



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ISABELLA OLIVEIRA BRITTO

Determinação do perfil molecular dos extratos de folhas de *Carica papaya* (L.) em busca de biomarcadores estágio-dependentes relacionados à doença da meleira do mamoeiro

Vitória

2024

ISABELLA OLIVEIRA BRITTO

Determinação do perfil molecular dos extratos de folhas de *Carica papaya* (L.) em busca de biomarcadores estágio-dependentes relacionados à doença da meleira do mamoeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título De Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos

Vitória/ES

2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B862d Britto, Isabella Oliveira, 1995-
Determinação do perfil molecular dos extratos de folhas de
Carica papaya (L.) em busca de biomarcadores estágio
dependentes relacionados à doença da meleira do mamoeiro /
Isabella Oliveira Britto. - 2024.
103 f. : il.

Orientador: Alexandre Martins Costa Santos.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Defesa vegetal. 2. Diagnóstico. 3. Biomarcadores. 4.
Meleira do mamoeiro. 5. Cromatografia. 6. Virose. I. Martins
Costa Santos, Alexandre. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 28ª sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente Isabella Oliveira Britto, realizada às quatorze horas do dia doze de julho de dois mil e vinte e quatro, tese intitulada “Determinação do perfil molecular dos extratos de folhas de *Carica papaya* (L.) em busca de biomarcadores estágio-dependentes relacionados à doença da meleira do mamoeiro”. A sessão pública foi realizada em formato virtual, com transmissão por meio de videoconferência. O presidente da Banca, Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Diolina Moura Silva, membro titular interno; Juliana Barbosa Coutinho Gonçalves, membro titular externo ao programa; João Paulo Viana Leite, membro titular externo à Ufes; Graziela Domingues de Almeida Lima, membro titular externo à Ufes, em seguida, passou a palavra para a aluna que apresentou a sua proposta de Tese. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda **APROVADA** na defesa de Doutorado. Eu, Alexandre Martins Costa Santos, que presidi a Banca de defesa, assino a presente Ata, juntamente aos demais membros e dou fé. Vitória, 12 de julho de 2024.

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos, - Orientador
 Universidade Federal do Espírito Santo

Profª Drª Diolina Moura Silva - Membro interno
 Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves – Membro externo ao Programa
 Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. João Paulo Viana Leite – Membro externo à Ufes
 Universidade Federal de Viçosa

Documento assinado digitalmente
 JOAO PAULO VIANA LEITE
 Data: 16/07/2024 18:56:39-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Graziela Domingues de Almeida Lima - Membro externo à Ufes
 Universidade Federal de Alfenas

Documento assinado digitalmente
 GRAZIELA DOMINGUES DE ALMEIDA LIMA
 Data: 17/07/2024 12:23:12-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Campus Universitário Maruípe – Av. Maruípe, 1468 – Maruípe, Vitória – ES | 29047-185 |
 Tel. e Fax: (27) 3335-9501 | <http://www.biotecnologia.ufes.br/> | pgbiotecnologia@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
ALEXANDRE MARTINS COSTA SANTOS - SIAPE 1698543
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCF/CCS
Em 15/07/2024 às 19:44

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/955226?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
DIOLINA MOURA SILVA - SIAPE 294671
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN
Em 15/07/2024 às 21:25

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/955258?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JULIANA BARBOSA COITINHO GONCALVES - SIAPE 2077211
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 16/07/2024 às 07:13

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/955298?tipoArquivo=O>

ISABELLA OLIVEIRA BRITTO

Determinação do perfil molecular dos extratos de folhas de *Carica papaya* (L.) em busca de biomarcadores estágio-dependentes relacionados à doença da meleira do mamoeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em 12 de julho de 2024.

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

VITÓRIA, ES

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha Vó Dora e primo Denis (in memoriam) e à toda minha família. Esta conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a espiritualidade amiga por toda força e clareza que me foi proporcionada durante esta trajetória. Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação por terem me recebido de braços abertos.

Agradeço ao meu orientador Alexandre Martins Costa Santos e a Prof. Patricia Machado Bueno Fernandes pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, pela orientação e troca de conhecimento ao longo desses 4 anos. Agradeço aos professores Alberto Fernandes e José Aires Ventura pelo olhar crítico sobre minha pesquisa. Eu tenho certeza de que onde eu for, o que eu aprendi com eles irá me acompanhar.

Agradeço aos doutores Oeber Quadros e Marlonni Maurastoni pela contextualização sobre a pesquisa em torno da doença da meleira do mamoeiro. Agradeço imensamente à doutora Tathiana Ferreira de Sá Antunes pela dedicação diária em me ensinar sobre o diagnóstico da doença e por ter quebrado meu bloqueio com a biologia molecular. Ela me fez enxergar este universo com outros olhos e serei eternamente grata, pois isso me fez crescer profissionalmente. Estes três pesquisadores foram muito solícitos e presentes em minha trajetória acadêmica no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio.

Agradeço ao meu marido Walberto pelo amor, paciência e dedicação. Agradeço aos meus pais, irmão e tias pelo sincero apoio. Agradeço aos amigos Raissa, Luiza Adami, Ane, Luíz, Mirielson, Raquel, Joellington, Weverton e Monique por me receberem assim que eu cheguei ao grupo e me mostrarem que nada é maior do que meu sonho em ser Doutora. Agradeço aos colegas do LB²MP e demais colegas de bancada pela troca diária de conhecimento. Agradeço ainda aos amigos de Viçosa, de Cataguases e do Buteco por deixarem esses quatro anos mais leves.

Agradeço às agências de apoio e financiamento FAPES, CNPq e CAPES pelo financiamento da minha pesquisa e projetos dos quais fiz parte.

EPÍGRAFE

“Nas lutas habituais, não exija a educação do companheiro. Demonstre a sua. Nas tarefas do bem não aguarde colaboração. Colabore, por sua vez, antes de tudo. As suas lágrimas não substituem o suor que você deve verter em benefício da sua própria felicidade.” (Chico Xavier)

RESUMO

BRITTO, I.O. **Determinação do perfil molecular dos extratos de folhas de *Carica papaya* (L.) em busca de biomarcadores estágio-dependentes relacionados à doença da meleira do mamoeiro.** 2024. 103f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A doença da meleira do mamoeiro, causada pelo complexo viral PMeV (PMeV e PMeV2), resulta em perdas significativas na qualidade e produção dos frutos. Plantas infectadas permanecem assintomáticas até a floração e frutificação, atuando como reservatórios silenciosos do vírus no campo. Metabólitos secundários podem ser usados como marcadores da progressão da doença e técnicas cromatográficas podem ser úteis para a detecção precoce da doença. Neste estudo, perfis moleculares de extratos etanólicos de folha de *C. papaya* (2,5, 5,0 e 7,5 mg.mL⁻¹) e frações em pré e pós-floração, com e sem sintomas de doença, foram avaliados por espectroscopia UV-Vis, cromatografia em fase reversa, cromatografia por troca iônica e espectrometria de massas. A concentração de 7,5 mg.mL⁻¹ foi selecionada como a concentração de trabalho dos extratos brutos. Nos cromatogramas, os picos de interesse exibiram formato simétrico, eluição em faixas de tempo de retenção similares entre os três estágios da planta, largura de base estreita, semelhantes e ausência de caudas, indicando uma separação eficiente e interações favoráveis dos metabólitos presentes com a fase estacionária. Os parâmetros analíticos indicaram picos cromatográficos quantitativamente maiores no extrato de folhas em pré-floração, comparados aos de pós-floração, refletindo uma possível resposta de defesa da planta contra infecção viral. Diferenças significativas nos perfis cromatográficos entre os diferentes estágios foram observadas, indicando o potencial desses grupos como biomarcadores da doença da meleira. Este estudo desenvolveu um método cromatográfico sensível e reproduzível para distinguir os estágios da planta, identificando os flavonoides e alcaloides como componentes dos grupos estratégicos relacionados ao sistema de defesa contra a infecção viral.

Palavras-chave: Defesa vegetal. Diagnóstico. Biomarcadores. Meleira do mamoeiro. Cromatografia.

ABSTRACT

BRITTO, I.O. Molecular Profiling of *Carica papaya* (L.) Leaf Extracts in Search of Stage-Dependent Biomarkers for Papaya Sticky Disease. 2024. 103p. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Papaya Sticky Disease is caused by PMeV viral complex and poses a significant threat to papaya production worldwide. Infected plants remain asymptomatic until flowering and fructification, acting as silent reservoirs of the virus in the field. Secondary metabolites could act as potential biomarkers of disease progression and can be detected using chromatographic techniques for early disease diagnosis. In this study, molecular profiles of ethanolic extracts from *C. papaya* leaves in pre- and post-flowering (2.5, 5.0, and 7.5 mg.mL⁻¹) and fractions were evaluated by UV-Vis spectroscopy, reversed-phase chromatography, ion exchange chromatography, and mass spectrometry. The 7.5 mg.mL⁻¹ concentration was selected as the experimental concentration for crude extracts. Chromatograms showed symmetrical peaks, eluted within similar retention time ranges across the three plant stages, with narrow base widths, similar peak shapes, and no tailing, suggesting the presence of a limited number of potentially isolable compounds. Analytical parameters indicated quantitatively larger chromatographic peaks in pre-flowering leaf extracts compared to post-flowering ones, reflecting a possible defense response against viral infection. Significant differences in chromatographic profiles between the different plant stages were observed, indicating the potential of these groups as biomarkers for Papaya Sticky Disease. This study developed a sensitive and reproducible chromatographic method to distinguish plant stages, identifying flavonoids and alkaloids as components of strategic groups related to the defense system against viral infections.

Key words: Plant protection. Diagnosis. Biomarkers. Papaya Sticky Disease. Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção nacional de mamão e setores econômicos em que a planta <i>C. papaya</i> se enquadra.	21
Figura 2. Sintomas típicos da doença da meleira em pomar em estágios iniciais da doença da meleira.	25
Figura 3. Esquema do funcionamento de um cromatógrafo líquido.	29
Figura 4. Esquema da separação por Cromatografia Líquida em Fase Reversa.	30
Figura 5. Detecção viral de PMeV e PMeV2 nos materiais vegetais.	46
Figura 6. Espectro de varredura UV-Vis de amostras de extratos de folhas de <i>C. papaya</i>	53
Figura 7. Estabilidade cinética dos extratos brutos.	56
Figura 8. Perfil molecular dos extratos na concentração de 2,5 mg.mL ⁻¹ em RP-HPLC a 258 nm e volume de injeção de 200 uL.	60
Figura 9. Perfil molecular dos extratos na concentração de 5,0 mg.mL ⁻¹ em RP-HPLC a 258 nm e volume de injeção de 200 uL.	61
Figura 10. Perfil molecular dos extratos na concentração de 7,5 mg.mL ⁻¹ em RP-HPLC monitorado a 258 nm e volume de injeção de 200 uL.....	62
Figura 11. Grupos de frações estabelecidos para FR-HPLC.	67
Figura 12. Análise quantitativa de frações selecionadas por FR-HPLC.....	68
Figura 13. Cromatogramas de troca catiônica dos grupos de fração 1 (G1).....	73
Figura 14. Cromatografia de troca iônica dos extratos brutos a 258 nm, volume de injeção de 10 µL e fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹	77
Figura 15. Metabólitos secundários identificados por UHPLC-MS/MS e relacionados com a doença da meleira do mamoeiro.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Designação das abreviações correspondentes a cada extrato bruto.....	39
Tabela 2. Gradiente da fase móvel utilizada na análise por UHPLC-MS/MS.....	43
Tabela 3. Rendimento dos extratos brutos.....	48
Tabela 4. Solubilidade dos extratos etanólicos de folha de <i>C. papaya</i>	50
Tabela 5. Série eluotrópica dos solventes para a cromatografia de adsorção na sílica.....	51
Tabela 6. Variação da absorbância em função do tempo dos extratos brutos de <i>C. papaya</i>	55
Tabela 7. Parâmetros analíticos quantitativos para o grupo G1 das diferentes concentrações obtidas por cromatografia de fase reversa.....	59
Tabela 8. Parâmetros analíticos quantitativos para os grupos de interesse G1 e G3'.....	70
Tabela 9. Relação entre a concentração do extrato bruto e dos grupos de fração G1 aplicados nas colunas de troca iônica.....	71
Tabela 10. Amostras enviadas para análise por UHPLC-MS/MS.....	80
Tabela 11. Identidade das moléculas analisadas por UHPLC-MS/MS em modo positivo e negativo.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APF - Extrato etanólico de folhas em pós-floração assintomática

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CTC – Cromatografia de Troca Catiônica

dsRNA – RNA fita dupla

FN-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Normal

FR-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do *inglês High Performance Liquid Chromatography*)

ISL – Extrato etanólico de folhas em pré-floração

IEX-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Troca Iônica

LABIOM - Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares

LBAA - Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio

MS – Espectrometria de Massas (do *inglês Mass Spectrometry*)

PMeV – Papaya meleira virus

PMeV2 – Papaya meleira vírus 2

PpVq – Papaya virus Q

PSD –Doença da Meleira do Mamoeiro (do *inglês Papaya Sticky Disease*)

PSFav - Papaya Sticky fruit-associated virus

RNA – Ácido Ribonucleico

SPF - Extrato etanólico de folhas em pós-floração sintomática

ssRNA – RNA fita simples

ORF – região aberta de leitura (do inglês *Open Reading frame*)

RT-PCR – Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Reverse-Transcription – polymerase chain reaction*)

RT – qPCR - Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês *Reverse-Transcription – quantitative polymerase chain reaction*)

UHPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Acoplada À Espectrometria De Massas (do inglês *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*)

UV – ultravioleta

Vis - Visível

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1.1 RELEVÂNCIA ECONÔMICA DE <i>Carica papaya</i> LINN.....	20
1.2 MELEIRA DO MAMOEIRO E ETIOLOGIA DA DOENÇA.....	21
1.3 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	23
1.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	26
1.4.1 A cromatografia como uma ferramenta diagnóstica.....	26
1.4.2 Fundamentos sobre Cromatografia Líquida de Alta Performance	26
1.5 <i>Carica papaya</i> L. E OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS RELACIONADOS À DEFESA CONTRA OS VÍRUS.....	31
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	35
2.1 HIPÓTESE.....	35
2.2 OBJETIVO GERAL.....	35
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA E LOCALIDADE DE COLETA.....	37
3.2 DIAGNÓSTICO VIRAL EM FOLHAS.....	37
3.3 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	38
3.4 TESTE DE SOLUBILIDADE DOS EXTRATOS.....	39
3.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA- VISÍVEL.....	39
3.6 TESTE DE ESTABILIDADE DOS EXTRATOS.....	40
3.7 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE FOLHA DE MAMÃO (<i>C. papaya</i>) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (FR-HPLC).....	40
3.7.1 Preparo de amostra e de fase móvel.....	40
3.7.2 Análise do perfil molecular por cromatografia em fase reversa (FR-HPLC).....	41
3.8 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM HPLC.....	41

3.9 AUMENTO DA RESOLUÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIÔNICA.....	41
3.9.1 Remoção de sal das amostras.....	42
3.10 DETERMINAÇÃO DA IDENTIDADE DAS MOLÉCULAS POR UHPLC-MS/MS.....	42
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS FOLHAS.....	45
4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	47
4.3 SOLUBILIDADE DOS EXTRATOS.....	49
4.4 ESPECTROSCOPIA DE VARREDURA UV-VIS.....	52
4.5 ESTABILIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS.....	54
4.6 PERFIL MOLECULAR DOS EXTRATOS BRUTOS.....	57
4.6.1 Análise cromatográfica dos extratos etanólicos de folha de <i>C. papaya</i>	57
4.6.2 Relação entre material vegetal fresco e o extrato bruto.....	64
4.6.3 Grupos de frações oriundos da cromatografia em fase reversa	65
4.7 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIÔNICA DE GRUPOS ESTRATÉGICOS.....	69
4.8 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DOS EXTRATOS BRUTOS - UMA ABORDAGEM QUALITATIVA.....	75
4.9 IDENTIDADE DAS MOLÉCULAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	78
5. CONCLUSÃO.....	88
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
7. REFERÊNCIA.....	90
8. ANEXO.....	103

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 RELEVÂNCIA ECONÔMICA DE *Carica papaya* LINN

A planta *Carica papaya* Linn é importante para o Brasil em decorrência do valor econômico atribuído em especial ao seu fruto (Accipe et al., 2023; FAO, 2024; Vij e Prashar, 2015). A posição brasileira no cenário mundial de fruticultura é bastante vantajosa, de modo que o país se encontra entre um dos cinco maiores produtores e exportadores mundiais de mamão (IBGE, 2022; FAO, 2024). O desempenho consistente ao longo dos anos no setor consolidou o Brasil como fornecedor de destaque no mercado global (FAO, 2024; Lira e Barbieri, 2024). Dados de produção mundial elencam o país em segunda posição, sendo liderado pela Índia e seguido por Brasil, República Dominicana, México e Indonésia, enquanto os países cuja exportação de mamão é mais expressiva são em primeiro lugar México, seguido por Brasil, Guatemala, Malásia, Estados Unidos da América e Holanda (FAO, 2024; Lira e Barbieri, 2024).

