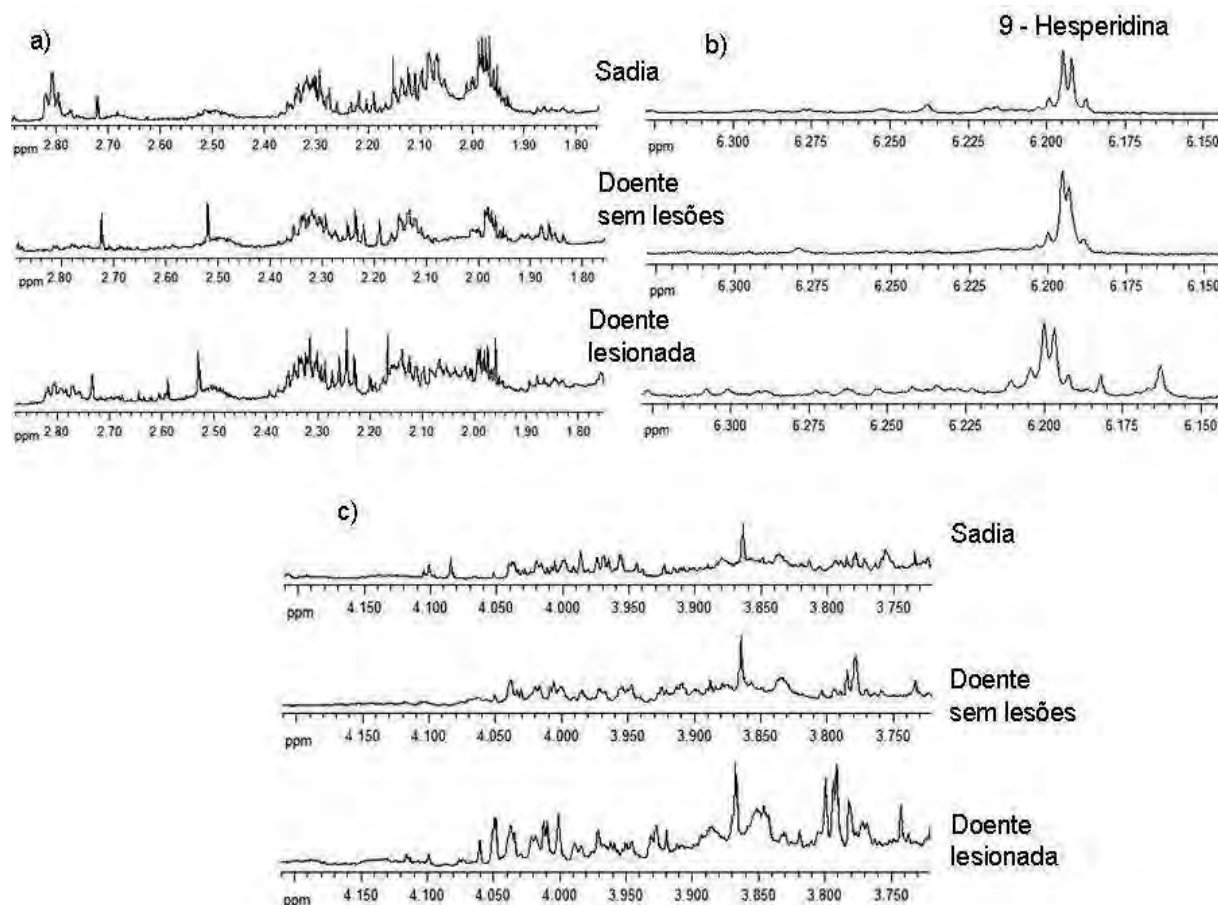


Figura 4.15 – Regiões dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas apontadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*) como responsável pela variância em PC2: a) 1,77 a 2,85 ppm; b) 6,14 a 6,35 ppm e c) 3,75 a 4,12 ppm.

A região de 3,75 a 4,12 ppm (Figura 4.15c), responsável por alocar indivíduos doentes lesionados em escores negativos de PC2, é dissimilar aos sadios e doentes sem as lesões. Sendo assim, esses compostos são encontrados na lesão, podendo ser inerentes ao mecanismo defensivo no foco da infecção, já que todas as células vegetais são individualmente capazes de reconhecer patógenos e acionar o sistema de defesa local (HOLT *et al.*, 2000); contudo, ainda assim, tais sinais podem ser de compostos intrínsecos da bactéria. Esta região é composta por deslocamentos de metoxilas e por sinais de hidrogênio α carboxílicos de aminoácidos. Como citado anteriormente, a laranja possui polimetoxi flavonóides, cujas metoxilas que participam de suas constituições

apresentam deslocamento químico de 3 a 4 ppm. Contudo, outros componentes podem ainda apresentar sinais nesta região e contribuir para a composição de PC2.

4.4. ANÁLISE POR HR-MAS

4.4.1. AVALIAÇÃO DAS CASCAS DO FRUTO

Nas análises das cascas do fruto, procurando verificar a estrutura geral dos dados, a HCA foi realizada (Figura 4.16).

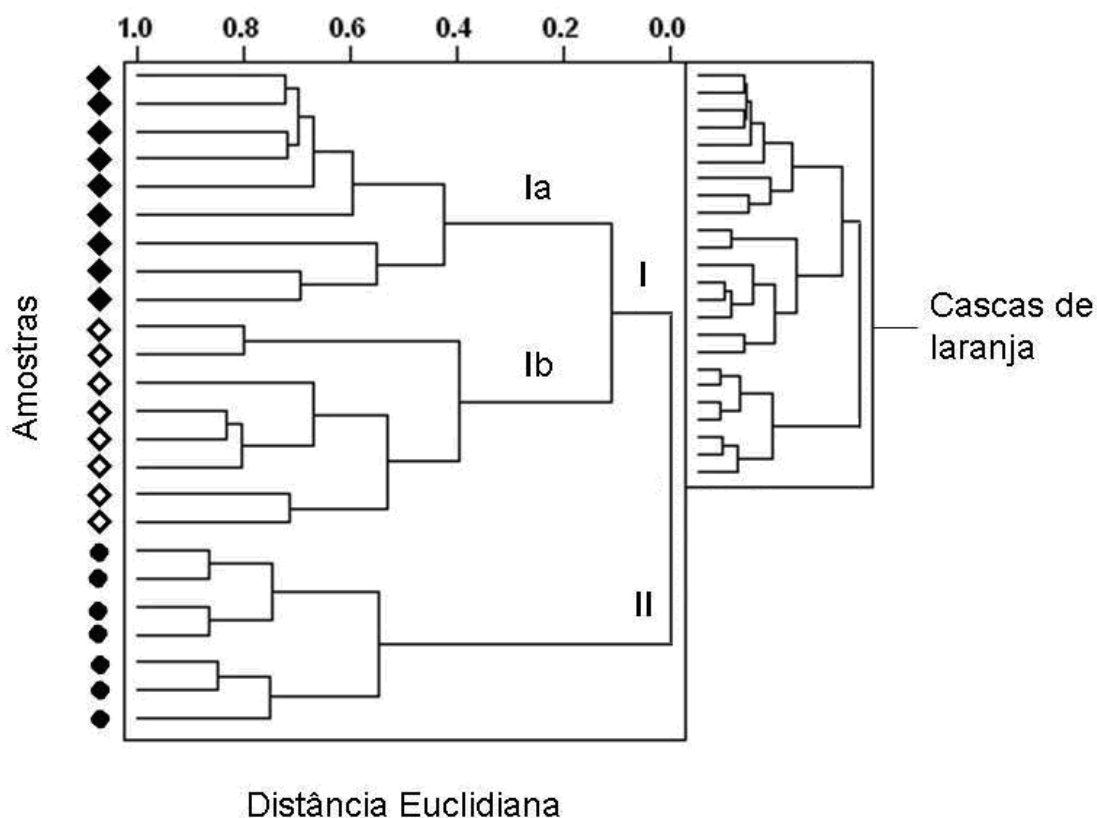


Figura 4.16 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das cascas do fruto da laranja: sadia (●); doente sem as lesões (◆); doente lesionada (◇).

O dendrograma resultante é composto inicialmente por dois agrupamentos, o primeiro que reúne as cascas demonstrando que há

diferenças naturais de características químicas e/ou morfológicas entre os mesmos.

Há inicialmente a formação de dois grupos principais, em que, o primeiro (I), é formado por cascas de laranja doente, independente do grau de incidência da lesão, e o segundo (II) é formado por cascas de laranja sadia, formando agrupamentos, portanto, em função da incidência do patógeno. Em seguida, com um índice de similaridade de aproximadamente 0,1, o primeiro grupo (I) é subdividido em um grupo de indivíduos doente sem as lesões (Ia) e outro de indivíduos doente lesionado (Ib), de acordo portanto, com os níveis de incidência da doença.

Na continuidade das análises, a aplicação dos algoritmos de PCA foi realizada resultando no agrupamento das replicatas com 77,8% da variância dos dados (Figura 4.17).

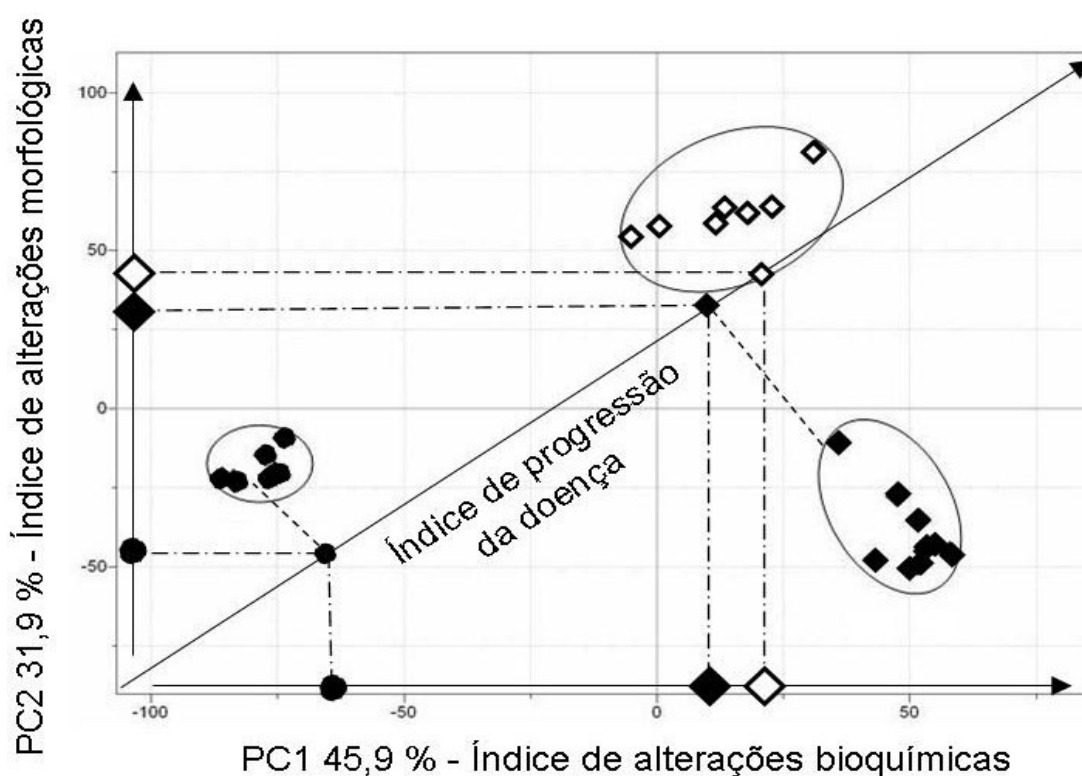


Figura 4.17 – Gráfico de escores da PCA dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das cascas do fruto de laranja sadia (●); doente sem as lesões (◆); doente lesionada (◇).

Para corroborar os dados da HCA, a bissetriz sob os eixos fatoriais foi traçada e resultados semelhantes aos extratos foram obtidos. As projeções perpendiculares das amostras sob a bissetriz resultam na progressão da doença com amostra sadia no quarto quadrante e doente lesionada no segundo quadrante. É verificado ainda que as amostras de cascas de laranja doente sem as lesões (◆) e doente lesionada (◇) foram semelhantes, e a sadia (●), diferente das demais. Na PCA dos extratos (Figura 4.10), as alterações morfológicas foram mais importantes na composição dos eixos, já que os indivíduos agrupados (sadio e doente sem as lesões) são morfologicamente semelhantes. Na PCA das cascas, os indivíduos agruparam em função do patógeno, demonstrando que as características bioquímicas são mais importantes quando a análise de metabólitos e em particular, os metabólitos primários, é realizada.

Na projeção das amostras sob a PC1, que reteve 45,9% da variabilidade dos dados, ocorreu a sequência de incidência da doença, seguindo o sentido de escores positivos de PC1, de forma que pode ser interpretada como o índice de alterações bioquímicas das amostras em função do patógeno.

A análise do gráfico de variáveis (*loadings*) foi realizada e as regiões de 1,25 a 2,45 ppm e 4,10 a 4,55 ppm (Figura 4.18) foram apontadas como responsáveis pela distribuição das amostras doente sem as lesões e doente lesionada (◆ e ◇) em escores positivos de PC1. As regiões de 5,20 a 5,45 ppm contribuíram para o posicionamento das cascas sadias (●) em escores negativos de PC1.

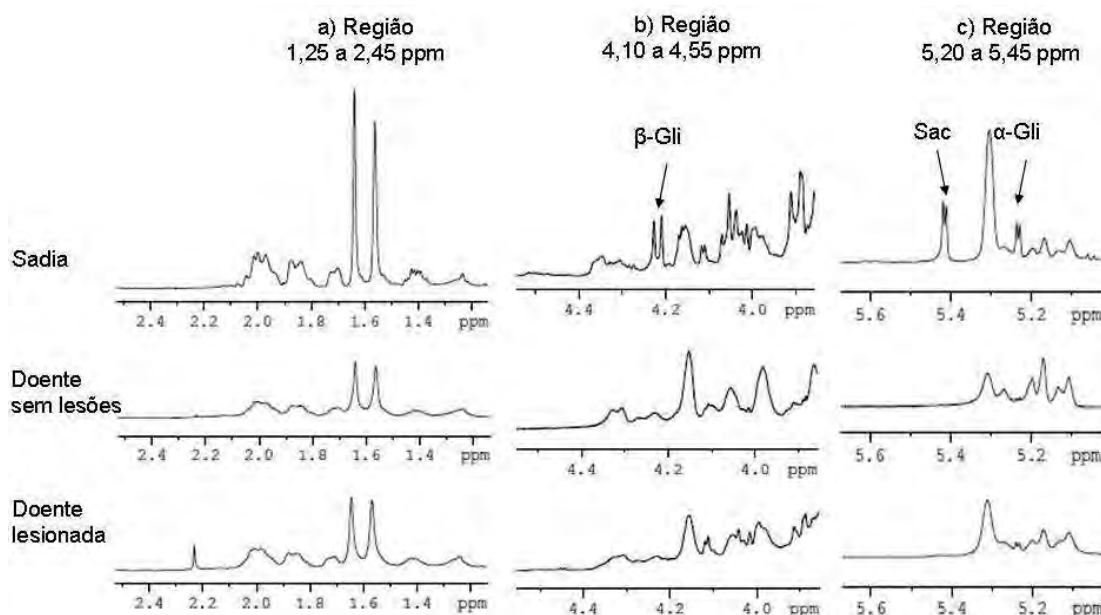


Figura 4.18 – Regiões dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das cascas do fruto, apontadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*), para a caracterização de PC1: a) região de 1,25 a 2,45 ppm; b) região de 4,10 a 4,55 ppm e c) região de 5,20 a 5,45 ppm. Legenda: β -gli: β -glicose; α -gli: α -glicose; sac: sacarose.

A região de 1,25 a 2,45 ppm (Figura 4.18a) pode ser atribuída aos hidrogênios alifáticos de resíduos de aminoácidos ou aos compostos terpênicos, como os óleos essenciais, que podem ser visualizados quando a HR-MAS é utilizada, já que a amostra a ser analisada sofre o mínimo de pré-tratamento. Verifica-se, contudo, a redução da produção do composto referente aos simpletos em 1,58 e 1,62 ppm, que apesar de sua identificação ter ficado comprometida em função da obtenção insatisfatória dos sinais de HMBC (mesmo com 20 h de experimento) (Figura 5.37), ainda assim, acoplamentos com carbonos olefínicos puderam ser visualizados e, em conjunto com as informações de RMN de ^1H (entre 5 e 5,5 ppm) inerentes à metoxilas (Item 5.3.), sugerem atribuição à hidrocarbonetos insaturados. Existe ainda um novo simpleto em 2,1 ppm na amostra de casca doente lesionada que não aparece nos experimentos bidimensionais.

De acordo com a Figura 4.18b, há a alteração na intensidade de sinais, que podem ser atribuídos aos hidrogênios policarbinólicos. No entanto, há a visível variação dos carboidratos livres β -glicose (Figura 4.18b)

e α -glicose e do dissacarídeo sacarose (Figura 4.18c). Já é sabido que a Xac leva as baixas taxas biossintéticas (SWARBRICK *et al.*, 2006) e catabolismo protéico (CERNADAS, *et al.*, 2008), no entanto, os carboidratos têm recebido o título de moléculas sinalizadoras de regulação do metabolismo, desenvolvimento e resposta ao estresse (GRENNAN, 2007). Sendo assim, verifica-se que a produção destes compostos foi praticamente cessada, o que pode ser associado ao fornecimento de energia requerida para reações de produção de metabólitos mais importantes ao mecanismo defensivo. A PC1 é, portanto, o índice de alterações bioquímicas representadas principalmente pelo catabolismo de carboidratos.

Da mesma forma, a projeção das amostras sob o eixo da segunda componente principal (PC2) – que retém 28,0 % da variabilidade dos dados – foi realizada resultando na sequência observada no primeiro eixo. A maior proximidade dos conjuntos amostrais observada em PC2 (já verificada nos extratos) foi visualizada nas cascas e, portanto, a PC2 reflete maior similaridade inter grupos e, sendo assim, atribuída às alterações morfológicas dos indivíduos. Logo, no sentido de escores positivos de PC2, ocorrem as alterações morfológicas das amostras que, em função da distribuição dos conjuntos amostrais no gráfico de escores (indivíduos doentes sem as lesões e lesionados agrupados), são sobrepujadas pelas alterações bioquímicas, que se mostram mais importantes para o entendimento da PCA.

A partir da análise do gráfico das variáveis, foi verificado que a região compreendida entre 6,0 e 8,0 ppm (elucidação comprometida) (Figura 4.19a), cuja produção é quase cessada durante a incidência bacteriana, é responsável por alocar o material doente lesionado em escores positivos de PC2. De acordo com a literatura, certos patógenos levam à manifestação de sintomas da doença através de mecanismos que envolvem a produção de toxinas, secreção de enzimas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta atacada, que são capazes de modular a resposta do espécime afetado com a repressão e mascaramento dos mecanismos de defesa da planta hospedeira (WHITE *et al.*, 2000; GACHOMO *et al.*, 2003). Não obstante, tais características são

atribuídas à bactéria do cancro cítrico, que suprime as respostas defensivas durante a manifestação da doença (CERNADAS *et al.*, 2008; FUJIKAWA *et al.*, 2006), confirmando a disposição predita, com a redução de sinais de compostos fenólicos que podem ser atribuídos a compostos inerentes ao mecanismo defensivo da planta.

Existe ainda a região de hidrogênios em 2,42 a 3,00 ppm que é responsável por alocar as amostras da casca do fruto doente para escores negativos de PC2 (Figura 4.19b) e acoplam com carbonos em torno de 30 a 40 ppm, sugerindo a presença aminoácidos e/ou ácidos orgânicos em que, tais sinais são reduzidos com a presença do patógeno, sugerindo seu consumo durante o ataque, corroborando as classes de compostos, preditas nas análises dos extratos e das cascas, responsáveis pela variabilidade da composição química durante o ataque da *Xac*.

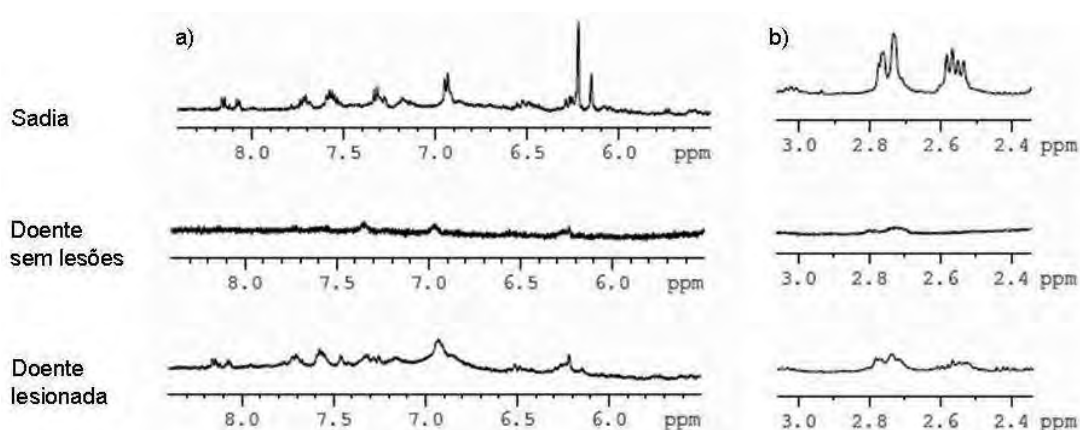


Figura 4.19 – Regiões dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das cascas do fruto apontadas pelo gráfico de variáveis (*loadings*), para a caracterização de PC2 a) região de 6,0 a 8,0 ppm; b) região de 2,42 a 3,0 ppm.

4.3.2. AVALIAÇÃO DIRETA DAS FOLHAS DE LARANJEIRA

A análise de HCA dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das folhas de laranja resultou em um dendrograma (Figura 4.20) similar ao obtido

pela matriz de HR-MAS das cascas de laranja. Há inicialmente a formação de dois grupos principais, em que, o primeiro (I), é formado por folhas de laranjeira sadia e o segundo (II) é formado por folhas de laranjeira doente sem as lesões e doente lesionada, independente do grau de incidência da lesão, formando agrupamentos similares aos concebidos com as análises de HR-MAS e, portanto, em função da incidência do patógeno. Em seguida, com um índice de similaridade de aproximadamente 0,18, o segundo grupo (II) é subdividido em um grupo de indivíduos doentes sem as lesões (IIa) e outro de indivíduos doentes lesionados (IIb), de acordo portanto, com níveis de incidência da doença.

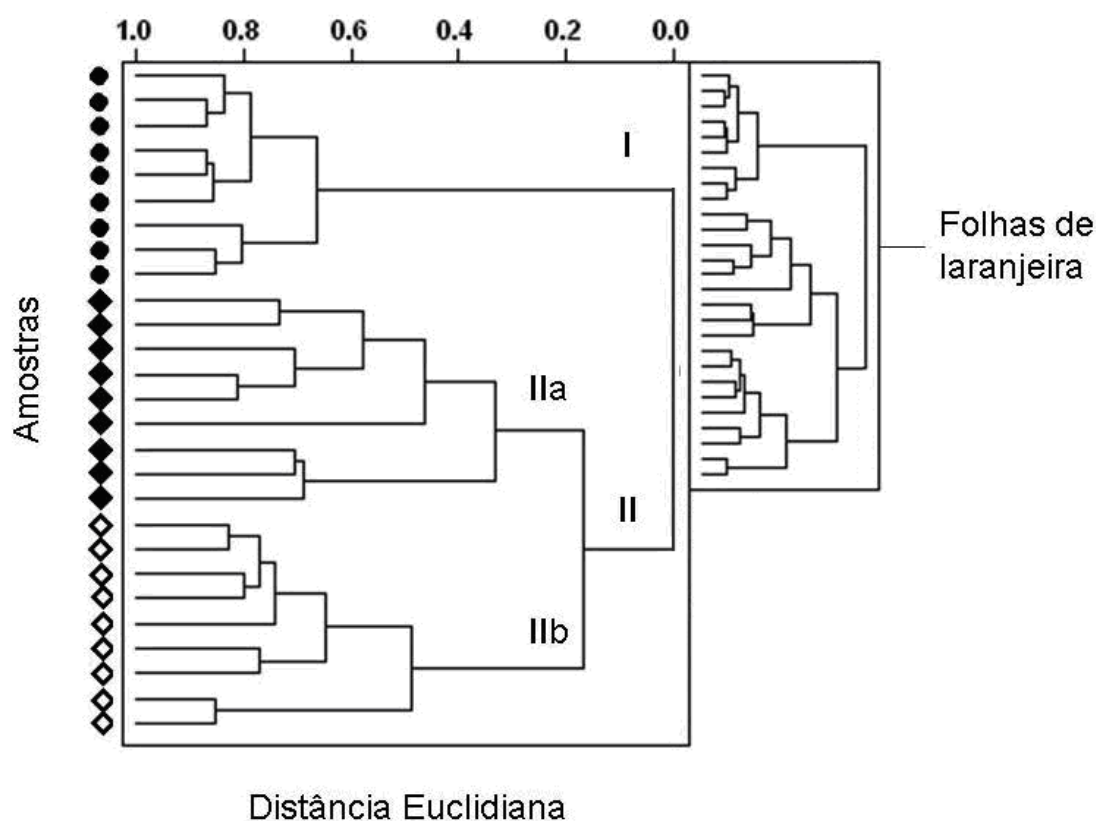


Figura 4.20 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das folhas de laranjeira: sadia (●); doente sem as lesões (◆); doente lesionada (◇).

A PCA obtida a partir da matriz original dos dados, utilizando a bissetriz dos dados, revelou o mesmo perfil observado na HCA, com retenção de 75,5 % da variabilidade dos dados (Figura 4.21).

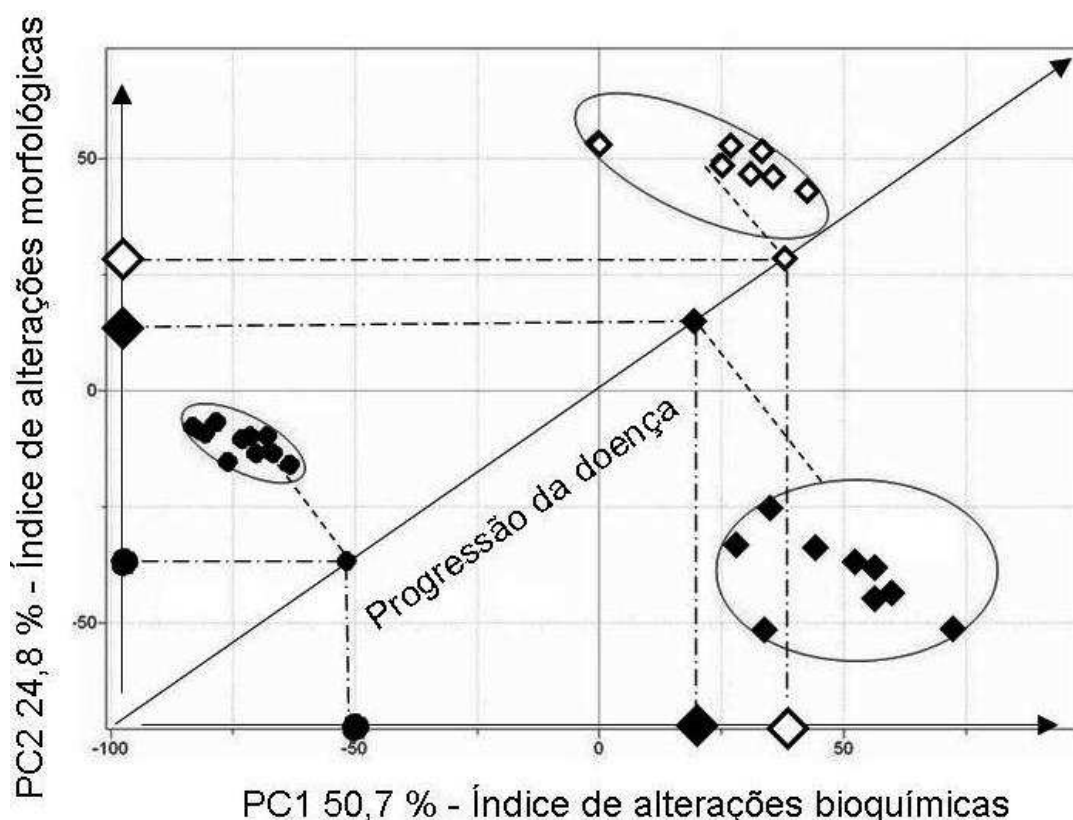


Figura 4.21 – Gráfico das amostras no espaço bidimensional de escores da PCA: sadia (●); doente sem as lesões (◆); doente lesionada (◇).

