



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLOS PINHEIRO CHAGAS DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E
APLICAÇÃO COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA PÓS-COLHEITA EM
MANGAS E MAÇÃS**

FORTALEZA

2020

CARLOS PINHEIRO CHAGAS DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E
APLICAÇÃO COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA PÓS-COLHEITA EM MANGAS E
MAÇÃS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

Coorientadora: Dra. Andréia Hansen Oster.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L697c Lima, Carlos Pinheiro Chagas de.
Caracterização parcial de polissacarídeos sulfatados e aplicação como indutores de resistência pós-colheita em mangas e maçãs / Carlos Pinheiro Chagas de Lima. – 2020.
106 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

Coorientação: Profa. Dra. Andréia Hansen Oster.

1. Elicitor. 2. Sulfatação. 3. Sterculia. 4. Maçãs. 5. Mangas. I. Título.

CDD 540

CARLOS PINHEIRO CHAGAS DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E
APLICAÇÃO COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA PÓS-COLHEITA EM MANGAS E
MAÇÃS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Aprovada em: 17/12/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Andréia Hansen Oster (Coorientadora)
Embrapa Uva e Vinho

Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Cléber de Freitas Fernandes
Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Morsyleide de Freitas Rosa
Embrapa Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo o apoio.

Ao meu pai e minha irmã que estiveram sempre disponíveis para me ajudar em tudo.

A professora Judith Feitosa pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e por sua inspiradora predisposição para aceitar os desafios das pesquisas que envolvem outras áreas do conhecimento.

A pesquisadora Andréia Hansen pela coorientação no desenvolvimento deste trabalho e por sua instigante entrega à pesquisa.

As professoras Regina Monteiro e Jeanny Maciel, e ao pesquisador Cléber de Freitas pelas sugestões dadas na qualificação.

Aos professores participantes da banca examinadora.

Ao pesquisador Fábio Cavalcante pelas análises bioquímicas.

A Andressa, Cecília e Ludmila pela ajuda na modificação dos polissacarídeos.

A Gina, Ageu e Raphaelly, bolsistas da Embrapa que me ajudaram muito nos trabalhos no Laboratório de Patologia Pós-colheita.

A Nádia pela realização das análises de absorção na região do infravermelho (FTIR), Análise Elementar e DSC.

A Regina Cláudia Rodrigues do Laboratório de Ciências e Tecnologia de Materiais do Departamento de Física da UFC pela contribuição nas análises termogravimétricas (TGAs).

A toda equipe do Laboratório de Polímeros (LabPol) pelo ambiente de colaboração e companherismo.

A turma do racha das sextas-feiras pelos momentos de descontração.

Ao Venícios e a Natália por estarem sempre dispostos para ajudar em tudo.

Ao CENAUREN e a Embrapa pelas análises de ressonância magnética nuclear (RMN).

Aos órgãos de fomento FUNCAP, CAPES, CNPQ e INOMAT pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todas as pessoas que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

“A vida é... uma relação entre moléculas.”

(Linus Carl Pauling)

RESUMO

Diante do crescimento populacional, a demanda por alimentos tende a aumentar. Hoje, fazer crescer a produção de alimentos de modo seguro para a saúde e o meio ambiente é um desafio. Elictores são compostos promissores para ajudar a solucionar esse desafio, pois são indutores de defesa de plantas contra fitopatógenos, micro-organismos que causam perdas entre cerca 10 a 40% do rendimento da produção agrícola mundial. Ulvanas e glucuronanas são polissacarídeos que podem atuar como elicitores. A atividade desses carboidratos parece estar relacionada aos grupos sulfato e aos resíduos de ramnose e ácido urônico. Como a goma de chichá (GCH), um polissacarídeo semelhante à goma de karaya, contém resíduos de ramnose e de ácido urônico, resolveu-se fazer modificações químicas nessa goma e realizar testes para avaliação da sua capacidade de induzir resistência pós-colheita. A goma e derivados tiveram suas identidades confirmadas por espectroscopia no infravermelho. A gravimetria térmica indicou que a goma após ser sulfatada (GCHS) e desacetilada (GCHDA) se tornou termicamente mais lábil. As massas molares de todos os derivados da goma chichá diminuíram após as modificações. O ^{13}C -RMN revelou que ocorreu sulfatação em C6 da galactose e no resíduo de rhamnose. Mangas e maçãs foram utilizadas para testar a atividade elicitora das gomas. Os frutos foram pulverizados com as soluções dos polissacarídeos e a atividade de enzimas de defesa foi mensurada utilizando-se o indutor comercial Benzotriazol (BTH) como controle positivo. GCHDA, e principalmente GCHS, aumentaram ($p < 0,05$) a atividade da enzima guaicol peroxidase (GPX) em 12–48 h, em maçãs. A atividade de PPO na polpa dessas frutas tratadas com GCHS aumentou em 12 e 24 h ($p < 0,05$). Este trabalho sugere que polissacarídeos de exsudato vegetal podem ser uma fonte promissora de compostos indutores de defesa vegetal.

Palavras-chave: elicitor; sulfatação; *Sterculia*; maçãs; mangas.

ABSTRACT

In view of the population growth, the demand for food tends to increase. Today, growing food production in a way that is safe for health and the environment is a challenge. Elicitors are promising compounds to help solve this challenge, as they induce plant defense against phytopathogens, microorganisms that cause losses between 10 to 40% of the world's agricultural production yield. Ulvans and glucuronans are polysaccharides that can act as elicitors. The activity of these carbohydrates seems to be related to the sulfate groups and the residues of rhamnose and uronic acids. As chichá gum (GCH), a polysaccharide similar to karaya gum, contains residues of rhamnose and uronic acid, it was decided to make chemical modifications to this gum and perform tests to evaluate its ability to induce post-harvest resistance. The gum and derivatives had their identities confirmed by infrared spectroscopy. Thermal gravimetry indicated that the gum after being sulfated (GCHS) and deacetylated (GCHDA) became thermally more labile. The molar mass of all derivatives of chichá gum decreased after the modifications. The ^{13}C -NMR revealed that there was sulfation in C6 of the galactose and in the rhamnose residue. Mangoes and apples were used to test the eliciting activity of the gums. The fruits were sprayed with the polysaccharide solutions and the activity of defense enzymes was measured using the commercial inducer Benzothiadiazole (BTH) as a positive control. GCHDA, and mainly GCHS, increased ($p < 0.05$) the activity of the enzyme guaiacol peroxidase (GPX) in 12–48 h, in apples. The PPO activity in the pulp of these GCHS-treated fruits increased at 12 and 24 h ($p < 0.05$). This work suggests that polysaccharides from plant exudate may be a promising source of plant defense inducing compounds.

Keywords: elicitor; sulfation; *Sterculia*; apples; mangoes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura química do benzotiadiazol (BTH) (a) e do ácido β -aminobutírico (BABA) (b).....	26
Figura 2	- Estrutura química básica das ulvanas (acima) e das glucuronanas (abaixo).....	28
Figura 3	- Árvore <i>Sterculia striata</i>	35
Figura 4	- Estrutura química básica da goma do chichá.....	36
Figura 5	- Esquema simplificado da reação de sulfatação de uma goma.....	37
Figura 6	- Esquema simplificado da reação de desacetilação de uma goma.....	38
Figura 7	- Esquema simplificado da reação de hidrólise de uma goma.....	38
Figura 8	- Fluxograma da extração da goma do chichá.....	42
Figura 9	- Fluxograma da sulfatação dos polissacarídeos.....	43
Figura 10	- Fluxograma da desacetilação da goma do chichá.....	45
Figura 11	- Fluxograma da hidrólise da goma do chichá e derivados.....	47
Figura 12	- FTIR para os polissacarídeos usados nos testes preliminares.....	53
Figura 13	- Diâmetro médio das lesões causadas por antracnose em mangas Tommy tratadas com goma do chichá. Após 4 dias (a) e 6 dias (b).....	54
Figura 14	- Teste para manga Tommy tratada com goma do cajueiro. Após 4 dias (a) e 6 dias (b).....	54
Figura 15	- Teste para manga Palmer tratada com goma do chichá. Após 4 dias (a) e 6 dias (b).....	55
Figura 16	- Teste para manga Palmer tratada com goma do cajueiro. Após 4 dias (a) e 6 dias (b).....	55
Figura 17	- Atividade da Fenilalanina amônia liase.....	56
Figura 18	- Teste antifúngico para a goma do chichá (GCH) (a) e para a goma do chichá sulfatada (GCHS) (b).....	56
Figura 19	- Teste antifúngico para a goma do cajueiro levemente sulfatada (GCS) (a) e para a galactomanana de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> sulfatada (GCPS) (b).....	57
Figura 20	- Teste antifúngico para a Celulose Bacteriana Sulfatada (CBS).....	57
Figura 21	- Severidade de doença causada por <i>Penicilium</i> em maçãs Fuji tratadas com derivados sulfatado e desacetilado da goma do chichá.....	58

Figura 22	- FTIR das gomas GCH, GCHDA e GCHH.....	60
Figura 23	- Cromatogramas das gomas GCH, GCHDA e GCHH.....	61
Figura 24	- Potencial zeta das gomas GCH, GCHDA e GCHH.....	62
Figura 25	- FTIR da goma GCHS.....	64
Figura 26	- Cromatograma da goma GCHS.....	65
Figura 27	- Potencial Zeta (PZ) das gomas GCH e GCHS.....	66
Figura 28	- FTIR das gomas GCHDA e GCHDAS.....	66
Figura 29	- Cromatogramas das gomas GCHDA e GCHDAS.....	67
Figura 30	- Potencial zeta para as gomas GCHDA e GCHDAS.....	68
Figura 31	- FTIR das gomas GCHDA e GCHDAH.....	69
Figura 32	- Cromatogramas das gomas GCHDA e GCHDAH.....	69
Figura 33	- Potencial Zeta das gomas GCHDA e GCHDAH.....	70
Figura 34	- FTIR das gomas GCHH e GCHHS.....	71
Figura 35	- Cromatograma das gomas GCHH e GCHHS.....	71
Figura 36	- Potencial Zeta de GCHH e GCHHS.....	72
Figura 37	- Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHHS.....	73
Figura 38	- Atividade da fenilalanina amônia-liase nas polpas de manga.....	74
Figura 39	- Mangas tratadas com água.....	74
Figura 40	- Mangas tratadas com GCH.....	75
Figura 41	- Mangas tratadas com GCHH.....	75
Figura 42	- Mangas tratadas com GCHHS.....	75
Figura 43	- Mangas tratadas com GCHDA.....	76
Figura 44	- Mangas tratadas com GCHDAH.....	76
Figura 45	- Mangas tratadas com GCHDAS.....	76
Figura 46	- Mangas tratadas com GCHS.....	77
Figura 47	- Mangas tratadas com Bion.....	77
Figura 48	- Curvas de TGA (em ar) da GCH e seus derivados.....	80
Figura 49	- Curvas de DSC (em N ₂) da GCH e seus derivados.....	81
Figura 50	- Espectro de ¹³ C-NMR da GCHS.....	82
Figura 51	- Atividade de GPX em maçãs Pink Lady em diferentes tempos após a pulverização com água destilada (controle, Ctrl) e GCHDA (a), GCHS (b) e BTH (c).....	83

Figura 52	-	Atividade de PPO em maçãs Pink Lady após pulverização com água destilada (controle, Ctrl) e GCHDA (a), GCHS (b) e BTH (c).....	84
Figura 53	-	Teor de lignina (derivados de TGA, mg g ⁻¹ FW) extraída de polpas de maçã (cv. Pink Lady) 72 h após pulverização com eliciadores. As maçãs controle (Ctrl-) foram pulverizadas com água destilada. As mesmas letras indicam que os valores não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey (p> 0,05).....	85
Figura 54	-	Espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 da goma de chichá bruta (GCH) e desacetilada (GCHDA).....	105
Figura 55	-	Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCH.....	107
Figura 56	-	Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHDA.....	107
Figura 57	-	Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHH.....	108
Figura 58	-	Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHS.....	108
Figura 59	-	Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHDAS.....	108
Figura 60	-	Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHDAH.....	109
Figura 61	-	Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHHS.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Composição monossacarídica residual de gomas de exsudato de plantas.....	33
Tabela 2	- Percentual de carbono e enxofre e o grau de sulfatação dos polissacarídeos sulfatados.....	52
Tabela 3	- Rendimento e grau de sulfatação para a goma do chichá e seus derivados.....	59
Tabela 4	- Quantidade de frutos afetados por tratamento.....	78
Tabela 5	- Análise estatística do tamanho da lesão nos frutos inoculados com <i>Colletrotrichum</i>	78
Tabela 6	- Massa molar da goma de chichá bruta (GCH), sulfatada (SCHG) e desacetilada (DCHG).....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -L-Ram	Resíduo de α -L-Ramnose
α -D-AGal	Resíduo de ácido α -D-galacturônico
β -D-AGlu	Resíduo de ácido β -D-glucurônico
β -D-Gal	Resíduo β -D-galactose
ACS	Ácido clorossulfônico
BABA	Ácido β -aminobutírico
BTH	Benzotiazol
13 C-NMR	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
Ctrl	Controle
D-AUro	Ácido D-urônico
D-Gal	D-galactose
D-Gli	D-glicose
D-Man	D-manose
DMF	N, N- dimetilformamida
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
D-Xil	D-xilose
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
GCH	Goma do chichá
GCHDA	Goma do chichá desacetilada
GCHS	Goma do chichá sulfatada
GPX	Guaiacol peroxidase
L-Ara	L-arabinose
L-Fuc	L-fucose
L-Ram	L-ramnose
MAMPs	Padrões Moleculares Associados a Micróbios
MIP	Manejo Integrado de Praga
Mn	Massas molar numerica média
Mw	Massas molar ponderal média
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
P&Ps	Pragas e patógenos
PIF	Produção Integrada de Frutas

PPO	Polifenol oxidases
PRRs	Proteínas Receptoras de Reconhecimento de Padrões
TGA	Análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	O crescimento da população urbana e a produção de alimentos	21
2.2	As pragas e os patógenos	22
2.3	Controle de pragas e patógenos com agroquímicos	22
2.4	Os malefícios dos agroquímicos	23
2.5	Produção Integrada de Frutas (PIF)	24
2.5.1	<i>Elicitores</i>	25
2.5.1.1	<i>Polissacarídeos de algas</i>	26
2.5.1.2	<i>O papel dos resíduos de monossacarídeos e de grupos sulfato na defesa vegetal</i>	29
2.5.1.2.1	Resíduos de ramnose	29
2.5.1.2.2	Resíduos de ácidos urônicos	30
2.5.1.2.3	Grupos sulfato	30
2.6	Polissacarídeos de exsudado de plantas	31
2.6.1	<i>A goma do chichá</i>	35
2.7	Sulfatação, desacetilação e hidrólise de gomas	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo Geral	39
4	HIPÓTESES	40
5	MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1	Testes preliminares em mangas	41
5.1.1	<i>Materiais</i>	41
5.1.2	<i>Isolamento e sulfatação dos polissacarídeos</i>	41
5.1.3	<i>Caracterização dos polissacarídeos</i>	43
5.1.3.1	<i>Microanálise elementar (ME)</i>	43
5.1.3.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	43
5.1.4	<i>Severidade da antracnose e atividade da fenilalanina amonialiase</i>	44
5.1.5	<i>Atividade antifúngica</i>	45
5.2	Testes preliminares em maçãs	45
5.2.1	<i>Materiais</i>	45
5.2.2	<i>Isolamento, sulfatação e desacetilação dos polissacarídeos</i>	45
5.2.3	<i>Caracterização dos polissacarídeos</i>	45
5.2.3.1	<i>Microanálise elementar (ME)</i>	46
5.2.3.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	46

5.2.4	<i>Severidade de doença causada por Penicilium</i>	46
5.3	Testes em mangas	46
5.3.1	<i>Materiais</i>	46
5.3.2	<i>Isolamento e modificações dos polissacarídeos</i>	46
5.3.3	<i>Caracterização dos polissacarídeos</i>	47
5.3.3.1	<i>Microanálise elementar (ME)</i>	47
5.3.3.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	47
5.3.3.3	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	47
5.3.3.4	<i>Potencial zeta e tamanho de partícula</i>	48
5.3.4	<i>Preparação de materiais e tratamento das mangas</i>	48
5.3.5	<i>Severidade da antracnose e atividade da fenilalanina amônia-liase</i>	48
5.4	Testes em maçãs	49
5.4.1	<i>Materiais</i>	49
5.4.2	<i>Isolamento, desacetilação e sulfatação dos polissacarídeos</i>	49
5.4.3	<i>Caracterização dos polissacarídeos</i>	49
5.4.3.1	<i>Microanálise elementar (ME)</i>	49
5.4.3.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	49
5.4.3.3	<i>Análise térmica (TGA, DSC)</i>	49
5.4.3.4	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (¹³C-RMN)</i>	50
5.4.3.5	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	50
5.4.4	<i>Preparação de materiais e tratamento das maçãs</i>	50
5.4.5	<i>Avaliação da atividade de GPX e PPO e do conteúdo de lignina</i>	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1	Testes preliminares em mangas	52
6.1.1	<i>Sulfatação dos polissacarídeos e caracterização dos derivados sulfatados</i>	52
6.1.2	<i>Severidade da antracnose e atividade da PAL</i>	54
6.1.3	<i>Atividade antifúngica</i>	56
6.2	Testes preliminares em maçãs	58
6.2.1	<i>Sulfatação e desacetilação da goma do chichá e caracterização dos derivados sulfatados</i>	58
6.2.2	<i>Severidade do Penicilium</i>	58
6.3	Testes em mangas	59
6.3.1	<i>Isolamento e modificações dos polissacarídeos</i>	59
6.3.2	<i>Caracterização dos polissacarídeos</i>	60
6.3.2.1	<i>Goma do chichá e goma do chichá desacetilada</i>	60
6.3.2.1.1	<i>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)</i>	60

6.3.2.1.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	61
6.3.2.1.3	Potencial Zeta	62
6.3.2.2	<i>Goma do chichá e goma do chichá hidrolisada</i>	62
6.3.2.2.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)	62
6.3.2.2.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	63
6.3.2.2.3	Potencial Zeta	63
6.3.2.3	<i>Goma do chichá sulfatada</i>	63
6.3.2.3.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)	63
6.3.2.3.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	64
6.3.2.3.3	Potencial zeta	65
6.3.2.4	<i>Goma do chichá desacetilada sulfatada</i>	66
6.3.2.4.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)	66
6.3.2.4.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	67
6.3.2.4.3	Potencial Zeta	68
6.3.2.5	<i>Goma do chichá desacetilada e goma do chichá desacetilada hidrolisada</i>	68
6.3.2.5.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)	68
6.3.2.5.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	69
6.3.2.5.3	Potencial Zeta	70
6.3.2.6	<i>Goma do chichá hidrolisada e goma do chichá hidrolisada sulfatada</i>	70
6.3.2.6.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)	70
6.3.2.6.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	71
6.3.2.6.3	Potencial Zeta	72
6.3.3	<i>Atividade da fenilalanina amônia-liase</i>	73
6.3.4	<i>Severidade da antracnose</i>	74
6.4	Teste em maçãs	79
6.4.1	<i>Isolamento, desacetilação e sulfatação da goma do chichá</i>	79
6.4.2	<i>Caracterização dos derivados sulfatados e desacetilados</i>	79
6.4.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	79
6.4.2.2	<i>Análise térmica (TGA, DSC)</i>	79
6.4.2.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (¹³C-RMN)</i>	81
6.4.2.4	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	82
6.4.2	<i>Avaliação da produção de compostos de defesa em maçãs Pink Lady</i>	82
7	CONCLUSÃO	86
7.1	Teste com as mangas	86
7.2	Teste com as maçãs	86
	REFERÊNCIAS	87

ANEXO A - GÁFICO-RESUMO.....	103
ANEXO B - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 DA GOMA DE CHICHÁ BRUTA (GCH) E DESACETILADA (GCHDA).....	104
ANEXO C - MASSAS MOLARES DOS POLISSACARÍDEOS.....	105
ANEXO D - GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELA INTENSIDADE PARA OS POLISSACARÍDEOS	106

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que até a metade deste século haverá um grande aumento da população urbana no mundo, e a produção de alimentos precisará crescer também para atender essa demanda (KNORR; KHOO; AUGUSTIN, 2018). Para aumentar o rendimento da produção agrícola tende-se a recorrer ao uso dos pesticidas. Porém, devido aos problemas causados por eles, a comunidade internacional está inclinada a buscar a redução significativa da utilização deles no curto ou médio prazo (HILLOCKS, 2012). Os elicitores parecem ser uma importante ferramenta para essa redução (SANDRONI *et al.*, 2020; WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

Elicitores são biofatores capazes de induzir resistência em plantas (BASIT *et al.*, 2018). Atualmente, amiúde, as siglas MAMPs e PAMPs, que significam Padrões Moleculares Associados a Micróbios e Padrões Moleculares Associados a Patógenos, são utilizadas como sinônimo de elicitores (JAULNEAU *et al.*, 2010). Essas substâncias podem proteger as plantas contra patógenos (BURKETOVA *et al.*, 2015).

O Bion é um elicitador comercial utilizado na pós-colheita tanto de mangas (KARUNANAYAKE, 2019) quanto de maçãs (LI *et al.*, 2020). Contudo, a carcinogenicidade desse elicitador sintético é classificada como Categoria 1A (MSDS BYON®, SYNGENTA, 2015), o que significa: “conhecido por ter potencial carcinogênico para humanos” (MCGREGOR *et al.*, 2010). Por isso é necessário identificar novas fontes de elicitores mais seguros.

Polissacarídeos e oligossacarídeos possuem um grande potencial para agirem como elicitores. Porém, ainda é necessária muita pesquisa para a implementação deles na agricultura (ZHENG *et al.*, 2019). Por isso é preciso a identificação e investigação de novos carboidratos que possam ter ação elicitora, como as gomas extraídas de sementes, de exudatos, de bactérias ou de algas (PETTONGKHAO *et al.*, 2019).

Ulvanas e glucuronanas, polissacarídeos extraídos de algas verdes, que já induziram resposta de defesa em frutas (CHIQUITO-CONTRERAS *et al.*, 2019; RIVAS-GARCIA *et al.*, 2018; ABOURAÏCHA *et al.*, 2017; ABOURAÏCHA *et al.*, 2015), possuem resíduos de açúcares que estão também presentes na goma do chichá (GCH), carboidrato extraído do exsudato de *Sterculia striata* (BRITO *et al.*, 2004). Este trabalho, explora essa semelhança e procura aperfeiçoá-la por meio de modificações químicas visando aplicar essa goma e/ou derivados em mangas e maçãs na pós-colheita.

O Brasil é o sétimo maior produtor de manga do planeta e está entre os líderes em exportação dessa fruta (THAKOR, 2019). Em 2017 foram produzidas aproximadamente 1,3 milhão de toneladas de maçãs no Brasil. Em geral, somente 7% da produção nacional de maçãs são exportados, ficando o restante para o consumo dos brasileiros (GABARDO *et al.*, 2019). Dessa forma a importância econômica das mangas está no mercado externo e das maçãs, no mercado interno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O crescimento da população urbana e a produção de alimentos

Ferreira Gullar, poeta maranhense, afirma em seu poema ‘Improviso ordinário sobre a Cidade Maravilhosa’ que “Uma cidade é um amontoado de gente que não planta e que come o que compra...” Há nesse trecho do poema uma assertiva que encerra uma problemática persistente em uma população urbana em crescimento: como aumentar a produção de alimentos de modo eficiente e ambientalmente seguro para alimentar essa crescente população que não planta?

No ano de 1900, no planeta terra, havia 6,7 habitantes rurais para cada habitante urbano. Em 2008, pela primeira vez na história, a população urbana se tornou maioria e estima-se que em 2025 existirão 2 habitantes rurais para cada 3 habitantes urbanos (SATTERTHWAITE; MCGRANAHAN; TACOLI, 2010). A FAO (2009) projetou que, em 2050, 70% da população mundial será cidadina e que para alimentar todas as pessoas do mundo nesse ano será necessário aumentar a produção de alimento em 70%, tendo como base os anos 2005/2007.

No período de 1961 a 2000 houve também um aumento na demanda por alimentos e os avanços científicos e tecnológicos permitiram a produção necessária. Porém, os insumos produzidos para aumentar o rendimento das colheitas acabaram se mostrando prejudiciais ao meio ambiente (COLE *et al.*, 2018). E isso fez com que a comunidade internacional pressionasse para que o aumento da produção dessa vez se desse de forma mais sustentável (HILLOCKS, 2012).

Berners-Lee *et al.* (2018) sustentam que a alimentação futura da população dependerá de quatro pilares: a) produção de alimento em quantidade necessária e com qualidade, b) distribuição eficiente, c) condições socioeconômicas para o acesso aos alimentos e d) consumidores conscientes na escolha de alimentos saudáveis e ambientalmente sustentáveis. O segundo, terceiro e quarto pilares (b, c e d) dependem fundamentalmente da economia e da conscientização política e ambiental, porém o primeiro pilar (a), além desses três fundamentos, depende também da pesquisa e da inovação para que o aumento do rendimento da produção de alimentos não incorra em alto custo à saúde dos seres vivos e ao meio ambiente.

2.2 As pragas e os patógenos

Paradoxalmente, os recursos utilizados para aumentar o rendimento da produção agrícola acabam também criando as condições para que haja perda de rendimento. Isso acontece porque quando se melhora o gerenciamento da água, do solo, da fertilização e outras técnicas de cultivo, para além de criar-se um ambiente propício ao crescimento e desenvolvimento das plantas de interesse, cria-se um meio atrativo para pragas e patógenos (P&Ps) (OERKE, 2006).

É muito antiga a relação dos patógenos e das pragas com as plantas. Há evidências de que esses organismos coevoluíram ao longo do tempo em ciclos alternados: em um ciclo as plantas se adaptavam às P&Ps, desenvolvendo resistência, e em outro ciclo as P&Ps superavam a resistência das plantas, tornando-as suscetíveis a ataques (RAUSHER, 2001).

Em meados do século XIX, na Irlanda, um patógeno denominado *Phytophthora infestans* contribuiu para a morte de mais de 1 milhão de pessoas e para a emigração de outro milhão devido a uma doença fatal causada em plantações de batata. No final desse mesmo século uma praga denominada *Daktulosphaira vitifoliae* destruiu a maioria das vinhas na Europa. Estima-se que ervas daninhas e P&Ps não nativos causem até 248 bilhões de dólares de perdas anuais para a agricultura mundial (FRIED *et al.*, 2017).

P&Ps são um dos principais obstáculos para o aumento do rendimento da produção agrícola. Atualmente, perdas causadas por esses organismos podem ser desde 10,1% para o trigo até 41,1% para o milho (SAVARY *et al.*, 2019). O cenário contemporâneo de aquecimento global está agravando o problema, pois as condições propícias ao surgimento de P&Ps estão se estendendo em direção aos polos a uma taxa de $2,7 \pm 0,8 \text{ km ano}^{-1}$ desde 1960. (BEBBER *et al.*, 2013).

2.3 Controle de pragas e patógenos com agroquímicos

O controle de P&Ps é principalmente realizado pelo uso de pesticidas e devido às causas já citadas (aumento da demanda por alimentos e o favorecimento da proliferação de P&Ps devido a alterações no clima) sua utilização só tende a aumentar. E isso é preocupante, porque nas condições atuais já é relatada a presença de resíduos dessas substâncias na atmosfera, no solo, na água, nos alimentos e até em lugares distantes de onde são aplicadas (MAGGI *et al.*, 2019).

Na atmosfera das regiões agrícolas canadenses foram detectados em níveis elevados os pesticidas: clorotalonil, endosulfan, malathion e carbofuran (YAO *et al.*, 2006). Silva *et al.* (2019) analisaram 317 solos agrícolas da União Europeia e encontraram um ou mais resíduos em 83% dos solos e em 58% acharam misturas residuais de pesticidas. No Programa de Controle Coordenado da União Europeia (EUCP) de 2015, 30 países monitoraram os resíduos de agroquímicos de 84.341 amostras de alimentos, das quais 2,8% excederam o limite recomendado para um ou vários pesticidas (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2017). Tatton e Ruzicka (1967) relataram a existência inclusive de pesticidas organoclorados em ovos de pinguim na Antártica, região onde não se usa agroquímicos.

Em 2011, impulsionados pelo grande consumo de agrotóxicos na América do Sul, Dinamarca, Estônia, Finlândia, Noruega e Suécia desenvolveram um projeto (*Nordic Project*) que visava analisar amostras de frutas e vegetais importados da América do Sul. Foram detectados nesses alimentos 37 pesticidas com frequência maior que 1%. Tiabendazol (usado na pós-colheita de mangas e maçãs), imazalil e procloraz, fungicidas usados em pós-colheita, foram encontrados em frutas e oleráceas (HJORTH *et al.*, 2011).

Em 2013, os produtores brasileiros compraram 902,41 mil toneladas de agroquímicos, 9,6% a mais do que adquiriram em 2012 (SEPULCRI, 2014). Em 2018 foram concedidos 450 registros para comercialização e uso de agrotóxicos no Brasil. Essa foi a maior concessão de registros desde 2005 (BRASIL, 2019; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019) e devido ao ritmo acelerado de registros no primeiro semestre de 2019, a expectativa é de novo recorde (GALVANI, 2019).

2.4 Os malefícios dos agroquímicos

A função dos pesticidas é eliminar P&Ps, porém outros seres vivos podem ser afetados por eles. Os fungicidas tebuconazol, hexaconazol, metalaxil e kitazin são tóxicos para *Klebsiella sp.*, uma rizobactéria promotora de crescimento de plantas isolada da mostarda (AHEMAD; KHAN, 2012). Echeverría-Sáenz *et al.* (2012) demonstraram os efeitos fisiológicos prejudiciais de fungicidas triazóis, como piraclostrobina (usado na pós-colheita de mangas e maçãs) e tiabendazol, em peixes do rio Jiménez (Costa Rica) que se localiza nas proximidades de uma plantação de abacaxi, que é tratada com esses agroquímicos. Aos fungicidas presentes nas águas foram atribuídos os elevados níveis de peroxidação lipídica nos peixes. O tebuconazol é tóxico para *Beauveria bassiana*, um fungo entomopatogênico, que

ajuda a controlar a proliferação de pragas (GONZÁLEZ *et al.*, 2011). No Reino Unido e na Hungria, pesticidas neonicotinóides afetaram populações de abelhas domésticas e silvestres, importantes polinizadores (STOKSTAD, 2017).