Os dados relacionados à produção nacional apontam o estado do Espírito Santo como primeiro colocado (FAO, 2024), detendo 38,8% do total, posicionando-se como o maior produtor tanto em quantidade quanto em qualidade. Essa relevância se traduz em um impacto socioeconômico significativo, gerando renda superior a 1,17 bilhão de reais para os produtores rurais em 2022, o que representa cerca de 5% do Valor Bruto da Produção Agropecuária capixaba. A qualidade do mamão produzido no Espírito Santo o torna um produto altamente competitivo no mercado internacional, alcançando 37 países em 2023 e gerando 21,1 milhões de dólares em receita com exportações (Brasil, 2024). Outros estados com produção expressiva do fruto são Bahia, Ceará, Rio Grande do Norte e Minas Gerais (Figura 1) (IBGE, 2022). Além da relevância macroeconômica, é importante destacar a importância social da cultura do mamão, que gera emprego e renda para a população rural e para o pequeno produtor (FAO, 2024; Lucena et al., 2021). Embora a maior parte da produção nacional de mamão seja destinada e consumida pelo mercado interno, a exportação do fruto representa uma fonte significativa de renda e emprego ao longo do ano para os produtores (Antunes et al., 2020; FAO, 2024; Lucena et al., 2021).

A planta *C. papaya* tem relevância para diversos setores diversos da economia como o alimentício através de doces, polpas, sucos, chás, condimentos e amaciante de carne, o têxtil por meio do amaciamento de seda, lã, couro e remoção de pelos e o farmacêutico pelo tratamento de doenças em humanos e cosméticos proporcionado pelo potencial biológico das diferentes partes do vegetal (fruto, folha, galho e látex) (Accipe et al., 2023; Babalola et al., 2023; FAO, 2024; Gondim et al., 2022; IBGE, 2022; Sharma et al., 2020; Zhou et al., 2023).



Figura 1. Produção nacional de mamão e setores econômicos em que a planta *C. papaya* se enquadra. Espírito Santo 38,8% (439,5 t), Bahia 35,3% (400,4 t), Ceará (140,9 t), Rio Grande do Norte (103,4 t) e Minas Gerais (48,4 t). Fonte: Adaptado de FAO, 2024; IBGE, 2022.

1.2 MELEIRA DO MAMOEIRO E ETIOLOGIA DA DOENÇA

A demanda pela qualidade do fruto tem aumentado e o mercado consumidor tem se tornado mais exigente quanto a isso (Antunes et al., 2020; Brasil, 2024; Ventura et al., 2019; Ventura, Costa e Tatagiba, 2004), mas fatores abióticos e bióticos podem comprometer essa qualidade, especialmente infecções causadas por patógenos como vírus (Antunes et al., 2020; Maurastoni et al., 2023; Ventura, Costa e Tatagiba,

2004; Vieira et al., 2024). O complexo viral Papaya meleira virus, composto pelos vírus papaya meleira virus e papaya meleira virus 2 (PMeV e PMV2 respectivamente) é responsável pela doença da meleira do mamoeiro (“Papaya Sticky Disease” – PSD) e representa uma das principais ameaças ao cultivo de mamão (Antunes et al., 2016, 2020; Maurastoni et al., 2023; Vieira et al., 2024).

Nos anos 80, acreditava-se que a origem da doença estava relacionada a fatores abióticos, como a deficiência na absorção de boro e cálcio. Os sintomas eram semelhantes aos observados em plantas submetidas a estresse hídrico ou ao desequilíbrio desses nutrientes no solo (Nakagawa, Takayama e Suzukama, 1987). Posteriormente, a doença foi associada a fator biótico confirmado como um vírus de RNA fita dupla (dsRNA) com tamanho aproximado de 10 a 12 Kb, denominado Papaya meleira virus (Kitajima, 1993; Maciel-Zambolim et al., 2003; Rodrigues, C H, Ventura e Mafia, 1989).

Em 2016, a etiologia foi novamente reconsiderada, pois o que antes era considerado um material genético subgenômico de cerca de 4,5 Kb foi identificado como RNA genômico, um RNA fita simples (ssRNA) pertencente a um segundo vírus, denominado Papaya meleira vírus 2 (Antunes et al., 2016; Antunes, 2017). A doença da meleira é causada pela ação conjunta desses dois vírus e que despertam particular interesse por serem vírus de RNA e se alojam nos laticíferos (Antunes et al., 2020; Kitajima, 1993; Maciel-Zambolim et al., 2003; Rodrigues, S P et al., 2009). Essas partículas virais estão ligadas a polímeros presentes no látex, podendo representar um mecanismo de proteção ou transporte do vírus (Rodrigues, S P et al., 2005). Além do Brasil, a doença já foi relatada no México, Equador e Austrália. A etiologia também foi relacionada a um complexo viral no Equador (papaya virus Q (PpVq) and papaya sticky fruit associated virus (PSFaV) enquanto nos demais países, apenas o vírus RNA fita simples foi identificado (Antunes et al. 2016; Cornejo-Franco et al., 2024; Madroñero et al. 2018; Pathania et al. 2019, Quito-Avila et al., 2015; Quito-Avila et al., 2023).

O segundo vírus (PMeV2) não é capaz de formar as partículas virais convencionais, pois não possui o gene que codifica a proteína capsideal e depende de um vírus auxiliar para conseguir transmitir seu genoma (Antunes et al., 2016, 2020; Quito-Avila et al., 2023). Os estudos também mostraram que o PMeV sozinho não é capaz de

causar sintomas na planta e que uma infecção dupla é necessária para isso. Possivelmente, partículas híbridas seriam formadas pela combinação da proteína capsideal do PMeV e o ssRNA do PMeV2, o que explicaria a severidade dos sintomas observados na pós-floração e pós-frutificação. Essas descobertas foram fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle da doença da meleira do mamoeiro (Antunes et al., 2016, 2020).

1.3 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Os sintomas clássicos da doença da meleira compreendem a exsudação de um látex translúcido e bastante aquoso do fruto, escurecimento do fruto decorrente da oxidação do látex quando em contato com o oxigênio, surgimento de lesões necróticas na ponta das folhas jovens também decorrente dessa exsudação, áreas irregulares verde-claras e amareladas nos frutos verdes e perda de importante propriedade inseticida natural no fruto, o benzil isotiocianato (BITC), contra as mosca das frutas havendo riscos de se levar doenças para fora do país (Figura 2). O próprio nome da doença Papaya Sticky Disease se deu a partir da aparência pegajosa dos frutos infectados (Antunes et al., 2020; Fernandes et al., 2018; Ventura, Costa e Tatagiba, 2004).

É intrigante o fato de que as plantas infectadas permanecem assintomáticas até a floração e frutificação (Ventura, Costa e Tatagiba, 2004) e a pré-floração é o período que em teoria há a presença apenas do vírus auxiliar PMeV (Antunes et al., 2016). Porém, na pós-floração e pós-frutificação e com a chegada do vírus PMeV2, a planta perde a suposta tolerância que permite a coexistência de vírus e hospedeiro (Madroñero et al., 2018), há o desenvolvimento dos sintomas da virose e perda da qualidade do fruto com consequentes prejuízos econômicos. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de métodos eficazes de controle e diagnóstico da doença no campo, juntamente com o desenvolvimento de uma variedade de mamão resistente aos vírus da meleira. Isso se torna ainda mais importante ao considerar que as plantas desempenham o papel de reservatório viral silencioso no pomar até o surgimento dos sintomas (Antunes et al., 2020, Merchan-Gaitán et al., 2024).

No Brasil, os pomares devem ser monitorados semanalmente para controle fitossanitário da doença da meleira (Ventura, Costa e Tatagiba, 2004) e as estratégias de controle envolvem a erradicação das plantas doentes identificadas pelos sintomas (Abreu, P M V et al., 2015; Antunes et al., 2020). Mesmo com controles rigorosos, a doença pode afetar até 20% da produção. Em caso de cuidados inadequados, 100% da colheita pode ser perdida (Abreu, E F M et al., 2015; Antunes et al., 2020; Vieira et al., 2024). Por isso, é importante o desenvolvimento de métodos de diagnóstico da doença no campo, especialmente em plantas assintomáticas que servem como inóculo viral.

O método diagnóstico da doença da meleira acontece por meio da biologia molecular (Abreu, P M V et al., 2012; Maurastoni et al., 2020). Inicialmente, o diagnóstico era feito pela extração do dsRNA total oriundo de látex de plantas doentes e seguida visualização da banda correspondente em gel de agarose (Kitajima, 1993; Maciel-Zambolim et al., 2003; Rodrigues, S P et al., 2005), mas não era abrangente para detecção do vírus em outros tecidos da planta e não considerava a presença do PMeV2. Com o avanço das pesquisas, a metodologia de RT-PCR precisou ser ajustada e possibilitou a detecção viral em tecidos como folhas, além de também empregar PCR em tempo real quantitativo nesse diagnóstico (RT-qPCR) (Abreu, P M V et al., 2012; Araújo et al., 2007; Antunes et al., 2016). O RT-PCR multiplex recentemente permitiu a detecção simultânea dos dois vírus (Maurastoni et al., 2020).

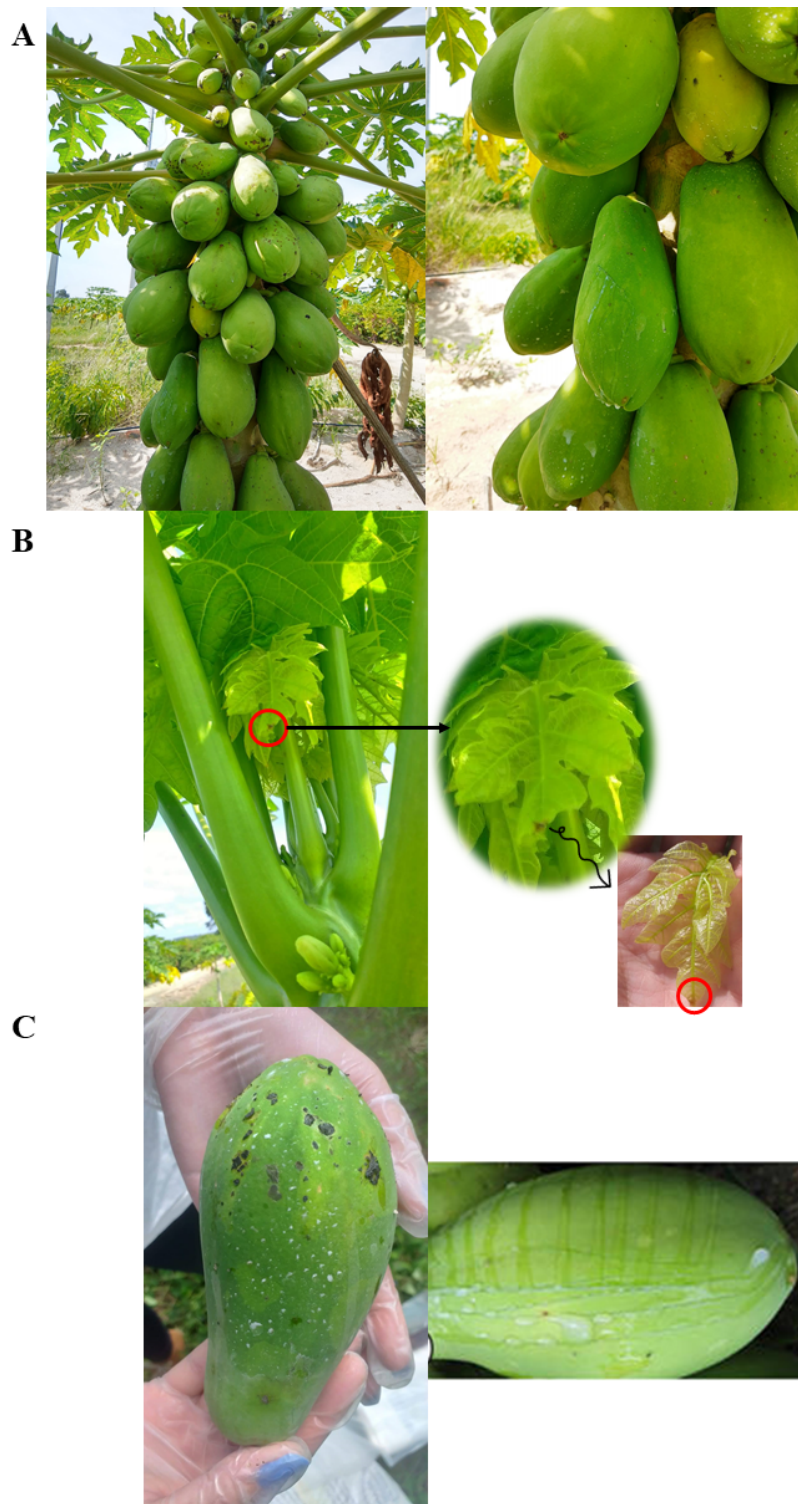


Figura 2. Sintomas típicos da doença da meleira em pomar em estágios iniciais da doença da meleira. A) Mamoeiro cujos frutos apresentam escurecimento e exsudação de látex. B) Lesões necróticas na ponta das folhas jovens indicadas pela seta. C) Látex fluido e bastante aquoso em frutos de plantas infectadas após lesão mecânica superficial e manchas verdes e amareladas. Fonte: Autoral.

1.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

1.4.1 A cromatografia como uma ferramenta diagnóstica

Diagnósticos virais requerem uma abordagem multifacetada e a técnica de PCR convencional e em tempo real se estabeleceu como o padrão ouro para a identificação viral precoce. No entanto, essa técnica possui limitações que incluem um procedimento complexo, elevado custo dos reagentes, necessidade de mão de obra altamente especializada e a possibilidade de resultados falso-negativos. Isso impulsionou o desenvolvimento de novas tecnologias, abrangendo dispositivos inovadores de detecção, avanços em métodos de testes sorológicos e ensaios sorológicos baseados em antígeno-anticorpo (Costa, Buss e Espinoza, 2020; Filchakova et al., 2022; Wu et al., 2024).

Ademais, as técnicas cromatográficas também são importantes para o diagnóstico clínico devido à sua especificidade, sensibilidade, capacidade quantitativa e potencial de alto rendimento (Jadhav et al., 2022; Kałużna-Czaplińska e Jóźwik 2014; Ngere et al., 2023; Oladimeji e Valan, 2020). Essas vantagens tornam a cromatografia uma ferramenta indispensável para o desenvolvimento de métodos diagnósticos precisos, com alta capacidade de padronização e com reconhecido potencial de para criação de kits ou métodos de diagnósticos de baixo custo, abrindo caminho para aplicações inovadoras e perspectivas pioneiras de pesquisa, particularmente nas ciências biológicas, ambientais e médicas. Isso representa uma oportunidade para o desenvolvimento de métodos diagnósticos alternativos baseados em abordagens cromatográficas (Ashraf et al., 2024; D'atri et al., 2019; Lima et al., 2021; Messner et al., 2022; Moreira et al., 2023; Ngere et al., 2023).