Da mesma maneira aplicada nas demais matrizes e com intuito de corroborar os dados do HCA, uma bissetriz sob os eixos fatoriais foi traçada, resultando na disposição das amostras no espaço vetorial, semelhante às cascas de laranja. Sendo assim, as projeções perpendiculares das amostras sob a bissetriz resultaram na progressão da doença com amostras de folhas de laranjeira doente sem as lesões (◆) e doente lesionada (◇) similares, e a sadia (●) dissimilar às demais. Assim como na PCA das cascas, as amostras se agruparam em função do patógeno, demonstrando mais uma vez que as características bioquímicas são mais importantes quando a análise de metabólitos e em particular, dos metabólitos primários, é realizada.

A avaliação do gráfico de variáveis (*loadings*) destaca a região de 1,25 a 1,6 ppm (Figura 4.22) como responsáveis pela localização dos

indivíduos doentes (◆ e ◇) em escores positivos de PC1, bem como a região de 3,53 a 3,77 ppm, foi indicadora do posicionamento dos indivíduos sadios em escores negativos de PC1.

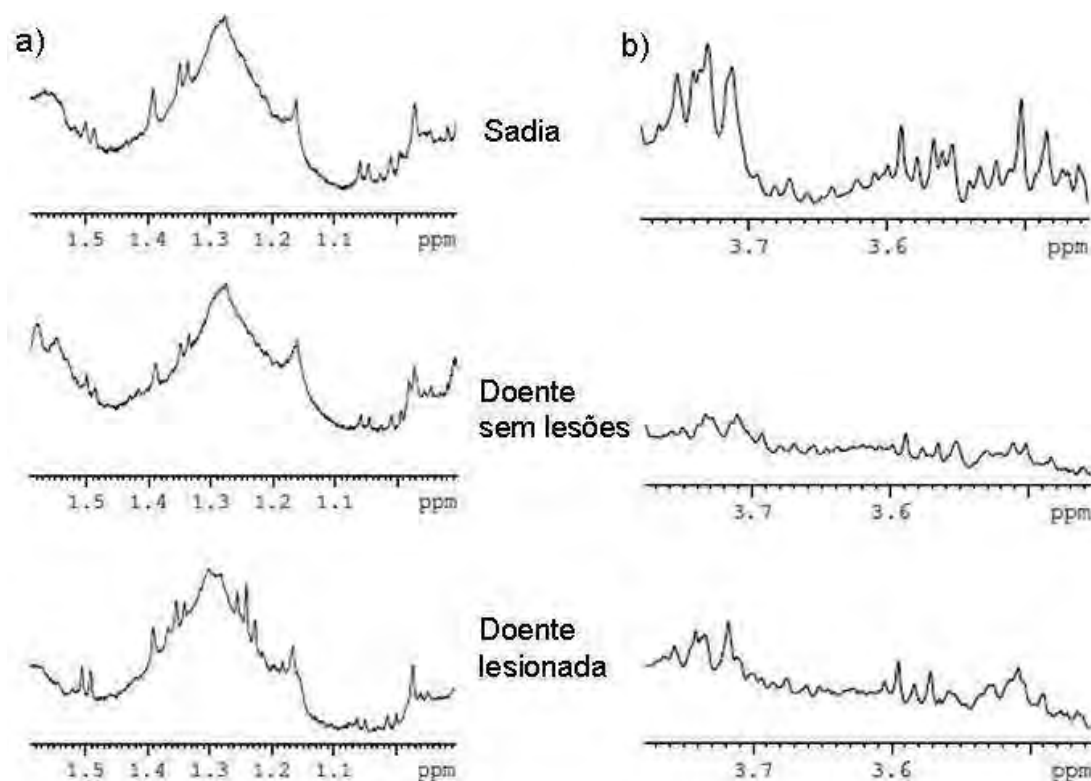


Figura 4.22 – Regiões apontadas pelos gráficos de variáveis como responsáveis pela variabilidade em PC1. a) 1,25 a 1,6 ppm; b) 3,53 a 3,77 ppm.

A região de baixo deslocamento químico no espectro de RMN de ^1H pode sugerir a presença de diversas classes de compostos inerentes à complexidade da matriz amostral. Nesse sentido, a região de 1,25 a 1,6 ppm poderia ser atribuída às paredes celulares bacterianas que são compostas por macromoléculas como carboidratos, lipídeos e proteínas (LI, 2006), que possuem hidrogênios de cadeias alifáticas, cujos sinais aparecem nos espectros de RMN de ^1H na região de 1 a 3 ppm (LE GALL *et al*, 2008). Assim, a aplicação da CPMG, a qual resulta no não aparecimento dos sinais de macromoléculas (CLARIDGE, 2008), foi também impetrada para a verificação dos sinais suprimidos, tais como aqueles intrínsecos às paredes celulares da bactéria em questão.

A comparação espectral, visualizada na Figura 4.23, entre o experimento obtido com a sequência de pulsos CPMG (a) e zgcprr (b) sugere a presença de terpenóides, dado ao resultado da manutenção da região de deslocamento químico de 1,25 a 1,6 ppm, importante na caracterização da PCA, quando a sequência zgcprr é aplicada. Pode-se observar ainda que a região em aproximadamente 2 ppm não foi visualizada no espectro obtido com a CPMG (Figura 4.23a), e portanto poderia ser atribuída à compostos da Xac, coerente com os resultados obtidos pelo gráfico de variáveis (*loadings*), visto que esta região não foi destacada importante para a composição da PCA.

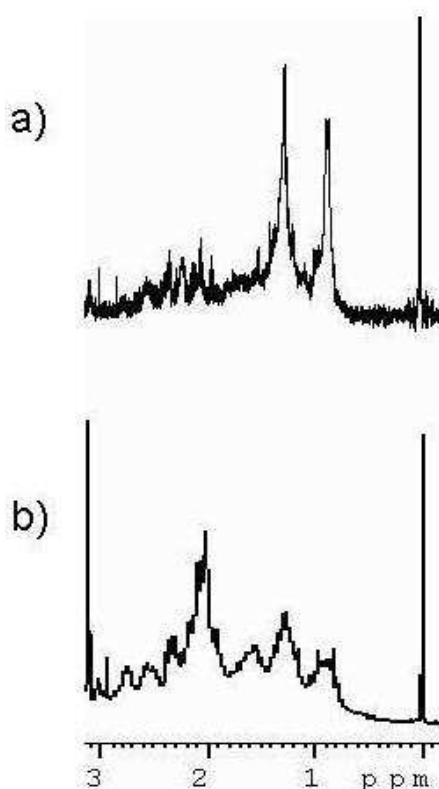


Figura 4.23 – Comparação entre espectros com as sequências de pulsos: a) CPMG, b) zgcprr.

Neste sentido, os compostos intrínsecos da região de 1,25 a 1,6 ppm podem ser atribuídos aos terpenóides, como os óleos essenciais, em que nos *Citrus* existe o limoneno como o preponderante, além de γ -terpineno, mirceno, α -farneseno, dentre outros (TAO *et al*, 2009). Na região

de 3,53 a 3,77 ppm, como nas outras matrizes, são preponderantemente aminoácidos e ácidos orgânicos, podem ser também considerados indicativos do mecanismo defensivo da planta. Em PC2, com 24,8 % da variância dos dados, a mesma situação observada na PC2 das cascas de laranja, foi verificada. No sentido de escores positivos, há a incidência dos agrupamentos similares doentes (◆ e ◇) e em escores negativos, a incidência de amostras de folhas de laranjeira sadia.

Com base na análise das variáveis, verificou-se que as regiões que influenciaram a composição do eixo estão em 2,60 a 3,10 ppm e 3,80 a 4,10 ppm para os escores positivos de PC2 e a região de 0,8 a 1,25 ppm correspondentes aos escores negativos de PC2 (Figura 4.24).

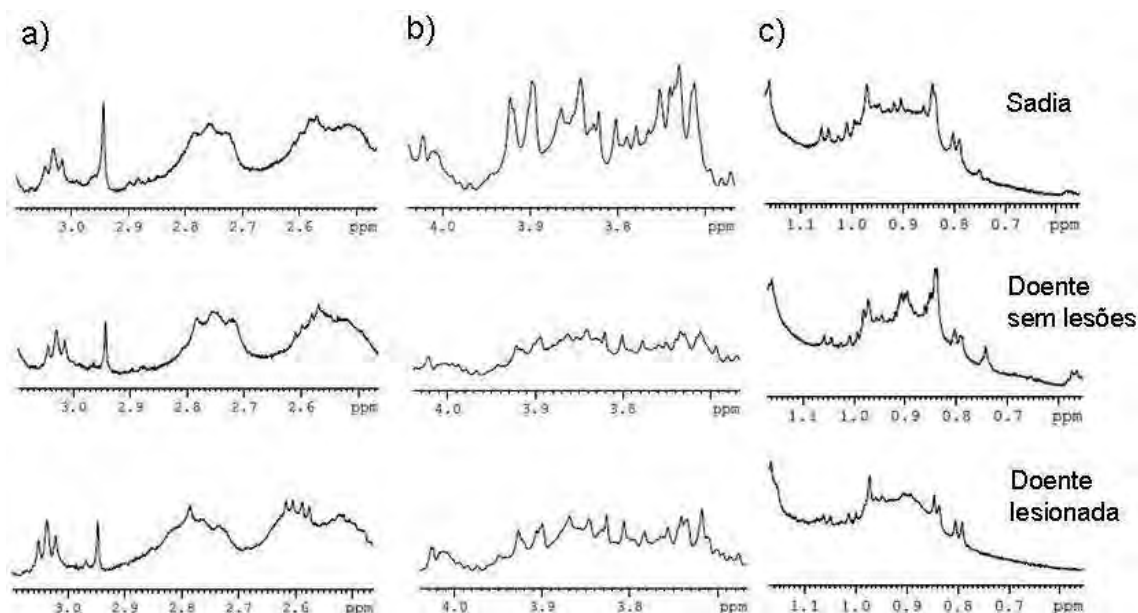


Figura 4.24 – Regiões apontadas pelos gráficos de variáveis como responsáveis pela variabilidade em PC2. a) 2,60 a 3,10 ppm; b) 3,80 a 4,10, c) 0,8 a 1,25 ppm.

As variáveis responsáveis pela caracterização da PCA corroboram os dados obtidos para a outra matriz analisada por HR-MAS, com as regiões de aminoácidos preponderantes para a classificação em PC2, demonstrando que a variabilidade de óleos essenciais podem também ser visualizadas nas análises de HR-MAS.

4.5. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

Os teste microbiológicos foram testados com o intuito de verificar se as variações de compostos biologicamente importantes (como a nobeletina e a tangeretina) podem ser suficientes para modificar as atividades biológicas dos extratos sem a Xac (sadia) e com a incidência do patógeno (doentes). Assim sendo, inicialmente os testes microbiológicos foram realizados com a aplicação de 1 mg dos extratos das folhas de laranjeira nos discos, a qual devido ao comprometimento da visualização do halo de inibição culminou na repetição da análise com 5 mg de extrato.

As zonas de inibição foram tomadas como a área onde não houve crescimento bacteriano visível e detectadas a olho nu. Tais zonas foram uniformemente circulares e os diâmetros da inibição completa foram medidos (inclusive o diâmetro do disco) com o auxílio de uma régua comum, incluindo o milímetro inteiro mais próximo, pela parte posterior da placa de *Petri* e contra a luz.

As zonas de inibição medidas foram interpretadas tomando como referência o halo de inibição do antibiótico cloranfenicol. Na Tabela 2, estão indicados os valores medidos dos halos de inibição para a *E. coli* e na Figura 4.25 há a imagem da placa ensaiada com a bactéria *E. coli*. Os dados da *S. aureus* não estão apresentados, pois não indicaram halo de inibição proeminente.

Tabela 2 – Medidas dos halos de inibição bacteriana pela técnica de difusão em ágar.

	<i>E. coli</i> (mm)
Sadia	1
Doente sem lesão	1
Doente lesionada	1

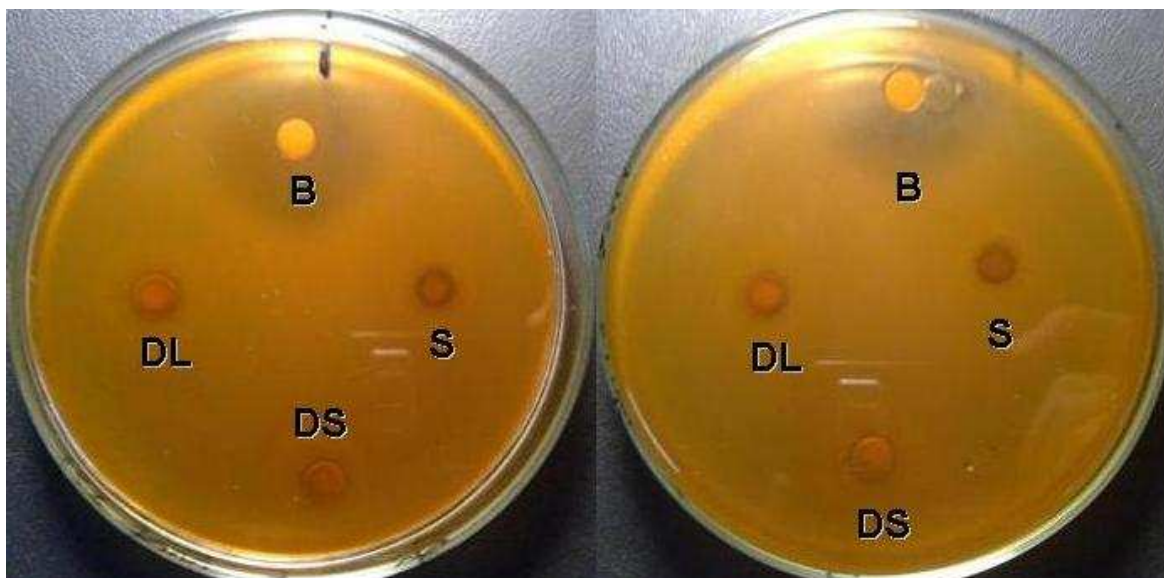


Figura 4.25 – Placa da análise biológica por difusão em agar. Legenda: B – Branco (cloranfenicol); S: Sadia; DS: Doente sem lesões; DL: Doente lesionada.

De acordo com as informações apresentadas e com a literatura disponível (OSTROSKY *et al*, 2008), o halo de inibição bacteriana menor que 2 mm classifica a bactéria *E. coli* e *S. aureus* resistentes aos extratos ensaiados. Sendo assim, não foi possível identificar diferenças de inibição entre extratos de folhas de laranjeira sadia e doente.

A verificação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos utilizados nos ensaios microbiológicos (Figura 4.26), indicou certa coincidência entre os resultados de atividade e os sinais dos hidrogênios do espectro em que há a incidência de sinais ao longo de toda a região espectral, sugerindo diversas classes de compostos como constituintes dos extratos. Contudo, segundo a literatura, dentre os compostos que apresentam atividade antimicrobiana destacam-se os óleos essenciais, alcalóides, lecitinas, fenóis e polifenólicos (GONÇALVES *et al.*, 2005). Assim, como verificado na Figura 4.26, os extratos apresentaram baixa incidência de sinais na região de hidrogênios aromáticos e, conseqüentemente, baixa concentração de fenóis e poli fenóis, os quais podem refletir no estreito halo de inibição para o experimento realizado.

Diante do exposto, a partir das análises preliminares realizadas, a RMN poderia ser uma ferramenta para análises preliminares dos componentes responsáveis pela atividade biológica dos extratos testados. Contudo, estudos mais aprofundados e abrangentes poderiam ser realizados para a constatação de tal fato.

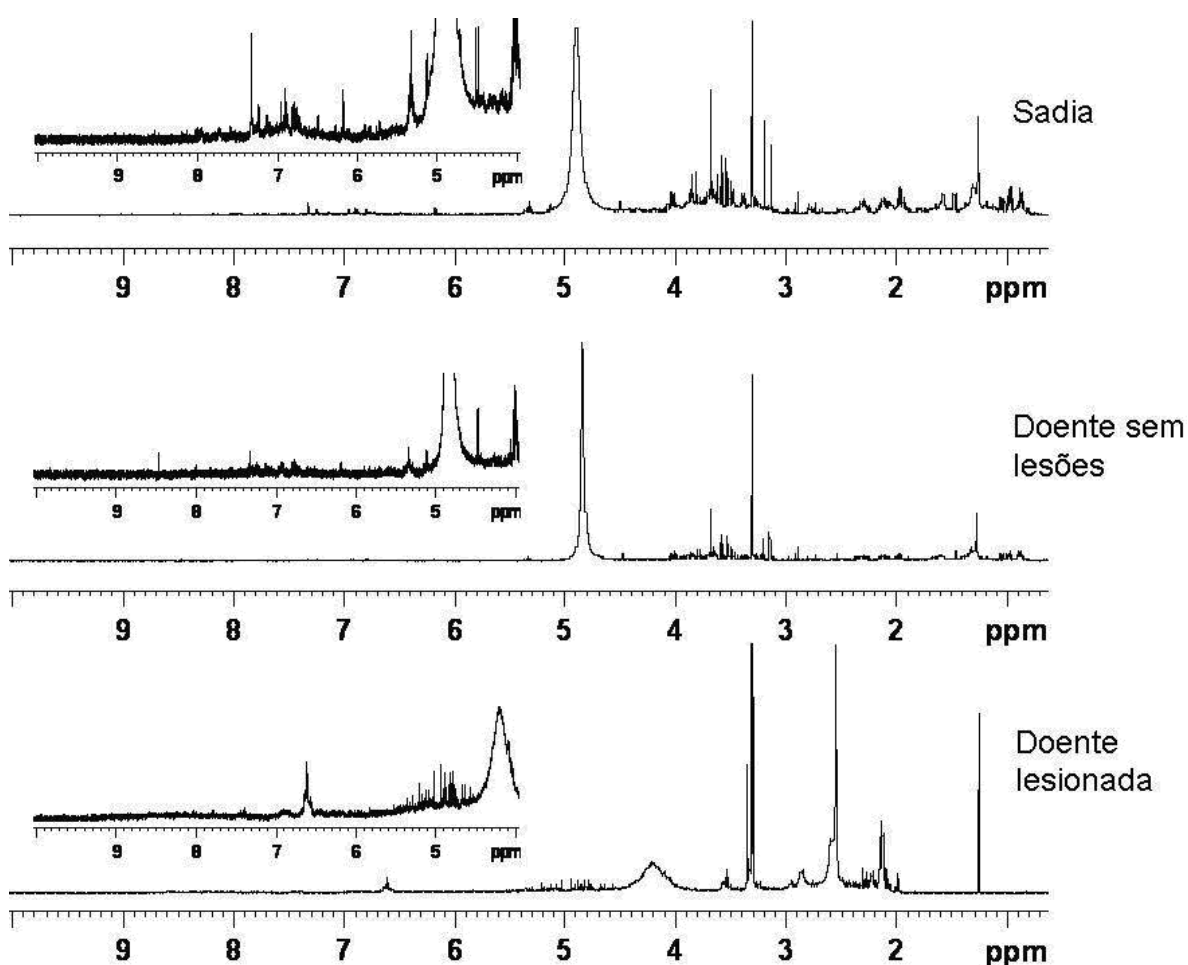


Figura 4.26 – Espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos utilizados nas análises microbiológicas.

4.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante é medida a partir da reação de compostos antioxidantes com um radical estável em uma solução de metanol. A

redução do DPPH é acompanhada pelo decréscimo na absorbância em comprimento de onda característico durante a reação (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Na Tabela 3 são apresentados os valores da concentração das soluções ensaiadas, as respectivas absorbâncias e porcentagens de atividade dos extratos sadia, doente sem lesões e doente lesionada, respectivamente em que os valores de porcentagens são relativos à absorbância do branco (0,750).

Tabela 3 - Concentração das soluções ensaiadas, absorbâncias e porcentagens de atividade antioxidante dos extratos de folhas de laranja sadia, doente sem lesões e doente lesionada.

Extrato de folhas de laranja sadia			
Tratamento	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbâncias (em triplicata)	% de atividade
T1	21,48	0,692 ; 0,687 ; 0,692	8,1
T2	42,97	0,638 ; 0,650 ; 0,658	13,1
T3	64,45	0,599 ; 0,603 ; 0,601	20,2
T4	85,93	0,571 ; 0,574 ; 0,582	23,9
T5	107,4	0,529 ; 0,545 ; 0,552	27,1
T6	214,8	0,407 ; 0,407 ; 0,418	45,9
T7 ^a	429,6	0,254 ; 0,251 ; 0,251	66,7

Extrato de folhas de laranja doente sem lesões			
Tratamento	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbâncias (em triplicata)	% de atividade
T1 ^a	10,21	0,738 ; 0,746 ; 0,758	1,07
T2	20,42	0,695 ; 0,705 ; 0,703	6,13
T3	40,85	0,688 ; 0,696 ; 0,699	7,07
T4 ^a	61,27	0,682 ; 0,701 ; 0,695	6,9
T5	81,70	0,673 ; 0,687 ; 0,675	10,0
T6	102,12	0,660 ; 0,665 ; 0,678	11,6
T7	204,25	0,605 ; 0,609 ; 0,613	18,8

T8	408,50	0,525; 0,523; 0,518	30,1
T9	817,02	0,330; 0,331; 0,332	55,87

Extrato de folhas de laranjeira doente lesionada			
Tratamento	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Absorbâncias (em triplicata)	% de atividade
T1	10,02	0,722; 0,719; 0,719	85,9
T2	20,04	0,702; 0,686; 0,689	62,3
T3	40,08	0,642; 0,618; 0,618	38,5
T4	60,13	0,573; 0,565; 0,569	30,8
T5	80,17	0,519; 0,503; 0,519	24,1
T6	100,21	0,457; 0,478; 0,461	17,6
T7	200,42	0,283; 0,263; 0,288	8,13
T8 ^a	400,85	0,106; 0,110; 0,105	3,87

^a – Dados não utilizados na construção dos gráficos de regressão linear.

Para a construção dos gráficos de regressão linear com índices de correlação (R) satisfatórios, a exclusão de pontos anômalos à tendência dos dados (indicados na Tabela com o subíndice a), foi necessária. Na Figura 4.27, há a ilustração dos gráficos de regressão linear com porcentagem de inibição *versus* concentração das amostras sadia, doente sem lesões e doente lesionada, respectivamente onde, a partir da equação da reta e tomando a metade da porcentagem de inibição máxima, é obtido o IC₅₀, em que é interpretado como a quantidade de extrato responsável pela metade de inibição total.

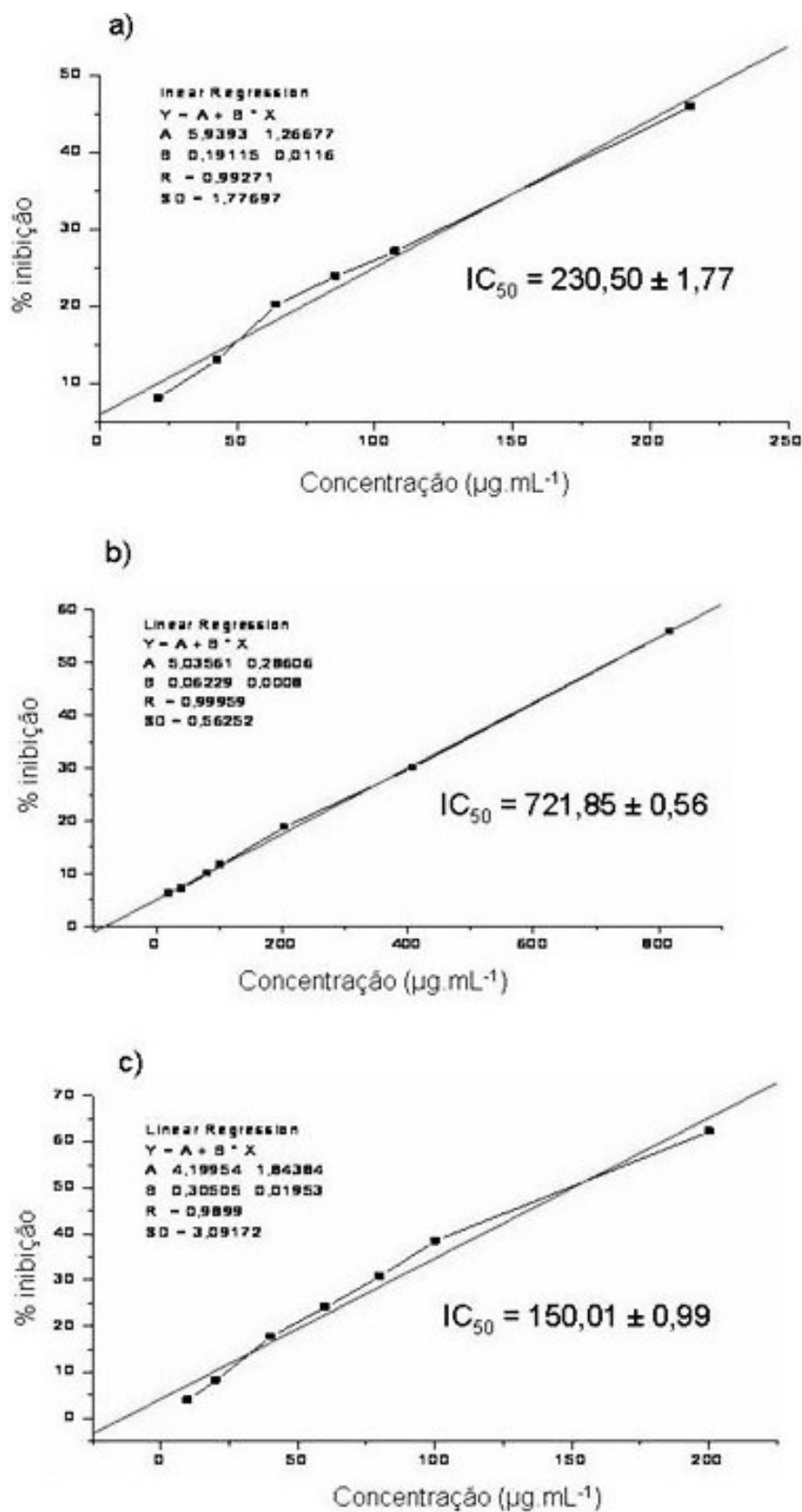


Figura 4.27 – Gráficos de regressão linear com porcentagem de inibição *versus* concentração das amostras: a) sadia; b) doente sem lesões e c) doente lesionada.

