ALICE NAGAI

Efeito induzido pelo vírus Y da batata (*Potato virus Y*) no metabolismo secundário do camapu (*Physalis angulata* L.)

**São Paulo
2012**

ALICE NAGAI

Efeito induzido pelo vírus Y da batata (*Potato virus Y*) no metabolismo secundário do camapu (*Physalis angulata* L.)

Orientação: Profa Dra Déborah Yara Alves Cursino dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências, Área de Botânica.

Colaborador: Dr Alexandre Levi Rodrigues Chaves (Pesquisador Científico – Instituto Biológico)

**São Paulo
2012**

Ficha catalográfica

Nagai, Alice

Efeito induzido pelo vírus Y da batata
(*Potato virus Y*) no metabolismo secundário do
camapu (*Physalis angulata* L.)

74 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. *Physalis angulata* 2. Metabólitos Secundários 3.
Fitovírus

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa Dra Déborah Yara Alves Cursino dos Santos

Dedico esse trabalho à minha família e ao meu noivo,
pelo apoio nas decisões, ajuda nas horas difíceis e
comemoração nos momentos de conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me presenteado com a vida, a sabedoria e força para conquistar meus objetivos.

À minha família e ao meu noivo, por estarem presentes na minha vida, fazendo meus dias mais felizes.

À minha mãe, por ter sido um referencial em minha vida (*in memoriam*).

À Iraci Rodrigues de Souza, pelo cuidado e zelo para comigo.

À professora Déborah Santos, por estar sempre disponível para sanar minhas dúvidas com calma e paciência e acompanhar meu trabalho com muita dedicação e esmero.

A todos do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico – SP, em especial à Dra Lígia M. Lembo Duarte e ao Dr Alexandre L. Rodrigues Chaves, por me orientarem na parte de Fitovirologia com demasiada atenção e preocupação.

À mestranda Sarah Soares por toda a ajuda, interesse no meu trabalho e pelos inúmeros momentos de agradáveis conversas; à mestranda Priscila Torres, por me auxiliar em diversas etapas do trabalho, principalmente na realização da curva padrão de rotina; à mestranda Janaina Morimoto Meyer, pelo auxílio na extração de alcaloides; e a todos do Laboratório de Fitoquímica, incluindo alunos e técnicos, pelo compartilhamento de experiências e conhecimentos, além dos momentos prazerosos durante as pausas para o café e nas comemorações.

À Dra Giuseppina Negri, pelo auxílio na interpretação da espectrometria de massas.

Ao doutorando do Laboratório de Anatomia de Plantas Vasculares, Giuliano Maselli Locosselli, pela ajuda nas análises estatísticas utilizando o programa R.

Ao professor Roberto Munehisa Shimizu, pelo auxílio com muita calma, paciência e gentileza, na interpretação da parte estatística dos dados.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Physalis angulata</i> L.	1
1.2. Metabolismo secundário.....	3
1.2.1. Flavonoides.....	5
1.2.2. Alcaloides	10
1.3. Fitovírus.....	13
1.3.1. <i>Potyviridae</i>	16
1.3.2. <i>Potato virus Y</i> (PVY).....	18
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Material Botânico	19
3.2. Vírus (PVY, <i>Potyviridae</i>).....	20
3.3. Fonte de inóculo	20
3.4. Determinação do pico máximo de infectividade em <i>P. angulata</i> por meio de DAS-ELISA	20
3.5. Montagem do experimento para avaliação de alcaloides e flavonoides.....	21
3.6. Monitoramento das plantas desafiadas com PVY ^O	22
3.7. Extração de flavonoides.....	22
3.8. Extração de alcaloides	22
3.9. Método de análise de flavonoides	23
3.10. Método de análise de alcaloides	23
3.11. Identificação de flavonoides	24
3.12. Identificação de alcaloides.....	25
3.13. Quantificação de fenóis totais.....	25
3.14. Quantificação de flavonoides totais.....	26
3.15. Quantificação de flavonoides obtidos por CLAE.....	27
3.16. Quantificação de alcaloides	27
3.17. Análises estatísticas	28
4. RESULTADOS	28
4.1. Pico máximo de infectividade PVY ^O	28
4.2. Monitoramento das plantas.....	29
4.3. Quantificação de fenóis totais.....	29
4.4. Quantificação de flavonoides totais.....	31
4.5. Identificação de flavonoides	32
4.6. Quantificação e análise de flavonoides por CLAE.....	42
4.7. Comparação da dosagem de flavonoides totais (espectrofotometria x CLAE).....	47
4.8. Identificação de alcaloides.....	48
4.9. Quantificação e análise de alcaloides	51
5. DISCUSSÃO	54
5.1. Comparação de fenóis totais nos três tratamentos.....	55
5.2. Identificação de flavonoides	56
5.3. Comparação de flavonoides nos tratamentos	59
5.4. Comparação de alcaloides nos tratamentos	61
6. CONCLUSÕES	62
RESUMO	64
SUMMARY	64
REFERÊNCIAS	65

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Physalis angulata</i> apresentando sintomas de infecção viral, com detalhe para a flor (seta branca). Foto: Marcelo Eiras (Instituto Biológico – SP).....	2
Figura 2. Blocos construtores do metabolismo primário utilizados no metabolismo secundário (adaptado de DEWICK, 2009).	5
Figura 3. Classes de flavonoides baseadas na posição de ligação do anel B na porção benzopirano. a. Flavonoide com numeração padrão dos átomos de carbono. b. Isoflavonoide. c. Neoflavonoide.....	6
Figura 4. Via biossintética dos flavonoides (Adaptado de DEWICK, 2009).....	8
Figura 5. Espectro de absorção na luz ultravioleta-visível da rutina.....	9
Figura 6. Representação esquemática dos núcleos produzidos a partir da L-ornitina. a. Núcleo pirrolidínico. b. Núcleo tropânico.	12
Figura 7. Biossíntese da higrina, primeiro alcaloide tropânico a ser formado a partir da L-ornitina.	12
Figura 8. Fotomicrografias em microscópio eletrônico de algumas partículas virais ilustrando suas morfologias (WOODS <i>et al.</i> , 1994).....	14
Figura 9. Planta indicadora de <i>Chenopodium amaranticolor</i> apresentando sintoma local (evidenciado pela seta branca - L) de pontos cloróticos induzidos pelo <i>Potato virus Y</i> , estirpe comum (PVY ⁰) isolado de <i>Physalis angulata</i> coletada em Mairiporã (SP). Foto: Alexandre L. R. Chaves (Instituto Biológico – SP)..	15
Figura 10. <i>Lactuca sativa</i> L. infectada (seta branca) por um complexo viral de <i>Lettuce big-vein associated virus</i> e <i>Mirafiori lettuce virus</i> apresentando sintoma de nanismo. Foto: Alexandre L. R. Chaves.	16
Figura 11. Inclusão citoplasmática em células de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun NN) infectadas com PVY (<i>Potato virus Y</i>) Retirado de SHAND <i>et al.</i> , 2009..	17
Figura 12. Absorbância em ensaio DAS-ELISA do extrato foliar de plantas de <i>P. angulata</i> infectadas com PVY por diferentes períodos de tempo.	29
Figura 13. Curva padrão de ácido ρ -cumárico para doseamento de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu de <i>P. angulata</i> obtida em espectrofotômetro de UV-vis a 760 nm.	30
Figura 14. Fenóis totais (em μg fenóis/mg de massa seca de planta) em folhas de <i>P. angulata</i> nos três tratamentos, tanto na infecção local quanto na sistêmica. Letras	

diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de um mesmo tipo de infecção.	30
Figura 15. Curva padrão de rotina para doseamento de flavonoides totais de <i>P. angulata</i> obtida em espectrofotômetro de UV-vis a 420 nm.	31
Figura 16. Flavonoides totais (em µg de flavonoides/mg de massa seca de planta) em folhas de <i>P. angulata</i> nas amostras da infecção local e sistêmica nos três tratamentos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de um mesmo tipo de infecção.	32
Figura 17. Cromatograma obtido em CLAE mostrando as cinco bandas (números cardinais) correspondentes a flavonoides.	33
Figura 18. Cromatografia em camada delgada (placa de celulose) desenvolvida com BAW (1ª e 3ª figuras) e ácido acético 15% (2ª e 4ª figuras) como fases móveis.	34
Figura 19. Cromatografia em camada delgada (placa de celulose) desenvolvida com ácido acético 15% como fase móvel. Da esquerda para a direita: um diglicosídeo (rotina), um monoglicosídeo (quercetina 3- <i>O</i> -galactosila), uma aglicona (quercetina), seguido das amostra.	35
Figura 20. Placa de celulose com os padrões de açúcares mais comumente encontrados nos flavonoides. Da esquerda para a direita: galactose, glicose, arabinose, xilose, ramnose e ácido glucurônico.	36
Figura 21. Hidrólise enzimática utilizando-se a β-hidroxilase e ácido acético 15% como fase móvel.	36
Figura 22. Espectro de absorção UV-visível da rutina obtida de <i>P. angulata</i> L. P: púrpura; A: amarelo; (o): ombro.	37
Figura 23. Espectro de absorção UV-visível do Campferol 4'- <i>O</i> -ramnosilglicosila obtido de <i>P. angulata</i> L. AA: amarelo alaranjado; A: amarelo; (o): ombro.	38
Figura 24. Espectro de absorção UV-visível do Campferol 3- <i>O</i> -ramnosilglicosila obtido de <i>P. angulata</i> L. AA: amarelo alaranjado; A: amarelo; (o): ombro.	39
Figura 25. Cromatografia em placa de celulose com agliconas dos padrões de flavonóis campferol, quercetina e miricetina; e agliconas dos flavonoides 3, 4 e 5.	40
Figura 26. Cromatogramas obtidos por CLAE e espectros em UV-vis. a. Aglicona do flavonoide 3. b. Padrão de quercetina. c. Sobreposição dos espectros em UV-vis do flavonoide 3 e do padrão de quercetina (352 nm).	41
Figura 27. Cromatogramas obtidos por CLAE (a, b e c) e espectros em UV-vis (d). a. Aglicona do flavonoide 4. b. Aglicona do flavonoide 5. c. Padrão de campferol. d.	

Sobreposição dos espectros em UV-vis dos flavonoides 4, 5 e do padrão de campferol (352 nm).	42
Figura 28. Cromatogramas dos extratos flavonoídicos brutos das folhas de <i>P. angulata</i> referentes aos tratamentos: a. Controle 1; b. Controle 2; c. Infectadas. Destaque em números cardinais (1 a 5) para as bandas correspondentes a flavonoides.....	43
Figura 29. Espectros em UV-visível das 5 bandas correspondentes a flavonoides no cromatograma do extrato bruto de <i>P. angulata</i> detectadas em $\lambda = 352$ nm. Os números cardinais (1 a 5) são correspondentes às bandas numeradas na Figura 17.	44
Figura 30. Curva padrão de rotina para quantificação de flavonoides obtida em CLAE.	45
Figura 31. Quantidade de cada um dos cinco flavonoides obtidos das folhas de <i>P. angulata</i> ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de planta). a. infecção local. b. infecção sistêmica.....	46
Figura 32. Comparação do teor de flavonoides totais obtido por espectrofotometria e por CLAE a. Infecção local. b. Infecção sistêmica.....	48
Figura 33. a. Cromatograma mostrando as três bandas correspondentes a alcaloides. b. Ampliação do cromatograma evidenciando o alcaloide 1. c. Ampliação do cromatograma evidenciando os alcaloides 2 e 3.	49
Figura 34. Espectros de massas utilizados para identificação dos três alcaloides obtidos de <i>P. angulata</i> . a. derivado de atropina. b. figrina. c. derivado de figrina.	50
Figura 35. Curva padrão de atropina para quantificação de alcaloides obtida em CG/EM.	51
Figura 36. Quantidade de cada um dos três alcaloides obtidos das folhas de <i>P. angulata</i> ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de planta). a. infecção local. b. infecção sistêmica..	52
Figura 37. Compostos flavonoídicos isolados de <i>P. angulata</i>	59

Lista de Tabelas

Tabela 1. Variação da absorção de luz ultravioleta-visível nos flavonoides. Dados retirados de MARKHAM (1982).	9
Tabela 2. Volumes usados no preparo da curva padrão de ácido ρ -cumárico para doseamento de fenóis totais.....	26
Tabela 3. Volumes usados no preparo da curva padrão de rutina para doseamento de flavonoides totais.....	26
Tabela 4. Volumes usados no preparo da curva padrão de rutina para doseamento de flavonoides por CLAE.....	27
Tabela 5. Volumes usados no preparo da curva padrão de sulfato de atropina para doseamento de alcaloides.	28
Tabela 6. Informações utilizadas para identificação dos flavonoides.	33
Tabela 7. Médias e desvios padrão das quantidades dos flavonoides encontrados em <i>P. angulata</i> nos três tratamentos na infecção local e na sistêmica.	47
Tabela 8. Valores de p encontrados na comparação entre os flavonoides nos diferentes tratamentos.	47
Tabela 9. Médias e desvios padrão das quantidades dos alcaloides encontrados em <i>P. angulata</i> nos três tratamentos na infecção local e na sistêmica.	53
Tabela 10. Valores de p encontrados na comparação entre os alcaloides nos diferentes tratamentos.	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Physalis angulata* L.

Physalis é uma palavra derivada do grego, na qual “*physa*” quer dizer bolha ou bexiga, fazendo referência ao cálice que encerra os frutos (TOMASSINI *et al.*, 2000). Esse gênero engloba plantas das quais são aproveitadas todas as partes, desde as raízes e folhas utilizadas medicinalmente, o fruto e até o cálice que pode ser utilizado em arte floral (RUFATO *et al.*, 2008). Em Alter do Chão – Pará, raízes de *P. angulata* são cozidas com as de urucu e açaí para o preparo de chás (BRANCH & SILVA, 1983). Suas folhas são utilizadas na medicina popular para tratar inflamações da bexiga, baço e icterícia, seu suco é utilizado como calmante e depurativo, além de ser útil contra males de reumatismo e dores de ouvido. Também é utilizada cozida para males do fígado e seu fruto é comestível, desobstruente, resolutivo e diurético (LORENZI, 1991).

Em um sistema agrícola, *P. angulata* (**Figura 1**) é considerada uma planta daninha rústica, a qual é pertencente à Solanaceae e nativa da América tropical com distribuição pantropical. Na África tropical, é encontrada praticamente em todos os países. No Brasil, ocorre em todas as regiões, sendo popularmente conhecida como bucho-de-rã, joá-de-capote, camapu, camambu, juá-de-capote, camapum, camaru, mata-fome, bate-testa, joá, juá-poca, balão-rajado e balão. É uma planta anual, herbácea, ereta, ramificada, possui o caule semi-suculento e glabro, medindo aproximadamente de 30 a 70 cm de altura e sua dispersão acontece através de sementes que possuem grande poder germinativo. Devido a sua boa adaptação, é encontrada com frequência infestando jardins, pomares, lavouras anuais e terrenos baldios (LORENZI, 1991; MAIRURA, 2008).

Figura 1. *Physalis angulata* apresentando sintomas de infecção viral, com detalhe para a flor (seta branca). Foto: Marcelo Eiras (Instituto Biológico – SP).

O camapu começou a ter importância econômica em 1985 na Colômbia, país com a maior produção mundial. Atualmente, essa planta constitui-se como excelente alternativa para pequenos e médios produtores no Brasil, podendo seu fruto ser comercializado “in natura” para a composição de saladas ou processado, por exemplo, em doces (MAIRURA, 2008).

No Brasil, o cultivo de espécies de *Physalis* se iniciou a partir de meados da década de 1990, havendo pouca informação a respeito dos aspectos fitossanitários dessa cultura. Recentemente, em área de cultivo comercial de *P. peruviana*, situada em Santa Maria (RS), foi relatada a primeira ocorrência natural do *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Tospovirus* (EIRAS *et al.*, 2012). Também já foi relatada a ocorrência natural do *Potato virus Y*, estirpe O (PVY^O), *Potyvirus*, em *P. angulata*, induzindo sintomas de mosaico severo (CHAVES *et al.*, 2010). Outro vírus que ocorre naturalmente em *P. angulata* no Brasil é o *Tomato chlorosis virus* (ToCV), induzindo clorose intervenal nas folhas inferiores da planta (FONSECA *et al.*, 2012). Além do PVY e do ToCV, foi isolado de *P. angulata* o *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Potyvirus*, na Costa do Marfim, induzindo amarelecimento das nervuras e mosaico (GIVORD, 1982). Essas infecções virais futuramente podem limitar o desenvolvimento desta cultura que possui elevado potencial para ser explorada comercialmente como frutífera e medicinal (RUFATO *et al.*, 2008).