1.4.2 Fundamentos sobre Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os extratos de planta contêm numerosos fitoconstituintes com diferentes graus de polaridade, o que representa um desafio durante a extração, isolamento e caracterização dos metabólitos secundários (Ingle et al., 2017; Oladimeji e Valan, 2020). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography* HPLC) é uma técnica analítica que auxilia nesse processo por ser flexível, estável, eficaz, qualitativa e quantitativa muito empregada no controle de

qualidade de extrato bruto de espécies vegetais para investigação do potencial biológicos e para isolamento de produtos naturais (Cannell, 1998; Ingle et al., 2017; Oladimeji e Valan, 2020).

A cromatografia líquida é um método físico-químico de separação em que a distribuição das moléculas pela fase estacionária acontece de forma desordenada e isso permite que os picos tenham um formato Gaussiano e sigam uma distribuição normal (Snyder, 1983). O princípio fundamental da HPLC reside na partição seletiva e migração diferencial dos componentes da amostra entre duas fases: a fase estacionária e a fase móvel (Snyder, 1983; Snyder e Kirkland, 1973; Snyder, Kirkland e Dolan 2009; Harris, 1999). A fase móvel é bombeada para a coluna preenchida com a fase estacionária em um fluxo constante e a amostra a ser analisada é injetada no fluxo do eluente antes de entrar na coluna. Os componentes da amostra são retidos seletivamente ao atingir a coluna com base nas interações físico-químicas entre as moléculas do analito e a fase estacionária, e a interação predominante que determina a retenção das moléculas é a adsorção (Snyder, 1983; Snyder e Kirkland, 1973; Snyder, Kirkland e Dolan 2009; Harris, 1999). De acordo com as condições cromatográficas estabelecidas, a fase móvel elui os componentes da amostra e as técnicas de detecção são usadas para detectar e medir os compostos eluídos (Figura 3) (Oladimeji e Valan, 2020, Snyder, Kirkland e Dolan 2009; Harris, 1999).

Dentre os detectores disponíveis, os detectores UltraVioleta (UV) são populares devido à sua alta sensibilidade, além da maioria dos compostos de origem natural apresentarem alguma absorção de UV em comprimentos de onda baixos (190-210 nm) (Cannell, 1998). Em condições cromatográficas adequadas, cada composto deve apresentar um pico característico no cromatograma (Sasidharan et al., 2011) e a área de cada pico, definida pela região delimitada pelo início e fim da eluição do pico, é diretamente proporcional à concentração nos detectores UV (Snyder, 1983).

A cromatografia líquida é categorizada de acordo com o sistema de fases utilizados no processo podendo ser cromatografia de fase normal (FN-HPLC - diferencia os fitocompostos com base na polaridade), cromatografia de fase reversa (FR-HPLC), cromatografia de troca iônica (IXC-HPLC), cromatografia de exclusão por tamanho (a separação ocorre com base no tamanho das moléculas) e quem determina o modo cromatográfico é a fase móvel (Oladimeji e Valan, 2020, Snyder, Kirkland e Dolan

2009; Harris, 1999). A FR-HPLC se baseia no princípio das interações hidrofóbicas decorrentes das forças entre o eluente polar e a fase estacionária apolar. A ordem de eluição consiste primeiro nos compostos polares, seguidos pelos menos polares e, por último, os apolares (Figura 4) (McHale et al., 2021; Rusli et al., 2022; Poole, 2003; Snyder, Kirkland e Dolan 2009).

A literatura aponta que mais de 60% de todas as separações por HPLC sejam realizadas no modo de fase reversa por conta da flexibilidade, versatilidade e escopo do processo que ela apresenta, oferecendo uma grande vantagem na análise de compostos com diferentes polaridades e massas moleculares (Ahuja, 2006; Oladimeji e Valan, 2020; Prathap, 2013). A IXC-HPLC por sua vez baseia-se nas forças de atração entre os íons do solvente e os sítios carregados ligados à fase estacionária e a separação dos componentes pode ser controlada pelo ajuste do pH da fase móvel, temperatura, composição iônica e adição de modificadores. Os trocadores de cátions contém sítio de ligação carregados negativamente, ligados covalentemente, que atraem os cátions do solutos e nos trocadores de ânions, os grupos carregados positivamente na fase estacionária atraem os ânions do soluto (Harris, 1999; Oladimeji e Valan, 2020; Weiss e Wesiss, 2004).

As principais tecnologias usadas na metabolômica incluem além da cromatografia líquida, a cromatografia gasosa, espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria por infravermelho com transformada de Fourier. Esses métodos são frequentemente combinados para fornecer informações complementares e são capazes de analisar diferentes tipos de metabólitos (Hakeem et al., 2019; Lu et al., 2017; Ye et al., 2022). As técnicas hífenadas apresentam vantagens como ausência de necessidade de uma grande quantidade de analito na sua forma purificada, a possibilidade de ajustar a seletividade das amostras, resultando em maior velocidade de análise e melhorias nos limites de detecção. Além disso, essas técnicas possuem maior sensibilidade e são mais eficientes e rápidas do que as técnicas convencionais de análise (Feng et al., 2021; Skirycz et al., 2016).

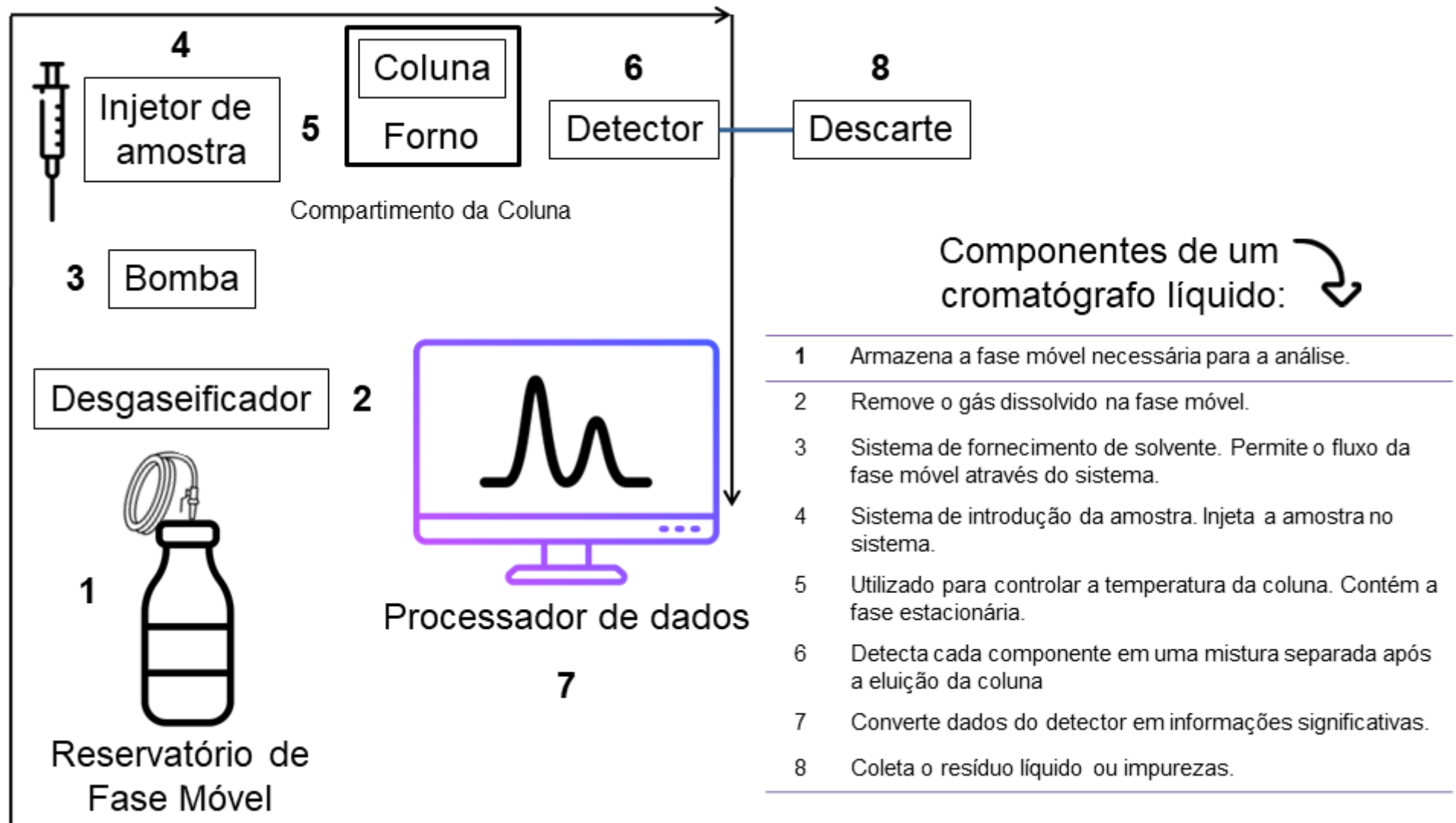


Figura 3. Esquema do funcionamento de um cromatógrafo líquido. Adaptado de Oladimeji e Valan, 2020.

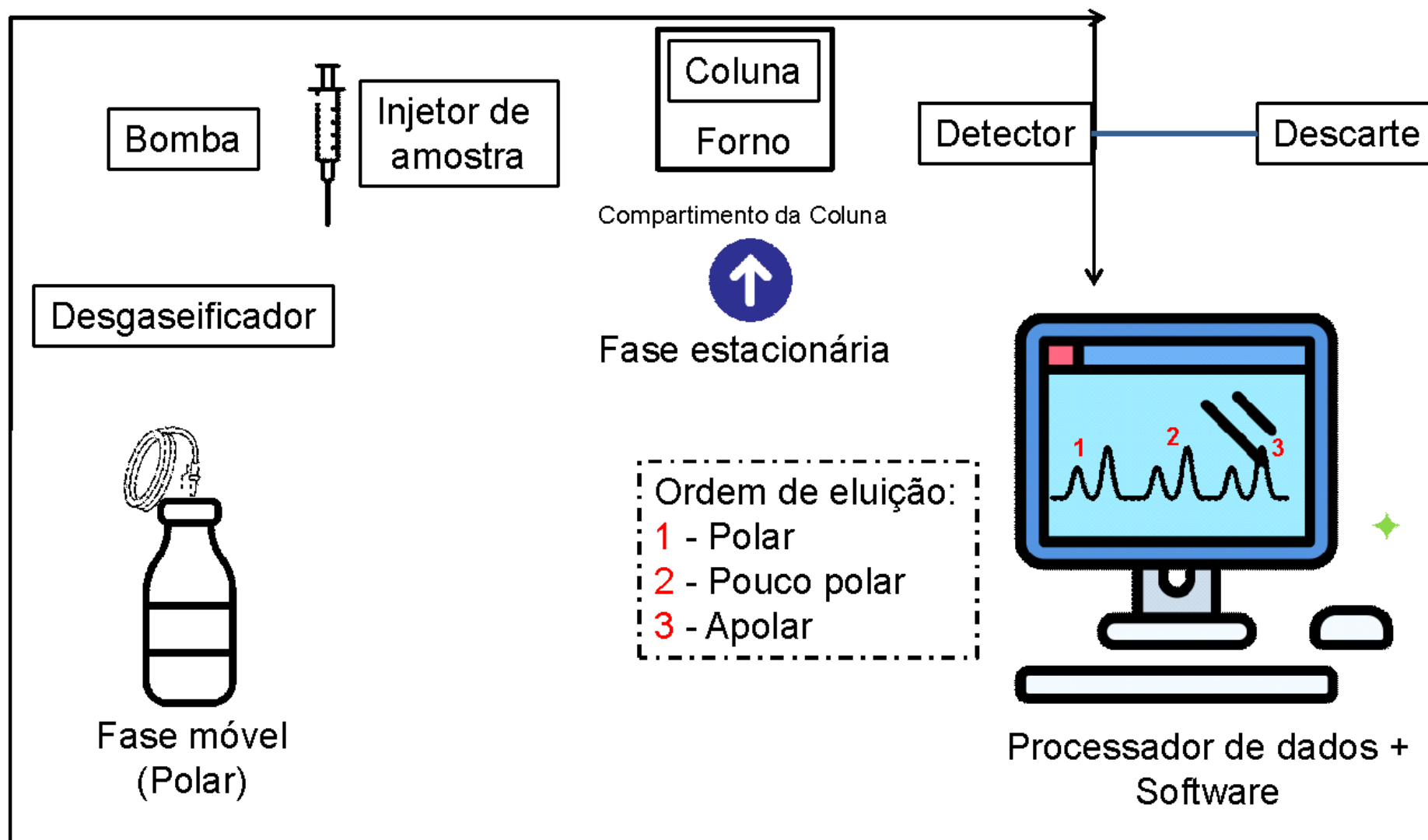


Figura 4. Esquema da separação por Cromatografia Líquida em Fase Reversa. Adaptado de Oladimeji e Valan, 2020.

1.5 *Carica papaya* L. E OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS RELACIONADOS À DEFESA CONTRA OS VÍRUS

Durante muito tempo, a pesquisa sobre o patossistema *C. papaya* – complexo viral PMeV focou na relação entre plantas saudáveis/doentes e o vírus PMeV, considerado o único responsável pela doença. A partir de 2016, foi necessário considerar ambos os vírus (PMeV e PMeV2) e reavaliar o sistema de interação entre vírus e planta, tanto na pré-floração quanto na pós-floração, que resultava em tolerância ao patógeno ou manifestação dos sintomas (Antunes et al., 2016; Fernandes et al., 2018; Madroñero et al., 2018; Maurastoni et al., 2023; Soares et al., 2017).

Houve uma progressão significativa na construção de uma rede de conhecimento bioquímico e molecular que investiga a interação entre a planta *C. papaya* e o complexo viral PMeV. No entanto, para uma compreensão mais abrangente deste patossistema, é necessário expandir as investigações para o metabolismo secundário. A pesquisa atualmente disponível sobre as respostas dos metabólitos secundários de *C. papaya* à infecção pelo complexo viral PMeV em diferentes estágios de desenvolvimento é limitada, o que representa um obstáculo para o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e estratégias de controle da doença da meleira. Além disso, há uma carência geral de estudos sobre o impacto das infecções virais de plantas e o metabolismo secundário (Canini et al., 2007; Duarte et al., 2023; Khadam et al., 2019; Merchán-Gaitán et al., 2024; Pang et al., 2021; Singh et al., 2020; Zaynab et al., 2018, 2019). Apesar dessas limitações, o interesse nesta área está crescendo, e há evidências sugerindo que os vírus de plantas podem exercer controle sobre o acúmulo desses compostos (Duarte et al., 2023; Merchán-Gaitán et al., 2024; Zaynab et al., 2018).

Carica papaya L. é uma planta da família Caricaceae, nativa da costa Caribenha da América Central e sul do México, amplamente cultivada em regiões tropicais, subtropicais e neotropicais (Accipe et al., 2023; Babalola et al., 2023; Gondim et al., 2022; Sharma et al., 2020; Vij e Prashar, 2015; Zhou et al., 2023). À planta, é atribuída alta relevância econômica, em especial pelo seu fruto (FAO, 2024) e suas folhas são usadas pela medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, como asma, cólica, febre de dengue e malária, câncer (Nguyen et al., 2016), além de ter

propriedades medicinais relacionadas ao aumento do apetite, estímulo da produção de leite materno e prevenção e cura da malária (Julianti, Oufir e Hamburger, 2014).

Estudos fitoquímicos e moleculares indicam que os extratos de diversas partes da planta *Carica papaya* L. demonstram atividades biológicas significativas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Estas incluem propriedades antioxidantes, antibacterianas, cicatrizantes, anticancerígenas, antivirais contra dengue e malária, anti-inflamatórias e imunomodulatórias (Gondim et al., 2022; Sharma et al., 2020; Zhou et al., 2023). Tais atividades são atribuídas aos compostos bioativos presentes na planta, tais como alcaloides, flavonoides, compostos fenólicos, carotenoides, triterpenos e esteroides (Sharma et al., 2020; Zaynab et al., 2018), que também participam do sistema de defesa vegetal contra infecções por patógenos (Duarte et al., 2023; Gondim et al., 2022; Sharma et al., 2020; Zaynab et al., 2018; Zhou et al., 2023).

