



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS DE ARAGUAÍNA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

MARCOS WILSON VICENTE DE ASSIS

**PERFIL QUÍMICO FIXO E SEMIVOLÁTIL DE SEMENTES DE MELANCIA POR
GC-MS E HPLC-DAD**

ARAGUAÍNA-TO

2020

MARCOS WILSON VICENTE DE ASSIS

**PERFIL QUÍMICO FIXO E SEMIVOLÁTIL DE SEMENTES DE MELANCIA POR
GC-MS E HPLC-DAD**

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína, Curso de Química para obtenção do título de Químico licenciado e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Ednilson dos Santos Niculau

ARAGUAÍNA-TO

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

A848p Assis, Marcos Wilson Vicente de.
PERFIL QUÍMICO FIXO E SEMIVOLÁTIL DE SEMENTES DE
MELANCIA POR GC-MS E HPLC-DAD. / Marcos Wilson Vicente de Assis.
– Araguaína, TO, 2020.
38 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Araguaína - Curso de Química, 2020.

Orientador: Ednilson dos Santos Niculau

1. Perfil químico fixo e semivolátil. 2. Melancia. 3. Semente. 4. Mancha-
aquosa. I. Título

CDD 540

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

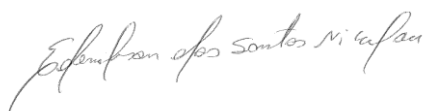
MARCOS WILSON VICENTE DE ASSIS

PERFIL QUÍMICO FIXO E SEMIVOLÁTIL DE SEMENTES DE MELANCIA POR GC-MS E HPLC-DAD

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína, Curso de Química para obtenção do título de Químico licenciado e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 28 / 03 / 2020

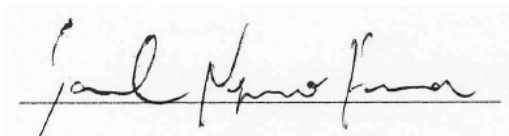
Banca Examinadora



Prof. Dr. Ednilson dos Santos Niculau, UFT



Prof. Dr. Daniel Augusto Barra de Oliveira, UFT



Prof. M. e. Samuel Nepomuceno Ferreira, IFTO

ARAGUAÍNA-TO

2020

Nem a altura, nem a profundidade, nem alguma outra criatura nos poderá separar do amor de Deus, que está em Cristo Jesus nosso Senhor.

Romanos 8:39

AGRADECIMENTOS

Durante minha vida sempre me mantive norteado por valores aprendidos desde a infância com minha família, eles me ensinaram o significado de uma vida honesta, pautada nos princípios cristãos e da ética. Agradeço a Deus por sempre estar comigo ao longo desta caminhada, pelo sacrifício na cruz que trouxe a paz, o sangue foi derramado pelo perdão de nossos pecados. Obrigado, pois sem o SENHOR, eu não teria chegado tão longe.

À Sirany Vicente da Silva, minha mãe que lutou para criar dois filhos, sem o auxílio de um pai que preferiu ir embora, sem assumir suas responsabilidades, acredito que não poderia expressar em palavras o quanto a amo e quero bem, uma pessoa que sempre batalhou para alcançar seus objetivos. Fica meu obrigado por ser uma fonte de inspiração, a pessoa que me escutou nos momentos da bonança e naqueles de maior dificuldade.

À minha avó Divina Alves da Silva e meu avô Ivani Vicente da Silva, vocês de certa forma são a razão da minha luta, pessoas que em meio ao turbilhão de situações que minha mãe precisou encarar, sempre estiveram presentes na minha vida, ensinando os bons valores, mostrando o caminho correto a ser seguido. Acredito que vocês são de fato como pais para mim, exemplos que sem dúvida melhores não haveria.

À meu irmão João Paulo Vicente de Assis, apesar de nossas divergências, seu companheirismo e nossa união sempre possibilitou bons diálogos sobre os mais variados temas, um procurando aconselhar o outro e tentando compreender melhor um ao outro, pois o ser humano por vezes não se trata de algo simples, mas muito complexo, no entanto, acredito que somente o fato de você me ouvir sempre foi de grande valia.

À Alessandra Jéssica Lima de Albuquerque; Inês Almeida da Silva; Janiele Pereira Nascimento e Melliny Nascimento Lisboa, amigos que estiveram comigo nas horas de maior dificuldade, só posso dizer-lhes muito obrigado! Não me abandonaram em nenhum momento, independente se eram fáceis ou difíceis.

À Leonardo de Souza Brito, colega de Iniciação Científica, agradeço lhe por todo apoio, ajudando-me nas dúvidas sobre documentação e outros assuntos relacionados a Iniciação sempre que foi necessário.

Aos meus orientadores no Programa Institucional de Monitoria-PIM, Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva, me orientou na disciplina de Introdução à Química e a Profa. Dra. Renata Ferreira Lins da Silva, tendo o imenso prazer de sua orientação nas disciplinas de Introdução à Química, Transformações Químicas e Físico-Química dos Gases, minha participação no programa foi de extrema relevância para minha formação profissional, sendo

muito bom poder contar com seus elogios, conselhos e cobranças, visando sempre uma melhoria.

Às técnicas de laboratório Ana Rosa Carvalho de Oliveira; Gildeth Pereira de Oliveira e Karolina Lima Nogueira por seu trabalho maravilhoso no Laboratório de Química. Vocês são não apenas exemplos a serem seguidos, mas também amizades para toda uma vida, sem o trabalho de vocês tudo seria mais difícil.

À professora Elineide Barbosa de Souza, da Universidade Federal Rural de Pernambuco que cedeu os isolados da bactéria *A. citrulli* e possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edenilson dos Santos Niculau, uma pessoa com quem tive a ótima oportunidade de aprender sempre mais e mais, obrigado por seu incentivo, este sempre foi uma motivação para pesquisar além do tradicional, saindo do costumeiro. Seus conselhos, compreensão com relação às minhas dificuldades e ao mesmo tempo suas cobranças, serviram-me como um impulso na busca pelo saber.

Por fim, gostaria de agradecer todos os meus professores (as) da Licenciatura em Química, colegas de curso, em especial a turma 2016.1 e demais profissionais da UFT que forneceram sua contribuição para minha chegada até este ponto.

RESUMO

É um fato, conhecido pela literatura que a bactéria *A. citrulli* é o patógeno responsável pela doença da mancha-aquosa em melões e melancias, o qual infecta o fruto e as sementes. Tendo em vista a importância econômica da cultura da melancia para o Tocantins, em especial para municípios como Lagoa da Confusão e Formoso do Araguaia, além de sua relevância nacional, o presente trabalho propôs-se a investigar os compostos presentes em amostra de sementes de melancia infectadas e sadias por meio das técnicas de HS-SPME/GC-MS (Headspace-Solid Phase Microextraction/Gas Chromatography–Mass Spectrometry) e HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector). Como resultado detectou-se não apenas diferenças nos compostos presentes ou ausentes, mas notou-se uma abundância de compostos fenólicos que indicam a possibilidade de tratar-se de uma possível defesa da planta mediante a infecção. Faz-se relevante que haja mais esforços de pesquisa, principalmente de colaboração entre grupos de pesquisa a fim de obter-se resultados mais completos, que possibilitem a criação de futuros defensivos viáveis economicamente ao mesmo tempo que sejam ambientalmente seguros.

Palavras-chaves: Melancia. Bactéria. Patógeno. Compostos fenólicos. Tocantins.

ABSTRACT

It is a known fact in the literature that the bacterium *A. citrulli* is the pathogen responsible for watery spot disease in melons and watermelons, the which infection of the fruit and as seeds. In view of the economic importance of watermelon culture for Tocantins, especially for municipalities such as Lagoa da Confusão and Formoso do Araguaia, in addition to its national relevance, the present work proposals to investigate the compounds present in infected watermelon samples and healthy using HS-SPME / GC-MS (Headspace-Solid Phase Microextraction/Gas Chromatography–Mass Spectrometry) and HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector) techniques. As the result not only detects differences in the compounds present or absent, but it abundance of phenolic compounds that allows possible the deduce of treat yourself defense of the plant for an infection. It is relevant that there is more research, mainly of collaboration between research groups, to obtain more complete results, which allows the creation of economically viable pesticides while being environmentally safe.

Key-words: Watermelon. Bacteria. Pathogen. Phenolic compounds. Tocantins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Gráfico comparativo da produção em toneladas entre os principais estados concorrentes da região norte do Brasil divulgados através da PAM, no período de 2016 a 2018.....	13
FIGURA 2	Cultivo da bactéria em meio sólido NYDA.....	17
FIGURA 3	Cultivo da bactéria em meio líquido NYDA. À esquerda representa somente o meio e à direita o meio de cultivo contendo o microrganismo.....	17
FIGURA 4	Inoculação da bactéria no fruto da melancia.....	18
FIGURA 5	Procedimentos para análise dos semivoláteis por HS-SPME/GC-MS.....	19
FIGURA 6	Cromatograma da corrente iônica total (TIC) dos voláteis das Sementes da melancia sadia (azul) e infectada (preto) por HS-SPME/GC-MS.....	22
FIGURA 7	Espectro de massas para o fenol presente na semente infectada.....	24
FIGURA 8	Espectro de massas para o fenol presente na semente infectada.....	24
FIGURA 9	Espectro de massas para o 2-metóxi-fenol presente na semente infectada.....	25
FIGURA 10	Cromatogramas HPLC-DAD dos compostos fixos dos extratos metanólicos das sementes da melancia sadia (rosa) e infectada (preto), referentes ao comprimento de onda de 276 nm.....	26
FIGURA 11	Espectro de UV das bandas cromatográficas referentes às bandas 1 (A) e 2 (B).....	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Constituintes químicos da semente sadia identificados por HS- SPME/GC-MS.....	22
TABELA 2	Constituintes químicos da semente infectada identificados por HS- SPME/GC-MS.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.	<i>Acidovorax</i>
BFB	Bacterial Fruit Blotch
Da	Dalton
DI	Diâmetro Interno
DI-SPME	Direct immersion -Solid Phase Microextraction
DPI	Dias Pós-Inoculação
EFS	Extração em Fase Sólida
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
GC-MSD	Cromatógrafo Gasoso-Detector Seletivo De Massas
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector
HS-SPME	Headspace-Solid Phase Microextraction
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IR	Índice de Retenção
MeOH	Metanol
nm	nanômetro
NYDA	Nutrient Yeast Dextrose Agar
PAM	Produção Agrícola Municipal
PDMS/DVB	Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene
pH	potencial Hidrogeniônico
SPME	Solid Phase Microextraction
subsp.	subespécie
UFC	Unidade Formadora de Colônias
µL	microlitro
µm	micrômetro
Vinj	Volume de injeção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	METODOLOGIA.....	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1	Análises das sementes de melancia por GC-MS.....	21
4.2	Análises das sementes de melancia por HPLC-DAD.....	25
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
6	CONTRIBUIÇÕES DA MONOGRAFIA.....	28
7	TRBALHOS FUTUROS.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30
	ANEXO A.....	34
	ANEXO B.....	34
	ANEXO C.....	35
	ANEXO D.....	35
	ANEXO E.....	36
	ANEXO F.....	36
	ANEXO G.....	37
	ANEXO H.....	37
	ANEXO I.....	38

