UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Avaliação das alterações bioquímicas em plantas com Morte Súbita
dos Citros**

Rosilene Aparecida Prestes

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo como
exigência para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
(Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago

SÃO CARLOS

2007

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus,

Ao Luís Antonio Pinheiro pelo amor,
companheirismo e dedicação
incondicional em todos os momentos de
minha vida.

E ao meu pai Antonio Prestes, a minha
mãe Lubina Prestes, as minhas irmãs e
melhores amigas, Beatriz e Sandra e aos
meus sogros Luís Pinheiro e Leonilda
Pinheiro.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago por sempre estar disposto, animado e presente em minha vida e na construção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Pela co-orientação e amizade.

Emanuel Carrilho

Pelo suporte, ensinamentos e preencher das minhas necessidades.

EMBRAPA
IQSC
FAPESP
FUNDECITRUS
FISCHER
UFG

Pelo auxílio, amizade, apoio, compreensão, convívio cordial e prestimoso.

Nelson Antoniosi (UFG)
Nelson Wulf (FUNDECITRUS)
René de Oste (EMBRAPA)
Silvia e Andréia (IQSC)
Gilvan Wosiack (UEPG)
Marco Antônio Barbirato (IQSC)
Colegas do CROMA/ IQSC
Colegas da EMBRAPA
Funcionários da biblioteca (IQSC e EMBRAPA)

Tenho a certeza que vocês influenciaram a minha vida para sempre.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO ESPECIAL	I
AGRADECIMENTOS	II
SUMÁRIO.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Iniciais.....	1
1.1.1 Histórico e Evolução da Morte Súbita dos Citros (MSC).....	2
1.1.2 Principais Sintomas da MSC.....	5
1.1.3 Hipóteses da Causa da MSC.....	9
1.2 Análise do Perfil Metabólico de Plantas (Metaboloma)	11
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21

3.1	Materiais	21
3.2	Métodos	25
3.2.1	Análise das Cascas in situ	25
3.2.1.1	Análise por RMN em Baixa Resolução	25
3.2.1.2	Determinação do Teor de Óleo por RMN em Baixa Resolução	25
3.2.1.3	Análise Qualitativa do Óleo da Casca com a Seqüência CPMG	26
3.2.1.4	Análise Qualitativa do Óleo da Casca com a Seqüência CWFP	27
3.2.1.5	Análise de RMN em Alta Resolução	28
3.2.2	Análise in vitro das Cascas	28
3.2.2.1	Extração com Hexano	29
3.2.2.2	Extração com Solução Alcoólica	29
3.2.2.3	Análise dos Extratos com RMN em Alta Resolução	29
3.2.2.4	Cromatografia	30
3.2.3	Análise dos FAME	32
3.2.3.1	Transesterificação das Amostras de Óleos Vegetais	32
3.2.3.2	Análise de FAME por GC-MS	33
3.2.3.3	Análise de FAME por GC/ FID	34
3.2.4	Análise Multivariada	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Análise Quantitativa dos Extratos (Análise in vitro)	37
4.2	Caracterização do Extrato	39
4.2.1	Análise dos Extratos por RMN em Alta Resolução	39
4.2.2	Análise dos Extratos Hexânicos por Cromatografia	43
4.3	Análise de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) por GC	45
4.3.1	Análise Quimiométrica dos Dados de Cromatografia	50
4.3.1.1	Análise de Componentes Principais para FAME	51
4.3.1.2	Análise de Agrupamentos Hierárquicos dos FAME	56
4.4	Caracterização da Casca (Análise in situ)	61
4.4.1	Análise dos Metabolitos das Cascas por RMN em Alta Resolução	61
4.4.2	Análise Quantitativa das Cascas por RMN em Baixa Resolução	67
4.5	Medidas de Relaxometria por RMN em Baixa Resolução	68
4.5.1	Análises dos Decaimentos do Sinal CPMG	68
4.5.2	Análises dos Decaimentos do Sinal CWFP	75
4.5.3	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	81

4.5.3.1	Correlação dos dados de CPMG com FAME.....	81
4.5.3.2	Correlação dos dados CWFP com FAME.....	84
5	CONCLUSÕES	86
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Pomar contaminado: diferença entre árvores com anomalia (direita) e saudáveis (esquerda).....	6
Figura 1.2. Cor amarelada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto, na região do floema.....	7
Figura 1.3. Esquema do floema. (a) vista externa, mostrando as placas crivadas e áreas laterais crivadas. (b) Seção longitudinal, mostrando o tubo crivado e seus componentes.....	9
Figura 1.4 Espectro de ^{13}C -RMN em diferentes estágios de germinação: (a) antes do contato com a água, (b) depois de 2,5 h, (c) 12 h, (d) 120 h, (e) 192 h, (f) 312 h ²⁷ . .	15
Figura 1.5 Análise de componentes principais dos dados de CPMG de sementes de rabanete e mostarda não-tratadas, umedecidas e secas ³³ . ..	18
Figura 3.1 Mapa do estado de São Paulo, destacando os municípios de coleta das plantas cítricas.	22
Figura 3.2. Dados de temperatura (a) e água disponível no solo (b) nas regiões de coleta de plantas cítricas em um ano ⁴³	23
Figura 3.3. Comparação entre plantas assintomáticas (ASS), sintomáticas de nível ameno (SIN1) e de nível severo (SIN2) ¹²	24
Figura 3.4. Ilustração da sequência CPMG.....	27
Figura 3.5 Sequência de pulsos utilizada no método CWFP.	27
Figura 4.1 Quantidade percentual de extratos (a) hexânico e (b) hidroalcoólico, obtidos das plantas SAD, ASS, SIN1 e SIN2. Em cada figura, os extratos do porta-enxerto (cavalo) se encontram à esquerda e os do enxerto (copa), à direita.....	39
Figura 4.2 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) do extrato hexânico da casca do porta-enxerto SIN2 em CDCl_3 . No destaque, expansão do espectro na região de	

insaturações entre 131 and 126 ppm.	40
Figura 4.3 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) do extrato hidroalcoólico da casca do porta-enxerto SIN2 em D_2O	42
Figura 4.4 Perfil cromatográfico do óleo extraído do enxerto de planta SAD.	44
Figura 4.5. Perfil cromatográfico dos FAME da amostra SIN2cav.	45
Figura 4.6 Concentrações percentuais dos ácidos graxos saturados de menor concentração: C, La, M e S nas plantas ASS e SIN1 e 2.	47
Figura 4.7 Concentrações percentuais dos ácidos graxos de maior concentração: P, O, L e Ln nas plantas ASS e SIN1 e SIN2.	47
Figura 4.8 Concentrações percentuais dos ácidos graxos saturados, monoinsaturado e poliinsaturados nas plantas ASS e SIN1 e SIN2.	49
Figura 4.9 Concentração percentual de ácidos graxos. Os valores se referem à soma das concentrações de ácidos graxos com tendências de aumento (C + La + M + P + S + L) e diminuição (O + L) de acordo com as alterações relacionadas a MSC.	50
Figura 4.10. Gráfico dos escores (a) e de pesos (b) da análise por PCA dos dados dos FAME das amostras de porta-enxerto, ASScav (●), SIN1cav (▲) e SIN2cav (☆).	52
Figura 4.11 Gráfico dos escores (a) e de pesos (b) da análise por PCA dos dados dos FAME das amostras de enxertos, ASScop (○), SIN1cop (△) e SIN2cop (★)...	54
Figura 4.12 Gráfico dos escores (a) e de pesos (b) da análise por PCA dos dados dos FAME das amostras de enxertos ASScop (○), SIN1cop (△) e SIN2cop (★), para os agrupamentos dos FAME O + Ln, P + L e C + La + M + P + S + L.	55
Figura 4.13 Gráfico dos escores (a) e de pesos (b) da análise por PCA dos dados dos FAME das amostras de porta-enxerto ASScav (●), SIN1cav (▲) e SIN2cav (☆), para os agrupamentos dos FAME O + Ln, P + L e C + La + M + P + S + L.	56
Figura 4.14 Dendrograma das amostras de enxerto ASS e SIN1 e 2 utilizando os ácidos graxos separadamente: C, La, M, P, S, O, L e Ln.	57

Figura 4.15 Dendrograma das amostras de porta-enxerto ASS e SIN1 e 2 utilizando os ácidos graxos separadamente: C, La, M, P, S, O, L e Ln.....	59
Figura 4.16 Dendrograma das amostras do enxerto ASS e SIN1 e 2 utilizando como variáveis os ácidos graxos agrupados: (O+Ln), (P+L) e (C+La+M+P+S+L).	60
Figura 4.17 Dendrograma das amostras do porta-enxerto ASS e SIN1 e 2 utilizando como variáveis os ácidos graxos agrupados: (O + Ln), (P + L) e (C + La + M + P + S + L).	61
Figura 4.18. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) da casca do porta-enxerto (in situ) de amostra SIN2 (a) e SAD (b).	62
Figura 4.19 Espectros de ^{13}C -RMN (400 MHz) de amostra de porta-enxerto SIN2: (a) casca da planta; (b) extrato hidroalcoólico em D_2O e (c) extrato hexânico em CDCl_3	64
Figura 4.20 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) da casca de porta-enxerto (in situ): (a) SAD e (b) SIN2.....	65
Figura 4.21 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) da casca de enxerto (in situ): (a) SAD e (b) SIN2.....	65
Figura 4.22 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) da casca de porta-enxerto SIN: (a) amostra não seca e (b) amostra seca em liofilizador.	66
Figura 4.23 Correlação dos dados de RMN em baixa resolução (in situ) com o extrato hexânico (in vitro) ($r= 0,99$).....	68
Figura 4.24 Decaimentos médios dos sinais de CPMG das amostras de cascas de enxertos e porta-enxertos, ASS, SIN1 e 2.	69
Figura 4.25 Gráficos dos escores para os dados de CPMG das cascas de enxerto Valência. (O) ASScop, ($\triangle$) SIN1cop e ($\star$) SIN2cop. (a) sem exclusão de variáveis e (b) com exclusão de variáveis.	71
Figura 4.26 Gráficos dos escores para os dados de CPMG das cascas de porta-enxerto limão Cravo. ($\bullet$) ASScav, ($\blacktriangle$) SIN1cav, ($\star$) SIN2cav. (a) PC 1 X PC 2, (b) PC 1 X PC 5.	72

- Figura 4.27. Dendrograma do HCA para plantas ASS e SIN1 e 2 da região do enxerto. As variáveis utilizadas da curva de decaimento CPMG foram 0,00117 a 0,03796 s.....74
- Figura 4.28. Dendrograma do HCA para plantas ASS e SIN1 e 2 da região do porta-enxerto. As variáveis utilizadas da curva de decaimento CPMG foram 0,00117 a 0,03796 s.....75
- Figura 4.29 Decaimentos médios dos sinais CWFP das amostras de cascas de enxertos e porta-enxertos, ASS, SIN1 e 2.76
- Figura 4.30. Gráfico de escores dos dados de CWFP para as amostras de enxerto ASS (○), SIN1 (△), SIN2(★), sem exclusão de variáveis.....77
- Figura 4.31. Gráfico de escores dos dados de CWFP para as amostras de porta-enxerto ASS (●), SIN1 (▲), SIN2(☆), sem exclusão de variáveis.78
- Figura 4.32 Resultado do HCA para plantas assintomáticas e sintomáticas nível 1 e 2 da região do enxerto, sem exclusão de variáveis.....79
- Figura 4.33 Resultado do HCA para plantas assintomáticas e sintomáticas nível 1 e 2 da região do porta-enxerto, sem exclusão de variáveis.80
- Figura 4.34 Correlação da percentagem calculada com PLS e medida com GC para o agrupamnetos (a) O + Ln, (b) C + La + M + P + L e (c) P + L dos enxertos das plantas ASS (○), SIN1 (△) e SIN2 (★), com exclusão de variáveis.83
- Figura 4.35 Correlação da percentagem predita e medida de ácidos graxos: (a) Ln + O, (b) C +La +M +P +S + L e (c) P + L das plantas ASS cop (○), SIN1cop (△) e SIN2cop (★), sem exclusão de variáveis.85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Comparação das sensibilidades relativas de várias ferramentas utilizadas para a determinação do metaboloma ²²	13
Tabela 3.1. Principais ácidos graxos de plantas cítricas e os respectivos tempos de retenção	35
Tabela 4.1 Dados dos ajustes monoexponencial dos tempos de relaxação T_2 das plantas ASS e SIN1 e 2.....	70
Tabela 4.2 Correlação dos dados de CPMG com as concentrações dos ácidos graxos individuais das amostras ASS e SIN 1 e 2 da região do enxerto e do porta-enxerto	82
Tabela 4.3 Correlação dos dados de CWFP com as concentrações dos ácidos graxos individuais das amostras ASS e SIN 1 e 2 da região do enxerto e do porta-enxerto	84
Tabela A. 1. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de porta-enxerto SIN.....	99
Tabela A. 2. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de enxerto SIN.	100
Tabela A. 3. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de porta-enxerto ASS.....	101
Tabela A. 4. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de enxerto ASS.	102
Tabela A. 5. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de porta-enxerto SAD.....	103
Tabela A. 6. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de enxerto SAD.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASS – Plantas assintomáticas.

CC – Células companheiras.

CE/ LIF – Eletroforese capilar acoplada a fluorescência induzida por laser.

CPMG – Carr-Purcell-Meiboom-Gill.

CSDaV – *Citrus sudden death associated virus*

CTV – *Citrus tristeza virus*

CWFP – Precensão livre em onda contínua

FAME – Ésteres metílicos de ácidos graxos.

FID – Decaimento livre induzido (*free induction decay*)

GC – Cromatografia gasosa.

GC-FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama.

GC/ MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa.

HCA – Análises de agrupamentos hierárquicos.

ILT – Transformada inversa de Laplace.

LC/ LIF – Cromatografia líquida acoplada a fluorescência induzida por laser.

MSC – Morte Súbita dos Citros.

MS – Espectroscopia de massa.

PCA – Análise de componentes principais.

PC – Componente principal.

PLS – Regressão por mínimos quadrados parciais

RMN – Ressonância magnética nuclear.

S/ R – Razão sinal / ruído.

SAD – Plantas sadias.

SIN – Plantas sintomáticas.

SIN1 – Plantas com sintomas amenos.

SIN2 – Plantas com sintomas severos.

T_1 – Tempo de relaxação longitudinal.

T_2 – Tempo de relaxação transversal.

RESUMO

A Morte Súbita dos Citros (MSC) é uma doença que afeta plantas de laranja-doce enxertadas em limão Cravo e Volkameriano e ainda não tem o agente causal determinado. Para entender quais são as principais mudanças fisiológicas causadas pela MSC, analisou-se as alterações nos metabolitos primários, tanto da casca do enxerto quanto do porta-enxerto. Fez-se análises dos extratos hexânico e hidroalcoólico com RMN em alta resolução e do extrato hexânico com cromatografia gasosa. Também analisou-se os metabolitos diretamente nas cascas com técnicas de RMN em alta e baixa resolução. Com essas análises foi possível observar que a MSC altera a deposição de triacilglicerídeos e sacarose nas cascas. A MSC também modifica o perfil de ácidos graxos, com o decréscimo dos teores de ácido oléico e linolênico e aumento dos ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico e linoléico, com a evolução da doença. Com esses resultados foi possível entender as principais alterações bioquímicas causadas pela MSC, como também demonstrar que elas podem ser usadas de forma complementar no diagnóstico da doença. Dentre todos os métodos avaliados, as análises das cascas com RMN em baixa resolução, com as técnicas CPMG e de precessão livre em onda contínua (CWFP), foram as mais rápidas (em alguns segundos) e eficientes para discriminar as plantas assintomáticas das sintomáticas. A discriminação das plantas pelos dados de RMN foi realizada com métodos quimiométricos como análise de componentes principais (PCA), análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

ABSTRACT

Citrus Sudden Death (CSD) is a new graft-transmissible disease of sweet orange grafted on Rangpur lime and *Citrus volkameriana* rootstocks. The causal agent is unknown. To understand the main physiological changes caused by the CSD, we analyzed the variations in the primary metabolites content in the bark of scion and rootstock. The hexanic and hydroalcoholic extracts were analyzed by high resolution NMR. The hexanic extracts were also analyzed by gas chromatography. The metabolites were also analyzed directly in the barks with high and low resolution NMR techniques. With these analyses it was possible to observe that CSD modifies the content of triglycerides and sucrose in the barks. The disease also changes the fatty acids profile, with a decrease in the oleic and linolenic and an increase in the capric, lauric, miristic, palmitic, stearic and linoleic content. With these results it was possible to understand the main biochemical disorders caused for the CSD, as well as to demonstrate that they can be used as complementary information in the disease diagnosis. The analysis of the barks with low resolution NMR techniques CPMG and continuous wave free precession (CWFP), had been the fastest (few seconds) and the most efficient one to discriminate between the symptomless and symptomatic plants. The discrimination of the plants by NMR data had been carried with chemometric methods such as principal component analysis (PCA), hierarchic cluster analysis (HCA) and partial least square regression (PLS).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A citricultura é uma das principais atividades econômicas do Estado de São Paulo. A laranja é a matéria-prima de uma agroindústria com faturamento anual de cerca de US\$ 2 bilhões e que gera perto de 400 mil empregos diretos e indiretos no Estado de São Paulo¹. Esses números demonstram a importância de se estudar as doenças que afetam as plantações de laranja, como a Clorose Variegada dos Citros (CVC), o Cancro Cítrico, a Podridão Floral dos Citros (PFC), a Pinta Preta, o *Greening* e a doença denominada Morte Súbita dos Citros (MSC)¹, que foi estudada nesta tese.

A MSC é uma doença que afeta plantas de laranjeira-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas em limão Cravo [*Citrus limonia* (L.) Osbeck]. Como esta combinação representa cerca de 85 % das plantas no estado de São Paulo, isso tem levado muita preocupação à agroindústria citrícola.

A MSC ainda não tem o agente causal determinado e as principais hipóteses são de uma variante do vírus da tristeza dos citros (CTV), uma vez que a MSC tem similaridades com a Tristeza dos Citros e de um novo vírus do gênero *Marafivirus* (família *Tymoviridae*)², o qual pode causar doença isoladamente ou sinergisticamente com o CTV.