Clorpirifós é um pesticida organofosforado, que é neurotóxico para animais e seres humanos. Foram acompanhados por ressonância magnética os efeitos da exposição pré-natal a esse inseticida e foi constatado que ele afeta regiões do cérebro responsáveis pela aprendizagem, memória e comportamentos emocionais (RAUH *et al.*, 2012). Há vários trabalhos mostrando que a exposição pré-natal a baixos níveis de pesticidas está associada a doenças como o autismo e o Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade TDAH (ROBERTS; DAWLEY; REIGART, 2019). Foi verificada uma relação entre o câncer e os óbitos fetais com as atividades do agronegócio nas cidades de Limoeiro do Norte, Quixeré e Russas do estado do Ceará. As taxas de internação por neoplasia e óbitos fetais são estatisticamente crescentes nessas regiões (RIGOTTO *et al.*, 2013).

Outro malefício dos pesticidas é que eles, com o passar do tempo, podem selecionar variedades de P&Ps resistentes, tornando-os mais fortes e ameaçadores (FONES *et al.*, 2020). Um exemplo é o carbendazim. Este fungicida seleciona *Colletotrichum gloeosporioides* portadores de mutação no códon 198, que gera substituição de bases nitrogenadas (adenina por citosina). Esse códon alterado causa a mudança de aminoácidos (ácido glutâmico por alanina) na β -tubulina, uma proteína que em condições normais se liga ao carbendazim e quando alterada não (KONGTRAGOUL *et al.*, 2011). A capacidade de pesticidas selecionarem mutações que são responsáveis por conferir resistência a P&Ps é muito conhecida. Outro bom exemplo é o caso do *Botrytis*, um gênero de fungo com um longo histórico de desenvolver resistência a fungicidas (HAHN, 2014). Porém, Amaradasa e Everhart (2016) observaram em um experimento *in vitro* que fungicidas em doses subletais aumentaram o número de mutações de 1,7 até 60 vezes do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Isso mostra que fungicidas podem tanto selecionar mutações, como também criá-las.

2.5 Produção Integrada de Frutas (PIF)

Dois principais motivos endossam as tendências atuais de procura por novas ferramentas para o controle de P&Ps nesse contexto de crescente demanda por alimentos: a) os problemas que os pesticidas podem causar aos seres humanos, demais seres vivos e ao meio ambiente (ROBERTS; DAWLEY; REIGART, 2019; STOKSTAD, 2017; ECHEVERRÍA-

SÁENZ *et al.* 2012) e b) a capacidade dos pesticidas funcionarem como elemento de pressão do meio capaz de selecionar P&Ps resistentes (FONES *et al.*, 2020; AMARADASA; EVERHART, 2016). Nesse cenário, surge a Produção Integrada de Frutas que integra estratégias de manejo de árvores frutíferas visando à produção de frutas de qualidade com a mínima quantidade de pesticidas, atendendo as exigências do mercado (FARIAS; MARTINS, 2002).

O Manejo Integrado de Pragas (MIP), que demonstrou eficácia pela primeira vez ao diminuir o emprego de pesticidas contra a lagarta da alfafa (SMITH; SMITH, 1949), faz parte das práticas da PIF. Nessa estratégia de cultivo visa-se o controle e não a erradicação de P&Ps (CHANDLER *et al.*, 2011). Sendo assim, a indução de resistência desponta como uma promissora estratégia para ser inserida no MIP e, conseqüentemente, na PIF (KUĆ, 2000; LUCAS, 1999). Nessa estratégia o foco é fortalecer o hospedeiro e não eliminar P&Ps.

No Brasil, a PIF se iniciou em 1996 na cultura das maçãs por meio da Embrapa Uva e Vinho, até mais tarde englobar uma grande quantidade de culturas dentre elas a da manga (FARIAS; MARTINS, 2002). A antracnose é a doença de manga mais importante, porque reduz a produção e a qualidade dos frutos (SANTOS FILHO; MATOS 2003). O Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Maçã (2004) recomenda tratamento pós-colheita com fungicidas somente em frutas com moderada a alta susceptibilidade a podridões, como é o caso da maçã Pink Lady (DI FRANCESCO *et al.*, 2019; GUR; REUVENI; COHEN, 2016; WASHINGTON *et al.*, 1998). A integração de elicitores seguros como aditivos alimentares ao PIF de mangas e maçãs poderia ser uma forma de reduzir ainda mais o uso de fungicidas na pós-colheita.

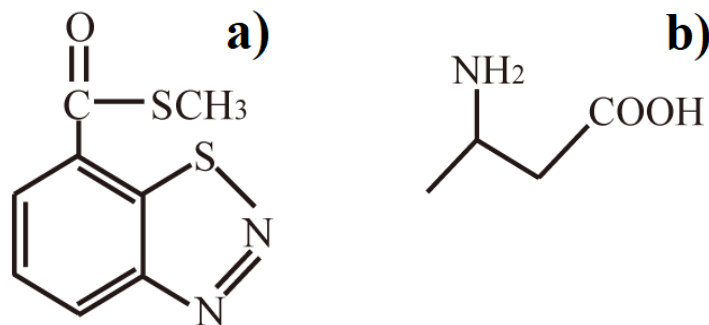
2.5.1 Elicitores

Incentivado pela dúvida da eficiência da pulverização de plantas com fungicidas, por pensar que os fungos internalizados não estavam sendo atingidos, e inspirado pelas imunizações de animais com vacinas, por volta de 1901 Julien Ray propõe a introdução de fungicidas, fungos atenuados e secreções de fungos, por injeção ou rega no interior das plantas para o tratamento e a prevenção (imunização) de doenças (BEAUVÉRIE, 1901; RAY, 1901). Esse foi o registro mais antigo encontrado da origem do que hoje se denominam elicitores, PAMPs ou MAMPs.

Como já mencionado na introdução, elicitores são compostos que, por induzirem resposta de defesa, têm a habilidade de proteger os vegetais contra patógenos (BURKETOVA

et al., 2015; SCHEEL; PARKER, 1990). O benzotiazol (BTH) (Figura 1a) e o ácido β -aminobutírico (BABA) (Figura 1b) são elicitores sintéticos que já induziram resistência em mangas contra antracnose pós-colheita causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (ZHANG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2008). Esses elicitores também foram capazes de induzir resposta de defesa contra queima bacteriana, causada por *Erwinia amylovora*, em macieiras (HASSAN; BUCHENAUER, 2007). Porém, a indução de resistência por BTH e BABA não teve o mesmo sucesso contra o mofo azul da maçã na pós-colheita. Esses elicitores manifestaram atividade fungicida contra o *Penicillium expansum* (QUAGLIA *et al.*, 2011). O BABA, de modo mais eficiente que fungicidas, controlou a podridão-marron causada por *Alternaria alternata* em maçãs pela via da indução de resistência (REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003). Marolleau *et al.* (2017) testaram a indução de resistência do BTH no controle da sarna da maçã nas condições de campo inserindo-o no MIP. O teste foi exitoso, pois foram evitados oito de doze fungicidas normalmente usados no MIP da sarna da maçã. Dentre as cultivares analisadas (Elstar, Fuji, Gala, Golden e Pink Lady), a Elstar e a Pink Lady apresentaram, respectivamente, o melhor e o pior nível de defesa constitutiva.

Figura 1 - Estrutura química do benzotiadiazol (BTH) (a) e do ácido β -aminobutírico (BABA) (b)



Fonte: Sun *et al.* (2015)

2.5.1.1 Polissacarídeos de algas

O registro mais antigo do uso de extrato de algas marinhas para proteção de frutas visando à diminuição de perdas talvez esteja no trabalho de Povolny (1969) (Apud KROK; WIENIARSKA, 2008; MÉRIGOUT, 2006). Soppelsa *et al.* (2018) observaram que extratos de macroalgas (*Ascophyllum nodosum*) e microalgas (*Spirulina spp.*) aumentaram a produção de

compostos fenólicos em maçãs. Esses compostos já foram relacionados com defesa em vegetais (EL MODAFAR *et al.*, 2012).

Entre os vários polissacarídeos de algas marinhas que já foram capazes de reduzir a severidade de diversas doenças das plantas (MANI; NAGARATHNAM, 2018; SALAH *et al.*, 2018; ABOURAÏCHA *et al.*, 2017; MOUSAVI *et al.*, 2017; RAMKISSOON; RAMSUBHAG; JAYARAMAN, 2017; ABOURAÏCHA *et al.*, 2015; FREITAS; STADNIK, 2015), estão as ulvanas e as glucuronanas (Figura 2), que são promissoras para a indução de defesa em tecido vegetal devido à abundância de algas verdes (ABOURAÏCHA *et al.* 2017; STADNIK; FREITAS, 2014).

Montealegre *et al.* (2010) trataram maçãs Fuji pós-colhidas com soluções de ulvana ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) e após 48 h inocularam as frutas com *Botrytis cinerea*. Nas maçãs tratadas em condições laboratoriais a redução da severidade da podridão cinzenta foi de 56%. Esses autores também realizaram tratamentos combinados pré-colheita (com soluções de ulvana 1 mg mL^{-1}) e pós-colheita em condições comerciais, porém não obtiveram sucesso. O mau resultado na pré-colheita foi atribuído à incapacidade do polissacarídeo de aumentar a atividade das enzimas quitinase e peroxidase.

Araujo e Stadnik (2013) trataram macieiras ('Gala' polinizadas por 'Fuji') com soluções de ulvana (10 mg mL^{-1}) e após seis dias inocularam as mudas com *Colletotrichum gloeosporioides*. Eles observaram que a severidade da mancha foliar de *Glomerella* (MFG) reduziu em 66% nas plantas tratadas e associaram o aumento da resistência com o aumento da atividade das enzimas peroxidases. Essas enzimas catalisam as etapas finais da síntese de lignina, compostos que ajudam a fortalecer a parede celular vegetal, inibindo o acesso de patógenos ao interior da célula (ARAÚJO; STADNIK, 2013; STADNIK; BUCHENAUER, 2000).

Abouraïcha *et al.* (2015) aplicaram soluções de ulvana e oligoulvana (5 mg mL^{-1}) em maçãs 'Golden Delicious' pós-colhidas e depois de 12 horas inocularam as frutas com *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*. A ulvana controlou melhor a incidência da doença causada por *Botrytis cinerea*. A oligoulvana suprimiu completamente os sintomas das doenças provocadas pelos dois fungos. Os autores supuseram que a eficácia desse oligossacarídeo estaria relacionada com menor tamanho molecular, menor viscosidade e maior difusibilidade nos tecidos vegetais.

Salah *et al.* (2018) testaram soluções de ulvana, carragenana, alginato e laminarina (2 mg mL^{-1}) em galhos de oliveira, objetivando o controle de doença causada por *Verticillium*

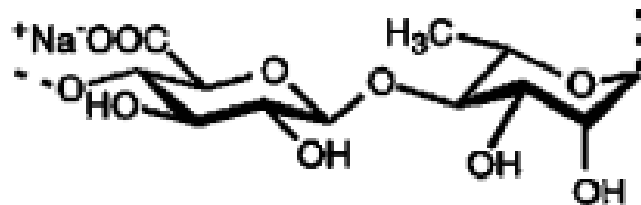
dahliae. A ulvana reduziu a gravidade da doença para 39,9%, e foi o polissacarídeo que provocou maior aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia liase.

El Modafar *et al.* (2012) demonstram que glucuronanas, em menor grau, e os oligoglucuronanas, em maior grau, (na concentração de 3 mg mL⁻¹) forneceram moderada resistência sistêmica adquirida dependente de ácido salicílico em mudas de tomate contra *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*.

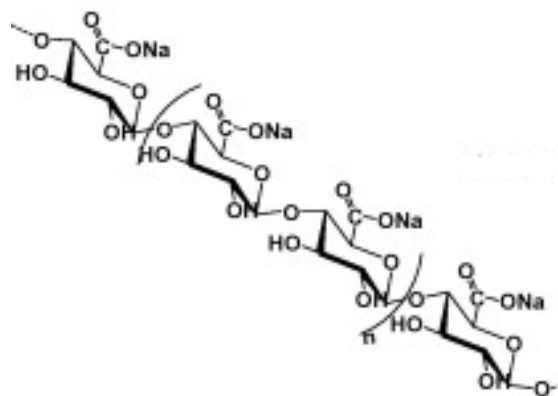
Abouraicha *et al.* (2017) aplicaram glucuronanas e oligoglucuronanas (5 mg mL⁻¹) em maçãs, e observaram que ambos foram eficazes no controle de doenças causadas por *Penicillium expansum* e *Botrytis cinérea*. Esses polissacarídeos aumentaram a atividade de enzimas de defesa, como a fenilalanina amônia liase, peroxidase e polifenoloxidasas.

As ulvanas são basicamente compostas de ramnose (16,8–45,0%), grupos sulfato (16,0–23,2%), ácidos urônicos (6,5–19%), xilose (2,1–12,0%), ácido idurônico (1,1–9,1%) e glicose (0,5 ± 6,4%) (STADNIK; FREITAS, 2014). De acordo com El Modafar *et al.* (2012) a capacidade das ulvanas de induzir a defesa da planta pode estar relacionada à presença de grupos ramnose e sulfato. Como as glucuronanas são compostas principalmente por resíduos de ácidos glucurônicos, esses resíduos podem estar relacionados à atividade indutora de defesa.

Figura 2 - Estrutura química básica das ulvanas (acima) e das glucuronanas (abaixo)



Fonte: Lahaye & Robic, 2007



Fonte: Redouan *et al.* (2009)

2.5.1.2 O papel dos resíduos de monossacarídeos e de grupos sulfato na defesa vegetal

Como os resíduos dos monossacarídeos ramnose e ácido urônico e dos grupos sulfato presentes nos polissacarídeos de algas verdes parecem ter um papel importante na indução de resistência em plantas, procurou-se na literatura elementos que reforcem essa hipótese.

2.5.1.2.1 Resíduos de ramnose

Os resíduos de ramnose parecem estar relacionados com atividade de defesa dos polissacarídeos, pois são um dos principais constituintes dos lipopolissacarídeos (EL MODAFAR *et al.*, 2012), biomoléculas que ocupam aproximadamente 75% da superfície da membrana plasmática de bactérias gram-negativas e são o primeiro setor de contato da bactéria com o meio exterior (CLIFFORD; RAPICAVOLI; ROPER, 2013).

Mitra *et al.* (2016) avaliaram o efeito da retirada dos resíduos de ramnose da estrutura de lipopolissacarídeos de bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium sp*) que estabelecem simbiose com a planta de arroz. Notaram que o biopolímero modificado reduziu a capacidade da bactéria mutante de colonizar o arroz e proporcionar seu crescimento.

Clifford, Rapicavoli e Roper (2013) de maneira semelhante à Mitra *et al.* (2016) produziram um mutante de *Xylella fastidiosa* com lipopolissacarídeos pobres em ramnose. *X. fastidiosa*, que em condições normais causa uma doença letal e grandes perdas econômicas em videiras, tem a capacidade de colonizar essa planta prejudicada, talvez devido a perda da habilidade de fixação à célula hospedeira.

Esses trabalhos mostram que as bactérias, seja para uma interação simbiótica, ou seja para uma interação parasítica, necessitam de uma grande quantidade de resíduos de ramnose nos lipopolissacarídeos da sua membrana plasmática. Assim, os resíduos de ramnose podem ser importantes na estrutura de moléculas elicitoras, por estarem na composição de moléculas da membrana plasmática de patógenos, podendo desempenhar a função de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e permitirem a fixação às proteínas Receptoras de Reconhecimento de Padrões (PRRs) das membranas de células vegetais.

2.5.1.2.2 Resíduos de ácidos urônicos

As células vegetais monitoram a integridade da sua parede. Quando a mesma é rompida pela ação de patógenos (ou também por danos físicos), as moléculas que se desprendem podem desempenhar a função de MAMPs (DAMPs) e induzir resposta de defesa (HÉMATY; CHERK; SOMERVILLE, 2009). A pectina é um dos principais componentes estruturais de paredes celulares, e fragmentos dela possuem oligogalacturonídeos, moléculas que já foram capazes de induzir resistência em folhas de videira contra *Botrytis cinerea* (AZIZ *et al.*, 2007).

Como ácidos galacturônicos, unidades básicas da pectina, representam aproximadamente 73% da composição monossacarídica da parede celular de maçãs (MASSIOT; BARON; DRILLEAU, 1994), esses resíduos podem exercer papéis importantes na elicitação dessas frutas, pois podem sinalizar um dano virtual nas células. Os trabalhos de Abouraïcha *et al.* (2017), Caillot *et al.* (2012) e El Modafar *et al.* (2012), expandem essa ideia, pois demonstram que glucuronanas e oligoglucuronanas, que são compostas por outro tipo de ácido urônico (ácido glucurônico), induziram a produção de compostos de defesa em videira, tomates e maçãs, respectivamente.

Resíduos de ácido galacturônico, combinados com resíduos de ramnose (abordados na subseção anterior), formam cadeias de ramnogalacturonanas que estão presentes na estrutura da cadeia da pectina de maçã (WU; MORT, 2014). Essas cadeias já foram relacionadas com o aumento da atividade de enzimas de defesa (-1,3-glucanase, quitinase e peroxidase) em tomate (JIMÉNEZ-MALDONADO *et al.*, 2018).

2.5.1.2.3 Grupos sulfato

Muitos autores, talvez baseados nos vários relatos acerca da relação entre grupos sulfato e atividade biológica (PIRES *et al.*, 2013; CRESTANI *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2001), correlacionaram de modo direto a atividade elicitora de polissacarídeos a esses grupos (ABOURAÏCHA *et al.*, 2015; SANGHA *et al.*, 2010; MÉNARD *et al.*, 2004; MERCIER *et al.*, 2001). Porém há na literatura motivos para a elaboração de outras hipóteses.

Wang *et al.* (2015) examinaram o efeito da variação do grau de sulfatação na atividade elicitora de lentinana, um polissacarídeo isolado do cogumelo shiitake, contra o vírus do mozaico do tabaco e notaram que quanto maior a quantidade de grupos sulfato maior a

produção de compostos de defesa. Ménard *et al.* (2005), analisaram o efeito da laminarina, um polissacarídeo extraído de algas pardas, não sulfatada e sulfatada como elicitores contra esse mesmo vírus e notaram que os mesmos não manifestaram efeitos de defesa e resistência sistêmica. Porém, produziram burst oxidativo em suspensão de células de tabaco e aumento da expressão de genes que codificam O-metiltransferases da via fenilpropanoide em plantas de tabaco. A laminarina sulfatada reduziu o número e tamanho da lesão, já a laminarina não sulfatada afeta apenas o número de lesões. Esses polissacarídeos, quando sulfatados foram capazes de aumentar a produção de compostos de defesa em videira (CHALAL *et al.*, 2015; GAUTHIER *et al.*, 2014; TROUVELOT *et al.*, 2008). El modafar *et al.* (2012) reforçaram a ideia da relação direta quando retiraram os grupos sulfatos da ulvana e observaram que esse polissacarídeo perdeu a capacidade de proteger tomateiros.

Contudo, Freitas *et al.* (2015) demonstraram que ulvanas com diferentes porcentagens de grupos sulfato (20,9 a 36,6%) apresentaram semelhantes reduções na severidade de doença causada por *Colletotrichum higginsianum* em *Arabidopsis thaliana*, uma planta da mesma família da mostarda, indicando que o aumento do grau de sulfatação nem sempre se traduz em aumento da eficácia da defesa.

2.6 Polissacarídeos de exsudado de plantas

Uma vasta variedade de plantas vasculares é capaz de exsudar diversos tipos de substâncias. O que distingue essas substâncias, dentre outros fatores, é a composição química. Os óleos são compostos por ácidos graxos e glicerol. As ceras, por ésteres alcoólicos de ácidos graxos. O látex, por terpenoides, proteínas, carboidratos e compostos fenólicos. O kino, por compostos polifenólicos. A mucilagem, por polissacarídeos neutros ou ácidos. As resinas, por terpenoides e/ou compostos fenólicos. As resinas de gomas, por uma mistura de polissacarídeos e terpenoides e/ou compostos fenólicos. E as gomas, que são formadas por polissacarídeos complexos (ROBERTS *et al.*, 2020).

A produção de gomas visa à oclusão de vasos condutores e é um fenômeno natural em plantas que ocorre, secundariamente, devido ao envelhecimento (formação de cerne), ao estresse, ao ferimento e ao ataque de microrganismos ou organismos decompositores de madeira. A oclusão dos vasos limita os danos causados pelo corte ou pelos patógenos e pragas a um local específico. Os estudos indicam que a embolia, obstrução dos vasos por bolhas de gases que se desprendem da água, é a causa primária da oclusão dos vasos por goma, assim as causas supracitadas estão vinculadas a processos de embolia (DE MICCO *et al.*, 2016).

As gomas de exudatos possuem diversas aplicações. Castellani *et al.* (2010) demonstraram que as gomas de *Acacia senegal*, *Acacia seyal* (ambas conhecidas como goma arábica) e *Anogeissus latifolia* (goma ghatti) podem atuar como agente emulsificante. Karimi e Mohammadifar (2014) concluíram que a goma de *Astragalus gossypinus* (goma tragacanto) possui propriedade de estabilizante e de emulsificante. A goma de *Prunus amygdalus* (goma de amendoeira) possui propriedade antioxidante e antimicrobiana (contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*), podendo ser usada no aprimoramento das propriedades biológicas e funcionais de muitas formulações de alimentos (BOUAZIZ *et al.*, 2014). Moura Neto *et al.* (2011) sugeriram o uso da goma de *Anacardium occidentale* (goma de cajueiro) modificada para a síntese de nanopartículas. Essa goma já foi utilizada para encapsular óleos essenciais com atividade larvicida (OLIVEIRA; PAULA; DE PAULA, 2014), como fonte de carbono para o crescimento de bactérias e fungos (TORQUATO *et al.*, 2004) e como aglutinante para a produção de comprimidos (OFORI-KWAKYE; ASANTEWAA; KIPO, 2010). A goma de *Spondias purpurea* (goma de Ciriguela) modificada pode ser utilizada no isolamento de lectinas específicas (TEIXEIRA *et al.*, 2007). A goma de *Anadenanthera colubrina*, aumentou a presença de macrófagos (células imunológicas de animais) ativados *in vitro* e em camundongos (MORETÃO *et al.*, 2003). Mate e Mishra (2020) relataram que goma de *Lannea coromandelica* (goma Moi) pode ser utilizada como absorvente, espessante, floculante, gelificante, emulsificante, substituinte de gordura e na formulação de comprimidos, na liberação controlada de fármacos, pesticidas e fertilizantes, na síntese de hidrogéis e no aumento do tempo de prateleira de frutas e legumes. O prolongamento do tempo de prateleira foi conseguido pelo revestimento das frutas com essa goma de modo semelhante ao que se faz com parafina. O aumento do tempo de prateleira foi atribuído pelos autores ao atraso do amadurecimento e redução da taxa de respiração. Já foi relatado que tomates revestidos com goma arábica são menos afetados por doenças (ALI *et al.*, 2010).

A composição monossacarídica residual das gomas extraídas do exsudato de plantas, em geral, é variada. Porém, dentre as fontes de gomas pesquisadas neste trabalho, todas apresentaram, em maior ou menor grau, resíduos de ácidos D-urônicos (D-AUro) e a maioria apresentou resíduos de L-ramnose (L-Ram), ambos relacionados com a defesa vegetal. Outros resíduos frequentes são os de L-arabinose (L-Ara) e D-galactose (D-Gal). Os demais resíduos que apareceram nas gomas foram D-manose (D-Man), D-glicose (D-Gli), D-xilose (D-Xil) e L-fucose (L-Fuc) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição monossacarídica residual de gomas de exsudato de plantas

Goma de	L-Ara	L-Ram	D-Man	D-Gal	D-Auro	D-Gli	D-Xil	L-Fuc	Referência
<i>C. speciosa</i>	6,7	13,3	6,7	53,3	20,0	---	---	---	Fabio <i>et al.</i> (1982)
<i>A. latifolia</i>	71,3	2,2	---	16,0	2,0	8,4	---	---	Deshmukh <i>et al.</i> (2012)
<i>A. colubrina</i>	63	6	1	20	10	---	--	---	Delgobo <i>et al.</i> (1998)
<i>P. amygdalus</i>	26	1	10	45	11	---	7	---	Bouaziz <i>et al.</i> (2014)
<i>P. pérsica</i>	36	---	2	42	13	---	7	---	Simas-Tosin <i>et al.</i> (2009)
<i>L. coromandelica</i>	11	2,5	---	69,5	17	---	---	---	Mate e Mishra (2020)
<i>A. gossypinus</i>	7,4	1,2	---	3,3	33,3	0,4	30,4	23,9	Karimi <i>et al.</i> (2014)
<i>A. scoparia Spach</i>	42,5	2,3	---	38,1	6	---	11,0	---	Molaei e Jahanbin (2018)
<i>S. phalerata</i>	34	---	---	---	7	---	54	5	Simas <i>et al.</i> (2004)
<i>C. praecox</i>	16	---	---	---	25	---	59	---	Pinto <i>et al.</i> (1994)
<i>M. sinclairii</i>	58	7	---	23	12	---	---	---	Sims e Furneaux (2003)
<i>S. purpúrea</i>	31,2	2,5	---	43,3	17,0	1,3	1,3	3,6	Teixeira <i>et al.</i> (2007)
<i>C. gossypium</i>	0,5	19,6	---	16,5	63,3	---	---	---	Janaki e Sashidhar (1998)
<i>A. occidentale</i>	4,8	3,6	---	72,5	5,5	12,5	---	---	Moura Neto <i>et al.</i> (2011)

<i>A. Senegal</i>	29,8	12,8	---	38,5	18,9	---	---	---	Apolinar <i>et al.</i> (2019)
<i>A. seyal</i>	45	4	---	38	13	---	---	---	Anderson <i>et al.</i> (1968)
<i>S. urens</i>	---	31	---	38	31	---	---	---	Anderson <i>et al.</i> (1982)
<i>S. striata</i>	---	28,8	---	23,4	42,2	---	5,6	---	Brito <i>et al.</i> (2004)

Três gomas se destacam por possuírem as maiores quantidades de resíduos de monossacarídeos envolvidos na defesa vegetal: as gomas de *Cochlospermum gossypium*, de *Sterculia urens* e de *Sterculia striata*. Esta última é conhecida como goma do chichá.

2.6.1 A goma do chichá

A árvore *Sterculia striata* (Figura 3) é vulgarmente chamada no Brasil de chichá, amendoim-da-mata e castanha-de-macaco (SILVA; FERNANDES, 2011). Pode ser classificada como micotrófica, ou seja, capaz de estabelecer vínculos mutualísticos com fungos (LACERDA *et al.*, 2011). Do exsudato dessa planta é possível extrair uma goma carregada denominada goma do chichá (BRITO *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2004).

Devido ao alto teor de ácidos urônicos, a goma do chichá já foi utilizada na síntese de nanocompósitos eletroativos para detecção de dopamina (ZAMPA *et al.*, 2007). Por causa da sua compressibilidade e fluidez essa goma pode ser usada na síntese de comprimidos (FERREIRA *et al.*, 2019). Magalhães *et al.* (2016) e Dario *et al.* (2010) sugeriram seu uso, respectivamente, para liberação controlada de cloroquina e para adsorção de lisozima em pastilhas de silício. Recentemente foi demonstrado que a goma do chichá esterificada possui efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas (SILVA *et al.*, 2021).

Figura 3 - Árvore *Sterculia striata*



Fonte: <https://www.capes.gov.br/36-noticias/10364-fruto-do-chicha-como-um-potencial-alimento-funcional>

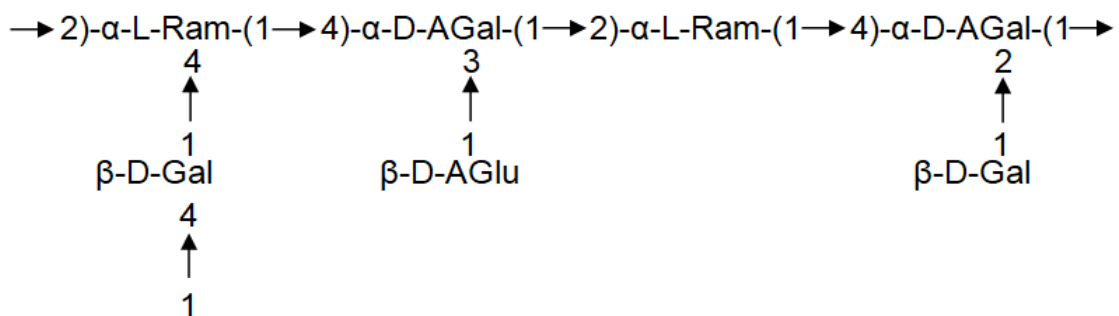
A composição da goma isolada do exsudato do chichá é a que segue: galactose (19,3–23,4%), ramnose (23,1–28,8%), ácidos urônicos (42,2–49,2%), xilose (5,6–7,7%) e grupos acetil (9,6–10,7%). Essa goma possui grandes quantidades (65,3-78%) de dois dos três resíduos que foram relacionadas à elicitação vegetal: ramnose e ácido urônico (BRITO *et al*, 2005; BRITO; SILVA; PAULA; FEITOSA, 2004) e poderia passar a conter os grupos sulfatos se fosse submetida a uma reação de sulfatação.

Le Cerf, Irinei e Muller (1990) já demonstraram que a goma karaya, um polissacarídeo semelhante à goma do chichá, depois de sofrer um processo de desacetilação, muda de uma conformação muito compacta para uma conformação mais expandida em solução aquosa. Brito *et al.* (2005) e Silva *et al.* (2003) observaram que a desacetilação tende a enfraquecer as interações entre as cadeias da goma.