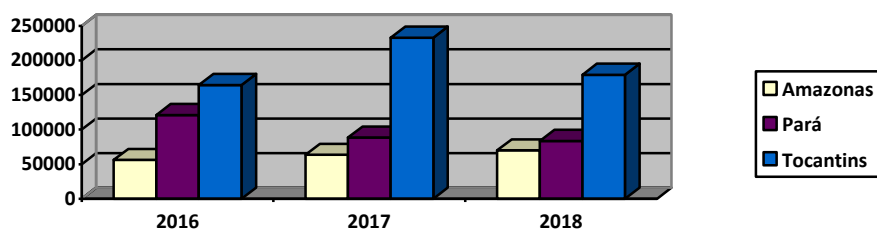
1 INTRODUÇÃO

A cultura da melancia é de grande importância para a economia do Tocantins e o sustento de muitos pequenos produtores do Estado, um dos maiores produtores do Brasil, com destaque para os municípios de Lagoa da Confusão e Formoso do Araguaia. Contudo não são os únicos, já que essa cultura se expandiu para outros municípios como Porto Nacional, Pium e Cristalândia. Apesar disso, dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) através da Produção Agrícola Municipal (PAM) mostram que ocorreram algumas oscilações como em Formoso do Araguaia, onde houve um certo declínio na quantidade produzida que foi de 20.500 toneladas em 2016 para 12.500 toneladas em 2017.

Porém, tais oscilações são esperadas. Tendo em vista, que a lavoura de melancia requer condições muito particulares de pH (5,5-7,0), clima variando entre ameno e mais quente (23° C a 28° C), solo profundo e a execução do manejo de solo, de modo que essas sejam preservadas, possibilitando seu cultivo (ROCHA, 2010). Isso significa dizer que se trata de uma planta frágil, necessitando de um solo e clima favoráveis para sua produção, quando o solo é encharcado por exemplo, não se deve executar o plantio (COSTA; LEITE, 2007).

Ao comparar-se os valores referentes a produção dos principais estados concorrentes da região norte tendo em vista os últimos três anos, a discrepância é muito clara (Figura 1).

FIGURA 1-Gráfico comparativo da produção em toneladas entre os principais estados concorrentes da região norte do Brasil divulgados através da PAM, no período de 2016 a 2018.



Fonte: IBGE-Produção Agrícola Municipal.

A cultura de melão e melancia vem sofrendo fortes influências negativas na produtividade e emprego por causa da presença de fitopatogênias. Entre estas, destaca-se a mancha-aquosa, uma doença ocasionada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, reclassificada recentemente para *A. citrulli*. Foi descrita no ano de 1965 nos Estados Unidos da América em culturas de melão e desde então passou a ser relatada em outras regiões do mundo como Índia, Austrália e Brasil (MARIANO e SILVEIRA, 2004; HALFELD-VIEIRA e NECHET, 2007). Esta fitopatogenia ainda é pouco estudada em nosso país com relação aos

aspectos químicos, biológicos e agrônômicos, no entanto, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) tem realizado trabalhos relevantes com o melão.

Na cultura do meloeiro, por exemplo, nota-se que infelizmente uma série de fatores acabam por favorecer a contaminação das lavouras, seja por meio da ação humana ou independente dela, causando lesões e desagregando valor ao fruto. Todavia para colonização efetiva se faz necessário elevada umidade bem como temperatura, ou seja, requerendo condições específicas. Um grande desafio, trata-se de ser uma doença que se propaga por diferentes meios, sendo assim faz-se preciso trabalhar em várias frentes (SILVA; SILVEIRA; MARIANO, 2006).

As técnicas de Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) e High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (HPLC-DAD) possibilitam conhecer alguns aspectos químicos de interação entre planta-microrganismo. A GC-MS é consolidada em nossos dias como uma ferramenta muito poderosa na identificação de compostos voláteis e termicamente estáveis, enquanto isso a HPLC-DAD é amplamente utilizada para screening, purificação e isolamento de compostos que geralmente a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas não é capaz de analisar (MARQUES; OLIVEIRA, 2013).

Tão importante quanto as técnicas cromatográficas empregadas, o método de extração também requer cuidado. A Microextração em Fase Sólida apresenta-se como um bom método, que elimina desvantagens da Extração em Fase Sólida (EFS) como a utilização de solventes, mantendo suas vantagens. Seu funcionamento, é explicado resumidamente pelo uso de uma fibra, a agulha da fibra irá perfurar o septo do vial ou outro recipiente (contendo a amostra) e permanecerá exposta durante certo período de tempo, após a extração dos analitos, retrai-se a fibra e ela é introduzida na porta do injetor do Cromatógrafo à gás, onde passará por dessorção térmica (DÓREA; GAUJAC e NAVICKIENE, 2008). Há diferentes tipos de fibra para atender a necessidade do pesquisador, cada uma com suas especificidades, que vão diferir em composição química, polaridade (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

A Microextração em Fase Sólida ou Solid-Phase Microextraction (SPME), em inglês, pode ainda ser subdividida, em dois métodos, Headspace- Solid Phase Microextraction (HS-SPME) e Direct Immersion-Solid Phase Microextraction (DI-SPME). O primeiro consiste na exposição da fibra sob a fase gasosa para absorver os voláteis da amostra líquida, gás ou de uma amostra gasosa. No segundo a fibra será imersa em um pequeno volume do líquido extraído da amostra (AULAKH et al., 2005; BOJKO et al., 2014; AL-KHSEMAWEE, AGARWAL e REN, 2017). Como dito no parágrafo anterior, após certo tempo de coleta dos

voláteis, a fibra é levada até o Cromatógrafo à gás, passando então por uma dessorção térmica, vale salientar que isso ocorre após atingir-se o equilíbrio entre as duas fases: matriz da amostra e SPME, dependendo portanto de aspectos termodinâmicos (PAWLISZYN, 1997; DÓREA, GAUJAC e NAVICKIENE, 2008).

A relevância de tais técnicas é evidenciada por sua larga utilização nos mais diversos setores como Produção Animal (DUARTE; SILVA e MEIRELLES, 2002); Adubação Nitrogenada (DESCHAMPS et al., 2012); Óleos Essenciais (PAULUS et al., 2013); Produtos Naturais (DE MELLO E CARNEIRO; CITO e PESSOA, 2010) e etc. De modo que é claro sua importância para o desenvolvimento da sociedade atual, até mesmo se fazendo presente na indústria do entretenimento, onde é retratada em laboratórios forenses de séries policiais norte-americanas, em especial a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE (SKOOG et al., 2006)

O primeiro relato da BFB (Bacterial Fruit Blotch), em inglês, nas melancias para fins comerciais data da primavera de 1989 na Flórida SOMODI et al., (1991). Walcott (2008) comenta que as primeiras perdas econômicas para indústria norte-americana em consequência da doença da mancha-aquosa na lavoura de melancia, ocorreram entre os anos de 1990 e 1995. No Brasil, os primeiros relatos datam de 1991 na melancia Robbs et al., (1991) e 1992 no melão (ROBBS; RODRIGUES NETO; BERIAN, 1992).

Em termos de mecanismo de invasão, importante de compreender-se para buscar formas de sanar o problema em estudo. Dutta et al., (2015) afirma que o mais rápido é através do pistilo da flor quando comparado a invasão por meio do pericarpo, com uma diferença na ordem de 7 DPI (Dias Pós-Inoculação).

Com tudo quanto foi exposto anteriormente, o presente trabalho de conclusão de curso buscou através das técnicas analíticas: GC-MS e HPLC-DAD traçar o perfil químico fixo e semivolátil das sementes de melancia. Tentando assim levantar hipóteses que permitam o desenvolvimento de métodos eficazes para controle ou mesmo erradicação da doença da mancha-aquosa, cujo agente causal é a bactéria *A. citrulli*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho apresenta como objetivo geral realizar o estudo químico entre *Citrullus lanatus* - *A. citrulli* visando a identificação de compostos voláteis, semivoláteis ou fixos.

2.2 Objetivos específicos

Extrair e identificar compostos fixos e semivoláteis das sementes de melancia utilizando extração com solvente orgânico, GC-MS e/ou HPLC-DAD;

Contribuir para o entendimento da interação entre a melancia e a bactéria causadora da mancha-aquosa.

3 METODOLOGIA

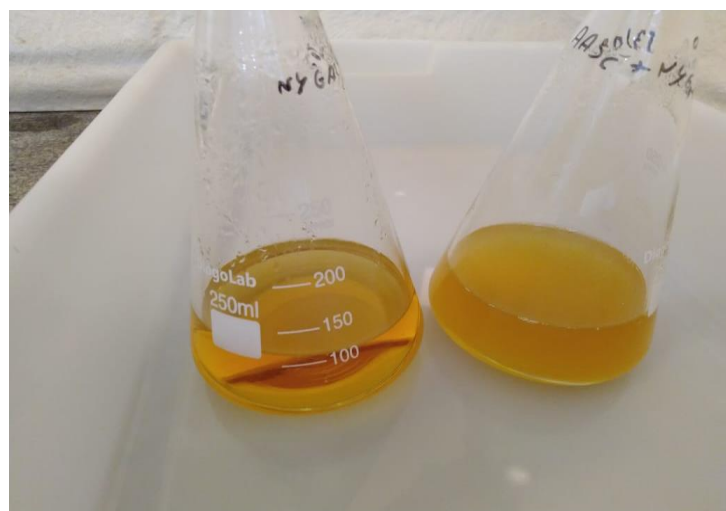
Os isolados da bactéria *A. citrulli* foram cedidos pela professora Elineide Barbosa de Souza, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e o fruto de melancia foi comprado no mercado municipal de Araguaína-TO. O cultivo da bactéria teve como meio nutritivo Nutrient Yeast Dextrose Agar (NYDA) sólido (2 g de glicose; 0,6 g de extrato de carne; 1 g de extrato de levedura e 3,6 g de ágar para 200 mL de água), e em meio líquido, sem ágar, para ser empregado na inoculação em melancia (Figura 2 e 3).