Cientificamente, foi demonstrado que extratos aquosos das folhas e caules do camapu possuíam atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* (Theodor Escherich) (SANCHEZ *et al.*, 1997). Além disso, o extrato metanólico da flor foi descrito com atividade anti-inflamatória e antialérgica e o extrato do cálice, com atividade antineoplásica (RIBEIRO *et al.*, 2002; CHOI & HWANG, 2003). Extratos aquosos da raiz apresentaram efeito genotóxico *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2008). As atividades anti-leishmaniose e antimicobacteriana foram atribuídas às fisalinas, substâncias do grupo dos vitaesteroides que reproduzem o esqueleto do ergostano, um esteroide (TOMASSINI *et al.*, 2000; JANUÁRIO *et al.*, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2009). A citotoxicidade contra células cancerígenas foi uma atividade biológica detectada tanto pelo ensaio utilizando extrato metanólico das folhas, quanto no ensaio com a miricetina 3-*O*-neoesperidosídeo, um flavonoide isolado do camapu (ISMAIL & ALAM, 2001).

Além da miricetina 3-*O*-neoesperidosídeo, foi isolado da parte aérea e das raízes de espécies de *Physalis*, inclusive de *Physalis angulata*, um alcaloide pirrolidínico denominado figrina (*bis*-higrina) (BASEY *et al.*, 1992; ISMAIL & ALAM, 2001).

1.2. Metabolismo secundário

A denominação de metabolismo ‘secundário’ é histórica e acreditava-se que ele não era essencial para as plantas, produzindo substâncias que não seriam usadas na formação de novas células e cujas funções eram desconhecidas (PICHERSKY & GANG, 2000; HARTMANN, 2007). Seu estudo se iniciou em 1806 com o isolamento da morfina por Friedrich Wilhelm Sertürner e a partir disso foram isoladas muitas outras substâncias, influenciando e direcionando muitas áreas da química orgânica, particularmente a sintética, analítica e a química farmacêutica. Com isso, houve um avanço na indústria química e na descoberta de novas drogas (HARTMANN, 2007).

O metabolismo secundário das plantas pode ser definido por alguns autores como um metabolismo que biossintetiza compostos restritos a organismos específicos ou grupos de organismos, expressando a individualidade das espécies. Os metabólitos secundários não são produzidos necessariamente em todas as condições. Alguns estão envolvidos na proteção contra herbívoros ou patógenos, na atração de polinizadores e de animais dispersores de sementes ou na competição entre espécies de plantas (alelopatia). Apesar de nem todas as funções dos metabólitos secundários serem conhecidas, pode-se assumir que todos desempenham um papel vital para o bem-estar dos organismos que os produziram. Dessa maneira, a fim de evitar um sentido pejorativo para descrever esse

metabolismo, alguns autores referem-se aos seus metabólitos como produtos naturais de plantas, os quais fornecem a maioria das substâncias farmacologicamente ativas na produção de novas drogas (CROTEAU *et al.*, 2000; DEWICK, 2009).

A descoberta de novas drogas de origem vegetal é de suma importância, devido ao surgimento de novas doenças e à tolerância dos agentes nocivos às drogas atuais (POLLIER *et al.*, 2011). Uma vez que a procura tradicional por fármacos baseados em plantas medicinais demanda grande custo e tempo, tem-se buscado alternativas para a geração de novas moléculas, como por exemplo, a biossíntese combinatória na qual os produtos sintetizados por organismos diferentes são associados para produzir novas moléculas bioativas (LEWINSOHN & GIJZEN, 2009; POLLIER *et al.*, 2011). Para isso, é necessário um conhecimento aprofundado das vias metabólicas das plantas que, apesar de produzir grande diversidade de substâncias, possuem apenas algumas rotas metabólicas (LEWINSOHN & GIJZEN, 2009).

Para a biossíntese dos metabólitos secundários nas plantas são necessários ‘blocos construtores’ provenientes do metabolismo primário e, salvo raras exceções, está envolvida uma série de enzimas que catalisam as reações (DEWICK, 2009) (**Figura 2**).

Essa biossíntese pode sofrer alterações tanto de fatores abióticos quanto de bióticos, incluindo patologias que possam acometer as plantas (BRUNI *et al.*, 2005). A presença viral, por exemplo, pode acarretar mudanças quanti e qualitativas do perfil químico de óleos voláteis de diversas espécies (HUDAIB *et al.*, 2001; BRUNI *et al.*, 2007; NAGAI *et al.*, 2011). Entretanto, os trabalhos envolvendo a influência viral em outros metabólitos como flavonoides e alcaloides são escassos. Dessa forma, nessa dissertação serão abordadas com maior profundidade as vias metabólicas que envolvem ácido chiquímico e acetil-CoA na produção de flavonoides e o aminoácido L-ornitina na produção de alcaloides tropânicos e pirrolidínicos e sua interação com a presença viral.

Figura 2. Blocos construtores do metabolismo primário utilizados no metabolismo secundário (Adaptado de DEWICK, 2009).

1.2.1. Flavonoides

Flavonoide é um termo utilizado para descrever uma ampla classe de produtos naturais com estrutura que, na forma de aglicona (moléculas sem açúcares ligados), possui 15 átomos de carbono cuja configuração $C_6-C_3-C_6$ é conhecida como uma funcionalidade fenilbenzopirano, ou seja, dois anéis aromáticos convencionalmente denominados A e B ligados por três átomos de carbono centrais que podem ou não formar outro anel, denominado C. No benzopirano (anel A juntamente com os três carbonos centrais), o anel B pode se ligar em diferentes posições, sendo possível a

divisão em três classes: flavonoides, nos quais o anel B se liga ao benzopirano na posição 2; isoflavonoides, nos quais a ligação ocorre na posição 3; e neoflavonoides em que o anel B liga-se em 4 (**Figura 3**) (MARKHAM, 1982; GROTEWOLD, 2006).

Figura 3. Classes de flavonoides baseadas na posição de ligação do anel B na porção benzopirano. **a.** Flavonoide com numeração padrão dos átomos de carbono. **b.** Isoflavonoide. **c.** Neoflavonoide.

Essas substâncias possuem diversas funções que ainda são desconhecidas. Outras, no entanto, são funções-chave no desenvolvimento e no crescimento das plantas, sendo algumas muito importantes para a sua sobrevivência, como atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, ativação dos genes responsáveis pela formação de nódulos nas raízes das plantas pela bactéria *Rhizobium*, promoção do crescimento do tubo polínico, principalmente, pelos flavonóis, e interação com outras plantas e com micro-organismos (alelopatia). Também estão envolvidos na proteção contra herbívoros, fungos e bactérias, como as antocianinas presentes em folhas, e contra radiações UV. São potentes agentes antioxidantes, mitigam os efeitos de estresse, como presença de metais pesados no solo e déficit hídrico, promovem interações entre a planta e a rizosfera que podem atrair micro-organismos benéficos para a planta, como bactérias noduladoras ou fungos nas associações de micorriza, e também repelir micro-organismos patogênicos. Foi demonstrado que agliconas de flavonoides atuam na regulação do transporte de auxina pela planta. Uma função recente demonstrada para essas substâncias está relacionada à influência na expressão de alguns genes por agir nos receptores de hormônios localizados nas membranas nucleares ou então por mudar a atividade de proteínas reguladoras, como a tirosina quinase, que estão envolvidas na divisão celular (GOULD & LISTER, 2006).

Os flavonoides, em geral, são biossintetizados a partir de uma via mista, sendo parte da molécula derivada da via do ácido malônico e a outra parte, do ácido chiquímico. O ácido chiquímico é sintetizado a partir da eritrose 4-fosfato proveniente da fotossíntese e do fosfoenolpiruvato da glicólise. Ocorrem diversas reações e o ácido chiquímico origina o ácido corísmico, do qual é sintetizado o ácido prefênico. A partir

desse, é produzido o ácido arogênico que dá origem à fenilalanina. Esse aminoácido é desaminado, formando o ácido cinâmico, o qual passa por diversas reações, originando o 4-hidroxicinamoilCoA. À essa molécula, são adicionadas três unidades de acetato provenientes da via do ácido malônico que são condensadas originando o anel A, enquanto que o anel B e os três carbonos centrais são originados do 4-hidroxicinamoilCoA. Dessa união, são sintetizadas as chalconas, que agem como precursoras das flavanonas, di-hidroflavonóis, catequinas, antocianidinas, flavandióis, flavonas e flavonóis. Serão abordados com maior profundidade os flavonóis que estão destacados na **Figura 4**. Os flavonóis são o maior grupo dentro dos flavonoides e, juntamente com as flavonas, são os flavonoides mais comumente encontrados nas frutas e nos outros vegetais que consumimos na alimentação. Os flavonóis não afetam diretamente o processo fotossintético, mas atuam como sinais químicos ou guias de UV para atrair ou repelir insetos, funcionando também como filtros muito efetivos contra as radiações UV. Também atuam como copigmentos com as antocianinas, intensificando a coloração das flores (VICKERY & VICKERY, 1981; GOULD & LISTER, 2006; DEWICK, 2009; RIBANI *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009).

Figura 4. Via biossintética dos flavonoides (Adaptado de DEWICK, 2009).

Nas plantas, os flavonoides podem ocorrer em formas estruturais variadas, sendo mais comumente encontrados na forma de glicosídeos, no qual os açúcares ligam-se diretamente no anel benzênico por uma ligação carbono-carbono (*C*-glicosídeos) ou nas hidroxilas (*O*-glicosídeos). Ligações carbono-carbono são resistentes à hidrólise ácida, enquanto que ligações carbono-oxigênio são instáveis. A glicosilação dos flavonoides permite o armazenamento dessas substâncias nos vacúolos e as torna menos reativas. Em se tratando dos *O*-glicosídeos, a glicosilação pode ocorrer em qualquer hidroxila do núcleo do flavonoide, entretanto algumas posições estão mais propensas de serem glicosiladas, como a posição 7 nas flavonas e a 3 e 7 nos flavonóis. O açúcar mais

comumente encontrado é a glicose, mas outros açúcares também podem aparecer como a galactose, a ramnose, a xilose e a arabinose. É possível a ocorrência de di, tri e até tetrassacarídeos ligados às moléculas de flavonoides. Nos C-glicosídeos, foi encontrada com maior frequência a ligação dos açúcares nas posições 6 e 8, sendo mais prevalente a ocorrência de flavonas C-glicosiladas (MARKHAM, 1982).

Os flavonoides são substâncias que ocorrem praticamente em todas as plantas terrestres e em qualquer parte delas, incluindo folha, raiz, caule, pólen, néctar, flor, fruto e semente. Cerca de 2% de todo carbono fotossintetizado pelas plantas são convertidos nessas substâncias, tornando-as um dos maiores grupos naturais de fenóis. Devido à presença do grupamento fenil, um cromóforo excelente, o qual é ativo na luz ultravioleta, há bastante informação sobre o tipo de flavonoide e o padrão de oxigenação. O espectro ultravioleta-visível dos flavonoides consiste de dois máximos de absorção nas faixas de 240-285 nm (banda II) e 300-550 nm (banda I) (**Figura 5**) (MARKHAM, 1982; ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

Figura 5. Espectro de absorção na luz ultravioleta-visível da rutina (I - banda I; II – banda II).

Há diferença na absorção da banda I entre os flavonóis, cuja hidroxila ligada ao carbono 3 pode estar livre ou substituída, como mostra a **tabela 1**.

Tabela 1. Variação da absorção de luz ultravioleta-visível nos flavonoides. Dados retirados de MARKHAM (1982).

Tipo de flavonoide	Banda I (nm)	Banda II (nm)
Flavonol (3-OH livre)	350 – 385	250 – 280
Flavonol (3-OH substituído)	330 – 360	250 – 280

Os flavonoides encontrados em *Physalis* são bastante variados, podendo estar tanto na forma de glicosídeos quanto na de agliconas de flavonas e flavonóis. Nas folhas de *Physalis peruviana* L., já foram encontrados flavonóis di e triglicosilados, como o campferol-3-*O*-rutinosídeo, campferol-3-*O*-rutinosídeo-7-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo-7-*O*-glicosídeo (ELIGER *et al.*, 1992). Nos cálices de *Physalis alkekengi* L., foram obtidos flavonóis e flavonas tanto na forma de aglicona quanto glicosilados (QIU *et al.*, 2008). No extrato da parte aérea de *Physalis minima* L. foram isoladas flavonas metoxiladas e metiladas (SERR, 1988). Em *Physalis angulata*, foi reportada a ocorrência de um flavonol glicosilado, a miricetina 3-*O*-neoesperidosídeo, que possui atividade citotóxica contra células de câncer (ISMAIL & ALAM, 2001).

1.2.2. Alcaloides

Alcaloides são metabólitos secundários com propriedades alcalinas que contêm nitrogênio em anel heterocíclico, sendo que podem possuir em sua molécula aminas primárias, secundárias, terciárias ou grupos amônio quaternários. Possuem estrutura bastante complexa, são pouco solúveis em água e solúveis em etanol, clorofórmio, benzeno e éter e alguns podem ser tóxicos mesmo em doses pequenas. Devido à intensa ação fisiológica dessas substâncias, são amplamente utilizadas como drogas na cura da malária (quinina e cloroquinina) e do câncer (taxol, vincristina e vimblastina), podendo também promover a circulação do sangue no cérebro (vincamina). Aminoácidos, peptídeos, nucleosídeos, açúcares aminados e antibióticos não são considerados como alcaloides (ANISZEWSKI, 2007).

Essas substâncias interferem no sistema nervoso de animais, agindo em nível psicomental, podendo atuar como forma de proteção para as plantas contra os herbívoros (HARBORNE, 1998; ANISZEWSKI, 2007; DEWICK, 2009). A tendência de atribuir aos alcaloides somente a função de proteção na interação com outros organismos é muito simplista, embora seja fortemente comprovado esse tipo de atividade (ANISZEWSKI, 2007).

Os alcaloides são armazenados nos vacúolos, onde não são tóxicos. Fora desses locais, podem apresentar toxicidade. São encontrados em fungos, bactérias e até mesmo em animais, como sapos e salamandras. Muitos deles são acumulados em determinada família ou em algumas espécies de plantas relacionadas acarretando em nomes que

fazem referência à planta na qual o metabólito é amplamente encontrado, por exemplo, a estriquinina extraída de *Strychnos nux-vomica* L.; a atropina, de *Atropa belladonna* L. e a nicotina, de *Nicotiana tabacum* L.. Quando alcaloides de estrutura semelhante são encontrados em famílias sistematicamente muito distantes, deve-se levar em conta sua biossíntese que normalmente é diferente (VICKERY & VICKERY, 1981; HARBORNE, 1998; ANISZEWSKI, 2007).

Os precursores mais comuns dessas substâncias são os aminoácidos protéicos, sendo que os principais são a lisina, tirosina, fenilalanina, triptofano e histidina; e os não protéicos como a ornitina, ácido nicotínico e ácido antranílico. Entretanto, a biossíntese desses compostos pode ser muito mais complexa. Nessa biossíntese, o esqueleto carbônico do aminoácido é normalmente mantido intacto, podendo haver a perda do carbono do ácido carboxílico por descarboxilação. Os anéis que não contêm nitrogênio ou as cadeias laterais são derivados de unidades de terpeno e/ou acetato e os grupos metila são adicionados por metioninas. De acordo com essa biossíntese, eles podem ser divididos em três tipos: alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides, sendo que os dois primeiros tipos são derivados de aminoácidos e os últimos são derivados de precursores ou pós-cursors de aminoácidos. Nos alcaloides verdadeiros, o nitrogênio faz parte de um anel heterocíclico, enquanto que nos protoalcaloides, o nitrogênio não faz parte do anel (VICKERY & VICKERY, 1981; HARBORNE, 1998; ANISZEWSKI, 2007; DEWICK, 2009).