Se a reação de desacetilação expande a macromolécula e enfraquece as interações intermoleculares, tem-se uma maior exposição dos resíduos de interesse (ramnose e ácidos urônicos) localizados em grande quantidade na cadeia principal da goma (ASPINALL; KHONDO; WILLIAMS, 1987) (Figura 4). Outra vantagem da desacetilação é a aproximação da composição da goma do chichá com a composição das ulvanas, pois retira um resíduo não comum.

Abouraïcha *et al.* (2017) e Abouraïcha *et al.* (2015) demonstraram que a capacidade das ulvanas e das glucuronanas de induzirem resistência em vegetais aumenta após a diminuição da cadeia molecular. Por isso a reação de hidrólise pode também trazer vantagens.

Figura 4 - Estrutura química básica da goma karaya, que é semelhante à da goma do chichá



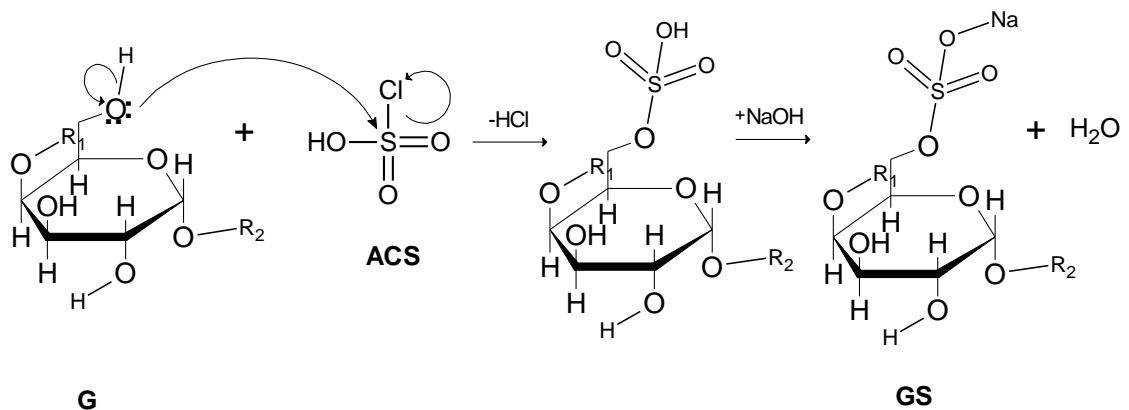
Adaptada de Aspinall, Khondo e Williams (1987)

2.7 Sulfatação, desacetilação e hidrólise de gomas

A modificação química de polissacarídeos pode ser útil para melhorar certas propriedades originais ou para criar novas. A sulfatação, desacetilação e a hidrólise são derivatizações comuns (ABOURAÏCHA *et al.*, 2017; HUANGA; CHENA; HUANG, 2016; BRITO *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2004).

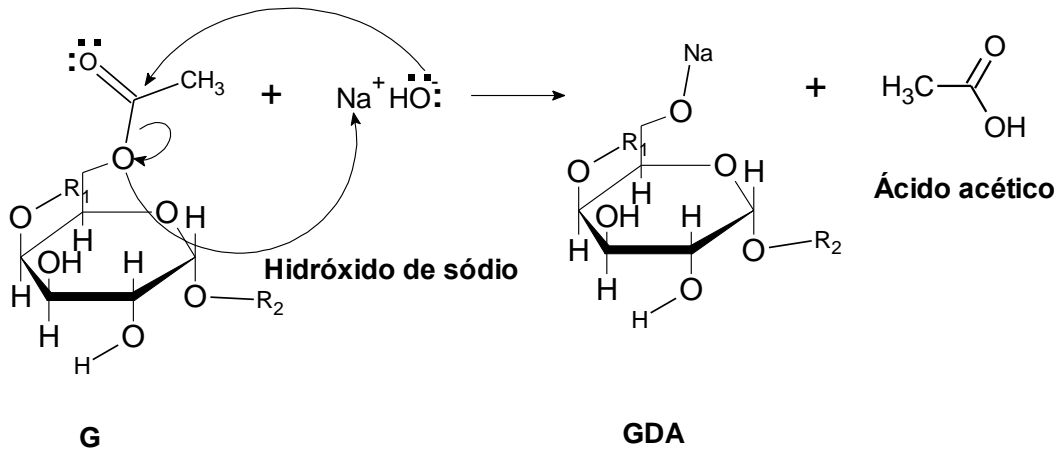
Um esquema simplificado da reação de sulfatação de um polissacarídeo pode ser observado na Figura 5. A sulfatação é uma reação eletrofílica na qual o eletrófilo é o agente sulfatante. No esquema abaixo nota-se que um par de elétrons da hidroxila do polissacarídeo ataca o enxofre do ACS para, após o hidrogênio abandonar a hidroxila (deixando os elétrons da ligação no oxigênio) e se unir ao cloro do ACS para formar ácido clorídrico, produzir a forma ácida do derivado sulfatado. Para obtenção do polissacarídeo na forma de sal de sódio utiliza-se o hidróxido de sódio.

Figura 5 - Esquema simplificado da reação de sulfatação de uma goma



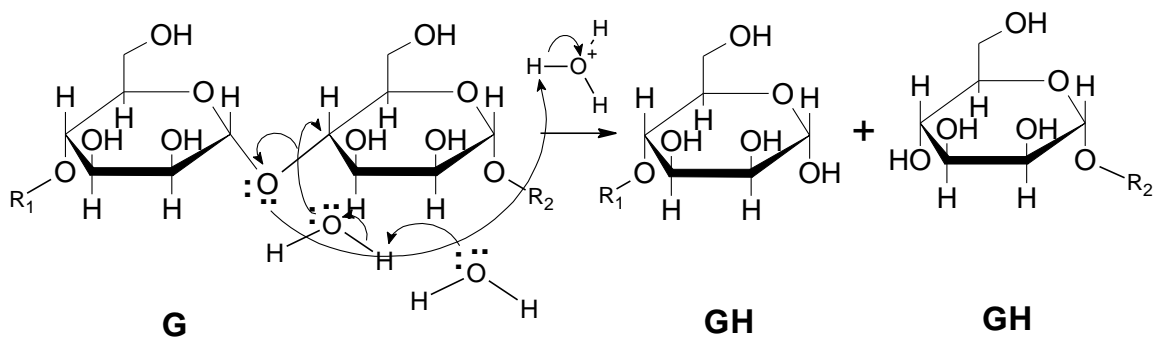
Um esquema simplificado que ilustra a reação de desacetilação de uma goma pode ser observado na Figura 6. Nele pode-se observar que a saída do grupo acetil se inicia com um ataque dos elétrons do íon hidróxido ao carbono da carbonila do grupo acetil. Esse grupo abandona o polissacarídeo na forma de ácido acético e carga negativa do íon alcóxido que resta no polissacarídeo é estabilizada pela carga positiva do contra-íon sódio.

Figura 6 - Esquema simplificado da reação de desacetilação de uma goma



Na reação de hidrólise ácida de polissacarídeos ocorre o rompimento de ligações entre os monossacarídeos por meio do ataque de um par de elétrons do oxigênio da ligação glicosídica ao íon de hidrogênio da solução ácida. A carga positiva que se forma no oxigênio atrai o par de elétrons de uma das ligações simples que o oxigênio forma com carbono, e ao mesmo tempo torna a carga parcial desse carbono positiva, tornando-o suscetível ao ataque dos elétrons do oxigênio das moléculas de água do meio, que perdem um íon hidrogênio, devolvendo-o ao meio onde se processa a catálise ácida (Figura 7).

Figura 7 - Esquema simplificado da reação de hidrólise de uma goma



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de polissacarídeos induzirem resistência na pós-colheita em mangas e maçãs.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e sulfatar polissacarídeos de *Anacardium occidentale*, *Sterculia striata*, *Dimorphandra gardneriana* e *Caesalpinia pulcherrima*.
- Produzir derivados desacetilados, hidrolizados e sulfatados do polissacarídeo de *Sterculia striata*;
- Caracterizar os polissacarídeos e seus derivados;
- Na etapa preliminar:
 - Avaliar o efeito dos polissacarídeos na indução de resistência contra *Colletotrichum* em mangas e/ou medir a atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) em mangas tratadas com esses polissacarídeos;
 - Mensurar o efeito da goma do chichá desacetilada e sulfatada na indução de resistência contra *Penicillium* em maçãs.
- Avaliar a atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) e a severidade da antracnose em mangas tratadas com a goma do chichá e seus derivados.
- Avaliar as atividades de enzimas de defesa e o conteúdo de lignina em maçãs tratadas com a goma do chichá desacetilada e sulfatada.

4 HIPÓTESES

É necessário analisar a capacidade de vários polissacarídeos agirem como indutores de resistência vegetal? O futuro da agricultura depende da resistência das plantas a doenças, seja conseguida por meio da engenharia genética ou por meio da indução de resistência por elicitores.

A cadeia principal da goma do chichá, que é composta por resíduos de ácidos urônicos e ramnose alternados, e está presente também na pectina da parede celular de mangas e maçãs e na estrutura da goma ulvana, tem a habilidade de aumentar a atividade de enzimas relacionadas com a defesa em mangas e maçãs.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Testes preliminares em mangas

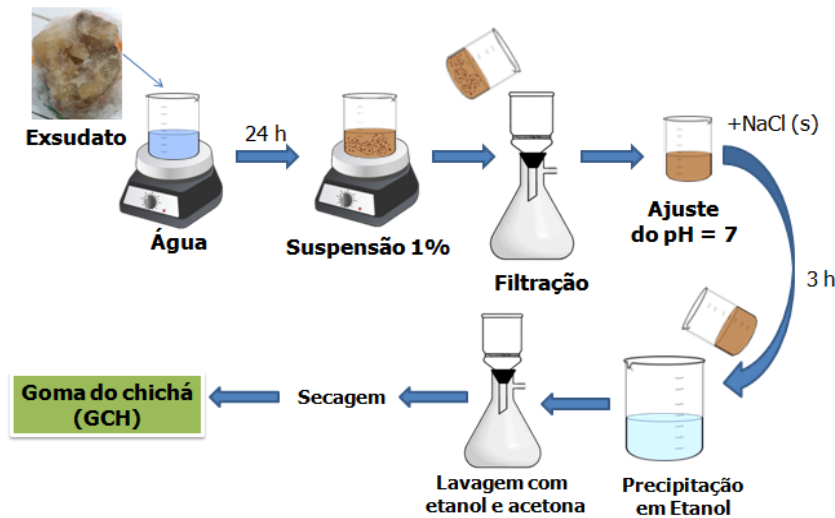
5.1.1 Materiais

Os exudatos de cajueiro e de chichá foram coletados em árvores localizadas em Fortaleza (Ceará-Brasil). As sementes de Fava danta e de *Caesalpinia pulcherrima* foram colhidas no Crato e em Russas (Ceará-Brasil), respectivamente. A celulose bacteriana foi produzida no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Agroindústria Tropical. O benzotiazol (BTH, Bion®) 50% p/p, hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, N, N-dimetilformamida (DMF) e ácido clorossulfônico (CSA) foram obtidos da Vetec, Brasil. O cloreto de sódio, ácido clorídrico e etanol foram adquiridos na Synth, São Paulo, Brasil.

5.1.2 Isolamento e sulfatação dos polissacarídeos

Os procedimentos de isolamento das gomas de exsudatos foram semelhantes. Na Figura 8 pode-se observar o fluxograma da extração da goma do chichá. Os exsudatos da *Sterculia striata* e do cajueiro foram dissolvidos em água destilada a 1 e 5%, respectivamente, à temperatura ambiente. As misturas foram filtradas em funil de placa sinterizada (G2) e o pH foi ajustado para 7,0 com adição de solução de hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$). Adicionou-se cloreto de sódio (o equivalente à metade da massa do exsudato utilizado) e após 3 h sob agitação precipitou-se a goma em 2 volumes de etanol (96 °GL). Filtrou-se a mistura em funil de placa sinterizada (G3). A goma retida no filtro foi lavada três vezes com etanol e posta no dessecador sob vácuo para secagem na temperatura ambiente, obtendo-se assim a goma do chichá e a goma do cajueiro (adaptado de MOURA NETO *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2004).

Figura 8 - Fluxograma da extração da goma do chichá

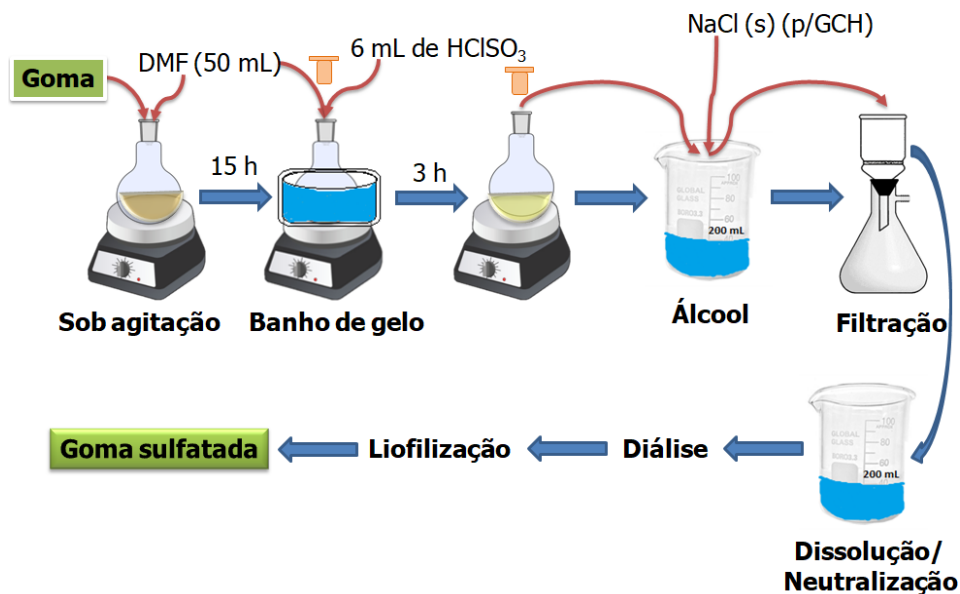


As sementes de Fava Danta e *Caesalpinia pulcherrima* (50 g) foram lavadas com detergente neutro para remoção dos compostos hidrofóbicos, colocadas em placa de Petri forrada com algodão umedecido em água destilada e sobreposta com outra camada de algodão umedecido. A placa foi colocada em autoclave por 30 minutos sob pressão de 1,0 a 1,5 kgf / cm² e temperatura entre 110 e 120 °C para o intumescimento das sementes que, após atingirem a temperatura ambiente, tiveram suas partes (tegumento, endosperma e cotilédone) separadas manualmente. O endosperma foi moído em água destilada, a mistura foi centrifugada a 6000 rpm por 30 minutos a 25°C e o sobrenadante foi coletado e precipitado em dois volumes de etanol. O precipitado foi retido sob vácuo em um funil de placa sinterizada n.º 3, lavado quatro vezes com álcool e duas vezes com acetona e seco em um dessecador a vácuo. Assim obtiveram-se as galactomananas de Fava Danta e *Caesalpinia pulcherrima* (Adaptado de MAZZINI; CEREZO, 1979).

Todas as gomas foram sulfatadas praticamente da mesma forma (Figura 9). Colocou-se 1,00 g do polissacarídeo em um balão de 250 mL. Foram adicionados aos poucos 50 mL de N, N- dimetilformamida (DMF) e o sistema foi deixado sob agitação por 15 horas. Mais 50 mL de DMF foram adicionados e o sistema foi colocado em banho de gelo. Adicionou-se, paulatinamente, de 2 em 2 mL, 6 mL de ácido clorossulfônico (ACS). A reação se processou por 3 horas à temperatura ambiente. A mistura foi adicionada em dois volumes de etanol. Somente no caso da goma do chichá foi colocado 0,5 g de cloreto de sódio. A goma precipitada foi retida em funil de placa sinterizada (G 3), lavada duas vezes com etanol e dissolvida em 200 mL de água destilada. O pH foi elevado para 7,0 com hidróxido de sódio (1,0 mol.L⁻¹) e a

mistura foi dialisada contra água destilada. Quando a condutividade da água de diálise foi equivalente ao da água destilada, o conteúdo da membrana foi liofilizado, obtendo-se o polissacarídeo sulfatado (adaptado de PIRES *et al.*, 2013).

Figura 9 - Fluxograma da sulfatação dos polissacarídeos



5.1.3 Caracterização dos polissacarídeos

5.1.3.1 Microanálise elementar (ME)

A porcentagem de carbono (% C) e enxofre (% S) contida nos derivados sulfatados, necessária para o cálculo do grau de sulfatação, foi medida em um microanalisador PerkinElmer 2400 Série II CHNS / O Analyzer.

5.1.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR para as gomas, seus derivados sulfatados e para GCH desacetilada foram obtidos por meio de pastilhas de KBr em equipamento IRTracer 100 (Shimadzu), com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} .

5.1.4 Severidade da antracnose e atividade da fenilalanina amonialiase

A severidade da antracnose foi mensurada por meio do diâmetro da lesão em cada fruto. (LIMA *et al.*, 2021). A análise estatística foi realizada por meio do programa Sisvar, usando-se a técnica de análise de variância Anava e o teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

A atividade da fenilalanina amonialiase (PAL) foi obtida a partir das polpas das mangas. Com o auxílio de uma sonda de aço inoxidável retirou-se parte da polpa e separou-se aproximadamente 2,0 g do mesocarpo. As amostras obtidas foram congeladas e armazenadas a -80 °C até serem utilizadas para produção do extrato. A atividade da PAL foi mensurada baseando-se no método descrito por El-Shora (2002) e Mori, Sakurai e Sakuta (2001). A PAL catalisa a desaminação não oxidativa da fenilalanina, gerando ácido transcinâmico (ATC). A técnica consiste em detectar a quantidade de ATC formada por espectroscopia no UV. A absorbância em 290 nm foi convertida em concentração de ATC por meio da curva de calibração. Para conseguir-se a curva padrão de ATC colocou-se, sob 30 °C de temperatura, em tubos de ensaio de 0 a 2250 µL (em alíquotas de 250 µL) da solução de ATC (1 mmol.L⁻¹) diluído 15 vezes, de 0 a 2250 µL da solução de tampão tris-HCl (100 mmol.L⁻¹, pH 8,4) e 250 µL de ácido clorídrico (6 mol.L⁻¹). O branco foi obtido em 290 nm, com a solução contendo todos os reagentes, exceto o ATC, utilizando-se cubeta de quartzo. Pesou-se aproximadamente 2,0 g do tecido da polpa da manga que foi homogeneizado com 8 mL da solução tampão de extração (pH 8) (2,45g de tris-hidroximetilaminometano (Tris), 0,037 g de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 0,5 g de polivinilpirrolidona (PVP) para 100 mL) em banho de gelo. A determinação da atividade enzimática foi feita em triplicata adicionando-se na cubeta em sequência: 50 µL de β-mercaptoetanol (50 mmol.L⁻¹), 250 µL do extrato, 1450 µL de tampão tris-HCl (100 mmol.L⁻¹, pH 8,4), 200 µL de solução de L-fenilalanina e incubando-a a 30 °C por 1 h. Uma alíquota de 250 µL de HCl 6 mol/L foi adicionada para finalizar a reação. No controle em branco para cada amostra, colocou-se a solução de L-fenilalanina somente após a interrupção da reação com HCl 6 mol.L⁻¹. Todos os tubos foram centrifugados a 10 000 x g/10 min e a absorbância lida.

5.1.5 Atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada acompanhando-se o crescimento do disco de micélio do *Colletotrichum siamense* em um meio de cultura feito com os polissacarídeos nas concentrações 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg mL⁻¹ (VIEIRA *et al.*, 2018).

5.2 Testes preliminares em maçãs

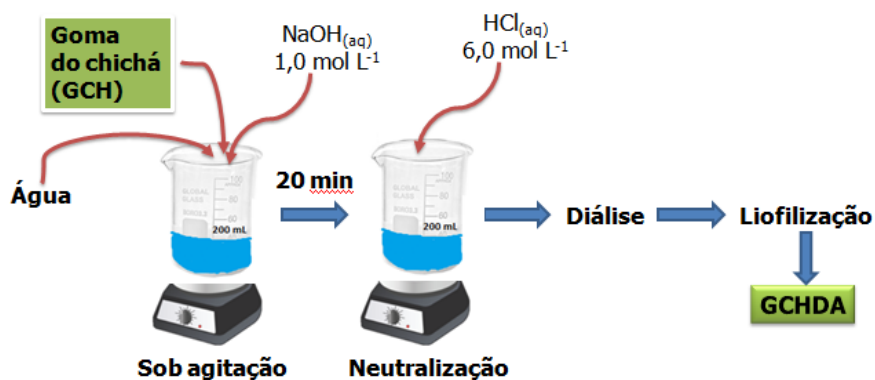
5.2.1 Materiais

A goma do chichá desacetilada e sulfatada advém de exudato com origem esclarecida em ‘5.1.1. Materiais’ da subseção 5.1. (**Testes preliminares em mangas**).

5.2.2 Isolamento, sulfatação e desacetilação dos polissacarídeos

O isolamento e a sulfatação da goma do chichá constam em ‘5.1.2. Isolamento e sulfatação dos polissacarídeos’ da subseção 5.1. (**Testes preliminares em mangas**). A desacetilação foi realizada como segue: foi preparada uma mistura de goma chichá com água (200 mL, 1% m/v). Um volume de 200 mL de uma solução de hidróxido de sódio (1,0 mol L⁻¹) foi adicionado com o sistema sob agitação e, 20 minutos depois, a mistura foi neutralizada com ácido clorídrico (6,0 mol L⁻¹) e dialisada por 4 dias acompanhando-se a condutividade da água. O conteúdo final da membrana foi liofilizado para produzir a goma de chichá desacetilada (GCHDA) (Figura 10) (BRITO *et al.*, 2005).

Figura 10 - Fluxograma da desacetilação da goma do chichá



5.2.3 Caracterização dos polissacarídeos

5.2.3.1 Microanálise elementar (ME)

Descrita na subseção ‘5.1.3. Caracterização dos polissacarídeos’.

5.2.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Descrita na subseção ‘5.1.3. Caracterização dos polissacarídeos’.

5.2.4 Severidade de doença causada por *Penicilium*

A severidade da doença causada pelo fungo *Penicilium* em maçãs foi medida da mesma forma que se mediu a severidade da antracnose em mangas. O método consta em ‘5.1.4. Severidade da antracnose e atividade da fenilalanina amonialiase’.

5.3 Testes em mangas

5.3.1 Materiais

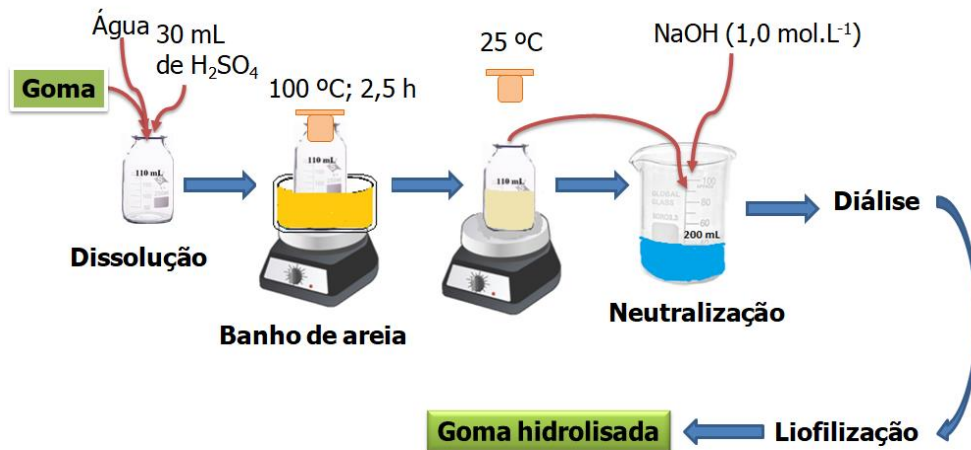
Goma do chichá (GCH), Goma do chichá desacetilada (GCHDA), hidrolisada (GCHH) e sulfatada (GCHS); Goma do chichá desacetilada hidrolisada (GCHDAH) e sulfatada (GCHDAS); Goma do chichá hidrolisada sulfatada (GCHHS). A goma do chichá advém de exudato com origem esclarecida em ‘5.1.1. Materiais’ da subseção 5.1. (**Testes preliminares em mangas**).

5.3.2 Isolamento e modificações dos polissacarídeos

Os métodos de isolamento e sulfatação são fornecidos em ‘5.1.2. Isolamento e sulfatação dos polissacarídeos’. A desacetilação é descrita em ‘5.2.2. Isolamento, sulfatação e desacetilação dos polissacarídeos’. O método de hidrólise é o que segue. Dissolveu-se 2,0 gramas da GCH em uma quantidade mínima de água destilada em um frasco vidro de 110 mL. Foram adicionados 30 mL de uma solução de ácido sulfúrico ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) e o frasco colocado em banho de areia a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$). Após 2,5 horas o frasco foi retirado do banho de areia, esperou-se o resfriamento e neutralizou-se a mistura com hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Dialisou-se o conteúdo contra água destilada. A goma hidrolisada (GCHH) foi obtida por liofilização (Figura 11) (adaptado de BRITO *et al.*, 2005).

Figura 11 - Fluxograma da hidrólise da goma do chichá e derivados



5.3.3 Caracterização dos polissacarídeos

5.3.3.1 Microanálise elementar (ME)

Descrita na subsecção ‘5.1.3. Caracterização dos polissacarídeos’.

5.3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Descrita na subsecção ‘5.1.3. Caracterização dos polissacarídeos’.

5.3.3.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Os polissacarídeos foram dissolvidos em NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (0,1% m/v) com o auxílio de um banho-maria (70 °C) e sob agitação por 12 horas. As soluções foram filtradas em membrana de celulose $0,45 \mu\text{m}$ da MILIPORE. As amostras, dissolvidas na solução de NaNO_3 ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foram injetadas em equipamento SHIMADZU, que consiste em uma bomba (LC10AD) acoplada a detectores de índice de refração (RID6A). Para a separação, foi utilizada uma coluna PolySep Linear (300 mm x 7,8 mm) com pré-coluna PolySep Linear (35 mm x 7,80

mm). A solução de NaNO_3 0,1 mol/L foi utilizada como eluente sob vazão de 1,0 mL/min. A curva padrão ($\log M = 13,92 - 0,99Ve$) para a determinação da massa molar foi construída usando os padrões de poliestirrenossulfonato.

5.3.3.4 Potencial zeta e tamanho de partícula

O potencial zeta e o tamanho de partícula dos polissacarídeos foram obtidos em um equipamento Nano Zeta Sizer Malvern® modelo ZS 3600 por meio do espalhamento dinâmico de luz utilizando um laser a 633 nm com um ângulo de espalhamento (configurado) em 173° . Os polissacarídeos foram dissolvidos em água (zeta) e em solução de NaNO_3 0,1 mol L^{-1} (tamanho) na concentração de 1,0 mg mL^{-1} .

5.3.4 Preparação de materiais e tratamento das mangas

As mangas foram imersas em uma solução de hipoclorito de sódio (2%, v/v) durante 2 minutos para sanitização. Foram lavadas com água da torneira e logo em seguida divididas de forma aleatória em 9 grupos de 21 mangas e secas ao ar. Depois foram borrifadas com as soluções de polissacarídeos na concentração de 5 mg mL^{-1} . Um grupo de controle foi borrifado com água destilada e outro com solução de Bion [0,196 mg mL^{-1} (ZHU *et al.*, 2008)]. Após 24 horas do tratamento com polissacarídeos, água e Bion, uma lesão uniforme foi feita em duas regiões de 9 dos 21 frutos tratados para inoculação de 20 μL de uma suspensão conidial de *C. siamense* (1×10^5 esporos/mL). Os frutos inoculados e não inoculados foram colocados em caixas de plástico, e armazenados a temperatura ambiente (em torno de 25°C). O diâmetro das manchas que foram causadas pelo fungo nas mangas foi acompanhado e medido.

5.3.5 Severidade da antracnose e atividade da fenilalanina amônia-liase

Consta em '5.1.4. Severidade da antracnose e atividade da fenilalanina amonialiase'.

5.4 Testes em maçãs

5.4.1 Materiais

A goma do chichá desacetilada e sulfatada advém de exudato com origem esclarecida em ‘5.1.1. *Materiais*’ da subseção 5.1. (**Testes preliminares em mangas**). BTH (Bion®) 50% p/p, hipoclorito de sódio, solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4), ácido cítrico, albumina sérica bovina, monolignol (guaiacol) peroxidase, guaiacol, peróxido de hidrogênio, pirocatecol, acetona, ácido tioglicólico e 2 -hidroxipropiléter foram fornecidos por Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil. Hidróxido de sódio, N, N-dimetilformamida (DMF) e ácido clorossulfônico (CSA) foram obtidos da Vetec, Brasil. O cloreto de sódio, ácido clorídrico e etanol foram adquiridos na Synth, São Paulo, Brasil.

5.4.2 Isolamento, desacetilação e sulfatação dos polissacarídeos

Consta na subseção ‘5.2.2. *Isolamento, sulfatação e desacetilação dos polissacarídeos*’.

5.4.3 Caracterização dos polissacarídeos

5.4.3.1 Microanálise elementar (ME)

Descrita na subseção ‘5.1.3. *Caracterização dos polissacarídeos*’.

5.4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Descrita na subseção ‘5.1.3. *Caracterização dos polissacarídeos*’.

5.4.3.3 Análise térmica (TGA, DSC)

Amostras de polissacarídeos (10 mg) foram submetidas à análise termogravimétrica em equipamento TGAQ50 (TA Instruments) em atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

5.4.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (^{13}C -RMN)

Os polissacarídeos foram dissolvidos em água deuterada, a qual foi adicionada DSS a 1% para calibração zero do deslocamento químico no espectro de ^{13}C RMN. A hidrólise ácida parcial foi realizada no GCH para tornar o espectro mais claro. Os espectros de ^{13}C RMN foram obtidos a 70 °C em um espectrômetro modelo BRUKER AVANCEDRX500.