1.1.1 Histórico e Evolução da Morte Súbita dos Citros (MSC)

A denominação de Morte Súbita dos Citros (MSC) foi dada por pesquisadores do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” devido à rapidez com que definha e inviabiliza comercialmente as plantas afetadas, principalmente as variedades tardias de laranjas doces. A MSC foi observada pela primeira vez por pesquisadores do Fundecitrus, em Comendador Gomes, Minas Gerais, em talhões de Valência, enxertados sobre limão Cravo, com idade de 12 anos. Em um dos talhões, com 4,7 mil plantas, em dezembro de 1999 foram encontradas 518 plantas mortas devido às causas até então desconhecidas e hoje atribuídas à MSC. Em agosto de 2000, foram constatadas mais 767 plantas doentes e 210 mortas. Estas árvores não foram eliminadas e em seis meses 86 % das plantas estavam doentes ou mortas. Constatou-se a evolução da doença em 41 propriedades de sete municípios: Altair, Barretos, Colômbia e Guaraci, em São Paulo, além de Comendador Gomes, Frutal e Uberlândia, em Minas Gerais^{3, 4}. Relatos da evolução da doença registrados em 2003 apontam 1,5 milhões de plantas com sintomas de MSC⁵.

A MSC está restrita ao sul do Triângulo Mineiro e ao norte do Estado de São Paulo. Até 2006 pesquisas relatam que a MSC foi detectada em 19 municípios paulistas localizados na região norte (Altair, Bálsamo, Barretos, Bebedouro, Cajobi, Colômbia, Cosmorama, Embaúba, Guaraci, Ibirá, Ipiguá, Monte Azul Paulista, Nova Granada, Olímpia, Onda Verde, Orindiúva, Paulo de Faria, Riolândia e Tanabi) e 12 municípios mineiros (Campo Florido, Comendador Gomes, Conceição das Alagoas, Fronteira, Frutal, Ituiutaba, Monte Alegre de Minas, Planura, Prata, São Francisco de Sales, Uberaba e Uberlândia)⁶.

A MSC se desenvolve com rapidez em plantas de variedades tardias (Natal e

Valência), meia-estação (Pêra-Rio) e precoces (Hamlin, Westin e Pinapple) enxertadas em porta-enxerto limão Cravo. Também tem sido observada a doença em laranja Natal enxertada em limão Volkameriano. A doença se manifesta principalmente na primavera e no início do verão, quando a planta reinicia seu desenvolvimento e necessita de maior volume de água. A MSC está relacionada ao enxerto de laranja doce/ limão Cravo, de maneira similar à Tristeza que está relacionada ao enxerto de laranja doce/ laranja azeda. Não tem sido observada a doença, por exemplo, em laranjas doces enxertadas em tangerina Cleópatra, tangerina Sunki, *Poncirus trifoliata* e *Citrumelo swingle*, mesmo em plantações próximas a pomares afetados.

A preferência dos produtores nacionais por limão Cravo como porta-enxerto é devido à sua elevada produtividade, precocidade e maior resistência ao déficit hídrico. Isso significa que para substituí-lo, a árvore perderá em produtividade ou, então, o pomar deverá ser irrigado, como já acontece na maior parte da área citrícola de outros países.

No início de 2004 especialistas relataram que o surgimento da Morte Súbita do Citros está mudando a tendência nacional dos citricultores para outros porta-enxertos como Sunki, a Cleópatra e o Swingle. Estes porta-enxertos são resistentes à doença, mas necessitam de irrigação⁷. No final deste mesmo ano, híbridos de citros, resistentes à seca e à gomose, e com boa produção de sementes foram testados como porta-enxertos. As sementes foram enxertadas com enxertos Hamlin, Valência, Pera e Natal, após as mudas receberam borbulhas de árvores com sintomas de MSC para auxiliar a seleção de materiais resistentes. Apesar disso, variedades híbridas de limão Cravo continuam sendo estudadas por causa das características mencionadas acima⁸.

Dados obtidos nos últimos quatro anos apontaram que a irrigação cresceu de 1,5 % para 10,2 % do total de área de citros no país. Isto poderá ser revertido se a citricultura encontrar um clone do limão Cravo⁷.

A compreensão dos mecanismos e a dinâmica da doença MSC, incluindo o estudo de padrões espaciais, tem sido realizada através da coleta e análise de dados epidemiológicos provenientes de avaliações feitas em diferentes momentos em talhões de plantas de citros. Esses estudos estatístico-computacionais têm possibilitado aos epidemiologistas uma compreensão dos mecanismos de propagação da doença e de definição de estratégias de controle⁹.

Bassanezi et al.¹⁰ fizeram uma análise espaço-temporal da dispersão e propagação das plantas com MSC e observaram que as plantas sintomáticas influenciam as árvores adjacentes, principalmente as plantas da mesma fileira. Estes resultados são compatíveis com um causador biótico da MSC, transmitido por um vetor.

Jesus Junior e Bassanezi¹¹ caracterizaram a disseminação da MSC empregando a técnica de análise da dinâmica e estrutura de focos em 166 mapas de distribuição espacial de plantas com sintomas de MSC, provenientes de 51 talhões do norte do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. Constataram que a MSC inicia com focos unitários distribuídos de maneira aleatória no talhão e o progresso da doença ocorre mais pelo aumento de novos focos do que pelo aumento do tamanho dos focos. Portanto, a disseminação da doença não ocorre de forma homogênea e contínua ao redor da primeira planta afetada.

Bassanezi et al.¹² caracterizaram e quantificaram os danos causados pela MSC na produção de frutos para demonstrar a importância da doença e definir o momento que o talhão deixa de ser economicamente viável. As plantas foram

classificadas de acordo com a severidade da doença em três níveis de evolução (0 = sadias, 1 = sintomas iniciais e 2 = sintomas severos). Com este estudo pode-se observar a redução da massa total de frutos em 28 % (nível 1) e 50% (nível 2), o número total de frutos em 12 % (nível 1) e 26 % (nível 2) e o tamanho do fruto em 22 % (nível 1) e 41 % (nível 2).

Pesquisas mais recentes sobre a MSC desenvolvidas em parceria com a Embrapa Instrumentação Agropecuária e o Instituto de Química de São Carlos (IQSC) utilizaram a técnica de espectroscopia de fluorescência para detecção desta doença. A metodologia desenvolvida permite o diagnóstico eficiente e não-invasivo da doença¹³.

Outro trabalho desenvolvido pelo IQSC para estudar a MSC foi a análise proteômica diferencial aplicada nas cascas de plantas cítricas. Utilizando-se as técnicas de ionização/ desorção a laser assistida por matriz/ tempo de voo/ tempo voo (MALDI-TOF-TOF) e cromatografia líquida/ ionização por electrospray – espectroscopia de massa/ espectroscopia de massa (LC-ESI-MS/ MS) foram identificadas de três isoformas de quitinase e proteína putativa similar a miraculina. Estas proteínas identificadas são conhecidas como marcadoras de mecanismos de defesa em plantas. Entretanto, as mesmas não se encontravam super-expressas em plantas sintomáticas¹⁴.

1.1.2 Principais Sintomas da MSC

As plantas afetadas pela MSC apresentam perda generalizada do brilho das folhas, contrastando com o verde escuro e brilhante das plantas sadias. Em seguida ocorre um desfolhamento das plantas doentes, com poucas brotações externas e

internas na copa das plantas (Figura 1.1). Em estágio mais avançado, pode ocorrer a morte da planta dependendo da variedade da copa.

Figura 1.1. Pomar contaminado: diferença entre árvores com anomalia (direita) e saudáveis (esquerda).

Algumas variações de sintomas podem ocorrer em função da variedade do enxerto de laranja doce. Nas variedades precoces (Hamlin e Westin) e de meia-estação (Pêra) a evolução dos sintomas é lenta e geralmente a morte, quando ocorre, pode levar alguns meses. No entanto, a planta se torna improdutiva logo com o aparecimento dos primeiros sintomas.

Em variedades tardias (Natal e Valência), no início da primavera e verão, os sintomas evoluem rapidamente, e podem ser encontradas plantas mortas com frutos com massa e tamanho normais. Nestas plantas, houve tempo para o florescimento, pegamento e maturação dos frutos antes do colapso súbito da árvore. A doença

pode estar presente há algum tempo, mas aparentemente a morte acontece de forma rápida e súbita quando a planta necessita absorver muita água para emissão de novas brotações e enchimento dos frutos. Estes sintomas são inespecíficos e refletem a ausência ou a grande quantidade de raízes mortas observadas nas plantas com MSC. Mesmo plantas com enxertos sem sintomas podem apresentar alguma podridão inicial nas extremidades das raízes¹⁵.

A característica mais acentuada nas plantas com MSC é a presença de coloração amarelada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto (Figura 1.2), na região do floema funcional, que fica completamente obstruído, afetando o sistema radicular.

Figura 1.2. Cor amarelada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto, na região do floema.

A destruição do sistema radicular é consequência da desorganização do floema funcional na região logo abaixo do ponto de enxertia, impedindo a nutrição

adequada das raízes ou radículas. O floema é o tecido vascular que conduz a seiva elaborada das folhas para todos os órgãos da planta. São suas células que conduzem os açúcares e outros compostos orgânicos através dos elementos crivados (Figura 1.3)¹⁶, que são células curtas (50-150 μm de comprimento) e dispostas longitudinalmente de forma superposta.

O tubo crivado quando danificado pode levar a planta a perder muita seiva do floema rica em açúcar. Entretanto, quando isso ocorre há uma deposição de proteínas denominada proteína-P¹⁶ e outras inclusões celulares nos poros da placa crivada para prevenir a perda de seiva. Uma solução em longo prazo para o dano no tubo crivado é a deposição de um polissacarídeo denominado calose¹⁷.

Cada elemento de tubo crivado está associado a uma ou mais células companheiras (Figura 1.3). Estas são células parenquimáticas especializadas que estão ligadas aos elementos de tubo crivado por meio de plasmodesmas. O movimento de materiais orgânicos no floema depende da interação fisiológica entre os elementos crivados e as células parenquimáticas especializadas contíguas. Essa continuidade entre esses dois tipos de células é tão grande, que freqüentemente, em material dissociado, o elemento crivado e sua(s) célula(s) companheira(s) (CC) permanecem junta(s)¹⁸. Também fazem parte da constituição do floema as fibras e esclereídeos que são células responsáveis pela sustentação, exercendo, ocasionalmente, função de reserva.

Estudos de microscopia eletrônica relatam mudanças nas cascas de plantas afetadas por MSC¹⁹. As alterações ultraestruturais ocorreram na redução do tamanho das células do floema, colapso e necrose nos tubos crivados, superprodução e degradação do floema, acúmulo de floema não funcional e invasão do córtex pelo floema velho e não funcional.

Figura 1.3. Esquema do floema. (a) vista externa, mostrando as placas crivadas e áreas laterais crivadas. (b) Seção longitudinal, mostrando o tubo crivado e seus componentes.

1.1.3 Hipóteses da Causa da MSC

Os sintomas da MSC podem ser confundidos com as do Declínio, outra doença que debilita e reduz a longevidade de plantas, principalmente das enxertadas sobre limão Cravo. No entanto, há algumas diferenças básicas entre essas doenças. No Declínio não há o amarelecimento da casca, não há podridão

das raízes, há intensa emissão de brotação na copa, não há morte de plantas com retenção de frutos e é constatada em laboratório a presença de uma proteína de 12 kDa, a qual não ocorre na MSC.

Após várias tentativas de isolamento e testes diagnósticos, baseados em serologia e biologia molecular e observações em microscópio eletrônico, nenhum patógeno como nematóide, fungo, bactéria, fitoplasma, espiroplasma ou protozoário foi, até o momento, associado a MSC. Uma das hipóteses é que a MSC seja causada por um novo vírus, muito provavelmente uma nova estirpe do vírus da tristeza dos citros (CTV), que tornou as combinações de laranja doce sobre limão Cravo e Volkameriano, antes resistentes, em susceptíveis.

A MSC tem muitos pontos em comum com a Tristeza ou “Declínio Rápido” das laranjas doce enxertadas sobre laranja azeda. Os pés-francos de limão Cravo e Volkameriano são tolerantes à MSC assim como os de laranja azeda à Tristeza. Os sintomas da MSC e Tristeza são sintomas de declínio rápido, causados pela necrose do floema do porta-enxerto abaixo do ponto de enxertia e consequentemente a podridão das raízes. Os estudos epidemiológicos têm revelado que a distribuição espacial e velocidade de progresso da MSC são muito semelhantes ao da Tristeza na presença de pulgão preto (*Toxoptera citricida*). Plantas com MSC, assim como plantas com Tristeza, podem ser recuperadas pela subenxertia com porta-enxertos tolerantes.

Outra hipótese é que a MSC seja causada pelo vírus *Citrus sudden death associated virus* (CSDaV) do gênero *Marafivirus* da família *Tymoviridae*². O CSDaV foi encontrado em cerca de 90 % das plantas com sintomas e não foi detectado em cerca de 90% das plantas sadias, num total de 773 plantas. Outro indicador da possível patogenicidade deste microrganismo é o fato de que os demais vírus da

família *Tymoviridae* atacam vegetais (milho, grama, aveia e uva). No caso da uva, um desses vírus causa um problema nas raízes da planta, similar ao observado em plantas com a MSC².

1.2 Análise do Perfil Metabólico de Plantas (Metaboloma)

Até recentemente a maioria das análises dos metabolitos ou de suas variações em um ser vivo, frente a fatores bióticos e abióticos, eram feitas individualmente, como por exemplo, dosagem do teor de glicose, triglicerídeos, colesterol, entre outros²⁰.

Nos últimos anos começaram a ser desenvolvidos métodos que permitem a análise simultânea de um grande número de metabolitos em extratos, exsudatos ou até mesmo diretamente no tecido biológico intacto (análise *in vivo*)²¹. Esse tipo de análise vem sendo denominado de análise do perfil metabólico, metaboloma ou metabonoma²¹.

Metaboloma, definido como a medida global do nível dos metabolitos de parte ou de um ser vivo biológico, vêm se tornando uma ferramenta poderosa para a compreensão das funções vitais. Ela complementa as análises genômicas, transcriptômicas e proteômicas, auxiliando a determinar o tipo e quantidade dos metabolitos que são produzidos e armazenados por um ser vivo, órgão, tecido ou célula. A análise metabolômica está se tornando uma ferramenta indispensável para estudos de doenças humanas, de plantas e simulações *in silico* de células vivas, entre outras aplicações²¹.

A grande maioria dos estudos de metaboloma visa o estudo em seres

humanos e animais²¹. No caso de vegetais tem sido usada para a análise do perfil metabólico²² que incluem:

- Impressão digital de espécies, genótipos ou ecótipos por taxonomia ou bioquímica.
- Monitoramento de comportamento de classes de espécies de metabolitos em relação à aplicação de exógenos químicos ou estímulos físicos.
- Estudo do desenvolvimento de processos tal qual estabelecimento de simbiose associativa ou amadurecimento de frutas.
- Comparação entre o conteúdo de metabolitos de plantas mutantes ou transgênicas com as contrapartes selvagens.

A seleção da técnica mais adequada para a análise metabolômica geralmente compreende uma correlação entre velocidade, seletividade e sensibilidade. Esta última é comparada para vários métodos na Tabela 1.1. Métodos como as espectroscopias na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e na região do ultravioleta-visível (UV-vis), são rápidos, mas pouco seletivos para identificar metabolitos responsáveis por semelhanças ou diferenças em plantas. A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma espectroscopia com alta capacidade de discriminar entre os vários metabolitos de uma amostra, é um método não destrutivo e pode ser usado até em análises *in vivo*. No entanto, a RMN apresenta baixa sensibilidade, detectando apenas os metabolitos que estão em alta concentração.

Tabela 1.1. Comparação das sensibilidades relativas de várias ferramentas utilizadas para a determinação do metaboloma²²

Técnica	Sensibilidade (mol)
RMN	10^{-6}
LC/ UV	10^{-9}
GC/ MS	10^{-12}
LC/ MS	10^{-15}
LC/ LIF	10^{-19}
CE/ LIF	10^{-23}

Uma outra versão de análise do metaboloma consiste do acoplamento de métodos de separação (eletroforese capilar - CE, cromatografia gasosa, líquida entre outras) e métodos de detecção como as espectroscopias acima, de fluorescência, espectrometria de massas entre outros²⁰⁻²³. Alguns exemplos das aplicações dessas técnicas em estudos metaboloma de vegetais serão apresentados a seguir.

Fiehn²⁴ utilizou análise metabolômica para explicar a estrutura e regulação metabólica e bioquímica do floema de uma amostra de *Cucurbita maxima*, utilizando as técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa (LC/ MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC/ MS). Este estudo revelou fatos interessantes sobre o sistema vascular da planta, principalmente com relação à sua composição em diferentes períodos do dia.

Yamazaki et al.²⁵ investigaram o perfil metabólico de dois tipos da antocianina de uma amostra de *Perilla frutescens* por cromatografia líquida de alto desempenho acoplada com um detector de fotodiodo e espectrômetro de massa (HPLC/ PDA/ MS). Os resultados mostraram as diferenças entre as duas formas desta planta, vermelha e verde, e que a concentração de antocianina é específica da primeira.

Verdonk et al.²⁶ utilizaram GC/ MS para analisar e identificar os compostos

voláteis (benzenóides) emitidos pelas flores da petúnia, o qual se mostrou uma ferramenta muito importante para medida de tais compostos *in vivo*. A realização das análises *in vitro* mostrou que o ramo das pétalas e estigmas foi o principal produtor de benzenóides e sesquiterpenos, respectivamente. Na comparação das análises *in vivo* e *in vitro* observou-se que os voláteis não foram estocados durante períodos de baixa emissão, mas sintetizadas novamente.