As plantas desenvolveram ao longo do tempo um sistema de defesa complexo, envolvendo interações entre metabólitos secundários e organismos patogênicos, cujas respostas imunes resultantes têm sido investigadas (Duarte et al., 2023; Merchan-Gaitan et al., 2024; Pang et al., 2021; Son et al., 2023; Zaynab et al., 2018, 2019). A infecção viral em plantas, exemplificada pelo complexo viral causador da doença da meleira do mamoeiro, representa um desafio econômico significativo pelos danos causados à produção (Maurastoni et al., 2023; Vieira et al., 2024), carecendo de estudos que elucidem as interações a nível do metabolismo secundário entre o patógeno e a planta *C. papaya*.

Duarte et al., 2023 reforçam a importância sobre compreender como os vírus alteram o metabolismo do hospedeiro e como as plantas respondem à infecção. Os agentes fitopatogênicos (fungos, bactérias, vírus, nematoides, artrópodes, entre outros) têm a capacidade de modificar a expressão genética das plantas hospedeiras para suprimir suas defesas ou induzir a produção de componentes que favoreçam seu próprio desenvolvimento e infecção. Portanto, uma compreensão detalhada das interações entre patógenos e hospedeiros em nível molecular é essencial para implementar estratégias de defesa eficazes, contribuindo para o controle eficiente de culturas de importância econômica (Duarte et al., 2023; Zaynab et al., 2019). Para mitigar o impacto do estresse causado por infecções virais, as plantas sintetizam uma variedade de metabólitos secundários que desempenham um papel crucial na defesa

contra estresses bióticos e abióticos, e podem também possuir propriedades antivirais tanto para animais quanto para outras plantas. Entre esses compostos, destacam-se alcaloides, flavonoides e óleos voláteis (Duarte et al., 2023; Zaynab et al., 2018; Mishra et al., 2020). Os vírus também exercem um impacto significativo na biossíntese de hormônios nas plantas, influenciando diretamente o mecanismo de defesa regulado pelos hormônios etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico (Madroñero et al., 2018; Mishra et al., 2020). Portanto, a identificação desses metabólitos em plantas infectadas pode revelar insights sobre as vias envolvidas nas respostas durante interações planta-patógeno (Taglienti et al., 2020). No entanto, há poucos estudos disponíveis sobre como as infecções virais influenciam esses metabólitos (Duarte et al., 2023; Merchan-Gaitán et al., 2024; Mishra et al., 2020).

Esses metabólitos secundários estão envolvidos em processos como a síntese da parede celular e na modulação de espécies reativas de oxigênio, têm a capacidade de interagir com proteínas, alterando sua estrutura tridimensional por meio de ligações covalentes com grupos SH, OH- ou amino livres, o que pode resultar na perda de função ou na modificação do turnover proteico (Khalid, Bilal e Huang, 2019; Zaynab et al., 2018). Esses fenômenos têm sido observados em plantas de *C. papaya* infectadas pelo complexo viral (Antunes et al., 2020), evidenciando a necessidade de estudos que correlacionem e atribuam estes e outros eventos à metabólitos secundários específicos.

Um estudo de proteômica realizado em folhas infectadas pelo complexo viral PMeV revelou a expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo secundário, tanto antes quanto após a floração, indicando uma resposta potencial à infecção viral (Soares, 2016). Contudo, esta investigação não foi direcionada ao metabolismo secundário, o que sugere que muitas informações relevantes podem não ter sido capturadas integralmente. A progressão da doença da meleira do mamoeiro pode induzir alterações na concentração dos metabólitos secundários da planta. Portanto, é importante realizar uma investigação aprofundada dessas variações no metabolismo secundário, com o objetivo de relacioná-las à atividade antiviral contra os vírus causadores da doença da meleira. Além disso, essa abordagem visa identificar

potenciais biomarcadores da doença que possam ser aplicados em estudos de desenvolvimento de diagnósticos precoce da doença da meleira no campo.

Justificativa: A identificação dos metabólitos secundários envolvidos na defesa de *C. papaya* contra os vírus PMeV e PMeV2 se faz necessária e pode fornecer informações valiosas sobre a interação do vírus com a planta, possibilitando o desenvolvimento de um novo método de diagnóstico. Os resultados da pesquisa reduziriam os custos com diagnóstico para o produtor rural e auxiliariam no controle e prevenção da doença da meleira, tão devastadora para a produção de mamão.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

Se o metabolismo secundário está relacionado com o sistema de defesa de plantas contra a infecção por patógenos, então possivelmente existem diferenças a nível de metabolismo secundário em plantas de *C. papaya* entre a pré-floração e a pós-floração em resposta a infecção pelo complexo viral PMeV e a caracterização qualitativa e quantitativa destes biomarcadores podem auxiliar no diagnóstico da doença da meleira no campo.

2.2 OBJETIVO GERAL

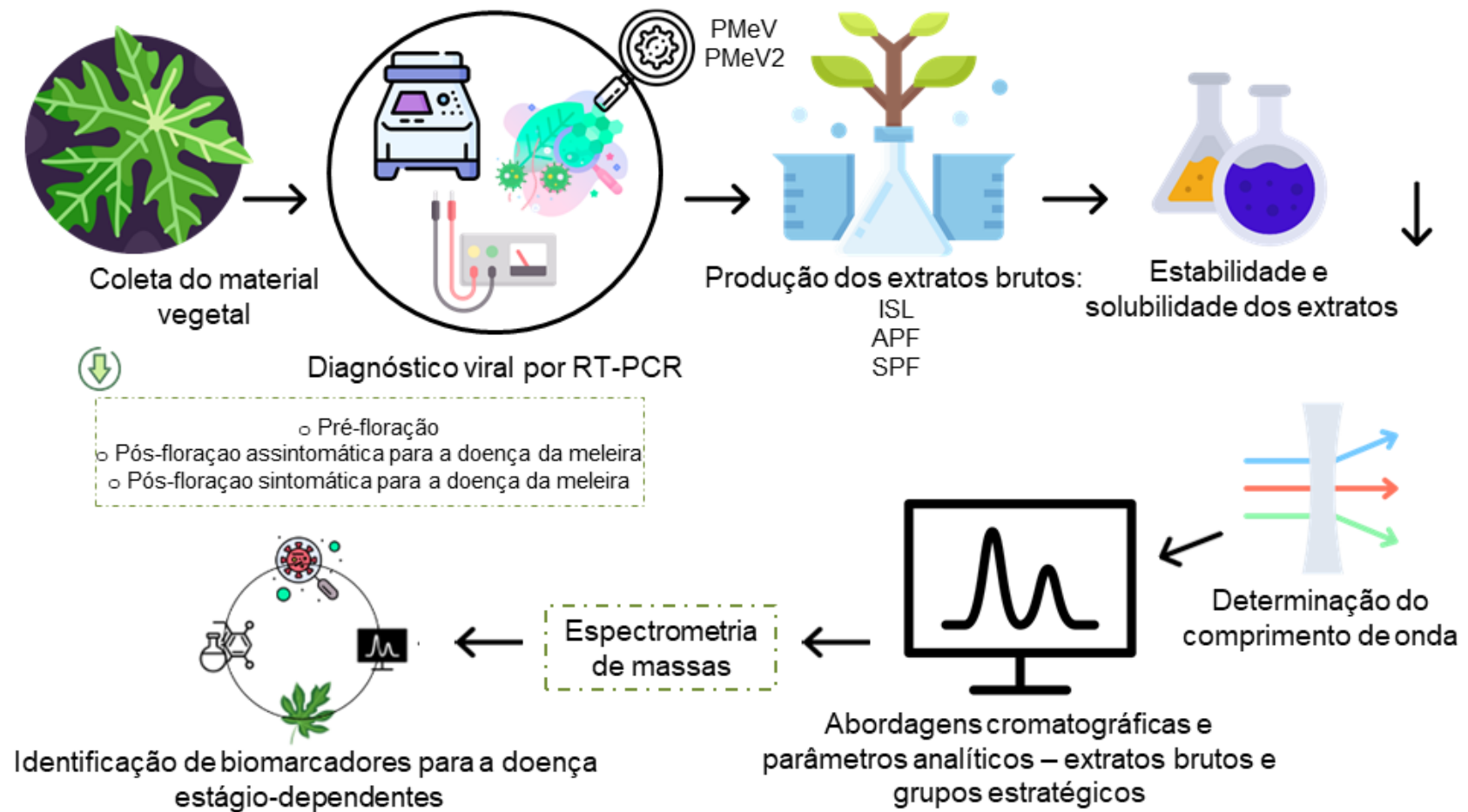
Determinar e caracterizar o perfil de metabólitos secundários dos extratos etanólicos de folhas de *C. papaya* associados ao mecanismo de tolerância ao complexo PMeV em plantas sadias e assintomáticas, e ao desencadeamento dos sintomas de meleira na pós-floração.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar folhas de *C. papaya* no campo em pré-floração e pós-floração;
- Realizar o diagnóstico viral de PMeV e PMeV2 das folhas jovens nos três estágios do desenvolvimento por meio de biologia molecular;
- Produzir os extratos brutos de folha de *C. papaya* em pré e pós-floração;
- Testar a solubilidade dos extratos vegetais;
- Testar a estabilidade cinética dos extratos vegetais;
- Analisar o perfil molecular qualitativo e quantitativo por meio de métodos cromatográficos dos extratos e grupos de frações em pré-floração e pós-floração
- Determinar a identidade das moléculas por espectrometria de massas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

DESENHO EXPERIMENTAL



MATERIAIS

Os reagentes para biologia molecular foram adquiridos da Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA e Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA. A glicina e cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes químicos glicina e cloreto de sódio (NaCl) são de grau analítico e o solvente acetonitrila utilizado em procedimentos cromatográficos são grau HPLC fornecidos pela sigma Aldrich.

MÉTODOS

3.1 ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA E LOCALIDADE DE COLETA

As amostras de folhas de *C. papaya* (grupo Havaí e variedade Aliança) em pré-floração (3 meses após a germinação) e em pós-floração (assintomática e sintomática para a doença da meleira do mamoeiro 12 meses após a germinação) foram coletadas no município de Linhares – ES, em diferentes localidades. O pomar em pré-floração foi acessado em Rio Norte UTM 24K – 2000 E371784 N7837132, o pomar em pós-floração sintomático foi acessado em Quartel de Cima UTM 24K – E376180 N7840424 e o pomar pós-floração assintomático foi acessado em Chapadão do XV UTM 24K – E380512 N7856976. Foram coletadas informações a respeito do histórico-cultural do pomar que incluíam além da localização, a idade da plantação, frequência de “*roguing*”, histórico de meleira e mosaico. Foram coletadas 3 folhas da copa de cada planta totalizando aproximadamente 60 árvores por pomar, de modo a manter a integridade do local.

3.2 DIAGNÓSTICO VIRAL EM FOLHAS

Para levar em consideração a natureza heterogênea dos extratos composta por folhas das diferentes plantas coletadas no mesmo pomar, foi utilizado um “pool” de material genético para a reação de RT-PCR. Brevemente, o RNA total foi extraído individualmente de 150 mg de folhas jovens de mamão (n=10) utilizando o reagente

TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do RNA (A260/A280) foi avaliada em espectrofotômetro NanoDrop® ND2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Em seguida, foram preparados três "pools" de RNA total na concentração de $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ("Pool" 1 - folhas em pré-floração; "Pool" 2 - folhas assintomáticas para a doença da meleira em pós-floração; "Pool" 3: folhas sintomáticas para a doença da meleira em pós-floração). O tratamento com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), síntese da fita complementar de DNA (cDNA), reações de PCR utilizando Taq DNA Polymerase recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e gel de eletroforese foram realizados conforme descrito por Antunes et al., 2016 e Maurastoni et al., 2020, uma vez que se trata de metodologia rotineira desenvolvida para o diagnóstico dos vírus PMeV e PMeV2 pelo laboratório onde o estudo foi conduzido (LBAA).

3.3 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

O método usado para a produção dos extratos vegetais seguiu o que foi proposto pela literatura com modificações (Alves et al., 2020; Britto et al., 2021; Salustiano, 2019). O material vegetal foi desidratado por quatro dias a 45 °C em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal TE-394/3 MP), triturado em moinho de disco vibratório (Retsch RS200) no LBAA e armazenado em potes de plástico sob o abrigo de luz. O material seco pulverizado foi depositado em percolador, onde adicionou-se etanol absoluto na proporção de 1:5 (m.v⁻¹) e assim permaneceu em maceração por 24 h. O processo de extração por percolação foi exaustivo. Os extratos etanólicos foram concentrados com auxílio de evaporador rotatório (Fisatom® 802) acoplado à bomba de vácuo (GS® VAC30) e banho-maria (Fanem® 1102) durante 21 dias. Posteriormente, os materiais concentrados foram liofilizados (-105 °C) em liofilizador K108 Liobras no LABIOM para eliminação total de solvente remanescente. O rendimento de cada extrato bruto (*R*) foi calculado segundo a equação abaixo e posteriormente armazenados em frascos de vidro, fechados e mantidos a -20 °C protegidos da luz e contato com oxigênio (McCloud, 2010). Os extratos foram designados por abreviações daqui em diante (Tabela 1). Esta etapa foi realizada em parceria com a Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

(EMESCAM) e Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER).

Equação 1. Determinação do rendimento dos extratos brutos.

$$R (\%) = \frac{\text{extrato bruto}(g)}{\text{material percolado}(g)} \times 100$$

Tabela 1. Designação das abreviações correspondentes a cada extrato bruto.

Extrato bruto	Abreviação
Extrato etanólico de folha de <i>C. papaya</i> em pré-floração	ISL
Extrato etanólico de folha de <i>C. papaya</i> em pós-floração assintomático	APF
Extrato etanólico de folha de <i>C. papaya</i> em pós-floração sintomático	SPF

3.4 TESTE DE SOLUBILIDADE DOS EXTRATOS

As amostras (ISL, APF e SPF) foram solubilizadas separadamente na concentração de 5,0 mg. mL⁻¹ em água reagente tipo I acidificada com ácido acético 0,1% v.v⁻¹, acetonitrila grau HPLC acidificada com ácido acético 0,1% v.v⁻¹ e em etanol absoluto para estabelecimento do solvente a ser usado para diluição dos extratos e posterior aplicação no cromatógrafo líquido. A determinação do solvente se baseou no parâmetro de força eluotrópica, polaridade e constante dielétrica.

3.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A espectroscopia foi usada a fim de se determinar o comprimento de onda a ser usado na detecção dos compostos na etapa Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(HPLC). Cada solução etanólica da amostra foi preparada na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ e realizada varredura espectral em uma faixa de 200 a 800 nm utilizando um espectrofotômetro Evolution® 300 da Thermo Scientific localizado no LABIOM. A velocidade de varredura foi ajustada para 120 nm.s⁻¹, com resolução espectral de 0,5 nm e o etanol absoluto foi utilizado como referência para as medições realizadas em triplicata. As análises e determinação dos picos foram realizadas no programa OriginPro versão 9.

3.6 TESTE DE ESTABILIDADE DOS EXTRATOS

A absorbância das três amostras (ISL, APF e SPF) foi monitorada durante quatro semanas na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ utilizando propriedade espectroscópica, como sonda no comprimento de onda de 258 nm e foi medida em um Espectrofotômetro Evolution ® Thermo Scientific em triplicata. A análise da estabilidade cinética foi realizada pelo programa SigmaPlot versão 8.0, usando o pacote de análise *Pharmacology/Shelf Life*. O programa usa um macro que foi validado seguindo as instruções da FDA, 1987.

3.7 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE FOLHA DE MAMÃO (*C. papaya*) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (FR-HPLC)

3.7.1 Preparo de amostra e de fase móvel

As fases móveis A (água reagente tipo I acidificada com ácido acético 0,1% v.v⁻¹) e B (acetonitrila grau HPLC acidificada com ácido acético 0,1% v.v⁻¹) foram preparadas seguida de filtração à vácuo com membrana PVDF 0,22 µm e degaseificadas por 10 min. Os extratos brutos foram solubilizados na fase móvel B, em seguida filtrados em filtro de seringa PVDF de 0,22 µm e centrifugados para garantir que nenhuma impureza fosse transferida para o cromatógrafo líquido.