Em Solanaceae, os alcaloides mais comumente encontrados são os tropânicos, esteroidais, a nicotina, a higrina e muitas outras estruturas responsáveis por efeitos medicinais e alucinógenos (RAFFAUF, 1996). Um estudo investigando a presença de alcaloides em *Physalis* constatou o alcalóide pirrolidínico higrina (*bis*-higrina) na raiz e nas partes aéreas de várias espécies, dentre elas a *Physalis angulata*. Alcaloides similares à higrina são comumente encontrados em membros de Solanaceae (BASEY *et al.*, 1992; CHRISTEN, 2000).

Tanto os alcaloides tropânicos quanto os pirrolidínicos possuem atividade biológica vigorosa e são biossintetizados a partir de um aminoácido comum, a L-ornitina que é formada a partir do ácido glutâmico nas plantas (**Figura 2**). Nos pirrolidínicos, o esqueleto do alcalóide possui o núcleo pirrolidínico, enquanto que nos tropânicos esse núcleo é um substrato para a construção do núcleo tropânico (**Figura 6**). A primeira etapa para a biossíntese desses alcaloides é a descarboxilação da ornitina dando origem, nesse caso, a uma amina biogênica - putrescina - e essa reação é

realizada através da enzima piridoxal fosfato (PLP). A putrescina é, então, metilada através da SAM (*S*-adenosilmetionina). Logo após, é formado o cátion *N*-metil- Δ^1 -pirrolinium, o qual reage com moléculas de acetil-CoA, formando o primeiro alcalóide – a higrina (**Figura 7**). A partir da higrina, são formados outros alcalóides tropânicos e pirrolidínicos por meio de adições de moléculas de acetil-CoA, hidrólises e reações intermoleculares de Mannich (BASEY *et al.*, 1992; ANISZEWSKI, 2007, DEWICK, 2009).

Figura 6. Representação esquemática dos núcleos produzidos a partir da L-ornitina. **a.** Núcleo pirrolidínico. **b.** Núcleo tropânico.

Figura 7. Biossíntese da higrina, primeiro alcalóide tropânico a ser formado a partir da L-ornitina (Adaptado de DEWICK, 2009).

1.3. Fitovírus

Vírus são um conjunto de ácido nucleico (RNA ou DNA), envoltos por uma capa protetora de proteína ou lipoproteína (capsídeo) que se replicam apenas no interior de células hospedeiras apropriadas, o que os classificam como parasitas intracelulares obrigatórios (HULL, 2002). Sua nomenclatura é independente de outras nomenclaturas biológicas, sendo uma exceção no Código Internacional de Bionomenclatura (BioCode). O nome de um táxon viral não possui status oficial até que seja aprovado pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Os nomes aceitos de ordens, famílias, subfamílias e gêneros são escritos em itálico, com a primeira letra dos nomes escrita em maiúsculo. Nomes de espécies de vírus aceitos são escritos em itálico, geralmente em inglês e, somente a primeira letra da primeira palavra é maiúscula, com exceção de nomes próprios, que são grafados sempre com letra maiúscula (ICTV, 2011).

Os fitovírus, ou seja, vírus que infectam plantas, possuem como material genético DNA ou RNA, de fita simples ou dupla. A maioria possui RNA de fita simples que pode ser de senso negativo ou positivo. Esse último tipo possui a sequência que será utilizada como RNAm, traduzindo em uma proteína, enquanto que as fitas simples com senso negativo necessitam sintetizar uma fita complementar que será utilizada como RNAm (HULL, 2009).

As famílias, gêneros e espécies dos fitovírus possuem morfologias, propriedades bioquímicas e biológicas diferentes. Essas características são utilizadas na identificação do vírus, empregando-se, para tanto, técnicas laboratoriais específicas de observações ao microscópio eletrônico de transmissão, ensaios biológicos de transmissão por inoculação mecânica em espécies de plantas indicadoras e organismos vetores (insetos, ácaros, nematoides e fungos), relacionamento sorológico (capa proteica) e identificação molecular (ácido nucleico) (WALLER, 2002). Em relação a sua morfologia, os vírus podem ser isométricos, baciliformes, filamentosos rígidos ou filamentosos flexuosos (**Figura 8**) (FAUQUET *et al.*, 2005).

Figura 8. Fotomicrografias em microscópio eletrônico de algumas partículas virais ilustrando suas morfologias. Escala: a, b e c (x300.000); d (x 150.000) (WOODS *et al.*, 1994).

O genoma dos vírus de plantas está entre os menores dentre os genomas virais, codificando de uma a 12 proteínas que serão responsáveis pela replicação, estrutura viral, transmissão por invertebrados ou por fungos, supressão do sistema de defesa do hospedeiro e movimento célula-célula do vírus (HULL, 2002).

Os vírus de plantas codificam de uma a quatro proteínas capazes de realizar o movimento pelas células das plantas através dos plasmodesmos, possibilitando a propagação do vírus pelo hospedeiro (CARTER & SAUNDERS, 2007).

Os vetores mais comuns e mais importantes dos fitovírus pertencem à classe Insecta, ordem Hemiptera (HARRIS *et al.*, 2001). Afídeos, moscas brancas e cigarrinhas compreendem o maior grupo de vetores. Eles transmitem os vírus alimentando-se do conteúdo celular ou seiva das plantas. Isso ocorre, pois esses invertebrados perfuram diversas células da planta até escolherem uma na qual irão se alimentar, podendo, dessa forma, transmitir os vírus a essas células. Os vírus também podem ser transmitidos por nematoides que vivem no solo, por fungos parasitas de plantas, por sementes e por enxertia (CARTER & SAUNDERS, 2007).

É importante o estudo dos vírus que infectam plantas, pois eles causam grande prejuízo econômico, além de servirem como modelo para a exploração das interações desses patógenos com seus hospedeiros (HULL, 2009). O estudo *in vivo* dos vírus de

plantas é feito, na maioria dos casos, a partir de folhas verdes, pois nesses órgãos a concentração viral é 10 a 20 vezes maior que em outros órgãos (HULL, 2002).

A infecção viral pode ser denominada de local, pois como o próprio nome indica, é a infecção no local onde foi inoculado o vírus. Com o passar do tempo, o vírus se movimenta na planta e, através do sistema vascular, podem invadir outras folhas ou órgãos, caracterizando uma infecção sistêmica. Dessa maneira, os sintomas observáveis podem ser locais ou sistêmicos. Os sintomas locais (**Figura 9**) não são economicamente significantes, embora sejam importantes para experimentos biológicos (HULL, 2002).

Figura 9. Planta indicadora de *Chenopodium amaranticolor* apresentando sintoma local (seta branca) de pontos cloróticos induzidos pelo *Potato virus Y*, estirpe comum (PVY^O) isolado de *Physalis angulata* coletada em Mairiporã (SP). Foto: Alexandre L. R. Chaves (Instituto Biológico – SP).

Além de sintomas visíveis, a presença viral pode acarretar em mudanças histológicas e efeitos citológicos. Dentre estas alterações, estão as inclusões citoplasmáticas clássicas do tipo cata-ventos induzidas pelos potyvirus (HULL, 2002).

Em algumas doenças, os sintomas de uma invasão sistêmica viral normalmente estão combinados, refletindo, por exemplo: na diminuição do tamanho da planta infectada (**Figura 10**); em padrões de áreas com coloração verde clara e verde escura, caracterizando um mosaico; no amarelecimento e enrolamento das folhas, assim como o aparecimento de pontos anelares concêntricos ou de linhas irregulares nas folhas; em necrose; no desenvolvimento de anormalidades; na murcha das partes aéreas e na redução da fixação de nitrogênio feitas pelas bactérias em determinados grupos de plantas. Entretanto, as infecções virais nem sempre causam danos, devido à infecção com uma estirpe viral branda; a um hospedeiro tolerante; a folhas que escapam da

infecção por causa de sua idade ou posição na planta, entre outros fatores (HULL, 2002).

Figura 10. *Lactuca sativa* L. infectada (seta branca) por um complexo viral de *Lettuce big-vein associated virus* e *Mirafiori lettuce virus* apresentando sintoma de nanismo. Foto: Alexandre L. R. Chaves (Instituto Biológico – SP).

1.3.1. *Potyviridae*

Potyviridae é uma família de vírus que infectam plantas, caracterizada por apresentarem partículas virais filamentosas e flexuosas não envelopadas, que podem chegar até a 900 nm de comprimento e 11 a 15 nm de diâmetro. Quando infectam o hospedeiro, há a formação de inclusões citoplasmáticas que são utilizadas como um dos caracteres taxonômicos da família (**Figura 11**). Essas inclusões são uma matriz de proteína viral que possui atividade de ATPase e helicase, sendo utilizada na replicação viral (SHUKLA *et al.*, 1994; FAUQUET *et al.*, 2005).

Figura 11. Inclusão citoplasmática denominada como cata-ventos em células de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) infectadas com PVY (*Potato virus Y*). A barra representa 200 nm (Retirado de SHAND *et al.*, 2009).

O genoma viral é linear, de RNA de fita simples e senso positivo e traduz uma poliproteína que será, subsequentemente, clivada em outras proteínas estruturais e não estruturais (FAUQUET *et al.*, 2005). Porém, mais recentemente, uma pequena ORF (*open reading frame* - quadro de leitura), denominada pipo, que codifica para uma proteína de 7kDa foi descoberta em todos os membros de *Potyviridae* (CHUNG *et al.*, 2008).

Possui grande importância econômica, pois, muitos desses vírus podem, por si só, causar sérios prejuízos econômicos no rendimento e na qualidade das culturas de interesse econômico. Embora alguns vírus desta família normalmente causem infecção assintomática, muitos deles causam sintomas conspícuos, tanto permanentes quanto esporádicos. Quando ocorre uma infecção mista de mais de um *Potyviridae*, ou seja, mais de um vírus infectando simultaneamente o mesmo hospedeiro, normalmente há a ocorrência de doenças severas. Além disso, alguns desses vírus aumentam a susceptibilidade da planta a infecções por fungos e outros diminuem a nodulação por *Rhizobium* em espécies de leguminosas (SHUKLA *et al.*, 1994).

Potyviridae engloba oito gêneros: *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rimovirus*, *Tritimovirus*, *Brambyvirus*, *Poacevirus* e *Bymovirus* com 175 espécies no

total (ICTV, 2011). Dentre esses gêneros, o mais bem estudado e o com maior número de espécies é o *Potyvirus*, o qual, juntamente com *Macluravirus* é transmitido por intermédio de afídeos, além de possuir partículas virais com 680 a 900nm de comprimento. Esse gênero possui 146 espécies, sendo que a espécie tipo é o *Potato virus Y* (PVY) (FAUQUET *et al.*, 2005; ICTV, 2011).

1.3.2. *Potato virus Y* (PVY)

Essa espécie possui grande importância, pois pode causar perdas econômicas de 10 a 80% em algumas culturas. Na cultura da batata, é considerado o vírus que causa os maiores prejuízos na produção de tubérculos quanto às características agrônômicas desejáveis. Possui estirpes que infectam naturalmente solanáceas como a pimenta, o tabaco, o tomate, o camapu e outras espécies vegetais distribuídas por todo o mundo, mas com maior frequência nos países mais quentes. Essas estirpes podem ser enquadradas em quatro grupos principais, Y^O (estirpe comum ou “ordinary”), Y^N (estirpe necrótica), Y^{NTN} (estirpe que induz necrose severa em *Nicotiana tabacum*) e Y^C (estirpe clorótica), de acordo com os sintomas causados nas hospedeiras (FAUQUET *et al.*, 2005). Entretanto, algumas estirpes não se encaixam em nenhum desses grupos e são classificadas como estirpes intermediárias (SHUKLA, 1994; VALKONEN, 2007). De acordo com levantamentos realizados no Brasil, nas culturas de solanáceas há a prevalência da estirpe PVY^O acarretando prejuízos principalmente na cultura da batata (DANIELS & PEREIRA, 2004).

As partículas virais do PVY são filamentosas flexuosas, não envelopadas, variando de 730 a 740 nm de comprimento e 11 a 12 nm de diâmetro. Possui simetria helicoidal, contendo cerca de 6% de ácido nucleico que consiste de uma molécula de RNA de fita simples. Naturalmente, é transmitido de maneira não persistente por mais de 50 espécies de afídeos, sendo *Mysus persicae* (Sulzer) o vetor mais eficiente, sendo necessários apenas alguns segundos ou minutos de alimentação na planta infectada para que ocorra a sua aquisição e transmissão. Também pode ser transmitido pela troca de seiva em decorrência do atrito entre as folhas, durante os tratamentos culturais de poda e desbaste de ramos e frutos e por enxertia. A transmissão pela seiva ocorre em plantas sadias que estão localizadas a curtas distâncias de plantas infectadas. Dessa maneira, se houver um ferimento na folha devido ao contato das duas plantas intermediado pelo vento ou pelo homem, há a disseminação do vírus (KERLAN, 2006; VALKONEN, 2007; NOLTE *et al.*, 2009).

Os sintomas causados pelo PVY^O nas diferentes variedades da batata são diferentes, podendo induzir nanismo, mosaico, murchamento das folhas, deformação severa nas folhas e até mesmo a morte da planta. Em algumas variedades, os sintomas são moderados ou até mesmo ausentes quando então se denomina infecção latente. Algumas novas estirpes do PVY causam menos danos às folhas da batata, porém, atingem os tubérculos, necrosando-os (NOLTE *et al.*, 2009). Em *P. angulata*, o PVY^O causou mosaico severo em plantas naturalmente infectadas (CHAVES *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

Devido aos escassos estudos sobre a interferência viral no metabolismo secundário das plantas, esse projeto tem como objetivo geral avaliar a influência desses patógenos sobre alguns desses metabólitos. Para isso, utilizaremos como agente infectante o PVY - estirpe 0 (PVY^O) e *P. angulata* como hospedeira.

Os objetivos específicos são:

- a. Comparar quantitativamente os teores de fenóis totais em extratos foliares de plantas sadias e infectadas de *P. angulata*;
- b. Comparar quantitativamente os teores de flavonoides totais em plantas sadias e infectadas de *P. angulata*;
- c. Analisar a composição dos flavonoides em plantas sadias de *P. angulata* e compará-la com a de plantas infectadas;
- d. Comparar quantitativamente os teores de alcaloides totais em plantas sadias e infectadas de *P. angulata*;
- e. Analisar o perfil dos alcaloides em plantas sadias de *P. angulata* e compará-lo com o de plantas infectadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Botânico

Foram utilizadas plantas de *Physalis angulata* L. (Solanaceae) provenientes de sementes obtidas no mercado, as quais foram germinadas em terra esterilizada e mantidas em casa-de-vegetação com irrigação diária. Após germinação e quando apresentavam de duas a três folhas além das cotiledonares, as plantas foram transplantadas para vasos. Material testemunho da planta sadia foi depositado no Herbário do Instituto de Biociências da USP (SPF) (Santos 6).

3.2. Vírus (PVY, *Potyviridae*)

O vírus utilizado para infectar as plantas foi o *Potato virus Y* – estirpe O (PVY^O) – isolado de *P. angulata* proveniente de Mairiporã, SP e pertencente à viroteca do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Vegetal do Instituto Biológico, São Paulo.

Toda parte experimental envolvendo a infecção viral e as análises do vírus foram realizadas no Instituto Biológico sob orientação do Dr. Alexandre Levi Rodrigues Chaves.

3.3. Fonte de inóculo

O inóculo viral foi preparado a partir de folhas de *P. angulata* infectada, trituradas em almofariz, na proporção de 1g para 3mL de tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio 0,04M (TI – tampão de inoculação).

3.4. Determinação do pico máximo de infectividade em *P. angulata* por meio de DAS-ELISA

As plantas de *P. angulata* foram divididas em lotes correspondentes aos tratamentos de 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. Foram utilizadas três plantas por tratamento, as quais foram mantidas em casa-de-vegetação.

Os inóculos foram preparados como já descrito anteriormente (item 3.3) e 50µL desta preparação foram aplicados na terceira e quarta folhas acima das cotiledonares de *P. angulata* previamente polvilhadas com o abrasivo carborundum 400 mesh. As folhas inoculadas e as imediatamente acima de cada tratamento foram coletadas após os respectivos períodos de tempo de cada tratamento, pesadas e trituradas em saco plástico em presença de tampão de extração pH 7,4 [tampão fosfato de sódio (PBS) com tween 20 - PBST + 2% PVP] na proporção de 1g para 10mL, para posterior realização de teste sorológico denominado *Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* “DAS-ELISA” (ALMEIDA, 2001) para a verificação da infecção das plantas de *P. angulata* inoculadas e a determinação do pico máximo de concentração viral (dias).