A ressonância magnética nuclear em alta resolução é uma técnica muito aplicada no estudo de fisiologia vegetal²⁷, permitindo a determinação de constituintes químicos em células e tecidos de plantas *in vivo*. Na Figura 1.4 tem-se um exemplo da aplicação da RMN de ^{13}C no estudo das variações bioquímicas que ocorrem em uma semente de soja, durante a germinação²⁷. No espectro da semente antes da embebição em água (a) os sinais observados são somente dos triacilglicerídeos (óleo) que são os compostos que estão na forma líquida e em alta concentração (20 %) nestas sementes. Nas figuras b e c estão os espectros de ^{13}C da mesma semente após a embebição em água e no início dos processos metabólicos envolvidos na germinação. Nestes espectros pode-se ver a presença de novos sinais entre 50 e 100 ppm, que são devidos à sacarose e outros açúcares (~15 %), que foram solubilizados com a água que a semente absorveu. Nos outros espectros de d a f pode-se ver que tanto os açúcares como os sinais do triacilglicerídeos foram desaparecendo com a germinação da semente. Nas sementes de soja, os açúcares e óleo são usados como fonte de energia e matérias-primas para a formação da plântula.

Figura 1.4 Espectro de ^{13}C -RMN em diferentes estágios de germinação: (a) antes do contato com a água, (b) depois de 2,5 h, (c) 12 h, (d) 120 h, (e) 192 h, (f) 312 h²⁷.

Além da RMN em alta resolução a RMN em baixa resolução vem sendo

usada em estudos de perfil metabólico de tecidos vegetais. Tem sido rotineiramente usada na indústria de alimentos para medida do teor óleos e gorduras em sementes, pescados, carne suína e bovina²⁸⁻³¹ entre outras aplicações³².

Ao contrário da RMN em alta resolução, na RMN em baixa resolução não se observa as diferentes frequências relativas aos diferentes deslocamentos químicos das moléculas presentes na amostra. Normalmente essa separação é baseada na variação da relaxação longitudinal e transversal entre os componentes da amostra.

A relaxação longitudinal envolve a transferência de energia do núcleo excitado para a rede e também é conhecida como relaxação spin-rede e é um processo exponencial, com uma constante de tempo T_1 . A relaxação transversal não envolve a troca de energia com a rede, mas somente entre os spins, levando apenas à perda de coerência de fase dos spins após a excitação da amostra. A relaxação transversal, também denominada de relaxação spin-spin, é um processo exponencial com uma constante de tempo T_2 . Como a medida de T_2 é feita com a seqüência denominada Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), é bem mais rápida do que a de T_1 e, portanto ela tem sido a mais usada nos estudos com RMN em baixa resolução.

A relaxação transversal é dependente, de vários fatores, entre eles a mobilidade molecular. Quanto mais restrito for o movimento da substância mais rápida ocorre a relaxação transversal e isso pode estar relacionado com a massa molecular e o ambiente onde se encontra.

Recentemente, com avanços dos métodos computacionais como a transformada inversa de Laplace (ILT) e métodos quimiométricos, os sinais de RMN em baixa resolução, principalmente os sinais coletados com a seqüência CPMG, tem sido usados na análise de vários metabolitos em amostra biológicas.

A aplicação da RMN em baixa resolução em análise do perfil metabólico tem sido principalmente na análise de sementes oleaginosas, determinando a umidade, o teor de óleo e proteínas.

Perdesen et al.³³ determinaram os conteúdos de água, óleo e proteína em sementes de rabanete e mostarda examinadas pela combinação de RMN em baixa resolução e quimiometria. Antes das análises de RMN as sementes foram submetidas a três tratamentos (não-tratadas, umedecidas e secas). A Figura 1.5 mostra os resultados de análise de componentes principais das curvas de relaxação dos dados de CPMG, onde se pode observar a classificação de dois tipos de sementes descritas pelos componentes principais PC 1 e PC 2. O PC1 discrimina os diferentes tipos de sementes; por sua vez, PC 2 discrimina a amostra umedecida das outras, mas não consegue separar as amostras não-tratadas, das secas. As medidas do conteúdo de óleo em amostras de sementes de rabanete e mostarda sobre a influência dos três tratamentos (global) demonstrou um coeficiente de correlação de 0,97 e 0,94, respectivamente, quando se usou o método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Já o coeficiente de correlação para o conteúdo de água foi de 0,98 para as duas sementes.

Mateus et al.³⁴ caracterizaram a mobilidade da água por RMN em baixa resolução em cafés torrados, umedecidos e secos. Os componentes de relaxação da população sólida foram distingüidos pela sequência decaimento livre induzido (FID) e as populações de fase apolar (óleo do café) e polar foram determinados pela sequência CPMG. A fase polar foi caracterizada pelos polímeros na parede da célula e pelo lúmen das células preenchidas com água.

utilização do tempo de repetição dos pulsos (τ) bem abaixo de T_1 , ela tem sido usada para aumentar a razão sinal/ ruído (S/ R) em análises quantitativas, medidas de fluxo, medida simultânea dos tempos de relaxação longitudinal e transversal^{36, 37, 38, 39}, medida de difusividade térmica⁴⁰ e para medidas ultra-rápidas de teor de óleo em sementes, com potencial de analisar mais de 20 mil amostras por hora⁴¹. Esse método vem sendo usado para estudos de qualidade de carne e frutas e tem sido possível classificar a qualidade desses produtos baseadas em seus principais constituintes⁴².

Para entender quais são as principais mudanças fisiológicas causadas pela MSC, analisou-se neste trabalho a composição química dos metabolitos primários, tanto da casca do enxerto quanto do porta-enxerto. Para isso realizou-se análises *in vitro* dos extratos hexânico e hidroalcoólico, com RMN em alta resolução, e do extrato hexânico com cromatografia gasosa e estudo dos metabolitos diretamente nas cascas (*in situ*) com as técnicas de RMN em alta e baixa resolução. Com isso foi possível não só entender as principais alterações bioquímicas causadas pela MSC, como também demonstrar que elas podem ser usadas de forma complementar no diagnóstico da doença.

2 OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações bioquímicas causadas pela doença denominada Morte Súbita dos Citros (MSC) em plantas de laranja doce enxertada em limão Cravo, bem como avaliar se algum metabolito pode ser usado no diagnóstico da doença.

Como objetivos específicos se destacam:

- Avaliar *in vitro* os extratos hexânicos, hidroalcoólicos por técnicas cromatográficas e espectroscópicas de RMN em alta resolução.
- Avaliar *in situ* (diretamente nas cascas das plantas) os componentes líquidos ou solúveis por RMN em alta e baixa resolução.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Para a avaliação do perfil metabólico de plantas com MSC foram utilizadas amostras de casca de laranja Valência [*Citrus sinensis* (L.)] enxertada em limão Cravo [*Citrus limonia* (L) Osbeck]. Foram coletadas tanto as cascas dos enxertos (Valência) quanto dos porta-enxertos (limão Cravo) na região da enxertia. As amostras de cada planta (porta-enxerto e enxerto) tinham cerca de 1,5 cm de largura e 10 cm de comprimento.

Para os resultados apresentados nesta tese foram coletadas 60 cascas de enxerto e 60 de porta-enxerto, sendo que para cada uma destas regiões da planta tomou-se 20 de plantas sadias (SAD), 20 de assintomáticas (ASS) e 20 de sintomáticas (SIN), com sintomas amenos e severos (SIN1 e SIN2). Para esta última, oito possuíam sintomas amenos e doze, sintomas severos (SIN1 e 2, respectivamente). As cascas foram coletadas por técnicos do FUNDECITRUS em outubro de 2006, no estado de São Paulo. As amostras SAD foram coletadas no município de Gavião Peixoto (Figura 3.1), procedentes da propriedade São José. As plantas tinham 11 anos de idade. As amostras SIN e ASS foram coletadas no município de Colômbia (propriedade Santo Antônio), plantio 1996 (Figura 3.1).

O município de Gavião Peixoto, localiza-se a uma latitude 21°50'20" sul e a uma longitude 48°29'41" oeste, estando a uma altitude de 515 metros, enquanto o município de Colômbia localiza-se a uma latitude 20°10'33" sul e a uma longitude 48°41'20" oeste, estando a uma altitude de 492 metros. Estas diferenças geográficas acarretam mudanças nas condições climáticas, características do solo entre outras.

Dois fatores climáticos serão citados como exemplo comparando estas regiões.

Figura 3.1 Mapa do estado de São Paulo, destacando os municípios de coleta das plantas cítricas.

A Figura 3.2 apresenta as variações da temperatura média e água disponível no solo⁴³, ocorridas um ano antes da coleta das amostras. No município de Colômbia a temperatura média é maior do que em Gavião Peixoto durante todo o ano e tem maior disponibilidade de água no solo somente nos meses de dezembro a maio.

Na Figura 3.3 se verificam fotos das plantas consideradas ASS, com folhas verdes e brilhantes, SIN1, com plantas parcialmente desfolhadas e a restante sem brilho e com casca do porta-enxerto levemente amarelada e SIN2, com desfolhamento bem elevado e presença de cor amarela intensa na casca do porta-enxerto.

(a)

(b)

Figura 3.2. Dados de temperatura (a) e água disponível no solo (b) nas regiões de coleta de plantas cítricas em um ano⁴³.

Figura 3.3. Comparação entre plantas assintomáticas (ASS), sintomáticas de nível ameno (SIN1) e de nível severo (SIN2)¹².

3.2 Métodos

3.2.1 *Análise das Cascas in situ*

3.2.1.1 Análise por RMN em Baixa Resolução

Utilizou para as análises de RMN em baixa resolução um console Apollo – Tecmag em conjunto com um ímã supercondutor de 2,1 Teslas da Oxford. A frequência de ressonância para ^1H foi de 85 MHz e tem uma homogeneidade de cerca de 0,5 ppm para amostra de água.

3.2.1.2 Determinação do Teor de Óleo por RMN em Baixa Resolução

A determinação da intensidade do decaimento livre induzido (FID) para a medida do teor de óleo nas cascas foram obtidos no equipamento citado acima. O FID foi determinado a 70 μs após o pulso, que é a metodologia usada para medida do teor de óleo em sementes⁴⁴. As amostras das cascas foram liofilizadas, moídas e colocadas em um tubo com 5,5 cm de altura e 1 cm de diâmetro. Cada amostra tinha cerca de 0,2 g e foram inseridas em uma sonda de RMN, com uma bobina de 1 cm de altura por 1,2 cm de diâmetro. Nesta bobina toda a amostra (0,5 cm de altura por 0,9 cm de diâmetro) ficou dentro da região central, que é a região de detecção ótima do sinal de RMN nesta sonda. Para a determinação da quantidade de óleo nas cascas fez-se uma curva de calibração entre a intensidade do sinal de RMN (FID a 70 μs) com a respectiva quantidade de óleo determinada pelo método de extração

com hexano.

3.2.1.3 Análise Qualitativa do Óleo da Casca com a Seqüência CPMG

As amostras das cascas analisadas com a técnica CPMG-RMN em baixa resolução foram desidratadas em um liofilizador e fragmentos foram colocados dentro de um tubo plástico, com 5,5 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro.

A seqüência de pulsos CPMG apresentada na Figura 3.4, consiste de um pulso de 90 graus no eixo x' , seguido por um tempo τ . Após esse tempo, aplica-se um pulso de 180 graus no eixo y' , que gera um eco a 2τ do primeiro pulso. Com as repetições desses pulsos de 180 graus a cada 2τ (n), gera-se um sinal de RMN cujo centro de cada eco resulta de um decaimento exponencial cuja constante de tempo é T_2 (relaxação transversal) da amostra, independente da não-homogeneidade de campo. Após n pulsos de 180 graus, espera-se um tempo T_r maior do que $5 \times T_1$, para iniciar nova aquisição dos dados. Na seqüência foi usado um pulso de rf (90°) de 14 μ s na freqüência de ressonância, $n = 1000$ ecos, $\tau = 100 \mu$ s, $T_r = 2$ s e 256 aquisições. Foi usado um tempo de aquisição (TA) de 16 μ s para cada eco. Os dados da seqüência CPMG tiveram a fase corrigida no próprio console Apollo, com o software NTNMR da Tecmag. Para isso colocou-se o valor máximo do sinal no canal real e o mínimo no canal imaginário. Em seguida os dados foram transferidos e processados com métodos de ajuste exponencial ou de análise quimiométrica (PCA, HCA e PLS).

Figura 3.4. Ilustração da seqüência CPMG

3.2.1.4 Análise Qualitativa do Óleo da Casca com a Seqüência CWFP

A seqüência CWFP-RMN em baixa resolução consiste de um trem de pulsos de 90 graus (Figura 3.5) separados por um tempo τ . Para as medidas foram usados pulsos 90° de $14 \mu\text{s}$, $\tau = 300 \mu\text{s}$, $n = 2000$ ecos, 256 aquisições e um $T_r = 2 \text{ s}$. A frequência de ressonância foi ajustada a 5 KHz da frequência central, o que equivale a um ângulo de precessão de 3π , para um tempo de $300 \mu\text{s}$. O tempo de aquisição entre cada pulso foi de $256 \mu\text{s}$, com 64 pontos e dwell time de $4 \mu\text{s}$. O sinal no modo magnitude foi exportado do console Apollo e processado com software de análise quimiométrica.

Figura 3.5 Seqüência de pulsos utilizada no método CWFP.

3.2.1.5 Análise de RMN em Alta Resolução

Os espectros de RMN em alta resolução das cascas foram adquiridos em espectrômetro Varian modelo Inova 400, com ímã de 9,4 Tesla, equivalente às frequências de 400 MHz para o ^1H e 100 MHz para ^{13}C .

Na análise das cascas por RMN em alta resolução foi removido um pedaço cerca de 40 mm de comprimento por 3 mm de espessura. As análises foram feitas com um probe de 5 mm normalmente usados para análises de soluções, sendo a amostra colocada dentro de um tubo e na região da bobina de excitação/ detecção. Os espectros foram obtidos sem *lock*, uma vez que não se usa solvente. Os ajustes de homogeneidade foram feitos diretamente no sinal de RMN da amostra (tanto no FID quanto no sinal transformado).

Nos espectros de ^1H o pulso de 90° foi de $9,5\ \mu\text{s}$, tempo de aquisição de 0,2 s e o tempo de repetição foi de 10 s. Os espectros de ^{13}C foram adquiridos com um tempo de aquisição de 1,2 s, pulso de 90° de $5,8\ \mu\text{s}$ e com tempo de repetição 10 s, com desacoplador ligado durante todo o experimento.

3.2.2 Análise *in vitro* das Cascas

Após o estudo das amostras de plantas cítricas pelas análises *in situ* por RMN em baixa e alta resolução as mesmas amostras de cascas das plantas SAD, ASS e SIN foram limpas, moídas em um moinho de facas, passadas em peneira de 16 mesh e desidratadas em um liofilizador.

3.2.2.1 Extração com Hexano.

Três gramas de material desidratado e moído foram colocados em um frasco de Erlenmeyer com 50 ml de hexano sob agitação durante 24 horas, à temperatura ambiente. Após as 24 horas, trocou-se e armazenou-se o hexano. Realizaram-se mais duas extrações com intervalos de 24 horas, trocando-se o solvente. O solvente do extrato foi evaporado e a massa do extrato hexânico foi expressa em % da massa inicial.

3.2.2.2 Extração com Solução Alcoólica.

O material insolúvel em hexano, após estar seco, foi usado para a extração hidroalcoólica. Ao resíduo sólido foi adicionado 10 ml de uma solução de álcool/ água, na proporção 80/ 20 % (v/ v). A suspensão foi agitada à temperatura ambiente e o solvente foi trocado por três vezes a cada 24 horas. O álcool foi evaporado em rotavapor e a água em um liofilizador. A massa do extrato foi expressa em % da massa inicial.

3.2.2.3 Análise dos Extratos com RMN em Alta Resolução

Os produtos dos extratos hexânico e hidroalcoólico foram analisados com RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando como solvente clorofórmio e água deuterada, respectivamente. Nos espectros de ^1H o pulso de 90° foi de 9,5 μs e o tempo de aquisição de 4,1 s. Os espectros de ^{13}C foram adquiridos com um tempo de

aquisição de 1,2 s e o pulso de 90° de 11,2 μ s, com desacoplador ligado durante todo o experimento.

3.2.2.4 Cromatografia

Após a extração dos óleos vegetais das cascas de plantas cítricas, os óleos brutos foram analisados por cromatografia gasosa de alta resolução para a identificação dos triacilglicerídeos e dos esteróis. Em seguida os óleos foram transesterificados para a determinação dos teores dos ácidos graxos⁴⁵.

Para determinação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa através da eluição de soluções padrões e para quantificação a cromatografia gasosa (GC). Na quantificação, utilizou-se o método de normalização das áreas dos picos, onde a concentração dos picos foi determinada pela razão da sua área com a área total de todos os de ésteres metílicos de ácidos graxos identificados.

3.2.2.4.1 Análise de Triacilglicerídeos por GC

As análises cromatográficas dos triacilglicerídeos de cadeia curta foram realizadas em um cromatógrafo a gás da Agilent HP6890 equipado com um detector de ionização de chama (FID) e um injetor *split/ splitless*. Utilizou-se o sistema de injeção no modo *split* em razão de 1:10, para um volume de injeção de 3 μ L. Empregou-se hidrogênio como gás de arraste e velocidade linear média de 60 cm/ s, e nitrogênio como gás auxiliar a 50 ml/ min.

A temperatura do injetor 360 °C e do detector 380 °C. A temperatura inicial do forno foi 260 °C por 2,5 minutos com taxa de aquecimento de 4 °C/ min até 350 °C, sendo mantida isotermicamente nesta temperatura por 10 minutos. A coluna capilar utilizada foi Quadrex (65 % fenil 400 metil silicone) com 25 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e fase estacionária com 0,1 µm de espessura (abreviadamente, 25 m x 0,25 mm x 0,1 µm).

A análise de triglicerídeos de cadeia longa foi realizada mudando-se alguns parâmetros das condições apresentadas acima. As temperaturas do detector e do injetor foram de 380 °C e 360 °C, respectivamente. Utilizou-se temperatura inicial do forno em 330 °C mantendo por 1 minuto, e, posteriormente, fez-se a rampa de aquecimento à 1 °C por minuto até a temperatura de 350 °C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos.

3.2.2.4.2 Análise de Esteróis

As análises de esteróis foram realizadas com GC nas mesmas condições propostas para a análise de triacilglicerídeos de cadeia curta. Os esteróis foram identificados por espectrometria de massas (MS), cromatógrafo a gás GC-17A da marca Shimadzu acoplado a um detector de espectroscopia de massa QP 5050A. As condições de trabalho utilizadas foram: hélio como gás de arraste a uma velocidade linear média de 44,3 cm/ s, e um sistema de injeção no modo *split* de 1:30, para um volume de 3 µL. As temperaturas do injetor e da interfase foram de 320 °C e 280 °C, respectivamente.