5.4.3.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Consta na subseção '5.3.3.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC)'.

5.4.4 Preparação de materiais e tratamento das maçãs

Os polissacarídeos GCHDA, GCHS e o BTH foram dissolvidos em água destilada nas seguintes concentrações, 5 mg mL⁻¹ para GCHDA e GCHS e 0,4 mg mL⁻¹ para o BTH. As maçãs Pink Lady foram colhidas em Vacaria, no estado do Rio Grande do Sul, no Brasil. Os frutos foram sanitizados em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v). Depois de secas, algumas maçãs foram pulverizadas com água, outras com as soluções de polissacarídeo e outras com BTH. Em um experimento com três repetições, amostras de maçã foram coletadas em vários momentos (12, 24, 48 e 72 h) para determinar a atividade das enzimas guaiacol peroxidases e polifenoloxidasas.

5.4.5 Avaliação da atividade de GPX e PPO e do conteúdo de lignina

As amostras de polpa foram retiradas com um perfurador e homogeneizadas por 2 minutos em um almofariz em diluição 1: 3 (m/v) com tampão PBS 100 mmol.L⁻¹ pH 7,4 contendo ácido cítrico 25 mmol.L⁻¹ (resfriado). Após filtração em gaze, o material fresco foi centrifugado a 12.400 x g por 10 min a 4 °C. O extrato bruto obtido do sobrenadante foi utilizado para determinações enzimáticas. Para avaliar as atividades relativas da enzima, a proteína solúvel (mgP mL⁻¹) dos extratos brutos foi determinada previamente usando albumina de soro bovino 0,3 mol.L⁻¹ (BSA) (BRADFORD, 1976).

Para determinação da atividade das enzimas alíquotas de 100µL dos extratos brutos (sobrenadante) foram utilizadas como substrato nas misturas das enzimas: 2,0 mL de

monolignol (guaiacol) peroxidase (GPX), com 20 mmol.L⁻¹ guaiacol e H₂O₂ 30 mmol.L⁻¹. As polifenol oxidases (PPO) foram medidas com pirocatecol 30 mmol.L⁻¹. A atividade das duas enzimas foi registrada por 10 minutos em espectrofotômetro. A atividade de GPXs foi lida em 480 nm e de PPOs em 410 nm (CAVALCANTI *et al.*, 2007). Uma unidade de atividade relativa (UA) de ambas as oxidases foi definida como a alteração da absorbância no respectivo comprimento de onda da enzima por um miligrama de proteína solúvel por minuto (UA mgP⁻¹ min⁻¹).

Amostras de polpa de maçã expostas a elicitores foram usadas para extração de lignina, conforme método descrito por Monties (1989), com pequenas modificações. Alíquotas de 0,2 mg de material fresco reduzidos a pó fino com nitrogênio líquido e expostas a acetona a 85% (7 mL) durante 48 h de incubação. As amostras foram então centrifugadas a 7.500 x g por 15 min a 7 °C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado seco ao ar por 24 h e ressuspenso em 5 mL de ácido tioglicólico (TGA) em HCl 2 mol.L⁻¹ (1:10, v / v) por 4 h a 25 °C. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 20 mL, onde foram adicionados 200 µL de 10 mol.L⁻¹ HCl a uma incubação em banho de gelo por 4 h. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação (7.500 x g, 30 min, 7 °C) com os granulados homogeneizados em 5 mL de NaOH 0,5 mol.L⁻¹ e lidos a 280 nm em espectrofotômetro UV. Para quantificar a lignina solúvel em ácido (derivados de TGA), uma curva padrão foi preparada variando de 10 a 100 mg.mL⁻¹ de éter 2-hidroxipropílico. Os dados foram expressos em microgramas por mililitro. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.4.6 Análise estatística

Em relação às respostas enzimáticas, estatísticas descritivas e desvios padrão entre as maçãs tratadas com gomas, Bion e as pré-tratadas com água (Ctrl-) foram comparadas com barras verticais ao lado das médias em cada hora do intervalo de tempo. Para as determinações de lignina, normalidade (Shapiro-Wilk), os testes de homocedasticidade (Bartlett), ANOVA e Tukey foram executados com 5% de significância com um script R específico (versão R 3.5.0 - The R Foundation, 2018).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Testes preliminares em mangas

6.1.1 Sulfatação dos polissacarídeos e caracterização dos derivados sulfatados

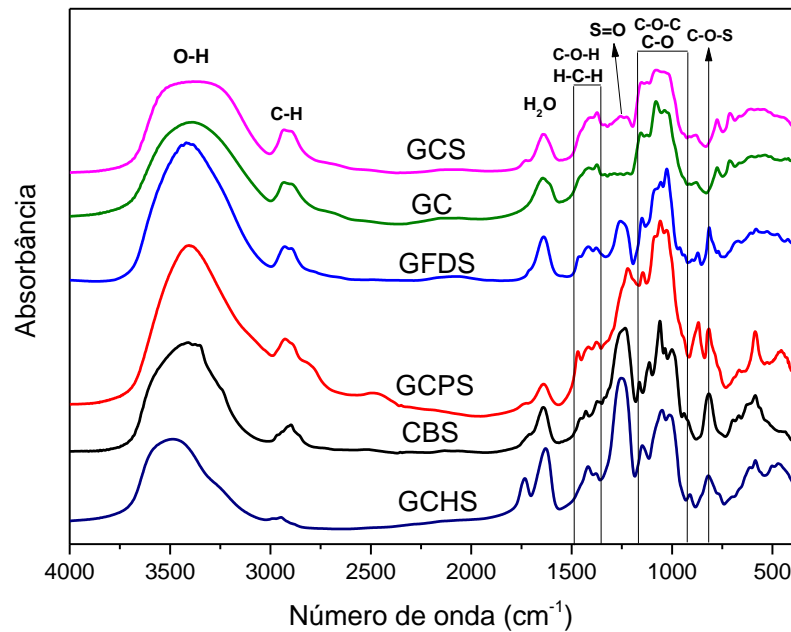
Na Tabela 2 pode-se observar o teor de carbono e enxofre e o grau de sulfatação das gomas. E na Figura 12 constam os espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das gomas usadas nos testes preliminares.

Tabela 2 - Percentual de carbono e enxofre e o grau de sulfatação dos polissacarídeos sulfatados¹

Amostras	%C	%S	DS
CBS	21,44	8,88	0,93
GCPS	23,08	4,60	0,45
GFDS	31,48	3,52	0,25
GCS	36,47	1,28	0,08
GCHS	17,50	7,10	0,82

¹ Legenda dos polissacarídeos: CBS (Celulose bacteriana sulfatada), GCPS (Galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* sulfatada), GFDS (Galactomanana de Fava Danta sulfatada), GCS (Goma do cajueiro sulfatada) e GCHS (Goma do chichá sulfatada).

Figura 12 – FTIR para os polissacarídeos usados nos testes preliminares²



Todos os polissacarídeos apresentaram bandas comuns no FTIR, como 3410 cm^{-1} e 2927 cm^{-1} devido à vibração de alongamento de OH e CH, respectivamente (WANG *et al.*, 2014), a faixa $1174\text{-}922\text{ cm}^{-1}$ atribuída às vibrações de COC, CO da estrutura glicosídica e C-OH do álcool primário (RAZAVI *et al.*, 2014) e a extensão $1490\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ causada pela deformação simétrica de HCH e COH (BURITI *et al.*, 2013; WANG; SOMASUNDARAN, 2006). A banda em 1638 cm^{-1} foi atribuída à água ligada (RODRIGUEZ-CANTO *et al.*, 2020; DODI; HRITCU; POPA, 2011).

A banda intensa em 1250 cm^{-1} foi devido ao alongamento assimétrico de S=O (PEYMAN *et al.*, 2011; KOSHY; BOGGS, 1997) e é mais intensa em CBS e menos intensa em GCS que possuem, respectivamente, o maior e o menor grau de sulfatação (DS) (Tabela 2). A banda 819 cm^{-1} foi relatada como sendo 6-sulfato de resíduos de D-galactose (WANG *et al.*, 2010b).

² Legenda dos polissacarídeos: CBS (Celulose bacteriana sulfatada), GCPS (Galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* sulfatada), GFDS (Galactomanana de Fava Danta sulfatada), GCS (Goma do cajueiro sulfatada) e GCHS (Goma do chichá sulfatada) e GC (Goma do cajueiro).

6.1.2 Severidade da antracnose e atividade da PAL

Objetivando se encontrar um polissacarídeo promissor para o tratamento de mangas contra antracnose, foi avaliada a severidade dessa doença após a aplicação de gomas nas frutas pós-colhidas. Nas Figuras 13 e 14 pode-se observar que a aplicação da goma do chichá e da goma do cajueiro nas doses de 0,5 e 0,8 mg mL⁻¹ não resultaram em redução da severidade da antracnose nas mangas Tommy. É válido salientar, entretanto, que os frutos estavam mais maduros que o ideal e que se inoculou os frutos com 20 µL de uma suspensão de esporos na concentração da ordem de 10⁷ que é relativamente grande.

Figura 13 –Diâmetro médio das lesões causadas por antracnose em mangas Tommy tratadas com goma do chichá. Após 4 dias (a) e 6 dias (b)

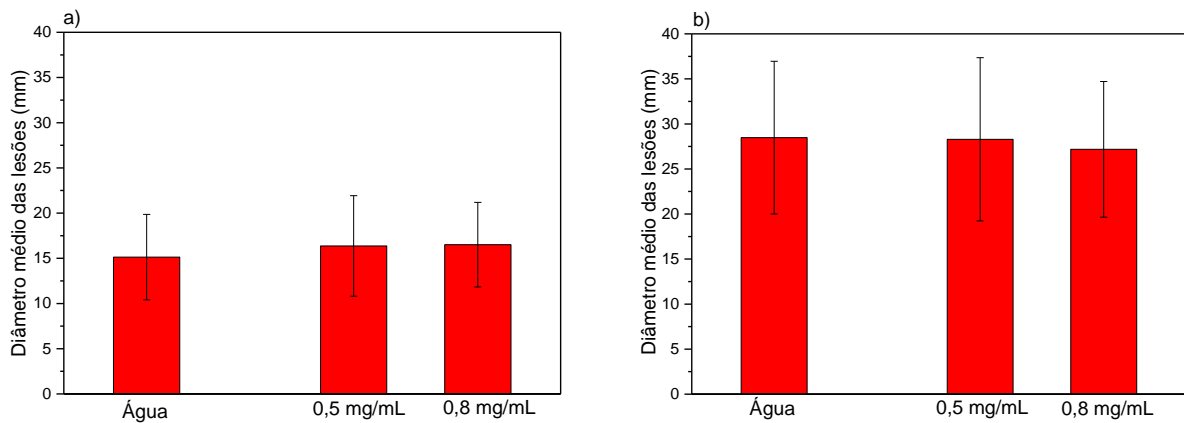
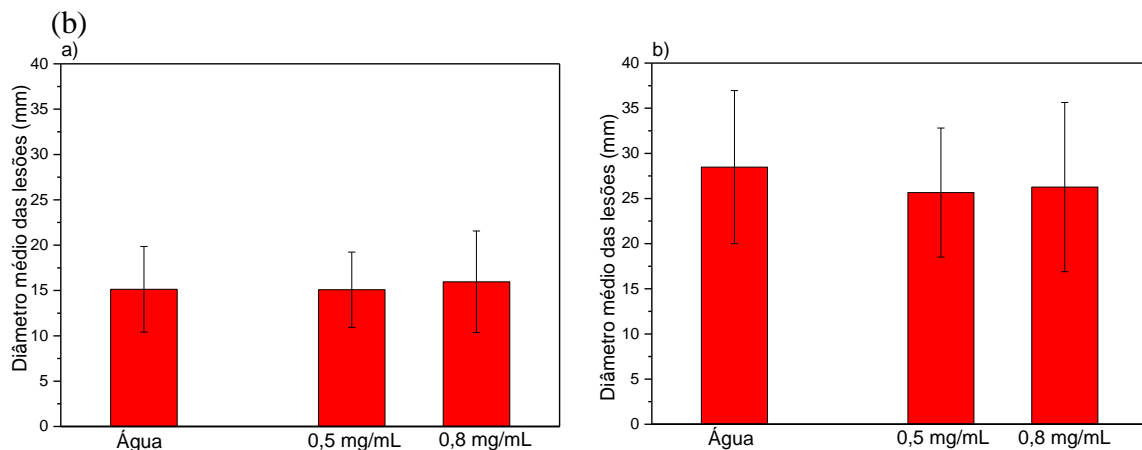


Figura 14 – Teste para manga Tommy tratada com goma do cajueiro. Após 4 dias (a) e 6 dias



As Figuras 15 e 16 também revelam que a aplicação dos polissacarídeos não impediu o desenvolvimento da doença nas mangas Palmer, talvez também por causa das condições supracitadas para o caso das mangas Tommy.

Figura 15 - Teste para manga Palmer tratada com goma do chichá. Após 4 dias (a) e 6 dias (b)

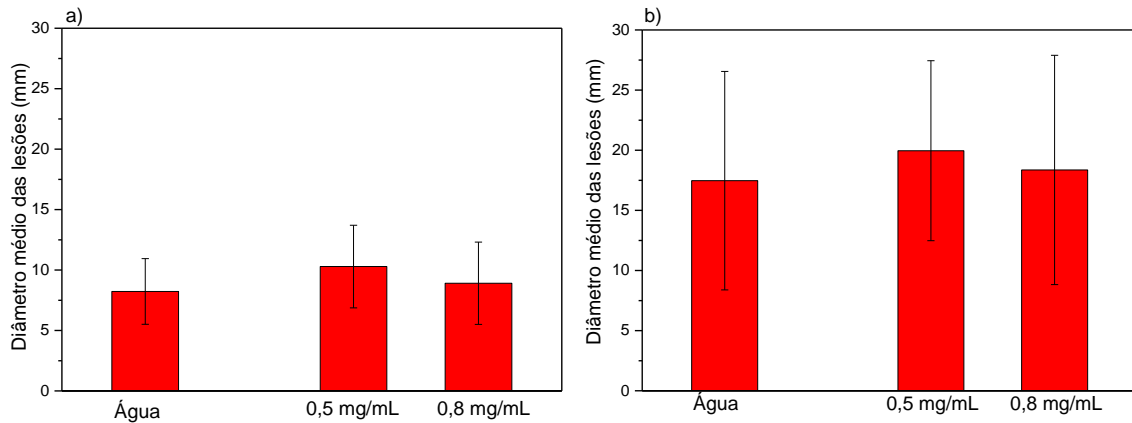
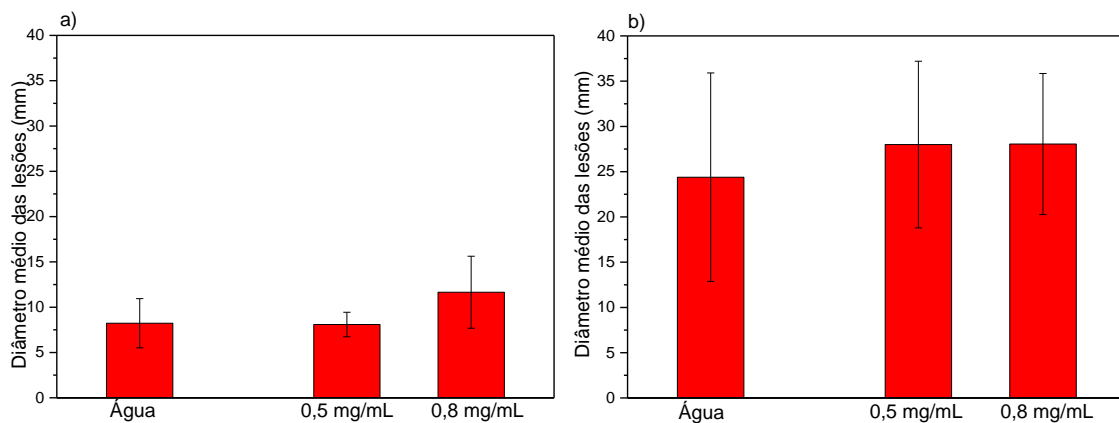


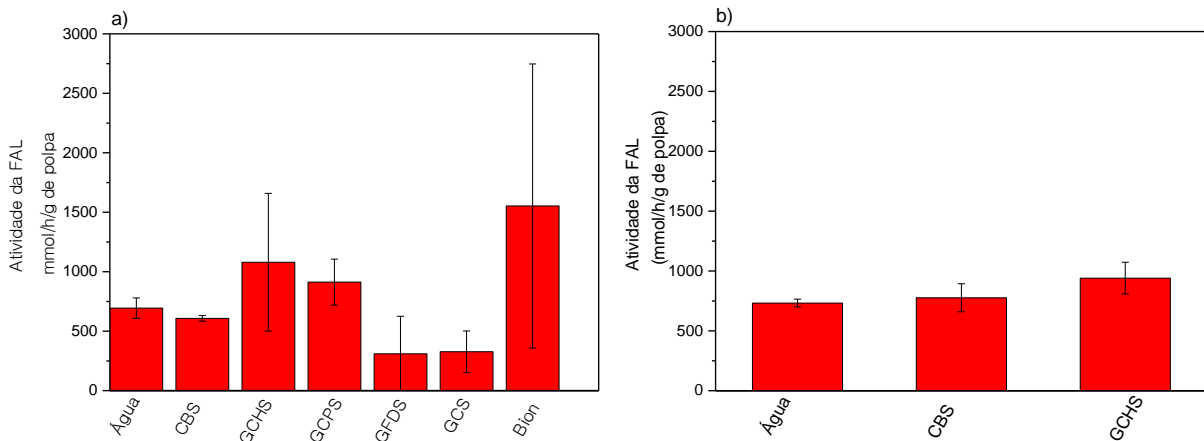
Figura 16 - Teste para manga Palmer tratada com goma do cajueiro. Após 4 dias (a) e 6 dias (b)



Como seria um processo lento e custoso fazer a seleção do polissacarídeo ideal observando-se a severidade da doença resolveu-se analisar a atividade de uma importante enzima envolvida na indução de defesas em vegetais, a fenilalanina amônia liase (PAL). Na Figura 17a constam os valores de atividade de PAL para cinco polissacarídeos (celulose bacteriana sulfatada [CBS], goma do chichá sulfatada [GCHS], galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* sulfatada [GCPS], galactomanana de fava danta sulfatada [GFDS] e goma do cajueiro sulfatada [GCS]). O bion foi utilizado como controle positivo. Note-se, estatisticamente semelhante, numericamente o polissacarídeo que parece ter o comportamento mais parecido com o do bion é GCHS. Na Figura 17b pode-se observar somente a atividade da PAL GCHS e CBS. A goma do Chichá sulfatada novamente apresentou atividade de FAL

numericamente maior que a água (controle negativo) e a celulose bacteriana sulfatada. Dessa forma decidiu-se explorar a goma do chichá e seus derivados para seguir com os testes com mangas.

Figura 17 – Atividade da Fenilalanina amônia liase



6.1.3 Atividade antifúngica

Alguns materiais que foram candidatos a elicitores tiveram suas atividades antifúngica testadas. Nas Figuras 18, 19 e 20 pode-se observar a capacidade de os polissacarídeos controlarem o crescimento do diâmetro do disco de micélio do fungo *Colletotrichum* no do tempo em diversas concentrações.

Figura 18 – Teste antifúngico para a goma do chichá (GCH) (a) e para a goma do chichá sulfatada (GCHS) (b)

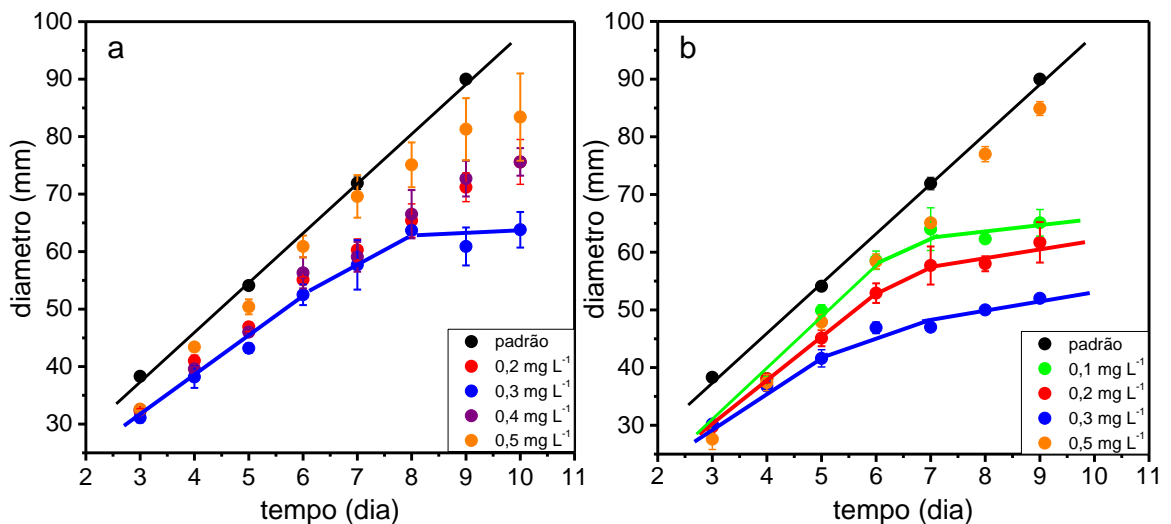


Figura 19 – Teste antifúngico para a goma do cajueiro levemente sulfatada (GCS) (a) e para a galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* sulfatada (GCPS) (b)

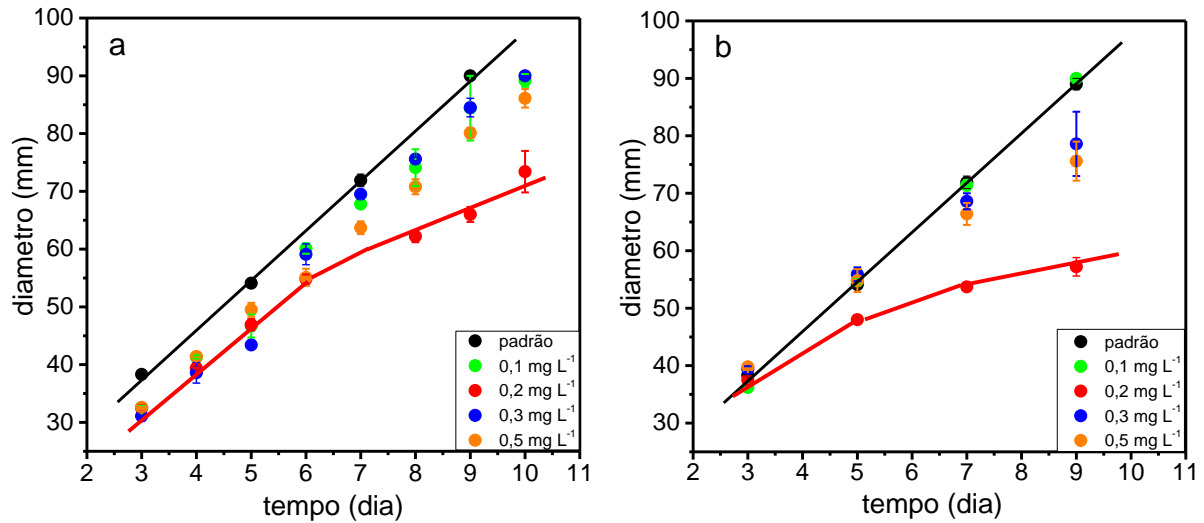
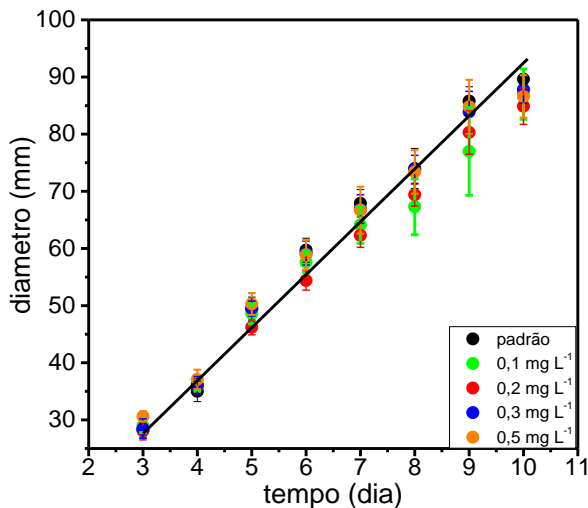


Figura 20 – Teste antifúngico para a Celulose Bacteriana Sulfatada (CBS)



Dentre as gomas testadas, a GCHS pareceu ter o maior efeito fungistático (que causa inibição sem causar a morte do fungo [LEWIS; GRAYBILL, 2008]), principalmente na concentração $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 18b) e a CBS, ao que parece, não possui atividade fungistática em nenhuma das concentrações testadas (Figura 20). GCPS apresentou efeito parecido com o da GCHS, mas somente em $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 19b). Fracos efeitos fungistático foram observados para GCH e GC nas concentrações $0,3$ e $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 18a e 19a).

É interessante notar que as gomas (GCH, GCHS, GCS e GCPS) apresentaram efeito fungistático máximo em concentrações inferiores ($0,3$ e $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) à máxima ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Ao que parece, a partir de determinada concentração ideal de goma, aumentos da concentração

diminuem o efeito fungistático. Velluti *et al.* (2003) relataram que a duplicação da concentração de óleo essencial de 500 para 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ não resultou em aumento da atividade antifúngica. Talvez essa perda de ganho de atividade com o aumento da concentração tenha relação com o crescimento também da viscosidade que restringe a mobilidade do princípio ativo.

6.2 Testes preliminares em maçãs

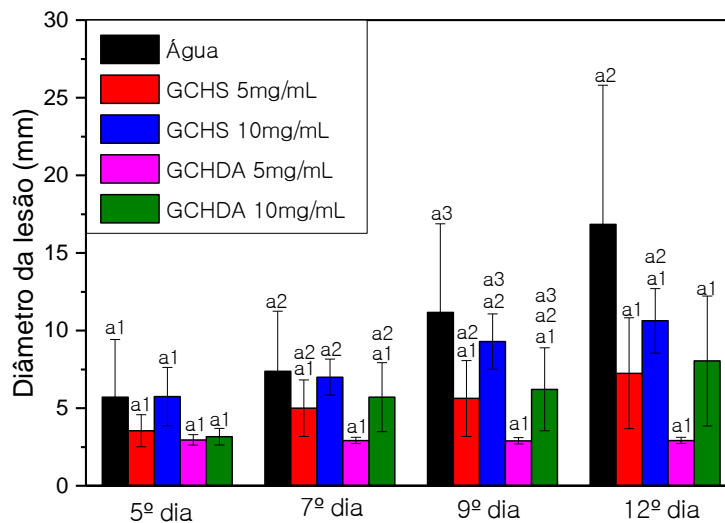
6.2.1 Sulfatação e desacetilação da goma do chichá e caracterização dos derivados sulfatados

Consta nas subseções 7.4.1. e 7.4.2. da seção ‘7.4. Testes em maçãs’

6.2.2 Severidade do *Penicilium*

Durante os testes dos derivados da goma do chichá como elicitores de mangas foi percebido que a estrutura da GCH continha resíduos também presentes nos polissacarídeos de algas verdes: ácidos urônicos e ramnose. Na literatura há trabalhos que relatam que esses resíduos juntamente com grupos sulfatos são responsáveis pela a indução de compostos de defesa provocada por polissacarídeos de algas verdes em maçãs. Por isso avaliou-se a severidade de doença causada por *Penicilium* em maçãs tratadas com derivados da goma do chichá.

Figura 21 – Severidade de doença causada por *Penicilium* em maçãs Fuji tratadas com derivados sulfatado e desacetilado da goma do chichá



Note-se na Figura 21 que as lesões nas maçãs tratadas com solução de goma do chichá desacetilada (GCHDA) (5 mg mL⁻¹) não aumentou estatisticamente com o passar do

tempo e que nas maçãs tratadas com goma do chichá sulfatada (GCHS) (5 mg mL^{-1}) houve leve aumento na lesão, em comparação com o controle.

Com base nesses resultados deu-se continuidade aos testes de derivados da goma do chichá como indutor de resistência em maçãs.

6.3 Testes em mangas

6.3.1 Isolamento e modificações dos polissacarídeos

A Tabela 2 apresenta o rendimento nominal do isolamento e de cada reação de modificação da goma do chichá, que foi calculado por meio da razão entre a massa inicial (antes da modificação) e final (depois da modificação), e o rendimento estequiométrico dos derivados sulfatados, que foi calculado de acordo com Moura Neto *et al.* (2011). Nessa Tabela pode-se notar que as gomas GCHDAS e GCHHS estão com um grau de sulfatação (DS) pequeno em relação ao da GCHS mesmo todas tendo sido submetidas ao mesmo processo reacional. Esse menor grau de sulfatação também está sinalizado no rendimento nominal, que foi menor para GCHDAS e GCHHS. O processo de sulfatação acaba gerando aumento de massa por molécula devido à saída de um hidrogênio (H) para a entrada de um grupo $-\text{SO}_3\text{Na}$. Nota-se na Tabela 2 que quanto maior o rendimento maior é o grau de sulfatação. O baixo rendimento para a produção de GCHDAH e GCHH revela que o processo de hidrólise gera muita perda de massa e deve ser repensado para ser mais viável.