Para tanto, foram utilizadas alíquotas de 50µL do antissoro contra o PVY^O (AGDIA), preparado na diluição de 1/200 em tampão carbonato pH 7,4, que foram aplicadas nos poços da placa de poliestireno e mantidas por 2h a 37°C. A seguir, a placa foi lavada por três vezes com PBS 0,1M, pH 7,2 acrescido de “Tween” 20 a 0,5% (PBST) para receber 50µL do extrato preparado em tampão de extração, na

concentração de 1/10 (P/V) a partir das folhas de *P. angulata* experimentalmente inoculadas e coletadas nos diferentes intervalos de tempo. Após incubação de 2h a 37°C, lavagem e secagem, foram adicionados 50µL de anti-imunoglobulina de coelho conjugada à enzima fosfatase alcalina, diluída em PBST + 2% PVP + 0,2% BSA (soro albumina bovina). A reação foi visualizada aplicando-se 50µL de *p*-nitrofenil fosfato (análogo ao substrato da enzima), dissolvido a 1mg/mL em tampão substrato. A intensidade da reação foi determinada por meio de leitura de absorbância a 405 nm em leitor de ELISA (Bio Rad, modelo 3550-UV). Para cada planta de *P. angulata* desafiada nos diferentes tratamentos, foram efetuadas triplicatas, considerando-as positivas quando a média da leitura da amostra infectada foi três vezes superior à média da amostra sadia (controle negativo).

3.5. Montagem do experimento para avaliação de alcaloides e flavonoides

Foram separados três lotes (Controle 1 – C₁, Controle 2 – C₂ e Tratadas - PVY) com 50 plantas cada. Cada lote foi dividido em cinco repetições (R1, R2, R3, R4 e R5), sendo que cada repetição foi formada por 10 indivíduos selecionados aleatoriamente. De cada indivíduo foram coletadas as folhas inoculadas (L) e as restantes (S). As análises em cada repetição (R1, R2, R3, R4 e R5) foram feitas juntando o material dos 10 indivíduos. Após secagem das folhas, a massa seca foi dividida, sendo metade utilizada para a extração de flavonoides e metade para extração de alcaloides.

Em C₁, as plantas não foram submetidas a qualquer tratamento. As plantas de C₂ foram friccionadas com o tampão fosfato (TF) 0,01 M, pH 7,0 com auxílio de pistilo, nas folhas do quarto e quinto nós acima das folhas cotiledonares. No lote PVY as plantas foram inoculadas com o vírus diluído em TF friccionando as folhas do quarto e quinto nós acima das folhas cotiledonares, conforme método utilizado por DUARTE *et al.* (2008).

As folhas para análise dos flavonoides e alcaloides foram coletadas no 21º dia, período de maior concentração do vírus na planta. Foram coletadas dos lotes C₂ e PVY tanto as folhas friccionadas com o TF (C₂ – L) e as inoculadas com o vírus (PVY – L), quanto as folhas que não foram friccionadas (C₂ – S) e inoculadas (PVY – S). Para o lote C₁ foram coletadas as folhas dos quarto e quinto nós acima das cotiledonares formando a amostra C₁ – L e, separadamente, as folhas restantes (C₁ – S).

As folhas friccionadas com o tampão e as inoculadas com o vírus (simbolizadas pela letra ‘L’ de local) foram coletadas separadamente das restantes (simbolizadas por

‘S’ de sistêmico) para que pudesse ser feita uma comparação entre as respostas observadas em nível local e sistêmico.

3.6. Monitoramento das plantas desafiadas com PVY^O

Um dia antes da coleta das folhas para extração dos metabólitos, uma pequena amostra de cada planta inoculada com o PVY foi triturada em saco plástico em presença de tampão de extração na proporção de 1g para 10mL para realização de DAS-ELISA, como descrito no item 3.4.

Apenas plantas infectadas foram coletadas para compor o tratamento I e foram separados números correspondentes de plantas para os tratamentos C₁ e C₂.

3.7. Extração de flavonoides

As extrações foram efetuadas a partir de folhas secas em estufa a uma temperatura de 40°C por 48h, as quais foram posteriormente pulverizadas com auxílio de nitrogênio líquido. Esse material foi submetido à extração com metanol 80% sob refluxo por 1 hora e depois filtrado, sendo esse procedimento repetido por três vezes. O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida até completa secura. O resíduo foi lavado com 1,0mL de tolueno, o sobrenadante coletado e o processo repetido por oito vezes. Após eliminação do tolueno, o resíduo foi acrescido de 2,0mL de metanol, deixado em banho-maria a 40°C por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e esse processo foi repetido por seis vezes. Os volumes de metanol coletados foram armazenados sempre juntos. Apenas a fração metanólica foi injetada no aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modificado de FURLAN *et al.*, 2010).

3.8. Extração de alcaloides

Essas substâncias foram extraídas de acordo com o método utilizado por DUARTE *et al.* (2008). Folhas secas e pulverizadas foram maceradas em 10mL de ácido acético glacial a 10% em etanol por 6 horas a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado diretamente para um funil de separação e o papel de filtro foi lavado por duas vezes com 5mL da solução citada acima. Em seguida, o extrato foi alcalinizado através da adição de hidróxido de amônio (NH₄OH) concentrado e foram adicionados 25mL de água. Então, 10mL de clorofórmio foram utilizados para extrair os alcaloides. Os alcaloides foram extraídos da solução clorofórmica, adicionando-se 5mL de ácido

sulfúrico 0,1M. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. Os extratos aquosos foram reunidos, novamente alcalinizados com NH_4OH concentrado e os alcaloides foram reextraídos por mais três vezes, com 5mL de clorofórmio. A solução clorofórmica final foi concentrada sob fluxo de nitrogênio.

3.9. Método de análise de flavonoides

Os flavonoides foram analisados em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – HP serie II 1090 - DAD, com coluna de fase reversa Zorbax C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm). O método de análise utilizado foi adaptado de MOTTA *et al.* (2005). A fração metanólica foi ressuspensa na concentração de 40mg/mL em metanol (pureza CLAE). Os solventes da fase móvel utilizados foram ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B) com o seguinte gradiente: 12% de B (0-5 minutos); 12% até 20% de B (5-8 minutos); 20% até 30% de B (8-20 minutos); 30% até 35% de B (20- 28 minutos); 35% até 50% de B (28-38 minutos); 50% até 65% de B (38-48 minutos) e 65% até 100% de B (48-50 minutos), isocrático por 5 minutos e decrescendo até 12% (55-60 minutos). O fluxo da fase móvel foi de 0,5mL/min até 48 minutos; 1,0mL/min de 50 a 55 minutos e 0,5mL/min de 56 a 60 minutos. A injeção foi de 50 μL e a detecção em $\lambda=352$ nm. Cada banda obtida no cromatograma foi submetida à varredura de 240 a 600 nm.

3.10. Método de análise de alcaloides

Para análise dos alcaloides, o método foi baseado em BRACHET *et al.* (1997). Às amostras previamente concentradas sob fluxo de nitrogênio, foram adicionados 50 μL de metanol e 1 μL dessa solução foi injetado em cromatógrafo gasoso (CG) - Agilent Technologies 6890N, em modo *splitless*, acoplado ao espectrômetro de massas (EM) Agilent 5975. As condições do cromatógrafo gasoso foram: temperatura inicial da coluna de 40°C por 2 minutos; aquecimento 30°C/min até 100°C; aquecimento de 10°C/min até 200°C; aquecimento de 5°C/min até temperatura final da coluna de 300°C, mantendo-se por 5 minutos. Tempo total de corrida 39 minutos. A coluna empregada foi a DB – 5 HT (30 m x 0,320 mm i.d. x 0,10 μm de filme). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de 1,4mL/min. A temperatura do injetor foi de 300°C. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram: temperatura da fonte = 230°C; temperatura do quadrupolo = 150°C; a voltagem da eletromultiplicadora (EM) foi de 70 eV; a amplitude de detecção de massa foi de 40 a 600 unidades de massa

atômica; com 2,62 scan/segundo.

3.11. Identificação de flavonoides

Para identificação dos flavonoides, foram utilizados 40g de folhas secas e pulverizadas de *P. angulata*, as quais foram submetidas à extração da mesma maneira como descrito no item 3.6. A fração metanólica diluída em metanol foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando-se polivinilpirrolidona (PVPP) como fase estacionária e metanol como fase móvel.

A partir desse extrato, foram obtidas 10 frações, as quais foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) – Agilent 1260, com coluna de fase reversa Zorbax C18 (4,6 x 250mm, 5µm) utilizando o mesmo método descrito no item 3.8. As frações com os flavonoides de interesse foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) – Agilent 1200, sendo cada componente coletado e liofilizado. Posteriormente à liofilização, os extratos foram ressuspensos em metanol, aplicados em placa de celulose e foi realizada a cromatografia em placa com as fases móveis ácido acético 15% e BAW para obtenção dos R_f (fator de retenção, retention factor – do inglês). Foi usada como referência uma amostra padrão de rutina.

Os flavonoides isolados foram analisados através de espectrofotometria de UV-visível (UV - 1650 PC - Shimadzu) em solução metanólica com acréscimo de reagentes ionizantes como hidróxido de potássio (KOH) e acetato de sódio (NaOAc) e complexantes como cloreto de alumínio ($AlCl_3$), ácido clorídrico (HCl) e ácido bórico (H_3BO_3) (MARKHAM, 1982).

Uma alíquota desses flavonoides livre de metanol foi utilizada para realizar a hidrólise por meio de processo ácido, adicionando-se cerca de 4mL de HCl 1N, deixando essa solução em banho seco a 95°C por 1 hora. As agliconas foram então separadas dos respectivos açúcares através de três extrações com 2mL de acetato de etila (AcOEt). A solução aquosa e a de acetato de etila foram evaporadas em banho-maria até a secura.

Os açúcares foram ressuspensos em água e aplicados em placa de celulose, sendo realizada a cromatografia em placa com a fase móvel piridina: acetato de etila: ácido acético: água (36:36:7:21) ao lado de amostras autênticas de ácido glucurônico, arabinose, galactose, glicose, ramnose e xilose (5mg/mL). Após a corrida, a placa foi nebulizada com solução de fosfato de anilina:acetona (2:3) e colocada em estufa a 100°C para visualização dos açúcares.

As agliconas foram confirmadas através de espectrofotometria de UV-visível, por CLAE e co-cromatografia em placa de celulose com os padrões de flavonóis campferol, quercetina e miricetina; e de flavonas apigenina e luteolina. Foi empregada como fase móvel clorofórmio: ácido acético: água (30:15:2).

Para a confirmação da posição relativa dos açúcares, foi feita a hidrólise enzimática com a β -glicosidase. Para isso, uma alíquota da amostra livre de metanol foi dissolvida em 1,5mL de tampão NaOAc pH=5,0, juntamente com a enzima, deixando a mistura “over night” a 37°C. Posteriormente, foram adicionadas 10 gotas de solução saturada de Na₂SO₄ e levou-se à centrifugação por 15 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi filtrado para outro tubo, acrescentando-se cerca de 2,0mL de MeOH. Novamente, esse tubo foi centrifugado e o sobrenadante filtrado para um vidro e evaporado em banho-maria. Para confirmar a hidrólise, foi realizada cromatografia em placa de celulose do hidrolisado e da amostra original glicosilada, empregando-se como fase móvel ácido acético 15%, visualizando-se sob luz UV.

3.12. Identificação de alcaloides

Os alcaloides foram identificados a partir do espectro de massas das bandas dos cromatogramas obtidos em CG/EM por comparação com espectros da literatura e com o auxílio da Dra Giuseppina Negri, especialista em química de produtos naturais.

3.13. Quantificação de fenóis totais

Os fenóis totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado de WATERMAN & MOLE (1994).

As amostras foram preparadas adicionando-se em tubos de ensaio 3,9mL de água destilada; 0,5mL do extrato metanólico de *P. angulata*, obtido no **item 3.6**; 0,25mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 0,75mL de solução saturada de carbonato de cálcio. Os tubos foram reservados por 2 horas, sendo posteriormente lidos em espectrofotômetro de UV-visível (UV - 1650 PC - Shimadzu) a 760 nm.

A quantificação foi feita comparando-se as absorbâncias das amostras com as obtidas numa curva padrão feita com ácido *p*-cumárico. Foram preparados dez tubos da mesma forma descrita acima, com volumes crescentes da solução padrão de ácido *p*-cumárico a 800µg/mL (solução PC) em metanol 80% (**Tabela 2**).

Tabela 2. Volumes usados no preparo da curva padrão de ácido *p*-cumárico para doseamento de fenóis totais.

Tubo	Solução PC* (800µg/mL) - mL	Metanol - mL	Quantidade de ácido <i>p</i>- cumárico (µg)
0	0	0,10	0
1	0,01	0,09	8
2	0,02	0,08	16
3	0,03	0,07	24
4	0,04	0,06	32
5	0,05	0,05	40
6	0,06	0,04	48
7	0,07	0,03	56
8	0,08	0,02	64
9	0,09	0,01	72
10	0,10	0	80

* Solução PC = solução de ácido *p*-cumárico

3.14. Quantificação de flavonoides totais

Para realizar a quantificação de flavonoides foi utilizado método adaptado de MOTTA *et al.* (2005). Foi preparada uma curva padrão com volumes crescentes de solução de rutina a 150µg/mL (solução R) (**Tabela 3**) diluídas em metanol, acrescidos de 0,5mL de solução aquosa de cloreto de alumínio. No preparo das amostras, foram adicionados em tubos eppendorf 0,5mL de extrato metanólico de *P. angulata* e 0,5mL de solução aquosa de cloreto de alumínio. Tanto os tubos referentes à curva padrão quanto os para as amostras foram reservados por 15 minutos e lidos em espectrofotômetro de UV-visível (UV - 1650 PC - Shimadzu) a 420 nm.

Tabela 3. Volumes usados no preparo da curva padrão de rutina para doseamento de flavonoides totais.

	Solução R* (150µg/mL) - mL	Metanol 80% - mL	Quantidade de rutina (µg)
0	0	0,500	0
1	0,010	0,490	1,5
2	0,015	0,485	2,25
3	0,020	0,480	3,0
4	0,025	0,475	3,75
5	0,050	0,450	7,5
6	0,100	0,400	15
7	0,150	0,350	22,5
08	0,200	0,300	30

* Solução R = solução de rutina

3.15. Quantificação de flavonoides obtidos por CLAE

Para quantificar cada flavonoide individualmente, foi preparada uma curva padrão com volumes crescentes de solução de rutina a 20µg/µL (solução R₂) diluídas em metanol com pureza CLAE e o volume corrigido para 1mL com o mesmo metanol utilizado para a diluição (**Tabela 4**). As amostras correspondentes a cada ponto foram injetadas em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – HP series II 1090 - DAD, com coluna de fase reversa Zorbax C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) nas mesmas condições descritas no **item 3.8**. De cada ponto, foram feitas três injeções de 5µL e foi feita média das áreas da banda correspondente à rutina.

Tabela 4. Volumes usados no preparo da curva padrão de rutina para doseamento de flavonoides por CLAE.

	Solução R₂* (20µg/µL) – mL	Metanol CLAE - mL	Quantidade de rutina (µg) injetada
1	0,02	0,98	2
2	0,03	0,97	3
3	0,04	0,96	4
4	0,05	0,95	5
5	0,10	0,90	10
6	0,20	0,80	20
7	0,30	0,70	30
8	0,40	0,60	40
9	0,50	0,50	50
10	0,60	0,40	60

* Solução R₂ = solução de rutina

3.16. Quantificação de alcaloides

Os alcaloides foram quantificados a partir de curva padrão obtida por injeção de quantidades crescentes do padrão de sulfato de atropina diluído em metanol, sendo o volume final completado para 1mL (**Tabela 5**). As amostras de cada ponto foram injetadas em cromatógrafo gasoso (CG) - Agilent Technologies 6890N, em modo *splitless*, acoplado ao espectrômetro de massas (EM) Agilent 5975 nas mesmas condições descritas no **item 3.9**. De cada ponto, foram feitas três injeções de 1µL e foi feita a média das áreas da banda correspondente ao sulfato de atropina.

Tabela 5. Volumes usados no preparo da curva padrão de sulfato de atropina para doseamento de alcaloides.