Realizou-se estas análises com uma coluna capilar de sílica fundida LM-5 (B 591197) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,35 µm. A temperatura inicial do

forno foi de 280 °C, aquecendo-se até 300 °C e manteve-se a temperatura final isotérmica por 50 minutos. Injetou-se uma amostra de óleo com menor quantidade de triacilglicerídeos. Os esteróis separados foram fragmentados por impacto eletrônico (70 eV) nas modalidades de varredura de todos os fragmentos (*total ion chromatogram*) e varredura de fragmentos selecionados (*single ion monitoring*).

Os esteróis foram também identificados com o uso de uma mistura padrão que continha: β -sitosterol, estigmasterol, palmitato, estearato de colesterol, α -tocoferol, δ -tocoferol, ergosterol e colesterol, e pelo preparo individual de algumas soluções de esteróis como: estigmasterol, ergosterol, colesterol estearato, β -sitosterol, monoestearina, estearil palmitato e colesterol.

3.2.3 Análise dos FAME

3.2.3.1 Transesterificação das Amostras de Óleos Vegetais

Realizou-se a transesterificação dos óleos segundo uma adaptação para microescala do método descrito por Hartman e Lago⁴⁵. Inicialmente preparou-se a mistura esterificante, adicionando 2,0 g de cloreto de amônia a 60,0 ml de metanol seguido pela adição de 3,0 ml de ácido sulfúrico concentrado. A mistura, contida em balão de fundo redondo adaptado a um condensador, foi mantida em refluxo sob agitação por 15 minutos. O reagente obtido foi então estocado em um Erlenmeyer com tampa de vidro, podendo ser utilizado por várias semanas.

Posteriormente, em um tubo de ensaio autoclavável de 20 ml, pesou-se 35,0 mg de óleo. A seguir, adicionou-se 0,5 ml de solução 0,5 mol/L de hidróxido de

sódio em metanol e o tubo de ensaio aquecido por 10 minutos em banho-maria a 90 °C. Resfriou-se em tubo de ensaio em banho de gelo e adicionou-se 1,5 ml da mistura esterificante previamente preparada segundo o procedimento descrito anteriormente. Aqueceu-se novamente o tubo de ensaio por 10 minutos em banho-maria 90 °C. Resfriou-se novamente o tubo de ensaio em banho de gelo e adicionou-se 5,0 ml de n-heptano e 10 ml de água destilada. Agitou-se o tubo de ensaio algumas vezes e esperou-se que ocorresse a separação de fases. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur isolou-se a fase orgânica superior correspondente a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), a qual foi analisada por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

3.2.3.2 Análise de FAME por GC-MS

As análises de FAME foram realizadas por GC-MS em um cromatógrafo a gás GC-17A da marca Shimadzu acoplado a um detector de espectroscopia de massa QP 5050A. Utilizou-se hélio como gás de arraste a uma velocidade linear média de 36,5 cm/ s, e um sistema de injeção no modo *splitless* de 1:10, para um volume de 1 µL. As temperaturas do injetor e da interfase foram ambas de 250 °C. Realizou-se estas análises com uma coluna capilar de sílica fundida LM-100 (Carbowax 20M, polietileno glicol) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,30 µm. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, mantendo-se esta temperatura por 8 °C/ min, aquecendo-se até 220 °C. Manteve-se a temperatura final isotérmica por 32 minutos.

Os ésteres metílicos separados foram fragmentados por impacto eletrônico (70 eV) nas modalidades de varredura de todos os fragmentos (*total ion*

chromatogram) e varredura de fragmentos selecionados (*single íon monitoring*). O fragmento monitorado para os ácidos graxos saturados foi o fragmento m/z 74, para ácidos graxos monoinsaturados, o m/z 55, para ácidos graxos diinsaturados, o m/z 67 e para ácidos graxos triinsaturados, o fragmento m/z 79⁴⁶. Fez-se a quantificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos através da normalização das áreas dos picos, semelhante ao procedimento descrito no final da seção 3.2.2.4.

3.2.3.3 Análise de FAME por GC/ FID

As análises cromatográficas dos FAME foram realizadas em um cromatógrafo a gás da Shimadzu, GC-17A, equipado com um detector de ionização de chama (FID) e um injetor *split/ splitless*. Utilizou-se o sistema de injeção no modo *splitless* em razão de 1:5, para um volume de injeção de 1 μ L. Empregou-se hidrogênio como gás de arraste e velocidade linear média de 31 cm/ s, e nitrogênio como gás auxiliar a 2,06 ml/ min.

A temperatura do injetor foi de 250 °C e do detector, 250 °C. A temperatura inicial do forno foi 60 °C por 8,0 minutos com taxa de aquecimento de 8 °C/ min até 220 °C, sendo mantida isotermicamente nesta temperatura por 32 minutos. A coluna capilar utilizada foi sílica fundida LM-100 (Carbowax 20M, polietileno glicol) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,30 μ m. A quantificação dos FAME foi efetuada por normalização da área dos picos cromatográficos, conforme procedimento na seção 3.2.2.4.

A Tabela 3.1 apresenta os oito principais ácidos graxos encontrados nas amostras de cascas cítricas e os respectivos tempos de retenção, para as condições

utilizadas.

Tabela 3.1. Principais ácidos graxos de plantas cítricas e os respectivos tempos de retenção

Ácido Graxo	Sigla	Tempo de Retenção
Cáprico	C	19,54
Láurico	La	23,02
Mirístico	M	26,06
Palmítico	P	28,9
Esteárico	S	32,26
Oléico	O	32,75
Linoléico	L	33,91
Linolênico	Ln	35,56

3.2.4 Análise Multivariada

Os valores da curva de decaimento dos tempos de relaxação (CPMG e CWFP) e as concentrações percentuais dos FAME (cromatografia gasosa) das cascas de cada amostra foram utilizados para as análises de componentes principais^{47, 48} (PCA), análise de agrupamento hierárquico (HCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) utilizando o programa Pirouette, versão 3.11 (Infometrix).

Os dados de CPMG para essas análises consistiu de uma matriz de 1000 variáveis (intensidade dos ecos) de cada uma das 120 amostras. Os dados de CWFP consistiu de uma matriz de 2000 variáveis de cada uma das 120 amostras. Os dados da concentração dos oito FAME consistiu de uma matriz de oito variáveis (% de cada FAME) para cada uma das 120 amostras. Estas foram divididas em classes: (1) sadias; (2) assintomáticas e (3) sintomáticas, de acordo com cada região

estudada (enxerto e porta-enxerto). As análises de PCA, HCA e PLS foram realizadas, primeiramente, sem qualquer tipo de pré-processamento e depois, empregaram-se os pré-processamentos autoescalamento e centralização dos dados na média.

A centralização dos dados na média consistiu em calcular o valor médio de cada variável para todas as curvas. O valor médio foi então subtraído de cada valor da variável, de forma que o mesmo se iguale a zero. No autoescalamento, os dados são centrados na média e depois divididos pelo respectivo desvio padrão do conjunto. Dessa forma, não se prioriza variáveis que possuam maior magnitude, as quais não distinguem necessariamente os dados, colocando todas elas com um mesmo peso⁴⁷.

Nas análises de HCA as amostras foram agrupadas pelo método de conexão incremental utilizando-se a distância euclidiana para a análise exploratória^{47, 48}. Os dados de diferentes técnicas foram correlacionados pelo método de PLS, onde se usaram a matriz de dados de CPMG e CWFP como variável independente e a dos FAME como variáveis dependentes⁴⁹. A avaliação da previsibilidade dos modelos obtidos foi feita através da validação cruzada, na qual se remove uma amostra do conjunto de dados para a geração do modelo, que será testada como desconhecida, repetindo-se este procedimento para as demais amostras⁵⁰.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil metabólico das cascas de plantas cítricas sem MSC (SAD), coletadas no município de Gavião Peixoto e das plantas coletadas em pomares contaminados no município de Colômbia, plantas assintomáticas (ASS) e sintomáticas nível 1 e 2 (SIN1 e SIN2) foram analisados *in vitro* (metabolitos extraídos) e *in situ* (direto na casca). As amostras de cascas de plantas SAD, ASS e SIN foram coletadas de árvores de mesma variedade (Valência), plantadas no mesmo ano, mas cultivadas em diferentes solos e climas, conforme a Figura 3.2. Como os fatores edafo-climáticos (solo e clima) podem alterar o metabolismo das plantas, em alguns casos as plantas ASS foram utilizadas como controle, em substituição as SAD.

Os extratos obtidos das cascas com hexano e soluções hidroalcoólicas (*in vitro*) foram usados para análise quantitativa e na análise qualitativa por RMN em alta resolução. O estudo cromatográfico foi realizado somente para o extrato hexânico. As cascas também foram analisadas (*in situ*) pela RMN em alta (^1H e ^{13}C) e baixa (^1H) resolução.

4.1 Análise Quantitativa dos Extratos (Análise *in vitro*)

A Figura 4.1 mostra a quantidade dos extratos hexânico e hidroalcoólico obtidos das cascas, próximas do ponto de enxertia, para as plantas SAD, ASS, SIN1 e SIN2. Observa-se nestas figuras que a quantidade do extrato hidroalcoólico é superior a do extrato hexânico. A Figura 4.1-a, apresenta a percentagem de extrato hexânico (lipídios apolares) das cascas dos enxertos (copas) e dos porta-enxertos

(cavalo). A quantidade de lipídios no porta-enxerto foi maior nas amostras SIN2 > SIN1 > ASS > SAD, variando de 2,2 a 1,2 %. Os teores de extratos hexânicos das cascas do enxerto foram menores (0,8 a 0,5 %) do que no porta-enxerto, mas com a mesma tendência, SIN2 > SIN1 > ASS. A exceção foi para as plantas SAD que apresentaram maior quantidade de extrato hexânico do que as plantas ASS. Estes resultados mostram claramente a correlação entre a quantidade de lipídios extraídos e os sintomas da MSC em ambas as cascas de enxerto e porta-enxerto.

A quantidade de extrato hidroalcoólico (Figura 4.1-b) das cascas do porta-enxerto foi mais alta nas plantas SIN2, do que nas outras amostras. As amostras de porta-enxerto SIN1, ASS e SAD apresentaram praticamente a mesma quantidade de extrato hidroalcoólico. Os extratos das cascas de enxerto SIN, ASS e SAD foram similares. Somente observou-se um pequeno aumento no extrato hidroalcoólico das plantas SIN2. Esses resultados mostram que o extrato hexânico é mais sensível a MSC do que o extrato hidroalcoólico.

O conteúdo mais elevado de triacilglicerídeo (TAG) e sacarose na casca de plantas com MSC do que nas plantas ASS/ SAD está diretamente ligado ao bloqueio do floema, impedindo o transporte da seiva elaborada das folhas (*source*) para outras partes da planta como a raiz (*sink*). O alto conteúdo de óleo observado nas plantas com sintomas pode ser um indicativo da relação entre a MSC e a doença Tristeza⁵¹⁻⁵³.

Figura 4.1 Quantidade percentual de extratos (a) hexânico e (b) hidroalcoólico, obtidas das plantas SAD, ASS, SIN1 e SIN2. Em cada figura, os extratos do porta-enxerto (cavalo) se encontram à esquerda e os do enxerto (copa), à direita.

4.2 Caracterização do Extrato

4.2.1 Análise dos Extratos por RMN em Alta Resolução

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . No entanto, serão apresentados apenas os dados de ^{13}C que contêm maiores informações.

Um espectro de RMN de ^{13}C típico do extrato hexânico da casca de SIN2 está na Figura 4.2. Os principais picos foram atribuídos aos TAG de ácidos graxos insaturados. O espectro mostra os sinais dos carbonos das carboxilas em 172 ppm, dos insaturados na região 126 e 132 ppm, do glicerol em 69 e 61 ppm, dos metilênicos entre 34 a 20 ppm e dos carbonos metílicos em 14 ppm⁵⁴⁻⁵⁷.

Figura 4.2 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) do extrato hexânico da casca do porta-enxerto SIN2 em CDCl_3 . No destaque, expansão do espectro na região de insaturações entre 131 and 126 ppm.

Na expansão da região de carbonos insaturados entre 131 e 126 ppm são observados doze picos (Figura 4.2), identificando-se quatro sinais de maior intensidade em 129,2; 129; 127 e 126,9 ppm relativos aos carbonos insaturados do ácido linoléico, seis sinais de média intensidade em 130,9; 128,9; 127,3; 127,2, 126,7 e 126,0 ppm, relativos aos carbonos insaturados do ácido linolênico e dois sinais de baixa intensidade em 128,8 e 128,7 ppm relativos aos carbonos do ácido oléico⁵⁸⁻⁶⁰. A intensidade dos picos dessa região mostra que a concentração dos ácidos graxos varia na seqüência linoléico > linolênico > oléico. O espectro de ^{13}C (Figura 4.2) também apresenta grande número de pequenos picos relativos a outros compostos apolares extraídos pelo hexano. O espectro de outras amostras SIN2 e ASS de enxerto e porta-enxerto foram similares a SIN2 da região do porta-enxerto e

não mostraram diferenças significativas entre plantas SIN2, ASS e SAD.

Um espectro típico de RMN de ^{13}C do extrato hidroalcoólico da casca do porta-enxerto SIN2 está na Figura 4.3. Os doze picos intensos em 105; 93; 82; 77; 75; 73,5; 73; 71; 70; 63,5; 62 e 61 ppm são atribuídos à sacarose^{27,61}. Outros sinais de menor intensidade são referentes aos aminoácidos, ácido glutâmico (182,0; 179,0; 56,0; 43,0 e 28,0 ppm) e à prolina (175,0; 62,0; 47,0; 30,0 e 24,0 ppm). Observou-se a glutamina tendo seus sinais no deslocamento químico 179,50; 174,45; 54,27; 33,00 e 28,30 ppm⁶²⁻⁶⁵. Nestes espectros também aparecem pequenos picos em 69 ppm e 67 ppm, que podem ser devido a dois açúcares, rafinose e estaquiose, respectivamente²⁷.

Observou-se que os sinais do ácido glutâmico em 56, 43 e 28 ppm são mais intensos nos extratos das cascas do enxerto ASS do que nos das plantas SIN. Os sinais da prolina em 175 e 30 ppm são fracos ou indetectáveis nos extratos das cascas de plantas ASS do que nas plantas SIN. A análise dos extratos das cascas do porta-enxerto mostra que o sinal do ácido glutâmico tem intensidades similares entre as plantas ASS e SIN, enquanto que o sinal da prolina é mais intenso nas plantas SIN.

Essas diferenças nos teores desses aminoácidos podem estar relacionadas à presença da doença, ou a outros fatores ambientais. As respostas metabólicas das plantas à desidratação são diversas e complexas, incluindo a acumulação de substâncias como a prolina, cuja concentração aumenta em condições de seca, em alta ou baixa temperatura, ou por deficiências nutricionais^{63, 66}.

Figura 4.3 Espectro de ¹³C-RMN (400 MHz) do extrato hidroalcoólico da casca do porta-enxerto SIN2 em D₂O.

As diferenças entre as plantas SAD e SIN podem ter ocorrido devido a um estresse ambiental, notadamente o hídrico, gerando na planta um acúmulo de prolina. As plantas SIN foram colhidas em região com menor índice pluviométrico e maior temperatura do que das plantas SAD, conforme Figura 3.2. O acúmulo de prolina sob déficit hídrico pode estar associado a essa condição desfavorável, representando um mecanismo regulador da perda de água, mediante aumento da osmolaridade celular, provendo estabilidade aos colóides e sendo uma fonte de nitrogênio em condições de seca.

A síntese de prolina se realiza a partir do ácido glutâmico^{67, 68}, tanto em condições normais quanto em alto estresse hídrico. Em condições de alto estresse hídrico, a prolina se oxida para formar parte do ácido glutâmico e outros compostos solúveis que posteriormente originam proteínas⁶⁹. Em condições inadequadas de crescimento, tais como déficit de nutrientes, de umidade ou excesso de sais, a

formação de ácido glutâmico é inibida, podendo acumular prolina ao diminuir sua taxa de oxidação^{70,71}.

Segundo Stewart⁷², nas plantas sob estresse, o acúmulo de prolina pode ser decorrente da regulação osmótica e proteção da integridade celular e também poderia estar relacionado com a função de proteger as células dos processos de desnaturação, ou ainda participar na constituição de um estoque de N e C que poderia ser utilizado depois do período de estresse⁷³. A perda da capacidade do transporte de nitrogênio está ligada à acumulação de prolina. A acumulação deste aminoácido é sintoma da planta à sua resposta de deterioração pelo déficit hídrico^{67,74} e não uma característica adaptativa do valor de sobrevivência⁷⁴.

O aumento na intensidade dos sinais da prolina nas plantas de citros poderia ser atribuído ao aumento das atividades das enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos⁷⁵ ou a inibição da oxidação da prolina⁷⁶. A planta com MSC, além do déficit hídrico da região, tem dificuldades de transportar a seiva elaborada devido à obstrução do floema, ocasionando uma menor formação de raízes e radículas e, consequentemente, diminuição da absorção de nutrientes e umidade do solo.

Andrade et al.⁷⁷ e Nolte⁶³ relatam que a prolina é um dos aminoácidos mais estáveis em condições de seca, o menos inibitório do crescimento celular e tem uma natureza altamente higroscópica.

4.2.2 *Análise dos Extratos Hexânicos por Cromatografia*

Investigou-se primeiramente o perfil metabólico do extrato hexânico, com a cromatografia gasosa com coluna apolar. A Figura 4.4 mostra o cromatograma dos

lipídios extraídos das cascas dos enxertos SAD. Esta figura apresenta o perfil geral dos lipídios que contêm principalmente esteróis, diacilglicerídeos e TAG.

Os esteróis foram identificados em tempos de eluição entre 3 e 6 minutos. Pode-se identificar o campesterol, estigmasterol e β -sitosterol, os quais eluem em tempos de 5,1; 5,4 e 5,9 minutos, respectivamente. Os outros picos desta região do cromatograma são relacionados com derivados de estigmasterol. Os diacilglicerídeos e triacilglicerídeos foram identificados em tempos de eluição entre 12 a 17 minutos e 20 a 32 minutos, respectivamente.