Assim sendo, verifica-se que a amostra doente lesionada tem atividade antioxidante maior do que as demais em que a sadia apresenta atividade mediana.

Na Figura 4.28, as porcentagens de inibição para as concentrações de 20, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram plotados resultando no gráfico de barras apresentado.

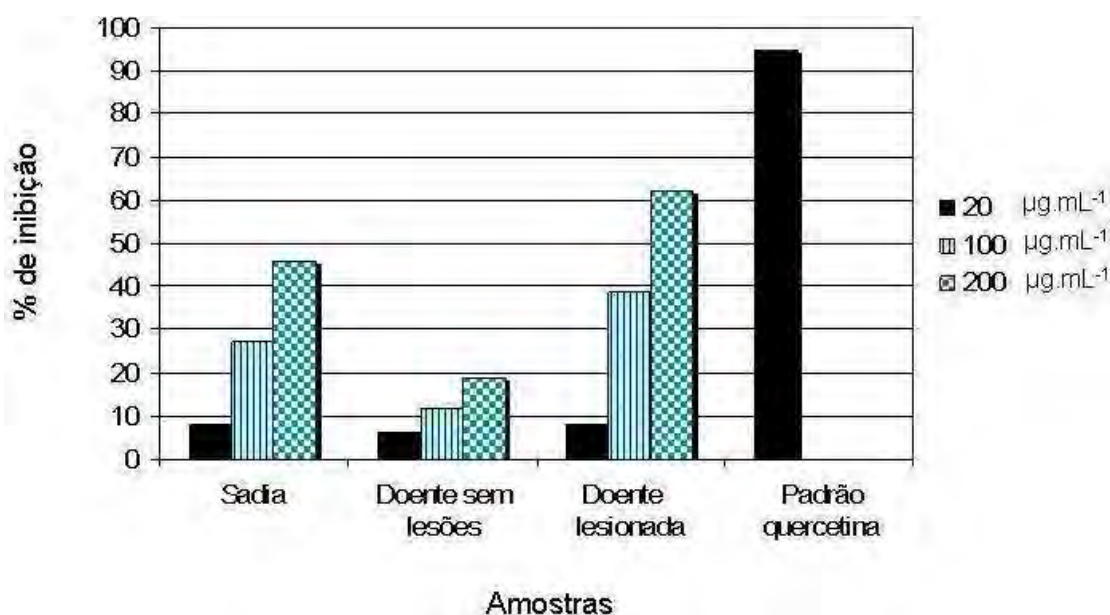


Figura 4.28 – Gráfico das porcentagens de inibição *versus* concentração da amostra sadia, doente sem lesões e doente lesionada.

Pode-se observar que o extrato das folhas de laranja sadia apresenta atividade antioxidante maior do que o extrato de folhas de laranja doente sem lesões e que os extratos de folhas de laranja lesionada apresenta atividade maior que as demais. Esta tendência observada é análoga à verificada no gráfico de escores da PCA dos extratos (Figura 4.10) em que as amostras sadia e doente sem lesões estão mais próximas em ambos os eixos (PC1 e PC2) e assim, mais similares e, por conseguinte, díspares à amostra doente lesionada.

Neste sentido, pode-se inferir que a variabilidade química das amostras, predita na análise quimiométrica, é acompanhada pela variação

da atividade antioxidante possibilitando a correlação das informações obtidas a partir da PCA com a porcentagem de inibição/ IC_{50} . Diante disto, as variáveis responsáveis pela variabilidade nos gráfico de escores da PCA e principalmente, as responsáveis por alocar indivíduos doentes lesionado em escores positivos de PC1, são importantes para o entendimento dos dados de inibição. Assim sendo, é sabido que durante o desenvolvimento da lesão, há a supressão das respostas defensivas e a indução da mobilização de nutrientes na direção dos sítios de infecção (CERNADAS *et al.*, 2008) e provavelmente essa diferença no metabolismo da planta durante o desenvolvimento da lesão pode justificar as diferenças de atividade antioxidante.

O gráfico de variáveis (*loadings*) apontou a região de 1,76 a 2,4 ppm (Figura 4.11, aminoácidos e ácidos orgânicos) e 6,48 a 6,69 ppm (Figura 4.13, compostos flavonoídicos) como responsáveis por alocar o conjunto de tecido doente lesionado em escores positivos de PC1 e as regiões de 0,7 a 1,08 ppm e 7,67 a 8,75 ppm (Figuras 4.14 a e b) foram responsáveis pelo posicionamento dos extratos das folhas de laranjeira sadia e doente sem as lesões, em escores negativos de PC1 e assim sendo os compostos inerentes a tais sinais podem ser considerados cruciais nas diferenças de atividade oxidante dos extratos metanólicos.

Na região de 6,48 a 6,69 ppm, verifica-se a redução de sinais inerentes aos compostos flavonoídicos de tal região, demonstrando que estes não influem na variação da capacidade antioxidante dos extratos. Na região de 1,76 a 2,4 ppm, como vislumbrado na Figura 4.11, no grupo de amostras doente lesionada, há aumento na concentração de compostos identificados como aminoácidos e em função de sua maior variabilidade nas amostras, conforme a discussão a seguir. Na região de 0,7 a 1,08 ppm há uma maior intensidade de tais sinais na sadia que (resíduos alifáticos) podem ser de carboidratos em que, nas formas poliméricas, apresentam atividade (TSIAPALI *et al.*, 2001), justificando seu maior poder antioxidante quando comparado com amostras doente sem lesões. Na região de 7,67 a 8,75 ppm verifica-se uma variabilidade dos espectros em que há o

aparecimento de sinais em 8,35 ppm que apesar da baixa intensidade, pode ser importante na caracterização da maior atividade vislumbrada nos extratos de amostra doente lesionada.

Nas últimas décadas os antioxidantes têm recebido destaque quanto à importância que desempenham ao bem estar humano (MOKBEL & HASHINAGA, 2004; FANG et al., 2002). Contudo, o valor destas espécies químicas não se restringe somente à saúde do homem. Tais substâncias são importantes também para a inibição de doenças nas plantas, inibindo ou atrasando a cadeia de reações de oxidações (KAUR & KAPOOR, 2001) em que a transposição de barreiras físicas e consequente penetração de patógenos nas espécies vegetais induz a ativação dos sistemas defensivos com a geração de espécies reativas de oxigênio dentre outras substâncias.

No presente trabalho, uma das variabilidades notadamente importantes na distinção de ataque patogênico foi a de aminoácidos em que há relatos das altas suscetibilidades dos aminoácidos e resíduos de proteínas à oxidação por espécies reativas (AHMAD et al., 1982; LARSON, 1988; STADTMAN & LEVINE, 2003). Assim sendo, tais compostos podem estar agindo como defensivos no sentido de retardar reações de oxidação na planta causadas pelo patógeno.

5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS IMPORTANTES NA CARACTERIZAÇÃO DAS PCA's

5.1. COMPOSTOS DOS SUCOS

5.1.1. ALANINA

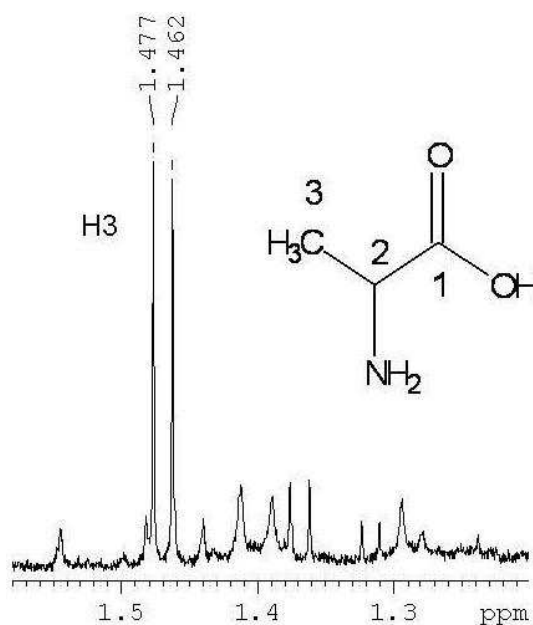


Figura 5.1 – Espectro de RMN de ^1H da alanina (D_2O , 500 Mhz).

Tabela 4 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da alanina.

Posição	$\delta\text{ C}$	Identificado ^a NORD <i>et al.</i> , 2004 ^b	
		$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)	$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)
C3	19	1,47 (d, 7,28)	1,52 (d, 7,3)
C2	53,5	c	3,94 (q, 7,3)
C1	179,3	-	-

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3COOD em D_2O); ^c sobreposto pelos sinais das outras substâncias.

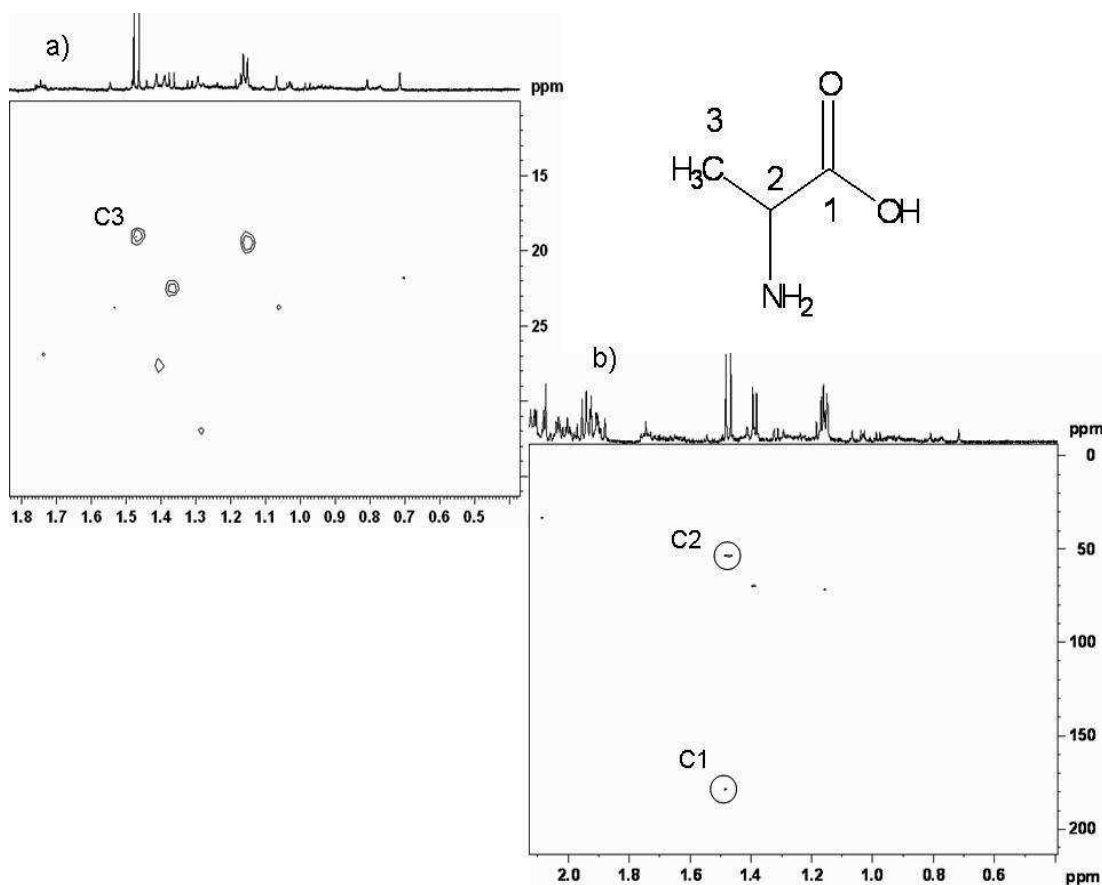


Figura 5.2 – a) Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HSQC (D_2O , 500 Mhz) da alanina; b) Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HMBC (D_2O , 500 Mhz) da alanina.

5.1.2. TREONINA

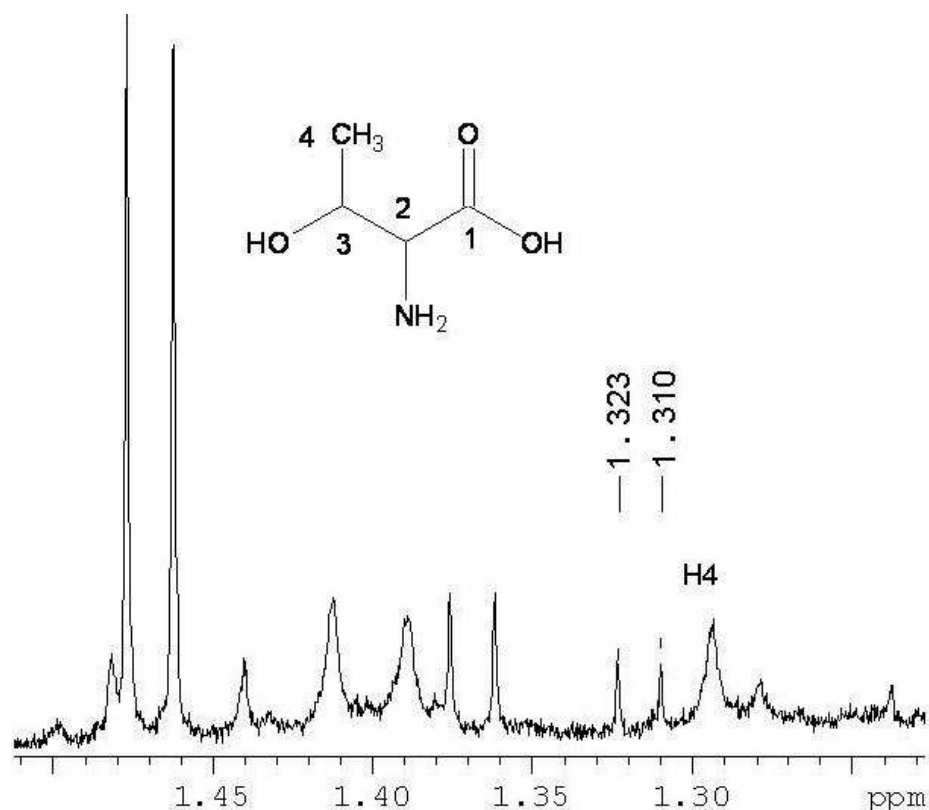


Figura 5.3 – Espectro de RMN de ^1H da treonina (D_2O , 500 Mhz).

Tabela 5 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da treonina.

Posição	$\delta\text{ C}$	Identificado ^a	
		GOVINDARAJU <i>et al.</i> , 2000 ^b	
		$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)	$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)
C2	c	c	3,58 (d, 4,9)
C3	c	4,25 (c)	4,24 (m)
C4	32,0	1,32 (d, 6,52)	1,32 (d, 6,35)

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^b - RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$); ^c sobreposto pelos sinais das outras substâncias.

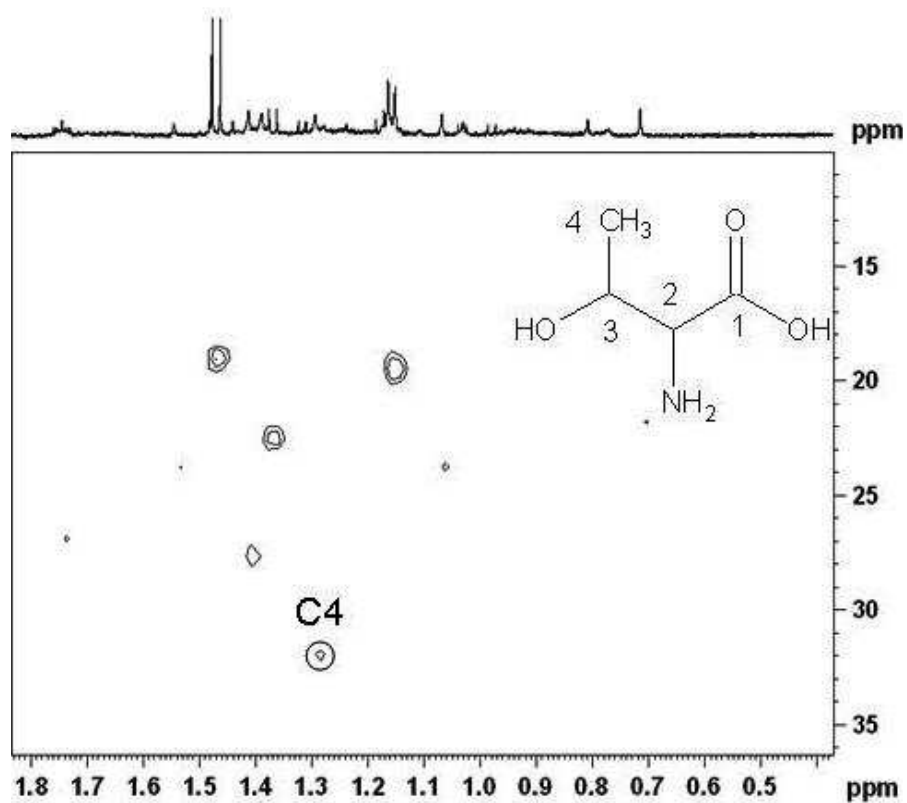


Figura 5.4 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (D_2O , 500 Mhz) da treonina.

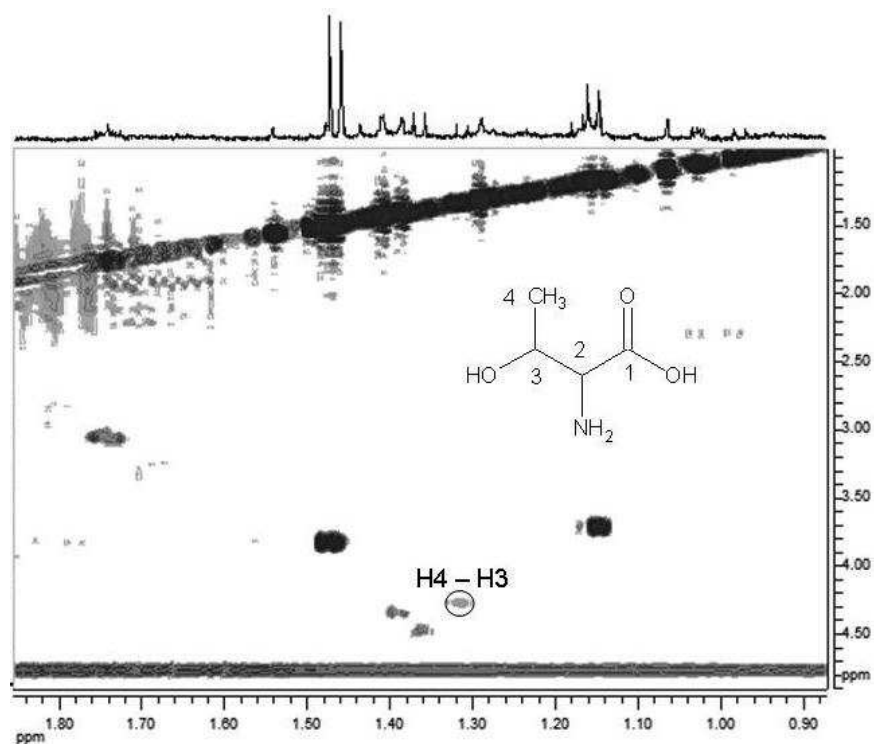
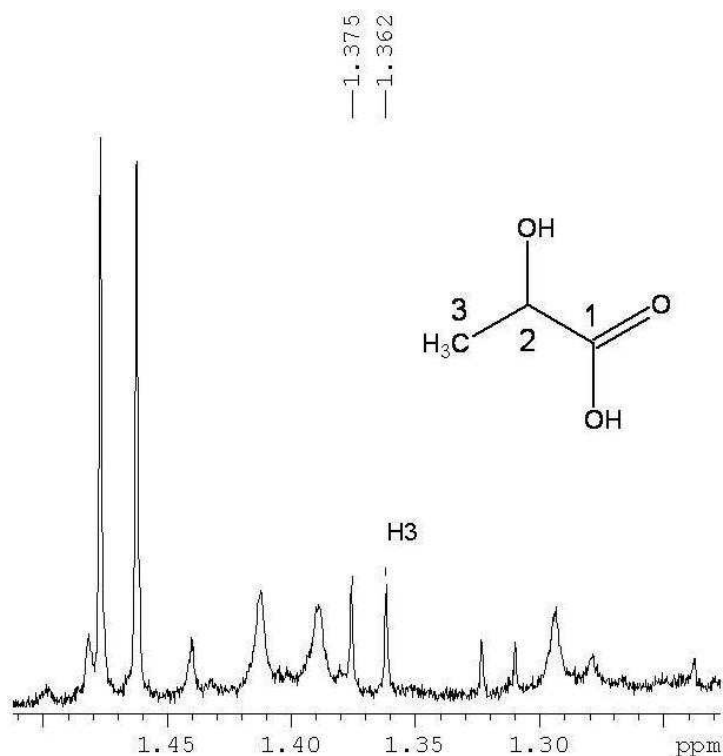


Figura 5.5 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gCOSY (D_2O , 500 Mhz) da treonina.

5.1.3. ÁCIDO LÁTICO

Figura 5.6 – Espectro de RMN de ^1H do ácido láctico (D_2O , 500 Mhz).Tabela 6 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido láctico.

Posição	$\delta\text{ C}$	Identificado ^a NORD <i>et al.</i> , 2004 ^b	
		$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)	$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)
C3	22,4	1,36 (d, 6,9)	1,42 (d, 7,0)
C2	69,8	c	4,38 (q, 7,0)
C1	d	c	-

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3COOD em D_2O); ^c sobreposto pelos sinais das outras substâncias; ^d sinal não observado no espectro.

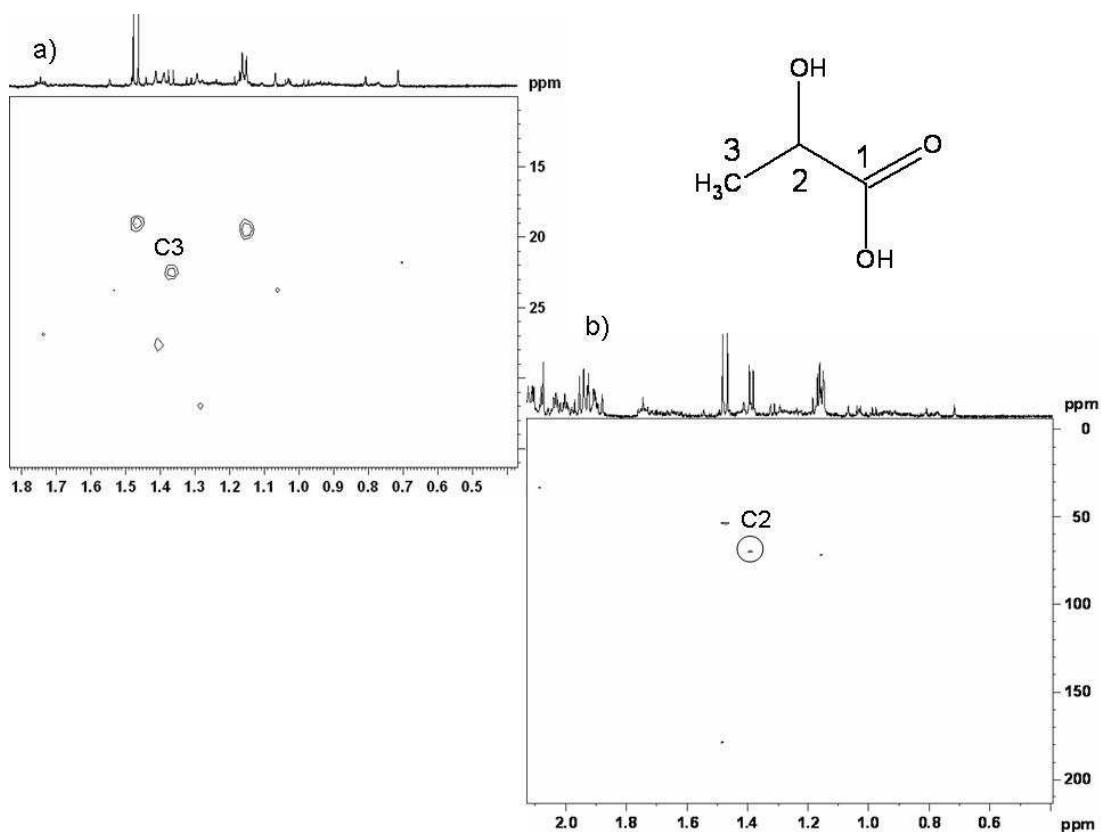


Figura 5.7 – a) Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (D_2O , 500 Mhz) do ácido láctico; b) Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (D_2O , 500 Mhz) do ácido láctico.

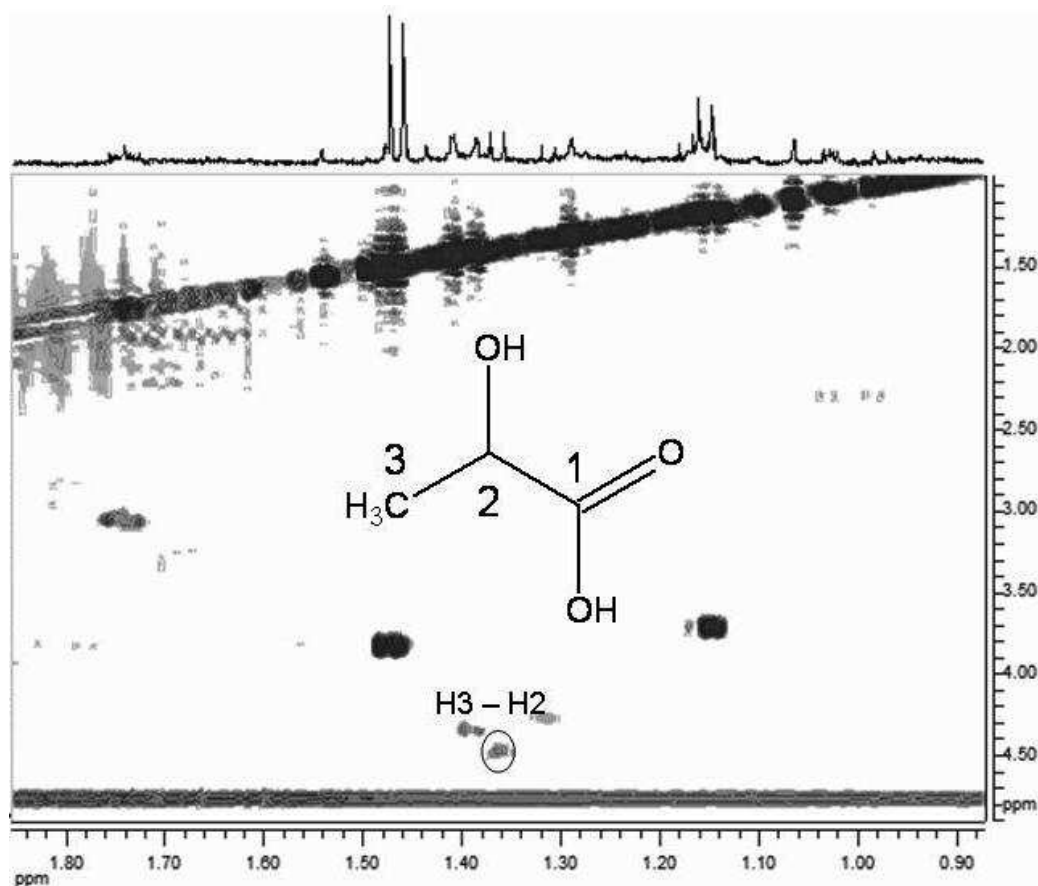


Figura 5.8 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gCOSY (D_2O , 500 Mhz) do ácido láctico.