	Solução A* (1µg/µL) - mL	Metanol – mL	Quantidade de atropina injetada (µg)
1	0,10	0,90	0,10
2	0,20	0,80	0,20
3	0,30	0,70	0,30
4	0,40	0,60	0,40
5	0,50	0,50	0,50
6	0,60	0,50	0,60
7	0,70	0,30	0,70
8	0,80	0,20	0,80
9	0,90	0,10	0,90
10	1,00	0	1,00

* Solução A = solução de sulfato de atropina

3.17. Análises estatísticas

Às amostras cujos dados obedeciam aos pressupostos da ANOVA, foi aplicado esse teste com um nível de significância de 5%, sendo posteriormente utilizado o teste de Tukey-Kramer para comparação de médias, caso houvesse diferenças significativas. Para isso, foi utilizado o programa JMP 5.01.

Os resultados dos experimentos que não apresentavam homogeneidade de variâncias e normalidade de dados foram avaliados estatisticamente com o teste de Kruskal-Wallis com um nível de significância de 5% para verificar diferenças entre os tratamentos (R Development Core Team, 2012). Se os tratamentos diferissem entre si, foi utilizado um pacote do programa R para avaliar essas diferenças (GIRAUDOUX, 2011).

No teste do pico máximo de infectividade do PVY, foi utilizado o teste de Wilcoxon com um nível de significância de 5% para contrastar os dois períodos de alta concentração viral, utilizando-se o programa JMP 5.01.

4. RESULTADOS

4.1. Pico máximo de infectividade PVY^O

De acordo com o teste do pico máximo de infectividade do PVY em *P. angulata*, o período em que a concentração do vírus estava maior correspondeu ao 14º dia. Entretanto, a concentração viral no 21º dia também era alta. Não foi encontrada diferença significativa utilizando-se o teste de Wilcoxon a 5% de significância entre as

absorbâncias dos extratos do 14^o e 21^o dias. Dessa maneira, adotou-se o 21^o dia após a infecção para coleta do material, visando obtenção de maior biomassa, uma vez que as folhas estavam maiores na terceira semana após a inoculação do vírus.

Na **Figura 12** está ilustrado um gráfico que representa o pico máximo de infectividade do PVY^O em *P. angulata* com as absorbâncias do teste sorológico (DAS-ELISA) nos respectivos dias em que foram coletadas as folhas.

Figura 12. Absorbância em ensaio DAS-ELISA do extrato foliar de plantas de *P. angulata* infectadas com PVY^O por diferentes períodos de tempo.

4.2. Monitoramento das plantas

De acordo com o teste DAS-ELISA, todas as 50 plantas inoculadas com o PVY^O foram infectadas. Dessa maneira, os demais tratamentos continham 50 plantas cada.

4.3. Quantificação de fenóis totais

A partir da equação da reta obtida da curva padrão de ácido *p*-cumárico (**Figura 13**), os fenóis totais dos extratos metanólicos de *P. angulata* foram quantificados (**Figura 14**).

Figura 13. Curva padrão de ácido p -cumárico para doseamento de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu de *P. angulata* obtida em espectrofotômetro de UV-vis a 760 nm.

Figura 14. Fenóis totais (em µg fenóis/mg de massa seca de planta) em folhas de *P. angulata* nos três tratamentos, tanto na infecção local quanto na sistêmica. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de um mesmo tipo de infecção (infecção local – $p < 0,000$; infecção sistêmica – $p = 0,0014$). Controle 1 – plantas sem tratamento. Controle 2 – plantas friccionadas com o tampão fosfato. Infectadas – plantas friccionadas com inóculo viral.

Para comparar as médias das porcentagens dos fenóis totais nos diferentes tratamentos, tanto na infecção local quanto na sistêmica (**Figura 14**), foi realizado a ANOVA a 5% de significância, pois houve homogeneidade de variâncias e os dados possuíam distribuição normal.

De acordo com o teste estatístico, foi observado que a porcentagem de fenóis totais foi significativamente diferente entre os três tratamentos. Para analisar quais tratamentos diferiam entre si, foi realizado o teste de Tukey-Kramer a 5% de significância. Na infecção local, todos os três tratamentos diferiram entre si ($p < 0,0001$) no que diz respeito à porcentagem de fenóis totais. O controle 1 apresentou porcentagem de fenóis totais maior que o das infectadas que, por sua vez, teve sua porcentagem maior que o do controle 2 ($C_1 > I > C_2$).

Na infecção sistêmica, não houve diferença entre a porcentagem de fenóis totais do controle 1 e das infectadas, sendo que esses dois tratamentos apresentaram a porcentagem de fenóis totais maior que a do controle 2 ($p = 0,0014$).

4.4. Quantificação de flavonoides totais

A partir da equação da reta obtida da curva padrão de rutina (**Figura 15**), foi possível quantificar os flavonoides totais dos extratos metanólicos de *P. angulata*. Os resultados encontram-se na **Figura 16**.

Figura 15. Curva padrão de rutina para doseamento de flavonoides totais de *P. angulata* obtida em espectrofotômetro de UV-vis a 420 nm.

Figura 16. Flavonoides totais (em µg de flavonoides/mg de massa seca de planta) em folhas de *P. angulata* nas amostras da infecção local e sistêmica nos três tratamentos. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de um mesmo tipo de infecção. (infecção local – $p = 0,0039$; infecção sistêmica – $p = 0,0044$). Controle 1 – plantas sem tratamento. Controle 2 – plantas friccionadas com o tampão fosfato. Infectadas – plantas friccionadas com inóculo viral.

Na infecção local, os dados não possuíram normalidade e a homogeneidade de variância observada estava próximo ao limite em que não se consideraria que os dados apresentavam homogeneidade. Por essa razão, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%, o qual apontou diferença significativa entre os três tratamentos ($p = 0,0039$). Esses valores foram submetidos ao teste de comparação múltipla utilizando-se o pacote pgirmess no programa R. De acordo com esse teste, houve diferença significativa apenas entre o C_1 e C_2 .

Os dados para a infecção sistêmica apresentaram normalidade e homogeneidade de variância. Dessa forma, para analisar se houve diferença significativa entre os três tratamentos foi realizada a ANOVA a 5% de significância ($p = 0,0044$). De acordo com esse teste, foi observada diferença entre C_1 , C_2 e I. O teste de Tukey-Kramer usado para comparação de médias indicou que não houve diferença entre as médias dos teores de flavonoides totais de C_1 e de I, sendo essas maiores que a média de C_2 .

4.5. Identificação de flavonoides

Foram obtidos cinco flavonoides por CLAE nos três tratamentos (**Figura 17**).

Figura 17. Cromatograma obtido em CLAE mostrando as cinco bandas (números cardinais) correspondentes a flavonoides.

Na coluna de PVPP, foram encontrados flavonoides em quantidade suficiente em cinco faixas, os quais foram comparados com aqueles obtidos nos três tratamentos. Foi possível fazer a correspondência apenas dos três últimos flavonoides. Os flavonoides 1 e 2 não foram detectados nas faixas, não sendo possível a obtenção de informações adicionais, assim como as obtidas para os demais flavonoides. Observando-se o espectro em UV-vis dessas duas substâncias, pode-se sugerir que são glicosídeos de campferol.

Os flavonoides 3, 4 e 5 foram identificados com base nas informações contidas na **Tabela 6**. De acordo com as informações obtidas nessa tabela, é possível perceber que os flavonoides 4 e 5 são muito semelhantes em todas as características analisadas, diferindo a coloração de seus glicosídeos e também apresentam tempos de retenção distintos em CLAE.

Tabela 6. Informações utilizadas para identificação dos flavonoides.

	Flavonoide 3	Flavonoide 4	Flavonoide 5
Inflexões (nm)	255 (om), 266, 294 (om), 356	265, 294 (om), 346	265, 294 (om), 346
R _f ácido acético 15%	0.5	0.6	0.6
R _f BAW	0.6	0.6	0.6
Coloração UV/NH ₃	P/A	AA/A	P/A
Glicosídeo			
Coloração UV/NH ₃	A/A	A/A	A/A
Aglicona			
Açúcares	ramnose e glicose	ramnose e glicose	ramnose e glicose
Agliconas	Quercetina	campferol	campferol
Possível identificação	Rutina	campferol 4'-O- ramnosilglicosila	campferol 3-O- ramnosilglicosila

om=ombro; P=púrpura; A=amarelo; AA=amarelo alaranjado.

A **Figura 18** ilustra a cromatografia em placa de celulose desenvolvida com ácido acético 15% e BAW para realização do cálculo de R_f contido na **Tabela 6**.

Figura 18. Cromatografia em camada delgada (placa de celulose) desenvolvida com BAW (1ª e 3ª figuras) e ácido acético 15% (2ª e 4ª figuras) como fases móveis.

Na **Figura 18** é possível observar que o glicosídeo do flavonoide 3 é púrpura. Entretanto, a coloração dos glicosídeos dos flavonoides 4 e 5 não está bem representada. Foi feito outro teste, no qual o glicosídeo do flavonoide 4 apresentou a coloração amarelo-alaranjada e a substância 5 glicosilada apresentou coloração púrpura. As agliconas dos flavonoides 3, 4 e 5 são amarelas (**Figura 19**). Além disso, nota-se que os três flavonoides de *P. angulata* são diglicosilados, comparando-se seus R_f s com o da rutina, um diglicosídeo.

Figura 19. Cromatografia em camada delgada (placa de celulose) desenvolvida com ácido acético 15% como fase móvel. Da esquerda para a direita: um diglicosídeo (rutina), um monoglicosídeo (quercetina 3-*O*-galactosila), uma aglicona (quercetina), seguido das amostras.

A reação de hidrólise ácida possibilitou a quebra dos açúcares, sendo possível identifica-los através de cromatografia em placa de celulose. Observando-se a **Figura 20**, é possível afirmar que os açúcares presentes em *P. angulata* são a glicose e a ramnose.

A confirmação das posições relativas dos açúcares foi realizada através da hidrólise enzimática com a enzima β -glicosidase. Na **Figura 21**, é possível observar que os flavonoides glicosilados apresentaram maior R_f em comparação aos seus flavonoides hidrolisados correspondentes, indicando a ocorrência da hidrólise da glicose em posição terminal.

A partir das reações de deslocamento, foi possível obter mais informações a respeito das moléculas de flavonoides das amostras. Nas **Figuras 22, 23 e 24**, encontram-se informações sobre coloração, valores de R_f e valores de absorção de UV/visível das Bandas I e II em solução metanólica e com o acréscimo de alguns reagentes.

Figura 20. Placa de celulose com os padrões de açúcares mais comumente encontrados nos flavonoides. Da esquerda para a direita: galactose, glicose, arabinose, xilose, ramnose e ácido glucurônico.

Figura 21. Hidrólise enzimática utilizando-se a β -hidroxilase e ácido acético 15% como fase móvel.

MeOH -----
KOH —————

MeOH: 360; 258
MeOH + KOH: 416; 316 (o); 274
MeOH + NaOAc: 388; 324 (o); 274
MeOH + NaOAc + H₃BO₃: 380; 272
MeOH + AlCl₃: 434; 276
MeOH + AlCl₃ + HCl: 402; 364; 270
coloração (UV/NH₃) glicosídeo: P/A
aglicona: A
R_f ácido acético 15%: 0,5
BAW : 0,3

MeOH + AlCl₃ -----
MeOH + AlCl₃ + HCl —————

MeOH + NaOAc -----
MeOH + NaOAc + H₃BO₃ —————

Figura 22. Espectro de absorção UV-visível da rutina obtida de *P. angulata* L. P: púrpura; A: amarelo; (o): ombro.

Figura 23. Espectro de absorção UV-visível do campferol 4'-O-ramnosilglicosila obtido de *P. angulata* L. AA: amarelo alaranjado; A: amarelo; (o): ombro.

Figura 24. Espectro de absorção UV-visível do campferol 3-*O*-ramnosilglicosila obtido de *P. angulata* L.
 AA: amarelo alaranjado; A: amarelo; (o): ombro.

As agliconas foram confirmadas por cromatografia em placa de celulose como mostra a **Figura 25**. Além disso, as amostras foram injetadas em CLAE. O tempo de retenção e o espectro em UV-vis do flavonoide 3 foram comparados ao da quercetina (**Figura 26**); enquanto que para as substâncias 4 e 5, esses parâmetros foram comparados com o do padrão de campferol (**Figura 27**).

De acordo com as informações contidas nas **Figuras 26 e 27**, conclui-se que os flavonoide 3 é derivado de quercetina e os flavonoides 4 e 5, do campferol.

Figura 25. Cromatografia em placa de celulose com agliconas dos padrões de flavonóis campferol, quercetina e miricetina; e agliconas dos flavonoides 3, 4 e 5.

Figura 26. Cromatogramas obtidos por CLAE e espectros em UV-vis. **a.** Aglicona do flavonoide 3. **b.** Padrão de quercetina. **c.** Sobreposição dos espectros em UV-vis do flavonoide 3 e do padrão de quercetina (352 nm).

Figura 27. Cromatogramas obtidos por CLAE (a, b e c) e espectros em UV-vis (d). **a.** Aglicona do flavonoide 4. **b.** Aglicona do flavonoide 5. **c.** Padrão de campferol. **d.** Sobreposição dos espectros em UV-vis dos flavonoides 4, 5 e do padrão de campferol (352 nm).

4.6. Quantificação e análise de flavonoides por CLAE

Não houve diferença qualitativa no perfil cromatográfico dos flavonoides encontrados nos três tratamentos. Foram observadas cinco bandas cujas absorbâncias no UV a 352 nm correspondiam a flavonoides. Essas bandas foram encontradas em tempos de retenção de até 20 minutos aproximadamente, os quais são relativamente baixos em

comparação com o tempo total de corrida correspondente a 60 minutos (**Figura 28 e 29**).

Figura 28. Cromatogramas dos extratos flavonoídicos brutos das folhas de *P. angulata* referentes aos tratamentos: **a.** Controle 1; **b.** Controle 2; **c.** Infectadas. Destaque em números cardinais (1 a 5) para as bandas correspondentes a flavonoides. Controle 1 – plantas sem tratamento. Controle 2 – plantas friccionadas com o tampão fosfato. Infectadas – plantas friccionadas com inóculo viral.

Figura 29. Espectros em UV-visível das 5 bandas correspondentes a flavonoides no cromatograma do extrato bruto de *P. angulata* detectadas em $\lambda = 352$ nm. Os números cardinais (1 a 5) são correspondentes às bandas numeradas na Figura 28.

Utilizando a equação da reta obtida para a curva padrão de rutina em CLAE (**Figura 30**), foi calculada a concentração de cada um dos flavonoides em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de planta (**Figura 31**).

Figura 30. Curva padrão de rutina para quantificação de flavonoides obtida em CLAE.

Para comparar as quantidades de flavonoides nos diferentes tratamentos, tanto na infecção local quanto na sistêmica, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com um nível de significância de 5%, pois os dados não possuíam uma distribuição normal e na infecção local, não havia homogeneidade de variâncias. As quantidades dos flavonoides que apresentaram diferenças foram submetidas ao teste de comparação múltipla utilizando-se o pacote pgirmess no programa R.

Os resultados encontram-se na **Figura 31** e estão representados por letras diferentes para as quantidades de flavonoides que apresentaram diferenças significativas dentro dos tratamentos. Como pode ser observado, só houve diferença significativa na quantidade dos flavonoides na infecção sistêmica, com a diminuição nas plantas infectadas comparadas às sadias. Na infecção local não houve diferença entre as quantidades dos flavonoides nos três tratamentos.

As médias e os desvios padrão dos flavonoides, tanto da infecção local quanto da sistêmica encontram-se na **Tabela 7** e na **Tabela 8** estão os valores de p .

Figura 31. Quantidade de cada um dos cinco flavonoides obtidos das folhas de *P. angulata* ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de planta). **a.** infecção local. **b.** infecção sistêmica. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as quantidades de cada um dos flavonoides nos tratamentos. Controle 1 – plantas sem tratamento. Controle 2 – plantas friccionadas com o tampão fosfato. Infectadas – plantas friccionadas com inóculo viral.

Tabela 7. Médias e desvios padrão das quantidades dos flavonoides (μg flavonoide/mg planta) encontrados em *P. angulata* nos três tratamentos na infecção local e na sistêmica.