Observou-se que nos enxertos SAD há menor quantidade de esteróis e maior quantidade de triacilglicerídeos do que nos enxertos SIN. Também ocorreu maior quantidade de TAG no porta-enxerto SIN do que no porta-enxerto SAD, o que pode estar relacionado com o aumento dos TAG nessas plantas. A quantidade de TAG é menor nos enxertos SIN do que nos porta-enxertos SIN.

Figura 4.4 Perfil cromatográfico do óleo extraído do enxerto de planta SAD.

4.3 Análise de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) por GC

Os TAG extraídos com hexano foram transesterificados para a obtenção do perfil dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. O perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) de uma amostra SIN2 (porta-enxerto) é mostrado na Figura 4.5. Os cromatogramas das outras amostras foram similares variando apenas as intensidades dos FAME. Nesta figura estão assinalados os oito principais FAME, cáprico (C), láurico (La), mirístico (M), palmítico (P), esteárico (S), oléico (O), linoléico (L) e linolênico (Ln), cujos tempos de retenção estão na Tabela 3.1. Os sinais menos intensos não foram identificados.

Figura 4.5. Perfil cromatográfico dos FAME da amostra SIN2cav.

As análises quantitativas foram realizadas em cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (GC-FID), pois os ácidos graxos têm resposta

idêntica, facilitando a medida de sua concentração. Já as análises qualitativas foram feitas com cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas, comparando-se com soluções padrões.

Através dos cromatogramas obteve-se a composição percentual dos ácidos graxos presentes nos óleos de cada amostra. Da Tabela A. 1 à Tabela A. 6, no Anexo A, se observa as concentrações percentuais de ácidos graxos para cada amostra.

A Figura 4.6 apresenta a proporção de ácidos graxos das plantas ASS e SIN1 e 2 que ocorrem em menor concentração (C, La, M e S). Comparando as amostras de porta-enxertos ASS e SIN1 e 2 (Figura 4.6) pode-se observar que a percentagem de ácidos graxos saturados C, La, M e S apresentaram tendências de aumentar à medida que evolui a doença. Nas copas essa tendência ocorre somente para o ácido esteárico. Os outros ácidos saturados (C, La e M) aumentam dos enxertos de plantas ASS para as plantas SIN1, diminuindo para o estágio mais severo da doença (SIN2).

A Figura 4.7 apresenta os dados referentes aos ácidos graxos em maior concentração (P, O, L e Ln). Nos enxertos observa-se a tendência de aumento de P e L e uma tendência de diminuição do O e Ln, com a severidade dos sintomas. Esta tendência também ocorre nos porta-enxertos, com aumento do L e diminuição do O e Ln. Nos porta-enxertos ocorreram um aumento do P das plantas ASS para a SIN1 e um decréscimo para o nível 2.

Comparando-se os ácidos graxos do enxerto e do porta-enxerto, pode-se dizer que a percentagem de ácidos graxos saturados La, M, P e S e o insaturado L apresentam aproximadamente a mesma quantidade em ambas as amostras, enquanto que a concentração de Ln é maior no porta-enxerto e do C e O no enxerto.

Figura 4.6 Concentrações percentuais dos ácidos graxos saturados de menor concentração: C, La, M e S nas plantas ASS e SIN1 e 2.

Figura 4.7 Concentrações percentuais dos ácidos graxos de maior concentração: P, O, L e Ln nas plantas ASS e SIN1 e SIN2.

O aumento na concentração de L com o avanço da doença e a consequente redução do teor de O e Ln pode estar relacionado com a biossíntese de moléculas sinalizadoras. Plantas infectadas com microorganismos liberam lipoxigenase (lox) que é a primeira enzima envolvida na produção de hidroperóxidos de ácido linolênico que é a intermediária na síntese do ácido jasmônico, que desencadeia mecanismos de defesa nas plantas^{78, 79}. Ou seja, a doença evolui e maior quantidade de ácido linolênico pode estar sendo convertido em ácido jasmônico. Isto pode estar ocorrendo tanto no enxerto quanto no porta-enxerto.

A Figura 4.8 apresenta o agrupamento dos ácidos graxos saturados, C, La, M, P e S, do monoinsaturado O e dos poliinsaturados L e Ln. Nesta figura se observa que os ácidos graxos poliinsaturados apresentam-se em maior quantidade em todas as amostras, e também em maior quantidade nos porta-enxerto do que nos enxertos. Neste gráfico se ressalta que as quantidades médias destes ácidos poliinsaturados para a região do porta-enxerto e do enxerto aumentam das plantas SAD para as ASS. Isso pode ser devido às diferenças de temperatura entre as duas regiões de coleta.

Não se observa uma variação significativa dos ácidos graxos poliinsaturados com o desenvolvimento da doença. O oléico diminui com a evolução da doença e os ácidos graxos saturados aumentam das plantas ASS > SIN1 > SIN2 tanto nos enxertos quanto nos porta-enxertos (Figura 4.6).

Figura 4.8 Concentrações percentuais dos ácidos graxos saturados, monoinsaturado e poliinsaturados nas plantas ASS e SIN1 e SIN2.

Na Figura 4.9 apresenta os ácidos que diminuem (O + Ln) e aumentam de concentração (C + La + M + P + S + L) com a evolução da doença, demonstrando uma variação similar entre as plantas ASS e SIN1 e 2 tanto nos porta-enxertos quanto nos enxertos. Por isso, esses agrupamentos (O + Ln) e (C + La + M + P + S + L) serão utilizados para auxiliar na interpretação dos dados de FAME e RMN em baixa resolução através dos dados quimiométricos, que serão descritos nos itens subsequentes.

Figura 4.9 Concentração percentual de ácidos graxos. Os valores se referem à soma das concentrações de ácidos graxos com tendências de aumento (C + La + M + P + S + L) e diminuição (O + L) de acordo com as alterações relacionadas a MSC.

4.3.1 Análise Quimiométrica dos Dados de Cromatografia.

Analisou-se também os dados cromatográficos por métodos quimiométricos como análise dos componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA). Esses métodos permitem que se faça uma avaliação global de todos os dados e de todas as amostras ao mesmo tempo, discriminando-as pelas suas similaridades e/ ou diferenças. Os resultados desses métodos são apresentados na forma de gráficos que permitem uma rápida inspeção visual das diferenças entre as amostras.

4.3.1.1 Análise de Componentes Principais para FAME

A PCA é o processamento matemático de um conjunto de dados com o objetivo de representar as variações presentes. O objetivo do PCA é descrever as distâncias entre pontos (espalhamento ou variação) usando poucos eixos ou dimensões. Isto é efetuado pela construção dos eixos dos componentes principais que se alinham com os dados⁸⁰.

Os valores de área percentual dos oito ácidos graxos das 120 amostras (Tabela A. 1 a Tabela A. 6), formando uma matriz de 120 x 8 elementos foram utilizados na PCA. Como não houve uma discriminação entre todas essas amostras, passou-se a analisar as amostras de enxertos e porta-enxertos separadamente e também sem as amostras SAD, que foram coletadas em regiões com diferentes condições ambientais (Figura 3.2).

Vários pré-processamentos foram utilizados, mas serão mostrados somente os resultados do pré-processamento centrado na média, devido ao fato deste ter apresentado uma relação coerente com os dados das concentrações percentuais, para se traçar uma comparação mais clara entre os dados.

A região do porta-enxerto foi estudada através da construção de uma matriz com as três classes ASS, SIN1 e 2. Com este processamento para a região do porta-enxerto conseguiu-se 99,89 % de informação com quatro componentes principais.

Na Figura 4.10-a está o mapa de escores entre os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) que demonstram que há uma pequena discriminação entre as plantas ASS e SIN. As amostras SIN1cav se mantiveram próximas das ASScav; no entanto, existem amostras desta última que se misturam

no grupo das sintomáticas. Foi tolerada essa mistura para amostras assintomáticas devido ao seu caráter dúbio: pode apresentar sintomas ou não, se comportando, respectivamente, como amostra sintomática ou sadia. Este gráfico também demonstra que a segunda componente é que discrimina as três classes, onde as amostras ASS apresentam valores negativos e as amostras SIN1cav e SIN2cav apresentam valores positivos.

Figura 4.10. Gráfico dos escores (a) e de pesos (b) da análise por PCA dos dados dos FAME das amostras de porta-enxerto, ASScav (●), SIN1cav (▲) e SIN2cav (☆).

O diagrama de pesos na Figura 4.10-b mostra que os ácidos graxos C, La, M e S contribuíram muito pouco para a elaboração deste modelo, certamente por estarem em baixa concentração nestas amostras. Por outro lado, os outros ácidos graxos P, O, L e Ln, que estão em alta concentração, contribuem significativamente para a formação do modelo. Esta figura também mostra que P e L possuem alto peso positivo na PC2, enquanto Ln e O apresentam valores negativos nesta componente. Esta característica discrimina os diferentes níveis da doença e essa

constatação é corroborada com os dados da Figura 4.7: a concentração dos ácidos O e Ln diminuem com a evolução da doença, enquanto que os ácidos L e P têm sua concentração aumentada com essa evolução.

Dentre as variáveis com maior peso, três delas são correspondentes a ácidos graxos insaturados, o que corrobora com a constatação acima de que as diferenças substanciais entre amostras sadias e doentes estão relacionadas com a concentração das espécies insaturadas.

Os resultados de PCA (mapa de escores e pesos) para as amostras do enxerto são mostrados na Figura 4.11. A variância acumulada atingida foi de 99,77 % com quatro componentes principais. O gráfico de escores (Figura 4.11-a) revelou que a discriminação das plantas ASS e SIN está relacionada à primeira componente principal (PC1), onde as amostras ASS apresentam valores positivos e as amostras SIN1 e 2, apresentam valores negativos. A sequência de agrupamento, de valores de PC1 negativo para PC1 positivo é SIN2cop, SIN1cop e ASScop. As variáveis que conduzem a esta separação estão associadas, portanto a esta componente, e podem ser identificadas pela análise do gráfico de pesos, (Figura 4.11-b), que revelou que os ácidos graxos O e Ln apresentaram alto peso positivo na PC1, por terem maior concentração nas plantas ASS, enquanto que os ácidos graxos P e L, peso negativo na mesma componente, por terem maior concentração nas plantas SIN. Esses resultados são corroborados por aqueles da Figura 4.7. A exemplo do que aconteceu com as amostras de porta-enxerto, os demais ácidos graxos (C, La, M e S) não contribuem significativamente para a descrição de cada conjunto de amostras.

Comparando-se os gráficos de escores das amostras de porta-enxerto e enxerto, se observa que para esta última os agrupamentos formados são mais

distintos, o que denota que as diferenças são mais observadas nessa região da planta. No entanto, no mapa de escores ocorreu uma melhor discriminação entre as plantas SIN1 e 2 dos porta-enxertos.

Figura 4.11 Gráfico dos escores (a) e de pesos (b) da análise por PCA dos dados dos FAME das amostras de enxertos, ASScop (○), SIN1cop (△) e SIN2cop (★).

Avaliou-se também os ácidos graxos fazendo-se o somatório dos mesmos que tiveram comportamento similar com a evolução da doença, ou seja, somou as concentrações de O + Ln, P + L e C + La + M + P + S + L, conforme demonstrando na Figura 4.9.

A Figura 4.12-a apresenta o resultado da PCA, onde se observa que o PC1 discriminou os três níveis da doença de forma eficiente. Neste gráfico, as amostras ASS apresentam valores negativos, e estão associadas à variável (O + Ln), que tem peso negativo nesta componente. As amostras SIN1 se comportaram no gráfico como se fosse a transição entre as plantas ASS e SIN2. As amostras SIN2cop ficaram na região positiva do gráfico dos escores. Estas amostras estão associadas às variáveis (P + L) e (C + La + M + P + S + L), que apresentaram pesos positivos. A

última variável acima foi importante na separação global do conjunto devido ao seu alto peso quando comparada com as outras variáveis, porém, individualmente ela não auxiliou significativamente na separação.

Figura 4.12 Gráfico dos escores (a) e de pesos (b) da análise por PCA dos dados dos FAME das amostras de enxertos ASScop ($\circ$), SIN1cop (Δ) e SIN2cop ($\star$), para os agrupamentos dos FAME O + Ln, P + L e C + La + M + P + S + L.

No estudo das amostras por PCA do porta-enxerto os mesmos agrupamentos dos ácidos graxos no enxerto (P + L, C + La + M + P + S + L e O + Ln) foram utilizados para discriminar os níveis da doença.

A Figura 4.13 apresenta os resultados da análise de componentes principais, onde a distinção das amostras não se dá somente com PC1, mas também com PC2. No gráfico de pesos (Figura 4.13-b) observa-se que a variável (C + La + M + P + S + L) não foi uma variável muito discriminante individualmente no conjunto das amostras, mas auxiliou na separação global dos dados aumentando a variância acumulativa.

Figura 4.13 Gráfico dos escores (a) e de pesos (b) da análise por PCA dos dados dos FAME das amostras de porta-enxerto ASScav (●), SIN1cav (▲) e SIN2cav (☆), para os agrupamentos dos FAME O + Ln, P + L e C + La + M + P + S + L.

4.3.1.2 Análise de Agrupamentos Hierárquicos dos FAME

Analísaram-se também os dados de FAME individualmente com o método HCA. Este consiste no tratamento matemático de cada amostra como um ponto no espaço multidimensional descrito pelas variáveis escolhidas. O objetivo da HCA é exibir os dados em um espaço bidimensional, de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. E seus resultados são apresentados na forma de um dendrograma com níveis de similaridade variando entre 1 e 0. No dendrograma, quanto mais próximo de 1 maior a similaridade entre as amostras.

Na Figura 4.14 esta o dendrograma dos dados de FAME para as amostras ASS e SIN1 e 2, para porta-enxerto e enxerto. Em todas as análises de HCA, o pré-processamento utilizado foi o centrado na média na forma incremental. Para as

amostras do enxerto Figura 4.14 ocorreu a formação de três grupos, ao se usar um grau de similaridade de 0,56. A parte esquerda do dendograma encontra-se quinze amostras, das quais três são SIN2, quatro SIN1 e oito ASS, formando um grupo com baixa discriminação. O agrupamento central discriminou as plantas ASS (doze amostras). O agrupamento à direita com treze amostras, discriminou as amostras de plantas SIN, sendo nove SIN2 e quatro SIN1.

Figura 4.14 Dendrograma das amostras de enxerto ASS e SIN1 e 2 utilizando os ácidos graxos separadamente: C, La, M, P, S, O, L e Ln.

O dendograma para as amostras de porta-enxerto está na Figura 4.15, que apresenta a formação de cinco grupos, ao se usar um grau de similaridade de 0,53. O agrupamento da esquerda contém apenas amostras SIN (onze), sendo que dez são SIN2 e uma SIN1. Em seguida, se observa um grupo com dezesseis amostras, onde se verifica uma mescla de amostras ASS (11 amostras) e SIN (5 amostras). Os últimos dois subgrupos à direita, com onze amostras não apresentaram uma boa discriminação, formando um grupo heterogêneo com plantas ASS (sete), SIN1(dois) e SIN2 (dois). Comparando se as Figura 4.14 e Figura 4.15 se observa que a melhor discriminação se deu com as amostras do enxerto.

A seguir serão apresentados somente os melhores modelos de discriminação conseguidos pela PCA, utilizando a soma das concentrações dos ácidos graxos (O + Ln), (P + L) e (C + La + M + P + S + L).

Na Figura 4.16 observa-se que houve a formação de três grupos para as amostras de enxerto de plantas SIN e ASS. Na parte esquerda do dendograma se encontram dezessete amostras SIN, sendo todas as doze amostras SIN2 e cinco SIN1. As vinte amostras ASS se encontram praticamente todas da parte central para a direita do dendograma. Junto com elas foram classificadas três amostras SIN1. Este dendograma foi edificado com índice de similaridade de 0,78.

Figura 4.15 Dendrograma das amostras de porta-enxerto ASS e SIN1 e 2 utilizando os ácidos graxos separadamente: C, La, M, P, S, O, L e Ln.

O dendrograma para as amostras do porta-enxerto Figura 4.17 apresenta uma discriminação similar a da copa (0,79). Observa-se que na parte esquerda do dendrograma dezoito amostras SIN, sendo onze amostras SIN2 e sete SIN1. As vinte amostras ASS se encontram praticamente todas da parte central para a direita do dendrograma, onde também foram classificadas uma amostra SIN1 e outra SIN2.

Figura 4.16 Dendrograma das amostras do enxerto ASS e SIN1 e 2 utilizando como variáveis os ácidos graxos agrupados: (O+Ln), (P+L) e (C+La+M+P+S+L).

Observa-se que a diferenciação é maior entre as amostras ASS e SIN 2 do que entre ASS e SIN 1, tanto para o enxerto quanto para o porta-enxerto. A melhor discriminação entre ASS e SIN2 ocorreu no enxerto.

Figura 4.17 Dendrograma das amostras do porta-enxerto ASS e SIN1 e 2 utilizando como variáveis os ácidos graxos agrupados: (O + Ln), (P + L) e (C + La + M + P + S + L).

4.4 Caracterização da Casca (Análise *in situ*)

4.4.1 Análise dos Metabolitos das Cascas por RMN em Alta Resolução

A Figura 4.18 mostra os espectros de RMN de ^1H *in situ*, de cascas de porta-

enxerto de plantas SIN2 e SAD. Nestes espectros os sinais de RMN são largos devido à suscetibilidade magnética gerada pela heterogeneidade das amostras. Mesmo assim, é possível observar o sinal da água em 4,7 ppm e dois sinais fracos em 4 e 1 ppm atribuídos aos açúcares solúveis e TAG, respectivamente. Como se podem ver esses sinais são mais intensos na planta SIN do que na SAD, principalmente o sinal do TAG em 1 ppm. Nas cascas do enxerto, se observou o mesmo efeito com sinais mais intensos nas plantas SIN2 do que nas SAD. No entanto, a intensidade foi menor do que as observadas nas cascas dos porta-enxerto. Isto reflete a alta concentração de açúcares e lipídios nas amostras SIN, como mostra a Figura 4.18.

Figura 4.18. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) da casca do porta-enxerto (*in situ*) de amostra SIN2 (a) e SAD (b).