3.7.2 Análise do perfil molecular por cromatografia em fase reversa (FR-HPLC)

A análise por FR-HPLC com eluição gradiente foi realizada em um Sistema HPLC Shimadzu Prominence no LBAA e uma coluna cromatográfica Alcom Kinetex 5 μm , EVO C18 100A de 4,6 mm x 25 cm como fase estacionária. O programa de eluição gradiente adotado foi: de 0 a 7 minutos, a concentração de (A) permaneceu isocrática em 100%; de 7 a 18 minutos, o gradiente mudou até atingir 100% de (B), o qual foi mantido até 40 minutos de eluição cromatográfica. Em seguida, a concentração de (B) diminuiu gradativamente até atingir 100% de (A) aos 48 minutos, sendo mantida isocrática até o final da corrida aos 56 minutos. Os extratos brutos foram injetados no sistema nas concentrações de 2,5, 5,0 e 7,5 mg.mL^{-1} e as análises foram monitoradas com comprimento de onda de 258 nm, volume de injeção da amostra de 200 μL e fluxo ajustado para 0,5 mL.min^{-1} . Os picos observados no cromatograma foram coletados na saída do detector, liofilizados ($-105\text{ }^{\circ}\text{C}$) em liofilizador K108 Liobras (LABIOM) e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM HPLC

As amostras (extratos brutos e grupos de interesse coletados anteriormente em FR-HPLC) foram analisadas pelo Sistema HPLC Shimadzu Prominence no LBAA com coluna Shimadzu LC Shim-Pack WC x 4 mm DI x 5 cm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como fases estacionárias catiônica e aniônica. A fase móvel consistiu em 50 mmol. L^{-1} de glicina, 50 mmol. L^{-1} de NaCl, ajustada para pH de 3,0. O tempo de corrida variou entre as amostras e o tipo de fase estacionária. As análises foram monitoradas com comprimento de onda de 258 nm, volume de injeção da amostra de 10 μL e fluxo de 0,2 mL.min^{-1} .

3.9 AUMENTO DA RESOLUÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIÔNICA

Os mesmos grupos estratégicos coletados previamente por FR-HPLC foram submetidos a uma nova separação cromatográfica e todos os parâmetros da coluna

menor foram recalculados para dimensões maiores (Harris, 1999, p. 562). Os perfis moleculares foram analisados pelo sistema HPLC Shimadzu Prominence no LBAA utilizando a coluna TSK-GEL-CM-25W LC de 5 μm , 4,6 mm DI x 25 cm como fase estacionária aniônica. A fase móvel consistiu em 50 mmol.L^{-1} de glicina, 50 mmol.L^{-1} de NaCl, ajustado para pH de 3,0. O tempo de corrida foi 40 minutos em condições isocráticas. As análises foram monitoradas 258 nm, volume de injeção da amostra de 300 μL e fluxo ajustado para 0,3 mL.min^{-1} . Os picos observados no cromatograma foram coletados na saída do detector, liofilizados ($-105\text{ }^{\circ}\text{C}$) em liofilizador K108 Liobras (LABIOM) e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.9.1 Remoção de sal das amostras

Com o objetivo de retirar o sal presente na amostra G3' coletada da cromatografia de troca catiônica no item 3.9, foi realizada uma cromatografia líquida de gel filtração de bancada com 69 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro e resina Sephadex® G-15 (Pharmacia, Estocolmo, Suécia). Foram adicionados 5 mg da amostra G3' e a eluição foi do tipo isocrática. A fase móvel foi composta por água destilada acidificada, eluída em um fluxo de 0,18 mL.min^{-1} controlado por uma bomba peristáltica Masterflex® 77122-02 (Thermo Fisher Scientific, Barrington, Estados Unidos da América). As frações foram coletadas a cada 11 min (2,0 mL). Para o acompanhamento e separação das frações contendo os metabólitos secundários e o sal, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos da América) localizado no LABIOM. As amostras contendo absorção em 258 nm foram reunidas, congeladas em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizadas no liofilizador K108 Liobras no LABIOM.

3.10 DETERMINAÇÃO DA IDENTIDADE DAS MOLÉCULAS POR UHPLC-MS/MS

As análises foram realizadas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo em um espectrômetro de massas LTQ XL™ (Thermo Fisher Scientific, USA) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) em modo positivo e negativo acoplado a um sistema

de UHPLC Vanquish (Thermo Scientific, USA). As separações por cromatografia líquida foram conduzidas usando uma coluna Phenomenex C18 (150 x 2,1 mm; 1,6µm) e como fase móvel foi usada sistema binário de acetonitrila e água deionizada acidificada com ácido fórmico (0,1% v.v⁻¹). O volume de injeção adotado foi de 5,0 µL, mantendo-se um fluxo da fase móvel de 0,2 mL.min⁻¹. Para eluição da amostra, um gradiente com fase móvel composta por água acidificada com ácido fórmico 0,1% (solvente A) e acetonitrila (solvente B), foi empregado. O gradiente iniciou-se com 20% de B. Aos 3 minutos atingiu-se 45% de B, e aos 10 min atingiu-se 100% de B, mantendo-se nessa proporção por quatro minutos, voltando às condições iniciais em segundos no minuto 14, sendo mantido nesta proporção até o final da corrida cromatográfica em 16 min. Os dados do gradiente cromatográfico empregado estão dispostos na Tabela 2. A temperatura da coluna foi mantida em 45 °C. Os dados de EM foram adquiridos na faixa de m/z 50 - 1000, com os seguintes parâmetros: temperatura capilar 320 °C, *sheath gas flow* 30, *aux. gas flow* 10 e *source heater temperature* 350 °C. A notação dos picos cromatográficos foi realizada pela determinação do envelope do isótopo do íon molecular (MS1) e comparação dos espectros de fragmentação (MS2) com espectros de referência contidos na literatura encontrada para a mesma matriz (Alencar et al., 2020; Gondin et al., 2022, Zhou et al., 2023).

Tabela 2. Gradiente da fase móvel utilizada na análise por UHPLC-MS/MS.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	80	20
3	55	45
10	0	100
14	0	100
14,001	80	20
16	80	20

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em triplicata. A significância estatística ($P \leq 0,05$) das diferenças entre as médias das amostras foi determinada pelo teste t de Student. Os dados obtidos foram importados para os softwares Origin(Pro) versão 9 e GraphPad Prism versão 7 para representação gráfica. Os parâmetros analíticos (tempo de retenção, largura da base, área do pico e número de pratos teóricos) foram determinados utilizando os métodos descritos por Harris, 1999.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS FOLHAS

As plantas em pré-floração foram indexadas por RT-PCR e confirmou-se a presença do PMeV no “pool” de folhas em pré-floração (tamanho do *amplicon*: 685 pb) (Figura 5A, número 3). Sementes certificadas são utilizadas para o cultivo de frutos, e plantas de *C. papaya* em pré-floração normalmente hospedam o vírus PMeV (Abreu, P M V et al., 2015; Antunes et al., 2016, 2020; Maurastoni et al., 2020). Tanto o PMeV quanto o PMeV2 (tamanho do *amplicon*: 815 pb) foram detectados nos “pools” em pós-floração (Figura 5A e B, números 4 e 5). Embora uma única planta possa conter o complexo viral sem manifestar os sintomas, isso não implica que todas as 60 plantas coletadas em pomares em pós-floração assintomáticos sejam positivas para PMeV2. A presença do complexo viral não é a única responsável pelo desencadeamento dos sintomas dessa doença. Isso envolve uma cascata complexa de eventos que precisam ser acionados ou reprimidos no vegetal (Abreu, P M V et al., 2015; Antunes et al., 2016, 2020; Maurastoni et al., 2020, 2023; Madroñero et al., 2018, Soares et al., 2017). Relatos isolados da doença da meleira do mamoeiro em ciclos econômicos anteriores deste pomar corroboram a possível ocorrência do segundo vírus. O “pool” de folhas em pós-floração sintomático (Figura 5A e B, número 5) amplificou para ambos os vírus, como esperado para plantas sintomáticas. Os controles negativos (Figura 5, números 1 e 2) não apresentaram amplificação, o que confirma a ausência de contaminação garantindo confiabilidade aos resultados sem a possibilidade de ocorrência de resultados falsos positivos e os controles positivos (Figura 5, números 6 e 7) amplificaram para ambos os vírus, como esperado.

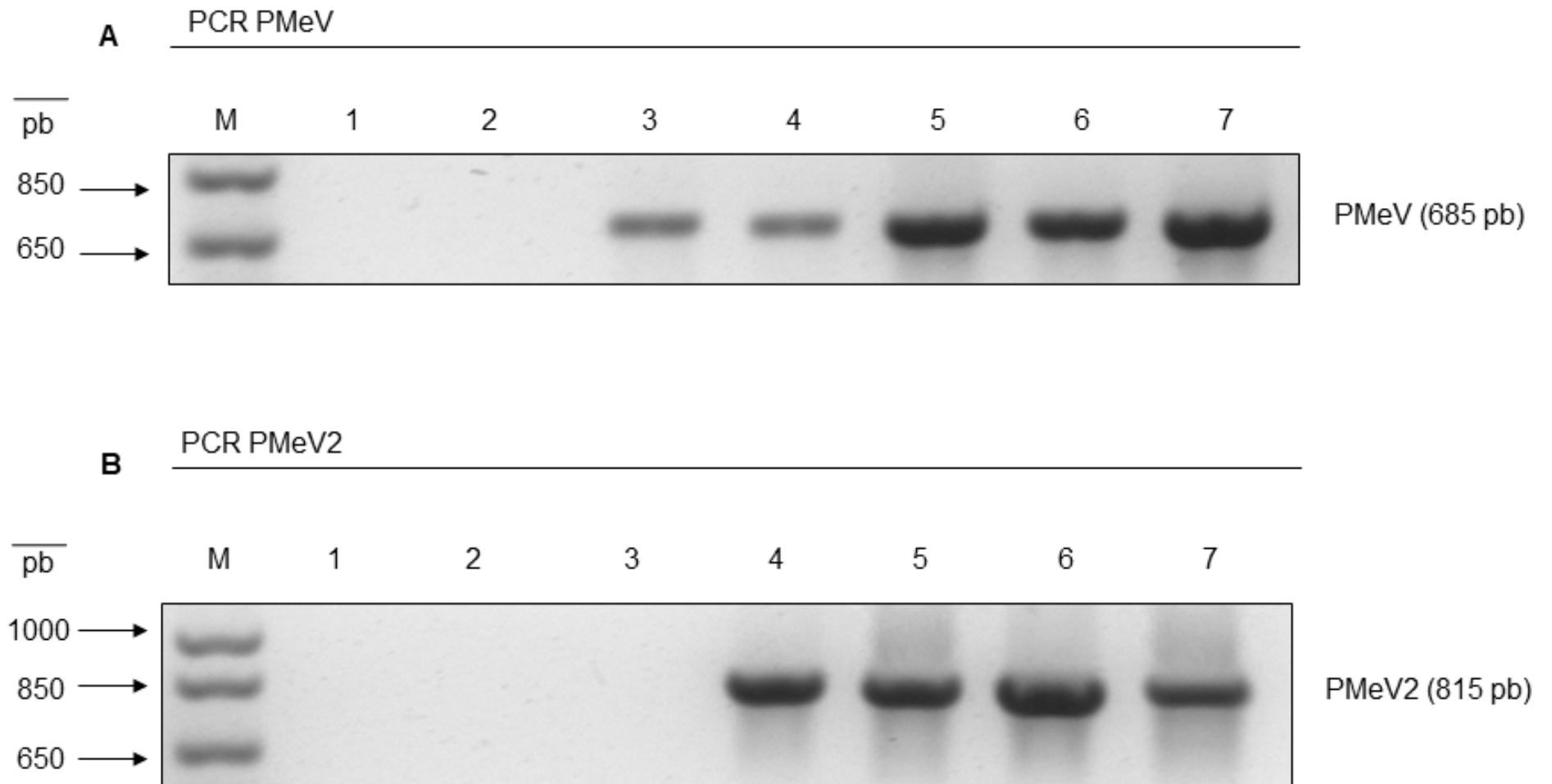


Figura 5. Detecção viral de PMeV e PMeV2 nos materiais vegetais. M: marcador molecular Ladder 1 Kb Plus, 1 e 2: controles negativos; 3: "pool" referente às folhas em pré-floração, 4: "pool" referente às folhas em pós-floração assintomática, 5: "pool" referente às folhas em pós-floração sintomática, 6 e 7: controles positivos.

4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

Visando estabelecer um parâmetro de referência para o rendimento de extratos etanólicos de folhas de *C. papaya* por percolação exaustiva, este estudo investigou a eficiência desse método na extração de metabólitos secundários. Os resultados, apresentados na Tabela 3 demonstram os rendimentos obtidos para os três extratos. Foram coletados 10,00 kg, 7,00 kg e 8,00 kg de material vegetal fresco dos pomares em pré-floração, pós-floração assintomático e pós-floração sintomático respectivamente. A realização desta coleta em larga escala foi necessária devido à ausência de dados na literatura sobre o rendimento de extrato de *C. papaya* utilizando percolação exaustiva com etanol como solvente extrator, sendo que o rendimento pode variar de acordo com a espécie vegetal e a metodologia empregada (Alves et al., 2020; Daí e Mumper, 2010; Handa et al., 2008).

O rendimento, expresso como porcentagem do extrato bruto em relação à massa inicial do material vegetal percolado, foi determinado segundo a literatura (Alves et al., 2020; Salustiano, 2019). Os valores obtidos (15-17%) são satisfatórios e estão dentro da faixa relatada (5-25%) para rendimentos de extrato bruto por percolação exaustiva (Handa et al., 2008; Shen et al., 2014). Esta metodologia foi escolhida devido à sua eficiência na extração de uma ampla gama de metabólitos secundários, resultando em um extrato bruto enriquecido com esses compostos (Agarwal et al., 2016; Altemimi et al., 2017; Ingle et al., 2017; Souza, Gasparoti e Paula, 2022; Tiwari et al., 2011). O presente resultado é importante para pesquisas futuras, pois estabelece uma referência para a quantidade de folhas frescas de *C. papaya* necessária para se obter a quantidade desejada de extrato bruto utilizando o método de percolação exaustiva.

As folhas do mamoeiro foram selecionadas para análise devido à sua natureza renovável e à presença visível de sintomas da meleira (Antunes et al., 2020). Essa escolha abre caminho para estudos que buscam identificar diferenças no perfil molecular da planta em relação à presença dos vírus causadores da doença da meleira do mamoeiro. A utilização das folhas como fonte de investigação oferece vantagens como a renovabilidade, a detecção viral e a ausência de danos à planta, características importantes para o desenvolvimento de um método diagnóstico baseado em marcadores fitoquímicos. O etanol foi o solvente extrator escolhido

devido à sua capacidade de solubilizar os compostos polares presentes nas folhas de mamão e o envolvimento de metabólitos secundários polares com o sistema de defesa da planta frente a infecção por vírus, conforme relatado pela literatura (Duarte et al., 2023; Khadan et al., 2019; Marchan-Gáitan et al., 2024; Pang et al., 2021; Sharma et al., 2020; Zaynab et al., 2018). A escolha do etanol visou também o possível desenvolvimento de um kit diagnóstico futuramente, pois este solvente não exige controle da Polícia Federal, simplificando o processo e tornando-o mais acessível.

Tabela 3. Rendimento dos extratos brutos.

Tipo de extrato de folha de <i>C. papaya</i>	Material vegetal fresco (kg)	Material vegetal pulverizado (g)	Material vegetal seco percolado (g)	Extrato bruto (g)	Rendimento (% m.m ⁻¹)
ISL	10,00	1548,44	400,00	63,67	15,92
APF	7,00	1220,00	500,00	82,94	16,59
SPF	8,00	1300,00	500,00	82,00	16,40

4.3 SOLUBILIDADE DOS EXTRATOS

Os extratos brutos demonstraram solubilidade nos três solventes testados conforme apresentado na Tabela 4. A escolha da água reagente tipo I acidificada com ácido acético 0,1% v.v⁻¹ e da acetonitrila grau HPLC acidificada com ácido acético 0,1% v.v⁻¹ foi justificada pela sua capacidade de simular as condições das fases móveis A e B, respectivamente, do sistema cromatográfico. Essa abordagem fornece informações importantes sobre a interação dos extratos com as fases móveis e estacionária, sendo essencial garantir que os extratos se dissolvam completamente para evitar precipitação/agregação durante a análise. O uso de etanol como solvente foi fundamentado, pois testar a solubilidade dos extratos neste solvente assegura a eficiência do processo de extração, garantindo que os compostos de interesse permaneçam solubilizados ao longo da análise subsequente.