FIGURA 2 – Cultivo da bactéria em meio sólido NYDA.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

FIGURA 3 – Cultivo da bactéria em meio líquido NYDA. À esquerda, representa somente o meio e à direita, o meio de cultivo contendo o microrganismo.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Seguindo a metodologia proposta por Somodi et al., (1991) e adaptando-a de acordo com os recursos disponíveis, procedeu-se a lavagem (água e sabão) e secagem do fruto. Em seguida foi marcado em linhas perpendiculares ao seu comprimento. Injetou-se com auxílio de seringa hipodérmica de 1 mL, 100 μ L de suspensão bacteriana ($\sim 10^8$ UFC/mL) logo abaixo da superfície da casca, nos espaços intercelulares (Figura 4).

FIGURA 4 - Inoculação da bactéria no fruto da melancia.

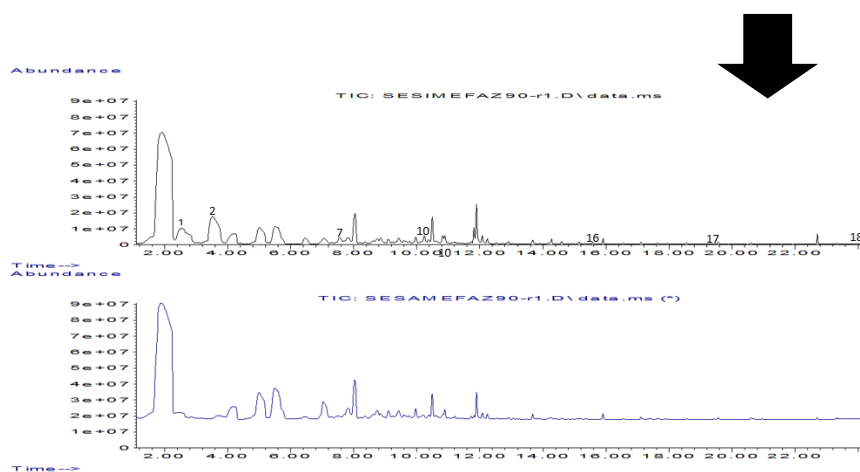
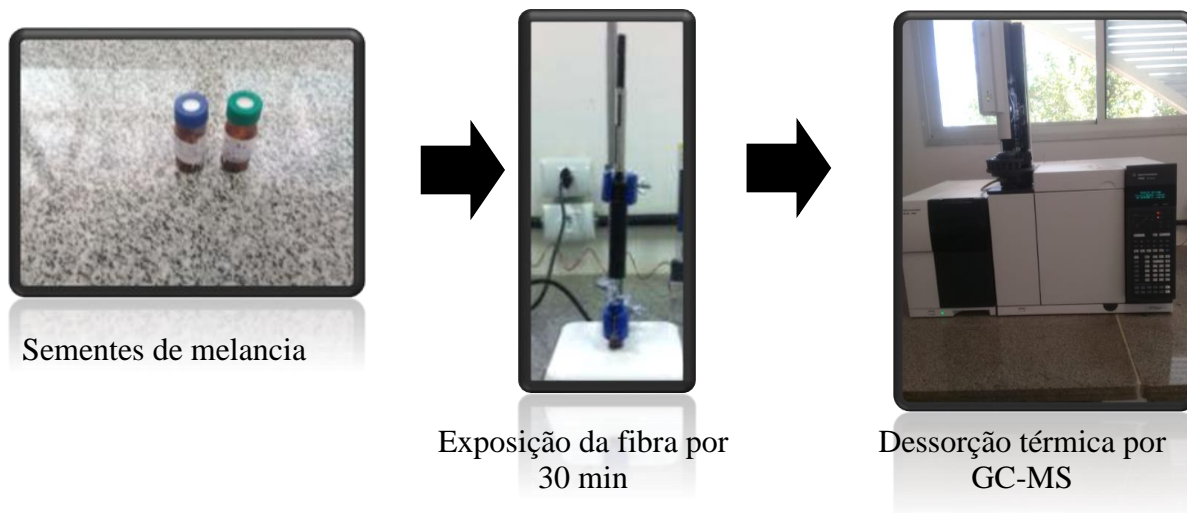


Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

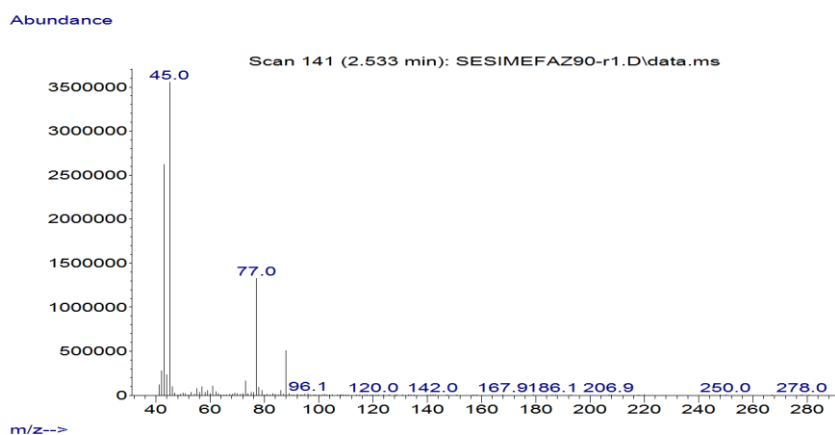
Após 10 dias da inoculação, transferiu-se com uma espátula as sementes de melancia infectadas para um almofariz e com auxílio de um pistilo macerou-se as mesmas, em seguida transferiu-se com outra espátula as sementes sadias para um almofariz e novamente com auxílio do pistilo realizou-se a maceração. Transferindo as mesmas para dois vials de 2 mL de armazenamento separadamente até um terço (1/3) de seu volume a fim de melhor acomodar as amostras maceradas nos vials utilizou-se de duas ponteiras. Nesse processo de maceração um fator que dificultou sua realização foi o fato de as sementes estarem bem úmidas em função de terem sido conservadas em ambiente refrigerado.

Afim de realizar-se a extração dos voláteis pela técnica de Microextração em Fase Sólida no modo Headspace associada à Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (HS-SPME/GC-MS), aqueceu-se o vial com a amostra a temperatura de 90 °C, então furou-se com a seringa da Fibra Azul PDMS/DVB o septo do vial, a fibra foi exposta durante um período de 30 min, após esse tempo ela foi retraída e submetida a dessorção térmica diretamente na porta do injetor do GC-MS da marca Agilent modelo 5977B GC/MSD (Figura 5).

FIGURA 5 – Procedimentos para análise dos semivoláteis por HS-SPME/GC-MS.



Cromatograma



Espectro de massas

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890B, hifenizado a um espectrômetro de massas (GC-MS) 5977B. Os cromatógrafos operaram com colunas capilares HP-5MS, L = 30 m, DI = 0,25 mm e filme = 0,25 μm . O gás de arraste foi Hélio (99.999%). As temperaturas do injetor, linha de transferência do massas, quadrupolo e da fonte foram mantidas a 300°C, 250°C, 150 °C e 230 °C, respectivamente. Gradiente de temperatura: Inicial 50 °C por 2 min; uma elevação de temperatura de 6 °C/ min até 170 °C por 0 min e uma elevação de 25 °C/min até 270 °C por 3 min.

Os volumes de amostra injetados foram de 1 μL para o padrão de *n*-alcanos e para fibra foi realizado dessorção térmica diretamente na porta do injetor no modo splitless. A detecção por massas, no modo scan, foi realizada num intervalo de 40-500 Da. Os componentes voláteis foram identificados através da comparação de seu espectro de massas com espectros existentes na literatura Adams (2007), com espectros do banco de dados (NIST2014) do equipamento, do NIST Web Book e pela comparação dos Índices de Retenção (IR). Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos C8-C18 diluída em hexano grau HPLC injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de VAN DEN DOOL e Kratz (1963).

A cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada para análise do perfil químico dos compostos fixos. Para isso, preparou-se as amostras para serem injetadas por meio de uma maceração metanólica, pesou-se com auxílio de um vidro de relógio uma semente infectada e outra sadia, separadamente, obtendo um valor de aproximadamente 100 mg para cada. Ambas foram transferidas com uma espátula para o almofariz (previamente ambientado com metanol P.A.) e maceradas com metanol HPLC, isoladamente.

Os extratos resultantes foram então armazenados em dois frascos e rotulados. Coletou-se com auxílio de uma microseringa 30 μL , o extrato da semente sadia e infectada, ambas na concentração de 12,5 mg/ml e injetou-se no HPLC Shimadzu Corporation, contendo detector SPD-M20A e bomba LC-20AT a fim de realizar-se as análises.

O desenvolvimento do método por esta técnica foi realizado no modo reverso de eluição cromatográfica. Um gradiente exploratório foi aplicado para decidir se seria possível utilizar uma eluição gradiente ou isocrática para as amostras. Os compostos das amostras tiveram uma grande distribuição de banda, com tempos de retenção baixos e altos Snyder e Dolan (1996), e por isso a eluição gradiente foi empregada nas seguintes condições: MeOH, 5-50% em 3 min, 50-100 em 27 min, isocrático 100% por 8 min; coluna VP-ODS C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm); vazão 0,8 mL/min; $\lambda = 220\text{-}600\text{ nm}$, $V_{inj} = 30\mu\text{L}$, $[] = 12,5\text{ mg/mL}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises das sementes de melancia via HS-SPME/GC-MS

Na análise via HS-SPME/GC-MS observou-se que alguns compostos presentes na semente infectada não foram detectados na semente sadia. Os compostos identificados na amostra sadia, a partir da comparação do espectro de massas com as literaturas, foram: *p*-xileno (C_8H_{10}); *o*-xileno (C_8H_{10}); benzaldeído (C_7H_6O); mirceno ($C_{10}H_{16}$); benzenoacetaldeído (C_8H_8O); álcool feniletílico ($C_8H_{10}O$); (*Z*)-3-nonen-1-ol ($C_9H_{18}O$); acetato de benzila ($C_9H_{10}O_2$); naftaleno ($C_{10}H_8$) e acetato de 2-feniletila ($C_{10}H_{12}O_2$).