Tabela 3 – Rendimento e grau de sulfatação para a goma do chichá e seus derivados

Amostras	Rendimento nominal (%)	Rendimento estequiométrico (%)	%C	%S	DS
GCH	78,5	---	---	---	---
GCHDA	76,0	---	---	---	---
GCHDAS	67,3	58,8	31,24	3,14	0,23
GCHDAH	25,6	---	---	---	---
GCHH	39,5	---	---	---	---
GCHHS	59,6	54,8	33,70	2,14	0,14
GCHS	105,3	66,9	17,50	7,10	0,82

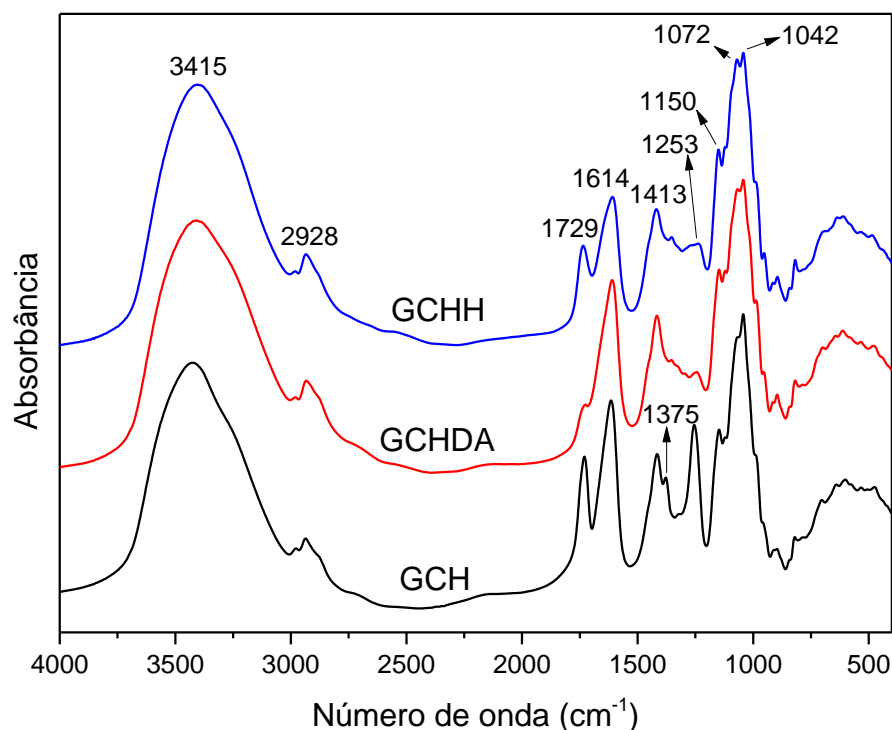
6.3.2 Caracterização dos polissacarídeos

6.3.2.1 Goma do chichá e goma do chichá desacetilada

6.3.2.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A Figura 22 apresenta o espectro de FTIR da goma do chichá *in natura* e da goma desacetilada. A banda em 3415 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento de ligação O-H do polissacarídeo (GANGAPURAM *et al.*, 2017) e em 2928 cm^{-1} à vibração de estiramento de C-H (PADIL; SENAN; ČERNÍK, 2015). As bandas em 1614 e em 1413 cm^{-1} são devidas a estiramento assimétrico e simétrico de COO^- de ácidos urônicos, respectivamente (GANGAPURAM *et al.*, 2017; KUDLE *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2004). A absorvância relativa A_{1614}/A_{1042} da GCH ($0,3272$) foi semelhante à da GCHDA ($0,3265$) indicando que não houve diminuição no teor de ácido urônico. As bandas em 1150 , 1072 e 1042 cm^{-1} (região da impressão digital) são referentes a vibrações de estiramento de várias ligações -C-O-C- presentes em carboidratos em geral (PADIL; SENAN; ČERNÍK, 2015).

Figura 22 – FTIR das gomas GCH, GCHDA e GCHH



A forte redução da intensidade das bandas em 1253 e 1729 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à vibração axial de C-O e ao estiramento de C=O do éster que grupo acetil ligado ao polissacarídeo forma (a banda em 1729 cm^{-1} também pode ser atribuída a C=O de grupo ácido),

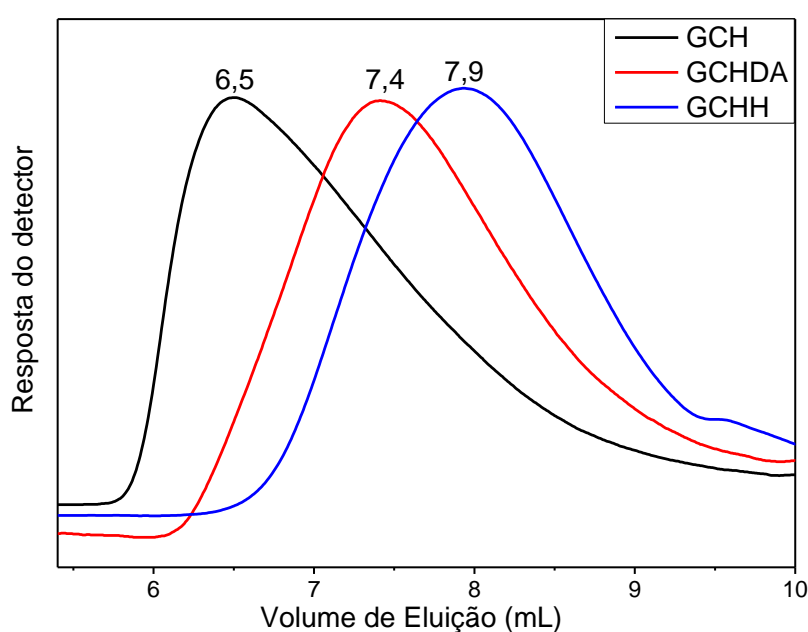
e a ausência da banda em 1375 cm^{-1} , referente a C-H de CH_3 de grupos acetil, no espectro da goma do chichá submetida ao processo de desacetilação, confirma que a reação de fato ocorreu (POSTULKOVA *et al.*, 2017; MAGALHÃES JÚNIOR *et al.*, 2016; PATRA; VOJTOVÁ; MARTINOVÁ, 2015; LÊ CERF; IRINEI; MULLER, 1990).

6.3.2.1.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A Figura 23 mostra que o volume de eluição de pico diminuiu para a goma desacetilada, indicando que o processo de desacetilação gera perda de volume hidrodinâmico. As massas molares (M_w) foram $15 \times 10^6\text{ g mol}^{-1}$ para a goma *in natura* e $4,79 \times 10^6\text{ g mol}^{-1}$ para a goma desacetilada. Dessa forma o processo gerou uma goma com massa molar cerca de quatro vezes menor.

Massas molares da mesma ordem de magnitude foram relatadas para goma karaya bruta ($M_w = 16,1 \times 10^6\text{ g mol}^{-1}$) (POSTULKOVA *et al.*, 2017) e desacetilada ($1,8 \times 10^6\text{ g mol}^{-1}$) (PADIL; SENAN; ČERNÍČ, 2015). Le Cerf, Irinei e Muller (1990), relataram aumento da massa molar após a desacetilação da goma karaya (de $2\text{--}5 \times 10^6$ para $12\text{--}16 \times 10^6\text{ g mol}^{-1}$). No entanto, os autores explicaram que a desacetilação permite a solubilização em água de cadeias poliméricas de alto M_w em pH alto, enquanto a solubilização da goma original sem ajustar o pH era apenas parcial, e apenas as frações de baixo M_w eram solúveis.

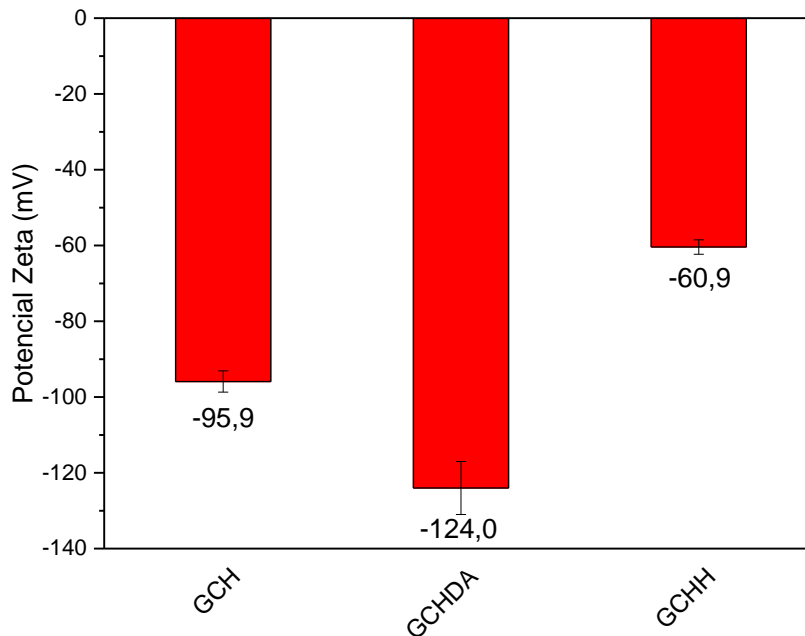
Figura 23 – Cromatogramas das gomas GCH, GCHDA e GCHH



6.3.2.1.3 Potencial Zeta

Observa-se na Figura 24 que o potencial zeta torna-se mais negativo para a goma do chichá desacetilada. Como os grupos acetil da goma não possuem carga, o processo de desacetilação ocasiona perda de massa, mas não de carga. Por isso, a GCHDA torna-se mais negativa. Esse aumento da razão carga/massa com a diminuição dos grupos acetil, que são hidrofóbicos, eleva a solubilidade. E essa maior solubilidade tem relação como o aumento das cargas superficiais da goma em interação com o solvente (água).

Figura 24 – Potencial zeta das gomas GCH, GCHDA e GCHH



6.3.2.2 Goma do chichá e goma do chichá hidrolisada

6.3.2.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Na Figura 22 pode-se observar o FTIR da goma do chichá hidrolisada (GCHH). Analisando-se os espectros nota-se a redução das seguintes bandas para a goma hidrolisada: em 1253 e em 1729 cm^{-1} que podem ser atribuídas, respectivamente, a C-O e a C=O de grupos acetil, e em 1614 e 1413 cm^{-1} que podem ser atribuídas a estiramento assimétrico e simétrico de COO^- de ácidos urônicos, respectivamente (GANGAPURAM *et al.*, 2017; KUDLE *et al.*, 2013; LÊ CERF; IRINEI; MULLER, 1990). Dessa forma, nota-se que o processo de hidrólise

gera perdas de grupos acetil e de resíduos de ácidos urônicos. O valor da absorvância relativa A_{1614}/A_{1042} foi significativamente menor (0,2261) do que o da GCH (0,3272). Essa diminuição representa uma perda de 31% de ácidos urônico após a hidrólise. Com base na absorvância relativa A_{1729}/A_{1042} , constata-se que houve redução de 42% no teor de grupos acetil. A absorvância relativa da GCH e da GCHH foram 0,1184 e 0,0681, respectivamente. Para compreensão da dimensão da perda de massa molar proporcionada pela hidrólise é necessário recorrer-se a Cromatografia de Permeação em Gel (Figura 23) e para o conhecimento da carga perdida pela saída dos resíduos de ácidos urônicos é preciso à análise do Potencial Zeta (Figura 24).

6.3.2.2.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Na Figura 23, pode-se observar que o volume de eluição de pico é maior para a goma hidrolisada do que para a goma do chichá *in natura*, indicando que a mesma teve seu volume hidrodinâmico reduzido. As massas molares (M_w) calculadas para as gomas foram as seguintes: $1,5 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$ para a goma não modificada e $2,08 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ para a goma hidrolisada, mostrando que a hidrólise diminuiu em sete vezes, aproximadamente, a massa molar da goma *in natura*.

6.3.2.2.3 Potencial Zeta

O potencial zeta mostra que além de perder massa molar e grupos acetil, a goma hidrolisada também perde cargas superficiais, o que é condizente com o resultado do FTIR que indica perda de 31% de ácidos urônicos após a hidrólise (Figura 22). A variação no potencial zeta da GCHH em comparação ao da GCH foi de 37% (Figura 24), valor relativamente próximo ao da variação do conteúdo de ácidos urônicos.

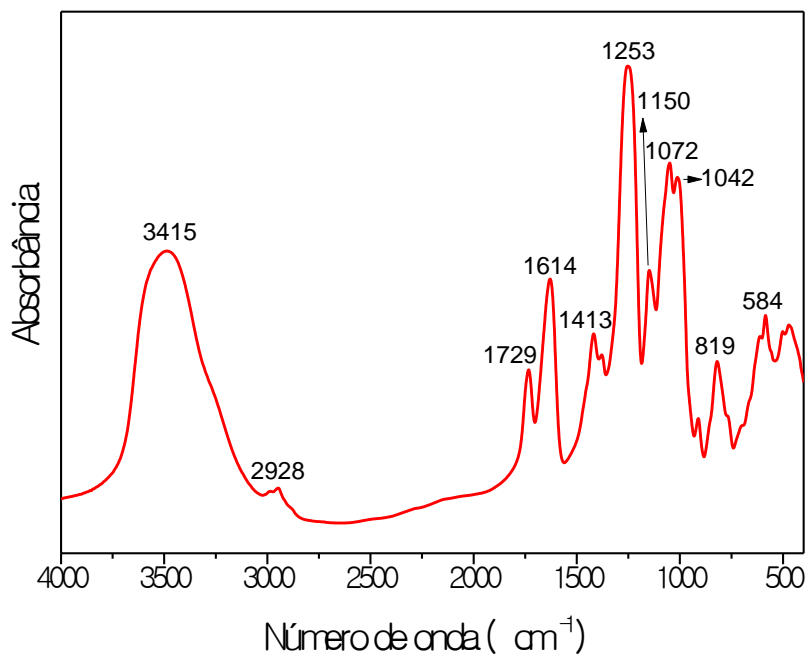
6.3.2.3 Goma do chichá sulfatada

6.3.2.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A Figura 25 apresenta o espectro de FTIR de GCHS. A banda em 3415 cm^{-1} é mais estreita, porque, como pode ser observada na Figura 5, a reação de sulfatação ocorre nas

hidroxilas do carboidrato, dessa forma para cada grupo sulfato que a macromolécula adquire, há a perda de um grupo hidroxila (O-H). A largura dessa banda também está relacionada às interações intermoleculares. Uma interação mais fraca leva a uma largura de banda mais estreita (PATRA; VOJTOVÁ; MARTINOVÁ, 2015). A intensificação da banda em 1253 cm^{-1} , que na goma do chichá *in natura* é atribuída à vibração axial de C-O de grupos acetil, indica a sulfatação da goma, porque o estiramento de S=O de grupo sulfato ocorre também em 1253 cm^{-1} (MOURA NETO *et al.*, 2011; PEYMAN *et al.*, 2011; SALEHI *et al.*, 2011). As bandas em 819 e 584 cm^{-1} se devem ao estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, de O-S-O de grupo sulfato (CAKIĆ *et al.*, 2005).

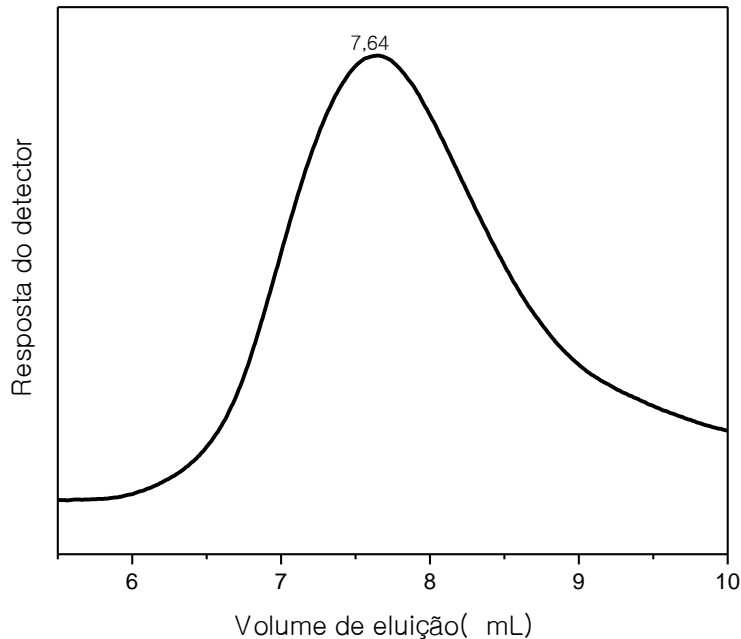
Figura 25 – FTIR da goma GCHS



6.3.2.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A Figura 26 mostra que o volume de eluição de pico é menor para a goma do chichá que sofreu sulfatação.

Figura 26 – Cromatograma da goma GCHS

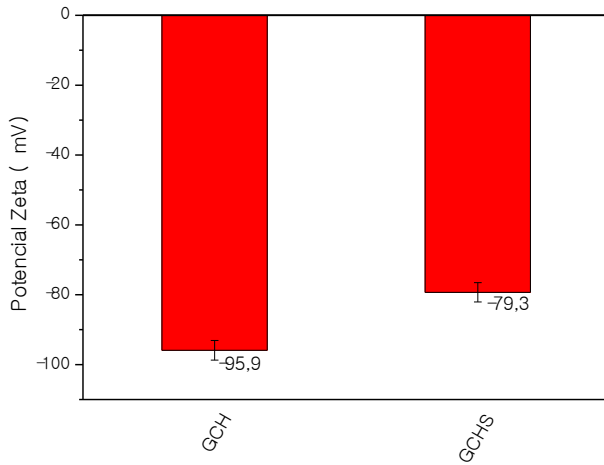


As massas molares (M_w) foram $1,5 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$ para a goma *in natura* e $3,8 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ para a goma sulfatada. Dessa forma a reação de sulfatação gerou uma goma com massa molar cerca de quatro vezes menor.

6.3.2.3.3 Potencial zeta

A Figura 27 mostra que o potencial zeta diminuiu em módulo para a GCHS. Tendo em vista somente a entrada de grupos sulfato, as cargas negativas superficiais da macromolécula deveriam ter aumentado depois do processo de sulfatação. Porém a reação ocorre em meio extremamente ácido e o processo de sulfatação acaba se vinculando a um processo de hidrólise ácida. Já se demonstrou que quando a GCH sofre uma hidrólise ácida ocorre uma diminuição em módulo do potencial zeta de -95,9 para -60,4 devido à perda de parte dos ácidos urônicos. Essas perdas continuam acontecendo durante o processo de sulfatação, porém balanceadas pela entrada de grupos negativos (sulfato). Enquanto o potencial zeta para o material somente hidrolisado variou em 35,5, para o polissacarídeo hidrolisado e sulfatado variou somente 15,06, ou seja, parte das cargas negativas superficiais (resíduo de ácido urônicos) perdidas na hidrólise ácida são repostas pela entrada de grupos sulfato.

Figura 27 - Potencial Zeta (PZ) das gomas GCH e GCHS

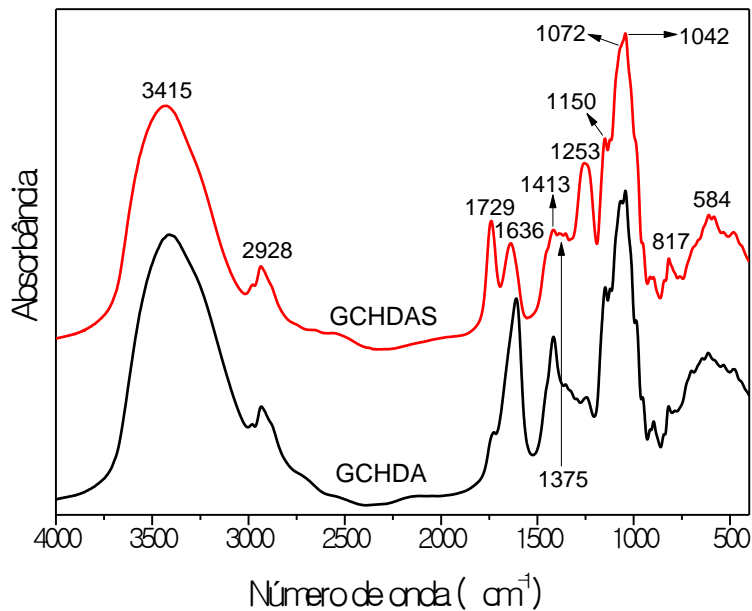


6.3.2.4 Goma do chichá desacetilada sulfatada

6.3.2.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A Figura 28 apresenta o espectro de FTIR da goma do chichá desacetilada sulfatada.

Figura 28 – FTIR das gomas GCHDA e GCHDAS



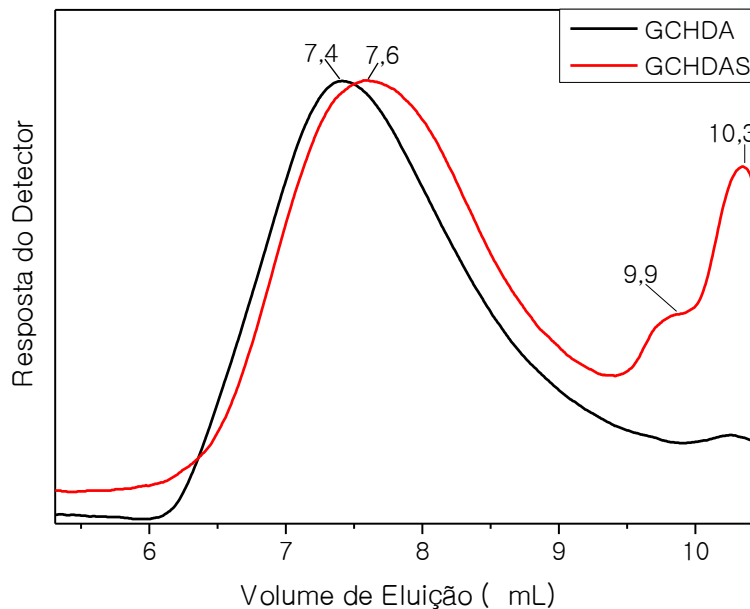
Nota-se no espectro da GCHDAS a presença das bandas convencionais de polissacarídeos sulfatados: 1253 cm^{-1} (PEYMAN *et al.*, 2011), de estiramento de S=O e 817 e 584 cm^{-1} de estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, de O-S-O (CAKIĆ *et al.*,

2005). O processo de sulfatação gerou perda de resíduos de ácidos urônicos. O valor da absorvância relativa A_{1636}/A_{1042} foi significativamente menor (0,1095) do que o da GCHDA (0,3265). Essa diminuição representa uma perda de 66% de ácidos urônico após a sulfatação. A sulfatação foi moderada ($DS = 0,23$), devendo ser pouca a aquisição de carga negativa.

6.3.2.4.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A Figura 29 apresenta os cromatogramas da GCHDA e GCHDAS.

Figura 29 – Cromatogramas das gomas GCHDA e GCHDAS

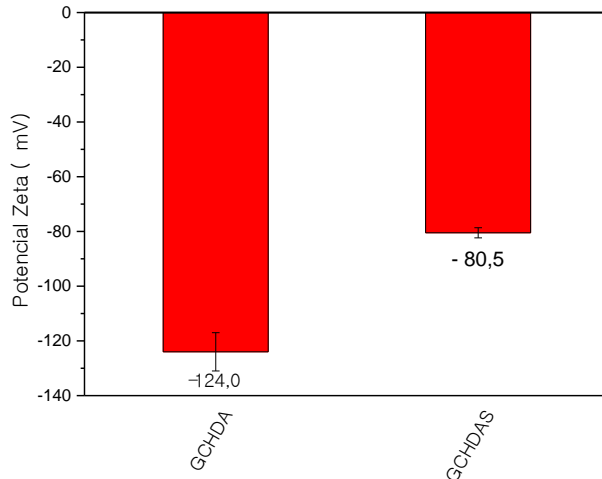


A sulfatação provocou moderada diminuição da massa molar (M_w) de $4,79 \times 10^6$ para $3,21 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$. O cromatograma para GCHDAS não é unimodal, apresentando além da massa molar de pico ($3,57 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$), frações de massas molares menores em $1,31 \times 10^4$ e $5,28 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, demonstrando novamente que ao processo de sulfatação está vinculado um processo de hidrólise ácida.

6.3.2.4.3 Potencial Zeta

A Figura 30 apresenta o potencial zeta para as gomas GCHDA e GCHDAS.

Figura 30– Potencial zeta para as gomas GCHDA e GCHDAS



O processo de sulfatação foi empregado três vezes, a saber, na GCH (perda 16,6), na GCHH (ganho de 21,5) e na GCHDA (perda de 43,5). A maior perda das cargas superficiais se deu para GCHDA como se a mesma fosse à goma mais exposta à hidrólise. De fato, Lê Cerf, Irinei e Muller (1990) demonstrou que uma goma *Sterculia* (Goma karaya) acetilada apresenta configuração bastante compacta e ramificada em solução aquosa ($a = 0,4$), porém a goma desacetilada apresenta conformação mais expandida, com constante ‘a’ da equação de Mark-Houwink ($[\eta] = KM^a$) no valor de 0,7. E essa configuração mais expandida fornece uma maior exposição da goma a processos de hidrólise gerando as perdas de partes da molécula portadoras de cargas (ácidos urônicos).

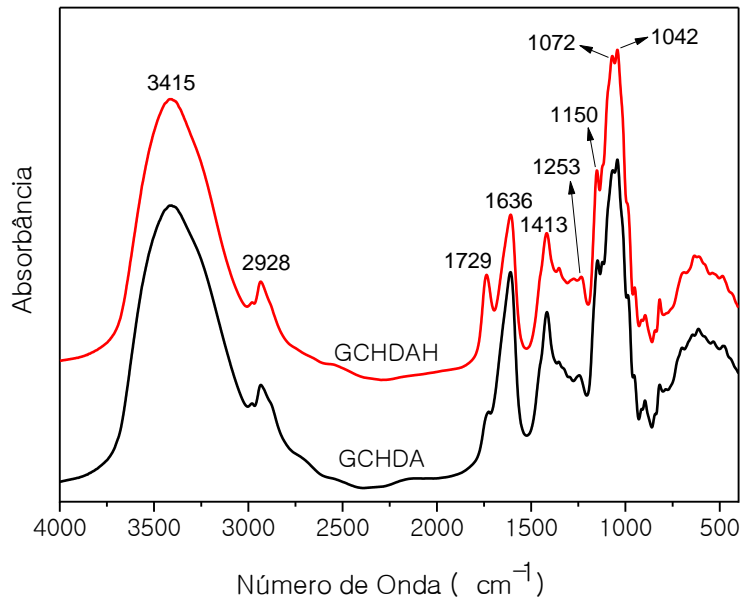
6.3.2.5 Goma do chichá desacetilada e goma do chichá desacetilada hidrolisada

6.3.2.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A Figura 31 mostra o espectro de absorção na região do infravermelho para GCHDAH. Nele nota-se uma diminuição da intensidade das bandas em 1636 e 1413 cm^{-1} revelando perda de resíduos de ácido urônico durante o processo de hidrólise. O valor da absorbância relativa $A_{1636-1729}/A_{1042}$ foi menor (0,2906) do que o da GCHDA (0,3265). Essa diminuição representa uma perda de 11% de ácidos urônico depois da hidrólise. A banda em

1729 cm^{-1} foi atribuída também a C=O de ácido urônico, por isso somou-se a integral dessa banda à integral da banda em 1636 cm^{-1} no cálculo da absorbância relativa.

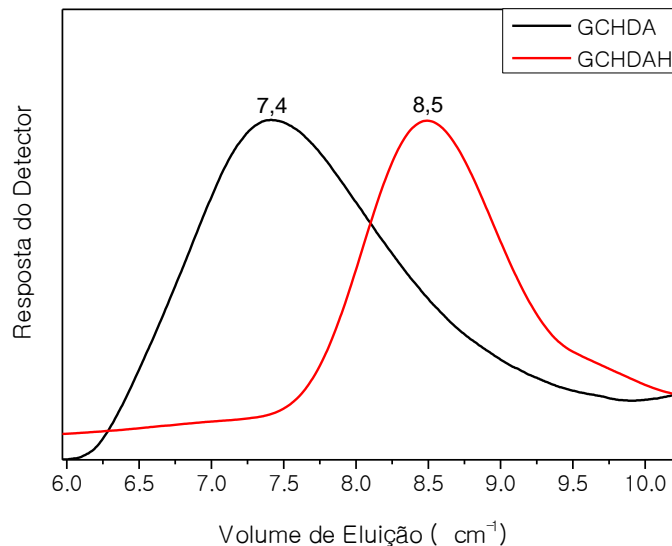
Figura 31 - FTIR das gomas GCHDA e GCHDAH



6.3.2.5.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A Figura 32 revela que o processo de hidrólise gerou uma diminuição do volume hidrodinâmico que pode ser estimada pelas massas molares (M_w) que foram $4,79 \times 10^6\text{ g/mol}$ para GCHDA e $8,55 \times 10^5\text{ g/mol}$ para GCHDAH, significando uma diminuição em cerca de 6 vezes na massa molar.

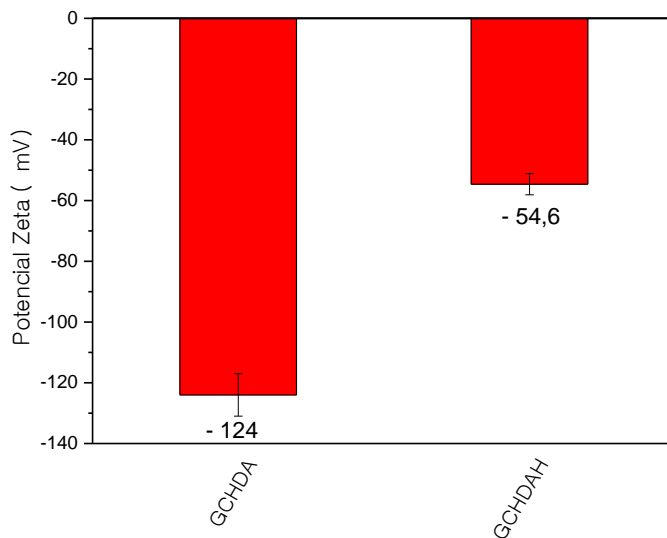
Figura 32 - Cromatogramas das gomas GCHDA e GCHDAH



6.3.2.5.3 Potencial Zeta

A redução do módulo do potencial zeta indica perda de resíduos de ácido urônico (Figura 33) e a presença de grupos COOH em vez de COO⁻. Como se constatou pelo FTIR (Figura 31).