Apesar dessas análises serem realizadas em poucos minutos e com menos do que 20 mg de casca, ela não foi largamente utilizada neste estudo pois é dependente da umidade da amostra. O espectro de RMN de ^1H em alta resolução da

casca desidratada não mostra os picos da água e açúcar e pode ser usado para quantificar o conteúdo de óleo. Entretanto, a análise do conteúdo de óleo pode ser muito mais rápida (segundos) quando se usa a técnica de RMN de ^1H em baixa resolução, que serão apresentados no item 4.4.2.

Os espectros RMN de ^{13}C das cascas (*in situ*) têm uma resolução muito maior do que os observados nos espectros de ^1H (Figura 4.18), devido a maior dispersão do deslocamento químico dos carbonos e a menor susceptibilidade magnética desse núcleo. Na Figura 4.19 pode-se ver que o espectro de RMN de ^{13}C *in situ* (a) é uma combinação dos espectros dos extratos hexânico (b) e hidroalcoólico (c). Isso demonstra que a análise de RMN de ^{13}C *in situ* pode ser usada para as análises quantitativas e qualitativas dos principais metabolitos das cascas, analisando tanto a parte lipídica quanto a parte polar e de uma maneira muito mais rápida (~ 4 horas), do que com os métodos extrativos.

Nos espectros das cascas consegue-se identificar a maioria dos carbonos dos triacilglicerídeos, sacarose, ácido glutâmico/ glutamina e prolina, observadas no extrato hexânico e hidroalcoólico.

Os sinais característicos dos carbonos dos grupos CH_2 e CH_3 dos triacilglicerídeos são observados entre 35 e 14 ppm dos carbonos insaturados, dos ácidos oléico, linoléico e linolênico entre 132 e 126 ppm (Figura 4.2). Os doze sinais de 105 a 61 ppm referentes a sacarose (Figura 4.3) também podem ser atribuídos na maioria dos espectros da casca. O sinal em 56 ppm é atribuído aos aminoácidos glutamina/ ácido glutâmico e o sinal em 47 ppm à prolina. Os picos das carbonilas desses aminoácidos podem ser vistos em 182, 179, 175, 172 e 169 ppm. Os sinais das carbonilas do ácido glutâmico absorvem em 182 e 175 ppm, da glutamina em 179 e 174 ppm e da prolina em 175 ppm. Os outros sinais dos aminoácidos

(glutamina/ ácido glutâmico e prolina) estão sobrepostos pelos sinais dos triacilglicerídeos e da sacarose.

Figura 4.19 Espectros de ^{13}C -RMN (400 MHz) de amostra de porta-enxerto SIN2: (a) casca da planta; (b) extrato hidroalcoólico em D_2O e (c) extrato hexânico em CDCl_3 .

As Figura 4.20 e Figura 4.21 apresentam os espectros de RMN de ^{13}C obtidos entre 0 a 200 ppm das cascas de plantas ASS e SIN2, do porta-enxerto e do enxerto, respectivamente. A principal diferença entre os espectros das cascas dos porta-enxertos das plantas SIN2 e SAD (Figura 4.20) é a maior intensidade do sinal dos TAG da planta sintomática. Isto é atribuído à alta quantidade de TAG nas plantas SIN de acordo com os dados das Figura 4.1 e Figura 4.18.

Figura 4.20 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) da casca de porta-enxerto (*in situ*): (a) SAD e (b) SIN2.

Figura 4.21 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) da casca de enxerto (*in situ*): (a) SAD e (b) SIN2.

A Figura 4.21 apresenta os espectro de RMN de ^{13}C das cascas dos enxertos

de plantas ASS e SIN. Eles possuem sinais idênticos àqueles observados no porta-enxerto e também tem maior intensidade nos sinais de TAG nas plantas SIN do que nas ASS. A diferença entre os espectros de ^{13}C das cascas dos porta-enxertos e dos enxertos é na intensidade relativa dos sinais de TAG/ sacarose. No enxerto os sinais de TAG são menos intensos do que no porta-enxerto.

Apesar dos espectros de RMN de ^{13}C identificarem um grande número de componentes nas cascas, também não foi usado em larga escala, pois a sua aquisição é muito lenta (várias horas) e é também dependente do conteúdo de umidade Figura 4.22, assim como o espectro de RMN de ^1H (Figura 4.18).

A Figura 4.22 apresenta diferenças espectrais entre a amostra de casca de porta-enxerto SIN seca no liofilizador e a hidratada, demonstrando que além da perda de resolução dos sinais dos TAG, desaparecem todos os sinais das substâncias solúveis em água, como os carboidratos e aminoácidos.

Figura 4.22 Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz) da casca de porta-enxerto SIN: (a) amostra não seca e (b) amostra seca em liofilizador.

4.4.2 *Análise Quantitativa das Cascas por RMN em Baixa Resolução*

Como as principais diferenças na composição das cascas SIN e ASS/ SAD é o conteúdo de óleo, realizou-se a quantificação destas amostras com a técnica de RMN em baixa resolução. A intensidade do sinal de FID pode ser usada como um método rápido para analisar o conteúdo de óleo em amostras biológicas como extensivamente demonstrado em sementes oleaginosas^{35,44}.

O gráfico da correlação entre a intensidade dos sinais de RMN (em unidades arbitrárias), com os dados do extrato hexânico está na Figura 4.23. Nesta figura estão os dados das cascas dos porta-enxertos e enxertos, das plantas ASS, SIN1 e SIN2. Os dados do enxerto estão entre 0,5 e 1,5 % de extrato hexânico, enquanto no porta-enxerto esses valores são superiores a 2,0 %. Ou seja, esta figura mostra sinal de RMN mais intenso no porta-enxerto do que no enxerto, decrescendo na seguinte ordem: SIN2 > SIN1 > ASS em ambos, enxerto e porta-enxerto. Uma vez que estas análises podem ser automatizadas, com mais de 300 medidas por hora, ela pode ser usada como uma ferramenta complementar para o diagnóstico de plantas com MSC.

Como para essa medida quantitativa de RMN é necessário pesar as amostras e a pesagem é muito mais lenta do que o tempo de medida por RMN, alguns milissegundos, passou-se a analisar o uso de medidas qualitativas por RMN, que não dependem de pesagem. Assim, se avaliou o uso da técnica de medida de T_2 , pela técnica CPMG, que demora menos de 0,5 s. Sabe-se que o T_2 de amostras de TAG reflete a composição de ácidos graxos. As amostras também foram analisadas pela técnica de CWFP que depende dos tempos de relaxação T_1 e T_2 .

Figura 4.23 Correlação dos dados de RMN em baixa resolução (*in situ*) com o extrato hexânico (*in vitro*) ($r= 0,99$).

4.5 Medidas de Relaxometria por RMN em Baixa Resolução

4.5.1 Análises dos Decaimentos do Sinal CPMG

A seqüência de pulsos denominada CPMG é uma técnica eco de spin que é usada para medir o T_2 independente dos efeitos da não-homogeneidade do campo magnético (Figura 3.4). A técnica CPMG tem sido usada para a medida da composição em ácidos graxos de óleo em sementes³⁵ e por isso foi empregada neste trabalho para avaliar as variações na composição em ácidos graxos das cascas de enxerto e porta-enxerto de plantas com MSC. Para não haver interferência do sinal da água na curva CPMG do óleo, as amostras foram desidratadas.

As curvas do decaimento da seqüência CPMG das cascas de plantas ASS e

SIN dos enxertos e dos porta-enxertos foram normalizadas pela concentração, que corresponde a uma divisão de todos os dados, pela intensidade do sinal do primeiro eco. Esse procedimento elimina o efeito da variação de massa entre as amostras e da concentração. Assim, a diferença do T_2 pode ser melhor visualizada na Figura 4.24, a qual corresponde às médias dos experimentos de CPMG para todas as amostras ASS e SIN1 e 2.

Figura 4.24 Decaimentos médios dos sinais de CPMG das amostras de cascas de enxertos e porta-enxertos, ASS, SIN1 e 2.

Observa-se nesta figura e na Tabela 4.1 que o tempo de relaxação T_2 é maior para os porta-enxertos ($\sim 0,044$ s para um ajuste monoexponencial) do que para os enxertos (abaixo de 0,035 s). Para os porta-enxertos os decaimentos foram muito

similares (Figura 4.24 e Tabela 4.1) e também foram similares para os enxertos SIN1 e 2 e bem menor para enxertos ASS (0,014 s). Esses valores de T_2 , abaixo de 0,05 s para o óleo nas cascas, é cerca de 3 vezes menor do que o observado para o óleo em sementes oleaginosas. Por exemplo, para o óleo de soja que tem composição em ácidos graxos é similar ao da casca tem T_2 de 0,15 s nas sementes³⁵. Com isso se pode concluir que a redução do T_2 nas cascas deve estar relacionada com a forma como os TAG estão depositados. No caso das sementes o óleo é depositado em organelas denominadas de oleossomas, que tem cerca de 1 μm de diâmetro. Para que o T_2 do óleo nas cascas seja bem menor do que nas sementes, é necessário que eles estejam depositados em organelas bem reduzidas⁸¹.

Tabela 4.1 Dados dos ajustes monoexponencial dos tempos de relaxação T_2 das plantas ASS e SIN1 e 2

Amostras	ASScav	SIN1cav	SIN2cav	ASScop	SIN1cop	SIN2cop
T_2	0,046	0,043	0,044	0,014	0,033	0,035

Para avaliar se há maiores informações nos dados de CPMG do que obtido com os ajustes multiexponenciais, usou-se as análises quimiométricas PCA e HCA, analisando-se todo o sinal de RMN.

A Figura 4.25-a mostra o mapa de PCA (dados dos escores) do PC 1 versus PC 2 dos dados de CPMG adquiridos das cascas dos enxertos com o pré-processamento centrado na média. Os dados não foram tratados previamente e a análise foi realizada com dez componentes principais, mas se observou que com dois obteve-se a maior quantidade das informações (99,32 %). Não houve exclusão

de amostras, apesar de algumas apresentarem comportamento diferente do grupo que pertenciam. Isto pode ser atribuído ao fato destas amostras apresentarem características fenotípicas que não correspondiam às alterações químicas ou a erro de identificação pelo coletor. Nesta figura pode-se ver que houve uma boa discriminação entre as amostras ASS e SIN, em ambos PC 1 e PC 2, similar a informação obtida na Tabela 4.1. Observa-se também que há uma baixa discriminação entre os níveis SIN1 e 2.

Figura 4.25 Gráficos dos escores para os dados de CPMG das cascas de enxerto Valência. (O) ASScop, (Δ) SIN1cop e ($\star$) SIN2cop. (a) sem exclusão de variáveis e (b) com exclusão de variáveis.

Fez-se uma nova análise de PCA (Figura 4.25-b) com exclusão das variáveis entre 0,03850 a 0,6 s, que tinham baixo peso em PC 1 e PC 2. Essa exclusão permitiu um aumento da discriminação das amostras SIN 1 e 2 das ASS. As amostras SIN1 e 2 apresentaram valores positivos para PC 1 e 2, e pode-se visualizar neste gráfico que a medida que o nível da doença aumenta esse valor

crece. As amostras ASS apresentaram valores positivos para PC 1 e negativos para PC 2.

O gráfico de escores da PCA das amostras de porta-enxerto (Figura 4.26-a) mostrou que a PC 1 descreve 99,34 % da variância dos dados. No entanto, nesta figura pode-se ver que não ocorreu separação das classes quando foi plotado PC 1 versus PC 2. Observou-se uma melhor discriminação ASS e SIN na Figura 4.26-b, de PC 1 versus PC 5. Quando foram excluídas as mesmas variáveis da análise do enxerto (0,03850 a 0,6 s) houve o aumento da variância total (99,63 %), porém não houve melhora na separação.

Figura 4.26 Gráficos dos escores para os dados de CPMG das cascas de porta-enxerto limão Cravo. (●) ASScav, (▲) SIN1cav, (☆) SIN2cav. (a) PC 1 X PC 2, (b) PC 1 X PC 5.

Fez-se também a análise por HCA dos dados de CPMG. Na Figura 4.27 está o dendograma para os dados CPMG das cascas dos enxertos ASS e SIN1 e 2, segundo as variáveis escolhidas (0,00117 a 0,03796 s), obtidas através do pré-processamento centrado na média e conexão incremental. O dendograma com nível

de similaridade de 0,75 mostrou a formação de três agrupamentos. O agrupamento da parte direita da figura com quatorze amostras, contém oito SIN2, cinco SIN1 e uma ASS. O agrupamento central com onze amostras contém dez amostras ASS e uma SIN1. O terceiro agrupamento contém quinze amostras, sendo quatro SIN2, duas SIN1 e nove ASS. Como se pode ver o agrupamento a direita classificou principalmente as plantas SIN1 e 2, o central, as ASS e no agrupamento da esquerda houve uma mistura entre as amostras, não ficando clara nenhuma separação. Pode-se ver também nessa Figura 4.27 (direita) que não houve discriminação entre SIN1 e 2.

Na Figura 4.28 está o dendrograma do HCA para os dados de CPMG das cascas dos porta-enxertos com similaridade 0,37. Como se pode ver não houve qualquer agrupamento das plantas SIN2, SIN1 e ASS, indicando que os dados de CPMG não são suficientes para a discriminação dos níveis da MSC.

A melhor discriminação na copa do que no cavalo pode estar relacionado com a constituição da planta. Como foi visto anteriormente a planta de citros é uma combinação de um enxerto (copa), sendo esta um clone, assim suas características são bem definidas geneticamente. O porta-enxerto (cavalo) por sua vez não é geneticamente idêntico, tendo assim uma maior dispersão natural.

Figura 4.27. Dendrograma do HCA para plantas ASS e SIN1 e 2 da região do enxerto. As variáveis utilizadas da curva de decaimento CPMG foram 0,00117 a 0,03796 s.

Figura 4.28. Dendrograma do HCA para plantas ASS e SIN1 e 2 da região do porta-enxerto. As variáveis utilizadas da curva de decaimento CPMG foram 0,00117 a 0,03796 s.

4.5.2 Análises dos Decaimentos do Sinal CWFP

Analisaram-se também as cascas com o método de precessão livre de onda contínua (CWFP) que tem dependência dos tempos de relaxação T_1 e T_2 .

Os sinais de RMN-CWFP obtidos das cascas de plantas SAD, SIN e ASS de

porta-enxerto e enxerto foram normalizados pela concentração, que corresponde a uma divisão de todos os dados, pela intensidade do sinal do FID. Esse procedimento elimina o efeito da massa da amostra e da concentração, no espectro CWFP.

Na Figura 4.29 estão os espectros médios dos dados de CWFP para as amostra dos enxertos e dos porta-enxertos, ASS, SIN1 e 2.

Nesta figura observa-se que os sinais CWFP apresentam um decaimento mais longo para os porta-enxertos do que para enxertos e que estão mais distribuídos que os obtidos com CPMG (Figura 4.24). Também se pode observar que o decaimento é mais longo nos enxertos e porta-enxertos para as amostras SIN2 > SIN1 > ASS. Para avaliar se há maiores informações nesses dados de CWFP fez-se também um estudo dessas amostras com os métodos quimiométricos.

Figura 4.29 Decaimentos médios dos sinais CWFP das amostras de cascas de enxertos e porta-enxertos, ASS, SIN1 e 2.

Na Figura 4.30 está o gráfico de escores PC 1 e PC 3 das amostras ASS e SIN1 e 2 dos enxertos sem exclusão de variáveis, com três componentes principais que descrevem 99,64 % dos dados, sendo que 97,32 % da variância total é descrita pela PC 1, 1,68 % pela PC 2 e 0,65 % pela PC 3. Nesta figura pode-se observar uma boa discriminação entre os três níveis da doença em PC 1, com as ASS em valores negativos e as SIN em valores positivos. As amostras SIN2 tiveram valores mais positivos que a SIN1 indicando a boa discriminação dos sintomas.

Figura 4.30. Gráfico de escores dos dados de CWFP para as amostras de enxerto ASS (○), SIN1 (△), SIN2(★), sem exclusão de variáveis.

Também usou o procedimento de exclusão de variáveis para melhorar a discriminação das amostras. No entanto, isso não apresentou melhora significativa para o caso CWFP, em contraste com o observado para CPMG.

Na Figura 4.31 tem-se o gráfico de escores dos dados de CWFP das cascas dos porta-enxertos ASS e SIN1 e 2 sem exclusão de variáveis. Utilizou-se dois componentes principais, que descrevem 99,25 % da variância total dos dados.

Verifica-se que houve discriminação das plantas ASS e SIN, quando plotados PC 1 versus PC 4. No entanto, não ocorreu uma discriminação entre as plantas com SIN1 e 2.

Figura 4.31. Gráfico de escores dos dados de CWFP para as amostras de porta-enxerto ASS (●), SIN1 (▲), SIN2(☆), sem exclusão de variáveis.

Analisaram-se também os dados de CWFP com HCA. Na Figura 4.32 está o dendrograma para as amostras ASS e SIN1 e 2 do enxerto. Com um índice de similaridade de 0,82 obteve-se a formação de três classes, que concentraram os três níveis da doença (ASS, SIN1 e 2). As plantas ASS localizaram-se no lado esquerdo do dendrograma, onde das 22 amostras presentes neste grupo 19 são ASS e três SIN2. No grupo central com doze amostras SIN, tem dois subgrupos que englobam as sete amostras SIN2 e quatro amostras SIN1 e uma amostra SIN2, respectivamente. No outro grupo da direita encontram-se seis amostras sendo quatro SIN1, uma SIN2 e uma ASS. As amostras presentes nos agrupamentos em menor proporção podem ser consideradas no mesmo estágio da doença, fato

atribuído a erro do coletor ou semelhança bioquímica com as amostras do grupo que pertence.

Figura 4.32 Resultado do HCA para plantas assintomáticas e sintomáticas nível 1 e 2 da região do enxerto, sem exclusão de variáveis.

O resultado de HCA para cascas de porta-enxerto ASS e SIN1 e 2 estão na Figura 4.33. Neste dendograma ocorreu a distinção de dois agrupamentos ASS e SIN, com um grau de similaridade de 0,74. Na classe da esquerda do dendograma

encontram-se 17 amostras, destas onze SIN2, cinco SIN1 e uma ASS. Na direita concentraram-se 23 amostras onde 19 são ASS, três SIN1 e uma SIN2. As amostras ASS ficaram praticamente todas agrupadas, ocorreu discriminação com as plantas SIN. No entanto, não se observa uma distinção clara entre as amostras de porta-enxerto SIN1 e 2.