5.1.4. ÁCIDO CÍTRICO

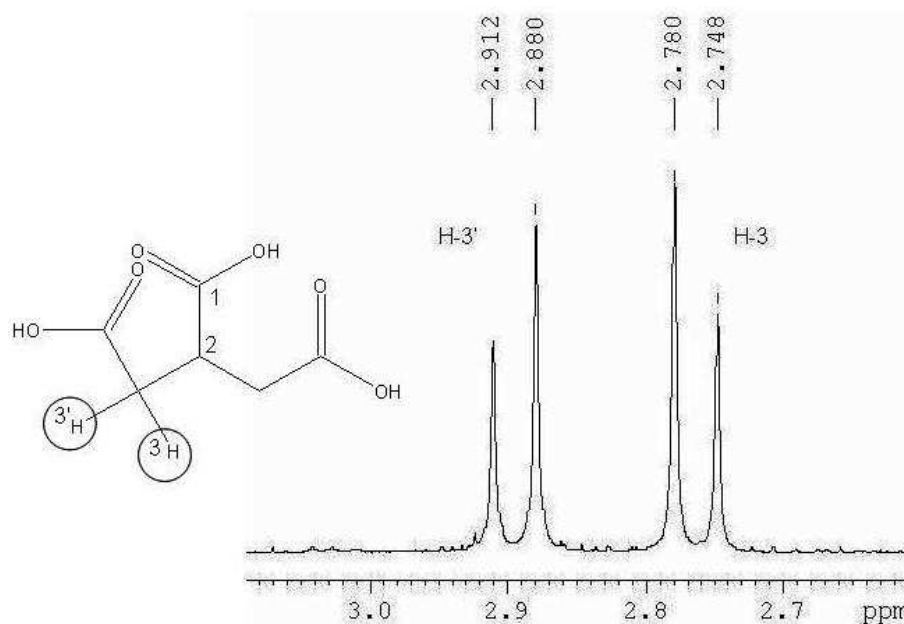


Figura 5.9 – Espectro de RMN de ^1H do ácido cítrico (D_2O , 500 Mhz).

Tabela 7 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido cítrico.

Posição	Identificado ^a		CALIGIANI <i>et al.</i> , 2007 ^b
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)	$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)
3 - CH	46,8	2,76 (d, 15,2)	3.02 (d, 15,83)
3 - CH'		2,90 (d, 15,2)	2,87 (d, 15,83)

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O).

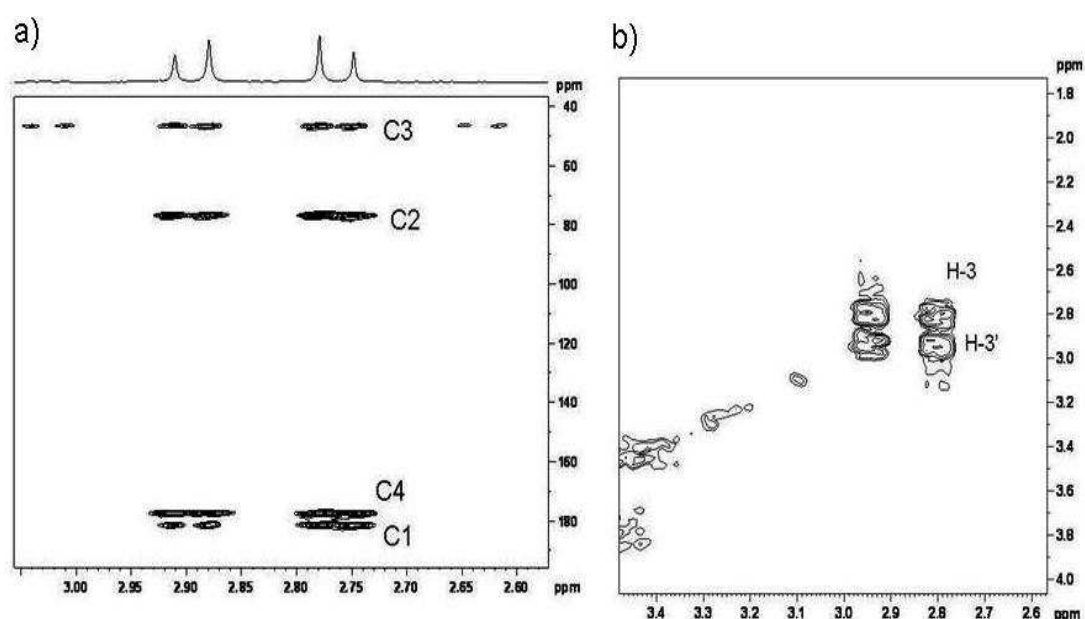


Figura 5.10 –a) Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *gHMBC* (D_2O , 500 Mhz) do ácido cítrico; Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de *gCOSY* (D_2O , 500 Mhz) do ácido cítrico.

5.1.5. ETANOL

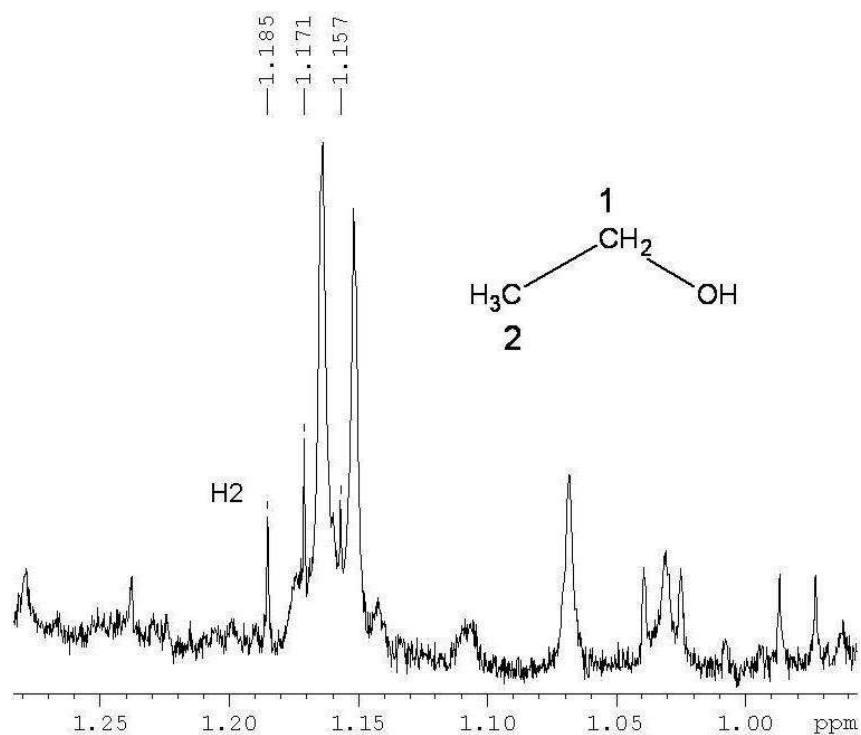


Figura 5.11 – Espectro de RMN de ^1H do etanol (D_2O , 500 Mhz).

Tabela 8 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do etanol.

Posição	Identificado ^a		Caligiani <i>et al.</i> , 2007 ^b
	δ C	δ H (multiplicidade, J Hz)	δ H (multiplicidade, J Hz)
C2	19,2	1,17 (t, 7,10)	1,17 (t, 7,09)
C1	71,7	c	e

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^c sobreposto pelos sinais das outras substâncias; ^e - sinal não reportado.

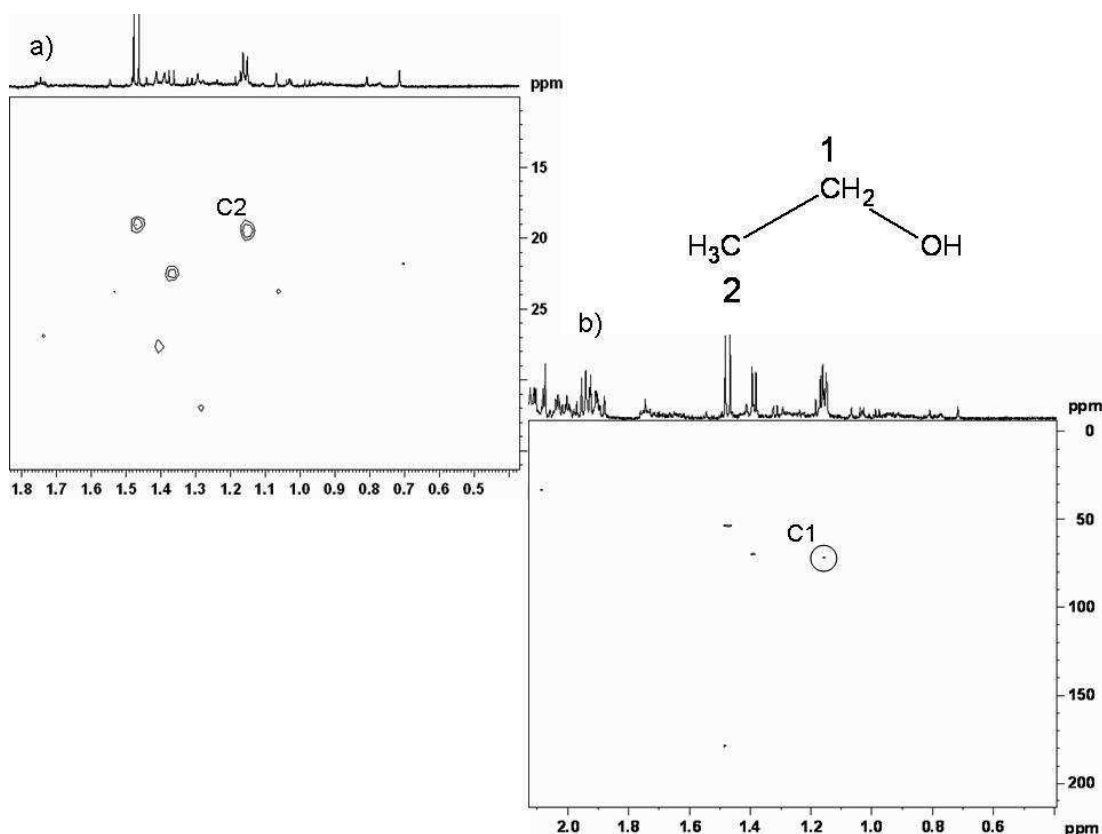


Figura 5.12 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (D_2O , 500 Mhz) do etanol; b) Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (D_2O , 500 Mhz) do etanol.

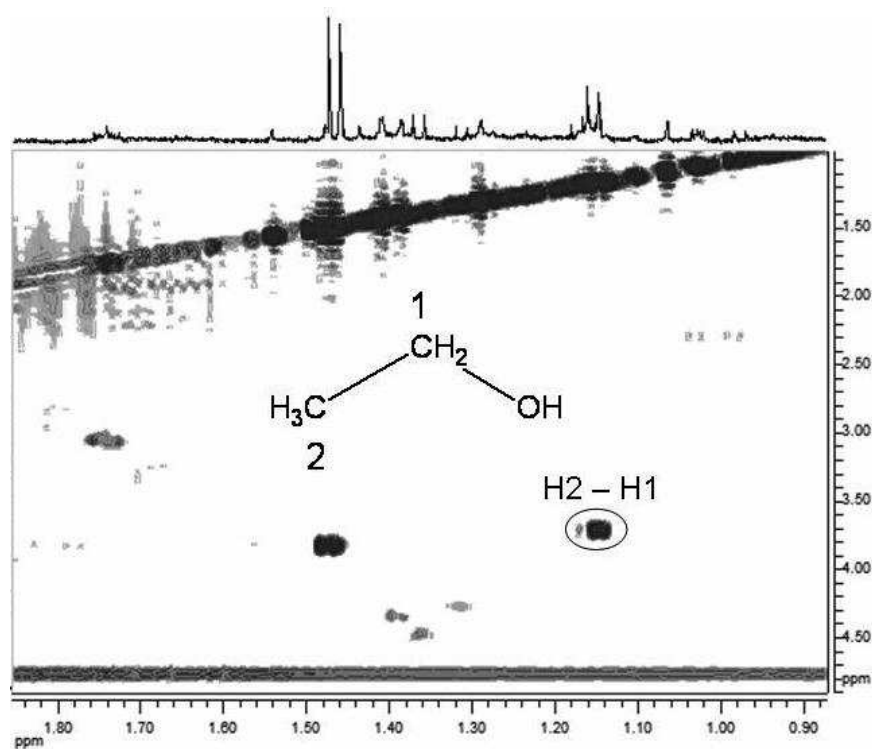


Figura 5.13 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gCOSY (D_2O , 500 Mhz) do etanol.

5.2. COMPOSTOS DOS EXTRATOS

5.2.1. PROLINA

Em virtude da dificuldade de visualização dos sinais do RMN de ^1H da prolina (Figura 5.14), por razão das sobreposições e por se tratar de multipletos e, portanto, sem informação adicional (acoplamentos), o espectro de ^1H não se encontra indicado. Contudo, a partir dos dados bidimensionais de *g*TOCSY (no *g*HMBC não foi possível verificar as correlações de interesse) e de *g*HSQC, foram realizadas algumas atribuições que estão representadas na Tabela 9.

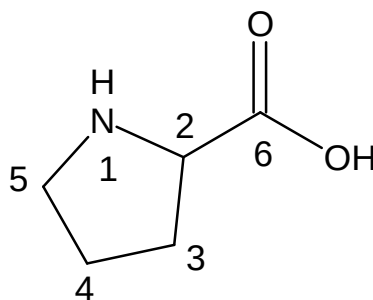


Figura 5.14 - Prolina.

Tabela 9 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do prolina.

Posição	Identificado ^a			LIU <i>et al</i> , 2010 ^b	
	δ C	δ H (multiplicidade, J Hz)		δ H (multiplicidade, J Hz)	
C2	61,7	3,98 (c)		4,08 (dd, 8,6; 6,4)	
C5	46,4	3,38 (c)		3,41 (m)	
C3	29,0	2,34 (m)		2,34 (m)	
C4	24,8	2,01 (m)		2,01 (m)	

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD) ; ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD) ; ^c sobreposto pelos sinais das outras substâncias.

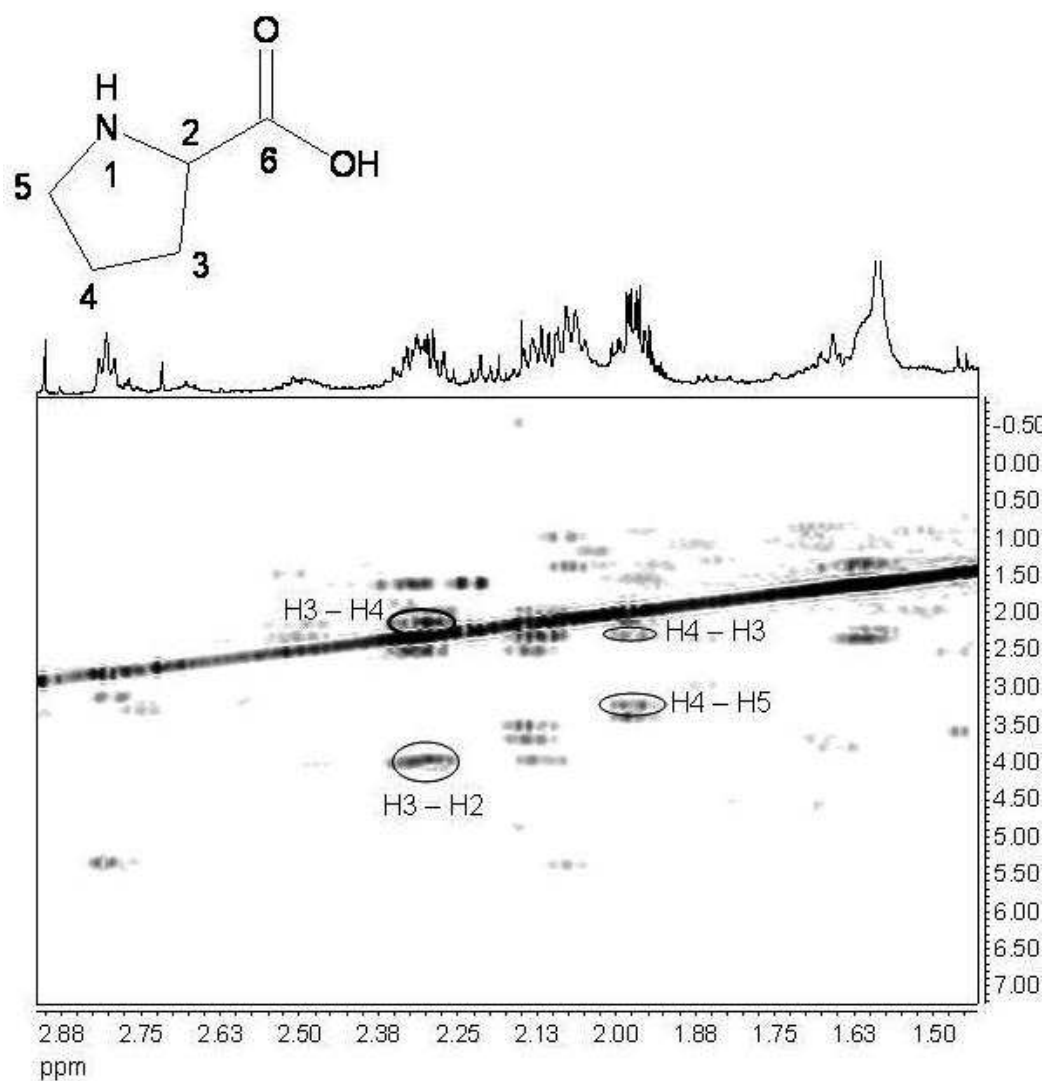


Figura 5.15 – Correlações à longa distância ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de $g\text{TOCSY}$ (MeOD, 500 Mhz) da prolina.

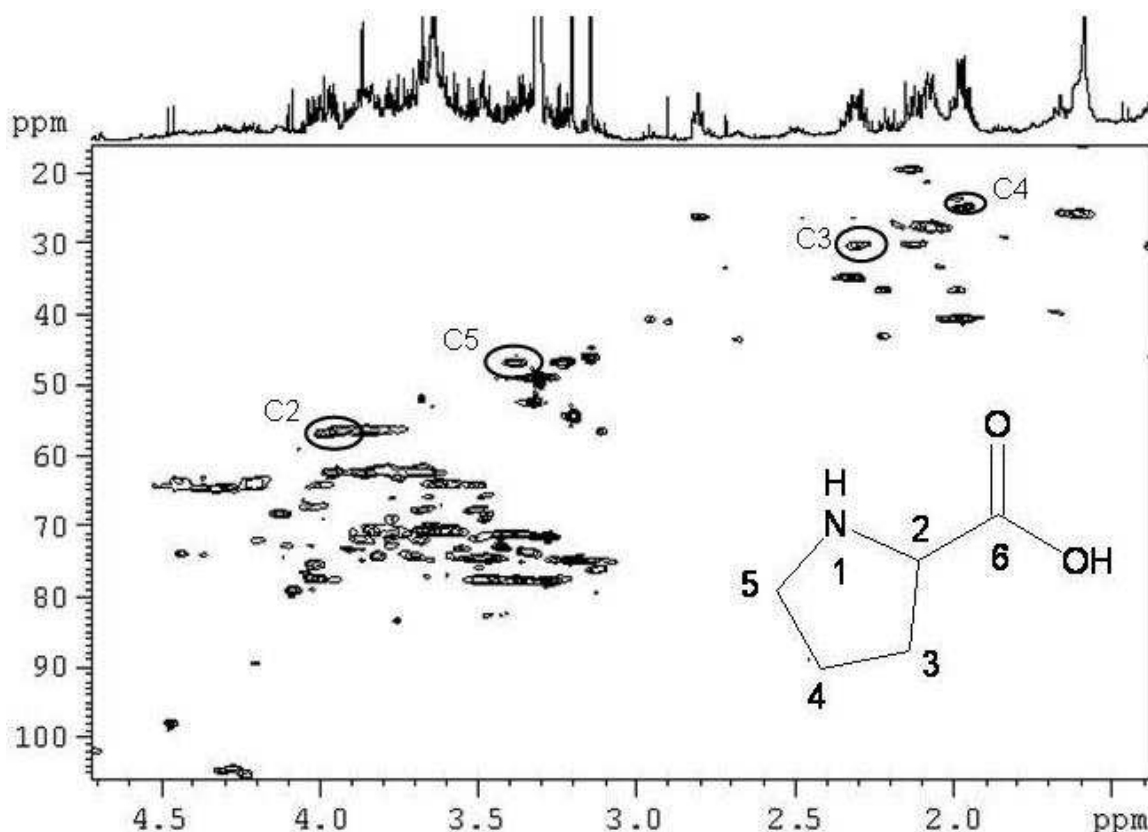


Figura 5.16 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (MeOD, 500 Mhz) da prolina.

5.2.2. ÁCIDO α -AMINO BUTÍRICO (AABA)

Os conjuntos de sinais observados nos experimentos de RMN uni e bidimensionais foram conclusivos para a proposta estrutural. Uma dificuldade adicional foi encontrada com a inobservância de dados confirmativos na literatura. Todavia, o deslocamento químico esperado para o sinal em 2,22 ppm (H_2 ; t, 7,67) seria em torno de 3,0 a 4,0 ppm. Contudo, sua ocorrência em regiões mais blindadas do espectro se deve ao fato da presença do cone de proteção que causa um efeito anisotrópico sobre o H_2 .

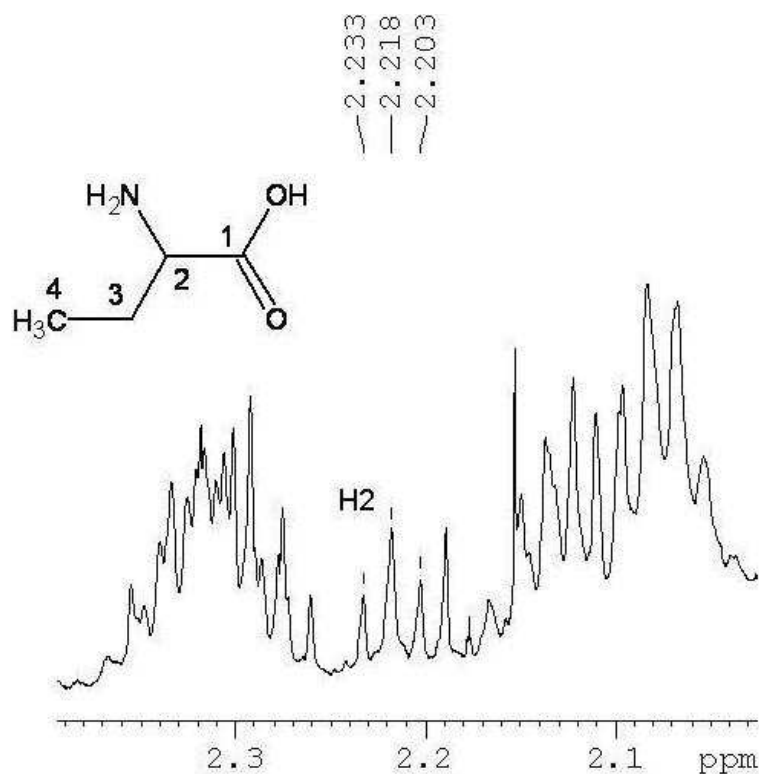


Figura 5.17 – Espectro de RMN de ^1H do ácido α -amino butírico (AABA) (MeOD, 500 Mhz).

Tabela 10 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido α -amino butírico (AABA).

Posição	Identificado ^a	
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)
C4	23,6	1,30 (c)
C3	20,2	1,60 (c)
C2	42,8	2,22 (t, 7,67)
C1	172,2	-

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD) ; ^c - sobreposto pelos sinais das outras substâncias.

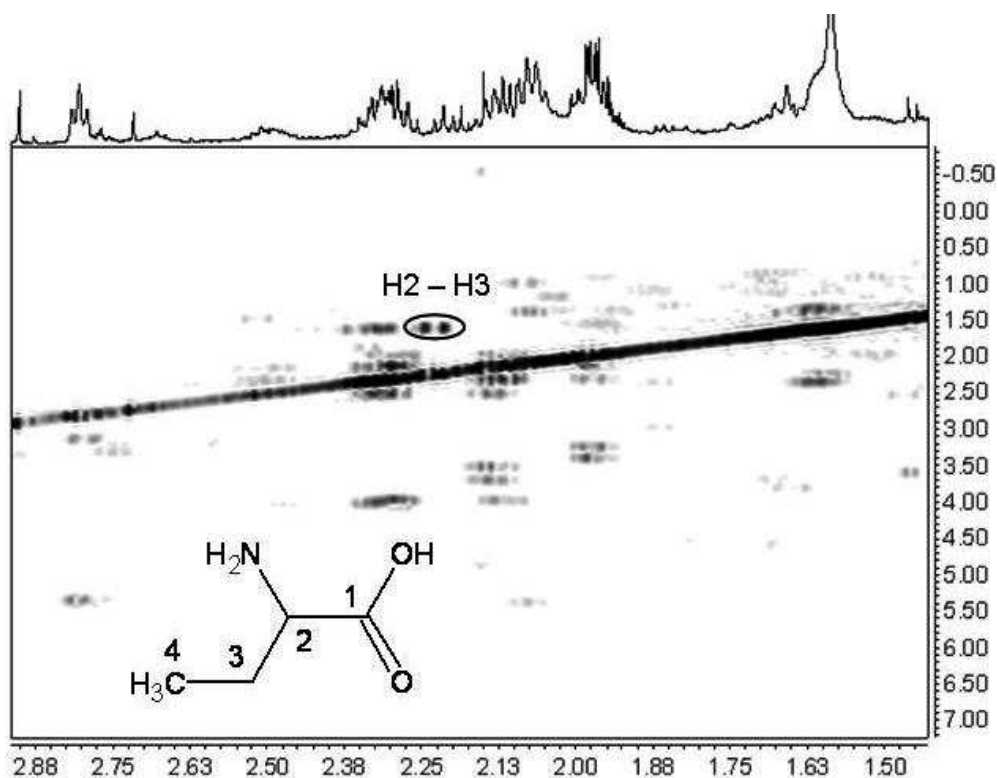


Figura 5.18 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gCOSY (MeOD, 500 Mhz) do ácido α -amino butírico (AABA).