A amostra da semente infectada apresentou em sua composição alguns compostos exclusivos como: acetoína ($C_4H_8O_2$); 2,3-butanodiol ($C_4H_{10}O_2$); fenol (C_6H_6O); 2-metóxi-fenol ($C_7H_8O_2$); 2-metóxi-4-etenilfenol ($C_9H_{10}O_2$); 2-tridecanona ($C_{13}H_{26}O$) e um éster de ácido graxo (FIGURA 6; TABELAS 1 e 2). Entre estes, alguns podem ser fitoalexinas (compostos novos produzidos pela planta como mecanismo de defesa, os quais não são detectados na matriz sadia) ou mesmo toxina lançada pela bactéria.

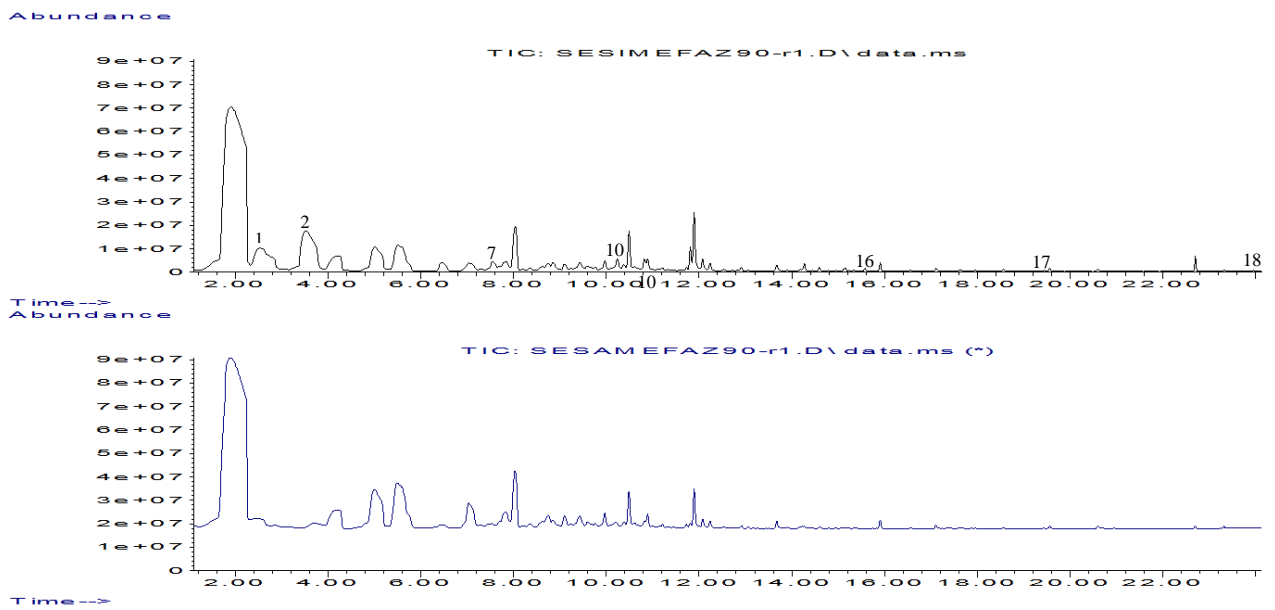
A acetoína apresentou uma diferença significativa no índice de retenção, conforme a literatura consultada, portanto não é possível inferir com precisão se a planta realiza a biossíntese desta molécula ou se trata-se de outro composto. Não foi possível saber o tamanho da cadeia do éster de ácido graxo, porém acredita-se que pela análise do espectro de massas seja um éster de cadeia longa sem insaturação.

Um dos compostos de interesse, com tempo de retenção 6,43 min, não foi identificado, devido ao fato do trabalho envolver uma interação planta-microorganismo, o que limita o número de compostos presentes nas bases de dados. Cabral et al., (2009), associaram a presença de compostos fenólicos em própolis vermelha brasileira às suas propriedades antibacterianas. Provavelmente, esta classe de metabólitos secundários, no nosso trabalho, também se relaciona a ações antimicrobianas, sendo biossintetizados pela planta para se defender dos ataques tóxicos da bactéria. McPherson et al., (2014), estudou a relação entre compostos fenólicos e a resistência para introdução de invasores patogênicos em *Quercus agrifolia* Nee e concluiu que realmente a resistência se relacionava com a presença de compostos fenólicos.

Portanto acredita-se que a presença de compostos fenólicos possa resultar da interação planta-bactéria ou serem produzidos naturalmente por uma delas e/ou pelas duas. Trabalhos como de Fernandes et al., (2019) que trabalhou com *Virola venosa* já mostraram que algumas

plantas produzem estes compostos. Outros autores também corroboram para tal hipótese como Ilić et al., (2019) trabalhando com *Apfelbeckia insculpta* (L. Koch, 1867); ROSERO-HERNÁNDEZ et al., (2019) com *Botrytis cinerea* e Yahia et al., (2019) com *Calligonum arich*.

FIGURA 6 – Cromatograma da corrente iônica total (TIC) dos voláteis das sementes da melancia sadia (azul) e infectada (preto) por HS-SPME/GC-MS.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

TABELA 1 - Constituintes químicos da semente sadia identificados por HS-SPME/GC-MS.

Pico	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	Composto	Referência
3	4,98	879	875	<i>p</i> -xileno	Varlet et al., 2006
4	5,49	900	900	<i>o</i> -xileno	Varlet et al., 2006
6	7,04	963	961	benzaldeído	Roussis et al., 2000
8	7,79	993	988	mirreno	ADAMS, 2007
9	9,09	1046	1049	benzenoacetaldeído	Asuming et al., 2005
11	10,81	1115	1116	álcool fenilético	Alissandrakis et al., 2007
12	11,81	1156	1156	(<i>Z</i>)-3-nonen-1-ol	Kim et al., 2001
13	12,08	1168	1165	acetato de benzila	Pino et al., 2005
14	12,52	1186	1178	naftaleno	ADAMS, 2007
15	14,26	1260	1256	acetato de 2-feniletila	Pino et al., 2005

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

Nas próximas páginas são apresentados os espectros de massas para os compostos fenólicos referidos anteriormente, fenol (Figura 6); 2-metóxi-fenol (Figura 7) e 2-metóxi-4-etenilfenol (Figura 8).

TABELA 2 - Constituintes químicos da semente infectada identificados por HS-SPME/GC-MS.

Pico	TR (min)	IR exp.*	IR lit.**	Composto	Referência
1	2,53	780	720	Acetoína***	Pino et al., 2005
2	3,52	819	819	2,3-butanodiol***	Kim et al., 2001
3	4,98	879	875	<i>p</i> -xileno	Varlet et al., 2006
4	5,49	900	900	<i>o</i> -xileno	Varlet et al., 2006
5	6,43	938	-	NI***	
6	7,04	963	961	benzaldeído	Roussis et al., 2000
7	7,53	983	981	fenol***	Lalel, Singh & Chye Tan, 2003
8	7,79	993	988	mirceno	ADAMS, 2007
9	9,09	1046	1049	benzenoacetaldéido	Asuming et al., 2005
10	10,23	1092	1090	2-metóxi-fenol***	Asuming et al., 2005
11	10,81	1115	1116	álcool feniletílico	Alissandrakis et al., 2007
12	11,81	1156	1156	(<i>Z</i>)-3-nonen-1-ol	Kim et al., 2001
13	12,08	1168	1165	acetato de benzila	Pino et al., 2005
14	12,52	1186	1178	naftaleno	ADAMS, 2007
15	14,26	1260	1256	acetato de 2-feniletila	Pino et al., 2005
16	15,58	1318	1315	2-metóxi-4-etenilfenol***	Asuming et al., 2005
17	19,43	1499	1495	2-tridecanona***	ADAMS, 2007
18	23,95	1755	-	éster de ácido graxo***	

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

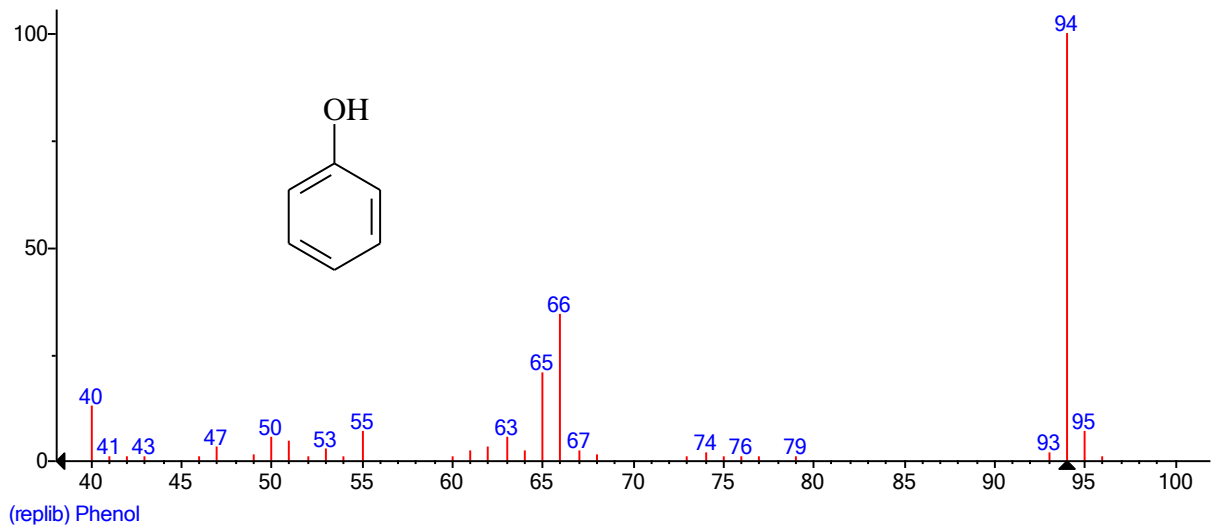
* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