Figura 33 - Potencial Zeta das gomas GCHDA e GCHDAH

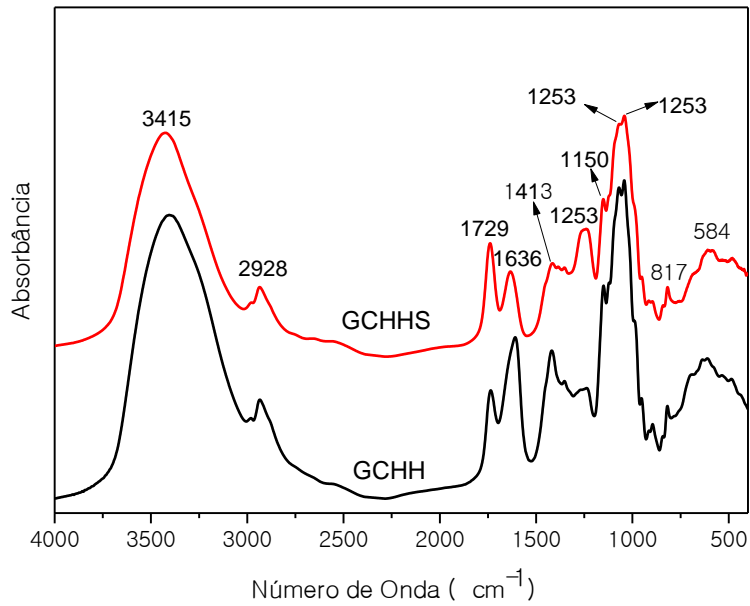


6.3.2.6 Goma do chichá hidrolisada e goma do chichá hidrolisada sulfatada

6.3.2.6.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A reação de sulfatação para GCHH causou perda de ácidos urônicos, é o que se pode deduzir levando-se em conta a perda de intensidade das bandas em 1636 e 1413 cm⁻¹. O valor da absorbância relativa A_{1636}/A_{1042} foi menor (0,1332) do que o da GCHH (0,2261), o que representa uma perda de 41% de ácidos urônico depois da hidrólise. Pode-se observar também nos espectros da Figura 34 que houve a intensificação da banda 1253 cm⁻¹ em GCHHS indicando sulfatação. A mesma foi moderada devido à falta de intensidade das bandas em 817 e 584 cm⁻¹, isso foi confirmado pelo grau de sulfatação obtido a partir da análise elementar (DS = 0,14). A banda em 1730 cm⁻¹ aumentou devido à reação ocorrer em meio ácido.

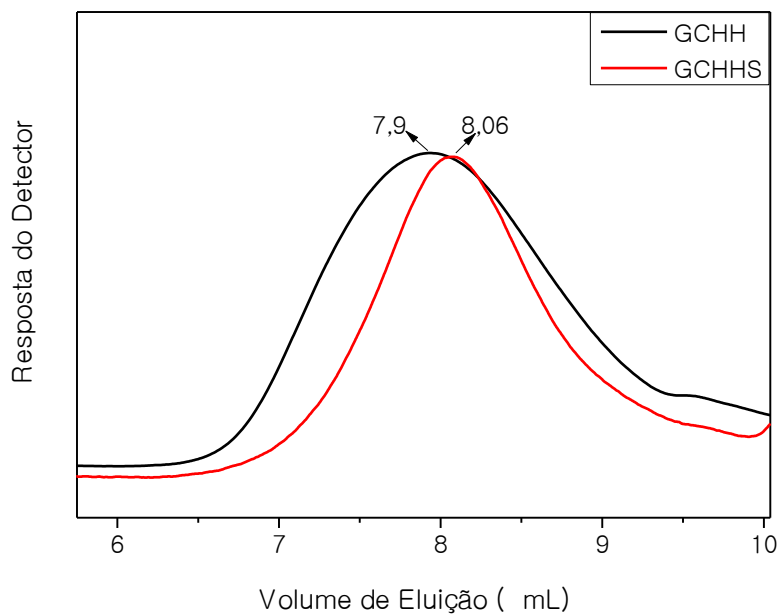
Figura 34 - FTIR das gomas GCHH e GCHHS



6.3.2.6.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Pode-se observar na Figura 35 que a sulfatação da GCHH gerou um derivado com menor volume hidrodinâmico de pico. As massas molares (M_w) foram $2,08 \times 10^6$ e $5,90 \times 10^5$ g mol^{-1} , respectivamente, para GCHH e GCHHS. A redução da massa molar foi em torno de 3,5 vezes.

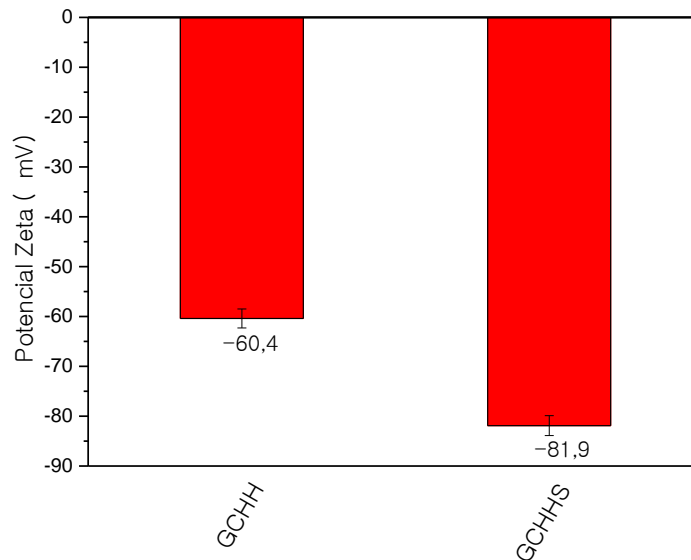
Figura 35 – Cromatograma das gomas GCHH e GCHHS



6.3.2.6.3 Potencial Zeta

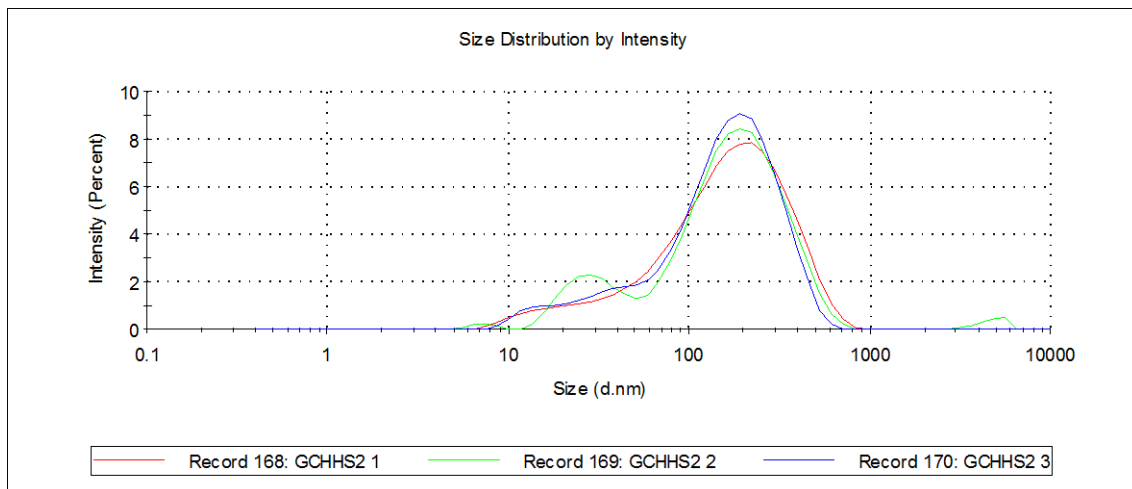
A análise do potencial zeta indica que o ganho de grupos sulfato e uma nova configuração de cadeia na qual haja mais exposição dos ácidos urônicos que restaram superou as perdas de resíduos de ácido urônico (Figura 36) que foi sinalizada pelo FTIR, pois houve um aumento das cargas superficiais em solução aquosa para GCHHS. Esse aumento de carga não pode ser justificado por desacetilação, porque o FTIR não indica perda de intensidade das bandas referentes a grupos acetil.

Figura 36 - Potencial Zeta de GCHH e GCHHS



O aumento do potencial zeta para a goma com grau de sulfatação tão baixo, combinado com a saída de resíduos de ácido urônico só pode ser explicada pelo rearranjo da macromolécula. Foi feita uma análise de tamanho de partícula (Figura 37) para averiguar se houve a formação de uma micela (nanopartícula) com ácido urônico e grupos sulfato expostos ao meio aquoso e os grupos acetil mantidos na parte interna da micela.

Figura 37 – Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHHS

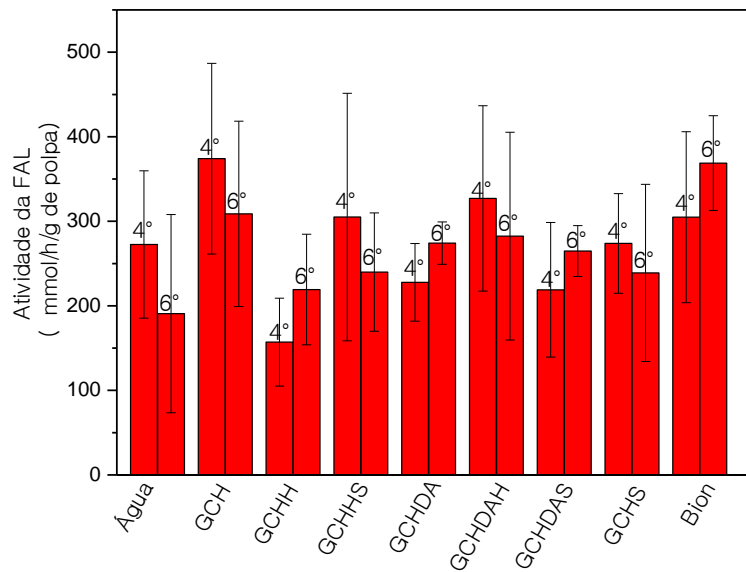


A Figura 37 mostra que GCHHS se organizou em torno de um tamanho médio de 194 nm o que poderia sugerir a formação das micelas.

6.3.3 Atividade da fenilalanina amônia-liase

Podem-se observar na Figura 38 os gráficos que revelam a atividade da PAL em grupos de mangas Tommy submetidas a nove tratamentos. A apreciação da atividade foi realizada no quarto e no sexto dia após cada tratamento. Nota-se o expressivo desvio padrão das atividades dentro de um grupo. As hipóteses são: imprecisão na coleta das amostras de polpa de cada fruto, diferenças nas quantidades de proteínas Receptoras Reconhecedoras de Padrão (PRRs) entre os frutos.

Figura 38 – Atividade da fenilalanina amônia-liase nas polpas de manga



6.3.4 Severidade da antracnose

As Figuras de 39 a 47 mostram as fotografias das mangas tratadas com água, polissacarídeos e Bion no nono dia após o tratamento. Pode-se observar nas mangas A9 (tratada com água), D2 (tratada com GCHHS), E6 (tratada com GCHDA) lesões que não foram provocadas pelo *Colletotrichum* inoculado e sim por um fungo contaminante do gênero *Lasiodiplodia*. Essa constatação foi feita com base em características morfológicas observadas no microcópico.

Figura 39 - Mangas tratadas com água



Figura 40 - Mangas tratadas com GCH



Figura 41 - Mangas tratadas com GCHH



Figura 42 - Mangas tratadas com GCHHS



Figura 43 - Mangas tratadas com GCHDA



Figura 44 - Mangas tratadas com GCHDAH



Figura 45 - Mangas tratadas com GCHDAS



Figura 46 - Mangas tratadas com GCHS



Figura 47 - Mangas tratadas com Bion



A doença se manifestou tardiamente nos frutos, por isso a medição das lesões só puderam ser realizadas no nono dia após a inoculação do fungo. Mesmo quando a doença se manifestou, dos 81 frutos tratados, apenas 25 manifestaram a doença (Tabela 3).

Tabela 4 – Quantidade de frutos afetados por tratamento

Tratamentos	Frutos totais	Frutos afetados
Água	9	4
GCH	9	3
GCHH	9	2
GCHHS	9	5
GCHDA	9	1
GCHDAH	9	3
GCHDAS	9	3
GCHS	9	2
Bion	9	2
Total	81	25

A análise estatística mostrou, talvez devido a pouca quantidade de frutos afetados no tratamento com água (controle negativo), que os resultados são inconclusivos (Tabela 3).

Tabela 5 – Análise estatística do tamanho da lesão nos frutos inoculados com *Colletrotrichum*

Tratamento	Diâmetro médio da lesão (mm)
Água	25 a1
GCH	11 a1
GCHH	6 a1
GCHHS	19 a1
GCHDA	20 a1
GCHDAH	4 a1
GCHDAS	16 a1
GCHS	4 a1
Bion	18 a1

6.4 Teste em maçãs

6.4.1 Isolamento, desacetilação e sulfatação da goma do chichá

Os rendimentos de isolamento, sulfatação e desacetilação foram 78,5, 105 e 76%, respectivamente (Tabela 2). O rendimento acima de 100% é justificado porque no processo de sulfatação ocorre a saída de um hidrogênio de massa molar de $1,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e a entrada de um grupo SO_3Na de $103,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ de massa molar. Outros autores observaram rendimentos de sulfatação acima de 100% (VIKHOREVA *et al.*, 2005; XING *et al.*, 2005). O grau de sulfatação alcançado foi de aproximadamente 0,82 (Tabela 2).

6.4.2 Caracterização dos derivados sulfatados e desacetilados

6.4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

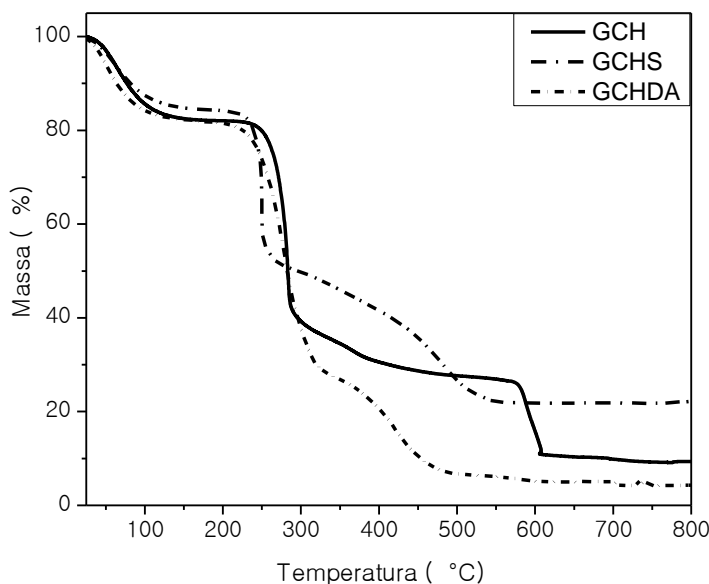
Os espectros da GCH e dos seus derivados sulfatados e desacetilados são mostrados nas Figuras 22 e 25. A banda em 1730 cm^{-1} , que estava ausente no perfil de FTIR de GCHDA, e presente no de GCH e GCHS, é atribuída a $\text{C}=\text{O}$ dos grupos acetil. A intensificação da banda em 1250 cm^{-1} foi observada para GCHS. Esta absorbância é atribuída às ligações $\text{S}=\text{O}$ dos grupos sulfato, e também ao grupo acetil (PATRA; VOJTOVÁ; MARTINOVÁ, 2015; MOURA NETO *et al.*, 2011; SALEHI *et al.*, 2011). As bandas em 818 e 584 cm^{-1} são devidas ao alongamento assimétrico e simétrico, respectivamente, das ligações $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ do grupo sulfato (CAKIĆ *et al.*, 2005).

6.4.2.2 Análise térmica (TGA, DSC)

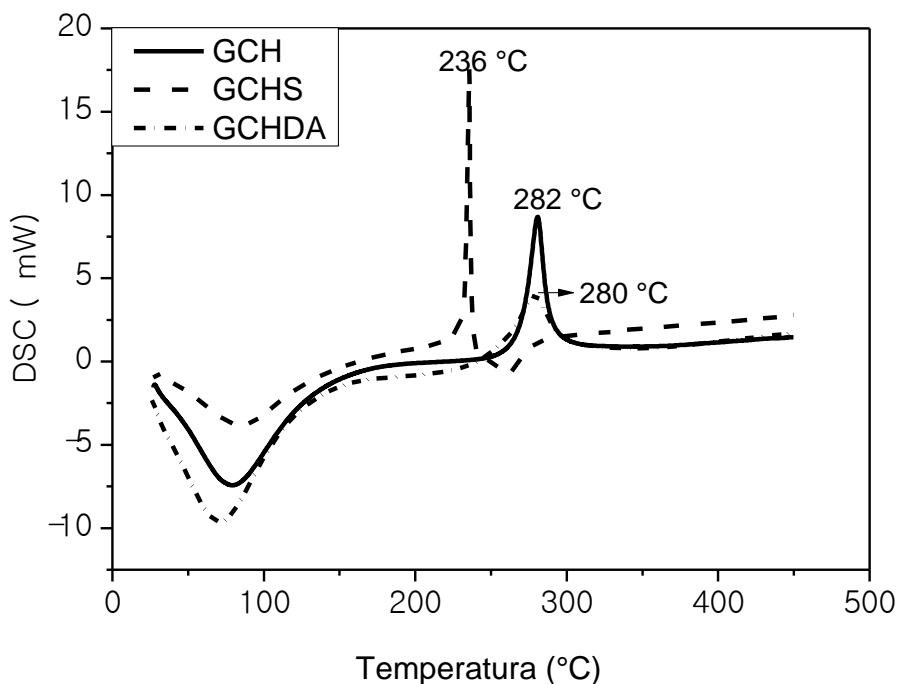
Os derivados sulfatados e desacetilados foram menos estáveis termicamente do que a goma chichá (Figura 48 e 49). A degradação começou a uma temperatura mais baixa para GCHS e GCHDA ($217,5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) do que para GCH ($236 \text{ }^\circ\text{C}$). O teor de umidade do GCH é próximo ao da GCHDA ($18,1 \pm 0,1\%$) e é maior do que o do GCHS ($15,7\%$). Esses valores estão na faixa de teor de umidade da goma karaya: 13% (SINGH; SHARMA; PAL, 2011) e 20% (PADIL; SENAN; ČERNÍK, 2015). O teor de umidade da GCHDA foi superior aos valores relatados para a goma karaya desacetilada, ou seja, $13, 15\%$ (PADIL; SENAN; ČERNÍK, 2015). Mais resíduo foi gerado a $800 \text{ }^\circ\text{C}$ para GCHS ($21,8\%$) do que para GCH

(9,2%) e GCHDA (4,6%). O aumento da quantidade de resíduo após a sulfatação deve-se à presença do contra-íon sódio (Na^+) dos grupos sulfato (PIRES *et al.*, 2013). O valor mais baixo para GCHDA em comparação com o da GCH pode ser devido à purificação não intencional da goma durante a desacetilação.

Figura 48 - Curvas de TGA (em ar) da GCH e seus derivados



A Figura 49 mostra as curvas de DSC para GCH e seus derivados. Dois eventos foram observados para todos os polissacarídeos. O primeiro (endotérmico) está relacionado à perda de água e o segundo (exotérmico) à decomposição térmica. A entalpia de perda de água seguiu a ordem: GCHDA (677 J g^{-1}) > GCH (575 J g^{-1}) > GCHS (345 J g^{-1}). A ordem foi mantida mesmo quando a diferença no teor de umidade das amostras foi levada em consideração. Esta é a mesma ordem da largura de banda OH observada nos espectros de FTIR, e pode estar relacionada à força das ligações de água e às forças intermoleculares. A degradação máxima ocorreu a $280 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ para a goma bruta e desacetilada, e a $236 \text{ }^\circ\text{C}$ para o polissacarídeo sulfatado. A entalpia de degradação foi mais baixa para GCHS (117 J g^{-1}), enquanto os valores para GCHDA e GCH foram próximos, ou seja, 156 e 163 J g^{-1} , respectivamente. A sulfatação aparentemente enfraqueceu as ligações químicas dos polissacarídeos. De acordo com Wang *et al.* (2010a) a interação repulsiva entre os grupos de sulfato adicionados leva a uma conformação estendida e rígida.

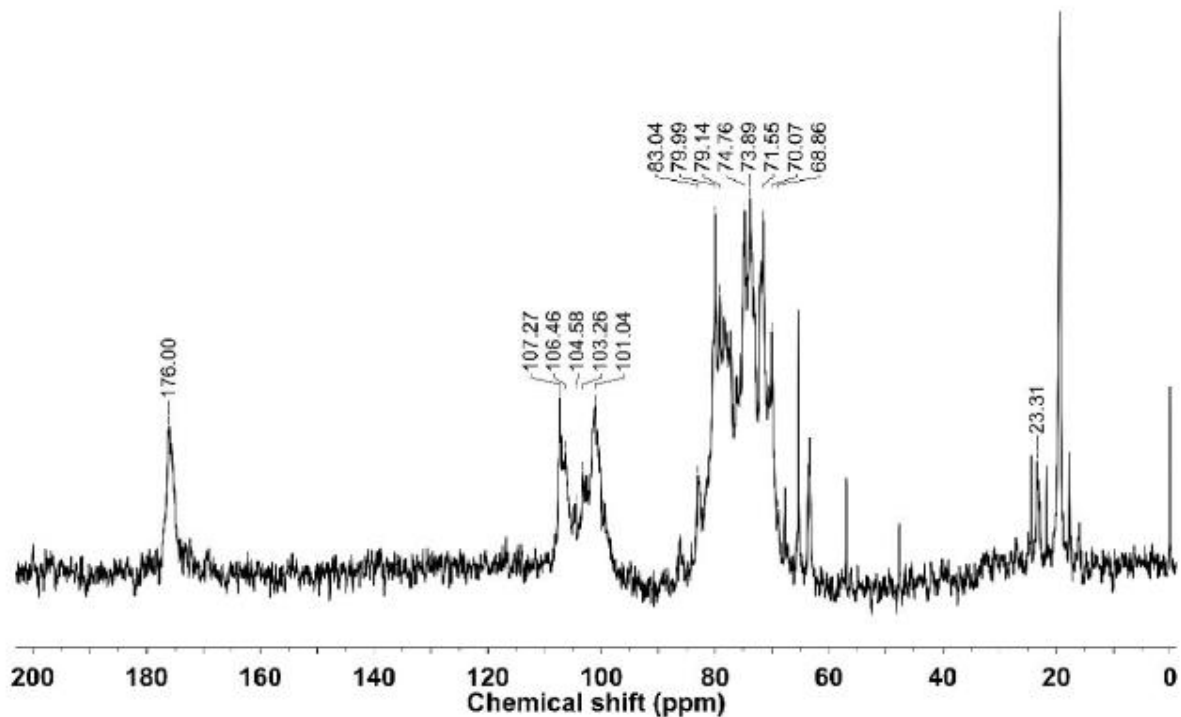
Figura 49 - Curvas de DSC (em N₂) da GCH e seus derivados

6.4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (¹³C-RMN)

A Figura 50 mostra o espectro de ¹³C-RMN de GCHS. A relação sinal/ruído é baixa. No entanto, informações importantes podem ser obtidas. Os espectros de GCH e GCHDA apresentados no Apêndice A são semelhantes aos relatados por Brito *et al.* (2004). A ausência da banda a 23,31 ppm no espectro GCHDA reafirma o sucesso da desacetilação e corrobora os resultados de FTIR. Os espectros de GCH e GCHDA mostram sinais a 60,46, 61,70, 61,21 e 61,63 ppm. Esses picos estão ausentes no perfil do GCHS e podem ser atribuídos ao carbono 6 dos resíduos de galactose (SINGH; SINGH, 2017; WANG *et al.*, 2010a). Outra possibilidade é que os picos possam ser atribuídos ao grupo 4-O-metil glucurônico ou 4-O-metil-galacturônico, mas este polissacarídeo não possui esses resíduos (BRITO *et al.*, 2004). Os dois novos picos que emergiram no espectro ¹³C-NMR de GCHS em 68,86 e 70,07 ppm, atribuídos ao carbono 6 sulfatado dos resíduos de galactose, mudaram em ~ 6 ppm para o campo inferior. O pico a 23,31 ppm no espectro ¹³C-NMR de GCHS é devido não apenas aos grupos metil de acetil (POSTULKOVA *et al.*, 2017; BRITO *et al.*, 2004), mas também aos grupos metil da ramnose sulfatada, e foi deslocado em ~ 4 ppm. Os espectros de ¹³C-NMR de materiais sulfatados são conhecidos por serem mais complexos porque os grupos sulfato retiram elétrons dos carbonos aos quais se ligam, deslocando os sinais desses carbonos para o campo inferior e doando

elétrons para carbonos vizinhos, deslocando esses sinais de carbono para o campo superior (WANG *et al.*, 2010a; YANG *et al.*, 2005).

Figura 50 - Espectro de ^{13}C -NMR da GCHS



6.4.2.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Como já mostrado na subseção ‘7.3.2. *Caracterização dos polissacarídeos*’ os polissacarídeos modificados necessitaram de um volume maior de eluente. Isso sugere que a sulfatação e a desacetilação degradam o polissacarídeo. As massas molares médias (M_w e M_n) de GCH são 15×10^6 e $0,40 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, respectivamente. A massa molar de GCHS diminuiu para $3,8 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ (cerca de quatro vezes), mas nenhum estudo de sulfatação foi encontrado para karaya ou GCH para comparar.

6.4.2 Avaliação da produção de compostos de defesa em maçãs Pink Lady

A atividade das enzimas GPX e PPO foi registrada para polpas de maçã ‘Pink Lady’ tratadas com goma e água (Ctrl-). O BTH foi adotado como controle positivo para testar as propriedades elicitoras dos materiais.

A atividade de GPX aumentou significativamente ($p < 0,05$) com GCHDA e GCHS em 12–48 h (Figura 51a e b). O BTH (4 mg mL^{-1}) induziu aumento na atividade do GPX em 12 h, enquanto não houve aumento significativo ($p > 0,05$) nos demais momentos. GPX desempenha um papel essencial na biossíntese de lignina em tecidos vegetais, pois essas enzimas catalisam a reticulação de monômeros da rota fenilpropanóide (álcoois coniferil, sinapil e p-cumaril) e seu acoplamento nas subunidades de polifenóis heterogêneos. A lignina está associada à indução da defesa da planta, pois fortalece as paredes celulares, dificultando a entrada de patógenos (PASSARDI *et al.*, 2005; VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980).

A atividade de PPO na polpa de maçã aumentou ($p < 0,05$) após 12–48 h de exposição a GCHDA (Figura 52b), conforme relatado para GPX. Entretanto, para as polpas de maçã tratadas com GCHS, a atividade do PPO aumentou apenas às 12 e 24 h ($p < 0,05$). GCHS induziu um aumento de quase duas vezes na atividade de PPO em 24 h. O BTH causou aumento às 12 e 24 horas. PPO também são consideradas enzimas marcadoras da resistência de plantas contra patógenos, pois já foram diversas vezes relacionadas com a defesa de vegetais, como no milho contra *Sclerospora graminicola* (RAJ; SAROSH; SHETTY, 2006), no tomateiro contra *Pseudomonas syringae* (LI; STEFFENS, 2002), no trigo contra *Fusarium graminearum* (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002), em maçãs contra *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* (ABOURAÏCHA *et al.*, 2017). Essas enzimas oxidam compostos fenólicos em quinonas tóxicas que podem agir contra patógenos invasores (ABOURAÏCHA *et al.*, 2017) e são enzimas essenciais para a síntese de lignina (REN *et al.*, 2014).

Figura 51 - Atividade de GPX em maçãs Pink Lady em diferentes tempos após a pulverização com água destilada (controle, Ctrl) e GCHDA (a), GCHS (b) e BTH (c)

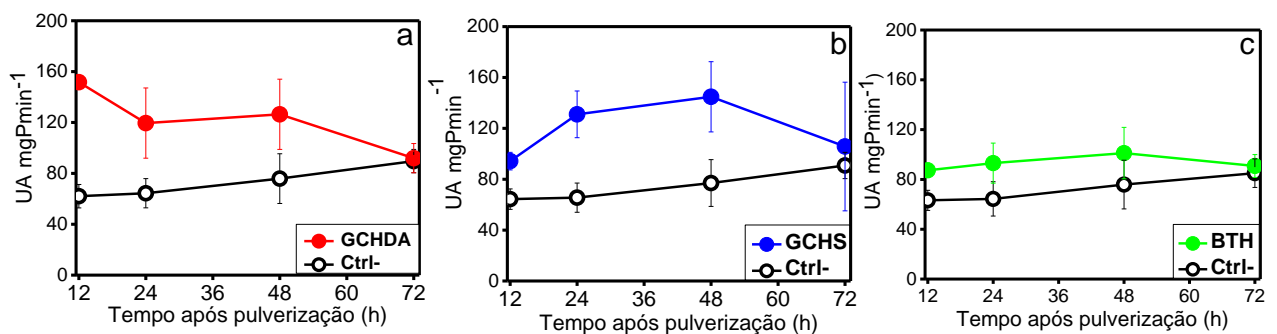
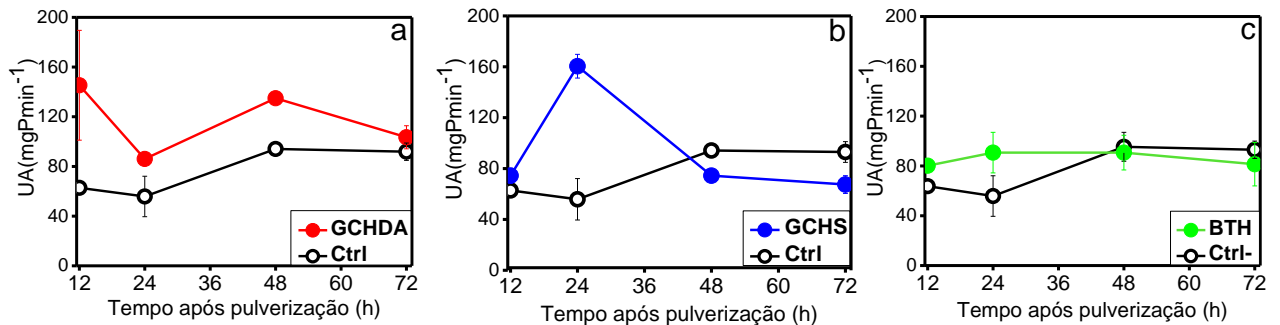


Figura 52 - Atividade de PPO em maçãs Pink Lady após pulverização com água destilada (controle, Ctrl) e GCHDA (a), GCHS (b) e BTH (c)



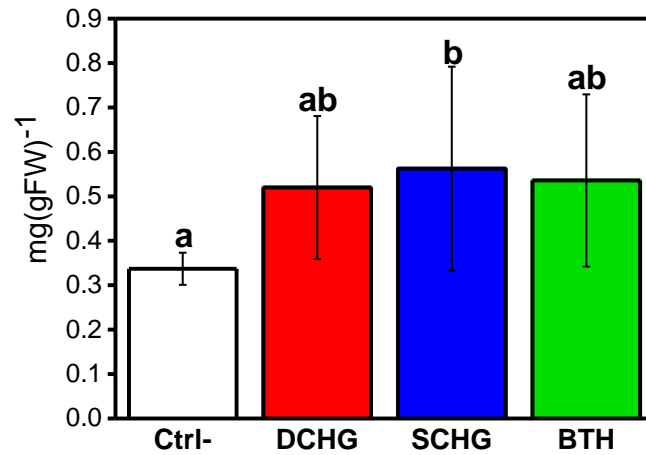
Como as duas enzimas analisadas estão envolvidas na síntese de lignina, composto que já foi correlacionado positivamente em alguns trabalhos com aumento de resistência de maçãs (VILANOVA *et al.*, 2014; SU *et al.*, 2011; VALENTINES *et al.*, 2005), seu conteúdo nos frutos foi quantificado 72 h após o tratamento. Como esperado, devido ao aumento na atividade de GPX e PPO, os frutos tratados com GCHDA, GCHS e BTH apresentaram níveis de lignina numericamente superiores aos da testemunha. Porém, apenas os frutos tratados com GCHS apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de lignina. O teor de lignina dos frutos tratados com GCHDA e BTH foi estatisticamente semelhante ao do controle e GCHS ($p > 0,05$).