Tratamentos	Flavonoides					
	1	2	3	4	5	Total
Infecção local						
Controle 1	1,592 $\pm$ 0,246	2,289 $\pm$ 0,465	3,212 $\pm$ 1,511	0,740 $\pm$ 0,169	2,829 $\pm$ 0,836	10,662 $\pm$ 1,167
Controle 2	1,793 $\pm$ 0,385	2,013 $\pm$ 0,266	2,343 $\pm$ 1,582	0,837 $\pm$ 0,412	2,165 $\pm$ 1,038	9,151 $\pm$ 0,976
Infectadas	1,716 $\pm$ 0,883	1,917 $\pm$ 1,104	3,390 $\pm$ 2,662	0,999 $\pm$ 0,771	2,203 $\pm$ 1,507	10,225 $\pm$ 1,621
Infecção sistêmica						
Controle 1	6,015 $\pm$ 1,008	6,658 $\pm$ 1,405	8,081 $\pm$ 3,314	2,904 $\pm$ 0,671	8,476 $\pm$ 2,468	32,135 $\pm$ 2,738
Controle 2	4,257 $\pm$ 1,350	3,458 $\pm$ 1,328	2,867 $\pm$ 2,532	1,599 $\pm$ 1,481	3,199 $\pm$ 2,078	15,380 $\pm$ 1,881
Infectadas	2,782 $\pm$ 1,203	2,508 $\pm$ 1,088	1,802 $\pm$ 0,884	0,960 $\pm$ 0,593	2,470 $\pm$ 1,179	10,521 $\pm$ 1,144

Tabela 8. Valores de p encontrados na comparação entre os flavonoides nos diferentes tratamentos.

Flavonoides				
1	2	3	4	5
Infecção local				
0,0118	0,0104	0,0226	0,0263	0,0122
Infecção sistêmica				
0,8270	0,5117	0,4724	0,8781	0,6907

4.7. Comparação da dosagem de flavonoides totais (espectrofotometria x CLAE)

A dosagem de flavonoides totais foi realizada através da espectrofotometria utilizando o reagente de cloreto de alumínio. Por meio da CLAE, foram quantificados flavonoides isoladamente. Para fazer uma comparação entre os teores totais dessas substâncias obtidos por essas duas técnicas diferentes, foi feita a somatória de cada um dos cinco flavonoides obtidos por CLAE nos três tratamentos e comparados com os teores obtidos por espectrofotometria (**Figura 32**).

De acordo com a **Figura 32**, percebe-se que por meio da técnica da espectrofotometria a dosagem de flavonoides totais apresentou um valor maior em comparação à cromatografia líquida.

Figura 32. Comparação do teor de flavonoides totais obtido por espectrofotometria e por CLAE. **a.** Infecção local. **b.** Infecção sistêmica.

4.8. Identificação de alcaloides

Foram identificadas três bandas correspondentes a alcaloides nos cromatogramas (**Figura 33**). Esses alcaloides foram identificados a partir da análise dos seus espectros de massas (**Figura 34**). O alcaloide 1 foi parcialmente identificado como um derivado de atropina, pois possui o pico base com massa de 124 unidades de massa atômica (u.m.a), assim como a atropina, porém com íon molecular diferente. Os alcaloides 2 e 3

foram identificados, respectivamente, como figrina e derivado de figrina, devido ao pico base possuir 125 u.m.a e o íon molecular da figrina possui 280 u.m.a.

Figura 33. a. Cromatograma mostrando as três bandas correspondentes a alcaloides. **b.** Ampliação do cromatograma evidenciando o alcaloide 1. **c.** Ampliação do cromatograma evidenciando os alcaloides 2 e 3.

Figura 34. Espectros de massas utilizados para identificação dos três alcaloides obtidos de *P. angulata*. **a.** derivado de atropina. **b.** figrina. **c.** derivado de figrina.

4.9. Quantificação e análise de alcaloides

Foram quantificadas as bandas de alcaloides que foram integradas padronizando-se o *threshold* do equipamento para 13.6. Valores abaixo desse apresentavam cromatogramas muito poluídos e as bandas podiam ser confundidas com ruídos da linha de base.

Foi possível identificar, pelo espectro de massas, três bandas que correspondiam a moléculas de alcaloides. Essas bandas foram quantificadas, em μg alcaloide/mg planta, utilizando-se a equação da reta obtida para a curva padrão de atropina em CG/EM (**Figura 35**).

Figura 35. Curva padrão de atropina para quantificação de alcaloides obtida em CG/EM.

As quantidades, em μg alcaloide/mg planta, encontram-se na **Figura 36**.

Figura 36. Quantidade de cada um dos três alcaloides obtidos das folhas de *P. angulata* ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de planta). **a.** infecção local. **b.** infecção sistêmica. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as quantidades de cada um dos alcaloides.

Tanto na infecção local quanto na sistêmica, os dados não apresentaram distribuição normal e, na infecção sistêmica, os dados não possuíam homogeneidade de variâncias. Para comparar as quantidades de alcaloides nos diferentes tratamentos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com um nível de significância de 5%. As quantidades dos alcaloides que apresentaram diferenças foram submetidas ao teste de comparação múltipla utilizando-se o pacote pgirmess no programa R.

Na infecção local, apesar da quantidade do derivado de atropina ter aumentado nas plantas infectadas, esse aumento não foi significativo em comparação com as plantas sadias. Entretanto, houve aumento significativo da concentração dessa substância nas plantas infectadas comparado às plantas inoculadas com o tampão somente.

Na infecção sistêmica, houve aumento significativo apenas da concentração do derivado de atropina nas plantas infectadas comparadas às sadias.

As médias e os desvios padrão dos alcaloides, tanto da infecção local quanto da sistêmica encontram-se na **Tabela 9** e na **Tabela 10** estão os valores de p .

Tabela 9. Médias e desvios padrão das quantidades dos alcaloides (μg alcaloide/mg planta) encontrados em *P. angulata* nos três tratamentos na infecção local e na sistêmica.

Tratamentos	Alcaloides			
	1	2	3	total
Infecção local				
Controle 1	0,071 $\pm$ 0,029	0,038 $\pm$ 0,012	0,039 $\pm$ 0,011	0,149 $\pm$ 0,025
Controle 2	0,066 $\pm$ 0,025	0,053 $\pm$ 0,020	0,053 $\pm$ 0,020	0,172 $\pm$ 0,020
Infectadas	0,110 $\pm$ 0,014	0,057 $\pm$ 0,014	0,057 $\pm$ 0,007	0,223 $\pm$ 0,028
Infecção sistêmica				
Controle 1	0,025 $\pm$ 0,005	0,026 $\pm$ 0,009	0,022 $\pm$ 0,008	0,073 $\pm$ 0,007
Controle 2	0,028 $\pm$ 0,007	0,031 $\pm$ 0,001	0,031 $\pm$ 0,008	0,090 $\pm$ 0,007
Infectadas	0,069 $\pm$ 0,011	0,082 $\pm$ 0,046	0,082 $\pm$ 0,032	0,233 $\pm$ 0,031

Tabela 10. Valores de p encontrados na comparação entre os alcaloides nos diferentes tratamentos.

Alcaloides		
1	2	3
Infecção local		
0,0263	0,1013	0,0846
Infecção sistêmica		
0,0068	0,0292*	0,015*

*Apesar do teste de Kruskal-Wallis ter apontado diferença significativa, o teste realizado *a posteriori* não determinou que as diferenças se encontravam entre o tratamento com C₁ e I, mas entre os tratamento C₂ e I, que é inviável. Dessa forma, foi desconsiderado esses valores de p .

5. DISCUSSÃO

Os flavonoides e alcaloides extraídos de *P. angulata* apresentaram apenas variação quantitativa, não havendo a produção de substâncias novas ou a supressão daquelas já formadas, assim como observado em cultivares diferentes de batata infectados por patógenos (KRÖNER *et al.*, 2012).

Essas substâncias também apresentaram desvios padrão muito altos, provavelmente, pelo fato do cultivo dessa espécie ter se iniciado apenas em meados de 1990, não tendo passado pelos processos de melhoramento tradicional e genético, pelo homem, nos quais há a seleção artificial pelo homem de características desejáveis, resultando em numerosas variedades das culturas modernas (AKHOND & MACHRAY, 2009; CHAVES *et al.*, 2010). Além disso, as plantas utilizadas no experimento foram obtidas a partir de sementes, apresentando variabilidade genética por causa de mutações espontâneas, as quais as plantas vêm sofrendo ao longo de milhares de anos de evolução pela seleção natural (AKHOND & MACHRAY, 2009).

A quantificação de flavonoides totais de *P. angulata* obtida por CLAE somando-se os flavonoides isolados de cada tratamento apresentou valores até oito vezes maiores do que aquela obtida por espectrofotometria utilizando-se o reagente de cloreto de alumínio. Na espectrofotometria, o reagente de cloreto de alumínio forma complexos ácido-estáveis entre hidroxilas e grupamentos cetonas vizinhos; e complexos ácido-insolúveis com ortho-dihidroxilas (MARKHAM, 1982). Utilizando-se a cromatografia líquida, os flavonoides são detectados por luz UV-vis com DAD (diode array detector), pois essas substâncias possuem pelo menos um anel aromático que absorve luz UV (WAKSMUNDZKA-HAJNOS & SHERMA, 2011).

Observa-se que a técnica espectrofotométrica que utiliza o reagente de cloreto de alumínio apresenta dados com valores consideravelmente menores do que os reais para a quantificação de flavonoides totais, pois é uma técnica menos precisa em comparação com CLAE (WOISKY & SALATINO, 1998; GUEDES *et al.*, 2009). A quantificação de flavonoides de própolis utilizando a espectrofotometria apresentou valores de três até seis vezes menores em relação à técnica CLAE (BONVEHÍ & COLL, 1994). Da mesma forma, a quantificação de flavonoides totais pela técnica CLAE foi até mesmo maior que a quantificação de fenóis totais pelo espectrofotômetro utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Uma vez que os flavonoides são substâncias fenólicas, esse resultado mostra-se contraditório. Entretanto, isso ocorreu, pois são equipamentos diferentes com sensibilidades distintas. Quando comparadas as quantificações de fenóis totais e

flavonoides totais pelo espectrofotômetro, verificou-se que os valores obtidos para os flavonoides totais foram menores que os dos fenóis totais.

Nos próximos itens, serão discutidas as variações dos metabólitos frente à infecção viral.

5.1. Comparação de fenóis totais nos três tratamentos

Há uma hipótese a respeito do mecanismo de defesa das plantas frente a patógenos que prediz que os genótipos de hospedeiros resistentes tendem a sintetizar e/ou acumular maiores concentrações de fenólicos do que os susceptíveis quando expostos aos eliciadores de patógenos. Para sustentar essa hipótese, foi feito um experimento com cinco cultivares de batata, os quais eram expostos aos eliciadores de dois fungos diferentes, o *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall 1902) Patel and Kulkarni 1951 e o *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, sendo posteriormente analisados e quantificados os compostos fenólicos, como ácido clorogênico e rutina. Foi observado que houve aumento da concentração de substâncias fenólicas após o tratamento com eliciador do fungo, mas não houve a produção de outras substâncias, ou seja, houve apenas variação quantitativa de compostos fenólicos (KRÖNER *et al.*, 2012). Essa resposta também foi observada em plantas de milho (*Zea mays* L.) inoculadas com os fungos *Colletotrichum graminicola* (Ces.) e *Helminthosporium maydis* Nisik and Miy, havendo aumento expressivo de dois compostos fenólicos que ocorriam em concentrações muito baixas em plantas sadias (LYONS *et al.*, 1990). Em folhas de macieira (*Malus* spp.) infectadas pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., a produção do ácido clorogênico foi de 1,1 a 7,6 vezes maior do que nas folhas sadias (PETKOVŠEK *et al.*, 2009). Em folhas de arroz da variedade IR36 tratadas com isolados patogênicos e não patogênicos do fungo *Helminthosporium oryzae* Breda da Haan, também houve grande aumento de compostos fenólicos. Entretanto, quando as folhas de arroz eram tratadas com a toxina produzida por esse fungo, a concentração de compostos fenólicos diminuiu bruscamente, provavelmente, pelo fato da toxina suprimir o mecanismo de defesa da planta desempenhado pelo composto fenólico (VIDHYASEKARAN *et al.*, 1992).

Em *Datura stramonium* L. infectada pelo *Potato virus X*, houve diminuição dos compostos fenólicos nas folhas inoculadas com o vírus. Na infecção sistêmica, por outro lado, houve aumento do teor de fenóis nas plantas infectadas assim como ocorreu com plantas infectadas por fungos (DUARTE *et al.*, 2008).

De acordo com o descrito acima, a resposta da planta pode variar dependendo do patógeno. Na infecção por fungos, houve o aumento dos teores de fenóis totais nas plantas infectadas, enquanto que na infecção viral esse aumento ocorreu apenas na infecção sistêmica. Dessa maneira, os resultados obtidos para os teores de fenóis totais de *P. angulata* infectada pelo PVY^O foram similares aos obtidos por *D. stramonium* infectada por PVX, havendo diminuição dos compostos fenólicos nas folhas inoculadas com o vírus (infecção local), enquanto que nas folhas não inoculadas (infecção sistêmica) a concentração de fenóis totais foi maior em comparação com as sadias.

A resposta obtida nesse experimento pode ter ocorrido devido à replicação viral que pode ser diferente nas folhas inoculadas comparado às folhas não inoculadas. Nas folhas inoculadas, houve, provavelmente, a inibição da produção de compostos fenólicos que atuam na defesa da planta, assim como ocorreu com as folhas de arroz tratadas com a toxina produzida pelo fungo (VIDHYASEKARAN *et al.*, 1992), sendo necessários outros estudos que investiguem a causa da diminuição dos compostos fenólicos.

5.2. Identificação de flavonoides

Nos cromatogramas obtidos por CLAE, pode-se inferir que a maioria dos flavonoides de *P. angulata* é glicosilada, pois em uma coluna de fase reversa como a utilizada para essa análise, os grupos funcionais presentes na fase estacionária são de natureza apolar. Assim, os glicosídeos (substâncias mais polares) possuem interação fraca com esses grupos, sendo arrastados pela fase móvel e detectados em tempos de retenção relativamente baixos (COLLINS *et al.*, 2006). Essa informação é corroborada pela análise da cromatografia bidimensional, na qual o extrato metanólico bruto se deslocou menos na corrida com BAW em comparação com a corrida feita com ácido acético, que é mais polar que o BAW.

Os flavonoides 3, 4 e 5 isolados apresentaram R_fs similares tanto na fase móvel com ácido acético quanto com BAW. Observando-se o guia de distribuição dos tipos de flavonoides na cromatografia bidimensional com TBA (equivalente ao BAW) e ácido acético como fases móveis, sugere-se que os flavonoides poderiam ser flavonóis 3-O-di ou monoglicosilados. A sugestão de que os flavonoides pertençam à classe dos flavonóis foi baseada na absorção do espectro em UV-vis da banda I, a qual era maior ou igual a 346 nm. Caso essas substâncias pertencessem à classe das flavonas, o valor da absorção da banda no espectro de UV-vis seria menor, uma vez que a glicosilação,

especialmente em 3, 5, 7 e 4', causa mudanças das bandas I para comprimentos de ondas menores (MARKHAM, 1982).

Observando-se a **Figura 19**, confirma-se que os flavonoides de *P. angulata* são da classe dos flavonóis e possuem pelo menos dois açúcares ligados (diglicosídeos).

Através da hidrólise ácida e enzimática, foi demonstrado que os açúcares dos flavonoides de *P. angulata* são ramnose e glicose ligados a hidroxilas da molécula, uma vez que os C-glicosídeos não sofrem hidrólise. Esperava-se encontrar um diglicosídeo de miricetina, a miricetina 3-O-neoesperidosídeo que já foi isolado de *P. angulata*. Entretanto, os três flavonoides parcialmente identificados não corresponderam ao já isolado, embora pertençam à classe dos flavonóis. Em outras espécies de *Physalis*, é comum a ocorrência de glicosídeos (MARKHAM, 1982; ELIGER *et al.*, 1992; ISMAIL & ALAM, 2001; QIU *et al.*, 2008).

Por meio das informações das reações de deslocamento, foi possível ter uma noção da hidroxilação da molécula de flavonoide. Com a adição do hidróxido de potássio (KOH), reagente que ioniza as hidroxilas fenólicas na molécula do flavonoide, é possível saber se há hidroxilas na posição 4' do anel B se houver desvio batocrômico e aumento da intensidade da Banda I e/ou hidroxilas livres na posição 7 do anel A, caso ocorra o aparecimento de uma terceira Banda. Nas leituras dos três flavonoides isolados com esse reagente, houve desvio batocrômico e aumento da intensidade da Banda I em relação à leitura com o MeOH somente, indicando a presença de hidroxila na posição 4'. Além disso, houve o aparecimento da terceira Banda em todos eles também. Assim, afirma-se que a glicosilação dos flavonoides não ocorre na posição 7 (MARKHAM, 1982).