*** = Compostos exclusivos da amostra de semente infectada.

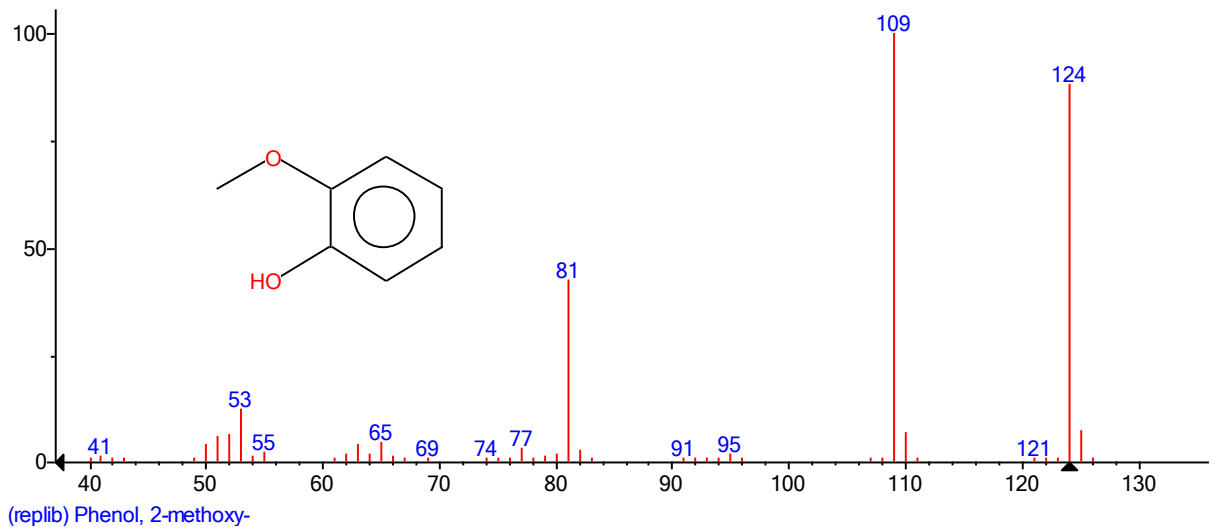
NI= Não identificado

FIGURA 7-Espectro de massas da biblioteca do software para o fenol presente na semente infectada.



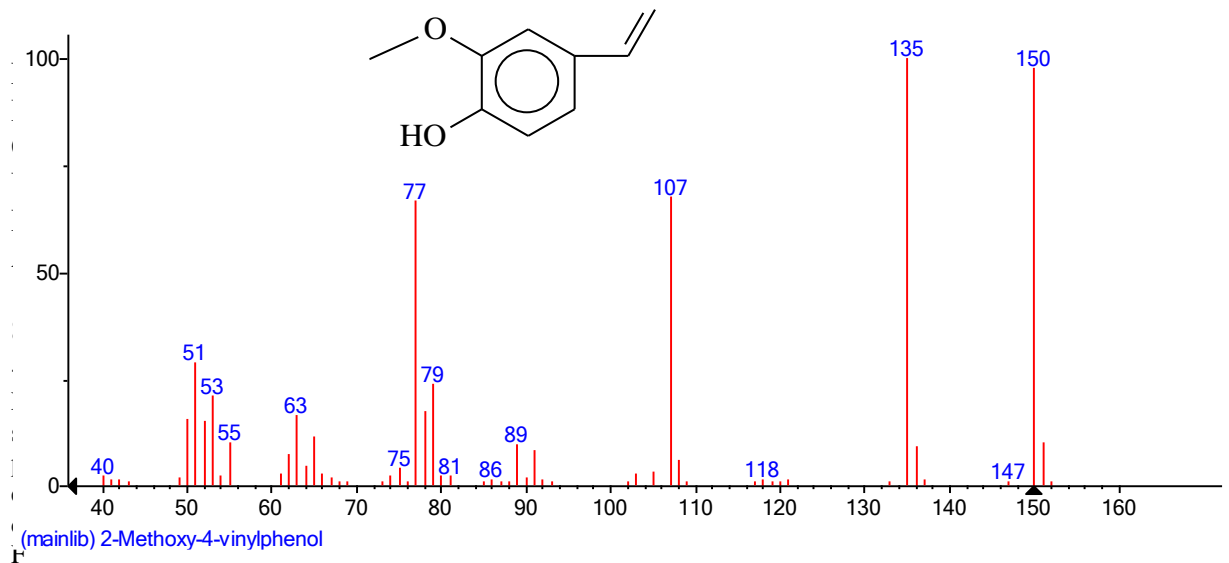
Fonte: Banco de dados da NIST2014, 2019.

FIGURA 8-Espectro de massas para o 2-metóxi-fenol presente na semente infectada.



Fonte: Banco de dados da NIST2014, 2019.

FIGURA 9-Espectro de massas para o 2-metóxi-4-etenilfenol presente na semente infectada.

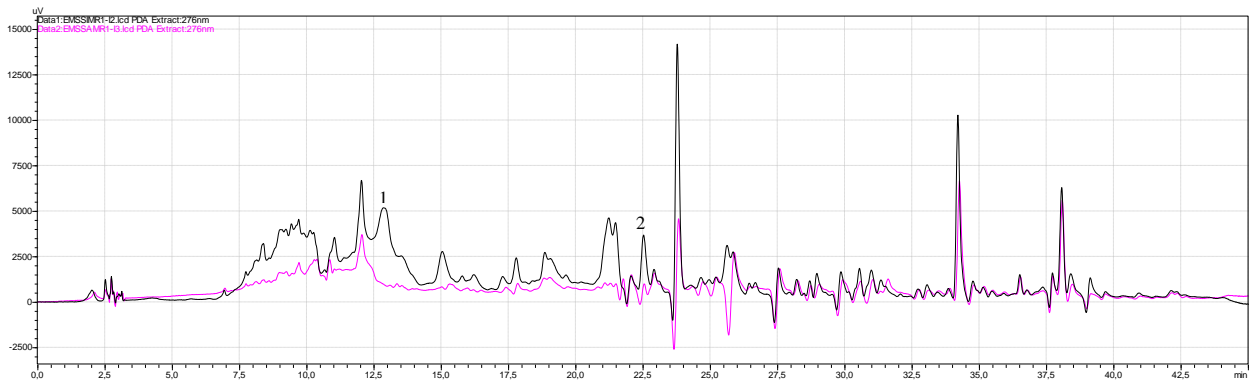


Fonte: Banco de dados da NIST2014, 2019.

4.2 Análises das sementes de melancia via HPLC-DAD

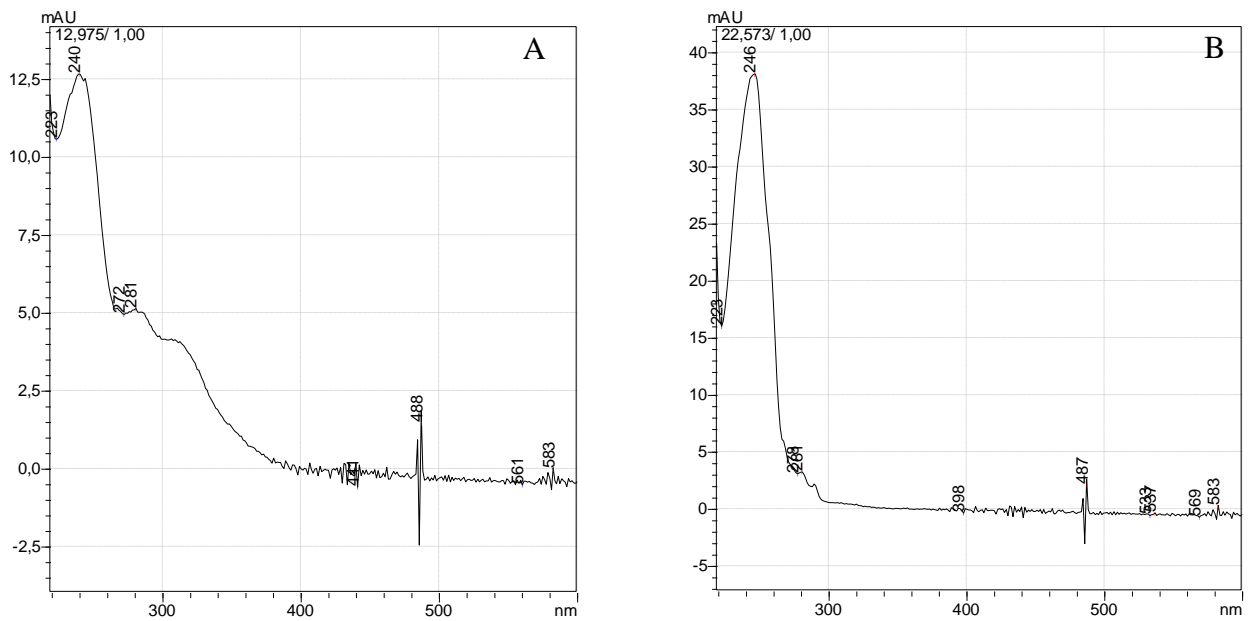
As análises dos extratos metanólicos das sementes sadia e infectada pela bactéria *A. citrulli* mostraram poucas diferenças no perfil químico dos compostos fixos, com destaque para as bandas cromatográficas em 12,97 min [banda 1] e 22,57 min [banda 2] (Figura 10), às quais foram detectadas apenas na amostra infectada. Não foi possível identificar ou elucidar os referidos compostos, mas pelas características dos espectros de UV e cromatogramas associados às condições do método analítico, sabe-se que estas moléculas são ligeiramente apolares e possuem grupos cromóforos de forte absorção em 240 nm e 246 nm (Figura 11). O composto 1 elui com percentual de 68,45% de MeOH e o compostos 2 com 86,24 % MeOH, o que demonstra que as referidas moléculas possuem fortes interações físico-químicas com a fase estacionária da coluna cromatográfica.

FIGURA 10 – Cromatogramas HPLC-DAD dos compostos fixos dos extratos metanólicos das sementes da melancia sadia (rosa) e infectada (preto), referentes ao comprimento de onda de 276 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

FIGURA 11 - Espectro de UV das bandas cromatográficas referentes às bandas 1 (A) e 2 (B).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No que tange as análises, destaca-se a presença de compostos tanto na semente infectada quanto na sadia via HS-SPME/GC-MS e HPLC-DAD e compostos diferentes presentes na infectada, fato que possibilita inferir que realmente a bactéria *A. citrulli* provoca alterações na composição da melancia ao infectá-la. Ainda abre caminho para que novas pesquisas sejam feitas nessa linha, tentando-se compreender um pouco mais do perfil químico fixo das sementes de melancia, dos processos bioquímicos envolvidos na interação planta-bactéria e desenvolvimento de novos compostos bactericidas.

6 CONTRIBUIÇÕES DA MONOGRAFIA

Com a necessidade crescente de pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de novos métodos de combate menos agressivos ao meio ambiente e de conhecer-se melhor os fatores químicos, biológicos e bioquímicos referentes a interação planta-microrganismo, o presente trabalho amplia o leque de fontes de consulta para melhor compreensão de tais processos.