A fraca indução de compostos de defesa (GPX, PPO e lignina) do BTH em maçãs Pink Lady pode ser explicada pelo baixo desempenho do BTH nesta cultivar. Marolleau *et al.* (2017) trataram as cultivares de maçã Elstar, Fuji, Gala, Golden e Pink Lady com BTH. E relataram que a cultivar Pink Lady apresentou o menor nível de indução de defesa constitutiva. A susceptibilidade dessa cultivar a doenças vem sendo relatada em diversos trabalhos. Gur, Reuveni e Cohen (2016) mostraram que 80% das frutas de alguns pomares apresentavam manchas causadas por *Alternaria alternata f. sp. mali*. As Cripps Pink pareceram também mais suscetíveis à podridão do olho-de-boi causada por *Neofabraea spp.* (DI FRANCESCO *et al.*, 2019) e à infecção de sarna foliar causada por *Spilocaea pomi* (WASHINGTON *et al.*, 1998).

Os resultados sugerem síntese 'de novo' de lignina desencadeada pelas gomas, principalmente GCHS, em maçãs Pink Lady. A goma que induziu a resposta de defesa mais forte é aquela que possui simultaneamente os três resíduos sugeridos pela literatura como responsáveis pela indução de compostos de defesa: grupos ramnose, ácido urônico e sulfato. Este trabalho reafirma a importância desses resíduos e sugere que os polissacarídeos do

exsudato vegetal devem ser mais explorados, pois podem ser uma fonte promissora de compostos indutores de defesa em plantas.

Figura 53 - Teor de lignina (derivados de TGA, mg g^{-1} FW) extraída de polpas de maçã (cv. Pink Lady) 72 h após pulverização com eliciadores. As maçãs controle (Ctrl-) foram pulverizadas com água destilada. As mesmas letras indicam que os valores não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).



7 CONCLUSÃO

7.1 Teste com as mangas

O polissacarídeo de *Sterculia striata* (goma chichá) foi pela primeira vez, sulfatado. Foram produzidos seis derivados a partir da goma do chichá. As modificações foram confirmadas por FTIR. A reação de sulfatação foi exitosa somente para a goma do chichá *in natura*, não sendo satisfatória para a goma do chichá desacetilada ou hidrolisada. A goma hidrolisada e sulfatada parece ter gerado micelas em solução aquosa. Os testes dos polissacarídeos como elicitores em mangas foram inconclusivos devido aos grandes desvios padrões na determinação da atividade da PAL e à baixa incidência de antracnose nas frutas testemunhas.

7.2 Teste com as maçãs

As modificações da goma chichá foram confirmadas por FTIR e ^{13}C -NMR. O TGA mostrou que os derivados foram termicamente mais lábeis. O DSC revelou que a desacetilação favorece interações intermoleculares e a sulfatação as enfraquece, e também atestou que as ligações químicas enfraquecem nos dois derivados com mais ênfase para a GCHS. O GPC indicou que o GCHS e o GCHDA tiveram suas massas molares reduzidas. Conforme indicado pela RMN ^{13}C , ocorreu sulfatação no carbono 6 da galactose. Ambos os derivados da goma chichá têm a capacidade de induzir o aumento da atividade enzimática relacionada à defesa nas maçãs Pink Lady. A melhor indução veio do polissacarídeo que continha as três subunidades mencionadas na literatura como envolvidas na produção de compostos de defesa (resíduos de ramnose e ácido urônico e grupos sulfato). Em vista desses resultados, espera-se que outros pesquisadores explorem ainda mais os polissacarídeos de exsudato de plantas como indutores de compostos de defesa em maçãs Pink Lady.

REFERÊNCIAS

- ABOURAÏCHA, E.; EL ALAOUI TALIBI, Z.; EL BOUTACHFAITI, R.; PETIT, E.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J.; EL MODAFAR, C. Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 121–128, 2015.
- ABOURAÏCHA, E. F.; EL ALAOUI-TALIBI, Z.; TADLAOUI-OUAFI, A.; EL BOUTACHFAITI, R.; PETIT, E.; DOUIRA, A.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J.; EL MODAFAR, C. Glucuronan and oligoglucuronans isolated from green algae activate natural defense responses in apple fruit and reduce postharvest blue and gray mold decay. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 471–480, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). *Registros e autorizações de agrotóxicos*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/01/2020.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Biotoxic impact of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Klebsiella* sp. isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. **Journal of Pest Science**, v. 85, p. 29–36, 2012.
- ALI, A.; MAQBOOL, M.; RAMACHANDRAN, S.; ALDERSON, P. G. Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 58, p. 42–47, 2010.
- AMARADASA, B. S.; EVERHART, S. E. Effects of Sublethal Fungicides on Mutation Rates and Genomic Variation in Fungal Plant Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, e0168079, 2016.
- ANDERSON, D. M. W.; DEA, I. C. M.; HIRST, S. E. Studies on uronic acid materials. Part XXXII. Some structural features of the gum exudates from *Acacia seyal* del. **Carbohydrate Research**, v. 8, p. 460-476, 1968.
- ANDERSON, D. M. W.; MCNAB, C. G. A.; ANDERSON, C. G. Studies of uronic acid materials, Part 58: Gum exudates from the genus *Sterculia* (gum karaya). **International Tree Crops Journal**, v. 2, p. 147–154, 1983.
- APOLINAR-VALIENTE, R.; WILLIAMS, P.; NIGEN, M.; TAMAYO, V. M.; DOCO, T.; SANCHEZ, C. Recovery, structure and physicochemical properties of an aggregate-rich fraction from *Acacia senegal* gum. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 864–873, 2019.
- ARAUJO, L.; STADNIK, M. J. Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, p. 287-293, 2013.
- ASPINALL, G. O.; KHONDO, L.; WILLIAMS, B. A. The hex-5-enose degradation: cleavage of glycosiduronic acid linkages in modified methylated *Sterculia* gums. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 65, p. 2069-2076, 1987.

AZIZ, A.; GAUTHIER, A.; BEZIER, A.; POINSSOT, B.; JOUBERT, J. M.; PUGIN, A.; HEYRAUD, A.; BAILLIEUL, F. Elicitor and resistance-inducing activities of b-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with b-1,3 glucans and a-1,4 oligogalacturonides. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1463–1472, 2007.

BASHIR, S.; TEO, Y. Y.; RAMESH, S.; RAMESH, K. Synthesis and characterization of karaya gum-g- poly (acrylic acid) hydrogels and in vitro release of hydrophobic quercetin. **Polymer**, v. 147, p. 108-120, 2018.

BASIT, A.; HANAN, A.; NAZIR, T.; MAJEED, M. Z.; QIU, D. Molecular and Functional Characterization of Elicitor PeBC1 Extracted from *Botrytis cinerea* Involved in the Induction of Resistance against Green Peach Aphid (*Myzus persicae*) in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Insects**, v. 10, p. 1-10, 2019.

BEAUVÉRIE, J. Pathologie végétale. - Essais d'immunisation des végétaux contre les maladies cryptogamiques. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, Paris, p. 107-110, 1901.

BERNERS-LEE, M.; KENNELLY, C.; WATSON, R.; HEWITT, C. N. Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation. **Elementa Science of the Anthropocene**, v. 6, Article 52.

BEBBER, D. P.; RAMOTOWSKI, M. A. T.; GURR, S. J. Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. **Nature Climate Change**, v. 3, p. 985-988, 2013.

BOUAZIZ, F.; KOUBAA, M.; HELBERT, C. B.; KALLEL, F.; DRISS, D.; KACEM, I.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Purification, structural data and biological properties of polysaccharide from *Prunus amygdalus* gum. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 578-584, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrotóxicos: registros de agrotóxicos e informações técnicas**, 2019. Disponível em: <http://www.mapa.gov.br>. Acesso em 20/01/2019.

BRITO, A. C. F.; SIERAKOWSKIB, M. R.; REICHERC, F.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. Dynamic rheological study of *Sterculia striata* and karaya polysaccharides in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 861–867, 2005.

BRITO, A. C. F.; SILVA, D. A.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. *Sterculia striata* exudate polysaccharide: characterization, rheological properties and comparison with *Sterculia urens* (karaya) polysaccharide. **Polymer International**, v. 53, p. 1025–1032, 2004.

BURITI, F. C. A.; DOS SANTOS, K. M. O.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; SÁ, D. M. A. T.; SALES, H. O.; OLIVEIRA, G.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOREIRA, R. A.; EGITO, A. S. Characterisation of partially hydrolysed

galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 512-521, 2014.

BURKETOVA, L.; TRDA, L.; OTT, P. G.; VALENTOVA, O. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 994–1004, 2015.

CAILLOT, S.; RAT, S.; TAVERNIER, M-L.; MICHAUD, P.; KOVENSKY, J.; WADOUACHI, A.; CLÉMENT, C.; BAILLIEUL, F.; PETIT, E. Native and sulfated oligoglucuronans as elicitors of defence-related responses inducing protection against *Botrytis cinerea* of *Vitis vinifera*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1728–1736, 2012.

CAKIĆ, M.; NIKOLIĆ, G.; ILIĆ, L.; STANKOVIĆ, S. Synthesis and FTIR characterization of some dextran sulphates. **Chemical Industry e Chemical Engineering Quarterly**, v. 11, p. 74-78, 2005.

CASTELLANI, O.; AL-ASSAF, S.; AXELOS, M.; PHILLIPS, G. O.; ANTON, M. Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 2 – Adsorption properties at the n-hexadecane–Water interface. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 121–130, 2010.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicioso* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 26, p. 729-738, 2007.

CHALAL, M.; WINKLER, J. B.; GOURRAT, K.; TROUVELOT, S.; ADRIAN, M.; SCHNITZLER, J-P.; JAMOIS, F.; DAIRE, X. Sesquiterpene volatile organic compounds (VOCs) are markers of elicitation by sulfated laminarine in grapevine. **Frontiers in Plant Science**, v. 6. p. 1-9, 2015.

CHANDLER, D.; BAILEY, A. S.; TATCHELL, G. M.; DAVIDSON, G.; GREAVES, J.; GRANT, W. P. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 366, p. 1987–1998, 2011.

CHRESTANI, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; UCHOA, D. A. E.; NOZAWA, C.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; ONO, L. *In vitro* antiherpetic and antirrotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 453-457, 2009.

CHIQUITO-CONTRERAS, R. G.; MURILLO-AMADOR, B.; CARMONA-HERNANDEZ, S.; CHIQUITO-CONTRERAS, C. J.; HERNANDEZ-MONTIEL, L. G. (). Effect of Marine Bacteria and Ulvan on the Activity of Antioxidant Defense Enzymes and the Bio-Protection of Papaya Fruit against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Antioxidants**, v. 8, p. 1-14, 2019.

CLIFFORD, J. C.; RAPICAVOLI, J. N.; ROPER, M. C. A rhamnose-rich O-antigen mediates adhesion, virulence and host colonization for the xylem-limited phytopathogen, *Xylella fastidiosa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, p. 676–685, 2013.

COLE, M. B.; AUGUSTIN, M. A.; ROBERTSON, M. J.; MANNERS, J. M. The science of food security. **npj Nature Partner Journals**, v. 14 p. 1-14, 2018.

- DARIO, A. F.; DE PAULA, R. C. M.; PAULA, H. C. B.; FEITOSA, J. P. A.; PETRI, D. F. S. Effect of solvent on the adsorption behavior and on the surface properties of *Sterculia striata* polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 284–290, 2010.
- DELGOBO, C. L.; GORIN, P. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.
- DE MICCO, V.; BALZANO, A.; WHEELER, E. A.; BAAS, P. Tyloses and gums: a review of structure, function and occurrence of vessel occlusions. **Journal International Association of Wood Anatomists**, v. 37, p. 186–205, 2016.
- DESHMUKH, A. S.; SETTY, C. M.; BADIGER, A. M.; MURALIKRISHNA, K. S. Gum ghatti: A promising polysaccharide for pharmaceutical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 980–986, 2012.
- DI FRANCESCO, A.; CAMELDI, I.; NERI, F.; BARBANTI, L.; ANNIBALE, F., A.; SPADONI, A.; BARALDI, E. Effect of apple cultivars and storage periods on the virulence of *Neofabraea spp.* **Plant Pathology**, v. 68, p. 1525–1532, 2019.
- DODI, G.; HRITCU, D.; POPA, M. I. Carboxymethylation of Guar Gum: Synthesis and Characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, p. 171-176, 2011.
- ECHEVERRÍA-SÁENZ, S.; MENA, F.; PINNOCK, M.; RUEPERT, C.; SOLANO, K.; CRUZ, E.; CAMPOS, B.; SÁNCHEZ-AVILA, J.; LACORTE, S.; BARATA, C. Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jiménez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica). **Science of The Total Environment**, v. 440, p. 106-114, 2012.
- EL-SHORA, H. M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. **Plant Science**, v. 162, p. 1–7, 2002.
- EL MODAFAR, C.; ELGADDA, M.; EL BOUTACHFAITI, R.; ABOURAICHA, E.; ZEHHARA, N.; PETIT, E.; EL ALAOUITALIBI, Z.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J. Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. **Scientia Horticulturae**, v. 138, v. 55–63, 2012.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. **EFSA Journal**, v. 15, article number e04791, 2017.
- FABIO, J. L. D.; DUTTON, G. G. S.; MOYNA, P. The structure of *Chorisia speciosa* gum. **Carbohydrate Research**, v. 99, p. 41-50, 1982.
- FAO. **Feeding the world in 2050**. p. 1-4, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/meeting/018/k6021e.pdf> . Acesso em 20/02/2019.

FERREIRA, S. R. S.; MESQUITA, M. V. N.; SÁ, L. L. F.; NOGUEIRA, N. C.; RIZZO, M. S.; SILVA-FILHO, E. C.; COSTA, M. P.; RIBEIRO, A. B. Sustainable natural gums for industrial application: Physicochemical and texturometric evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, Article number 101306, 2019.

FONES, H. N.; BEBBER, D. P.; CHALONER, T. M.; KAY, W. T.; STEINBERG, G.; GURR, S. J. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. **Nature Food**, v. 1, p. 332–342, 2020.

FREITAS, M. B.; FERREIRA, L. G.; HAWERROTH, C.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; STADNIK, M. J. Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 384–390, 2015.

FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Ulvan induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Alternaria brassicicola* requires reactive oxygen species derived from NADPH oxidase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 90, p. 49-56, 2015.

FRIED, G.; CHAUVEL, B.; REYNAUD, P.; SACHE, I. Decreases in Crop Production by Non-native Weeds, Pests, and Pathogens. In: M. Vilà, P.E. Hulme (eds.), **Impact of Biological Invasions on Ecosystem Services**, Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology v. 12, p. 83-101, 2017.

GABARDO, G. C.; FREITAS, L. P.; CONTINI, R. H.; FARINA, E.; SANTOS, K. C.; SOUZA, V. N.; FURTADO, L. L. Strategies for Increasing the Apple Epidermis Red Colored with Physiogrow® Color. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 34, p. 1-7, 2019.

GALVANI, G. **Brasil tem um novo registro de agrotóxico por dia em 2019**. Carta Capital, São Paulo, 21 maio 2019. Disponível em: <https://www.cartacapital.com.br/politica/brasil-tem-um-novo-registro-de-agrotoxico-por-dia-em-2019/>. Acesso em: 20/09/2019.

GANGAPURAM, B. R.; BANDI, R.; DADIGALA, R.; KOTU, G. M.; GUTTENA, V. Facile Green Synthesis of Gold Nanoparticles with Carboxymethyl Gum Karaya, Selective and Sensitive Colorimetric Detection of Copper (II) Ions. **Journal of Cluster Science**, v. 28, p. 2873–2890, 2017.

GAUTHIER, A.; TROUVELOT, S.; KELLONIEMI, J.; FRETTEINGER, P.; WENDEHENNE, D.; DAIRE, X.; JOUBERT, J.-M.; FERRARINI, A.; DELLEDONNE, M.; FLORS, V.; POINSSOT, B. The Sulfated Laminarin Triggers a Stress Transcriptome before Priming the SA- and ROS-Dependent Defenses during Grapevine's Induced Resistance against *Plasmopara viticola*. **PLoS ONE**, v. 9, Article number e88145, 2014.

GONZÁLEZ, L. C.; GARCÍA, B. L. M.; NICAÑO, M. E. L.; FERNÁNDEZ, A. R.; ALBERNAL, M. G. Efecto in vitro de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. **Fitosanidad**, v. 15, p. 31-38, 2011.

GUR, L.; REUVENI, M.; COHEN, Y. Occurrence and etiology of *Alternaria* leaf blotch and fruit spot of apple caused by *Alternaria alternata* f. sp. *mali* on cv. Pink lady in Israel. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, p. 695-708, 2016.

- HAHN, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. **Journal of Chemical Biology**, v. 7, p. 133–141, 2014.
- HAMDANI, A. M.; WANI, I. A.; GANI, A.; BHAT, N. A.; MASOODI, F. A. Effect of gamma irradiation on physicochemical, structural and rheological properties of plant exudate gums. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 44, p. 74–82, 2017.
- HASSAN, M. A. E.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance to fire blight in apple by acibenzolar-S-methyl and DL-3-aminobutyric acid. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 114, p. 151–158, 2007.
- HÉMATY, K.; CHERK, C.; SOMERVILLE, S. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 406–413, 2009.
- HILLOCKS, R. J. Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. **Crop Protection**, v. 31, p. 85–93, 2012.
- HJORTH, K.; JOHANSEN, K.; HOLEN, B.; ANDERSSON, A.; CHRISTENSEN, H. B.; SIIVINEN, K.; TOOME, M. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America - A Nordic Project, **Food Control**, v. 22, p. 1701–1706, 2011.
- HUANG, G.; CHEN, X.; HUANG, H. Chemical Modifications and Biological Activities of Polysaccharides. **Current Drug Targets**, v. 17, p. 1799–1803, 2016.
- JANAKI, B.; SASHIDHAR, R. B. Physico-chemical analysis of gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): a potential food additive. **Food Chemistry**, v. 61, p. 231–236, 1998.
- JAULENEAU, V.; LAFITTE, C.; JACQUET, C.; FOURNIER, S.; SALAMAGNE, S.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ TUGAYÉ, M.; DUMAS, B. Ulvan, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article number 525291, 2010
- JIMÉNEZ-MALDONADO, M. I.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M. E.; RASCÓN-CHU, A.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; LIZARDI-MENDOZA, J.; TRONCOSO-ROJAS, R. Analysis of rhamnogalacturonan I fragments as elicitors of the defense mechanism in tomato fruit. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 78, p. 339–349, 2018.
- KARIMI, N.; MOHAMMADIFAR, M. A. Role of water soluble and water swellable fractions of gum tragacanth on stability and characteristic of model oil in water emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 124–133, 2014.
- KARUNANAYAKE, K. O. L. C. Postharvest Application Of Defence Elicitors To Managae Anthracnose In Mango Fruit. **Journal of Science of the University of Kelaniya**, v. 12, p. 66–82, 2019.
- KNORR, D.; KHOO, C. S. H.; AUGUSTIN, M. A. Food for an Urban planet: challenges and research Opportunities. **Frontiers in Nutrition**, v. 4, Article number 73, 2018.

KONGTRAGOUL, P.; NALUMPANG, S.; MIYAMOTO, Y.; IZUMI, Y.; AKIMITSU, K. Mutation at codon 198 of TUB2 gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. **Journal of Plant Protection Research**, v. 51, p. 377-384, 2011.

KOSHY, K. M.; BOGGS, J. M. The effect of anomerism and hydration on the C–O–S vibrational frequency of D-galactose-3-sulfate determined by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 297, p. 93-99, 1997.

KROK, K.; WIENIARSKA, J. **Effect of goëmar BM 86 application on development and quality of primocane raspberry fruits**. Monograph. In: Biostimulators in modern agriculture University of Life Sciences in Lublin, Poland, p. 49-58, 2008.

KUĆ, J. Development and future direction of induced systemic acquired resistance in plants. **Crop Protection**, v. 19, p. 859–861, 2000.

KUDLE, K. R.; DONDA, M. R.; MERUGU, R.; PRASHANTHI, Y.; KUDLE, M. R.; PRATAP RUDRA, M. P. Green synthesis of silver nanoparticles using water soluble gum of *Sterculia foetida* and evaluation of its antimicrobial activity. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 563-568, 2013.

LACERDA, K. A. P.; SILVA, M. M. S.; CARNEIRO, M. A. C.; REIS, E. F.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada no crescimento inicial de seis espécies arbóreas do cerrado. **Cerne, Lavras**, v. 17, p. 377-386, 2011.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1765-1774, 2007.

LE CERF, D. L.; IRINEI, F.; MULLER, G. Solution Properties of Gum Exudates from *Sterculia urens* (Karaya Gum). **Carbohydrate Polymers**, v. 13, p. 375-386, 1990.

LEWIS, J. S.; GRAYBILL, J. R. Fungicidal versus Fungistatic: what's in a word? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, p. 927-935, 2008.

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, v. 215, p. 239–247, 2002.

LIMA, E. N.; OSTER, A. H.; BORDALLO, P. N.; ARAUJO, A. A. C.; SILVA, D. E. M.; LIMA, C. S. A novel lineage in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex is one of the causal agents of *Fusarium* rot on melon fruits in northeast Brazil. **Plant Pathology** (online), v. 70, p. 133-143, 2021.

LI, S.; JIANG, H.; WANG, Y.; LYU, L.; PRUSKY, D.; JI, Y.; ZHENG, X.; BI, Y. Effect of benzothiadiazole treatment on improving the mitochondrial energy metabolism involved in induced resistance of apple fruit during postharvest storage. **Food Chemistry**, v. 302, p. 125-288, 2020.

LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J.; WANG, F. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 370–375, 2009.

LUCAS, J. A. Plant immunisation: from myth to SAR. **Pesticide Science**, v. 55, p. 193–196, 1999.

MAGALHÃES JR., G. A.; MOURA NETO, E.; SOMBRA, V. G.; RICHTER, A. R.; ABREU, C. M. W. S.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B.; GOYCOOLEA, F. M.; PAULA, R. C. M. Chitosan/*Sterculia striata* polysaccharides nanocomplex as a potential chloroquine drug release device. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 244-253, 2016.

MAGGI, F.; TANG, F. H. M.; CECILIA, D.; MCBRATNEY, A. PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. **Scientific Data**, v. 6, Article number 170, 2019.

MANI, S. D.; NAGARATHNAM, R. Sulfated polysaccharide from *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva primes defense responses against anthracnose disease of *Capsicum annum* Linn. **Algal Research**, v. 32, p. 121–130, 2018.

MANUAL DE SEGURANÇA E QUALIDADE PARA A CULTURA DA MAÇÃ. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004.

MAROLLEAU, B.; GAUCHER, M.; HEINTZ, C.; DEGRAV, A.; WARNEYS, R.; ORAIN, G.; LEMARQUAND, A.; BRISSET, M-N. When a Plant Resistance Inducer Leaves the Lab for the Field: Integrating ASM into Routine Apple Protection Practices. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, Article number 1938, 2017.

MASSIOT, P.; BARON, A.; DRILLEAU, J. F. Characterisation and enzymatic hydrolysis of cell-wall polysaccharides from different tissue zones of apple. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 145-154, 1994.

MATE, C. J.; MISHRA, S. Exploring the Potential of Moi Gum for Diverse Applications: A Review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, p. 1579–1591, 2020.

MATERIAL SAFETY DATA SHEET (MSDS) Byon®, Syngenta, 4/16/2015. Disponível em: <https://assets.greenbook.net/M114161.pdf>, acesso em: 5/10/2020.

MAZZINI, M. N.; CERESO, A. S. The Carbohydrate and Protein Composition of the Endosperm, Embryo and Testa of the Seed of *Gleditsia triacanthos*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 881-891, 1979.

MCGREGOR, D.; BOOBIS, A.; BINAGLIA, M.; BOTHAM, P.; HOFFSTADT, L.; HUBBARD, S.; PETRY, T.; RILEY, A.; SCHWARTZ, D.; HENNES, C. Guidance for the classification of carcinogens under the Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). **Critical Review in Toxicology**, v. 40, p. 245-285, 2010.

MÉNARD, R.; ALBAN, S.; RUFFRAY, P.; JAMOIS, F.; FRANZ, G.; FRITIG, B.; YVIN, J-C.; KAUFFMANN, S. b-1,3 Glucan Sulfate, but Not b-1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 16, p. 3020–3032, 2004.

MÉNARD, R.; RUFFRAY, P.; FRITIG, B.; YVIN, J-C.; KAUFFMANN, S. Defense and Resistance-inducing Activities in Tobacco of the Sulfated β -1,3 glucan PS3 and its Synergistic Activities with the Unsulfated Molecule. **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 1964–1972, 2005.

MERCIER, L.; LAFITTE, C.; BORDERIES, G.; BRIAND, X.; ESQUERRÉTUGAYÉ, M.; FOURNIER, J. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. **New Phytologist**, v. 149, p. 43-51, 2001.

MÉRIGOUT, P. **Étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants cultureux. Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté.** Sciences of the Universe [physics]. *INAPG (AgroParisTech)*, 2006.

MITRA, S.; MUKHERJEE, A.; WILEY-KALIL, A.; DAS, S.; OWEN, H.; REDDY, P. M.; ANÉ, J-M.; JAMES, E. K.; PRASAD GYANESHWAR. A rhamnose-deficient lipopolysaccharide mutant of *Rhizobium* sp. IRBG74 is defective in root colonization and beneficial interactions with its flooding-tolerant hosts *Sesbania cannabina* and wetland rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 5869–5884, 2016.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, p. 491–498, 2002.

MOLAEI, H.; JAHANBIN, K. Structural features of a new water-soluble polysaccharide from the gum exudates of *Amygdalus scoparia* Spach (Zedo gum). **Carbohydrate Polymers**, v. 182, p. 98–105, 2018.

MONTEALEGRE, J. R.; LÓPEZ, C.; STADNIK, M. J.; HENRÍQUEZ, J. L.; HERRERA, R.; POLANCO, R.; DI PIERO, R. M.; PÉREZ, L. M. Control of grey rot of apple fruits by biologically active natural products. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 271-276, 2010.

MONTIES, B. **Lignins.** In: DEY, P.M.; HARBORNE, J. B. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, v. 1. Academic Press, New York, p. 113–157, 1989.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, v. 160, p. 355–360, 2001.

MOURA NETO, E.; MACIEL, J. S.; CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1953-1960, 2011.

MOUSAVI, E. A.; NASIBI, F.; KALANTARI, K. M.; OLOUMI, H. Stimulation effect of carrageenan on enzymatic defense system of sweet basil against *Cuscuta campestris* infection. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, p. 286–294, 2017.

OERKE, E.-C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, p. 31–43, 2006.

OFORIKWAKYE, K.; ASANTEWAA, Y.; KIPO, S. L. Physicochemical And Binding Properties Of Cashew Tree Gum In Metronidazole Tablet Formulations. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 105-109, 2010.

OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146–151, 2014.

PADIL, V. V. T.; SENAN, C.; ČERNÍK, M. Dodecenylsuccinic Anhydride Derivatives of Gum Karaya (*Sterculia urens*): Preparation, Characterization, and Their Antibacterial Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 3757-3765, 2015.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reporter**, v. 24, p. 255-265, 2005.

PATRA, N.; VOJTOVA, L.; MARTINOVA, L. Deacetylation-induced changes in thermal properties of *Sterculia urens* gum. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 122, p. 235–240, 2015.

PETTONGKHAO, S.; BILANGLD, A.; KHOMPATARA, K.; CHURNGCHOW, N. Sulphated Polysaccharide from *Acanthophora spicifera* Induced *Hevea brasiliensis* Defense Responses Against *Phytophthora palmivora* Infection. **Plants**, v. 8, p. 73, 2019.

PEYMAN, S.; YOUSEF, D.; FATEMEH, M.T.; FATEMEH, S.; REZA, R. Structural and compositional characteristics of a sulfated galactan from the red alga *Gracilaria psispersica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1570-1574, 2011.