O acréscimo do acetato de sódio (NaOAc) à solução metanólica ioniza as hidroxilas mais ácidas. Isso fornece informações complementares da ocorrência de hidroxilas livres na posição 7 das flavonas, flavonóis e isoflavonas, caso ocorra desvio batocrômico entre 5 a 20 nm na Banda II. Caso o padrão de oxigenação seja em 6 ou 8, esse desvio é reduzido. Com a adição de ácido bórico (H_3BO_3) nessa solução, é possível obter informações a respeito de hidroxilas vicinais no anel B, pois o boro se complexa a esses pares de hidroxilas, acarretando em um desvio batocrômico entre 12 a 36 nm na Banda I em relação ao valor observado para a solução metanólica. Nas três moléculas de flavonoides do camapu, houve o desvio batocrômico entre 5 a 20 nm com a adição do NaOAc, confirmando a existência de uma hidroxila livre na posição 7. Em relação ao espectro referente à adição do H_3BO_3 , apenas o flavonoide 3 apresentou desvio

batocrômico de 12 a 36 nm, indicando *o*-dihidroxilas no anel B. Como os desvios para os flavonoides 4 e 5 foram menores, não há hidroxilas vicinais no anel B (MARKHAM, 1982).

A adição de cloreto de alumínio (AlCl_3) à solução metanólica, leva à formação de complexos entre todas as hidroxilas vicinais. Quanto maior for o número de complexos, maior será o desvio batocrômico. Desvios batocrômicos de 30 a 40 nm, em relação ao do metanol, significam *o*-dihidroxilas no anel B. Adicionando-se ácido clorídrico (HCl), os complexos são desfeitos, exceto os que envolvem o grupamento da posição 4 (complexo hidroxí-cetônico não é desfeito). Assim, as hidroxilas vicinais são detectadas caso ocorra desvio hipsocrômico da solução de (MeOH/HCl/ AlCl_3) em relação à solução de (MeOH + AlCl_3). No flavonoide 3, houve desvio batocrômico de 32 nm do espectro de AlCl_3 em relação ao de AlCl_3/HCl . Dessa maneira, confirmam-se as hidroxilas vicinais no anel B (*o*-dihidroxilas). Esse desvio não foi observado para os flavonoides 4 e 5. Nos três flavonoides, houve desvio batocrômico de mais de 40 nm da banda I em relação ao espectro de MeOH, indicando hidroxila livre em 5 (MARKHAM, 1982).

A coloração do glicosídeo e das agliconas também é fonte de informação a respeito da glicosilação das moléculas de flavonoides. Os glicosídeos dos flavonoides 3 e do 5 são púrpura, indicando substituição na posição 3 do anel C, enquanto que o glicosídeo do flavonoide 4 é amarelo-alaranjado, indicando que a posição 3 tem uma hidroxila livre. A glicosilação também não ocorre na posição 5 do anel A, pois os glicosídeos não eram azuis na luz UV.

Na hidrólise ácida não foi possível a identificação apenas dos açúcares. Também foi realizada cromatografia em placa de celulose com as agliconas ao lado de amostras autênticas de campferol, quercetina e miricetina. Além disso, as agliconas foram injetadas em CLAE e foi possível confirmá-las. O flavonoide 3 é derivado de quercetina, enquanto que os 4 e 5 são derivados de campferol.

A identificação do flavonoide 3 foi feita também através da comparação com amostra autêntica de rutina. No cromatograma obtido em CLAE, essas duas substâncias possuíram o mesmo tempo de retenção e o espectro de absorção em UV-visível foi muito similar (dados não mostrados).

Após a reação de hidrólise enzimática, foi possível saber a natureza da ligação do açúcar no flavonoide. Nessa reação, a enzima só hidrolisa glicoses terminais, não ocorrendo a hidrólise caso esse açúcar esteja presente no meio da cadeia. Como ocorreu

a hidrólise, presume-se que a ordem da ligação dos açúcares no flavonoide seja ramnose-glicose.

Juntando-se todas as informações acima descritas, chega-se a uma sugestão da estrutura dos flavonoides isolados de *P. angulata* que se encontra na **Figura 37**.

Figura 37. Compostos flavonoídicos isolados de *P. angulata*

5.3. Comparação de flavonoides nos tratamentos

Os flavonoides são compostos fenólicos. Dessa maneira, espera-se que sua síntese seja maior em plantas infectadas por patógenos em comparação com plantas saudáveis, assim como ocorre com outros fenólicos, os quais podem desempenhar papel de defesa contra patógenos (CROTEAU *et al.*, 2000).

Essa resposta foi observada em plantas de maçã (*Malus* spp.) infectadas pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint, nas quais houve aumento da concentração de flavonóis, como a rutina (quercetina 3-*O*-rutinosídeo) e a quercitrina (quercetina 3-*O*-ramnose) (PETKOVŠEK *et al.*, 2009).

O teor de flavonóis em frutos de *Vitis vinifera* L. var. Cabernet Sauvignon infectados com Grapevine leaf-roll-associated virus-3 (GLRaV-3) foi maior em relação ao de plantas saudáveis, em estágios anteriores ao amadurecimento do fruto. Entretanto, na fase de amadurecimento dos frutos de *V. vinifera*, houve a diminuição do teor de flavonóis (VEGA *et al.*, 2011). Dessa maneira, pode-se perceber que há variação dos metabólitos secundários em plantas infectadas comparadas com plantas saudáveis em diferentes estágios de maturação da planta.

A concentração de outro grupo de flavonoides, as antocianinas, em plantas de *V. vinifera* infectadas por GLRaV-3, foi menor em comparação com plantas saudáveis. Uma possível explicação para a diminuição do teor total de antocianinas nas plantas

infectadas de *V. vinifera* em comparação com as sadias, seria a diminuição da expressão dos principais genes da via de síntese dos flavonoides (VEGA *et al.*, 2011). Essa resposta foi similar àquela obtida a partir do teor de flavonoides de plantas de camapu infectadas comparadas com plantas sadias da mesma espécie. Nesse sentido, outros trabalhos que investiguem a expressão de genes em plantas infectadas e sadias do camapu, poderia explicar a diminuição do teor dos flavonoides.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* L.) infectada por *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV), assim como outras plantas infectadas tendem a acumular maior quantidade de açúcares, como amido e sacarose, em comparação com plantas sadias. Essa resposta decorre, provavelmente, do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmos mediado pela proteína de movimento do vírus, acarretando na diminuição do transporte dos açúcares para os órgãos drenos. Com isso, há o acúmulo de carboidratos não estruturais e a consequente diminuição da taxa fotossintética após alguns dias (LEHRER *et al.*, 2007). Como já foi explicado anteriormente, os metabólitos secundários das plantas são biossintetizados a partir de blocos construtores do metabolismo primário (**Figura 2**). Se os vírus tendem a diminuir a taxa fotossintética da planta devido ao acúmulo de carboidratos, isso levaria a uma consequente redução dos metabólitos secundários, o que poderia explicar a diminuição do teor de fenóis totais e de flavonoides nas plantas infectadas de *P. angulata*.

A diminuição dos teores de flavonoide foi observada em plantas de batata da variedade Igor (*Solanum tuberosum* cv. Igor) infectadas pelo PVY^{NTN}, as quais apresentaram concentração de rutina duas vezes menor em relação ao controle. Por outro lado, na variedade Sante houve pequeno aumento nessa concentração e na Desirée, pequena diminuição. A variedade Igor, a qual apresenta sintomas severos de infecção, havendo a maior redução do teor de rutina, é suscetível à infecção viral; a Desirée não apresenta sintomas severos de infecção e responde com pequena diminuição do teor de rutina, sendo uma variedade tolerante; e a Sante, na qual houve aumento desse teor, é resistente (KREFT *et al.*, 1999). Extrapolando-se esses resultados para as plantas de *P. angulata*, pode-se sugerir que elas sejam tolerantes à infecção viral, uma vez que não apresentaram sintomas severos da infecção por PVY e o teor de rutina foi significativamente menor nas plantas infectadas na infecção sistêmica.

Foi observado que o estresse causado pela fricção do tampão de inoculação nas folhas do camapu causou maior diminuição do teor de flavonoides do que o causado pela inoculação do vírus (infecção local). Dessa forma, percebe-se que a planta

responde de maneira distinta a um estresse causado por fator abiótico (simples fricção do tampão nas folhas) e por um fator biótico (presença de patógeno). Isso deve ocorrer, provavelmente, pois os vírus podem induzir a síntese de substâncias que servem como sinais intracelulares (eliciadores) que são detectados por receptores presentes na membrana plasmática. A percepção desses eliciadores inicia uma rede de transdução de sinais que leva à ativação da biossíntese *de novo* de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo secundário (ZHAO *et al.*, 2005).

Na infecção sistêmica, o teor de flavonoides foi menor nas plantas infectadas em comparação às sadias e às inoculadas com o tampão apenas. Dessa maneira, pode-se sugerir que os flavonoides não desempenham papel essencial na defesa da planta contra o vírus ou que o patógeno interfere em alguma etapa da biossíntese dessas substâncias, causando sua diminuição.

5.4. Comparação de alcaloides nos tratamentos

A infecção de *Senecio vulgaris* L. pelo fungo *Puccinia lagenophorae* Cooke não causou diferenças quantitativas nos alcaloides pirrolizidínicos extraídos da planta inteira e dos extraídos da parte vegetativa da planta. Entretanto, houve diminuição dessas substâncias nas raízes e nos capítulos foliares, que são os órgãos que mais sofrem com a ação herbívora (TINNEY *et al.*, 1998).

Em trabalho feito com plantas infectadas de *Amaranthus hypochondriacus* L. por *Ageratum enation virus*, foram analisados diversos metabólitos, comparando-os entre plantas sadias e infectadas. Assim como em outros trabalhos envolvendo infecção viral, não houve um padrão para a resposta frente ao patógeno, mas pôde-se notar a alteração metabólica. No trabalho feito com *A. hypochondriacus*, a concentração de alguns aminoácidos, como alanina, lisina e fenilalanina foi significativamente menor nas plantas infectadas (SRIVASTAVA *et al.*, 2012). Apesar de nenhum desses aminoácidos ser precursor dos alcaloides tropânicos e pirrolidínicos encontrados em Solanaceae, sua diminuição pode fornecer indicações do que ocorre com substâncias nitrogenadas em plantas infectadas por vírus.

Em folhas de *D. stramonium* inoculadas com o *Potato virus X*, também houve a diminuição de alcaloides totais em comparação com folhas sadias. A escopolamina encontrada em maior concentração nessa planta sadia, foi detectada apenas em traços nas plantas infectadas (DUARTE *et al.*, 2008). Dessa forma, apesar de não haver um padrão de resposta para os metabólitos secundários em plantas infectadas, parece haver

diminuição das substâncias nitrogenadas. Isso ocorre, provavelmente, pois a infecção viral leva a um desvio no uso dos aminoácidos e nucleotídeos do hospedeiro para a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos virais (HULL, 2009).

Plantas de *Datura metel* L. infectadas pelo PVY apresentaram diminuição de alcaloides totais. Além disso, a composição alcaloídica das plantas infectadas diferia das sadias, sendo produzidos novos alcaloides, enquanto outros estavam ausentes (EL-DOUGDOUG *et al.*, 2007).

Nesse experimento realizado com plantas de *P. angulata*, o derivado de atropina apresentou aumento nas plantas infectadas comparado às sadias na infecção local, embora esse aumento não tenha sido significativo. Essa mesma substância apresentou aumento significativo nas plantas infectadas em relação às sadias na infecção sistêmica. Frente a isso, pode-se sugerir que essa substância desempenha algum papel na defesa da planta contra o vírus.

A figrina e seu derivado apresentaram concentrações maiores nas plantas infectadas em comparação com C₁ e C₂ na infecção sistêmica. O teste feito *a posteriori* do Kruskal-Wallis não foi sensível o suficiente para detectar variações significativas entre essas substâncias, pois os desvios padrão nas plantas infectadas foram muito grandes, além do n amostral ter sido pequeno, pois o aumento do n amostral acarretaria na obtenção de uma quantidade de planta muito maior, o que inviabilizaria a extração das substâncias.

Sabe-se que os metabólitos secundários desempenham papel de defesa contra patógenos (WINK, 2009). É difícil estimar o custo energético para sua produção, pois há variação entre os diferentes compostos. Aqueles que contêm elementos limitantes, como nitrogênio, são mais custosos energeticamente e mais sensíveis a variações desses nutrientes no ambiente (SEIGLER, 1995). Embora sejam custosos, há um aumento na capacidade de sobrevivência da espécie (MAPLESTONE *et al.*, 1992). Dessa forma, o aumento da concentração de alcaloides nas plantas infectadas de *P. angulata* é bastante custoso energeticamente, mas esse custo parece ser recompensado pelo papel de defesa desempenhado por esses metabólitos.

6. CONCLUSÕES

Não houve variação qualitativa dos flavonoides e dos alcaloides, Porém, houve variação quantitativa dos metabólitos analisados nas plantas de *P. angulata*.

As respostas obtidas para o teor de fenóis totais, flavonoides totais e flavonoides obtidos por CLAE nos sítios de infecção viral local (folhas inoculadas) seguiram um padrão semelhante, com a maior porcentagem encontrada nas plantas em que não houve tratamento algum (C_1), seguida das plantas infectadas (I) e a consequente menor porcentagem nas plantas friccionadas apenas com o tampão de inoculação (C_2). Já os flavonoides obtidos por CLAE, na infecção sistêmica, não obedeceram a esse mesmo padrão, ocorrendo, de maneira geral, maior porcentagem dessas substâncias em C_1 , seguido de C_2 e em I, houve a menor porcentagem.

Se a resposta dos flavonoides fosse universal frente à infecção viral, os resultados obtidos nesse experimento seriam contraditórios aos da literatura. Entretanto, não é possível construir um quadro geral que explique a mudança metabólica do hospedeiro de um vírus, uma vez que diversos estudos sobre a interação vírus-hospedeiro já foram feitos e não foi observado um padrão. Como a resposta é variável na interação vírus-hospedeiro, seriam necessários outros estudos para explicar os motivos dos resultados obtidos.

Já foi descrita atividade citotóxica de um flavonoide de *P. angulata* contra células de leucemia, carcinoma e adenocarcinoma (ISMAIL & ALAM, 2001). Além dessa atividade, já foram descritas diversas outras para o camapu, como as citadas na introdução dessa dissertação. Dessa maneira, não é interessante que os metabólitos presentes na planta estejam em concentrações menores, o que poderia acarretar em menor atividade biológica. Assim, os resultados desse trabalho reforçam a importância do controle fitossanitário de plantas utilizadas como fonte para o preparo de extratos ou para o isolamento de substâncias com atividade descrita.

O efeito induzido pelo PVY^O no metabolismo secundário do camapu teve maior impacto na via das substâncias nitrogenadas, principalmente causando aumento significativo do derivado de atropina na infecção sistêmica e aparente aumento desse composto na infecção local. Seriam interessantes mais testes para o entendimento da função dessa substância na infecção viral, como a ação dessa substância isolada sobre inóculos contendo o PVY.

O entendimento de como os eliciadores dos patógenos são reconhecidos pelos receptores nas células; os passos da transdução de sinais para ativação da transcrição de genes envolvidos no metabolismo secundário e os fatores de transcrição envolvidos, podem levar à elaboração de estratégias para o aumento da síntese do metabólito

secundário de interesse, uma vez que essas substâncias são fonte para produção de fármacos, aditivos na alimentação, dentre outros produtos (ZHAO *et al.*, 2005).