7 TRABALHOS FUTUROS

Partindo dos resultados obtidos no presente trabalho, futuramente acredita-se que este possua potencial para realização de pesquisas em parceria com outras instituições de ensino da região, afim de não apenas identificar se o comportamento *in vivo* mostra o mesmo padrão *in vitro* bem como o desenvolvimento de um método de combate abrangente que possibilite diminuir os danos provocados pela doença da mancha-aquosa em melancia. Os resultados aqui demonstrados em conjunto com os de outros colegas de Iniciação Científica possivelmente serão publicados também em um artigo científico.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured: Carol Stream, 2007. 804 p.
- ALISSANDRAKIS, E. et al. Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8152-8157, 2007. DOI 10.1021/jf071442y.
- AL-KHSEMAWEE, H.; AGARWAL, M.; REN, Y. Evaluation of stable isotope ¹³C₆-glucose on volatile organic compounds in different stages of Mediterranean fruit fly (Medfly) *Ceratitis Capitata* (Diptera: Tephritidae). **Entomology, Ornithology & Herpetology: Current Research**, v. 6, n. 3, p. 3–8. 2017. DOI 10.4172/2161-0983.1000195.
- ASUMING, W. A. et al. Essential oil composition of four *Lomatium* Raf. species and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 1, p. 17-26, 2005. DOI 10.1016/j.bse.2004.06.005.
- AULAKH, J. S. et al. A review on solid phase micro extraction—High performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 71–85, 2005. DOI 10.1080/10408340590947952.
- BOJKO, B. et al. Solid-phase microextraction in metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 61, p. 168–180, 2014.
- CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da propolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- COSTA, N. D.; LEITE, W. M. **Manejo e conservação do solo e da água: potencial agrícola do solo para o cultivo da melancia**. Barreiras-BA: Embrapa Semi-Árido. 2007. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/159191/1/OPB1322.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- DESCHAMPS, C. et al. Produção de biomassa, teor e composição do óleo essencial de *Mentha x piperita* L. em resposta a fontes e doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.12-17, 2012.
- DE MELLO E CARNEIRO, J. G.; CITO, A. M. G. L.; PESSOA, E. F. Constituintes voláteis do fruto do pajeuzeiro (*tripalis* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 907-909, 2010.
- DÓREA, H. S.; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**, v. 4, n. 7, p. 1-7, 2008.

DUARTE, K. M. R.; SILVA, F. M. S. M.; MEIRELLES, C. F. Resíduos de anabolizantes na produção animal: importância e métodos de detecção. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.731-737, 2002.

DUTTA, B. et al. Pathways of bacterial invasion and watermelon seed infection by *Acidovorax citrulli*. **Plant pathology**, v. 64, n. 3, p. 537-544, 2015.

FERNANDES, K. R. P. et al. Phenolic compounds from *Virola venosa* (*Myristicaceae*) and evaluation of their antioxidant and enzyme inhibition potential. **Acta Amazonica**, v.49, n.1, p. 48-53, 2019. DOI 10.1590/1809-4392201800832.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. Mancha-aquosa da melancia em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, 2007.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, **Produção Agrícola Municipal**, 2017. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2017_v44_br_informativo.pdf. Acesso em: 05 mar. 2019.

_____. **Produção Agrícola Municipal**, 2018. Sistema IBGE de Recuperação Automática – Sidra. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acesso em: 30 set. 2019.

_____. **Produção Agrícola Municipal**, 2017. Sistema IBGE de Recuperação Automática – Sidra. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acesso em: 07 mar. 2019

_____. **Produção Agrícola Municipal**, 2016. Sistema IBGE de Recuperação Automática – Sidra. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acesso em: 07 mar. 2019.

ILÍĆ, B. et al. Phenol-based millipede defence: antimicrobial activity of secretions from the Balkan endemic millipede *Apfelbeckia insculpta* (L. Koch, 1867) (Diplopoda: Callipodida). **The Science of Nature**, v. 106, p. 1-9, 2019. DOI 10.1007/s00114-019-1631-z.

KIM, T. H. et al. Volatile flavour compounds in suspension culture of *Agastache rugosa* Kuntze (Korean mint). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 6, p. 569-575, 2001. DOI 10.1002/jsfa.845.

LALEL, H. J. D.; SINGH, Z.; CHYE TAN, S. Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity, **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, n. 2, p. 205-218, 2003. DOI 10.1016/S0925-5214(02)00250-8.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Mancha aquosa: importante bacteriose do meloeiro no Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, v. 1, p.79-88, 2004.

MARQUES, L. M. M.; OLIVEIRA, A. R. M. Técnicas cromatográficas e os desafios na determinação de compostos presentes em matrizes complexas: relato de um caso prático do produto natural piperlongumina. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 101-109, 2013.

McPherson, B. A. et al. Association between resistance to an introduced invasive pathogen and phenolic compounds that may serve as biomarkers in native oaks. **Forest Ecology and Management**, v. 312, p. 154-160, 2014. DOI 10.1016/j.foreco.2013.10.009.

PAULUS, D. et al. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 203-209, 2013.

PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction: theory and practice**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 1997.

PINO, J. A. et al. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2213-2223, 2005. DOI 10.1021/jf0402633.

ROBBS, C. F. et al. Mancha bacteriana da melancia no estado de São Paulo, causada por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.2, p. XLVIII, 1991.

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAN, L. O. S. Podridões de frutos de melão em pós-colheita causadas por bactérias no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, n.2, p.195, 1992.

ROCHA, M. R. **Sistemas de cultivo para a cultura da melancia**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), Santa Maria, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/5519/ROCHA%2c%20MARTA%20RODRIGUES%20DA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 mar. 2020.

ROSETO-HERNÁNDEZ, E. D. et al. Natural compounds that modulate the development of the fungus *Botrytis cinerea* and Protect *Solanum lycopersicum*. **Plants**, v. 8, p. 1-13, 2019.

ROUSSIS, V. et al. Volatile constituents of four Helichrysum species growing in Greece. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 2, p. 163-175, 2000. DOI 10.1016/S0305-1978(99)00046-0.

SILVA, V. A. V.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em Meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 381-386, 2006.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 1, p. 3-14, 1996.

SOMODI, G. C. et al. Occurrence of bacterial watermelon fruit blotch in Florida. **Plant Disease**, v. 75, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

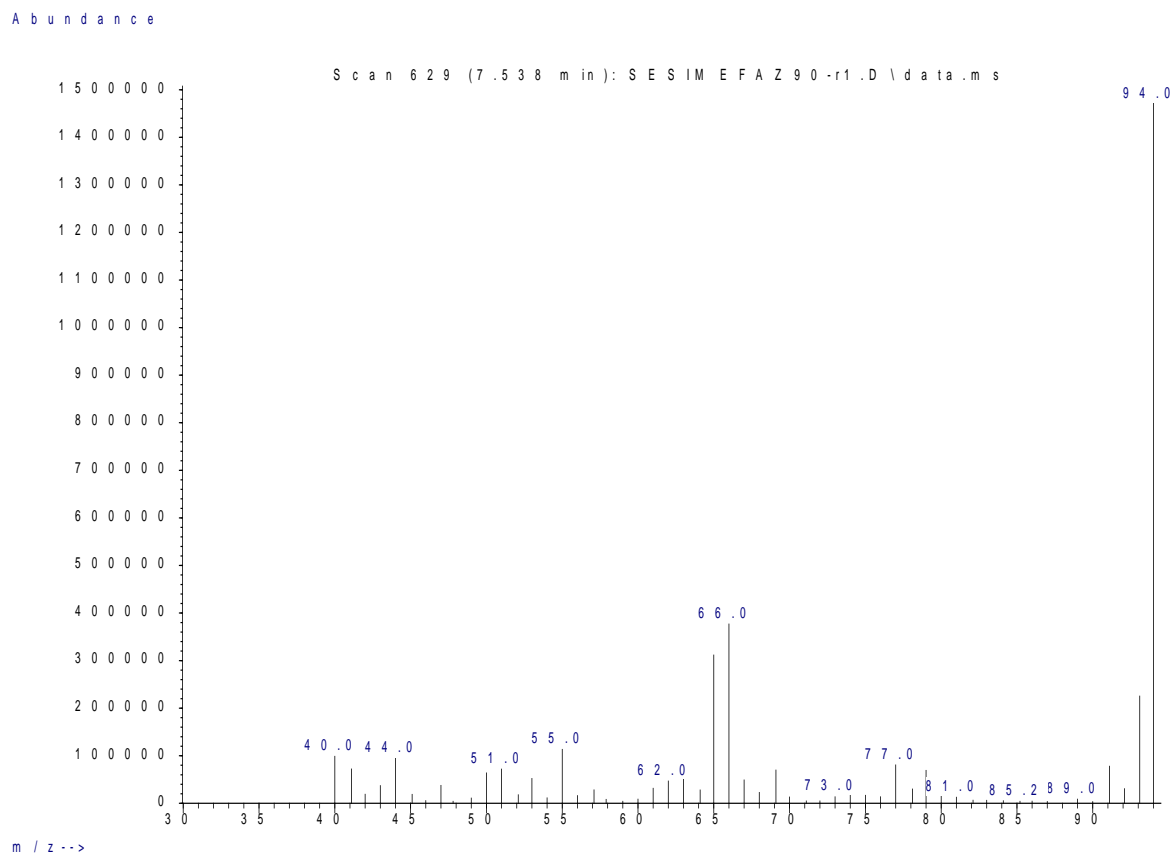
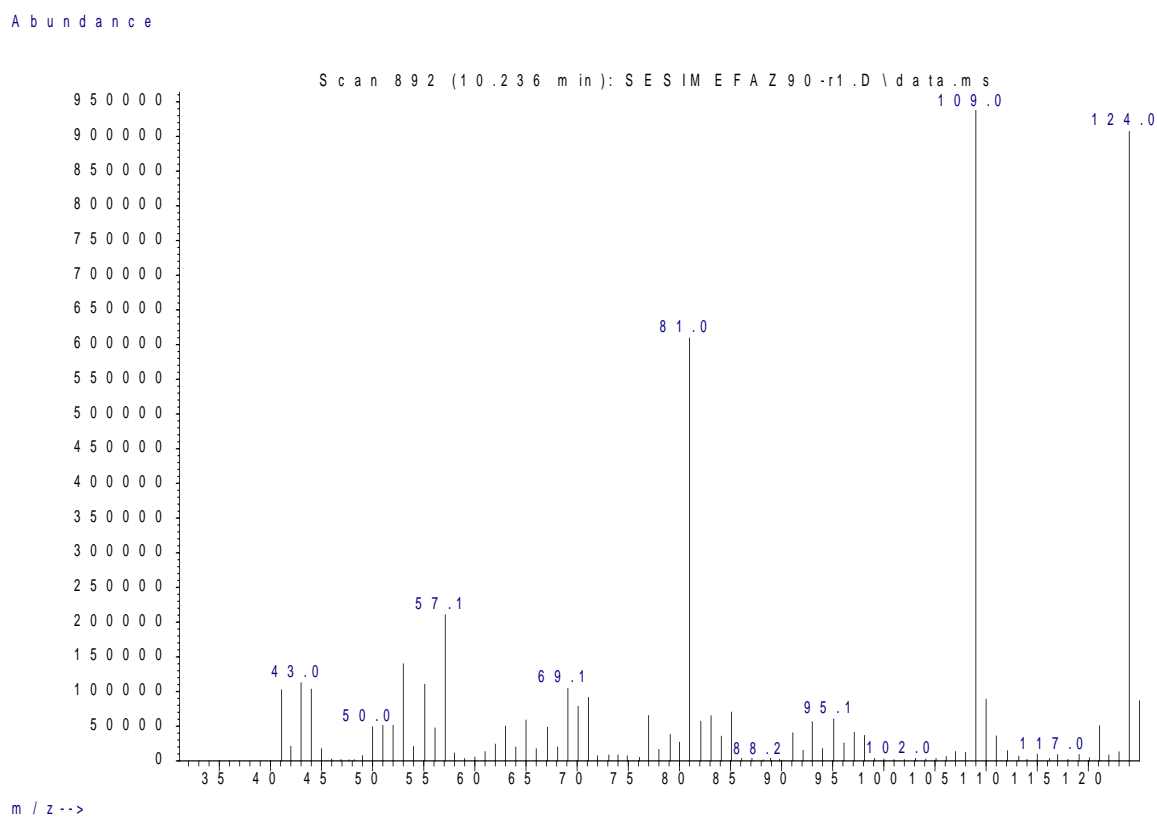
VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, p. 523-530, v. 23, n. 4, 2000.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