Pinto, G. L.; Martínez, M.; Rivas, C. Chemical and spectroscopic studies of *Cercidium praecox* gum exudates. **Carbohydrate Research**, v. 260, p. 17-25, 1994.

PIRES, L.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. An active heparinoid obtained by sulphation of galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 165-169, 2001.

PIRES, N. R.; CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; ANGELIM, A. L.; MELO, V. M. M.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 92–99, 2013.

PISSONNIER, S.; LAVIGNE, C.; TOUBON, J.-F.; LE GAL, P.-Y. Factors driving growers' selection and implementation of an Apple crop protection strategy at the farm level. **Crop Protection**, v. 88, p. 109-117, 2016.

POSTULKOVA, H.; CHAMRAĐOVA, I.; PAVLINAK, D.; HUMPA, O.; JANCAR, J.; VOJTOVA, L. Study of effects and conditions on the solubility of natural polysaccharide gum karaya. **Food Hydrocolloids**, v. 67, p. 148-156, 2017.

POVOLNY, M. The influence of sea-weeds extracts on the storability of apples. **Rostlinna Vyroba**, v. 15, p. 545-554, 1969.

QUAGLIA, M.; EDERLI, L.; PASQUALINI, S.; ZAZZERINI, A. Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, p. 307-315, 2011.

RAJ, S. N.; SAROSH, B. R.; SHETTY, H. S. Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 563-571, 2006.

RAMKISSOON, A.; RAMSUBHAG, A.; JAYARAMAN, J. Phytoelicitor activity of three Caribbean seaweed species on suppression of pathogenic infections in tomato plants. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 3235-3244, 2017.

RAUH, V. A.; PERERA, F. P.; HORTON, M. K.; WHYATT, R. M.; BANSAL, R.; HAO, X.; LIU, J.; BARR, D. B.; SLOTKIN, T. A.; PETERSON, B. S. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. **PNAS**, v. 109, p. 7871-7876, 2012.

RAUSHER, M. D. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. **Nature**, v. 411, p. 857-864, 2001.

RAY, J. Les maladies cryptogamiques des végétaux. **Revue Générale de Botanique**, Paris, v. 13, p. 145-151, 1901.

RAZAVI, S. M. A.; CUI, S. W.; GUO, Q.; DING, H. Some physicochemical properties of sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 453-462, 2014.

REDOUAN, E.; CEDRIC, D.; EMMANUEL, P.; MOHAMED, E. G.; BERNARD, C.; PHILIPPE, M.; CHERKAOUI, E. M.; JOSIANE, C. Improved isolation of glucuronan from algae and the production of glucuronic acid oligosaccharides using a glucuronan lyase. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1670-1675, 2009.

REN, G.; WANG, B.; ZHU, X.; MU, Q.; WANG, C.; TAO, R.; FANG, J. Cloning, expression, and characterization of miR058 and its target PPO during the development of grapevine berry stone. **Gene**, v. 548, p. 166-173, 2014.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D.; COHEN, Y. Control of Moldy-Core Decay in Apple Fruits by β -Aminobutyric Acids and Potassium Phosphites. **Plant Disease**, v. 87, p. 933-936, 2003.

RIVAS-GARCIA, T.; MURILLO-AMADOR, B.; NIETO-GARIBAY, A.; CHIQUITO-CONTRERAS, R. G.; RINCON-ENRIQUEZ, G.; HERNANDEZ-MONTIEL, L. G. (). Effect of Ulvan on the Biocontrol Activity of *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* against Fruit Rot of *Cucumis melo* L. **Agronomy**, v. 8, p. 1-13, 2018.

ROBERTS, E. A.; SEYFULLAH, L. J.; LOVERIDGE, R. F.; GARSIDE, P.; MARTILL, D. M. Cretaceous gnetalean yields first preserved plant gum. **Scientific Reports**, v. 10, Article number 3401, 2020.

ROBERTS, J. R.; DAWLEY, E. H.; REIGART, J. R. Children's low-level pesticide exposure and associations with autism and ADHD: a review. **Pediatric Research**, v. 85, p. 234–241, 2019.

RODRIGUEZ-CANTO, W.; CERQUEIRA, M. A.; CHEL-GUERRERO, L.; PASTRANA, L.M.; AGUILAR-VEGA, M. *Delonix regia* galactomannan-based edible films: Effect of molecular weight and karrageenan on physicochemical properties, **Food Hydrocolloids**, v. 103, Article number 105632, 2020.

SANGHA, J. S.; RAVICHANDRAN, S.; PRITHIVIRAJ, K.; CRITCHLEY, A. T.; PRITHIVIRAJ, B. Sulfated macroalgal polysaccharides λ -carrageenan and ι -carrageenan differentially alter *Arabidopsis thaliana* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 75, p. 38-45, 2010.

SANTOS FILHO, H. P.; MATOS, A. P. Doenças da mangueira. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (eds.), **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 435-491.

SALAH, I. B.; AGHROUSS, S.; DOUIRA, A.; AISSAM, S.; EL ALAOUI-TALIBI, Z.; FILALI-MALTOUF, A.; EL MODAFAR, C. Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against verticillium wilt of olive. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, p. 248-255, 2018.

SALEHI, P.; DASHTI, Y.; TAJABADI, F. M.; SAFIDKON, F.; RABEI, R. Structural and compositional characteristics of a sulfated galactan from the red alga *Gracilariopsis persica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1570-1574, 2011.

SANDRONI, M.; LILJEROTH, E.; MULUGETA, T.; ALEXANDERSSON, E. Plant resistance inducers (PRIs): perspectives for future disease management in the Field. **AB Reviews**, v. 15, n. 001, 2020.

SATTERTHWAITE, D.; MCGRANAHAN, G.; TACOLI, C. Urbanization and its implications for food and farming. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, p. 2809-2820, 2010.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; PETHYBRIDGE, S. J.; ESKER, P.; MCROBERTS, N.; NELSON, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, p. 430–439, 2019.

SCHEEL, D.; PARKER, J. E. Elicitor Recognition and Signal Transduction in Plant Defense Gene Activation. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 45c, p. 569-575, 1990.

SEPULCRI, O. **Agrotóxicos na agricultura**. EMATER - Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural, Curitiba, 2014. Disponível em: <[http://www.odiliosepulcri.com.br/pdf-/Agrotoxicos na Agricultura.pdf](http://www.odiliosepulcri.com.br/pdf-/Agrotoxicos%20na%20Agricultura.pdf)>. Acesso em: 27 junho 2015.

SILVA, D. A.; BRITO, A. C. F.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, H. C. B. Effect of mono and divalent salts on gelation of native, Na and deacetylated *Sterculia striata* and *Sterculia urens* polysaccharide gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 229–236, 2003.

SILVA, M. A. G.; FERNANDES, K. F. Composição química e antinutrientes presentes nas amêndoas cruas e torradas de chicha (*Sterculia striata* A. St. Hill & Naudin). **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 24, p. 305-314, 2011.

SILVA, S. C. C. C.; BRAZ, E. M. A.; BRITO, C. A. R. S.; ALVES, M. M. M.; CARVALHO, F. A. A.; BARRETO, H. M.; OLIVEIRA, A. L.; SILVA, D. A.; SILVA-FILHO, E. C. Phthalic anhydride esterified chicha gum: characterization and antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, Article number 117077, 2021.

SILVA, V.; MOL, H. G. J.; ZOMER, P.; TIENSTRA, M.; RITSEMA, C. J.; GEISSEN, V. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1532–1545, 2019.

SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; SASSAKI, G. L.; DELGOBO, C. L.; IACOMINI, M. Structure of a heteroxylan of gum exudate of the palm *Scheelea phalerata* (uricuri). **Phytochemistry**, v. 65, p. 2347–2355, 2004.

SIMAS-TOSIN, F. F.; WAGNER, R.; SANTOS, E. M. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharide of nectarine gum exudate: Comparison with that of peach gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 485–487, 2009.

SIMS, I. M.; FURNEAUX, R. H. Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 423–431, 2003.

SINGH, B.; DHIMAN, A.; RAJNEESH; KUMAR, A. Slow release of ciprofloxacin from β -cyclodextrin containing drug delivery system through network formation and supramolecular interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 390–400, 2016.

SINGH, B.; SHARMA, N. Synthesis and characterization of *Sterculia* gum based pH responsive drug delivery system for use in colon cancer. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 46, p. 381–396, 2009.

SINGH, B.; SHARMA, V.; PAL, L. Formation of *Sterculia* polysaccharide networks by gamma rays induced graft copolymerization for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1371–1380, 2011.

SINGH, B.; SINGH, B. Influence of graphene-oxide nanosheets impregnation on properties of *Sterculia* gum-polyacrylamide hydrogel formed by radiation induced polymerization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 699–712, 2017.

SINGH, B.; VASHISHTHA, M. Development of novel hydrogels by modification of *Sterculia* gum through radiation cross-linking polymerization for use in drug delivery. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 266, p. 2009–2020, 2008.

SMITH, R. F.; SMITH, G. L. Supervised control of insects. **California Agriculture**, v. 3, p. 11-12, 1949.

SOPPELSA, S.; KELDERER, M.; CASERA, C.; BASSI, M.; ROBATSCHER, P.; ANDREOTTI, C. Use of Biostimulants for Organic Apple Production: Effects on Tree Growth, Yield, and Fruit Quality at Harvest and During Storage. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, Article number 1342, 2018.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis f. sp. tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 25–34, 2000.

Stadnik, M. J.; Freitas, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 111-118, 2014.

STOKSTAD, E. European bee study fuels debate over pesticide ban. **Environmental Science**, v. 356, p. 1321-1321, 2017.

SU, J.; TU, K.; CHENG, L.; TU, S.; WANG, M.; XU, H.; ZHAN, G. Wound-induced H₂O₂ and resistance to *Botrytis cinerea* decline with the ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, p. 64–70, 2011.

SUN, T-J.; LU, Y.; NARUSAKA, M.; SHI, C.; YANG, Y-B.; WU, J-X.; ZENG, H-Y.; NARUSAKA, Y.; YAO, N. A Novel Pyrimidin-Like Plant Activator Stimulates Plant Disease Resistance and Promotes Growth. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-16, 2015.

TATTON, J.; RUZICKA, J. Organochlorine Pesticides in Antarctica. **Nature**, v. 215, p. 346–348, 1967.

THAKOR, N. J. Indian Mango – Production and Export Scenario. **Advanced Agricultural Research & Technology Journal**, v. 3, p. 80-88, 2019.

TEIXEIRA, D. M. A.; BRAGA, R. C.; HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. A.; BRITO, A. C. F.; MACIEL, J. S.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. *Spondias purpurea* exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 369–377, 2007.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 505–507, 2004.

TROUVELOT, S.; VARNIER, A-L.; ALLÈGRE, M.; MERCIER, L.; BAILLIEUL, F.; ARNOULD, C.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; KLARZYNSKI, O.; JOUBERT, J-M.; PUGIN, A.; DAIRE, X. A β -1,3 Glucan Sulfate Induces Resistance in Grapevine against *Plasmopara viticola* Through Priming of Defense Responses, Including HR-like Cell Death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 232–243, 2008.

VALENTINES, M. C.; VILAPLANA, R.; TORRES, R.; USALL, J.; LARRIGAUDIÈRE, C. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, p. 227–234, 2005.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **The Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259–288, 1980.

VANHOLME, R.; MEESTER, B. D.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 230–239, 2019.

VIKHOREVA, G.; BANNIKOVA, G.; STOLBUSHKINA, P.; PANOV, A.; DROZD, N.; MAKAROV, V.; VARLAMOV, V.; GAL'BRAIKH, L. Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulfated chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 327–332, 2005.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 145–154, 2003.

VILANOVA, L.; TORRES, R.; VIÑAS, I.; GONZÁLEZ-CANDELAS L.; USALL, J.; FIORI, S.; SOLSONA, C.; TEIXIDÓ, N. Wound response in orange as a resistance mechanism against *Penicillium digitatum* (pathogen) and *P. expansum* (non-host pathogen). **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 113–122, 2013.

VINOD, V. T. P.; SASHIDHAR, R. B.; SURESH, K. I.; RAMA RAO, B.; VIJAYA SARADHI, U. V. R.; PRABHAKAR RAO, T. Morphological, physico-chemical and structural characterization of gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A tree gum from India. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 899–915, 2008.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 1263–1280, 2013.

WANG, J.; GUO, H.; ZHANG, J.; WANG, X.; ZHAO, B.; YAO, J.; WANG, Y. Sulfated modification, characterization and structure–antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 897–905, 2010a.

WANG, J.; SOMASUNDARAN, P. Mechanisms of ethyl(hydroxyethyl) cellulose–solid interaction: Influence of hydrophobic modification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 293, p. 322–332, 2006.

WANG, J.; YANG, T.; TIAN, J.; LIU, W.; JING, F.; YAO, J.; ZHANG, J.; LEI, Z. Optimization of reaction conditions by RSM and structure characterization of sulfated locust bean gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 375–383, 2014.

WANG, J.; YU, G.; LI, Y.; SHEN, L.; QIAN, Y.; YANG, J.; WANG, F. Inhibitory effects of sulfated lentinan with different degree of sulfation against tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 122, p. 38–43, 2015.

WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, B.; YAO, J.; WANG, Y. Structure–antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 59–66, 2010b.

WASHINGTON, W. S.; VILLALTA, O. N.; INGRAM, J.; BARDON, D. Susceptibility of apple cultivars to apple scab and powdery mildew in Victoria, Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, p. 625–629, 1998.

WU, X.; MORT, A. Structure of a Rhamnogalacturonan Fragment from Apple Pectin: Implications for Pectin Architecture. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2014, Article ID 347381, 2014.

XING, R.; LIU, S.; YU, H.; GUO, Z.; LI, Z.; LI, P. Preparation of high molecular weight and high sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 148–154, 2005.

YANG, X. B.; GAO, X. D.; HAN, F.; TAN, R. X. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1725, p. 120–127, 2005.

YAO, Y.; TUDURI, L.; HARNER, T.; BLANCHARD, P.; WAITE, D.; POISSANT, L.; MURPHYE, C.; BELZER, W.; AULAGNIER, F.; LIA, Y-F.; SVERKO, E. Spatial and temporal distribution of pesticide air concentrations in Canadian agricultural regions. **Atmospheric Environment**, v. 40, p. 4339–4351, 2006.

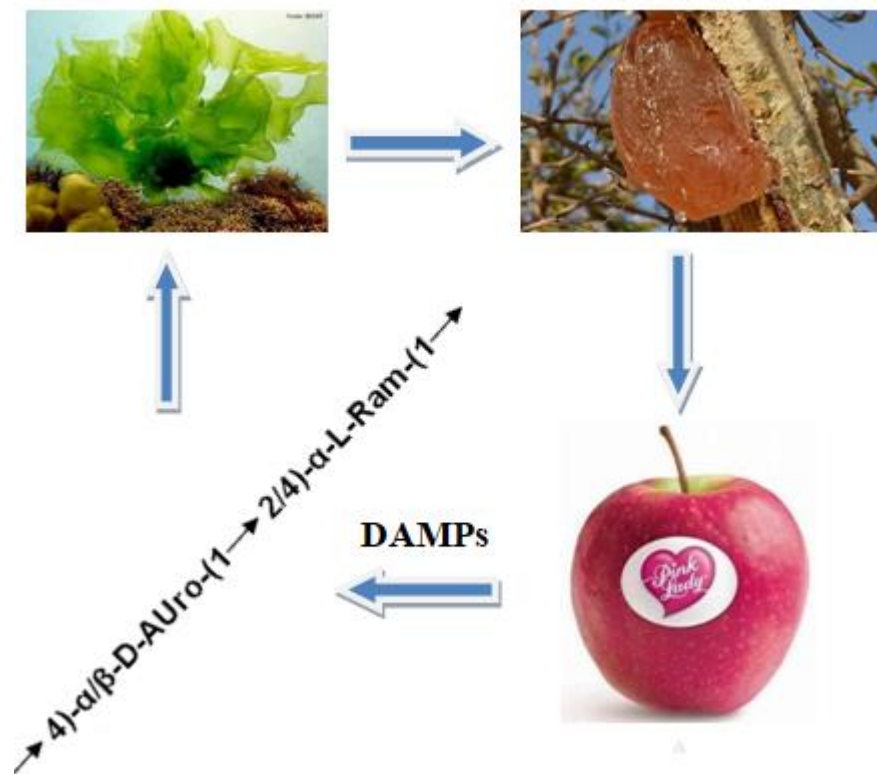
ZAMPA, M. F.; BRITO, A. C. F.; KITAGAWA, I. L.; CONSTANTINO, C. J. L.; OLIVEIRA JR. O. N.; CUNHA, H. N.; ZUCOLOTTI, V.; SANTOS JR., J. R.; EIRAS, C. Natural Gum-Assisted Phthalocyanine Immobilization in Electroactive Nanocomposites: Physicochemical Characterization and Sensing Applications. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3408–3413, 2007.

ZHANG, Z.; YANG, D.; YANG, B.; GAO, Z.; LI, M.; JIANG, Y.; HU, M. β -Aminobutyric acid induces resistance of mango fruit to postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 78–84, 2013.

ZHENG, F.; CHEN, L.; ZHANG, P.; ZHOU, J.; LU, X.; TIAN, W. Carbohydrate polymers exhibit great potential as effective elicitors in organic agriculture: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, Article number 115637, 2019.

ZHU, X.; CAO, J.; WANG, Q.; JIANG, W. Postharvest Infiltration of BTH Reduces Infection of Mango Fruits (*Mangifera indica* L. cv. *Tainong*) by *Colletotrichum gloeosporioides* and Enhances Resistance Inducing Compounds. **Journal Phytopathology**, v. 156, p. 68–74, 2008.

ANEXO A - GÁFICO-RESUMO



As células vegetais monitoram a integridade da sua parede. Pedacos dela (DAMPs) podem induzir resposta de defesa. A parede celular de maçãs é composta basicamente por pectina, polissacarídeo que possui em sua cadeia principal fragmentos de ramnouronana (cadeia de ácidos urônicos e ramnoses alternados) que já foram relacionados com a indução de resposta de defesa vegetal. Polissacarídeos presentes em algas verdes (ulvana) e exsudato de planta (goma do chichá) possuem cadeias principais de ramnouronana. Talvez por isso essas gomas possam simular DAMPs e induzir o aumento da atividade de enzimas relacionadas com a defesa em maçãs.

ANEXO C - MASSAS MOLARES DOS POLISSACARÍDEOS

Tabela 6 - Massas molares da goma de chichá bruta (GCH) e de seus derivados

Goma	M_w (g mol ⁻¹)	M_n (g mol ⁻¹)	Pd (M_w/M_n)
GCH	$1,5 \times 10^7$	$4,2 \times 10^5$	38
GCHS	$3,8 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	8,3
GCHDA	$4,8 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$	15
GCHH	$2,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	5,9
GCHDAS	$3,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^4$	91,7
GCHDAH	$8,6 \times 10^5$	$8,7 \times 10^4$	9,8
GCHHS	$5,9 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$	9,83

ANEXO D - GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELA INTENSIDADE PARA OS POLISSACARÍDEOS

Figura 55 – Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCH

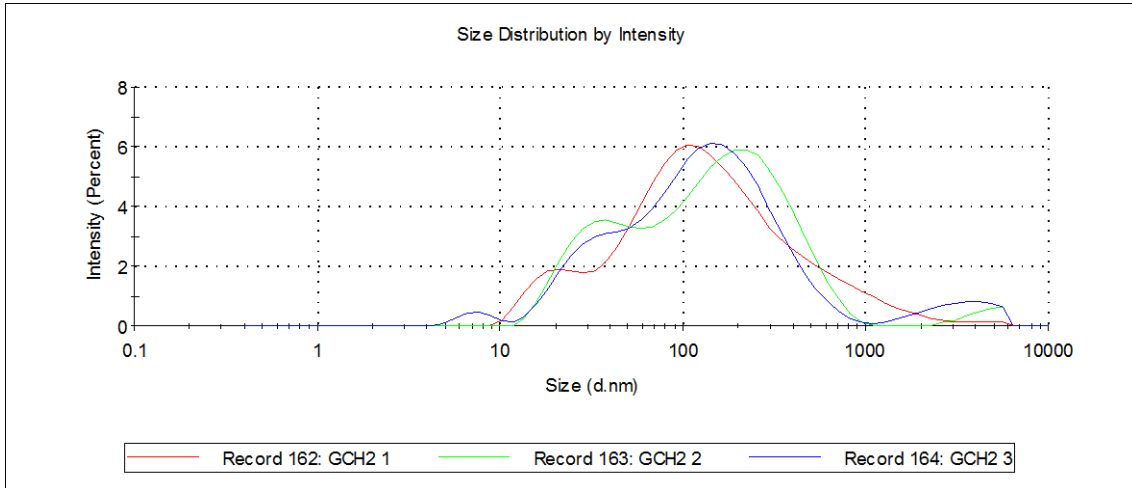


Figura 56 – Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHDA

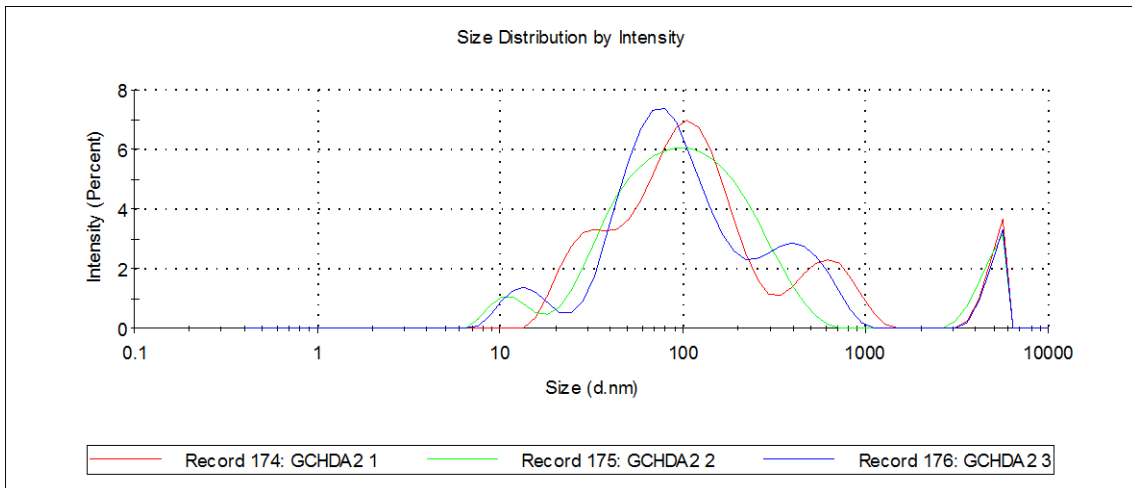


Figura 57 – Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHH

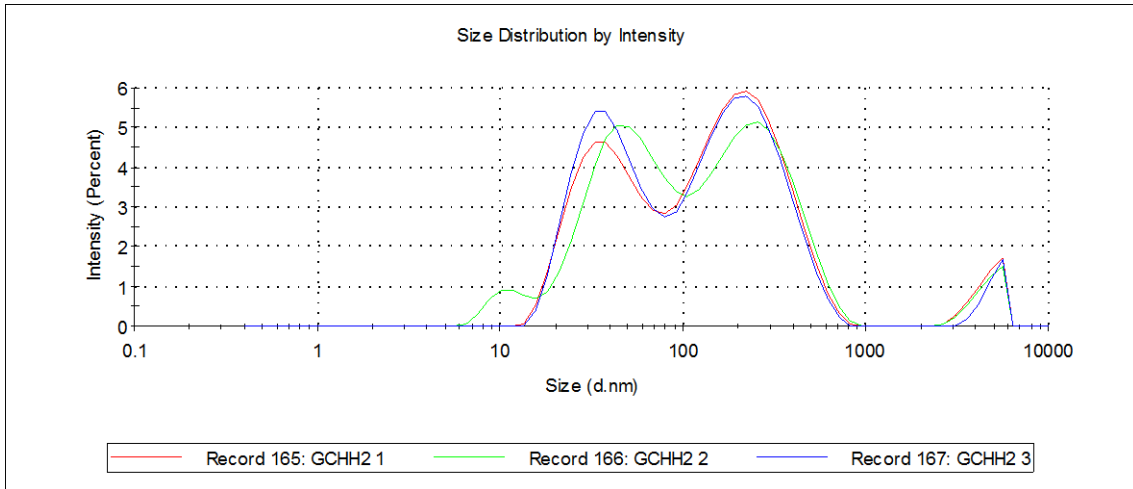


Figura 58 – Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHS

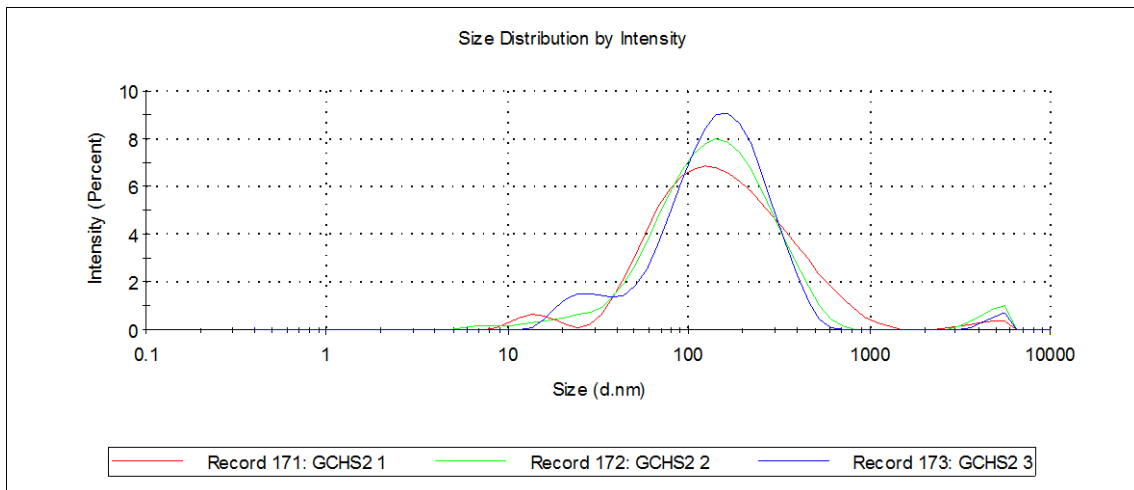


Figura 59 – Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHDAS

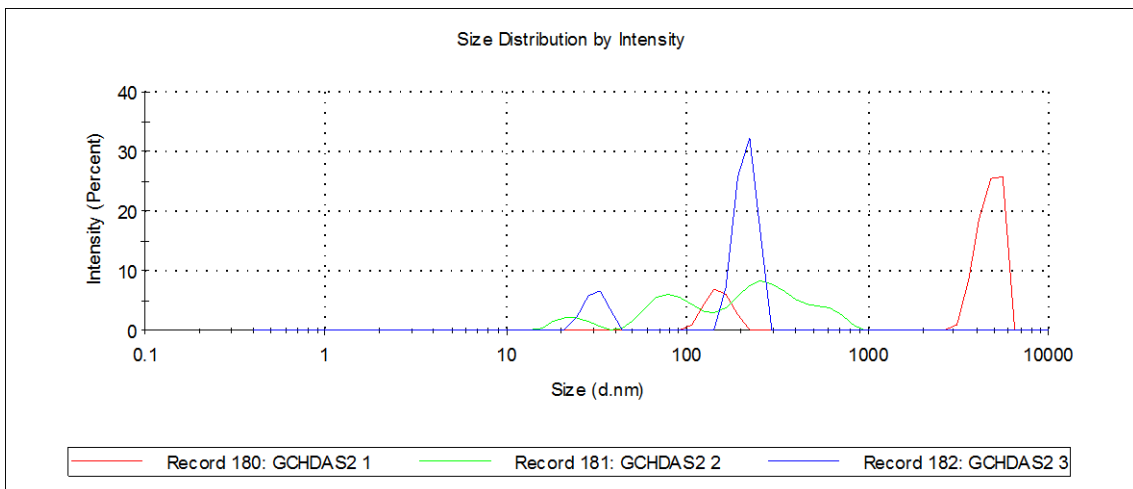


Figura 60 – Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHDAH

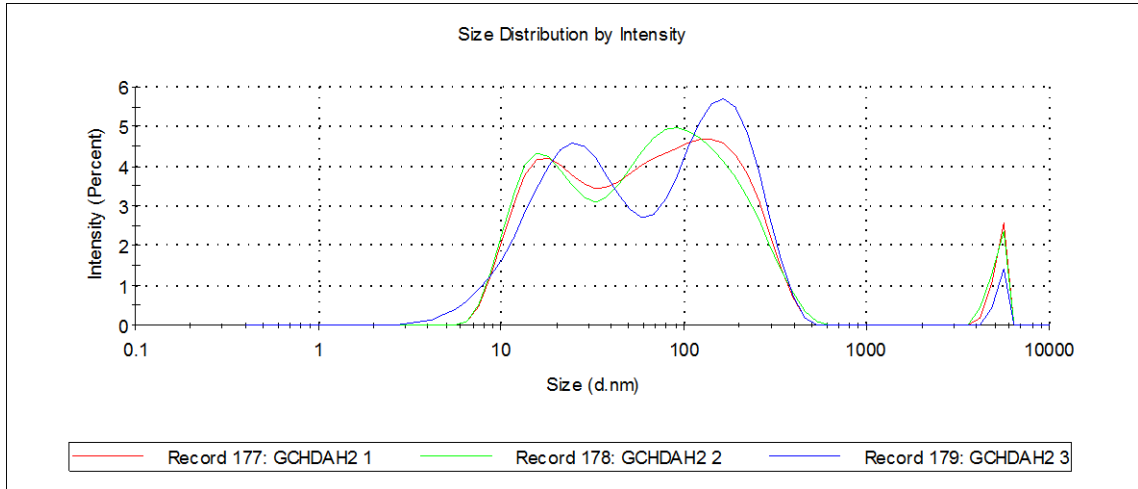


Figura 61 – Gráfico de distribuição de tamanho pela intensidade para GCHHS