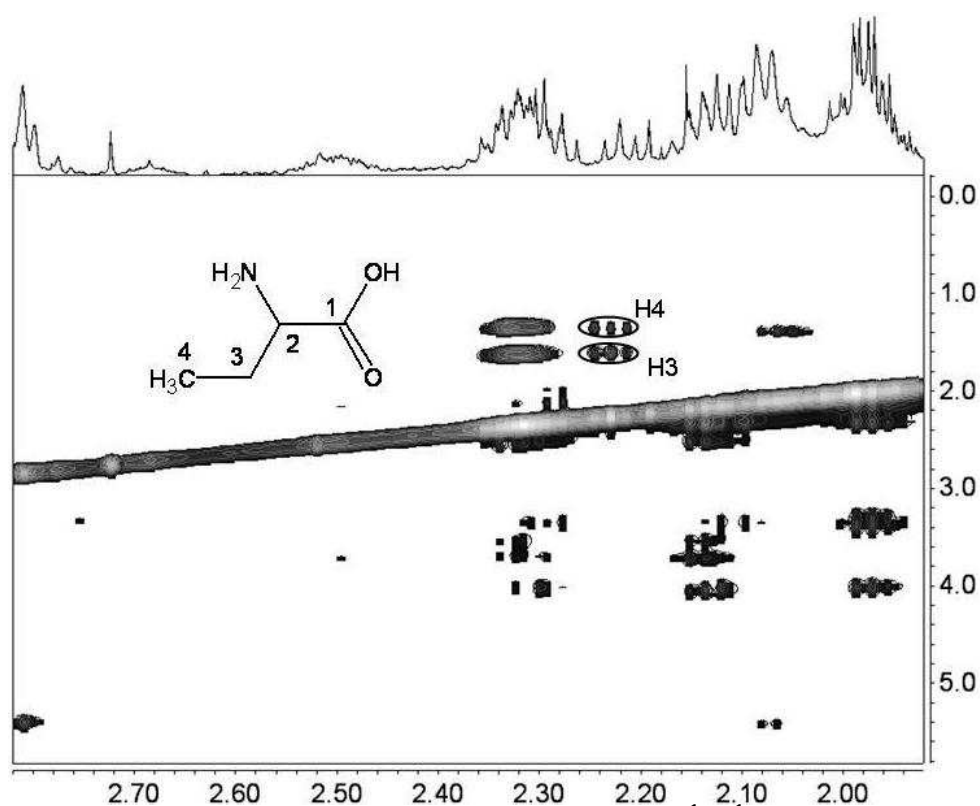


Figura 5.19 – Correlações à longa distância ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gTOCSY (MeOD, 500 Mhz) do ácido α -amino butírico (AABA).

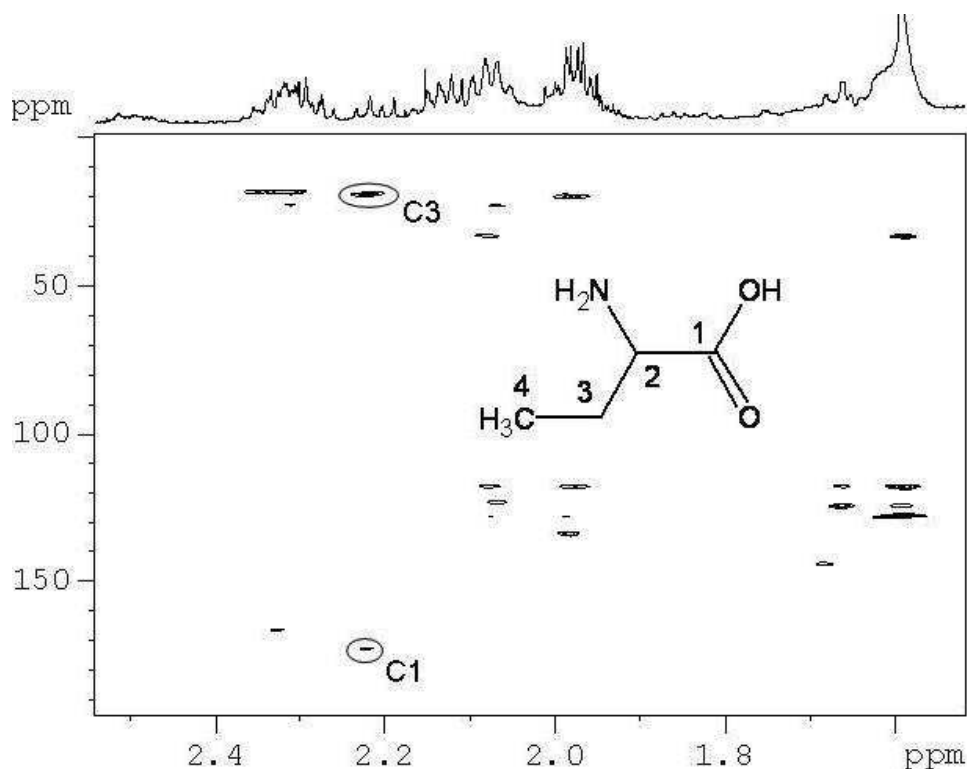


Figura 5.20 – Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (MeOD, 500 Mhz) do ácido α -amino butírico (AABA).

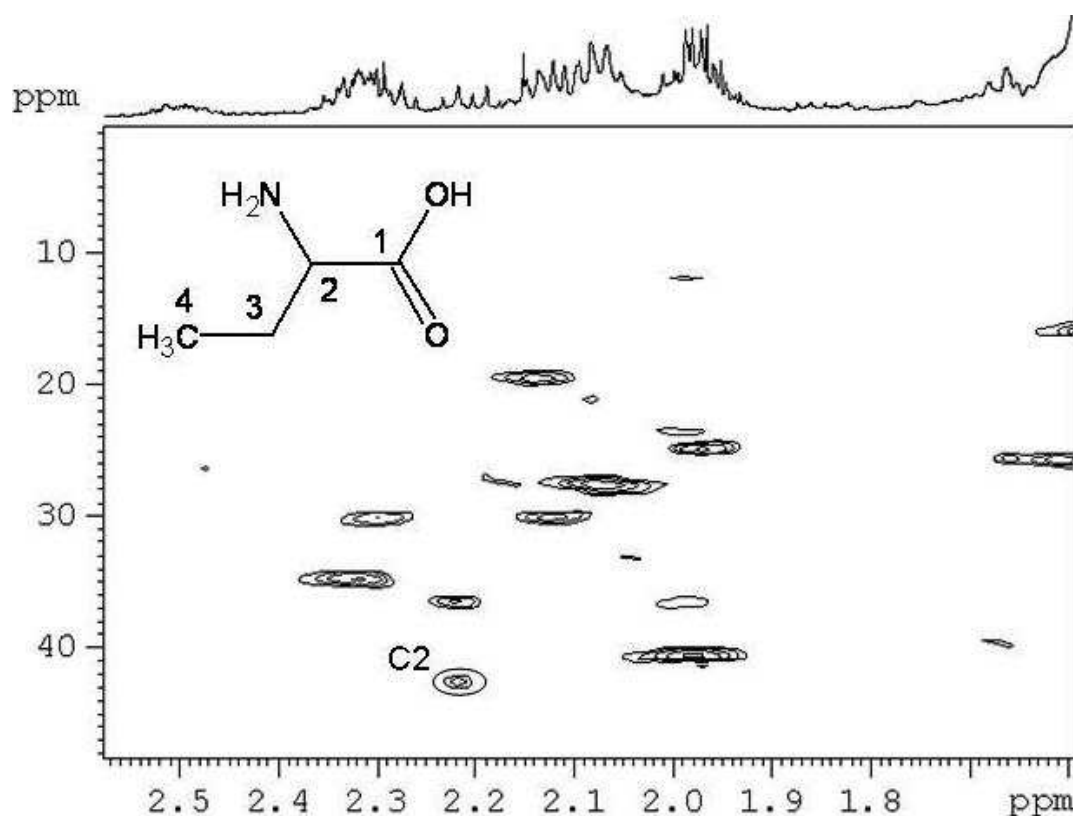


Figura 5.21 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (MeOD, 500 Mhz) do ácido α -amino butírico (AABA).

5.2.3. ARGININA

Em virtude das sobreposições, o espectro de RMN de ^1H da arginina (Figura 5.22) não está apresentado. Contudo, a partir dos dados bidimensionais, foram realizadas atribuições que estão representadas na Tabela 11.

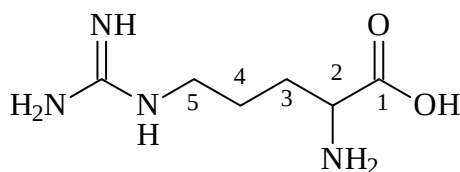


Figura 5.22 – Arginina.

Tabela 11 – Dados espectrais de ^1H e ^{13}C da arginina.

Posição	Identificado ^a		NORD <i>et al.</i> , 2004 ^b
	δ C	δ H (multiplicidade, J Hz)	δ H (multiplicidade, J Hz)
C2	57,1	3,95 (c)	3,90 (t, 6,2)
C3	26,8	2,28 (c)	1,95 (m)
C4	23,9	1,93 (c)	1,75 (m)
C5	-	3,35 (c)	3,25 (m)

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD) ; ^b – RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD) ; ^c Sobreposto pelos sinais das outras substâncias.

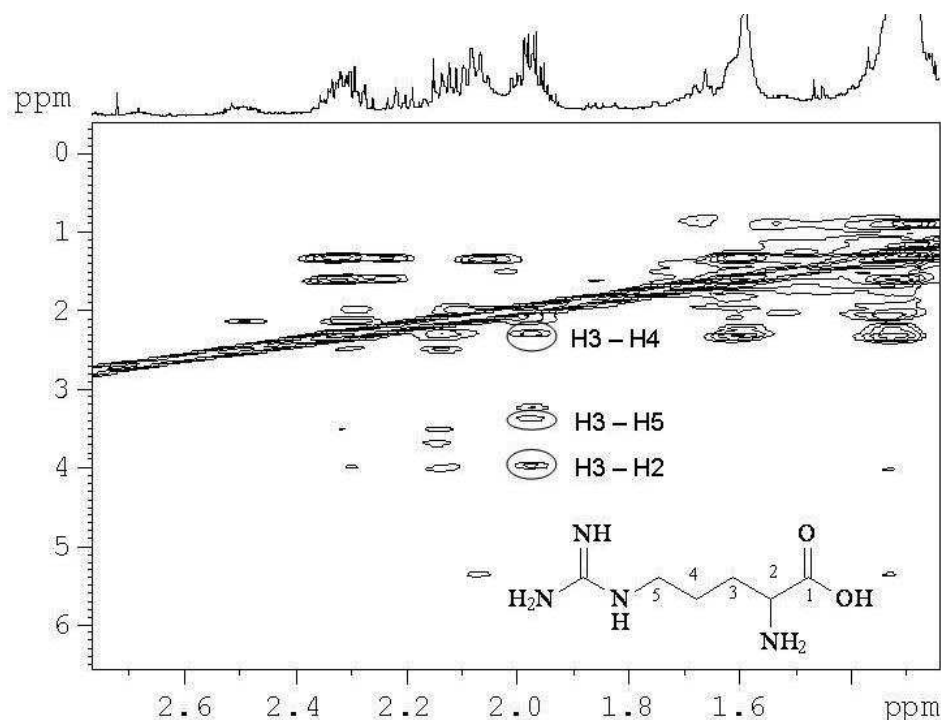


Figura 5.23 – Correlações à longa distância ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de *g*TOCSY (MeOD, 500 Mhz) da arginina.

5.2.4. ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO (GABA)

Em virtude das sobreposições, o espectro de RMN de ^1H do ácido γ -amino butírico (Figura 5.24) não está indicado. A partir dos dados bidimensionais de *g*TOCSY e de *g*HMBC, foram realizadas algumas atribuições aproximadas que estão representadas na Tabela 12.

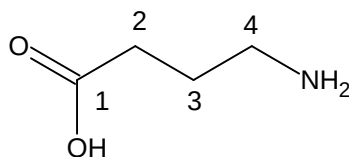


Figura 5.24 – Ácido γ -amino butírico.

Tabela 12 – Dados espectrais de ^1H e ^{13}C do ácido γ -amino butírico.

Posição	Identificado ^a		GOVINDARAJU <i>et al.</i> , 2000 ^b
	δ C	δ H (multiplicidade, J Hz)	δ H (multiplicidade, J Hz)
C4	d	2,12 (c)	2,28 (t, 7,75)
C3	17,5	1,95 (c)	1,88 (m)
C2	39,1	3,3 (c)	3,01 (m)
C1	166,2	-	-

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD) ; ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^c encoberto pelos sinais das outras substancias; ^d - Não aparece no experimento de gHMBC.

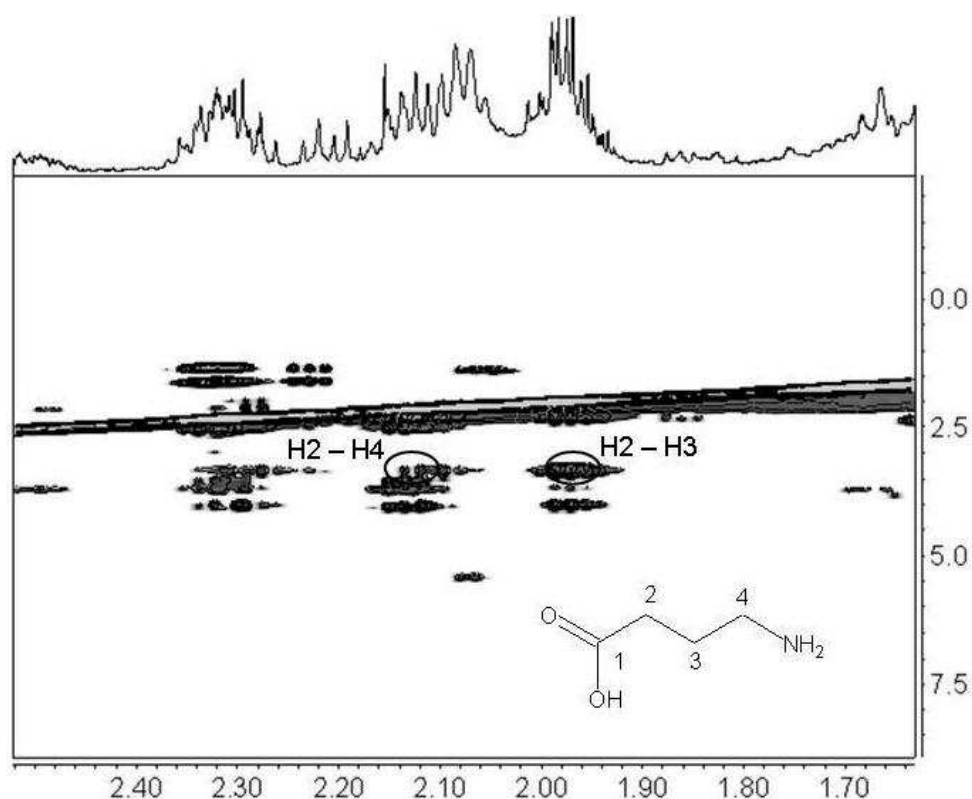


Figura 5.25 – Correlações à longa distância ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gTOCSY (MeOD, 500 Mhz) do ácido γ -amino butírico (GABA).

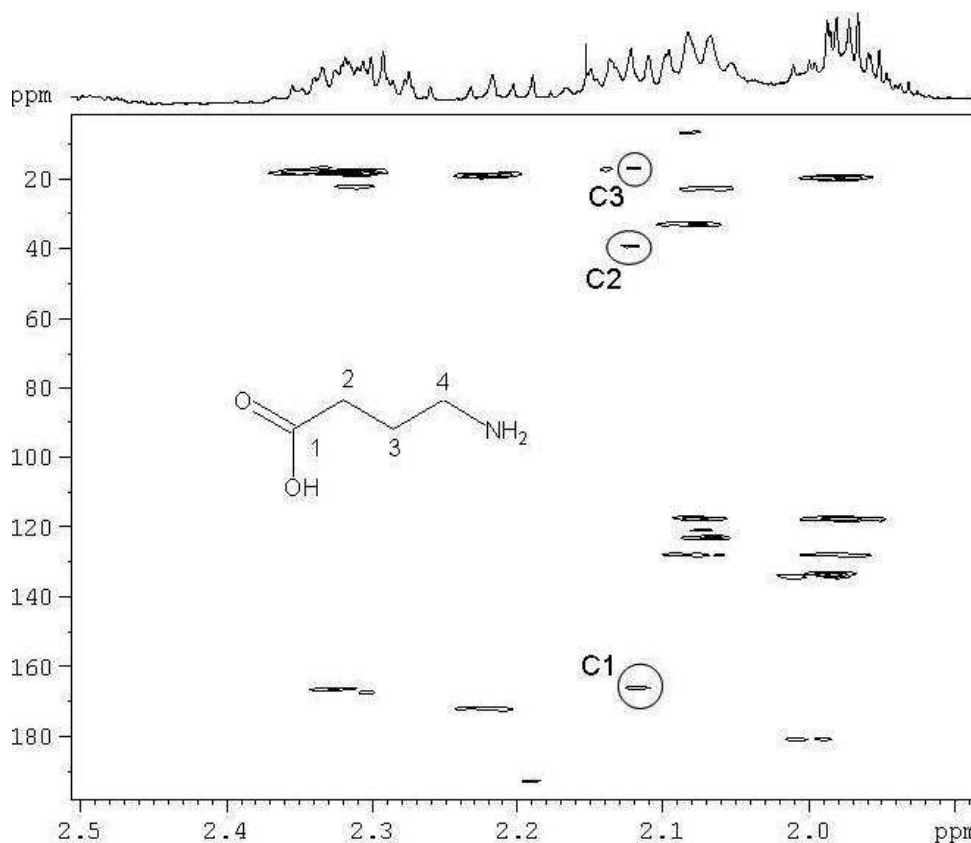


Figura 5.26 – Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (MeOD, 500 Mhz) do ácido γ -amino butírico (GABA).

5.2.5. NOBELETINA

A Nobeletina (Figura 5.27) é um composto que contém um anel flavonoídico substituído majoritariamente por metoxilas, havendo assim poucos sinais referentes a esta estrutura no espectro de RMN de ^1H . Além disto, em função de sua baixa concentração, muitos sinais não são passíveis de visualização. No entanto, algumas correlações confirmativas foram expostas nos experimentos bidimensionais e, juntamente com as atribuições esperadas concebidas no gHSQC, auxiliaram na construção da Tabela 13. Sendo assim, uma classe de compostos (já descritos em *Citrus*), com esqueletos moleculares similares, puderam ser identificados, como se segue a diante.

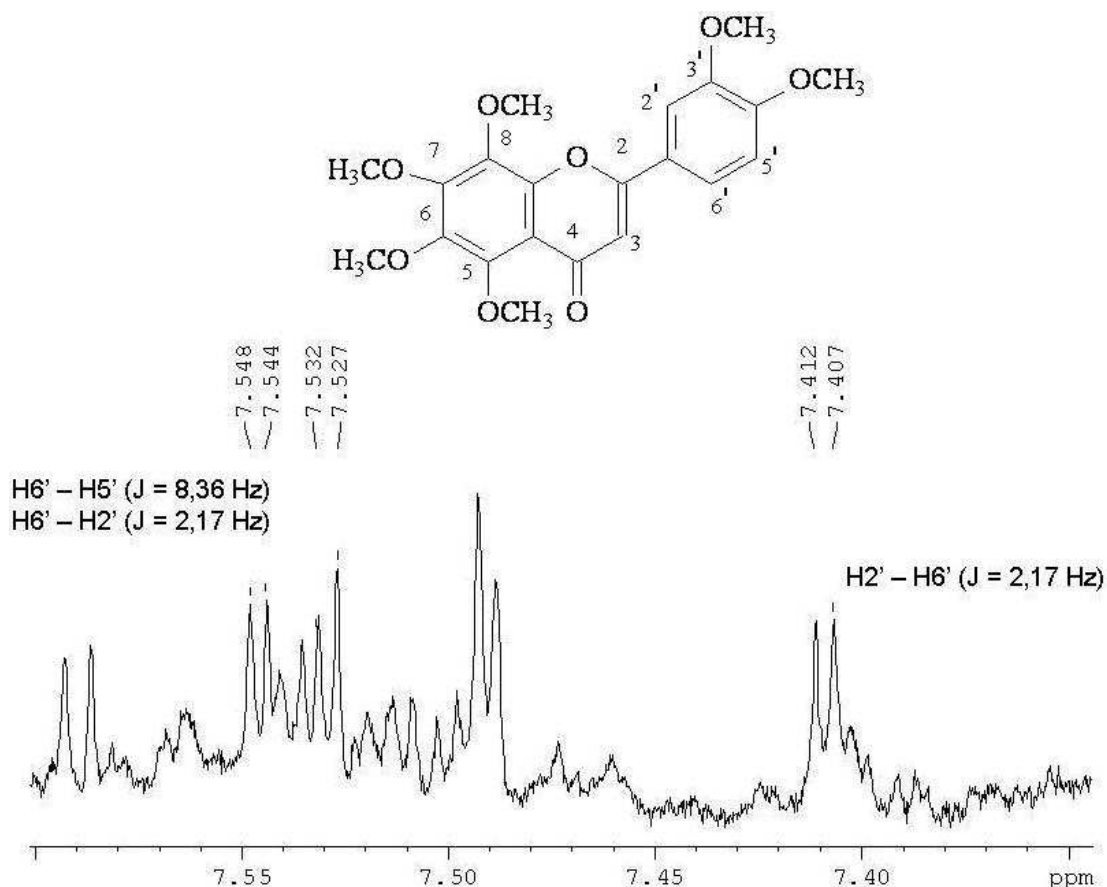


Figura 5.27 – Espectro de RMN de ^1H da nobeletina (MeOD, 500 Mhz).

Tabela 13 – Dados espectrais de ^1H e ^{13}C da nobeletina.

Posição	Identificado ^a NAGASE <i>et al.</i> , 2005 ^b		
	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)	$\delta \text{ H}$ (multiplicidade, J Hz)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	3,93 (s)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	3,94 (s)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	3,96 (s)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	4,01 (s)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	4,08 (s)
C2	103,8	6,613 (s)	6,59 (s)
C9'	d	7,08 (d, 8,75)	6,97 (d, 8,5)
C6'	d	7,41 (d, 2,29)	7,39 (d, 2,1)
C2'	d	7,53 (dd, 8,36; 2,17)	7,55 (dd, 8,5; 2,1)

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD); ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O); ^d - Não aparece no experimento de gHMBC e gHSQC; ^e - Região provável, com alta incidência de sinais.

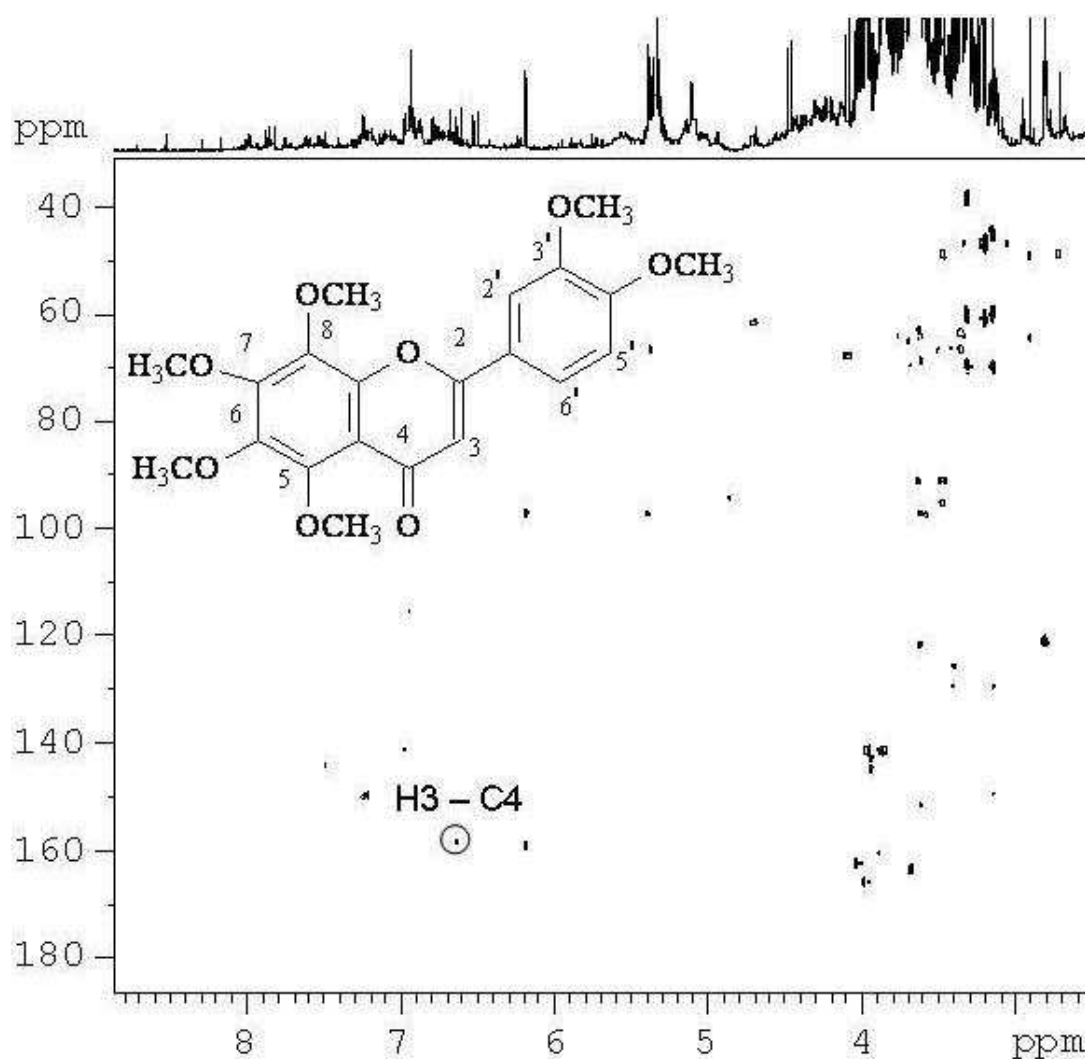


Figura 5.28 – Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (MeOD, 500 Mhz) da nobeletina.