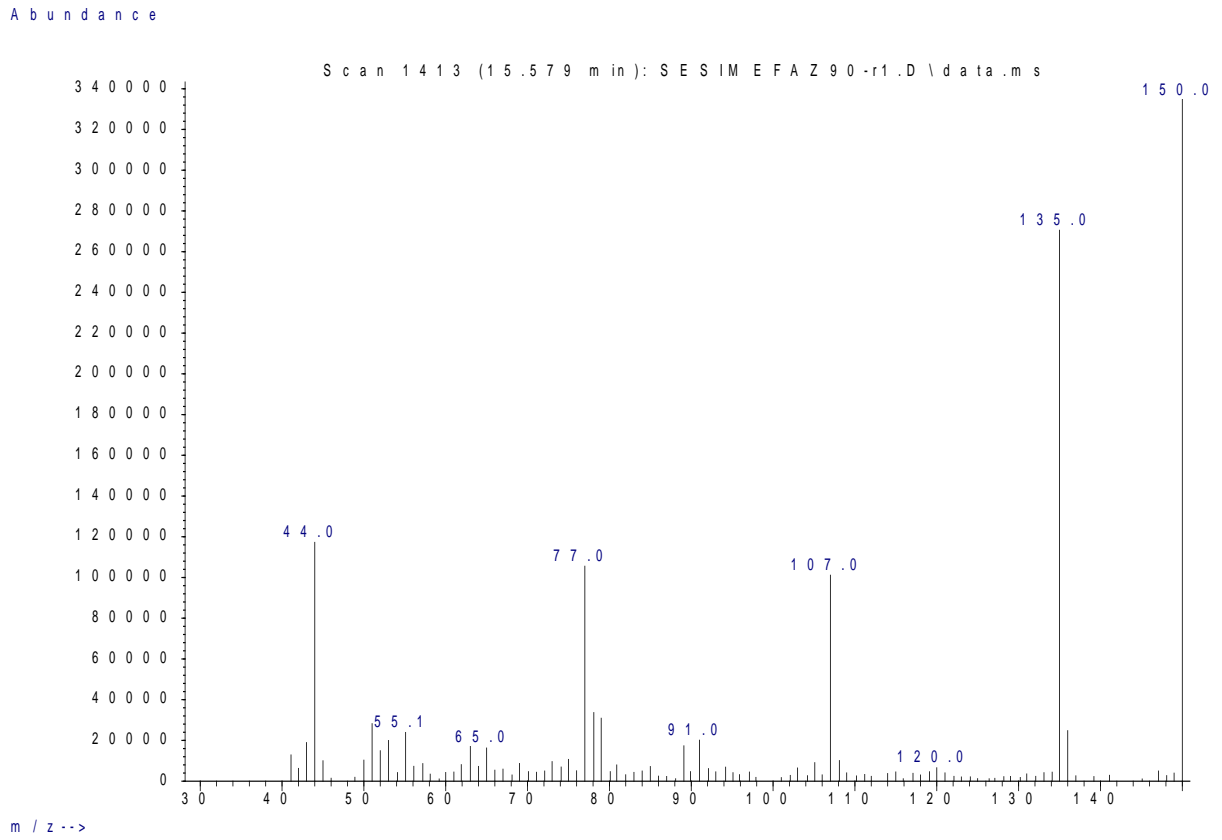
VARLET, V. et al. Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3391-3401, 2006. DOI 10.1021/jf053001p.

WALCOTT, R. R. Integrated pest management of bacterial fruit blotch of cucurbits. In: A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.). **Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria**, p. 187-205, 2008.

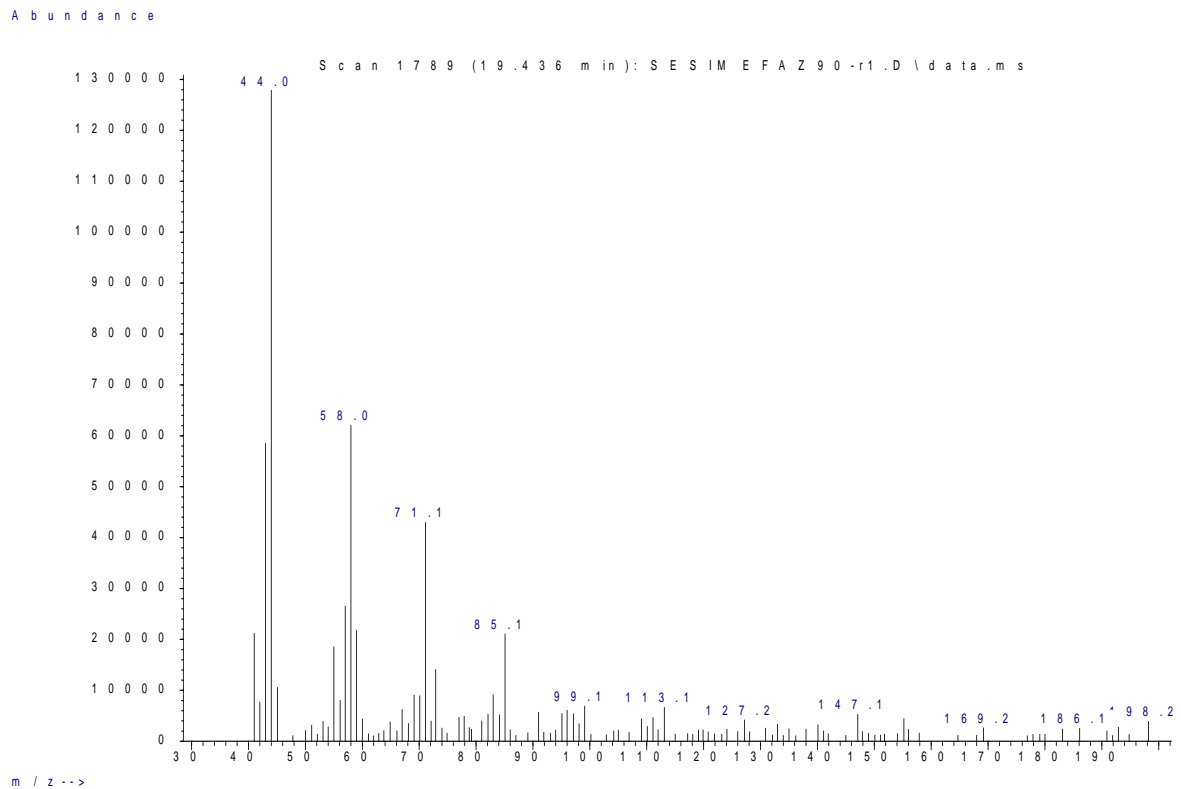
YAHIA, Y. et al. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of *Calligonum arich* L., desert endemic plant in Tunisia. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 414-419, 2019. DOI 10.1016/j.sajb.2019.06.005.

ANEXO A-ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAL PARA O FENOL.**ANEXO B-ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAL PARA O 2-METÓXI-FENOL.**

ANEXO C-ESPECTRO DE MASMAS EXPERIMENTAL PARA O 2-METÓXI-4-ETENILFENOL.