A decisão pela utilização da solução de acetonitrila grau HPLC acidificada com ácido acético 0,1% v.v⁻¹ foi baseada pelos parâmetros de força de eluição dos solventes (Tabela 5), considerando suas polaridades e constantes dielétricas conforme discutido por Harris, 1999 e Snyder, 1983. A separação das moléculas dos extratos quando solubilizadas neste solvente é mais eficiente pela sua capacidade de promover uma interação mais lenta com a fase estacionária. O etanol, devido à sua força de eluição próxima à do metanol ($\epsilon^\circ = 0,70$), resultaria em uma interação rápida do extrato solubilizado com a fase estacionária, comprometendo a separação dos compostos, os quais seriam eluídos rapidamente com baixa resolução. Portanto, determinar o solvente em que a amostra será solubilizada levando em conta esses parâmetros analíticos foi uma etapa importante para nosso estudo cromatográficos, previne a precipitação dos componentes e promove a separação adequada das moléculas (Burdick e Jackson, 1990; Harris, 1999; Snyder, 1983).

Tabela 4. Solubilidade dos extratos etanólicos de folha de *C. papaya*. O sinal (+) indica que o extrato foi solúvel.

Tipo de extrato	Solvente		
	Água reagente tipo I acidificada com ácido acético 0,1% v.v ⁻¹	Acetonitrila grau HPLC acidificada com ácido acético 0,1% v.v ⁻¹	Etanol
ISL	+	+	+
APF	+	+	+
SPF	+	+	+

Tabela 5. Série eluotrópica dos solventes para a cromatografia de adsorção na sílica.

Solvente	Força eluente (ϵ°)
Pentano	0,00
Hexano	0,01
Heptano	0,01
Triclorotrifluoroetano	0,02
Tolueno	0,22
Clorofórmio	0,26
Diclorometano	0,30
Éter etílico	0,43
Acetato de etila	0,48
Éter metil t-butílico	0,48
Dioxano	0,51
Acetonitrila	0,52
Acetona	0,53
Tetraidrofurano	0,53
2-propanol	0,60
Metanol	0,70

Fontes: Burdick e Jackson, 1990; Snyder, 1983.

4.4 ESPECTROSCOPIA DE VARREDURA UV-VIS

A análise por espectroscopia UV-Vis dos três extratos de folha (ISL, APF e SPF) identificou comprimentos de onda distintos correspondentes a picos de absorção. Como pode ser visto na Figura 6, todos os espectros exibiram uma banda de absorção similar em torno de 258 nm e absorção secundária em torno de 320-400 nm. Considerando a literatura associada a esses extratos (Gondin et al., 2022; Sharma et al., 2020; Khadam et al., 2020; Nughroro et al., 2017; Singh et al., 2020; Zhou et al., 2023) e as bandas de absorção observadas, pode-se sugerir que as moléculas possuem compostos aromáticos em sua estrutura.

Como pode ser visto na Figura 6A, existe uma largura de banda com picos em 258 nm, 320 nm e 393 nm determinados por meio da análise de múltiplos picos pelo programa Origin Pro Versão 9 e varia de 200 nm a 550 nm. Essa ampla largura de banda sugere a presença de cromóforos com transições eletrônicas complexas ou com uma variedade de conformações de forma que a amplitude geral do espectro implica em uma mistura complexa de compostos com diversas características estruturais. Por meio da análise da Figura 6B na faixa de 200-510 nm, observa-se que a largura de banda do espectro possui picos em 258 nm, 331 e 415 nm, variando de 200 nm a 510 nm. Essa largura de banda ligeiramente mais estreita em comparação com a Figura 6A pode indicar uma mistura menos complexa de compostos ou até mesmo uma potencial estrutura molecular mais rígida.

Já na Figura 6C, existe uma largura de banda com picos em aproximadamente 258 nm, variando de 200 nm a 550 nm semelhante às da Figura 6A, sugerindo também uma mistura potencialmente complexa de compostos. Conforme documentado na literatura, classes de metabólitos secundários, como flavonoides, alcaloides, compostos fenólicos e cumarinas absorvem luz em comprimento de onda de 258 nm (Britto et al., 2021; Feng et al., 2021; Kumar, Krishnakumar e Jhon 2022; Nugroho et al., 2017; Sharma et al., 2020; Son et al., 2023) e estão relacionados com atividade antipatogenica, incluindo antiviral (Duarte et al., 2023; Merchan-Gaitan et al., 2024; Rodrigues, S A et al., 2009; Sharma et al., 2020; Zaynab et al., 2018). Portanto, selecionar 258 nm para detecção por RP-HPLC está estrategicamente alinhado com o perfil de absorção esperado desses compostos presentes nos extratos.

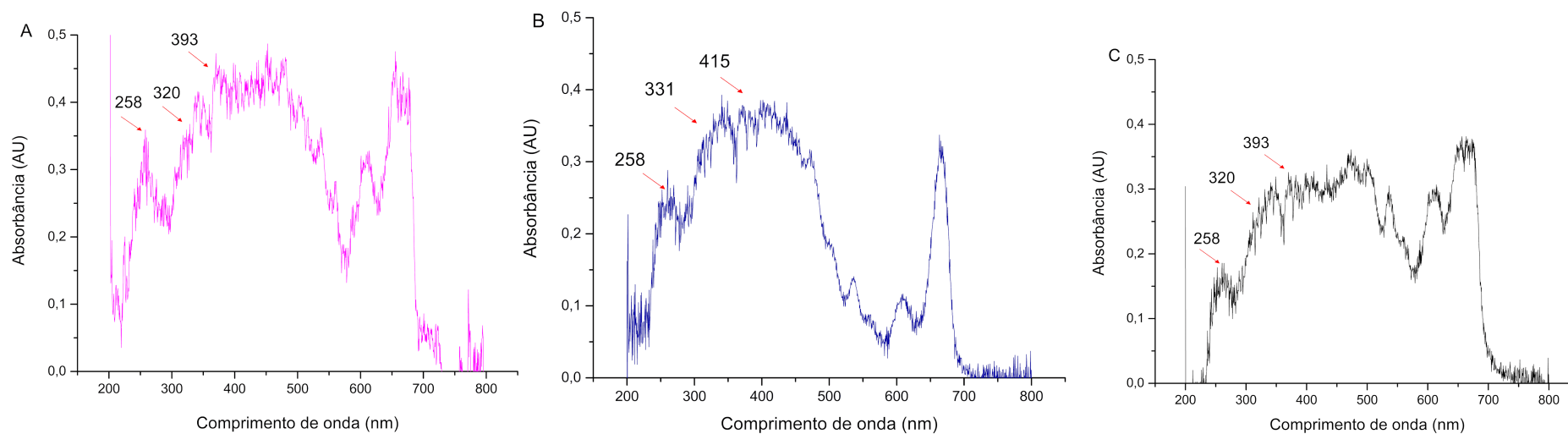


Figura 6. Espectro de varredura UV-Vis de amostras de extratos de folhas de *C. papaya*. A velocidade foi definida como 120 nm.s^{-1} e largura de banda de $0,5 \text{ nm}$. A) Bandas de absorção para extrato de folha do estágio inicial (ISL). B) Bandas de absorção para extrato de folha em pós-floração assintomático (APF). C) Bandas de absorção para extrato de folha pós-floração sintomático (SPF). A cor rosa refere-se ao extrato ISL, azul ao extrato APF e preta ao extrato SPF.

4.5 ESTABILIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos foram analisados usando propriedade espectroscópica como sonda para determinação da estabilidade química dos compostos que absorvem energia na faixa do ultravioleta e parâmetro cinético. Como demonstrado na Tabela 6, não houve variação significativa na absorbância das amostras ao longo do tempo, sugerindo que as moléculas se mantiveram estáveis durante o período investigado. Este resultado foi corroborado pela Figura 7, que apresenta a análise da vida útil dos extratos (*Shel life analysis*), parâmetro cinético e físico-químico essencial para determinar a estabilidade e durabilidade dos produtos ao longo do tempo. O eixo X representa o tempo em dias e o eixo Y representa o t90%. A linha indicada por 1 corresponde à projeção matemática de medidas experimentais e por 2, previsão teórica. O ponto 3 corresponde à projeção do tempo necessário para que a linha teórica decaia para 90% de seu valor inicial, o que indicaria que o composto teria perdido 10% de sua estabilidade. De acordo com este resultados, os extratos levariam aproximadamente 3×10^{14} dias para atingirem o t90%, o que comprova a sua estabilidade.

Os resultados mostraram que os compostos presentes nos extratos mantiveram sua integridade química ao longo do tempo analisado, o que é fundamental para garantir a confiabilidade e consistência dos resultados em estudos subsequentes de atividade química ou biológica. Esta estabilidade é importante para o desenvolvimento de extratotecas e bibliotecas de compostos naturais, permitindo o armazenamento prolongado sem comprometer suas propriedades bioativas. A metodologia empregada não apenas confirma a estabilidade dos extratos, mas também estabelece uma base sólida para futuras investigações sobre o potencial terapêutico ou biotecnológico desses compostos.

A estabilidade dos extratos brutos, quando corretamente acondicionados, é esperada conforme evidenciado na literatura (Dai e Mumper, 2010; Shen et al., 2014; Thornburg et al., 2018). Bibliotecas de extratos brutos são utilizadas para testes de atividade biológica (Almeida et al., 2022; Thornburg et al., 2018) e o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (INC) se destaca como um exemplo em

bioprospecção molecular por meio da construção de uma biblioteca de extratos estáveis ao longo do tempo, o que possibilitou a descoberta de importantes fármacos anticancerígenos (Thornburg et al., 2018). Esta abordagem é seguida por universidades brasileiras e centros de pesquisa, que constroem suas próprias bibliotecas de extratos brutos oriundos dos biomas brasileiros (Almeida et al., 2022, 2020; Harvey, Edrada-Ebel e Quinn, 2015; Lowell et al., 2015; www.biopros.ufv.br).

Tabela 6. Variação da absorbância em função do tempo dos extratos brutos de *C. papaya*. Os dados não diferem entre si pela análise ANOVA ($P \leq 0,05$). A tabela traz informações da média de absorbância do extrato em cada semana e o desvio padrão.

Semana	Média da semana (AU) em 258 nm	Desvio padrão
Extrato ISL		
1	0,2549	$\pm 0,0013$
2	0,2563	$\pm 0,0012$
3	0,2549	$\pm 0,0005$
4	0,2554	$\pm 0,0004$
Extrato APF		
1	0,2484	$\pm 0,0021$
2	0,2464	$\pm 0,0009$
3	0,2463	$\pm 0,0004$
4	0,2485	$\pm 0,0019$
Extrato SPF		
1	0,2852	$\pm 0,0052$
2	0,2889	$\pm 0,0036$
3	0,2883	$\pm 0,0092$
4	0,2890	$\pm 0,0061$

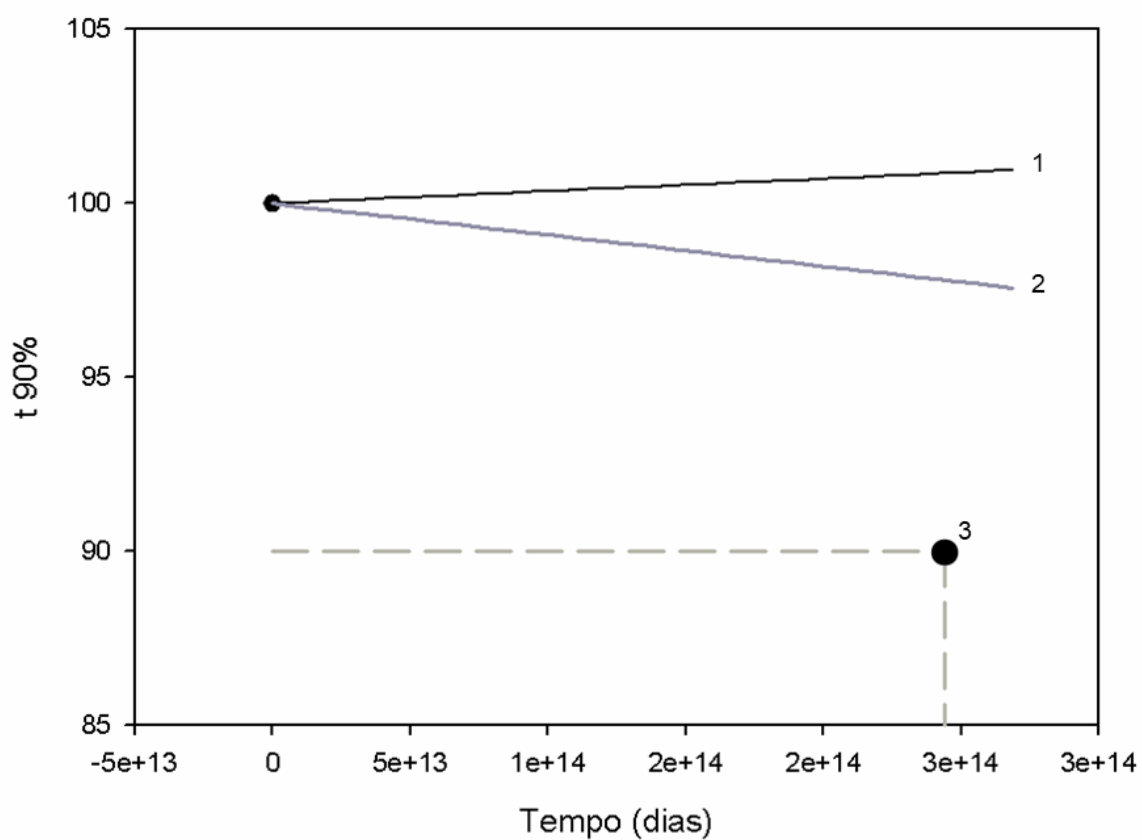


Figura 7. Estabilidade cinética dos extratos brutos. 1) Linha referente à projeção matemática de medidas experimentais. 2) Linha referente ao resultado da previsão teórica. 3) Projeção de tempo em que a linha de decaimento teórica alcança o $t_{90\%}$.

4.6 PERFIL MOLECULAR DOS EXTRATOS BRUTOS

4.6.1 Análise cromatográfica dos extratos etanólicos de folha de *C. papaya*

As amostras (ISL, APF e SPF) foram analisadas em três concentrações distintas (2,5, 5,0 e 7,5 mg.mL⁻¹) no comprimento de onda de 258 nm e os resultados obtidos através dos cromatogramas (Figura 8 a Figura 10) revelam que o aumento da concentração da amostra injetada não gerou a detecção de novos picos cromatográficos. Em contrapartida, observou-se um aumento na intensidade e área dos picos já existentes e nos mesmos tempos de retenção (Figura 8 a Figura 10, Tabela 7). A análise cromatográfica também evidenciou que, em decorrência da natureza apolar da fase estacionária utilizada, os compostos polares eluíram primeiro durante a corrida, enquanto os compostos de polaridade intermediária ou apolares foram eluídos posteriormente, devido à sua maior afinidade com a fase estacionária (Oladimeji e Valan, 2020).

Como pode ser visto nas Figura 8 a 10 e Tabela 7, observou-se uma região nos tempos iniciais de eluição indicados na Tabela 7 em todas as concentrações a qual foi denominada grupo de fração 1 ou G1. Este grupo G1 apresentou diferenças quantitativas de área e intensidade entre os três tipos de extratos analisados (Tabela 7). Os picos observados em G1 para os três extratos em todas as concentrações analisadas exibiram formato simétrico, com eluição registrada na mesma faixa de tempo de retenção como pode ser visto na Tabela 7. Adicionalmente, foi observada largura de base estreita e similar (Tabela 7) sugerindo número reduzido de moléculas, e ausência de caudas demonstrando que a coluna não está saturada (Harri,s 1999; Poole, 2003; Posert e Baconguis, 2023; Snyder, Kirkland e Dolan, 2009).