Figura 4.33 Resultado do HCA para plantas assintomáticas e sintomáticas nível 1 e 2 da região do porta-enxerto, sem exclusão de variáveis.

Ao comparar os resultados obtidos com as análises de RMN em baixa

resolução, obteve-se uma melhor discriminação com a técnica de CWFP do que com a CPMG. Esse resultado pode ser atribuído ao fato da técnica de CWFP avaliar os dois processos de relaxação nuclear (T_1 e T_2), enquanto que a CPMG só depende de T_2 . Os resultados também demonstram que as técnicas levaram a maior discriminação dos níveis da doença nos enxertos do que nos porta-enxertos. Para uma avaliação quantitativa desses resultados fez-se também uma correlação entre os dados de CPMG e CWFP com as respectivas concentrações dos FAME, usando o método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS).

4.5.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Diferentemente dos métodos de HCA e PCA, a análise por PLS faz uma regressão dos dados que se deseja analisar com os dados obtidos com uma técnica convencional. Assim, fez-se a regressão por PLS dos dados de CPMG e CWFP (variáveis independente) com as concentrações dos ácidos graxos, obtidos por cromatografia (variáveis dependentes).

4.5.3.1 Correlação dos dados de CPMG com FAME

Fez-se inicialmente a regressão usando o modelo de PLS dos dados de CPMG (matriz de 80 x 1000) de todas as 80 amostras ASS e SIN1 e 2 do enxerto e do porta-enxerto, com as concentrações dos FAME (80 x 8) determinadas por cromatografia gasosa.

Na Tabela 4.2 estão os coeficientes de correlação obtidos para os oito principais ácidos graxos identificados nas cascas de plantas cítricas, a partir dos

resultados previsto pelo PLS dos dados de CPMG e os respectivos FAME, determinados por GC.

Tabela 4.2 Correlação dos dados de CPMG com as concentrações dos ácidos graxos individuais das amostras ASS e SIN 1 e 2 da região do enxerto e do porta-enxerto

Ácido Graxo	C	La	M	P	S	O	L	Ln
r (CPMG e FAME)	0,57	0,51	0,44	0,22	0,31	0,50	0,46	0,41

Como se pode ver nesta tabela houve uma baixa correlação entre os dados de CPMG previsto pelo PLS e os respectivos FAME determinados por GC. Isso também tem sido observado quando se correlacionou os dados de CPMG e de FAME para sementes oleaginosas³⁵. Analisaram-se as regiões do enxerto e do porta-enxerto isoladamente e observou-se que o coeficiente de correlação variou pouco. Portanto, para melhorar as correlações, procurou-se agrupar os ácidos graxos de acordo com as tendências observadas com o aumento e diminuição dos sintomas (Figura 4.9). Assim, agrupou-se O + Ln, que diminuem com o aumento dos sintomas, P + L e C + La + M + P + S + L, que aumentam com o aumento dos sintomas.

Os coeficientes de correlação entre as concentrações dos agrupamentos (O + Ln), (P + L) e (C + La + M + P + S + L) e as respectivas concentrações calculadas pelo PLS com todos os dados de CPMG para as amostras do enxerto ASS e SIN1 e 2, foram de 0,71; 0,72 e 0,71, respectivamente, que é bem melhor do que o observado para cada ácido graxo separadamente (Tabela 4.2). Ao fazer a regressão pelo método PLS com os dados de CPMG entre 0,00117 a 0,03796 s

(que tiveram melhor discriminação no PCA, Figura 4.25-b) obteve uma melhor correlação do que a obtida acima, com $r = 0,83$ para todos os agrupamentos (Figura 4.34).

Figura 4.34 Correlação da percentagem calculada com PLS e medida com GC para o agrupamnetos (a) O + Ln, (b) C + La + M + P + L e (c) P + L dos enxertos das plantas ASS (○), SIN1 (△) e SIN2 (★), com exclusão de variáveis.

Quando se analisou as cascas de porta-enxerto ASS, SIN1 e 2 sem exclusão de variáveis para os agrupamentos (O + Ln), (P + L) e (C + La + M + P + S + L) não se obteve boa correlação (0,54, 0,36 e 0,54, respectivamente). Com exclusão das

variáveis 2 a 65 (em valores de tempo 0,00117 a 0,03796 s) o coeficiente foi de 0,51, dos dados de CPMG com os ácidos graxos, com os três agrupamentos acima. Isso novamente pode estar refletindo a maior variabilidade genética do porta-enxerto em relação ao enxerto.

4.5.3.2 Correlação dos dados CWFP com FAME

Na Tabela 4.3 estão os coeficientes de correlação obtidos para os oito ácidos graxos principais, a partir dos resultados previstos pelo PLS dos dados CWFP e os respectivos FAME, determinados por GC. Como se pode ver nesta tabela também se obteve um baixo coeficiente de correlação para os oitos ácidos graxos de maneira similar ao que se obteve com CPMG.

Tabela 4.3 Correlação dos dados de CWFP com as concentrações dos ácidos graxos individuais das amostras ASS e SIN 1 e 2 da região do enxerto e do porta-enxerto

Ácido Graxo	C	La	M	P	S	O	L	Ln
r (CWFP e FAME)	0,52	0,54	0,49	0,27	0,32	0,51	0,37	0,44

Assim, realizaram-se os agrupamentos de ácidos graxos semelhantes aos construídos para os dados de CPMG. Quando se correlacionou a concentração para os agrupamentos dos ácidos graxos (O + Ln), (C + La + M + P + S + L) e (P + L) previsto pelo PLS e os FAME, obteve-se um coeficiente de correlação de 0,79, 0,79 e 0,78, respectivamente, para o enxerto.(Figura 4.35). Esses resultados são um pouco melhor do que os obtidos com o CPMG sem retirada de variáveis ($r \sim 0,72$).

Diferentemente do CPMG, a correlação com os dados previstos pelo PLS a partir dos dados CWFP diminuiu.

No caso do porta-enxerto a previsão do PLS a partir dos dados de CWFP para os agrupamentos de ácidos graxos (O + Ln), (C + La + M + P + S + L) e (P + L), teve uma melhor correlação com os FAME ($r = 0,69$; $0,69$ e $0,44$), do que a obtida com CPMG ($0,51$). Mais uma vez confirma-se a melhor correlação dos dados do enxerto com a MSC.

Figura 4.35 Correlação da percentagem predita e medida de ácidos graxos: (a) Ln + O, (b) C + La + M + P + S + L e (c) P + L das plantas ASS cop (○), SIN1cop (△) e SIN2cop (★), sem exclusão de variáveis.

5 CONCLUSÕES

No que concerne ao presente trabalho, cujo principal escopo é a comparação entre espécies de plantas doentes e sadias, pode-se concluir que a análise metabolômica pode auxiliar no estabelecimento de uma visão global dos metabolitos da planta para entender os processos de sua fisiologia e assim compreender a forma como age o agente patológico e as alterações químicas e bioquímicas provocadas por ele.

A RMN em alta resolução demonstrou que pode ser usada na análise da variação de metabolitos diretamente nas cascas de plantas cítricas com ou sem MSC, sem necessidade de purificação dos componentes. Também esta técnica auxiliou na identificação dos metabolitos dos extratos hexânicos e hidroalcoólico.

As amostras de SIN apresentam maior quantidade de óleo do que as plantas ASS e SAD. A quantidade de óleo e açúcares é maior no porta-enxerto que no enxerto das plantas com sintomas e sem sintomas. Nas plantas SIN o sinal da prolina é mais intenso que nas plantas SAD e ASS.

Na busca por um diagnóstico de doença de plantas mais rápido e barato a espectroscopia por ressonância magnética em baixa resolução mostrou-se uma técnica promissora. Informações relevantes foram adquiridas pela determinação da distribuição de T_1 e T_2 relativas aos tempos de relaxação dos vários componentes das amostras.

As seqüências de pulsos CPMG e CWFP aplicadas em amostras de cascas de porta-enxerto e enxerto sadias e sintomáticas estão se mostraram técnicas rápidas e eficientes no diagnóstico da doença Morte Súbita do Citros. Também demonstrou ser um método vantajoso devido ao fato da amostra não necessitar de

preparação sofisticada. Somente uma secagem.

Considerando as técnicas estudadas, os sinais dos decaimentos proporcionados pela CWFP-RMN promoveram uma melhor separação se comparada à técnica de CPMG. Isto deve estar ocorrendo, pois esta técnica avalia dois processos de relaxação nuclear (T_1 e T_2).

As análises dos CPMG e CWFP foram estudadas através da técnica estatística multivariada: a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Com estes métodos, é possível ter uma visão geral do conjunto de dados e de todas as correlações possíveis entre as variáveis, sempre de uma forma global, inteira, e, portanto, muito mais completa.

A associação experimental dos dados de cromatografia gasosa com quimiometria (PCA e HCA) foi essencial para o melhor entendimento dos dados, conseguindo distinguir as plantas cítricas sintomáticas das assintomáticas. E também, compreenderam-se as variáveis que deveriam ser agrupadas e excluídas do conjunto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARCOS, P. Risco de infarto no laranjal. **Pesquisa FAPESP**, v. 85, p. 1-4, 2003. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/index.php?art=2083&bd=1&pg=1&lg=>>>. Acesso em: 15 set. 2007.
2. MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M. C.; GREGGIO, C. C.; PIAZZA, J. P.; KAMLA, R. F.; ZACHARIAS, P. R. A.; BARJOSEPH, M.; KITAJIMA, E. W.; ASSUMPÇÃO, L. C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E. C.; FERRARI, F.; FRANCO, S. F.; GIACHETTO, P. F.; GIRASOL, A.; JORDÃO, H.; SILVA, V. H. A.; SOUZA, L. C. A.; AGUILARVILDOSO, C. I.; ZANCA, A. S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J.P.; REINACH, F. C.; FERRO, J. A.; DASILVA, A. C. R. Identification and genomic characterization of a new virus (*Tymoviridae* Family) associated with citrus sudden death disease. **Journal of Virology**, v. 79, p. 3028-3037, 2005.
3. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Fundecitrus especial**: Morte súbita dos citros: nova doença, Edição especial, p. 1-12, 2002.
4. GIMENEZ-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do triângulo mineiro. **Summa Phitopathologica**, v. 27, n. 1, p. 93, 2001.
5. BASSANEZI, R. B; FERNANDE, N. G.; YAMAMOTO, P. T. **Morte súbita dos citros**. Araraquara: FUNDECITRUS, 2003. v. 24, p. 54 (Boletim citrícola).
6. PESQUISA – No mesmo lugar: MSC está restrita ao sul do Triângulo Mineiro e ao norte do Estado de São Paulo. **Revista do Fundecitrus**, v. 136, p. 7, 2006. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec_ed136_pg07.pdf>. Acesso em: 15 set. 2007.
7. PESQUISA - Morte Súbita: estimula irrigação, **Revista do Fundecitrus**, v. 121, p. 12-13, 2004. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec_ed121_pag12e13.pdf>. Acesso em: 10 set. 2007.

8. PORTA enxerto - Morte Súbita: embrapa reforça a rede de pesquisas contra a doença. **Revista do Fundecitrus**, v. 125, p. 4-5, 2004. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec_ed125_pg04a05.pdf>. Acesso em: 20 set. 2007.
9. KRAINSKI, E. T.; RIBEIRO, P. J.; ANDRADE NETO, P. R.; BASSANEZI, R. B. Um ambiente para monitoramento da morte súbita dos citros. Disponível em: <<http://www.geoinfo.info/geoinfo2005/papers/P72.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2007.
10. BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN, A. F.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T. R.; BOVÉ, J. M. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, v. 93, n. 4, p. 502-512, 2003.
11. JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 399-405, 2004.
12. BASSANEZI, R. B.; BUSATO, L. A.; SANCHES, A. L.; BARBOSA, J. C. Danos da morte súbita dos citros sobre a produção de laranja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 497-503, 2005.
13. TERCENIO, J. C. C. **Deteção precoce da morte súbita dos citros usando fluorescência**. 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.
14. CANTÚ, M. D. **Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros**. 2007. 229 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.
15. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). Morte súbita dos citros. Disponível em: <http://fundecitrus.com.br/doencas/morte_subita.html>. Acesso em: 17 nov. 2007.
16. TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

17. SALISBURY, F. B.; PARKE, R. V. **Las plantas vasculares: forma y funcion.** Mexico: Herrero Hermanos Sucesores, 1968. 198 p.

18. GALSTON, A. W.; DAVIES, P. J. *A planta verde.* São Paulo: Edgard Blucher, 1974. 118 p.

19. ROMAN, M.; CAMBRA, M.; JUAREZ, J.; MORENO, P.; VILA, N. D.; TANAKA, F. A. O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E. W.; YAMAMOTO, P.; BASSANEZI, R. Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease**, v. 88, n. 5, p. 453-467, 2004.

20. RADWAN, D. E. M.; FAYEZ, K. A.; MAHMOUD, S. Y.; HAMAD, A.; LU, G. Physiological and metabolic changes of Cucurbita pepo leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 480-489, 2007.

21. SOGA, T.; YOSHIKI OHASHI, Y.; UENO, Y.; NARAOKA, H.; TOMITA, M.; TAKAOKI NISHIOKA, T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 2, p. 488-494, 2003.

22. SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plants metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.

23. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

24. FIEHN, O. Metabolic networks of *Cucurbita maxima* phloem. **Phytochemistry**, v. 62, p. 875-886, 2003.

25. YAMAZAKI, M.; NAKAJIMA, J. I.; YAMANASHI, M.; SUGIYAMA, M.; MAKITA, Y.; SPRINGOB, K.; AWAZUHARA, M.; SAITO, K. Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 987-995, 2003.

26. VERDONK, J. C.; DEVOS, C. H. R.; VERHOEVEN, H. A.; HARING, M.A.; VAN TUNEN, A. J.; SCHUURINK, R. C. Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. **Phytochemistry**, v. 62, p. 997-1008, 2003.

27. COLNAGO, L. A.; SEIDL, P. R. Application of Carbon-13 nuclear resonance to the germination of soybean seeds in vivo. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 459-461, 1983.

28. TIMMS, R. E. Physical chemistry of fats. **In fats in food products**. London: Blackie, 1994. p. 1-27.

29. SIMONEAU, C.; MCCARTHY, M. J.; GERMAN, J. B. Magnetic-resonance-imaging and spectroscopy for food systems. **Food Research International**, v. 26, p. 387-398, 1993.

30. HALWALKAR, V. R. **Thermal anaysis of food**. Barking: Elsevier Science, 1990. 366 p.

31. BROWN, R. J. S.; CAPOZZI, F.; CAVANI, C.; CREMONINI, M. A.; PETRACCI, M.; PLACUCCI, G. Relationships between ^1H NMR relaxation data and some technological parameters of meat: a chemometric approach. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 147, p. 89-94, 2000.

32. PEÑA, A. A.; HIRASAKI, G. J. Enhanced characterization of oilfield emulsions via NMR diffusion and transverse relaxation experiments. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 5, p. 103-150, 2003.

33. PERDESEN, H. P.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S. B. Low-Field ^1H nuclear magnetic resonance and chemometrics combined for simultaneous determination of water, oil, and protein contentes in oilseeds. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 10, p. 1069-1076, 2000.

34. MATEUS, M. L.; CHAPION, D.; LIARDON, R.; VOILLEY, A. Characterization of water mobility in dry and wetted roasted coffee using low-field proton nuclear magnetic resonance. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 572-579, 2007.

35. PRESTES, R. A.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H.; CARRILHO, E. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 325-329, 2007.

36. AZEREDO, R. B. de V.; COLNAGO, L. A.; SOUSA, A. A.; ENGELSBERG, M. Continuous wave free precession: a practical analytical tool for low resolution NMR measurements. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 313-320, 2003.

37. AZEREDO, R. B. de V.; ENGELSBERG, M.; COLNAGO, L. A. Flow sensitivity and coherence in steady-state free spin precession. **Physical Review E**, v. 64, n. 16309, p. 1-4, 2001.

38. VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R. B. de V.; ALEM, N. E. R.; COLNAGO, L. A. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, p. 34-36, 2005.

39. VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R. B. de V.; COLNAGO, L. A. Thermal diffusivity and nuclear spin relaxation: a continuous wave free precession NMR study. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 181, p. 29-34, 2006.

40. VENÂNCIO, T. **Novas aplicações da precessão livre em onda contínua em ressonância magnética nuclear de baixa e alta resolução**. 2007. 157 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

41. COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M.; SOUZA, A. A.; BARBOZA, L. L. High-throughput, non-destructive, determination of oil content in intact seeds by continuous wave free precession nuclear magnetic resonance.. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1271-1274, 2007.

42. CORRÊA, C. C. **Análise da qualidade de carne bovina por ressonância magnética nuclear em baixa resolução**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

43. INSTITUTO AGRONÔMICO (IAC). Centro Integrado de informações agrometereológicas (CIIAGRO). Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/>>. Acesso em: 10 out. 2007.

44. HARALD, T. Quality control with time-domain NMR. **Europe Journal Lipid Science Tchnology**, v. 103, p. 835-840, 2001.

45. HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipidis. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

46. HALLGREN, B.; RYHAGE, R.; STENHAGEN, E. The mass spectra of methyl oleato, methyl linoleate, and methyllinolenate. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 13, n. 4, p. 845-847, 1959.

47. SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R. **Chemometrics**. New York: John Wiley & Sons, 1986. 338 p.

48. BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics**: a practical guide. New York: John Wiley & Sons, 1998. 348p.

49. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

50. MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994, 424 p.

51. GHORBEL, R.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Biological characterization of citrus tristeza vírus isolates by in vitro tissue cultures. **Plant Pathology**, v. 47, p. 333-340, 1998.