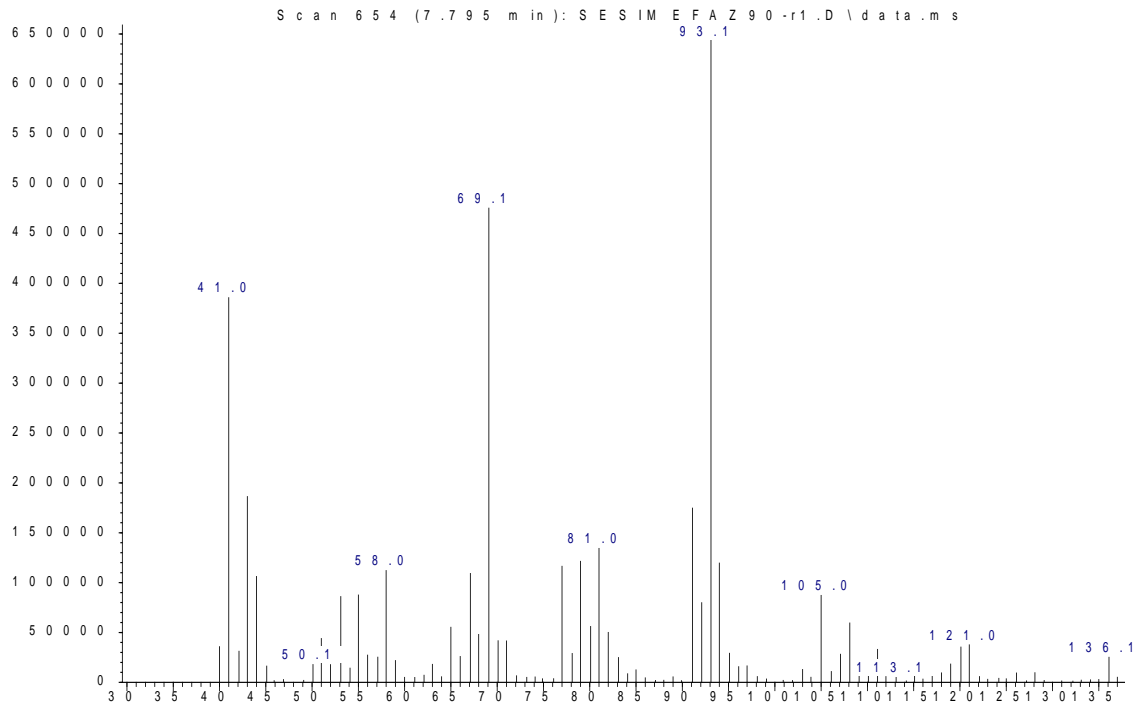


ANEXO D-ESPECTRO DE MASMAS EXPERIMENTAL PARA O 2-TRIDECANONA.



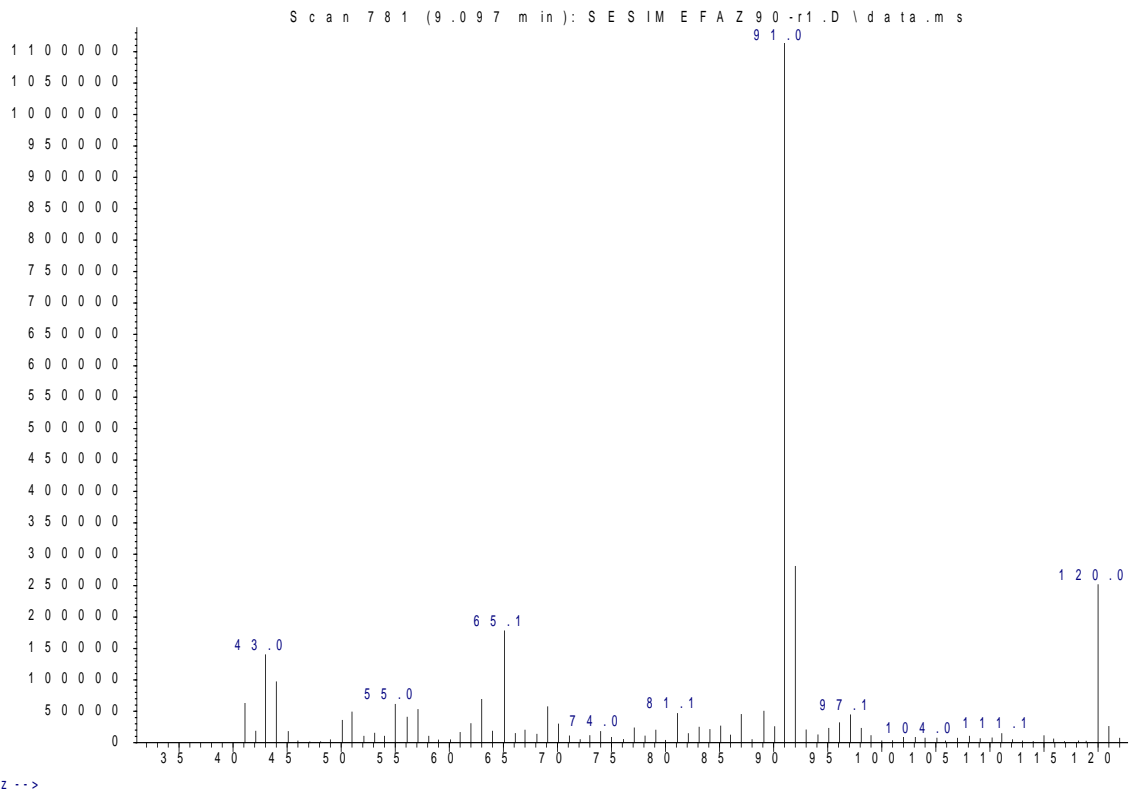
ANEXO E-ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAL PARA O MIRCENO.

Abundance



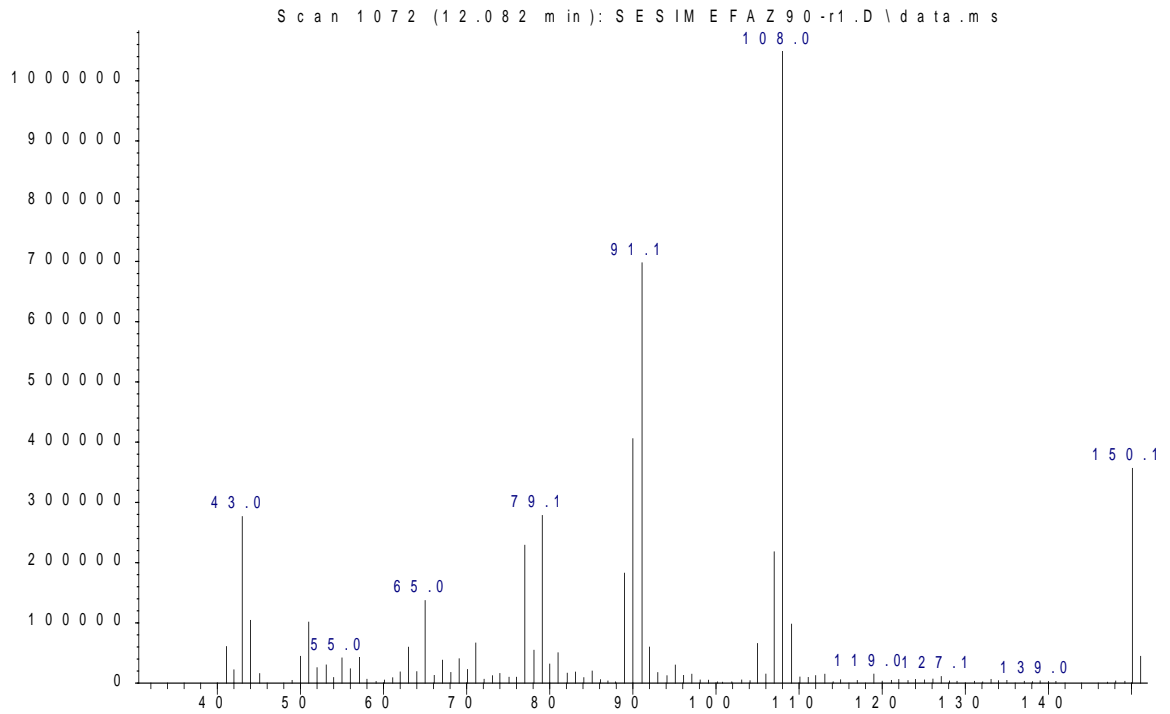
ANEXO F-ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAL PARA O BENZENOACETALDEÍDO.

Abundance



ANEXO G-ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAL PARA O ACETATO DE BENZILA.

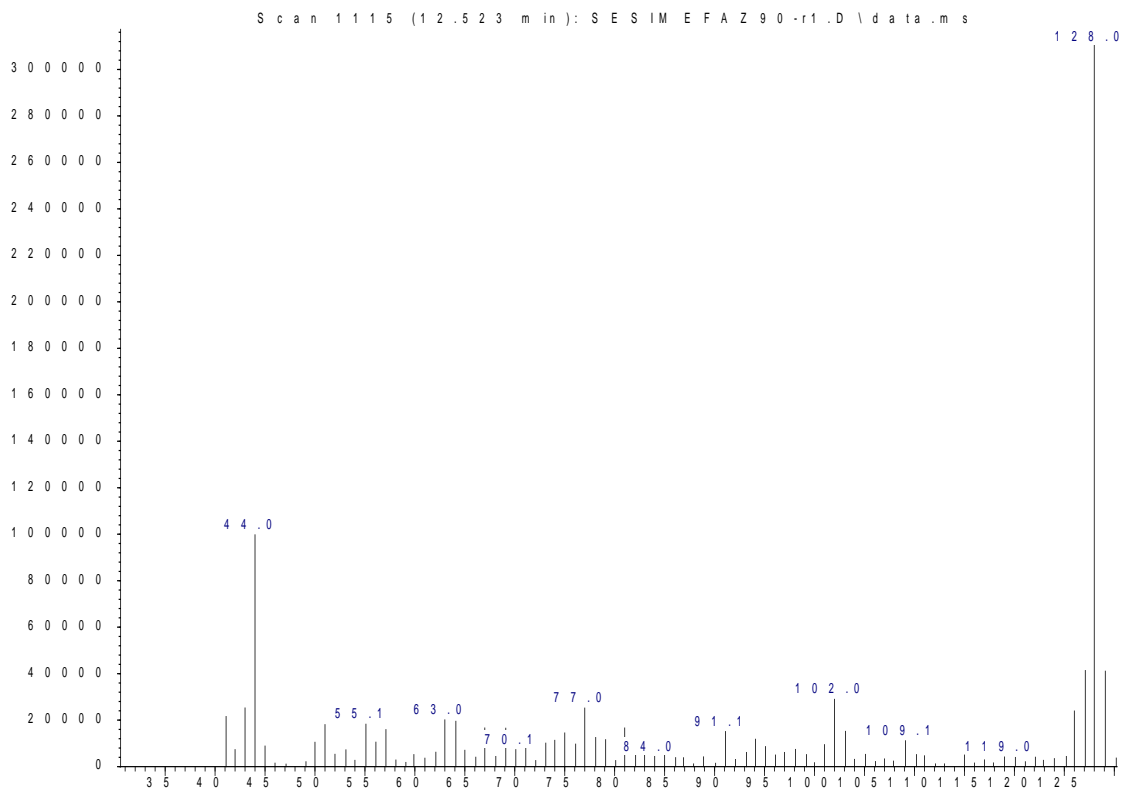
Abundance



m / z-->

ANEXO H-ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAL PARA O NAFTALENO.

Abundance



m / z-->

ANEXO I-ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAL PARA O ÁLCOOL FENILETÍLICO.