A ausência de cauda observada nos picos cromatográficos de interesse indica uma separação eficiente, onde os compostos presentes nas amostras se separam de forma eficaz na coluna, minimizando interações indesejadas, resultando em picos estreitos e bem definidos. Além disso, essa ausência de cauda sugere que os compostos presentes nestes grupos de fração G1 são relativamente puros, livres de

contaminantes ou interferentes e também reflete condições cromatográficas otimizadas (Baeza-Baeza e Coque, 2004, Snyder, Kirkland e Dolan 2009). A forma simétrica dos picos aponta para o fato de que as interações com a fase estacionária da coluna são favoráveis, de maneira que a molécula se associa e dissocia da fase estacionária de forma eficiente e uniforme, minimizando a dispersão e garantindo uma eluição rápida e bem definida. A simetria dos picos pode estar relacionada às propriedades físico-químicas dos compostos, como polaridade, tamanho e geometria molecular, com compostos homogêneos tendendo a apresentar picos mais simétricos (Baeza-Baeza e Coque, 2004; Harris, 1999; Snyder, Kirkland e Dolan 2009). A análise da forma dos picos, juntamente com outros parâmetros cromatográficos como tempo de retenção e altura do pico, fornece informações valiosas sobre a identidade e pureza dos compostos presentes na amostra (Baeza-Baeza e Coque, 2004; Harris, 1999; Snyder, Kirkland e Dolan 2009).

A análise dos resultados da cromatografia por meio de FR-HPLC indicou que o extrato ISL exibiu maior área e intensidade referente ao pico existente em G1 correspondente a mesma faixa de tempo de retenção para as concentrações de 2,5, 5,0 e 7,5 mg.mL⁻¹. No intervalo de tempo de retenção analisado, os extratos de APF e SPF apresentaram áreas e intensidades de pico progressivamente menores (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros analíticos quantitativos para o grupo G1 das diferentes concentrações obtidas por cromatografia de fase reversa. A porcentagem relativa está associada aos valores de área. O tempo entre parênteses se refere ao período de eluição do grupo de interesse.

Concentração 7,5 mg. mL ⁻¹ (4,00 a 5,40 min)					
Grupo 1 (G1)	Tempo de retenção (min)	Largura da base do pico (w)	Intensidade (mAU)	Área	Porcentagem relativa (%)
ISL	4,6	0,92	757	434,76	100
APF	4,64	0,96	476	291,26	66,99
SPF	4,58	0,91	314	187,89	43,22
Concentração 5,0 mg. mL ⁻¹ (3,90 a 5,05 min)					
Grupo 1 (G1)	Tempo de retenção (min)	Largura da base do pico (w)	Intensidade (mAU)	Área	Porcentagem relativa (%)
ISL	4,76	1	375	242,2	100
APF	4,71	0,93	171	100,69	41,57
SPF	4,72	0,97	153	76,91	31,75
Concentração 2,5 mg. mL ⁻¹ (4,00 a 5,40 min)					
Grupo 1 (G1)	Tempo de retenção (min)	Largura da base do pico (w)	Intensidade (mAU)	Área	Porcentagem relativa (%)
ISL	4,52	0,98	410,48	197,47	100
APF	4,61	0,97	131,65	76,25	38,61
SPF	4,62	0,93	117,52	63,7	32,25

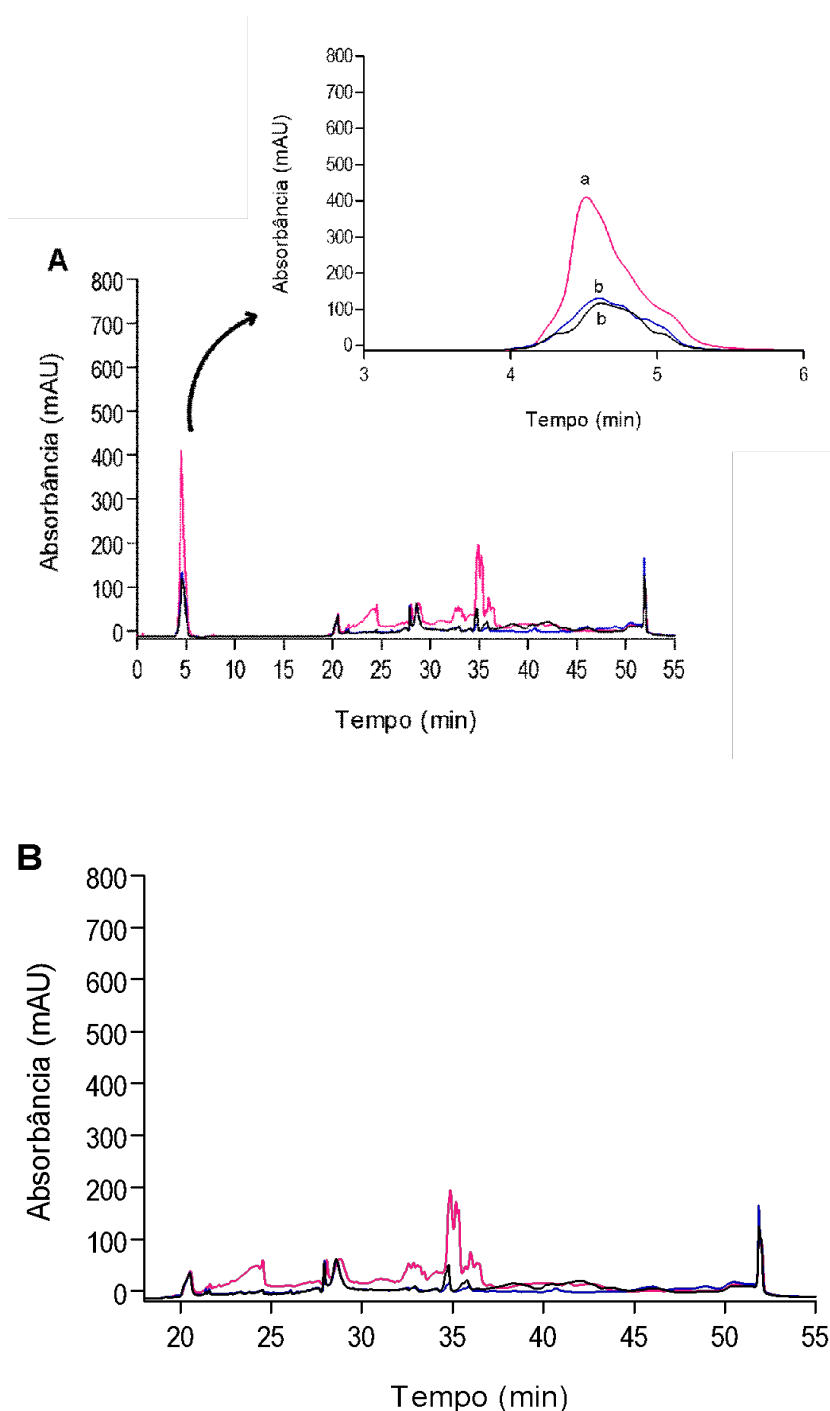


Figura 8. Perfil molecular dos extratos na concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em RP-HPLC a 258 nm e volume de injeção de 200 μL . A) Cromatograma completo e inserto referente ao grupo G1. B) Corte no cromatograma de 18 min a 56 min. O cromatograma representa a média de três repetições. Não há diferença estatística entre as repetições cromatográficas de um mesmo tipo de extrato (repetições individuais) enquanto letras diferentes no inserto de G1 indicam diferença significativa pelo Teste T ($P < 0,05$). A cor rosa refere-se ao extrato ISL, azul ao extrato APF e preta ao extrato SPF.

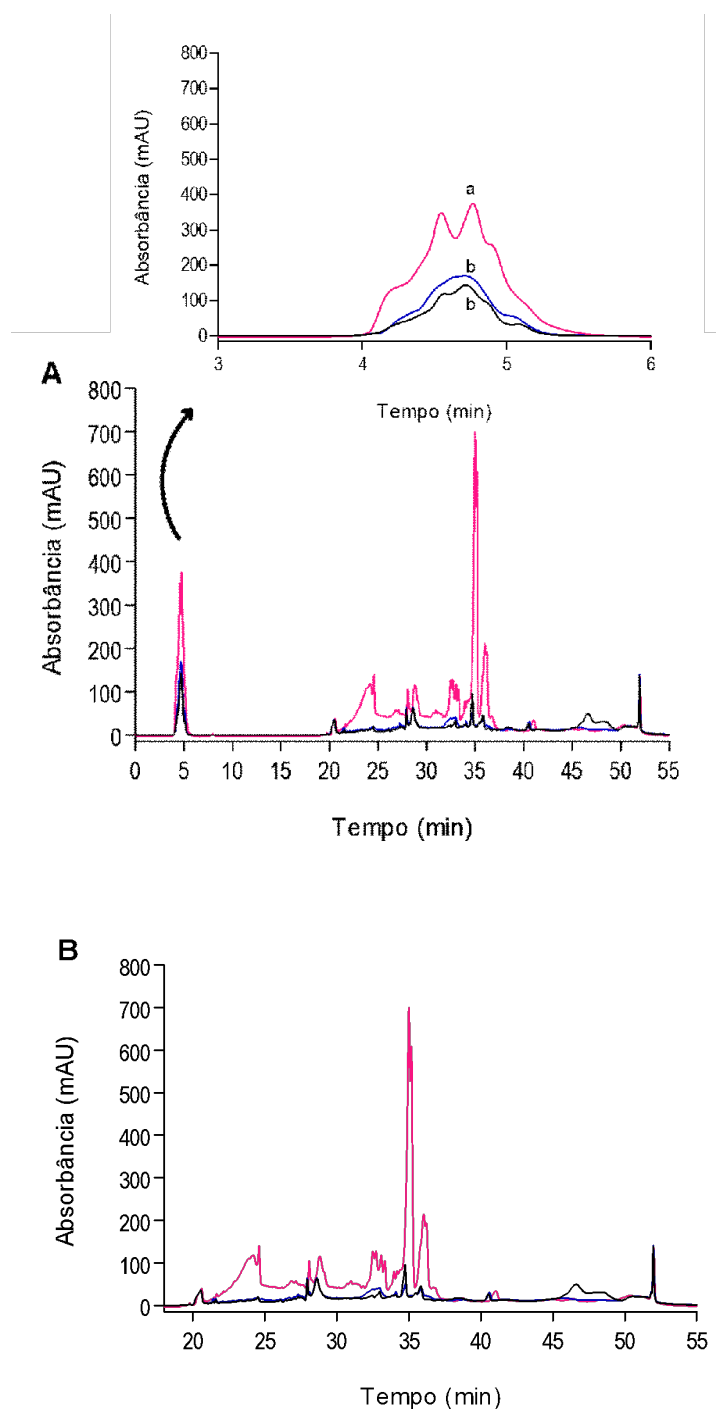


Figura 9. Perfil molecular dos extratos na concentração de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em RP-HPLC a 258 nm e volume de injeção de 200 μL . A) Cromatograma completo e inserto referente ao grupo G1. B) Corte no cromatograma de 18 min a 56 min. O cromatograma representa a média de três repetições. Não há diferença estatística entre as repetições cromatográficas de um mesmo tipo de extrato (repetições individuais) enquanto letras diferentes no inserto de G1 indicam diferença significativa pelo Teste T ($P < 0,05$). A cor rosa refere-se ao extrato ISL, azul ao extrato APF e preta ao extrato SPF.

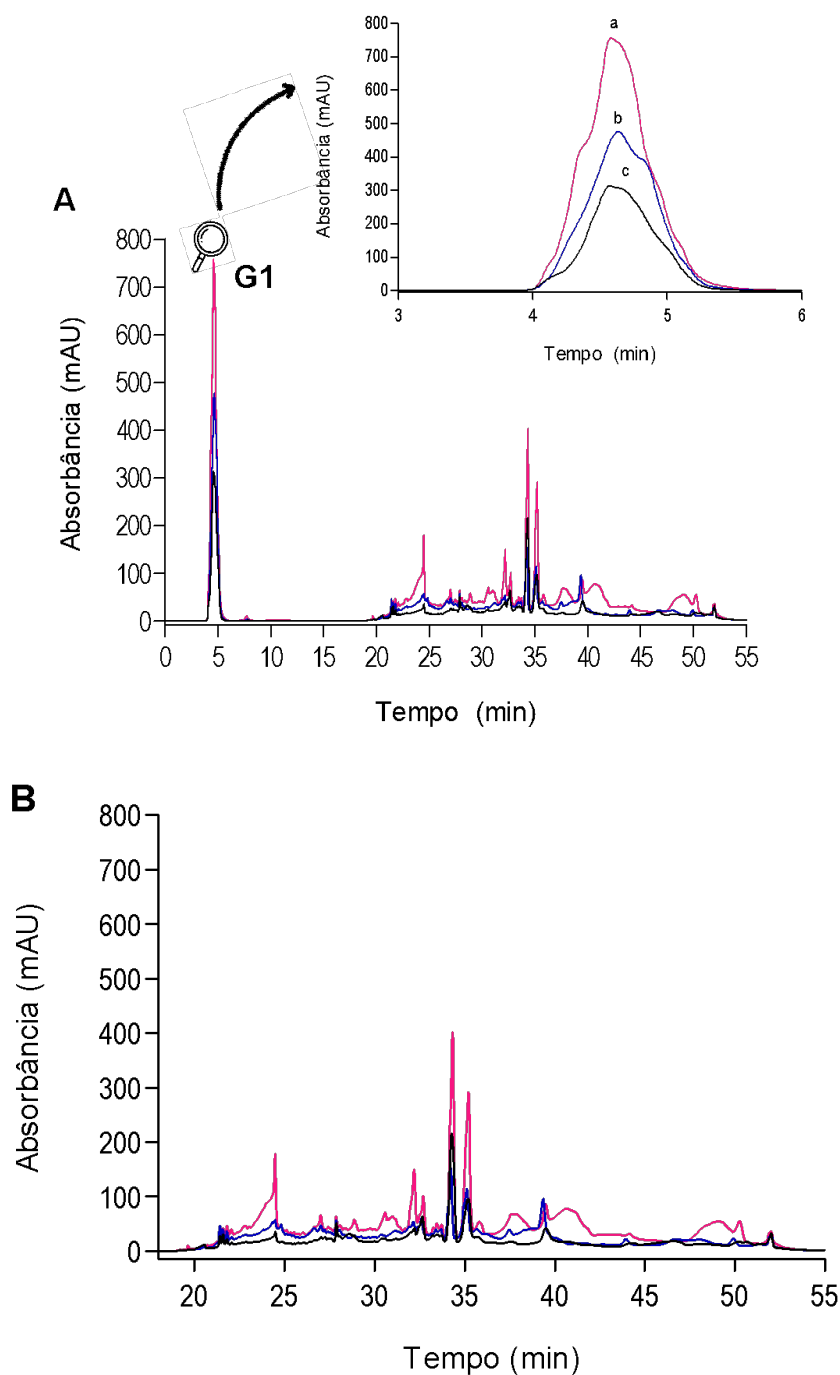


Figura 10. Perfil molecular dos extratos na concentração de $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em RP-HPLC monitorado a 258 nm e volume de injeção de $200 \text{ }\mu\text{L}$. A) Cromatograma completo e inserto referente ao grupo G1. B) Corte no cromatograma de 18 min a 56 min. O cromatograma representa a média de três repetições. Não há diferença estatística entre as repetições cromatográficas de um mesmo tipo de extrato (repetições individuais) enquanto letras diferentes no inserto do pico cromatográfico G1 indicam diferença significativa pelo Teste T ($P < 0,05$). A cor rosa refere-se ao extrato ISL, azul ao extrato APF e preta ao extrato SPF.

