

William Ohashi¹, Ana Paula Espindola¹, Márcia Miguel Castro Ferreira², Helvécio Della Coletta Filho³, João Guilherme de Moraes Pontes¹, Ljubica Tasic^{1*}

ljubica@iqm.unicamp.br

¹Laboratório de Química Biológica & ²Laboratório de Quimiometria Teórica e Aplicada, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo, Brasil. ³Centro APTA Citros Sylvio Moreira IAC – Cordeirópolis, São Paulo, Brasil.

Palavras chave: *Citrus sinensis*, *Liberibacter asiaticus*, interações planta-patógeno, metabólicas, RMN de ¹H.

Resumo

A *Huanglongbing* (HLB) é uma das doenças de alto impacto econômico que afeta a indústria de laranja. Causada no floema pela bactéria restrita *Candidatus Liberibacter*, essa infecção é confirmada através de PCR após a inspeção visual. No entanto, os tratamentos são restritos principalmente pelo controle do vetor psílido e pelo corte de árvores contaminadas. Nosso objetivo foi avaliar as alterações induzidas pelo patógeno no perfil metabólico mostrado nos espectros de RMN de ¹H obtidos após de obter as extratos de folhas de laranjeiras de diferente polaridade. Através da comparação dos espectros de folhas de *Citrus sinensis* saudáveis, sintomáticas e assintomáticas usando ferramentas quimiométricas, tais como, análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamento (HCA), com o intuito de visualizar grupos nos modelos quimiométricos esperamos propor um novo método de diagnóstico da HLB.

Experimental

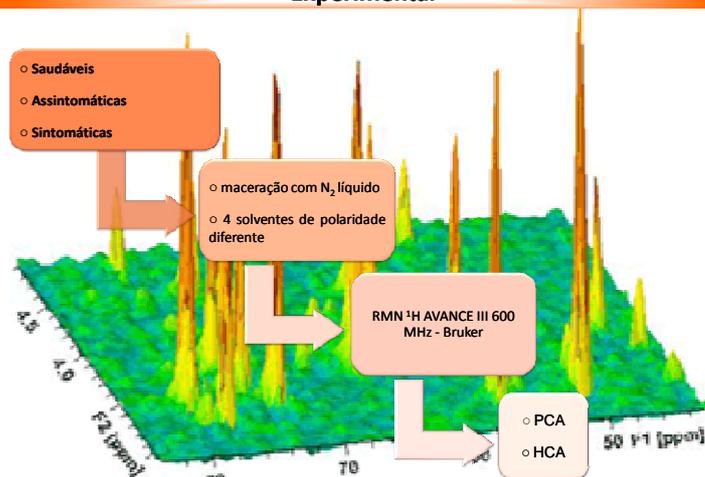


Figura 1. Fluxograma da metodologia escolhida. Os solventes usados foram: 1. tampão fosfato, 2. metanol, 3. clorofórmio/metanol 1:1 (v/v) e 4. clorofórmio. A análise quimiométrica foi realizada usando programa Infometrix Piroette®.

Análises Quimiométricas e Espectros

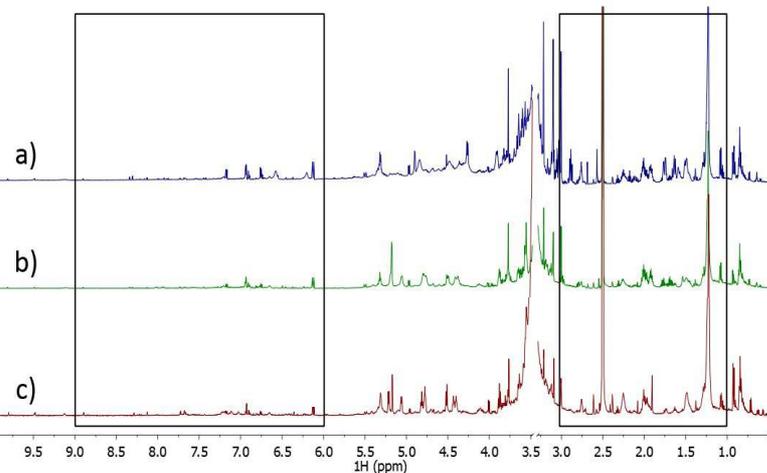


Figura 2. Exemplos de espectros de RMN de ¹H obtidos de folhas saudáveis (a), folhas assintomáticas (b) e folhas sintomáticas (c). As áreas marcadas representam as regiões com loadings mais altos, i.e., as regiões dos espectros que são mais importantes conforme dados de PCA.