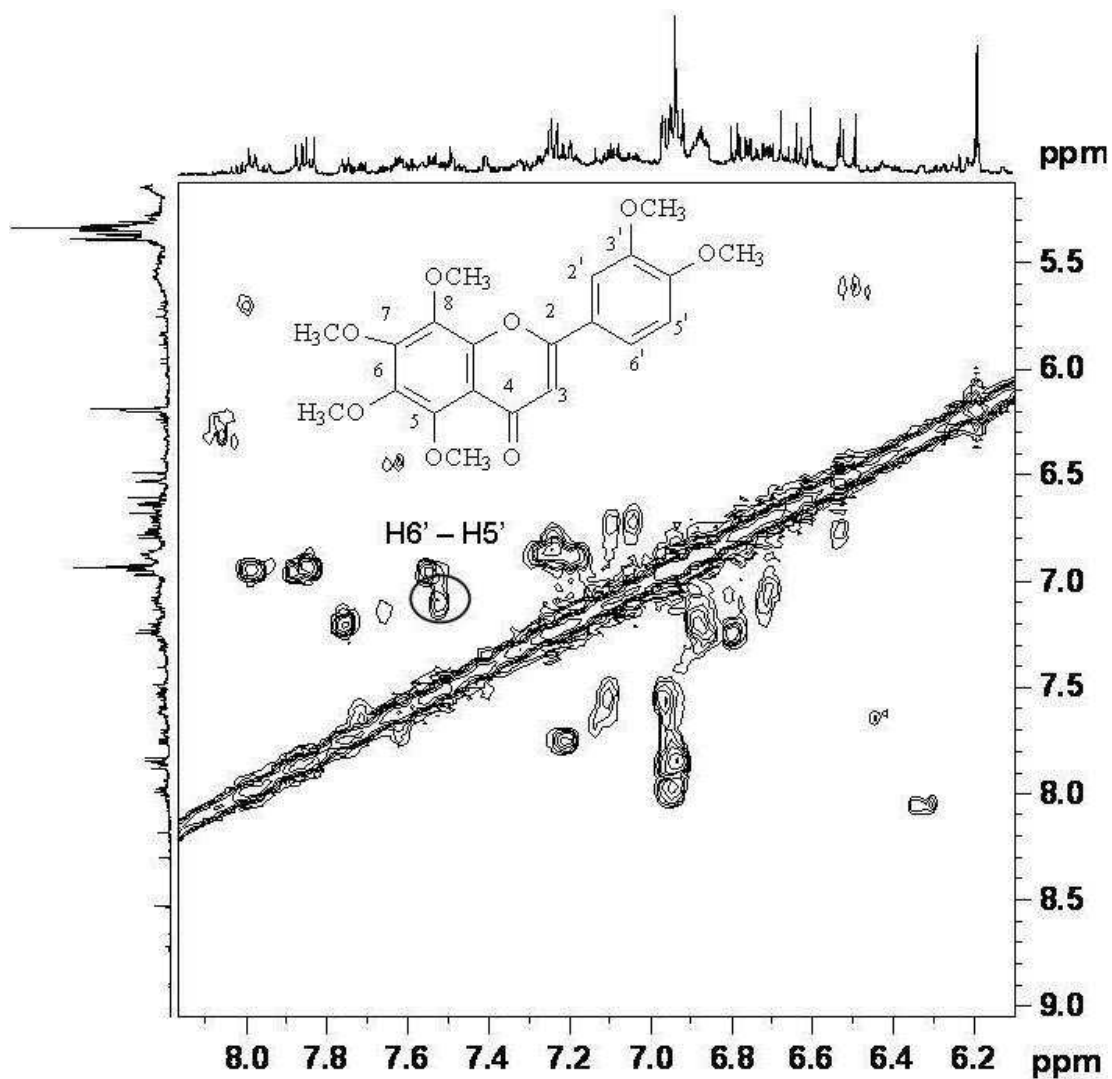


Figura 5.29 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gCOSY (MeOD, 500 Mhz) da nobeletina.

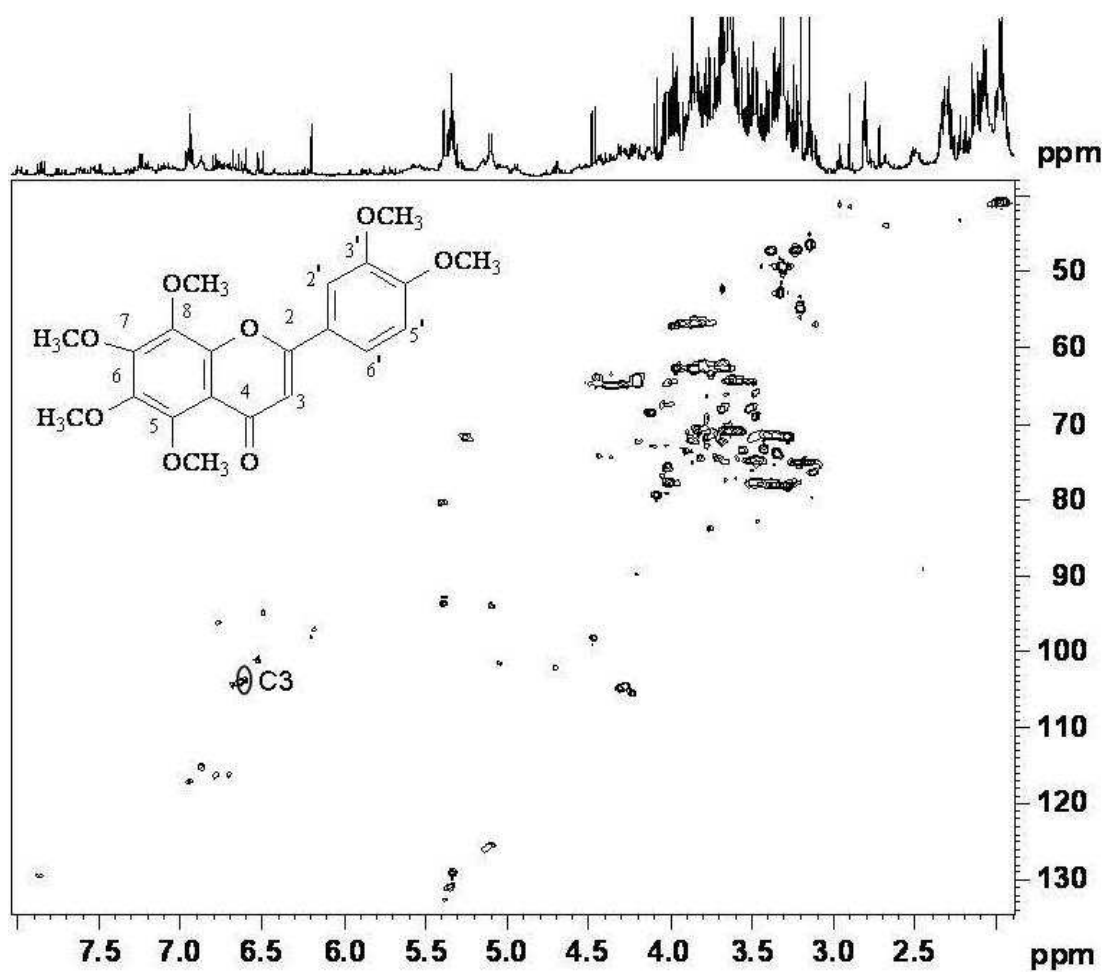


Figura 5.30 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (MeOD, 500 Mhz) da nobeletina.

5.2.6. TANGERETINA E DIMETOXI TANGERETINA

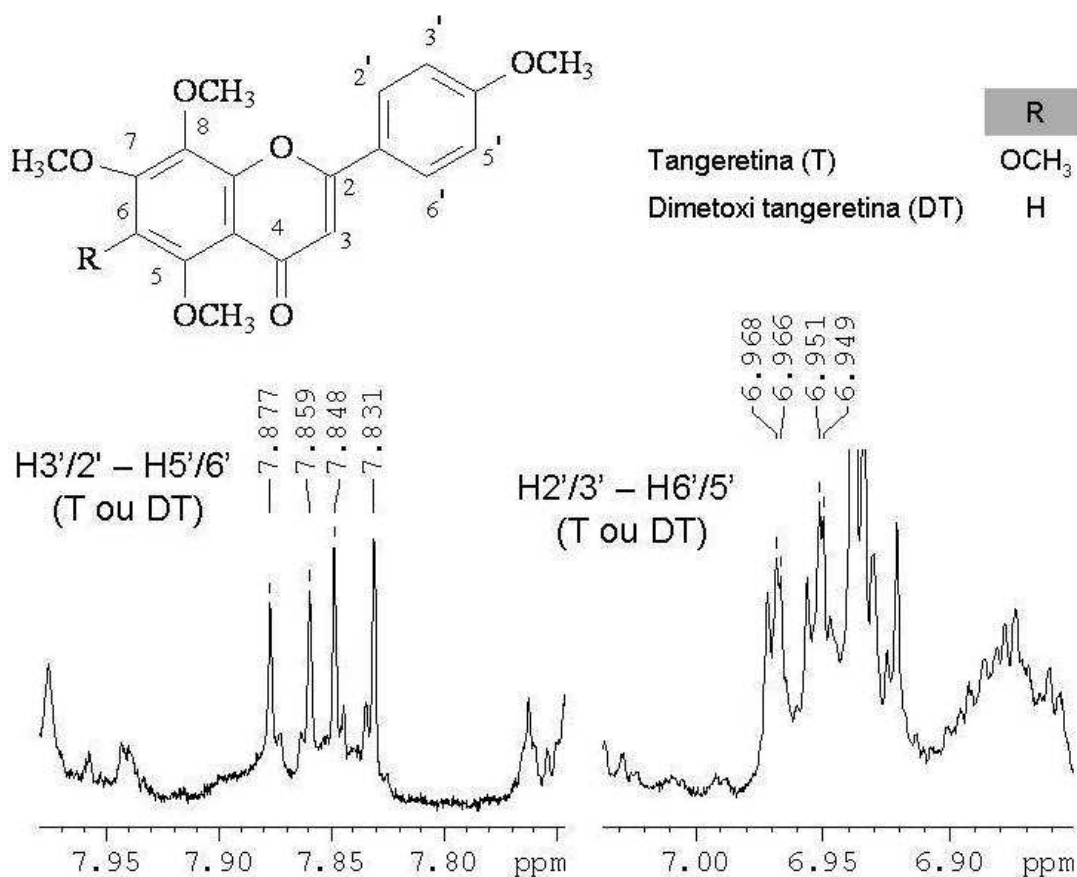


Figura 5.31 – Espectro de RMN de ^1H da tangeretina (T) e da dimetoxi tangeretina (DT) (MeOD, 500 Mhz).

Tabela 14 – Dados espectrais de ^1H e ^{13}C da tangeretina e da dimetoxi tangeretina.

Posição	Identificado ^a		NAGASE <i>et al.</i> , Tangeretina		2005 ^b Dimetoxi tangeretina
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (multip., J Hz)	Dimetoxi tangeretina $\delta\text{ H}$ (multip., J Hz)	$\delta\text{ H}$ (multip., J Hz)	$\delta\text{ H}$ (multip., J Hz)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	3 a 5 (e)	3,88 (s)	3,87(s)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	3 a 5 (e)	3,94 (s)	3,94 (s)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	3 a 5 (e)	4,02 (s)	3,97 (s)
-	50 a 70 (e)	3 a 5 (e)	3 a 5 (e)	4,09 (s)	3,99 (s)
C3	101,1	6,53 (s)	6,52 (s)	6,59 (s)	6,43 (s)
C6	95,0	-	6,49 (s)	-	6,58 (s)
C6'/C2'	117,2	6,93 (d, 8,8)	6,95 (d, 8,8)	7,02 (d, 8,9)	7,01 (d, 9,0)
C5'/C3'	129,5	7,84 (d, 8,9)	7,86 (d, 8,9)	7,87 (d, 8,9)	7,87 (d, 9,0)

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD) ; ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^d - Não aparece no experimento de gHMBC e gHSQC; ^e - Região provável, com alta incidência de sinais.

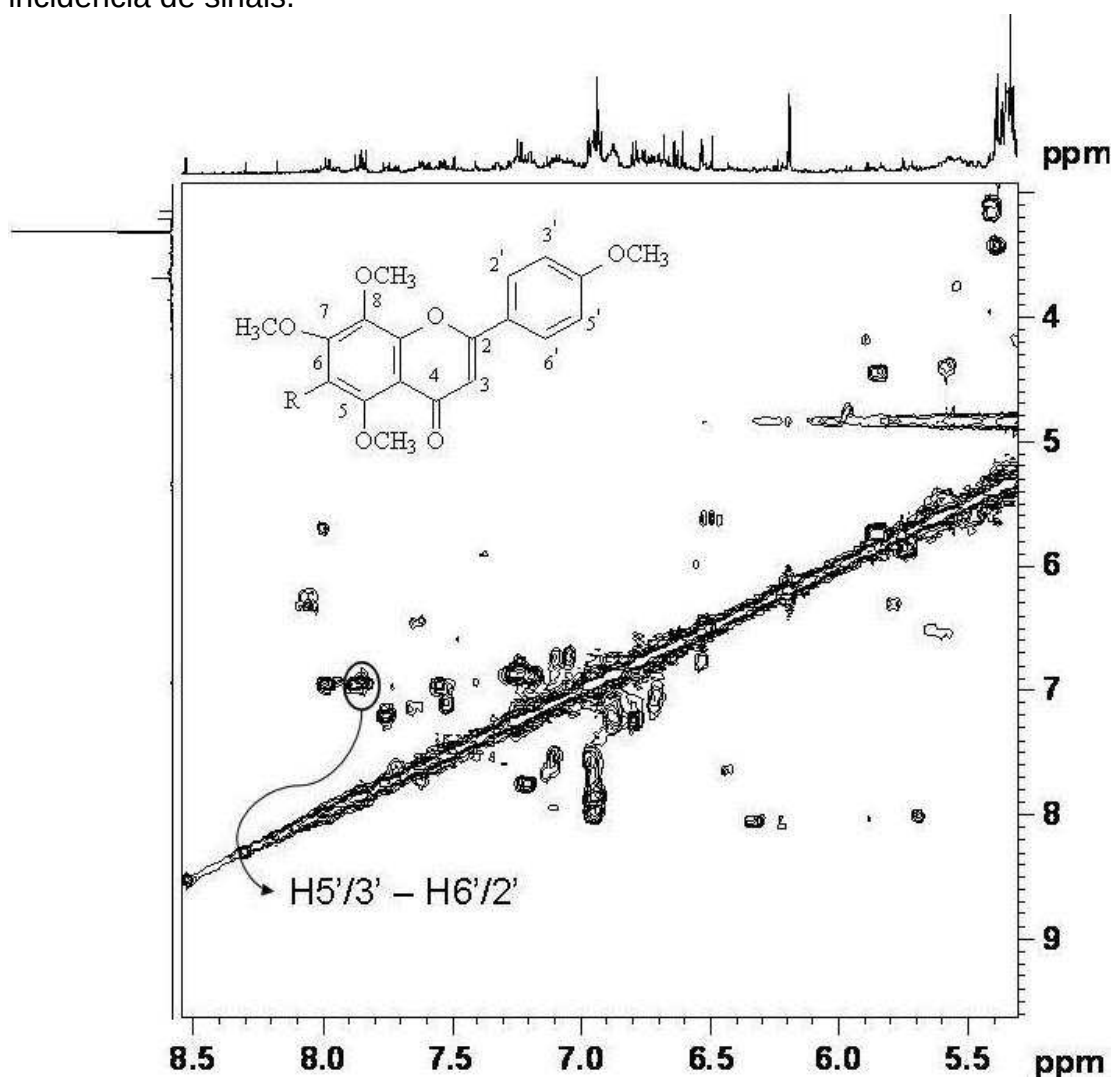


Figura 5.32 – Correlações ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gCOSY (MeOD, 500 Mhz) da tangeretina (T) e da dimetoxi tangeretina (DT).

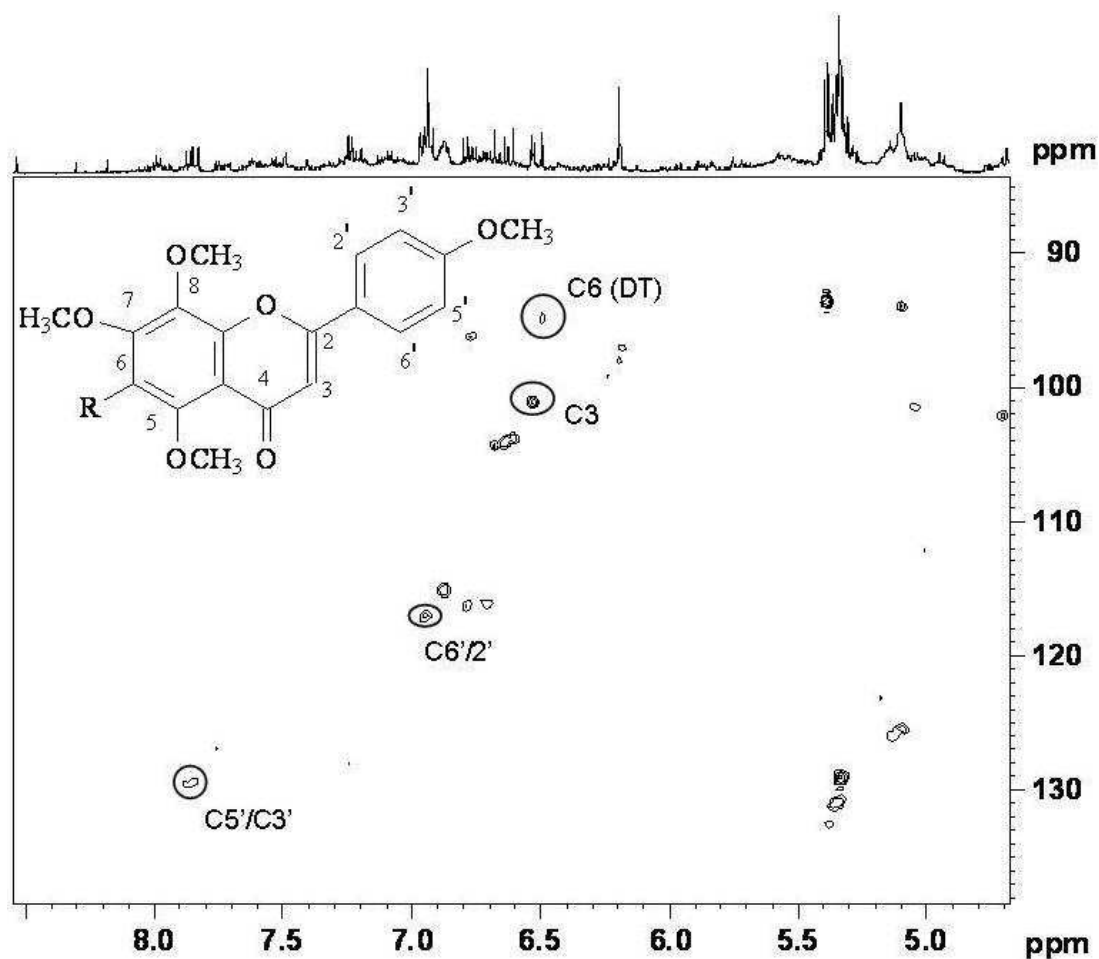


Figura 5.33 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (MeOD, 500 Mhz) da tangeretina (T) e da dimetoxi tangeretina (DT).

5.2.7. HESPERIDINA

A determinação da estrutura da hesperidina, apesar de citada no texto, ainda não pode ser considerada conclusiva já que os existe uma dificuldade de visualizar seus sinais nos experimentos bidimensionais.

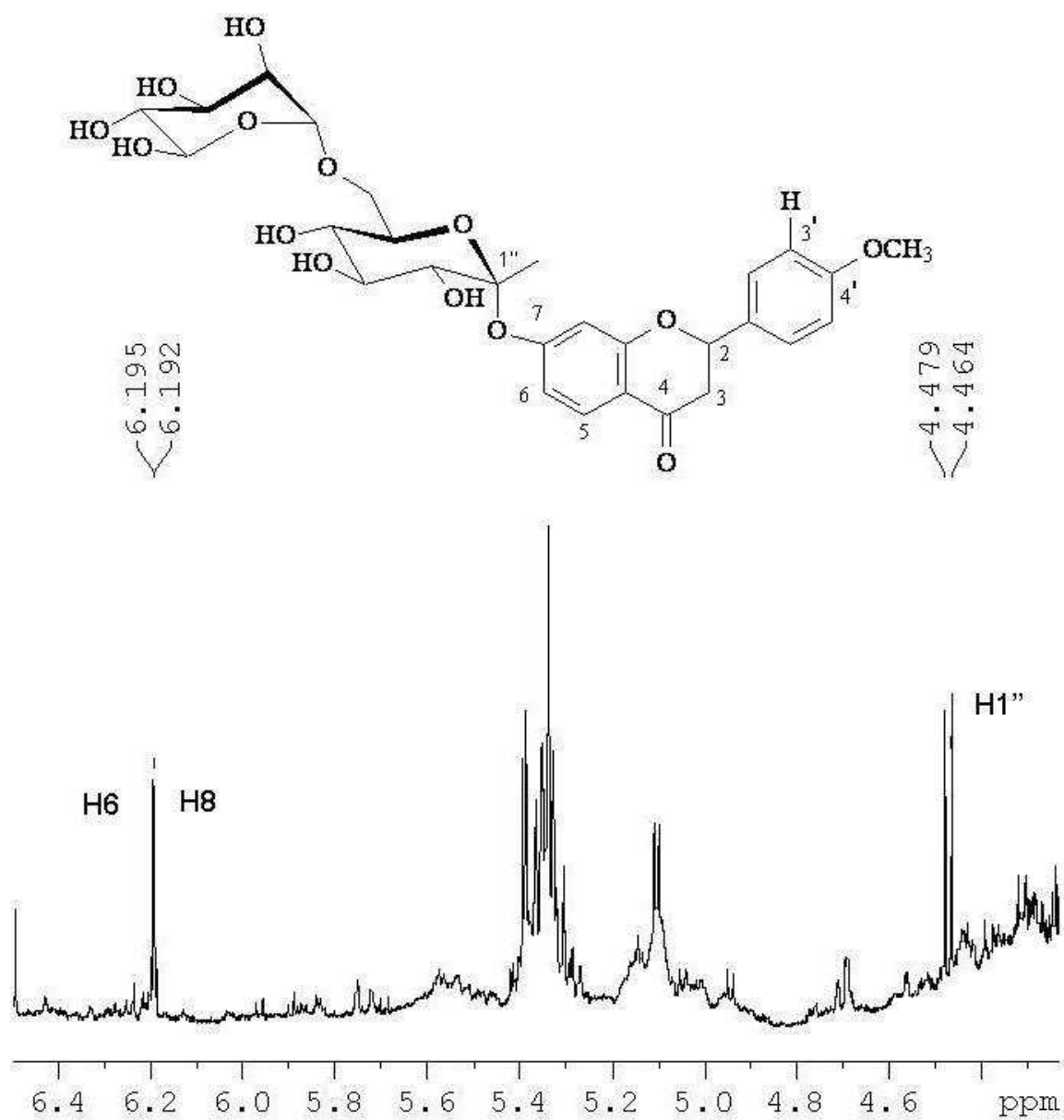


Figura 5.34 – Espectro de RMN DE ^1H da hesperidina (MeOD, 500 Mhz).

Tabela 15 – Dados espectrais de ^1H e ^{13}C da hesperidina.

Numeração	Identificado ^a	MOCCELINI <i>et al</i> , 2009
	δ H (multiplicidade, J Hz)	δ H (multiplicidade, J Hz)
-	c	2,77 (dd, 3,11; 15,11)
-	c	3,07 (dd, 13,8; 12,0)
-	3 a 5 (e)	3,09 a 3,86
-	3 a 5 (e)	3,77 (s)
	4,47 (d, 7,6)	4,52 (d, 7,38)
-	5,35 (c)	5,49 (dd, 3,11; 12,18)
2	6,192 (s)	6,12 (sl)
9	6,195 (s)	6,15 (sl)
2'/5'/6'	6,93 (m)	6,92 (m)

^a - RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD); ^b - RMN de ^1H e ^{13}C (D₂O); ^c - Sinal encoberto; ^d - Não aparece no experimento de *g*HMBC e *g*HSQC; ^e - Região provável, com alta incidência de sinais.

5.3. COMPOSTOS DAS CASCAS DA LARANJA OBTIDOS POR HR-MAS

Na Figura 5.35, há a representação do RMN de ^1H das cascas de laranja e na Figura 5.36 há o HSQC obtido e na Figura 5.37, há o HMBC das cascas de laranja doente lesionada e ambos geram os dados obtidos, apresentados na Tabela 16. Os experimentos bidimensionais foram realizados para todas as amostras (sadia, doente sem lesões e doente lesionada) e a escolha das figuras apresentadas se deu em função das melhores correlações visualizadas. Contudo os experimentos que se apresentaram demasiadamente demorados (HSQC – 17h; HMBC – 20h) e com informações insuficientes para identificações mais exatas, os quais foram somente constatados a presença de dois alcenos (M1 e M2) Tabela 16.

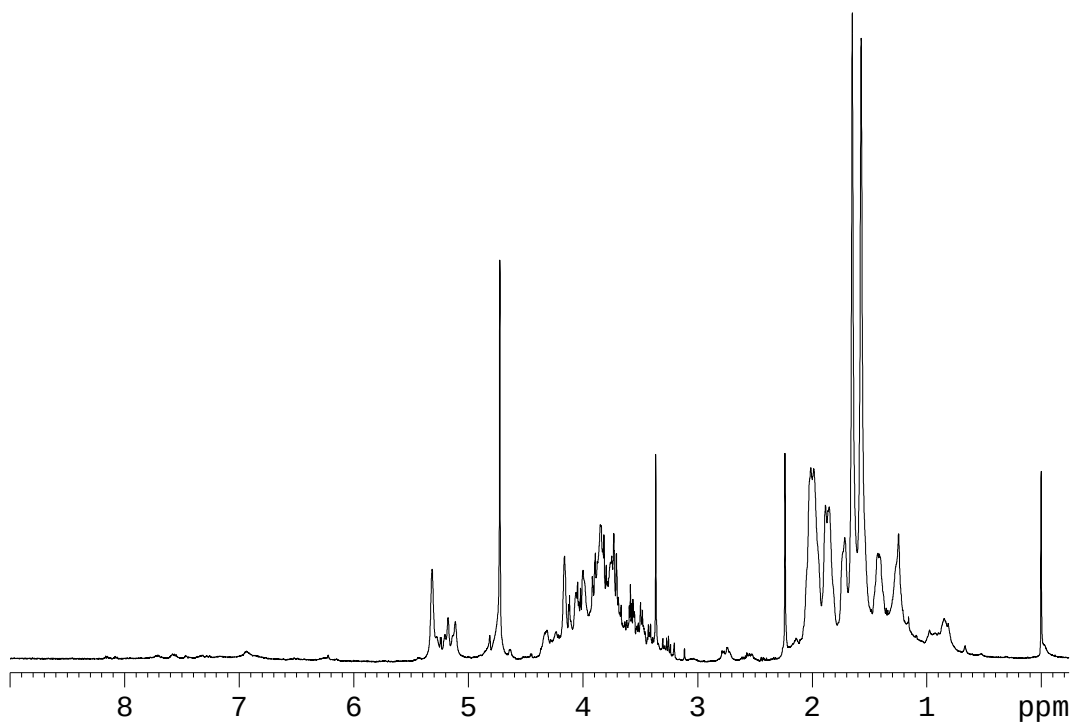


Figura 5.35 – Espectro de RMN de ^1H das cascas de laranja (MeOD, 500 Mhz).

Tabela 16 – Dados espectrais de ^1H e ^{13}C dos alcenos constatados como constituintes das cascas de laranja.

Identificado ^a			
δ C		δ H (multiplicidade, J Hz)	
M1 ^b	M2 ^b	M1 ^b	M2 ^b
(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
24,1	25,6	1,64	1,57
44,0	33,7	2,01	1,94
112,0	124,0	5,12	5,30
152,0	135,0	-	-

M1 – Dados espectrais da molécula 1; M2 – Dados espectrais da molécula 2; ^a - RMN de ^1H e ^{13}C (D_2O) ; ^b – Multiplicidade não definida; .