RESUMO

Physalis angulata L. (Solanaceae), popularmente conhecida como camapu ou balãozinho, é uma espécie que vem ganhando importância econômica em decorrência de suas atividades biológicas, como citotóxica, antibacteriana e anti-inflamatória. Dentre os diversos metabólitos secundários conhecidos para esta espécie, destacam-se os flavonoides e alcaloides. É amplamente difundido que o metabolismo secundário das plantas pode ser alterado por fatores bióticos e abióticos. Nesse sentido, esse trabalho objetivou destacar a influência do *Potato virus Y*, estirpe O (PVY^O), isolado de camapu, no metabolismo secundário, avaliando as quantidades e os perfis de flavonoides e alcaloides também em plantas de camapu infectadas. A infecção viral foi induzida em plantas obtidas por sementes, os metabólitos foram extraídos a partir de folhas, foram analisados em CLAE e CG-EM e comparados com aqueles provenientes de plantas sadias. Não foram observadas diferenças qualitativas nos perfis tanto dos flavonoides quanto dos alcaloides. Por outro lado, houve diminuição no teor de flavonoides totais nas plantas infectadas na infecção sistêmica. Além disso, houve aumento significativo do derivado de atropina nas plantas infectadas em comparação com os demais tratamentos. Dessa forma, sugerimos que a infecção induzida pelo PVY^O em plantas de camapu teve maior impacto na via das substâncias nitrogenadas em relação às fenólicas.

SUMMARY

Physalis angulata L. (Solanaceae), popularly known as “camapu” or “balãozinho”, has become economically important due to its biological activities, such as cytotoxic, antibacterial and anti-inflammatory. Among the secondary metabolites, flavonoids and alkaloids have already been described for this species. Secondary metabolism can be influenced by both biotic and environmental agents. The main goal of this work was to analyze the influence of *Potato virus Y* (PVY^O) on the secondary metabolism of infected “camapu” plants, evaluating total amount and profiles of flavonoids and alkaloids. Viral infection was induced in plants obtained from seeds. The compounds were extracted from leaves, analyzed in HPLC and GC/MS and compared with those

from healthy plants. There were no qualitative differences between healthy and infected plants concerning to alkaloid and flavonoid profiles. On the other hand, it was noticed a lower flavonoid concentration in the systemic infection of infected plants. An increase of an atropine derivative was observed in infected plants. In conclusion, according to the results we propose that the PVY^O induced infection in plants of “camapu” had stronger impact on the nitrogenous compounds than on phenolics.

REFERÊNCIAS

AKHOND, M. A. Y.; MACHRAY, G. C. Biotech crops: technologies, achievements and prospects. **Euphytica**. v.166, p.47-59, 2009.

ALMEIDA, A.M.R. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitopatologia**. In: ALMEIDA, A.M.R. & LIMA, J.A.A. (Eds.) EMBRAPA Soja, Londrina, 186 p., 2001.

ANDERSEN, O. M., MARCKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. New York. 2006. 1128p.

ANISZEWSKI, T. **Alkaloids - secrets of life**. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Elsevier. Holanda. 2007. 334 p.

BASEY, K.; MCGAW, B. A.; WOOLEY, J. G. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. **Phytochemistry**. v.31, n.12, p. 4173-4176, 1992.

BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Phenolic composition of propolis from China and South America. **Zeitschrift für Naturforschung – section C**. v. 49, p.712-718, 1994

BRACHET, A.; MUÑOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J. C.; CHRISTEN, P. Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem bark. **Phytochemistry**. v.43, n.08, p.1439-1442, 1997.

BRANCH, L. C.; SILVA, M. F. Folk medicine of Alter do Chão, Pará, Brazil. **Acta amazonica**. v.13, n.05-06, p.737-797, 1983.

BRUNI, R.; PELLATI, F.; BELLARDI, M.G.; BENVENUTI, S.; PALTRINIERI, S.; BERTACCINI, A.; BIANCHI, A. Herbal drug quality and phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infections. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n.04, p. 964-968, 2005.

BRUNI, R.; BIANCHI, A.; BELLARDI, M. G.; Essential oil composition of *Agastache anethiodora* Britton (Lamiaceae) infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV). **Flavour and fragrance journal**. v.22, n.01, p.66-70, 2007.

CARTER, J.; SAUDERS, V. **Virology** – principles and applications. Trento, John Wiley & Sons Ltd, 2007, 358p.

CHAVES, A.L.R., GARCÊZ, R.M., EIRAS, M.,COLARICCIO,A., GALLETI, S.R. Infecção natural do *Potato virus Y* em *Physalis angulata*. *Summa Phytopathologica*, v. 36, nº47, 2010.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **J. ethnopharmacol.** v.89, n.01, p. 171-175, 2003.

CHRISTEN, P. Tropane alkaloids: old drugs used in modern medicine. **Studies in natural products chemistry**. v.22, p.717-749, 2000.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006.

CROTEAU R.; KUTCHAN T.M.; LEWIS N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, p.1250-1318.

DANIELS, J.; PEREIRA, A. S. Resistência de genótipos de batata ao vírus do enrolamento das folhas de batata (PLRV) e ao vírus Y (PVY). **Horticultura brasileira**. v.21, p.521-524, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd, 2009. 546 p.

DUARTE, L. M. L.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; NEGRI, G.; BARRADAS, M. M. Effect of *Potato virus X* on total phenol and alkaloid contents in *Datura stramonium* leaves. **Summa Phytopathol.** v.34, n.01, p. 65-67, 2008.

EIRAS, M.; COSTA, I. F. D.; CHAVES, A. L. R.; COLARICCIO, A.; HARAKAVA, R.; TANAKA, F. A. O.; GARCÊZ, R. M.; SILVA, L. A. First report of a tospovirus in a commercial crop of capegooseberry in Brazil. **New Disease Report**, v.25, p.25, 2012.

EL-DOUGDOUG, K. A.; MOHAMED, H.; ABO-SENNA, A. Effect of PVY viral infection on alkaloid contents of cultivated medicinal plants. **Journal of applied sciences research.** v.3, n.07, p.558-563, 2007.

ELIGER, C. A.; EASH, J. A.; WAISS Jr, A. C. Kampferol and querecetin di and triglycosides from *Physalis peruviana* leaves. **Biochemical Systematics and Ecology.** v.20, n.03, p.268, 1992.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. **Virus taxonomy**: Classification and nomenclature of viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 1259 p., 2005.

FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; ABREU, H.; NOGUEIRA, I.; PEREIRA-CARVALHO, R. C. *Physalis angulata*: A New Natural Host of *Tomato chlorosis virus* in Brazil. **Plant disease.** 2012. In press. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-06-12-0593-PDN>>. Acesso em: 21set. 2012.

FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; MOTTA, L. B.; DOMINGOS, M.; SALATINO, A. Guava flavonoids and the effects of industrial air pollutants. **Atmospheric pollution research.** v.01, p.30-35, 2010.

GIRAUDOUX, P. pgirmess: Data analysis in ecology. R package version 1.5.2. <http://CRAN.R-project.org/package=pgirmess>, 2011.

GIVORD, L. Pepper Veinal Mottle Virus in the Weed *Physalis angulata* in the Ivory Coast. **Plant disease**. v.66, p.1081-1082, 1982.

GUEDES, C. C.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; SILVA, C. S. Avaliação da utilização da espectrofotometria de UV/vis na quantificação de antibióticos em extractos de leite de vaca. **Revista da faculdade de ciência da saúde**. v.06, p.232-243, 2009.

GUIMARÃES, E. T.; LIMA, M. S.; SANTOS, L. A.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. B. C.; SANTOS, R. R.; SANTOS, W. L. C.; SOARES, M. B. P. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. **J. antimicrob. chemother.** v.64, n.01, p. 84-87, 2009.

GOULD, K. S.; LISTER, C. Flavonoid functions in plants. In: Andersen, O. M., Marckham, K. R. (Editors). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. New York. CRC Press, 2006. p. 397-441

GROTEWOLD, E. The genetics and biochemistry of floral pigments. **Annu. Rev. Plant Biol.** v.57, p.761-802, 2006.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods** – a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall. London. 1998. 302p.

HARRIS, K.; SMITH, O.; DUFFUS, J. **Virus-insect-plant interactions**. 1st ed, Academic Press: Texas, 2001, 376p.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemical: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**. v.68, p.2831-2846, 2007.

HUDAIB, M.; BELLARDI, M. G.; RUBIES-AUTONELL, C.; FIORI, J.; CAVRINI, V. Chromatographic (GC-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV-1. **Il Farmaco**. v.56, n.03, p. 219-227, 2001.

HULL, R. **Matthews' plant virology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 2002.1001p.

HULL, R. **Comparative plant virology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2009. 376p.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>> Acesso em 10 abr. 2011.

ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**. v.72, n.06, p. 676-679, 2001.

JANUÁRIO, A. H.; RODRIGUES FILHO, E.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytotherapy research**. v.16, p.445-448, 2002.

KERLAN, C. *Potato virus Y*. C.M.I./A.A.B. *Description of plant viruses*, n°414, 2006.

KRÖNER, A.; MARNET, N.; ANDRIVON, D.; VAL, F. Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. **Plant physiology and biochemistry**. v.57, p.23-31, 2012.

KREFT, S.; POMPE, M.; RAVNIKAR, M.; UMEK, A.; STRUKELJ, B. Accumulation rate of rutin is decreased after infection of susceptible potato cultivar with PVY^{NTN}. **Phyton (Austria)**, v.39, p.259-264, 1999.

LEHRER, A. T.; MOORE, P. H.; KOMOR, E. Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) on the carbohydrate status of sugarcane: Comparison of virus-free plants with symptomatic and asymptomatic virus-infected plants. **Physiological and molecular plant pathology**. v.70, p.180-188, 2007.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M. Phytochemical diversity: the sounds of silent

metabolism. **Plant science**. v.176, p.161-169, 2009.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1991.

LYONS, P. C.; WOOD, K. V.; NICHOLSON, R. L. Caffeoyl ester accumulation in corn leaves inoculated with fungal pathogens. **Phytochemistry**. v.29, p.97-101, 1990.

MAIRURA, F.S., 2008. *Physalis angulata* L. [Internet] Record from Protabase. SCHMELZER, G.H. & GURIB-FAKIM, A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. <<http://database.prota.org/search.htm>>. Accessed 22 February 2012.

MAPLESTONE, R. A.; STONE, M. J.; WILLIAMS, D. H.; The evolutionary role of secondary metabolites - a review. **Gene**. v.115, p.151-157, 1992.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic press. London. 1982. 113p.

MOTTA, L. B.; KRAUS, J. E.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. **Biochemical and systematic ecology**. v.33, p. 971-981, 2005.

NAGAI, A.; DUARTE, L. M. L.; SANTOS, D. Y. A. C. Influence of viral infection on essential oil composition of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). **Natural product communications**. v.06, n.08, p.1189-1192, 2011.

NOLTE, P.; ALVAREZ, J. M.; WHITWORTH, J. L. *Potato virus Y* management for the seed potato producer. University of Idaho Extension. 2009. 8p.

PETKOVŠEK, M. M.; ŠTAMPAR, F.; VEBERİČ. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Physiological and molecular plant pathology**. v.64, p.60-67, 2009.

PICHERSKY, E.; GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in plant science**. v.05, n.10, p.439-445, 2000.

POLLIER, J.; MOSES, T.; GOOSSENS, A. Combinatorial biosynthesis in plants: A (p)review on its potential and future exploitation. **Natural Products Rep**. v.28, p.1897-1916, 2011.

QIU, L.; ZHAO, F.; JIANG, Z. H.; CHEN, L.X.; ZHAO, Q.; LIU, H.X.; YAO, X. S.; QIU, F. Steroids and flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetti* and their inhibitory effects on nitric oxide production. **J. Nat. Prod.** v.71, p.642-646, 2008.

RAFFAUF, R. F. **Plant alkaloids**: a guide to their discovery and distribution. Food Products Press. New York. 1996. 278p.

RIBANI, R. F.; HUBER, L. S.; AMAYA, D. B. R. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of food composition and analysis**. v.23, p. 263-268, 2009.

RIBEIRO, I.M.; SILVA, M.T.G.; SOARES, R.D.A.; STUTZ, C.M.; BOZZA, M.; TOMASSINI, T.C.B. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*, evaluation from it's stems and fruit capsules. **Revista brasileira de farmacognosia**. v.12, supl., p.21-23, 2002.

RUFATO, L.; RUFATO, A. R.; SCHLEMPER, C.; LIMA, C. S. M.; KRETZSCHMAR, A. A. LAGES: CAV/UDESC. **Aspectos técnicos da cultura de *Physalis***. 2008. 100p.

SANCHEZ, E. G.; SILVA, M. T. G.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. C. B. Evaluation of the antibacterial activity of *Physalis angulata* L. extracts. **Boll Chim Farm** 2: 136; p. 154, 1997.

SANTOS, R. A.; CABRAL, T. R.; CABRAL, I. R.; ANTUNES, L. M. G.; ANDRADE, C. P.; CARDOSO, P. C. S.; BAHIA, M. O.; PESSOA, C.; NASCIMENTO, J. L. M.; BURBANO, R. R.; TAKAHASHI, C. S. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L.

(Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell.** v.32, n.02, p.195-200, 2008.

SEIGLER, D. S. **Plant secondary metabolism.** Kluwer Academic publisher: Massachusetts. 1995. 761p.

SERR, N. A. Flavonoids from *Physalis minima*. **Phytochemistry.** v.27, n.11, p.3708-3709, 1988.

SHAND, K.; THEODOROPOULOS, C.; STENZEL, D.; DALE, J. L.; HARRISON, M. D. Expression of *Potato virus Y* cytoplasmic inclusion protein in tobacco results in disorganization of parenchyma cell, distortion of epidermal cells, and induces mitochondrial and chloroplast abnormalities, formation of membrane whorls and atypical lipid accumulation. **Micron.** v.40, p.730-736, 2009.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae.** 1st ed., CAB INTERNATIONAL: UK. 1994, 516p.

SRIVASTAVA, S.; BISHT, H.; SIDHU, O. P.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, P. C.; PANDEY, R. M.; RAJ, S. K.; ROY, R.; NAUTIYAL, C. S. Changes in the metabolome and histopathology of *Amaranthus hypochondriacus* L. in response to *Ageratum enation virus* infection. **Phytochemistry.** v.80, p.8-16, 2012.

TINNEY, G.; THEURING, C.; PAUL, N.; HARTMANN, T. Effects of rust infection with *Puccinia lagenophorae* on pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris*. **Phytochemistry.** v.49, p.1589-1592, 1998.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis* – uma revisão sobre vitaesteroides. **Química nova.** v.23, n.01, p. 47-57, 2000.

VALKONEN, J. P. T. **Viruses:** economical losses and biotechnological potential. *Potato biology and biotechnology: advances and perspectives.* Chapter 28. p. 626, 2007.

VEGA, A.; GUTIÉRREZ, R. A.; PEÑA-NEIRA, A.; CRAMER, G. R.; ARCE-JOHNSON, P. Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. **Plant Molecular Biology**. v.77, p.261-274, 2011.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. The Macmillan Press Ltda. 1981. 335p.

VIDHYASEKARAN, P. V.; BORROMEO, E. S.; MEW, T. W. Helminthosporium oryzae toxin suppresses phenol metabolism in rice plants and aids pathogen colonization. **Physiological and molecular plant pathology**. v.41, p.307-315, 1992.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. **High performance liquid chromatography in phytochemical analysis**. CRC Press. Taylor & Francis Group: New York. 2011. 975p.

WALLER, J. M.; LENNE'S, J. M.; WALLER, S. J. **Plant pathologists' pocketbook**. 3rd ed.; CABI: United Kingdom. 2002. 516p.

WATERMAN, P.G., MOLE, S., **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1994. 238p.

WINK, M. **Annual plant reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites**. Wiley-Blackwell, 2nd ed., 2009. 424p.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of apicultural research**. v.37, n.02, p.99-105, 1998.

WOODS, R.; JONES, P.; ROBERTS, S. Electron Micrographs of Plant Viruses. Disponível em: <http://www.rothamsted.ac.uk/ppi/links/pplinks/virusems/>. Acesso: 9 de julho de 2012. 1994.

YANG, B.; HALTTUNEN, T.; RAIMO, O.; PRICE, K.; KALLIO, H. Flavonol glycosides in wild and cultivated berries of three major subspecies of *Hippophaë rhamnoides* and changes during harvesting period. **Food chemistry**. v.115, p.657-664, 2009.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORT, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnological advances**. v.23, p.283-333, 2005.

	Flavonoide 3	Flavonoide 4	Flavonoide 5
R	ramnosil-glicosila	H	ramnosil-glicosila
R ₁	H	ramnosil-glicosila	H
R ₂	OH	H	H

Figura 37. Compostos flavonoídicos isolados de *P. angulata*.