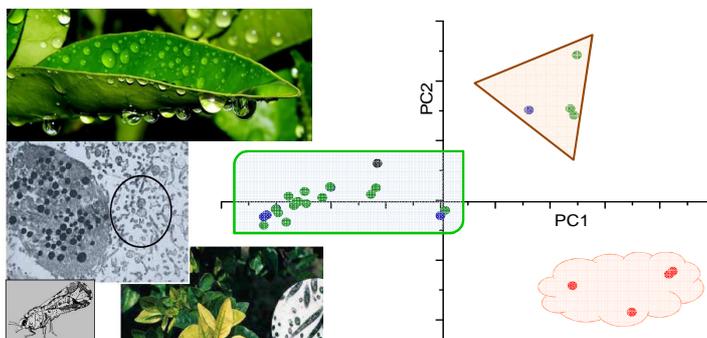


Figura 3. Representação gráfica da análise de componentes principais em 2D, com variância de PC1 de 60,85% e variância de PC2 de 28,75%.

Candidatus Liberibacter asiaticus

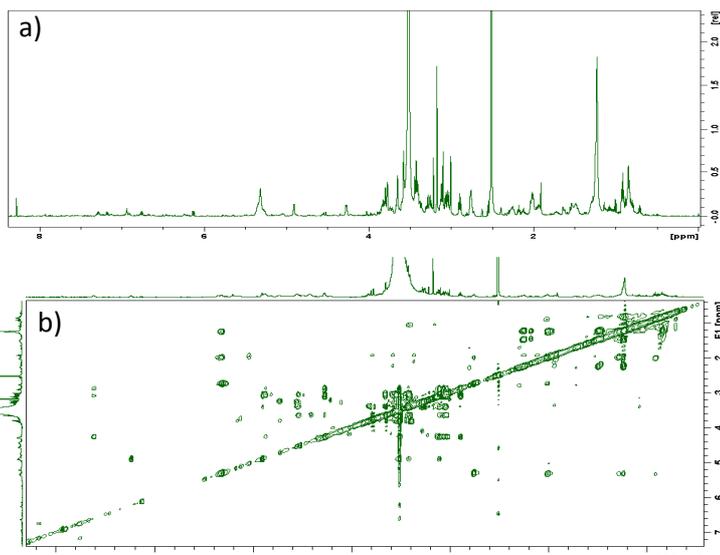


Figura 4. (a) O espectro de RMN de ¹H com uso de filtro de T2 de uma das folhas *Citrus sinensis* após extração com clorofórmio/metanol 1:1 (v/v). (b) Mapa de contorno de espectro de TOCSY que auxiliará na identificação dos metabólitos.

Conclusões

As principais mudanças observadas no perfil metabólico foi na região de lipídios do espectro responsável pelo PC1. Também foram observadas mudanças no perfil das seguintes moléculas: açúcares, aminoácidos e metabólitos relacionados com a resposta imunológica, sendo essas similares aos dados já publicados. Os resultados iniciais mostraram que a metodologia escolhida possibilitou classificar as amostras em saudáveis e sintomáticas com uma variância de PC1: 60,85%; PC2: 28,75% e PC3: 3,70%. Outras análises estão sendo realizadas para uma maior significância estatística.

Agradecimentos

inbeb

Centro de Citricultura Sylvio Moreira

IQ INSTITUTO DE QUÍMICA

LQB Laboratório de Química Biológica

LOTA

Referências

Silva, L., M., Alvez, E.; G., Choze, R., Lião, L., M., Alcantara, G., B., ¹H HRMAS NMR spectroscopy and chemometrics for evaluation of metabolic changes in *Citrus sinensis* caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1054-1061.