52. ALBIACH-MARTÍ, M. R.; MUNIR AWASSI, M.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; HILF, M. E.; SHANKER, S.; ALMIRA, E. C.; VIVES, M. C.; LÓPEZ, C.; GUERRI, J.; FLORES, R.; MORENO, P.; GARNSEY, S. M.; DAWSON, W. O. Sequences of citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical. **Journal of Virology**, v. 74, p. 6856-6865, 2000.
53. KONG, P.; RUBIO, L.; POLEK, M.; FALK, B. W. Population structure and genetic diversity within California citrus tristeza virus (CTV) isolates. **Virus Genes**, v. 21, p. 139-145, 2002.
54. SCHAEFER, J.; STEJSKAL, E. O. Carbon-13 nuclear magnetic resonance measurement of oil composition in single viable soybeans. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 51, p. 210-213, 1974.
55. SACCHI, R.; ADDEO, F.; PAOLILLO, L. ¹H and ¹³C NMR of virgin olive oil: an overview. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 35, p. S133-S145, 1997.
56. MANNINA, L.; LUCHINAT, C.; EMANUELE, M. C.; SEGRE, A. Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils: a ¹³C NMR study. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 103, p. 47-55, 1999.
57. MANNINA, L.; DUGO, G.; SALVO, F.; CICERO, L.; ANSANELLI, G.; CALGAGNI, C.; SEGRE, A. Study of the cultivar: composition relationship in Sicilian olive oils by GC, NMR, and statistical methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 120-127, 2003.
58. SEIDL, P. R.; COLNAGO, L. A. Carbon-13 NMR spectroscopy of oilseeds. In: LAMBERT, J. B.; RITTNER, R. (Eds). **Recent advances in organic NMR spectroscopy**. New York: Norell Press, 1987. p. 143-151.
59. FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A.; GARRATT, R. C.; LOPES-FILHO, M. A. Identification of free fatty acids in maize and protein bodies and purified zeins by ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 106-114, 2000.

60. VLAHOV, G. Quantitative ¹³C NMR method using the DEPT pulse sequence for the detection of olive oil adulteration with soybean oil. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 35, p. S8-S12, 1997.

61. MARASCHIN, M.; CAROBREZ, S. G.; PERSIKE, D.; PEIXOTO, M. L.; FERREIRA, A. G.; FERRACIN, R.; VERPOOTE, R.; FONTANA, J. D. Cell wall polysaccharides from *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) cultured cell: extration and chemical structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 55-60, 2000.

62. FORATO, L. A. ; DORIGUETTO, A. C. ; FISCHER, H. ; MASCARENHAS, Y. P. ; CRAIEVICH, A. ; COLNAGO, L. A. Conformation of the Z19 prolamin by FTIR, NMR and SAXS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2382-2385, 2004.

63. NOLTE, H. D.; HANSON, A. D.; GAGE, D. A. Proline accumulation and methylation to proline in citrus: imprications for genetic engenering of stress resistance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 122, p. 8-13, 1997.

64. STEWART, G. H.; LEE, J. A. The role of proline accumulation in halophytes. **Plant**, v. 120, p. 276-289, 1974.

65. TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, dows, ins, and outs. **Plant Cell**, v. 8, p. 1221-1224, 1996.

66. COSTANTINI, V.; BELLINCONTRO, A.; DE SANTIS, D.; BOTONDI, R.; MENCARELLI, F. Metabolic changes of Malvasia grapes for wine production during postharvest drying. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3334-3340, 2006.

67. JEREZ, M. La prolina y su relación con el estrés hídrico. **Cultivos tropicales**. Cuba, v. 10, n. 3, p. 30, 1987.

68. STEWART, C. R.; BOGGESS, S. F.; ASPINAL, D. Inhibition of proline oxidation by warter stress. **Plant Physiology**, v. 59, p. 930- 932, 1997.

69. PALFI, G.; JUHASZ, J. The theoretical basis and practical application of a new method of selection for determining water deficiency in plants. **Plant and Soil**, v. 34, p. 503- 507, 1971.
70. POSSINGHAM, J. V. The effect of mineral nutrition the content of free amino acids and amides in tomato plants. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 539- 551, 1956.
71. LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. p. 531.
72. STEWART, G. H.; LEE, J. A. The role of proline accumulation in halophytes. **Plant**, v. 120, p. 276- 289, 1974.
73. BREVEDAN, E.; HODGES, H. Effects of moisture deficit on translocation in corn (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, v. 52, p. 436- 439, 1973.
74. WAGNER, M. Efecto del patrón y la frecuencia de riego sobre el nivel foliar de prolina en el naranjo 'Valencia'. **BIOAGRO**, v.10, p. 76- 79, 1998.
75. KANDPAL, R. P.; RAO, N. A. Water stress induced alterations in the properties of ornithine aminotransferase from ragi (*Eleusine coracana*) leaves. **Biochemistry International**, v. 5, p. 297- 302, 1982.
76. KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase: an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but down regulated dehydration in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 8, p. 1323-1335, 1996.
77. ANDRADE, J. L. Proline accumulation in leaves of four cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. With different drought resistance. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 149- 157, 1995.

78. BLOUIN, M.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A. T.; LAFFRAY, D.; REVERSA, G.; PANDO, A.; TONDOH, J.; LAVELLE, P. Belowground organism activities affect plant aboveground phenotype, inducing plant tolerance to parasites. **Ecology Letters**, v. 8, p. 202-208, 2005.

79. LEE, S. H.; AHN, S. J.; IM, Y. J.; CHO, K.; CHUNG, G. C.; CHO, B. H.; HAN, O. I. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 330, p. 1194-1198, 2005.

80. BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics**: a practical guide. New York: John Wiley, 1998. 348 p.

81. CAROL, L.; ZHOU, E.; EL-DESOUKY, A.; HANY, S.; SANDRA, K.; MARYLOU, P.; DIANE, E. U. Citrus tristeza virus ultrastructure and associated cytopathology in citrus sinensis and citrus aurantifolia. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, n. 5, p. 512-525, 2002.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela A. 1. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de porta-enxerto SIN.

Amostra	C	La	M	P	S	O	L	Ln
SIN2cav	0.51	3.56	3.61	19,00	3.13	15.44	31.82	22.93
SIN1cav	0.25	1.57	1.36	16.83	3.07	18.99	33.03	24.90
SIN1cav	0.28	1.83	1.68	16.33	2.97	16.38	35.94	24.60
SIN1cav	0.88	5.40	4.99	30.55	4.83	23.41	20.21	9.73
SIN1cav	0.64	3.14	3.03	25.12	3.68	26.84	24.10	13.44
SIN1cav	0.21	1.68	1.80	17.54	2.97	13.82	38.52	23.44
SIN2cav	0.49	2.52	2.74	18.86	3.28	17.27	34.77	20.06
SIN1cav	0.18	1.27	1.44	15.57	3.05	15.88	37.26	25.35
SIN1cav	0.25	1.77	1.87	15.15	2.48	14.67	36.95	26.85
SIN2cav	0.29	2.02	2.30	17.26	3.40	15.21	38.20	21.33
SIN1cav	0.25	1.68	1.66	16.54	2.77	17.26	35.21	24.63
SIN2cav	0.47	3.17	2.91	21.43	3.68	12.48	36.22	19.63
SIN2cav	0.22	1.61	1.89	16.04	2.94	14.52	39.23	23.54
SIN2cav	0.45	2.58	2.56	15.41	2.64	30.91	28.55	16.90
SIN2cav	0.27	1.94	2.04	18.11	3.17	13.70	39.12	21.46
SIN2cav	0.28	1.79	1.95	16.64	2.88	13.44	39.31	23.71
SIN2cav	0.473	2.013	2.298	22.88	3.36	23.74	27.26	17.97
SIN2cav	0.334	2.188	1.938	18.76	3.06	14.52	36.20	22.99
SIN2cav	0.48	2.84	2.33	18.60	2.90	18.36	33.98	20.51
SIN2cav	0.48	3.29	3.06	16.65	2.83	13.75	37.27	22.65
Média	0.38	2.39	2.37	18.66	3.15	17.54	34.16	21.33
D. P.	0.17	0.97	0.86	3.79	0.50	4.95	5.30	4.20

Tabela A. 2. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de enxerto SIN.

Amostra	C	La	M	P	S	O	L	Ln
SIN2cop	1.15	3.27	2.99	26.85	4.96	27.04	24.85	8.88
SIN1cop	1.09	2.49	1.90	18.02	3.25	28.07	30.41	14.77
SIN1cop	0.48	1.53	1.11	16.23	3.27	25.44	34.64	17.30
SIN1cop	1.11	3.36	2.37	18.30	3.04	28.01	29.31	14.49
SIN1cop	0.34	0.97	1.03	19.17	3.57	29.48	32.60	12.83
SIN1cop	0.22	1.46	1.19	19.88	3.09	22.09	37.71	14.37
SIN2cop	0.40	1.30	1.19	19.37	3.59	22.89	39.39	11.87
SIN1cop	0.35	1.25	1.01	18.99	3.20	22.69	37.46	15.06
SIN1cop	0.14	0.51	0.61	16.09	3.08	19.68	41.05	18.83
SIN2cop	0.41	1.19	1.11	19.17	3.52	19.13	40.33	15.14
SIN1cop	0.44	1.43	1.19	19.91	3.31	21.35	36.30	16.07
SIN2cop	0.28	0.94	0.89	20.76	3.06	17.82	41.51	14.75
SIN2cop	0.57	1.62	1.41	16.64	2.96	19.58	40.04	17.17
SIN2cop	0.48	1.55	1.60	21.19	3.96	21.76	36.50	12.96
SIN2cop	0.15	0.56	0.78	17.55	4.06	22.38	40.73	13.77
SIN2cop	0.46	1.26	1.21	17.99	3.09	20.53	39.50	15.95
SIN2cop	0.17	0.67	0.70	19.58	3.11	20.13	40.91	14.72
SIN2cop	0.46	1.52	1.32	20.17	3.13	18.51	40.78	14.11
SIN2cop	0.23	0.67	0.63	19.06	2.41	28.89	33.79	14.31
SIN2cop	0.35	1.38	1.27	17.19	2.97	24.37	37.01	15.46
Média	0.46	1.45	1.28	19.11	3.33	22.99	36.74	14.64
D. P.	0.31	0.78	0.58	2.32	0.53	3.67	4.58	2.10

Tabela A. 3. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de porta-enxerto ASS.

Amostra	C	La	M	P	S	O	L	Ln
ASScav	0.27	1.04	0.88	17.50	2.69	16.85	34.46	26.32
ASScav	0.12	0.80	0.70	14.4	2.05	16.97	34.88	30.07
ASScav	0.15	0.95	0.86	15.53	2.75	10.03	38.13	31.60
ASScav	0.34	1.63	1.99	24.13	3.85	31.39	19.22	17.44
ASScav	0.20	1.27	1.19	14.94	2.66	20.27	31.03	28.44
ASScav	0.23	1.32	1.21	19.37	2.95	26.94	24.40	23.58
ASScav	0.06	0.61	0.56	15.56	2.76	18.36	35.39	26.69
ASScav	0.12	0.87	0.77	16.84	2.23	16.78	35.95	26.44
ASScav	0.24	1.41	1.41	16.11	2.69	21.9	29.01	27.23
ASScav	0.13	0.89	0.76	14.92	1.94	17.95	35.63	27.77
ASScav	0.22	1.13	1.28	16.43	2.64	23.59	28.50	26.21
ASScav	0.28	1.48	1.54	17.27	2.47	22.62	29.25	25.08
ASScav	0.19	1.24	1.23	18.38	3.34	29.90	24.43	21.28
ASScav	0.19	1.38	1.13	17.34	2.82	19.37	32.67	25.11
ASScav	0.34	1.83	1.96	25.4	3.28	27.80	22.64	16.76
ASScav	0.11	0.86	0.66	14.35	2.46	18.03	33.77	29.75
ASScav	0.16	1.02	0.89	15.26	2.48	18.13	34.51	27.56
ASScav	0.19	1.21	0.96	16.24	2.40	18.21	32.37	28.42
ASScav	0.13	1.00	0.86	0.18	2.88	21.29	40.14	33.52
ASScav	0.16	1.11	0.98	17.06	2.32	19.42	32.45	26.50
Média	0.19	1.15	1.09	16.36	2.68	20.79	31.44	26.29
D. P.	0.07	0.3	0.40	4.79	0.45	5.11	5.42	4.14

Tabela A. 4. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de enxerto ASS.

Amostra	C	La	M	P	S	O	L	Ln
ASScop	0.52	1.43	1.31	13.78	2.55	21.74	37.20	21.48
ASScop	0.36	1.21	1.09	14.26	2.23	26.72	30.55	23.58
ASScop	0.52	1.42	1.18	13.66	2.31	26.24	31.69	22.98
ASScop	0.64	1.87	1.46	16.39	2.65	29.56	30.38	17.04
ASScop	0.92	1.85	1.39	17.20	2.67	28.49	31.70	15.77
ASScop	0.22	0.69	0.71	17.39	3.30	28.52	33.24	15.92
ASScop	0.29	0.93	0.89	16.11	2.34	23.07	32.33	24.05
ASScop	0.16	0.64	0.60	12.85	2.64	26.02	36.61	20.47
ASScop	0.75	0.59	1.25	16.26	2.78	29.08	31.78	17.51
ASScop	0.26	0.82	0.68	12.76	2.20	30.04	33.20	20.03
ASScop	0.59	1.63	1.25	18.43	3.06	31.04	29.05	14.94
ASScop	0.33	1.10	0.89	14.76	2.39	28.40	31.01	21.09
ASScop	0.38	1.23	1.02	16.41	2.55	31.66	29.19	17.56
ASScop	0.46	1.45	1.34	16.36	2.42	25.98	32.16	19.84
ASScop	0.20	0.63	0.78	17.24	3.64	28.47	34.71	14.36
ASScop16	0.46	1.17	1.02	13.98	2.23	25.95	31.95	23.24
ASScop	0.22	0.72	0.74	13.24	2.53	26.6	34.66	21.24
ASScop	0.66	1.77	1.37	17.28	2.74	27.20	31.35	17.62
ASScop	0.28	0.96	0.87	14.14	2.12	23.68	32.95	24.99
ASScop	0.22	0.96	0.89	16.93	2.46	24.00	32.88	21.66
Média	0.42	1.15	1.04	15.47	2.59	27.12	32.43	19.77
D. P.	0.21	0.42	0.27	1.76	0.38	2.65	2.14	3.23

Tabela A. 5. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de porta-enxerto SAD.

Amostra	C	La	M	P	S	O	L	Ln
SADcav	0.00	0.83	0.93	12.66	2.69	33.50	32.93	16.45
SADcav	0.53	3.05	2.57	19.89	2.84	20.81	27.93	22.37
SADcav	0.58	3.17	2.68	16.95	2.61	19.26	25.70	29.05
SADcav	0.60	3.69	2.86	16.54	2.47	20.01	27.05	26.78
SADcav	0.64	3.39	2.50	19.97	3.36	23.91	26.70	19.54
SADcav	0.41	1.79	1.55	15.05	2.72	30.41	25.55	22.52
SADcav	0.26	1.89	1.30	17.97	2.90	18.67	33.35	23.65
SADcav	0.25	1.89	1.61	17.04	2.81	18.55	32.99	24.86
SADcav	0.31	1.99	0.16	15.58	2.37	16.71	32.50	30.37
SADcav	0.88	4.13	3.24	19.31	3.42	20.62	26.21	22.20
SADcav	0.43	2.68	2.37	20.47	3.68	22.47	29.24	18.64
SADcav	0.15	1.17	1.24	14.15	2.91	21.50	31.96	26.93
SADcav	0.08	0.80	0.96	12.58	3.02	22.30	31.90	28.35
SADcav	0.51	3.47	2.77	16.92	2.74	21.51	25.36	26.73
SADcav	0.54	3.75	2.72	21.42	3.41	20.71	26.62	20.82
SADcav	0.29	1.97	1.72	16.22	2.59	20.58	31.10	25.51
SADcav	0.31	1.72	2.34	21.23	4.43	31.36	25.16	13.45
SADcav	0.66	4.39	3.36	24.44	4.08	26.58	21.24	15.25
SADcav	1.92	7.34	5.6	19.22	3.76	25.38	23.91	12.89
SADcav	0.65	2.03	1.51	15.76	2.65	29.25	28.28	19.86
Média	0.50	2.76	2.20	17.67	3.07	23.20	28.28	22.31
D. P.	0.40	1.52	1.17	3.07	0.56	4.70	3.52	5.17

Tabela A. 6. Composição percentual de ácidos graxos em óleos das cascas de enxerto SAD.

Amostra	C	La	M	P	S	O	L	Ln
SADcop	1.09	2.98	2.30	20.15	3.48	30.27	27.60	12.12
SADcop	1.08	2.88	2.30	19.20	3.62	26.05	30.38	14.50
SADcop	1.63	4.24	5.07	19.48	3.23	24.67	27.20	14.47
SADcop	1.62	4.02	2.78	14.50	2.92	21.97	31.59	20.59
SADcop	2.43	5.77	3.52	25.29	4.2	23.63	24.97	10.18
SADcop	0.48	2.46	1.74	14.76	3.19	28.29	27.13	21.96
SADcop	1.49	3.49	2.39	16.20	3.18	22.81	32.81	17.63
SADcop	1.07	3.03	2.19	19.87	3.30	24.30	32.42	13.81
SADcop	1.19	3.51	2.67	18.27	3.44	25.85	28.76	16.29
SADcop	1.60	4.55	2.66	20.07	3.36	27.43	25.62	14.71
SADcop	2.10	4.89	3.54	17.94	2.95	21.62	32.37	14.59
SADcop	0.85	2.51	2.02	15.53	2.82	23.59	33.80	18.87
SADcop	0.93	2.83	2.32	16.84	3.05	25.97	29.96	18.10
SADcop	1.27	3.14	2.65	14.55	2.89	23.27	29.22	23.02
SADcop	0.73	2.07	1.82	16.07	3.00	20.61	35.09	20.61
SADcop	0.94	2.77	2.21	16.59	2.93	25.40	32.52	16.64
SADcop	0.92	4.26	3.27	24.87	3.86	26.30	24.68	11.83
SADcop	1.36	4.29	3.21	21.72	4.79	26.40	23.23	14.99
SADcop	1.47	4.14	3.57	18.48	4.05	22.86	29.83	15.59
SADcop	0.75	2.32	0.36	15.42	2.56	27.58	28.75	22.25
Média	1.25	3.51	2.63	18.29	3.34	24.94	29.40	16.64
D. P.	0.48	0.98	0.94	3.13	0.54	2.45	3.29	3.66