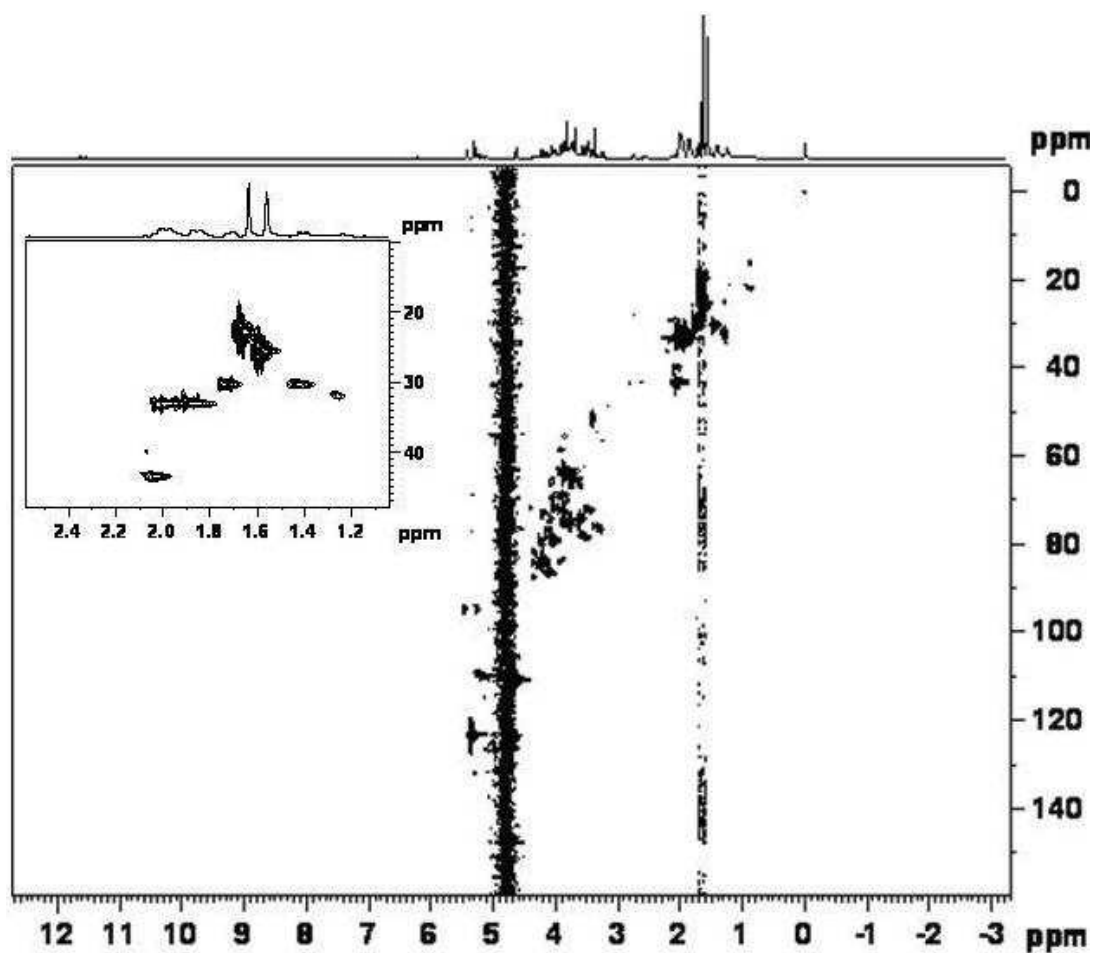


Figura 5.36 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (D_2O , 500 MHz) das cascas de laranja sadia, com expansão dos sinais em 1,5 a 2 ppm.

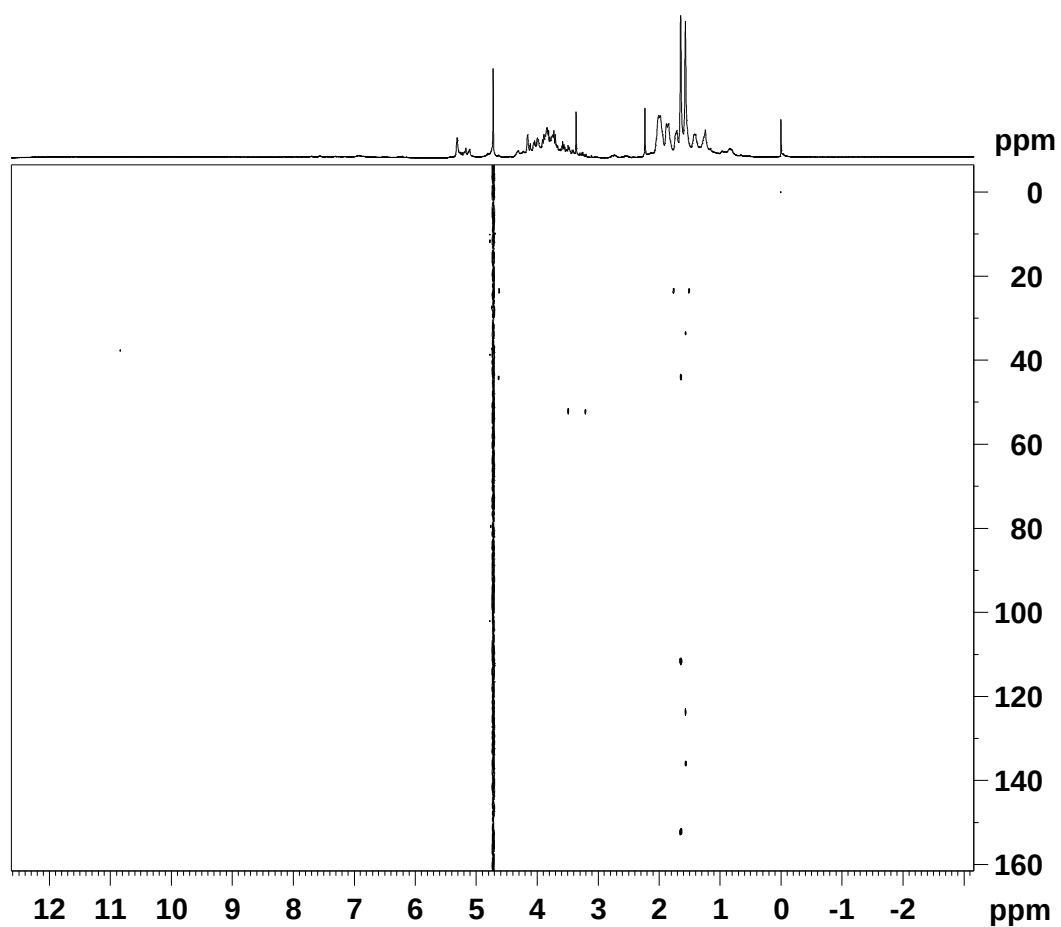


Figura 5.37 – Correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HMBC (D_2O , 500 Mhz) das cascas de laranja doente selecionada.

5.4. COMPOSTOS DAS FOLHAS DE LARANJEIRA OBTIDOS POR HR-MAS

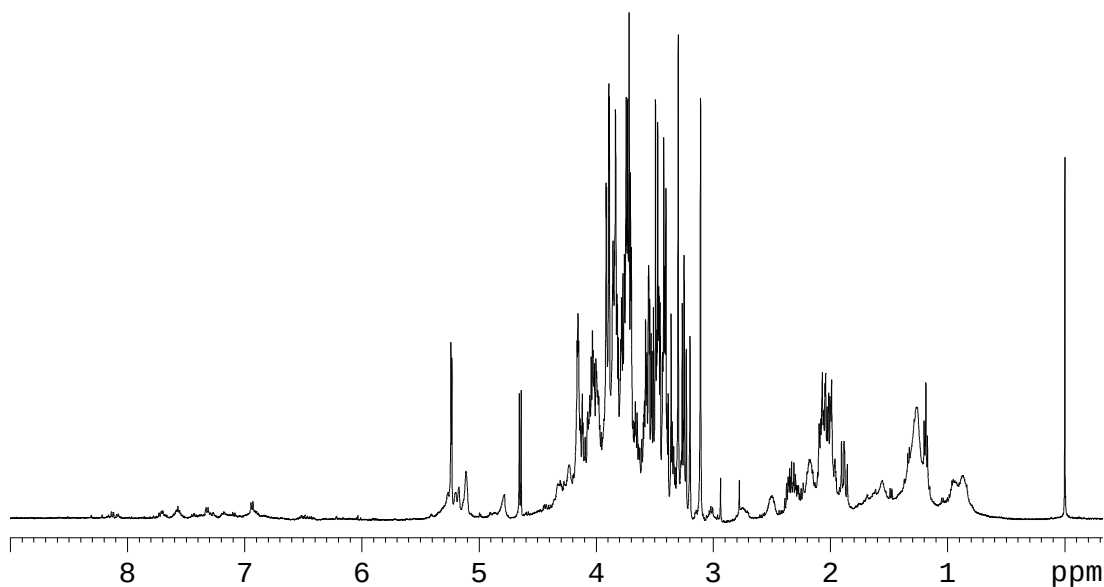


Figura 5.38 – Espectro de RMN de ^1H das folhas de laranjeira.

De acordo com os resultados obtidos com os experimentos bidimensionais das folhas, foi realizado somente o HSQC (Figura 5.39), já que o HMBC apresentou pouca informação em um intervalo experimental longo.

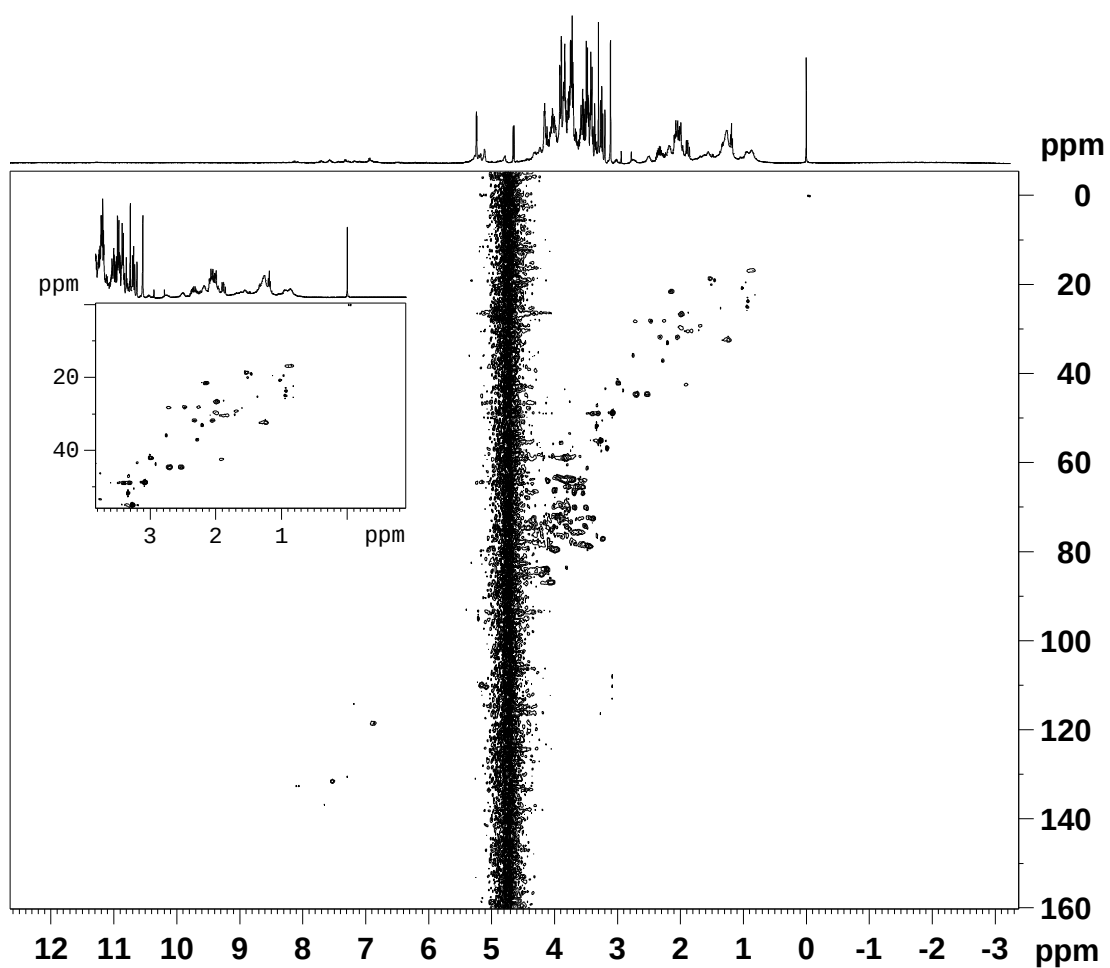


Figura 5.39 – Correlações ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de *g*HSQC (D_2O , 500 Mhz) das folhas de laranja, com a expansão da região de 0 a 3 ppm.

6. CONCLUSÃO

A espectroscopia de RMN foi satisfatoriamente utilizada para a investigação dos metabólitos das matrizes obtidas com a laranja, apontando alta eficiência para análises exploratórias de monitoramento. No entanto, apesar do alto limite de detecção referente à RMN, alguns compostos que se mostraram importantes para o entendimento das PCA's, principalmente nos espectros obtidos por HR-MAS, não puderam ser identificados, já que os sinais não puderam ser vislumbrados nos experimentos bidimensionais. Contudo, limites de detecção poderiam ser aumentados com a utilização de um maior número de *scans*, o que, entretanto, acarretaria maior tempo de máquina; com a utilização de equipamentos de mais alto campo ou com o uso da tecnologia de criossondas.

A escolha de sequências de pulsos apropriadas é de grande importância para análises mais amplas. A exemplo disto, observou-se que o uso da CPMG foi importante na identificação mais detalhada dos sinais de interesse, demonstrando que compostos intrínsecos de bactérias (como suas paredes celulares) não influíram nos resultados experimentais.

As regiões espectrais destacadas pelos *loadings* nos conjuntos de dados foram consideradas complementares e de constatação das informações obtidas, já que os resultados foram similares, mesmo para compostos oriundos de metabolismo primário provindo das análises de HR-MAS e secundário inerentes às análises de RMN em solução. Sendo assim, há variação de, principalmente, aminoácidos e ácidos orgânicos em regiões de menor deslocamento químico, cujo AABA pode ser considerado um composto inerente à resposta defensiva da planta. Sabendo que tais compostos são sinalizadores de metabolismo, pode-se inferir que o cancro causa modificação da produção destes.

Nos sucos, a observação de que compostos intrínsecos de processos fermentativos têm a produção acrescida – acarretando mudança de sabor da fruta – é importante, já que demonstra que a bactéria ocasiona uma ampliação na velocidade de apodrecimento do fruto, modificando sua vida útil e provocando uma confusão visual, já que um fruto aparentemente não amadurecido pode ter tido seu processo fermentativo acelerado.

De acordo com este trabalho, os flavonóides também tiveram seu metabolismo modificado e em alguns casos, com redução de sua produção, acarretando perda de compostos importantes que conferem citotoxicidade para as folhas, por exemplo. Contudo, flavonóides importantes como a naringenina e hesperidina, não apresentaram alteração, mantendo-se constantes durante a incidência da *Xac*. Os dados obtidos pela HR-MAS corroboram os obtidos por análises de RMN em solução, demonstrando que as duas técnicas são complementares para análises mais abrangentes, onde as matrizes submetidas a um mínimo de pré-tratamento podem apresentar sinais de compostos voláteis visualizados a partir dos experimentos de HR-MAS.

Nas análises biológicas, e com a verificação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos, há certa coincidência entre os resultados de atividade e os sinais dos hidrogênios do espectro indicando a possibilidade de confronto entre a RMN e dados de atividade biológica.

Os dados dos ensaios antioxidantes foram interpretados como complementares no sentido de reforçar a contribuição dos aminoácidos como compostos importantes para o sistema defensivo dos *Citrus* frente ao ataque patogênico. A tendência de atividade antioxidante acompanhou as informações preditas com a análise quimiométrica, demonstrando ainda, a possibilidade de correlação entre informações obtidas a partir de dados espectroscópicos e de atividade antioxidante, fornecendo subsídios preliminares de entendimentos das classes de compostos responsáveis pelos resultados de inibição antioxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. M.; AL-HAKIM, S.; ADEL, A.; SHEHATA, Y. The antioxidant activity of amino acids in two vegetable oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 60, n. 4, p. 837-840, 1983.

ALCANTARA, G. B.; HONDA, N. K.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. Chemometric analysis applied in ^1H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 595, p. 3-8, 2007.

AL-HASHIMI, H. M.; PATEL, D. J. Residual dipolar coupling: Synergy between NMR and structural genomics. *Journal of Biomolecular NMR*, v. 22, p. 1-8, 2002.

AMARAL, J. D.. Os citrinos. Lisboa: Clássica Editora, p. 18-20, 1982.

AMARAL, A. M.; CARVALHO, S.; DOMINGUES, A. D.; DEZOTTI, D. F.; BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A. Reação de acesos de citros á *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sob condições de casa-de-vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. S284, 2003.

ANDRONESI, O. C.; MINTZOPOULOS, D.; STRUPPE, J.; BLACK, P. M.; TZIKA, A. A. Solid-state NMR adiabatic TOBSY sequences provide enhanced sensitivity for multidimensional high-resolution magic-angle-spinning ^1H MR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 193, p. 251–258, 2008.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S.; Atividade antimicrobiana " in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 517-524, 2006.

ARDO, Y. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 238– 242, 2006.

ARUOMA, O.I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, v. 9, n. 20, p.523-524, 2003.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v. 89, p. 27-36, 2005.

BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. N. C.; MACHADO, M. A.; WICKERT, E.; MARASCHIN, S. F.; COLETTA FILHO, H. D.; SCHAFFER, G. Characterization of citrus genotypes (*Citrus sp.*) using RAPDs markers. *Ciência Rural*, v. 31, n. 5, p. 763-768, 2001.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 2413-2415, 1996.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics: A practical guide*. New York, John Wiley & Sons, 1998.

BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; RIBEIRO, L. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; AMORIM, L. Escalas Diagramáticas para Avaliação da Severidade do Cancro Cítrico. *Fitopatologia brasileira*, v. 30, n. 4, p. 387-393, 2005.

BERREGI, I.; SANTOS, J. I.; CAMPO, G.; MIRANDA, J. I.; AIZPURUA, J. M. Quantitation determination of chlorogenic acid in cider apple juices by ^1H -NMR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 486, p. 269–274, 2003.

BEVERIDGE, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles, *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 16, p. 4725–4733, 1999.

BIANCO, A.; FURRER, J.; LIMAL, D.; GUICHARD, G.; ELBAYED, K.; RAYA, J.; PIOTTO, M.; BRIAND, J. P. Multistep synthesis of 2,5-diketopiperazines on different solid supports monitored by high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Journal of Combinatorial Chemistry*, v. 2, n. 6, p. 681, 2000.

BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*, Rio de Janeiro, Melhoramentos, 1976.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. *O Biológico*, v. 23, p. 101-111, 1957.

BLIGNY, R.; DOUCE, R. NMR and Plant metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, p. 191–196, 2001.

BLOEMBERGEN, N.; E.M. PURCELL, POUND, R. V. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review*, v. 73, n. 7, p. 679-711, 1948.

BORRADAILE, N. M.; CARROLL, K. K.; KUROWSKA, E. M. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids*, v. 34, p. 591- 598, 1999.

BRAND-WILIAMS, W.; CUEVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRERETON, R. G. *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. England, John Wiley & Sons Ltd, 2003.

BRESCIA, M. A.; DI MARTINO, G.; FARES, C.; DI FONZO, N.; PLATINI, C.; GHELLI, S.; RENIERO, F.; SACCO, A. Characterization of italian durum wheat semolina by means of chemical analytical and spectroscopic determinations. *Cereal Chemistry*, v. 79, n. 2, p. 238, 2002.

BRESCIA, M. A.; KOSIR, I. J.; CALDAROLA, V.; KIDRIC, J.; SACCO, A. Chemometric classification of Apulian and Slovenian wines using ^1H NMR and ICP-OES together with HPICE data. *Journal of Agriculture and Food Cheminty*, v. 51, p. 21–26, 2003.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, v.125, p. 2125–2154, 2000.

BRERETON, R. G. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. England, John Wiley & Sons, p. 210, 2003.

BROBERG, A.; KENNE, L. Use of high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy for in situ studies of low-molecular-mass compounds in red algae. *Analytical Biochemistry*, v. 284, p. 367-374, 2000.

BROBERG, A.; KENNE, L.; PEDERSEN, M. In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* using high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, v. 206, n. 2, p. 300-307, 1998.

BRUKER BIOSPIN – NMR guide: Version 3.5, 1998 – 2000.

CALIGIANI, A.; ACQUOTTI, D.; PALLA, G.; BOCCHI, V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 585, p. 110–119, 2007.

CAMPOS, F. P.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 8, p. 226–229, 2007.

CANTEROS, B.I. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: International Conference of Plant Pathogenic Bacteria. Proceedings, 9, Madras, Índia, p. 455-459, 1996.

CARVALHO, Flávia Maria de Souza. Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira. Ribeirão Preto, 2006. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

CASTOLO, A. A. Beyond Excitation NMR Relaxation. Concepts in Magnetic Resonance. Part A, v. 32A, n. 3, p. 168–182, 2008.

CERNADAS, R. A.; CAMILLO, L. R.; BENEDETTI, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange Interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, n. 5, p. 609–631, 2008.

CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Use of spin label EPR spectra to monitor peptide chain aggregation inside resin beads. *Tetrahedron Letters*, v. 4, p. 517-520, 1997.

CIVEROLO, E. L. Bacterial canker disease of citrus. *Journal of Rio Grande Valley Horticulture Society*, v. 37, p. 127-146, 1984.

CLARIDGE, T. D. W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. London, Tetrahedron Organic Chemistry Series, 2008.

COHEN, Y.R. β -Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens plant disease. *Plant Disease*, v. 86, n. 4, p. 448 – 457, 2002.

CONSONNI, R.; GATTI, A. ^1H NMR studies on italian balsamic and traditional balsamic vinegars. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 52, p. 3446–3450, 2004.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova* v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

DAS, A. K. Citrus canker – A review. *Journal of Applied Horticulture*, v. 5, n. 1, p. 52-60, 2003.

DEFERNEZ, M.; COLQUHOUN, I. J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra. *Phytochemistry*, v. 62, p. 1009–1017, 2002.

DUAR, M. J. *Solid-State NMR spectroscopy: Principles and applications*. Oxford, London, Blackwell Science Ltd, 2002.

EPPO/CABI. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Quarantine Pests for Europe, v. 2, p. 1101–1108, 1997.

EMSLEY, J. W.; FEENEY, J. Forty years of Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 50, p. 179–198, 2007.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; GUSMÃO, N. B.; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N. K.; PEREIRA, E. C. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 21, n. 1, p. 43-9, 2002.

FANG, Y. YANG, S.; WU, G. Free Radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, v. 18, p. 872– 879, 2002.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITES NATIONS. Faostat agriculture data, agricultural production, crops primary. Disponível em: <http://www.fao.org>, acessado em 13 de julho de 2009.

FAWCETT, H. S.; JENKINS, A. E. Records of citrus Canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. *Phytopathology*, v. 23, p. 820-824, 1933.

FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. *Eclética Química*, v. 27, p. 77-90, 2002.

FUJIKAWA, T.; ISHIHARA, H.; LEACH, J.E.; TSUYUMU, S. Suppression of defense response in plants by *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant–Microbe Interact*, v. 19, p. 342–349, 2006.

FUNDECITRUS, FUNDO DE DEFESA DA AGRICULTURA. Manual técnico – Cancro Cítrico, 2008. Disponível em http://www.fundecitrus.com.br/manuais/fundec_manual_cancro1106.pdf, acessado em 29 de outubro de 2009.

FUNDECITRUS, FUNDO DE DEFESA DA AGRICULTURA. Disponível em <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>, acessado em 28 de outubro de 2009.

GABOR, M.; CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBONE, J. V.; BERETZ, A. E.; LISS, A., R. Anti-inflammatory and antiallergic properties of flavonoids. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine Biochemical Pharmacological and Structure-Activity Relationships*, v. 213, p. 471-480, 1986.

GACHOMO, E. W.; SHONUKAN, O. O.; KOTCHONI, S. O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, n. 2, p. 26-32, 2003.

GALATI, E. M.; MONFORTE, M. T.; KIRJAVAINEN, S.; FORESTIERI, A. M.; TROVATO, A. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco*, v. 49, p. 709-712, 1994.

GALILI, S.; AMIR, R.; GALILI, G. Genetic Engineering of Amino Acid Metabolism in Plants. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, v. 1, p. 49 – 80, 2008.

GARROD, S.; HOLMES, E.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. HR-MAS: a new tool for semisolid samples. *Bruker Report*, v. 146, p. 18, 1998.

GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; DELGADILLO, I.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 5, p. 1524 – 1436, 2000.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativa. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GOTO, M.; OHTA, K.; OKABE, N. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hase) Dowson. 1. Detection of the bacterium from a grass (*Zoysia japonica*). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v. 41, p. 9-14, 1975.

GOTO, M.; YAGUCHI, Y. Relationship between defoliation and disease severity in citrus canker [*Xanthomonas citri*]. *Annals of Phytopathology Society of Japan*, v. 45, p. 689-694, 1979.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. *Phytopathology*, v. 82, p. 930-935, 1992.

GOTTWALD, T. R.; IREY, M. Post-hurricane analysis of citrus canker II: Predictive model estimation of disease spread and area potentially impacted by various eradication protocols following catastrophic weather events. Online. *Plant Health Progress*, doi: 10.1094/PHP-2007-0405-01-RS, 2007. Disponível em: <http://www.apsnet.org/online/feature/hurricane/>. Acessado em 10 de outubro de 2009.

GOVINDARAJU, V.; YOUNG, K.; MAUDSLEY, A. A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine*, v. 13, p. 129-153, 2000.

GUZZO, C. R.; NAGEM, R. A. P.; BARBOSA, J. A. R. G.; FARAH, C. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* YaeQ structure reveals new compact protein fold built around a variation of the PD-(D/E)XK nucleasemotif. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, v. 69, n. 3, p. 644-651, 2007.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. Research perspectives on eradication of citrus bacterial diseases in Flórida. *Plant Diseases*, v. 75, p. 1193-1200, 1991.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. Pathogen profile *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker". Molecular Plant Pathology, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; FARDELMAN, D. Cultivar-specific interactions for strains of *Xanthomonas campestris* from Florida that causes citrus canker and citrus bacterial spot. Plant Disease, v. 74, p. 753-756, 1990.

GREEN, R. M.; VARDI, A.; GALUN, E. The plastome of Citrus. Physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera. Theoretical and Applied Genetics, v. 72, p. 170–177, 1986.

GRENNAN, A.K. The role of trehalose biosynthesis in plants. Plant Physiol., v. 144, p. 3–5, 2007.

GROHMANN, G.; K.; MANTHEY, J.A.; CAMERON, R. G.; BUSLIG, B. S. Purification of Citrus Peel Juice and Molasses, J. Agric. Food Chem., v. 47, p. 4859-4867, 1999.

HARDLE, W.; SIMAR, L. Applied Multivariate Statistical Analysis. Germany, Springer, 2000.

HENG, L. L.; CHANG, I. W.; SMITH, B. L.; GONZALEZ, G. "Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy". Journal of Magnetic Resonance, 135(1): 194, 1998.

HIRANO, T.; ABE, K.; GOTOH, M.; OKA, K. "Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. British Journal of Câncer, v. 72, p. 1380-1388, 1995.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos, BRASIL ALIMENTOS, n. 9, p. 23-30, 2001.

HOLT, B. F.; MACKEY, D.; DANGL, J. L. Recognition of pathogens by plants. Current Opinion in Chemical Biology, v. 10, n. 1, p. 0-7, 2000.

HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B. Quantitative NMR spectroscopy – Application in drug analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 38, p. 806–812, 2005.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.-L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. Planta Medica, v. 63, p. 2-10, 1997.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal (PAM - 1990 a 2004) e Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA - julho/2006). Elaboração: Secretaria de Política Agrícola-MAPA. Disponível em: www.ibge.gov.br, acessado em 13 de julho de 2009.

IEA – INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, APTA. Secretaria de agricultura e abastecimento. Disponível em www.iea.sp.gov.br, acessado em 13 de julho de 2009.

IZQUIERDO, A., G.; GIL, M., I.; FERRERES, F. Effect of Processing Techniques at Industrial Scale on Orange Juice Antioxidant and Beneficial Health Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 5107-5114, 2002.

IWAMASA, M., NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., Tel Aviv, 1988. Proceedings. Tel Aviv :International Society of Citriculture, v. 1, p. 165-275, 1988.

JACKSON, L. C.; REYES, L. A. M.; CORDIÉS, M. L. H. Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Medica*, v. 8, n. 1, p. 58-65, 1998.

JOHANN, S.; OLIVEIRA, V. L.; PIZZOLATTI, M. G.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; BRANCO, A.; SMANIA JR. A. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from citrus spp. peels. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, V. 102, n. 6, p. 681-685, 2007.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. *Microbiologia médica*, Rio de Janeiro, 5 ed., Guanabara, p. 15-17, 1968.

JORGENSEN, J. H. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. *Journal of Clinic Microbiology*, v. 31, p. 2841-2847, 1993.

JORGENSEN, J. H. & FERRERO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clinic Infectology Disease*, v. 26, p. 973-80, 1998.

KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 628-633, 2003.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 36, p. 703-725, 2001.

KEIFER, P. A.; BALTUSIS, L.; RICE, D. M.; TYMIAK, A. A.; SHOOLERY, J. N. A comparison of NMR spectra obtained for solid-phase-synthesis resins using conventional high-resolution magic-angle spinning and high-resolution magic angle spinning probes. *Journal of Magnetic Resonance: Series A*, v. 119, p. 65-75, 1996.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study". *British Medical Journal*, v. 312, p. 478-481, 1996.

KOIZUMI, M.; GRIERSON, W. 1979. Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, v. 3, p. 924-928, 1979.

KOYUNCU, H.; BERKARDA, B.; BAYKUT, F.; SOYBIR, G.; ALATLI, C.; GUL, H.; ALTUN, M. Preventive effect of hesperidin against inflammation in CD-1 mouse skin caused by tumor promoter. *Anticancer Resources*, v. 19, p. 3237-3242, 1999.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, v. 66, n. 05, p. 1003-1010, 1994

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 7-12, 2001.

KUROWSKA, E. M.; SPENCE, J. D.; JORDAN, J.; WETMORE, S.; FREEMAN, D. J.; PICHE, L. A.; SERRATORE, P. HDL-cholesterolraising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 72, p. 1095-1100, 2000.

LADANIYA, M. S. Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation. Academic Press, San Diego, Elsevier, 2008.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LAXALT, A.M.; MUNNIK, T. Phospholipid signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, p. 332–338, 2002.

LEE, H.A. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker. *Journal of Agricultural Resources*, v. 15, p. 661- 665, 1918.

Le GALL, G.; PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 580-588, 2001.

LEITE JÚNIOR, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. *Crop Protection*, v. 9, p. 3-7, 1990.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J. G.; DE LEY, J. The hostrange of the genus *Xanthomonas*. *Botanical Review*, v. 50, p. 308-356, 1984.

LI, W. Multidimensional HRMAS NMR: a platform for in vivo studies using intact bacterial cells, *Analyst*, v. 131, 777–781, 2006.

LIAPIS, A. I.; MILLMAN, M. J.; MARCHELLO, J. M. An analysis of the lyophilization process using a sorption-sublimation model and various operational policies. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v. 31, n. 10, p. 1594-1604, 1985.

LIN, M.; SHAPIRO, M. J. Mixture analysis in combinatorial chemistry. Application of diffusion-resolved NMR spectroscopy. *Journal Organic of Chemistry*, v. 61, p. 7617-7619, 1996.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 39, n. 1, p. 1-40, 2001.

LIU, N. Q.; CAO, M.; FREDERICH, M.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; KOOY, F. Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of *Artemisia afra* with NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, artigo no prelo, 2010. doi:10.1016/j.jep.2010.01.020

MACOMBER, R. S. A complete introduction to modern NMR spectroscopy. New York, A Wiley-Interscience publication, p. 1-2, 1997.

MANDALARI, G.; BENNETT, R. N.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C. B.; GASSON, M. J. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2056–2064, 2007.

MANNINA, L.; PATUMI, M.; PROIETTI, N.; BASSI, D.; SEGRE, A. L. Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 2687–2696, 2001.

Manual do software AMIX-VIEWER, Bruker, v. 3.7, 2006.

MARTENS, H; NAES, T. Multivariate Calibration. New York, John Wiley & Sons, 1989.

MASSARI, C. A.; BELASQUE Jr., J. A campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo - Situação atual e contaminação em viveiros. Laranja, v. 27, p. 41-55, 2006.

MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M.A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. Revista Analytica, v. 6, p. 38-50, 2003.

MAZZONI, V.; BRADESI, P.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using ^{13}C NMR spectroscopy: application to honey. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 35, n. 13, p. S81 - S90, 1998.

MENEGUIM, L.; RINALDI, D. A. M. F.; SANTOS, A. C. A.; RODRIGUES, L. S.; SILVA, M. R. L.; CANTERI, M. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ao cobre maconzeb. Fitopatol. Bras. v. 32, n. 3, p. 247 – 252, 2007.

MILLIS, K. K.; MAAS, W. E.; CORY, D. G.; SINGER, S. Gradient, high resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy of intact cells. Magnetic Resonance in Medicine, v. 39, n. 3, p. 337-345, 1998.

MOCCELINI, S. K.; SILVA, V. C.; NDIAYE, E. A.; SOUSA JUNIOR, P. T.; VIEIRA, P. C. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (RUTACEAE). Quimica Nova, v. 32, n. 1, p. 131-133, 2009.

MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. Journal of Medicinal Plants Research, v. 3, n. 4, p. 217-223, 2009.

NAGASE, H.; OMAE, N.; OMORI, A.; NAKAGAWASAI, O.; TADANO, T.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y.; MIMAKI, Y.; YAMAKUNI, T.; OHIZUMI, Y. Nobiletin and its related flavonoids with CRE-dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities, Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 337, p. 1330–1336, 2005.

NASCIMENTO, Cláudia Alves. Estudo Fitoquímico e Atividade Antibacteriana de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). Goiânia, 2005. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química da UFG.

NAKAJIMA, M.; GOTO, M.; HIBI, T. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. Journal of General Plant Pathology, v. 68, p. 68-74, 2002.

NETO, E. F.; LOPES, M. P. C.; PALHARIN, L. H. C.; SAMBUGARO, R. Revisão literária sobre cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis*, PV. *citri*). Rev. Científica eletrônica de agronomia, v. 5, n. 10, 2006.

NIMITKEATKAI, H.; UEDA, Y.; FURUKAWA, H.; INAMOTO, K.; DOI, M. Emission of methylbutyric acid from L. during bud opening: Changes in amino acid catabolism. Scientia Horticulturae, v. 106, p. 370–380, 2005.

NORD, L.I.; VAAG, P.; DUUS, J. O. Quantification of organic and amino acids in beer by ^1H NMR spectroscopy. Analytical Chemistry, v. 76, p. 4790-4798, 2004.

OEPP/EPPO. Diagnostic protocols for regulated pests: *Xanthomonas axonopodi* pv. *Dieffenbachiae*. Bulletin OEPP/EPPO, v. 34, p. 183-186, 2004.

ONozUKA, H.; NAKAJIMA, A.; MATSUZAKI, K.; SHIN, R. W.; OGINO, K.; SAIGUSA, D.; TETSU, N.; YOKOSUKA, A.; SASHIDA, Y.; MIMAKI, Y.; YAMAKUNI, T.; OHIZUMI, Y. Nobiletin, a Citrus Flavonoid, Improves Memory Impairment and A β Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, v. 326, p. 739–744, 2008.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, O. E.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 16, p. 510-516, 2006.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais, *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OTTO, M. *Chemometrics – Statistics and computer application in Analytical chemistry*. Germany, Willey-VCH, 1999.

PALAZZO, D. A.; MALAVOLTA, V. A. Jr.; NOGUEIRA, E. M. de C. Effect of some climatic factors on the index of infection of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on Valencia orange (*Citrus sinensis*). *Fitopatologia Brasileira*, v. 9, p. 283-290, 1984.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, v. 39, p. 791-800, 2006

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.1, n. 4, p. 12-15, 1998.

POLEK, M.; VIDALAKIS, G.; GODFREY, K. Citrus bacterial canker disease and huanglongbing (citrus greening). ANR University of California, Publication 8218, p. 1-12, 2007.

RAPISARDA, P.; FABRONI, S.; PETEREK, S.; RUSSO, G.; MOCK, H., P. Juice of New citrus hybrids (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. *C. sinensis* L. Osbeck) as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, v. 117, p. 212–218, 2009.

RENCHE, A. C. "Methods of Multivariate Analysis". USA, Wiley Interscience, 2001.

RUHLAND, T.; ANDERSEN, K.; PEDERSEN, H. Selenium-linking strategy for traceless solid-phase synthesis: Direct loading, aliphatic C-H bond formation upon cleavage and reaction monitoring by gradient MAS NMR spectroscopy. *Journal of Organic Chemistry*, v. 63, n. 25, p. 9204-9211, 1998.

SACCO, A.; BOLSI, I. N.; MASSINI, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER E.; GHELLI, S. Preliminary investigation on the characterization of durum wheat flours coming from some areas of south Italy by means of ^1H High-Resolution

Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 46, p. 4242-4249, 1998.

SANDERS, J. K. M.; HUNTER, B. *Modern NMR spectroscopy: a guide for chemists*. USA, Oxford University Press, p. 308, 1987.

SCHNEIDER, B. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy in biosynthetic studies. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 51, p. 155-198, 2007.

SCHUBERT, T. S.; RIZVI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – Again. *Plant Disease*, v. 85, n. 4, p. 340-356, 2001.

SCORA, R. W. On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. v. 102, p. 369–375, 1975.

SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SENA, M. M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. *Quím. Nova*, v. 28, n. 5, p. 910-920, 2005.

SHAPIRO, M. & GOUNARIDES, J. S. High-resolution MAS-NMR in combinatorial chemistry. *Biotechnology and Bioengineering (Combinatorial Chemistry)*, v. 71, n. 2, p. 130-148, 2000.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L.; Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, v. 25, p. 207–218, 2003.

STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annual Review of Phytopathology*, v. 29, p. 339-420, 1991.

STALL, R. E.; MILLER, J. W.; MARCO, G. M.; CANTEROS de ECHENIQUE, B. I. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. *Proc. Florida State Horticultural Society*, v. 93, p. 10-14, 1980.

STERR, Y.; WEISS, A.; SCHMIDT, H. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. *International Journal of Food Microbiology*, v. 136, p. 75–82, 2009.

STRUCKMANN, J., R.; NICOLAIDES, A. N. A review of the pharmacology and therapeutic efficacy of Daflon 500 mg in patients with chronic venous insufficiency and related disorders. *Angiology*, v. 45, p. 419-428, 1994.

SWARBRICK, P. J.; SCHULZE-LEFERT, P.; SCHOLES, J. D. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broadspectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell & Environment*, v. 29, p. 1061–1076, (2006).

TAO, N.; LIU, Y.; ZHANG, M. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck), *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 1281–1285, 2009.

TOMA'S-BARBERA'N, F. A.; CLIFFORD, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones: nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 1073-1080, 2000.

TRIPOLI, E.; GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; MAJO, D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, v. 104, p. 466–479, 2007.

TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W.; WILLIAMS, D. L. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 30, n. 4, p. 393-402, 2001.

TURCZAN, J. W.; MEDWICK, T. Qualitative and quantitative analysis of amygdalin using NMR spectroscopy. *Analytical Letters*, v. 10, n. 7 e 8, p. 581 – 590, 1977.

VAN ANDEL, O. M. Investigations on plant chemotherapy II. Influence of amino acids on the relation plant-pathogen. *Tijdschrift over Planteziekten*, v. 64, p. 307-327, 1958.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. *The American Phytopathological Society*, 90 (7): 677-682, 2000.

VERNIÈRE, C.; HARTUNG, J. S.; PRPUVOST, O. P.; CIVEROLO, E. L.; ALVAREZ, A. M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, v. 104, p. 477-487, 1998.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin of IDF*, v. 345, p.15- 18, 2000.

WELJIE, A. M.; NEWTON, J.; JIRIK, F. R.; VOGEL, H. J. Evaluating low-intensity unknown signals in quantitative proton NMR mixture analysis. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 8956-8965, 2008.

WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, n. 4, p. 291-298, 2000.

WILKINS, M.R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1614–1619, 2007.

WILSON, R. A.; JENKUNSON, J. M.; GIBSON, R. P.; LITTLECHILD, J. A.; WANG, Z. Y.; TALBOT, N. J. *Tps1* regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. *European Molecular Biology Organization Journal* v. 26, p. 3673–3685, 2007.

WINDIG, W.; ANTALÉK, B.; LIPPERT, J. L.; BATONNEAU, Y.; BREMARD, C. Combined use of conventional and second-derivative data in the SIMPLISMA self-modeling mixture analysis approach. *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 1371–1379, 2002.

WINNING, H.; LARSEN, F. H.; BRO, R.; ENGELSEN, S. B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 190, p. 26–32, 2008.

YAN, B.; JEWELL, C.F.; MYERS, S.W. Quantitatively monitorinh of solid-phase organic synthesis by combustion elemental analysis. Tetrahedron Letters, v. 54, p. 11755–11766, 1998.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. American Journal of Epidemiology, v. 149, p. 943-949, 1999.

8. CURRICULUM VITAE

Lorena Mara Alexandre e Silva *Curriculum Vitae*

Dados Pessoais

Nome Lorena Mara Alexandre e Silva
Filiação José Lino e Maristela Martins da Silva
Nascimento 17/12/1984 - Goiania/GO - Brasil
Carteira de Identidade 4384298 DGPC - GO - 25/07/1999
CPF 00155188178

Endereço residencial RUA 227, nº108, Ap. 105
 Leste Universitário - Goiania
 74605-080, GO - Brasil
 Telefone: 62 96491827

Endereço profissional Universidade Federal de Goiás, Instituto de
 Química
 CAMPUS SAMAMBAIA
 ITATIAIA - Goiania
 74001-970, GO - Brasil
 Telefone: 62 35211059

Endereço eletrônico e-mail para contato : lorena.mara@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2008 Mestrando em Química.
 Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil
 Título: Avaliação de citrus sp. atingidas pelo cancro cítrico

através de RMN e ferramentas quimiométricas

Orientador: Glaucia Braz Alcântara

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Palavras-chave: RMN, Análise por Componentes Principais (PCA), Xanthomonas axonopodis, cancro cítrico

Áreas do conhecimento : Elucidação de estruturas Orgânicas com ênfase em RMN

- 2006** Graduação em Química.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil
- 2003 - 2007** Graduação em Química Industrial.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, IFG, Goiania, Brasil
Título: AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE *Galianthe ramosa* E.L.Cabral
Orientador: Lucília Kato

Formação complementar

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Teoria Básica de RMN.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em RMN para determinação da conformação de pequenas m.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Cromatografia Líquida (HPLC).
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, SENAI, Brasil
Palavras-chave: HPLC
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Sistemática e Identificação da Família Rubiaceae.
Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil
Palavras-chave: Rubiaceae

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Goiás - UFG

Vínculo institucional

- 2009 - 2009** Vínculo: Professor Substituto , Enquadramento funcional: Professor Substituto , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

11/2008 - 05/2009 Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química

Linhas de Pesquisa: Química Analítica e Alimentos

08/2008 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química

Linhas de Pesquisa: RMN aplicada à alimentos

03/2008 - 12/2008 Graduação, Química

Disciplinas Ministradas: Monitoria em Química Orgânica

04/2007 - 06/2007 Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química

Linhas de Pesquisa: Bioatividade Molecular

08/2006 - 12/2007 Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química

Linhas de Pesquisa: Produtos Naturais

Linhas de pesquisa

1. Bioatividade Molecular
2. Produtos Naturais
3. Química Analítica e Alimentos
4. RMN aplicada à alimentos

Áreas de atuação

1. RMN aplicado a alimentos
2. Quimiometria
3. Produtos Naturais

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Produção em C, T& A
Produção bibliográfica
Artigos completos publicados em periódicos

1. COSTA, D. P., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., SANTOS, S. C.,

PASSOS, X. S., SILVA, M. R. R., SERAPHIN, J. C., FERRI, P. H.
Influence of Fruit Biotypes on the Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 5, p. 851-858, 2010. *Referências adicionais : Inglês.*

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., LIAO, L. M., ALCANTARA, G. B.
Cultivars Discrimination by ¹H NMR (HR-MAS and in Solution) and Chemometric Analysis Applied to Sugarcane Leaves In: AUREMN, 2009, Angra dos Reis - RJ.

Cultivars Discrimination by ¹H NMR (HR-MAS and in Solution) and Chemometric Analysis Applied to Sugarcane Leaves. , 2009.

Palavras-chave: NMR, sugarcane, chemometric analysis

Áreas do conhecimento : RMN

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

2. SILVA, L. M. A., ALVES FILHO, E. G., LIAO, L. M., ALCANTARA, G. B.
Preliminary Assessment of Orange Leaves Affected by Citrus Canker Through NMR and Chemometric Analysis In: AUREMN, 2009, Angra dos Reis - RJ.

Preliminary Assessment of Orange Leaves Affected by Citrus Canker Through NMR and Chemometric Analysis. , 2009.

Palavras-chave: NMR, citrus canker, chemometric analysis

Áreas do conhecimento : RMN

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

3. COSTA, D. P., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., SANTOS, S. C., FERRI, P. H.

INFLUÊNCIA DA COLORAÇÃO DOS FRUTOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eugenia uniflora* In: 31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.

Anais da 31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2008.

Palavras-chave: Eugenia uniflora, Óleos essenciais, Bioatividade

Áreas do conhecimento : Produtos Naturais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

4. SILVA, L. M. A., KATO, L., OLIVEIRA, C. M. A., DELPRETE, P. G., SILVA, C. C., TANAKA, C. M. A.

NOVO ALCALÓIDE INDÓLICO DE *Galianthe ramosa* E. L. Cabral In: 31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.

Anais da 31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2008.

Palavras-chave: Galianthe ramosa, Rubiaceae, Produtos Naturais

Áreas do conhecimento : Produtos Naturais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio

magnético

5. SILVA, L. M. A., KATO, L., OLIVEIRA, C. M. A., DELPRETE, P. G., SILVA, C. C., TANAKA, C. M. A.

ALKALOID FROM GALIANTHE RAMOSA E. L. CABRAL In: 1º Brazilian Conference on Natural Products & XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution Systematics and Ecology (RESEM), 2008, São Pedro - São Paulo.

Anais do 1º Brazilian Conference on Natural Products & XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution Systematics and Ecology (RESEM). , 2007.

Palavras-chave: Galianthe ramosa, Rubiaceae, Produtos Naturais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

6. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., FERRI, P. H., SANTOS, S. C.

CICLIZAÇÃO DO CITRONELAL COM CARBOXEN 569 – CATALIZADOR DIASTEREOSELETIVO PARA A SÍNTESE DE ISOPULEGOL In: IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - Ciência, Educação e compromisso Social, 2007, Goiania.

<http://www.eventos.ufg.br/conpeex2007/page.php> . , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português.

7. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., FERRI, P. H., SANTOS, S. C.

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS BIOGÊNICOS (BVOCs) EM UMA POPULAÇÃO DE Eucalyptus citriodora In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil - Ecologia no Tempo de Mudanças Globais, 2007, Caxambú - MG.

Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu - MG. , 2007.

Palavras-chave: BVOCs, Eucalyptus citriodora

Áreas do conhecimento : Química dos Produtos Naturais

Setores de atividade : Outros Setores, Produtos e Serviços Voltados Para A Defesa e Proteção do Meio Ambiente, Incluindo O Desenvolvimento Sustentado

Referências adicionais : França/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

Apresentação de Trabalho

1. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., LIAO, L. M., ALCANTARA, G. B.

Cultivars Discrimination by 1H NMR (HR-MAS and in Solution) and Chemometric Analysis Applied to Sugarcane Leaves, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: NMR, sugarcane, chemometric analysis

Áreas do conhecimento : RMN

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel do Frade; Cidade: Angra dos Reis - RJ; Evento: AUREMN

2. SILVA, L. M. A., ALVES FILHO, E. G., LIAO, L. M., ALCANTARA, G. B.

Preliminary Assessment of Orange Leaves Affected by Citrus Canker

Through NMR and Chemometric Analysis, 2009.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: NMR, citrus canker, chemometric analysis

Áreas do conhecimento : RMN

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel do Frade; Cidade: Angra dos Reis - RJ; Evento: AUREMN

3. COSTA, D. P., ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., SANTOS, S. C., FERRI, P. H.

INFLUÊNCIA DA COLORAÇÃO DOS FRUTOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eugenia uniflora*, 2008.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Eugênia uniflora, Óleos essenciais, Bioatividade

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético; Local: São Paulo; Cidade: Águas de Lindóia; Evento: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Inst.promotora/financiadora: SBQ - Sociedade Brasileira de Química

4. SILVA, L. M. A., KATO, L., OLIVEIRA, C. M. A., DELPRETE, P. G., SILVA, C. C., TANAKA, C. M. A.

NOVO ALCALÓIDE INDÓLICO DA *Galianthe ramosa* E. L. Cabral, 2008.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Galianthe ramosa, Rubiaceae, Produtos Naturais

Áreas do conhecimento : Produtos Naturais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: São Paulo; Cidade: Águas de Lindóia; Evento: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Química

5. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., FERRI, P. H., SANTOS, S. C.

CICLIZAÇÃO DO CITRONELAL COM CARBOXEN 569 – CATALIZADOR DIASTEREOSELETIVO PARA A SÍNTESE DE ISOPULEGOL, 2007.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético; Local: Goiás; Cidade: Goiânia; Evento: IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - Ciência, Educação e Compromisso Social; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Goiás

6. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., FERRI, P. H., SANTOS, S. C.

Compostos Orgânicos Voláteis Biogênicos (BVOCs) em uma população de *Eucalyptus citriodora*, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários, Homepage: http://www.viiiceb.org.br/site/trabalhos/segunda_lista.html; Local: Minas Gerais; Cidade: Caxambú; Evento: VIII Congresso de Ecologia do Brasil - Ecologia nos Tempos de Mudanças Globais; Inst.promotora/financiadora: SBE - Sociedade Brasileira de Ecologia

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **VI CONPEEX - Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão**, 2009. (Congresso)
Análises preliminares de folhas e sucos de laranja afetada por cancro cítrico através de RMN e ferramentas quimiométricas.
2. **32ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009. (Congresso)
3. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008. (Congresso)
NOVO ALCALÓIDE INDÓLICO DA *Galearia tomentosa* E. L. Cabral & INFLUÊNCIA DA COLORAÇÃO DOS FRUTOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *EUGENIA UNIFLORA*.
4. **Associação Brasileira de Química - Semana da Química Integrada**, 2008. (Simpósio)
5. **Mini-curso - Biotransformações em Química Orgânica**, 2008. (Outra)
6. **1º Workshop em Síntese Orgânica do Norte e Nordeste - 1º WSO**, 2008. (Encontro)
7. **MiniCurso: Gerenciamento de Resíduos Químicos Institucionais**, 2008. (Outra)
8. **3º Escola de Verão em Química na Bahia - Analítica, Alimentos, Ambiental**, 2008. (Congresso)
9. **V CONPEEX - Produção de Conhecimento e Transformação Social**, 2008. (Congresso)
10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - Ciência, Educação e compromisso Social**, 2007. (Congresso)
CICLIZAÇÃO DO CITRONELAL COM CARBOXEN 569 – CATALIZADOR DIASTEREOSELETIVO PARA A SÍNTESE DE ISOPULEGOL.
11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VIII Congresso de Ecologia do Brasil - Ecologia no Tempo de Mudanças Globais**, 2007. (Congresso)
Compostos Orgânicos Voláteis Biogênicos (BVOCs) em uma população de *Eucalyptus citriodora*.
12. **XV Semana da Química**, 2007. (Congresso)
13. **Mini-Curso: Utilização de Marcadores Moleculares em Estudos Populacionais**, 2007. (Oficina)

14. **Mini-curso: Educação Empreendedora, o caso do INATEL**, 2007. (Outra)
15. **Mini-curso: Ecologia Química das Plantas**, 2007. (Outra)
16. **Mini-curso: Ressonância Paramagnética Eletrônica em Membranas e Proteínas da Pele**, 2007. (Outra)
17. **Mini-curso - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa**, 2006. (Oficina)
18. **1º Congresso de Goiânia Sobre o Acidente do Cásio 137**, 2006. (Congresso)
19. **Mini-curso - Novos Avanços na Química de Produtos Naturais**, 2006. (Oficina)
20. **III Compeex**, 2006. (Congresso)
21. **Defesa de TCC - Determinação de Metais Pesados em Carvão Ativado Comercializado por Farmácias de Manipulação**, 2006. (Outra)
22. **XIII Semana de Química - "Em defesa da Universidade Pública"**, 2006. (Outra)
23. **Defesa de TCC - Aplicação de Métodos de Reconhecimento de Padrões na Classificação de Soja Transgênica e Convencional**, 2005. (Outra)
24. **Defesa de TCC - Caracterização do Cromo no Processo Wet Blue do Curtume Israel Couros, no Município de Aragoiânia**, 2005. (Outra)
25. **Mini-curso - Controle de Qualidade Microbiológico em uma Indústria de Bebidas**, 2005. (Outra)
26. **Mini-curso - Eletroanalítica Aplicada na Detecção de Metais Pesados em Amostras Ambientais**, 2005. (Congresso)
27. **XXIV Encontro Nacional dos Estudantes de Química**, 2005. (Congresso)
28. **Mini-curso - Saneamento e Meio Ambiente**, 2004. (Encontro)
29. **Palestra - Avaliação de Conformidade**, 2004. (Outra)
30. **Mini-curso - Vigilância Sanitária e Higiêne**, 2004. (Outra)
31. **Palestra - Efluentes Industriais**, 2004. (Outra)

32. Palestra - Segurança Alimentar, 2004. (Outra)

Outras informações relevantes

Artigos submetidos:

1. ALVES FILHO, E. G., SILVA, L. M. A., CHOZE, R., LIAO, L. M., HONDA, N. K., ALCANTARA, G. B.

Cultivar Distinction by ¹H HR-MAS and in Solution NMR and Chemometric. *Applied Spectroscopy*, 2010.

2. ALVES FILHO, E. G.*; SILVA, L. M. A.; MARTINS, A. O.; SOUZA, P. S.

Variabilidade de Cachaças do Estado de Goiás frente à Composição de Sais Minerais. *Revista Analytica*, 2010.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	7
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	6

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	12
Participações em eventos (simpósio).....	1
Participações em eventos (oficina).....	3
Participações em eventos (encontro).....	2
Participações em eventos (outra).....	14