Os resultados apresentados da Tabela 7 revelaram que a área do pico G1 referente à ISL excedeu significativamente a área dos picos de APF e SPF em 58,43% e 68,25%, respectivamente para a concentração de 2,5 mg.mL⁻¹, 61,39% e 67,75%, respectivamente para a concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ e 33,01% e 56,78% respectivamente para a concentração de 7,5 mg.mL⁻¹. A análise estatística presente nas Figuras 8, 9 e 10 mostrou a ausência de diferenças significativas entre as repetições cromatográficas de um mesmo tipo de extrato (repetições individuais), indicando a reprodutibilidade dos procedimentos cromatográficos. Essa consistência dos resultados garante a precisão dos resultados. No entanto, houve diferença significativa apenas entre os perfis cromatográficos dos três tipos diferentes de extratos referentes ao grupo G1 na concentração de 7,5 mg.mL⁻¹ e isso sugere que este grupo possa atuar como um potencial biomarcador para a doença da meleira (Figura 10A).

Na região do cromatograma da Figura 10B que abrange os tempos de retenção correspondentes as moléculas menos polares (20 a 56 min), uma análise qualitativa relacionada à intensidade de picos sugere que o extrato ISL na concentração de 7,5 mg.mL⁻¹ exibiu predominantemente maior intensidade ao longo do cromatograma em relação aos extratos APF e SPF. O mesmo comportamento pode ser observado nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹ conforme observado nas Figuras 8 e 9. O perfil químico observado está alinhado com o que é reportado na literatura (Alencar et al., 2020; Zhou et al., 2023), no entanto, existe diferença em relação às intensidades dos picos, o que pode estar relacionado à presença dos vírus.

Considerando esses resultados e o fato de a presente investigação se basear na busca por diferenças no perfil molecular em nível de metabolismo secundário entre plantas em pré-floração e pós-floração (com e sem sintomas da doença da meleira do mamoeiro), a concentração de 7,5 mg.mL⁻¹ exibiu as diferenças quantitativas referente à área e intensidade mais significativas estatisticamente. Além disso, esta região do cromatograma correspondentes aos grupos G1 indicados no inserto da Figura 10A se relaciona à compostos polares e a literatura reporta o potencial antiviral referente a estes compostos polares (Gondin et al., 2022; Duarte et al., 2023; Mechan-Gaitán et al., 2024; Rodrigues, S P et al., 2009; Sharma et al., 2020; Zaynab et al., 2018). Portanto, foi a concentração selecionada para a continuidade dos estudos. Os

extratos brutos também foram analisados nos comprimentos de onda de 320 nm, 331 nm, 393 nm e 415 nm identificados no item 4.4. Nos dois primeiros (320 e 331), o perfil molecular foi similar a 258 nm, no entanto com menor intensidade. Nos dois últimos (393 e 415), não houve absorbância, de forma que estes resultados não foram apresentados, mas foram realizados.

As diferenças quantitativas observadas nos extratos ISL (infectado apenas pelo vírus PMeV), APF e SPF (infectados por ambos PMeV e PMeV2) sugerem uma possível influência direta da presença dos vírus na planta, resultando em uma expressão ou concentração diferenciada de moléculas no perfil molecular. Embora um potencial marcador para a doença tenha sido identificado no grupo G1, é necessário realizar investigações mais detalhadas para compreender a diversidade dos compostos presentes nesse grupo, considerando o formato do pico e os parâmetros analíticos observados. Nossos resultados sugeriram a presença de outros compostos dentro desses grupos que também devem ser explorados para determinar se essa resposta é seletiva ou geral contra a infecção. Apesar do resultado satisfatório da cromatografia de fase reversa, ela separa componentes principalmente com base na hidrofobicidade, o que não é adequado para resolver os compostos polares em G1. Portanto, estratégias cromatográficas alternativas focadas na polaridade e carga foram utilizadas, e a cromatografia de troca iônica foi aplicável à presente investigação, facilitando o isolamento de potenciais marcadores de metabólitos secundários de extratos vegetais complexos (Ngere et al., 2023, Oladimeji e Valan, 2020).

4.6.2 Relação entre material vegetal fresco e o extrato bruto

A fim de saber a quantidade de material fresco necessária para obter o resultado acima apresentado em triplicata, foi realizado um cálculo reverso teórico a partir da concentração de trabalho estabelecida para extrato bruto ($7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$). Para tal, os dados da Tabela 3 (valores de extrato bruto, material percolado, seco e fresco) foram considerados como base para a estimativa da quantidade de folha fresca necessária. Através dos cálculos realizados, foi determinado que 0,86 g de folha fresca são

suficientes para alcançar o resultado teórico em triplicata no HPLC. A utilização de pouca da quantidade de folha fresca, em teoria, para fornecer o resultado observado na análise por HPLC para o diagnóstico da doença da meleira no campo, com foco no desenvolvimento de um possível kit diagnóstico barato, portátil e rápido a partir do perfil dos metabólitos secundários, oferece vantagens que beneficiam a pesquisa científica e a prática agrícola. Entre elas, a utilização de pouca amostra vegetal reflete em sensibilidade do método, otimização dos recursos laboratoriais, facilidade de coleta e transporte quando comparada ao cuidado necessário com o material (folha e látex) para diagnóstico por meio do RT-PCR, a possibilidade de realização do diagnóstico *in loco* em áreas extensas e impacto positivo na pesquisa e desenvolvimento de soluções e novas ferramentas de diagnóstico, monitoramento e controle da doença, além de auxiliar na busca por soluções inovadoras para o manejo da doença no campo. A presente pesquisa é um ponto de partida para a implementação de novos programas de monitoramento mais eficazes da doença da meleira, permitindo a detecção precoce da doença no campo e a tomada de medidas de controle mais assertivas, minimizando os impactos da doença na produção agrícola e na qualidade dos produtos.

4.6.3 Grupos de frações oriundos da cromatografia em fase reversa

Os picos cromatográficos obtidos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, na concentração de $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, foram agrupados em quatro grupos de frações, considerando tempo de retenção, sensibilidade do método, limite detecção e quantificação. Neste estudo analítico, valores abaixo de 100 mAU foram considerados como ruído (Figura 11). Assim as frações foram coletadas separadamente ao longo de 60 corridas cromatográficas para cada tipo de extrato, visando obter material suficiente para análises subsequentes. A análise do resultado da cromatografia presente na Figura 12 mostrou que houve uma diferença significativa entre os extratos ISL, APF e SPF em relação ao grupo 1 (G1) e ao pico 1 do grupo G4 (Figura 12A e 12D respectivamente). Nos grupos G2 e G3, apesar da diferença estatística observada entre os três extratos, apenas ISL apresentou valores superiores

ao limite de detecção (Figura 12B e 12C). Quanto ao pico 2 do grupo G4, observou-se uma diferença estatística significativa entre ISL e os extratos APF e SPF. No entanto, não houve diferença estatística significativa entre os extratos em pós-floração (Figura 12E). Esta análise baseou-se na intensidade dos picos cromatográficos sendo possível devido ao fato de que os picos analisados foram eluídos nos mesmos tempos de retenção e apresentaram a mesma largura na base (Tabela 7), permitindo estabelecer uma relação quantitativa entre eles. Os valores de área presentes na Tabela 7 demonstraram a mesma relação para o grupo G1.

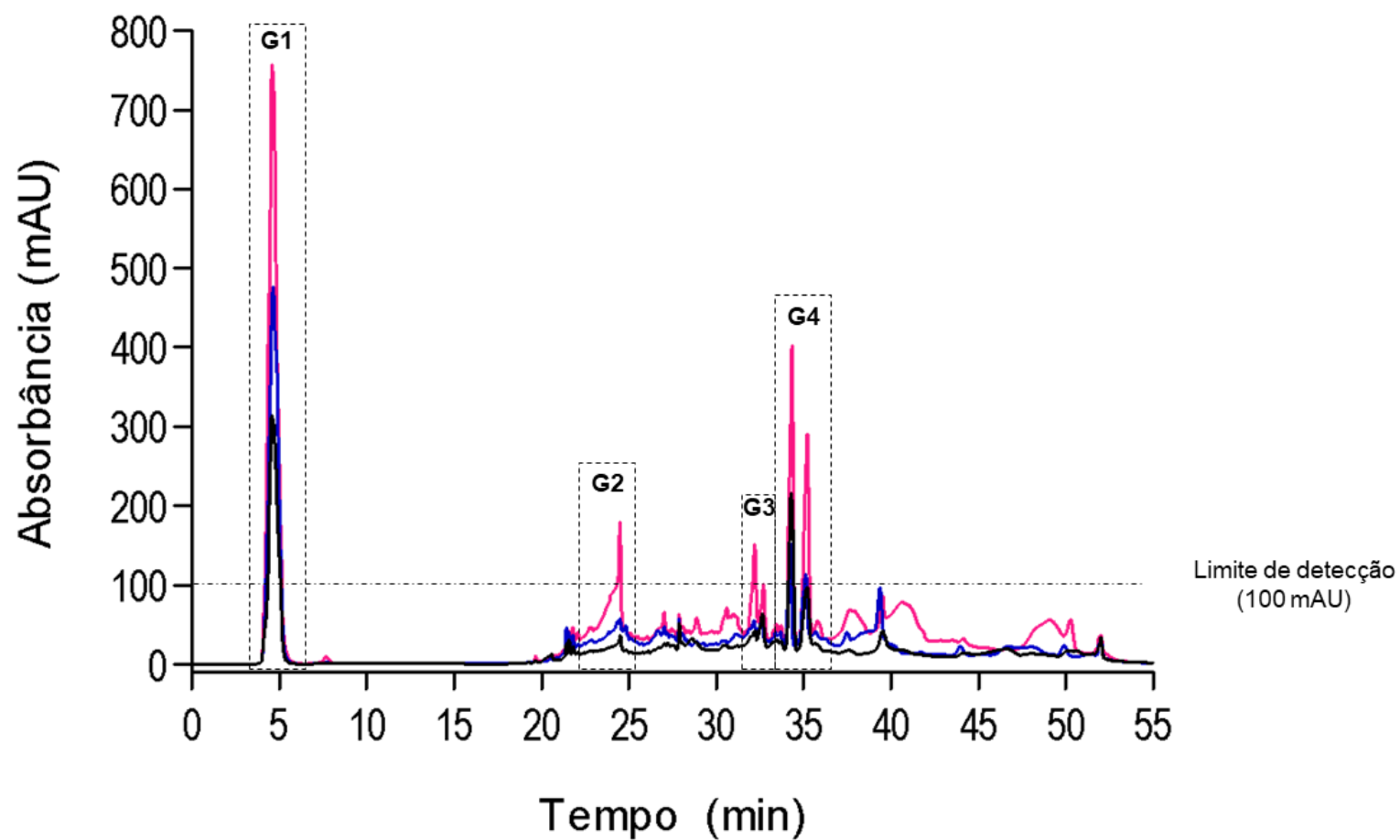


Figura 11. Grupos de frações estabelecidos para FR-HPLC. A linha preta representa o limite de detecção baseado nos parâmetros analíticos obtidos.

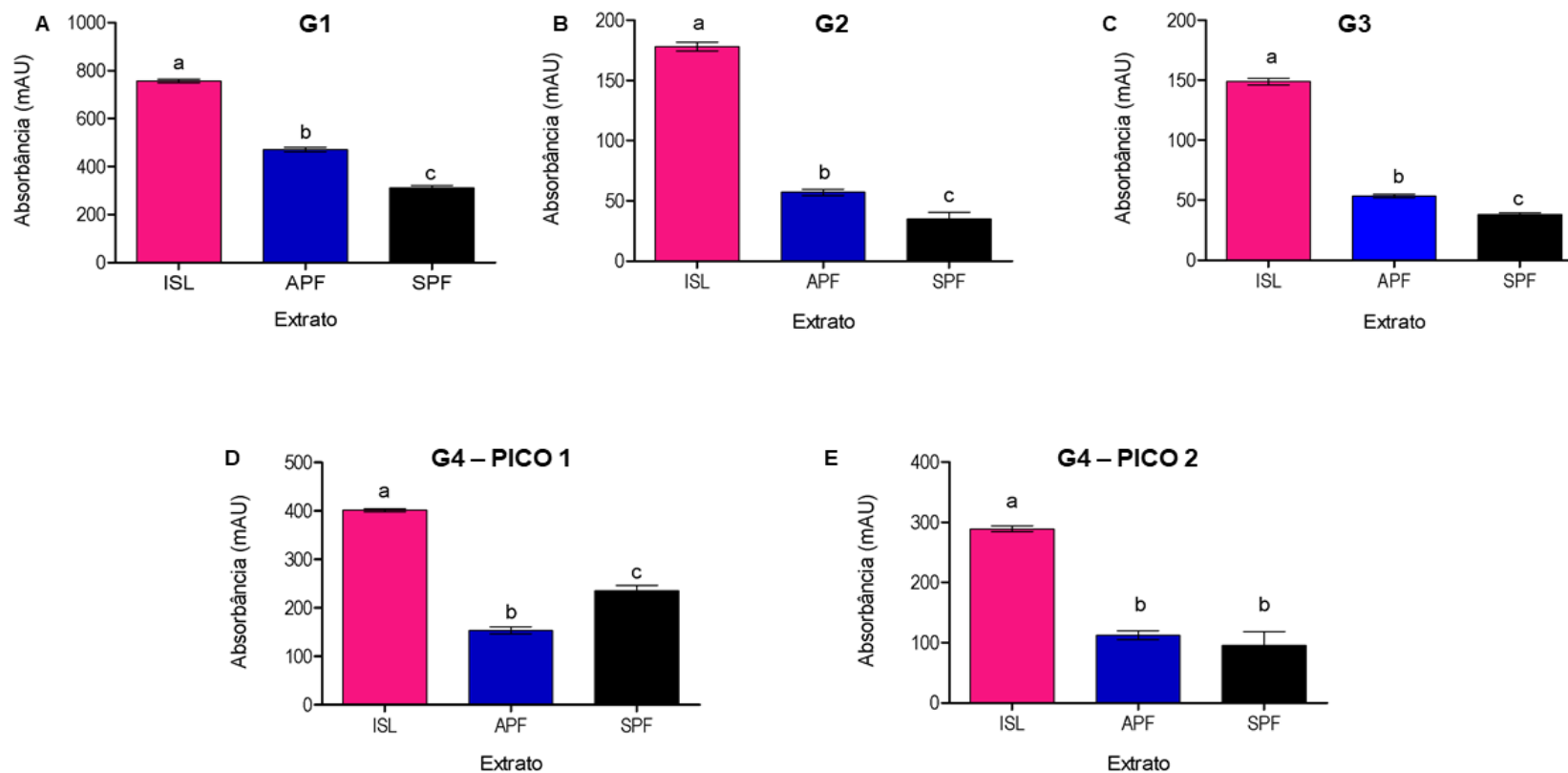


Figura 12. Análise quantitativa de frações selecionadas por FR-HPLC. As colunas referem-se às médias da triplicata dos pontos de máxima intensidade dos grupos de fração selecionados de cada extrato. Teste T: $P < 0,05$. Os picos compartilham a mesma largura da base e, portanto, se pode estabelecer relação quantitativa entre eles.

4.7 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIÔNICA DE GRUPOS ESTRATÉGICOS

A cromatografia de fase reversa usada anteriormente, por se basear em hidrofobicidade, não separou compostos polares do grupo G1. Para isso, foram empregadas estratégias que se relacionam com a polaridade e a carga dos compostos, com a intenção de obter uma separação mais eficiente. Assim, foram usadas duas colunas de troca catiônica com diferentes dimensões (comprimento da coluna) com a intenção de padronizar e posteriormente expandir o método para obter melhor resolução dos compostos presentes nas amostras. Como pode ser visto na Figura 13A, todos os picos existentes no cromatograma exibiram tempos de retenção similares ao longo dos três estágios do desenvolvimento da planta. Larguras de base (w) estreitas e similares na região correspondente ao inserto na Figura 13A indicaram a presença de poucos compostos, potencialmente isoláveis, semelhantes aos resultados da análise por FR-HPLC (Tabela 8).

Além disso, esta análise cromatográfica se mostrou satisfatória na separação dos componentes carregados dos grupos G1 isolados e previamente analisados por cromatografia em fase reversa em dois grupos carregados (entre 2,73 e 3,95 min e 3,94 a 5,5 min). A cromatografia de troca catiônica em que foi utilizada uma coluna de menor comprimento (Figura 13A, Tabela 8) exibiu um pico principal do extrato ISL com área e intensidade significativamente maior em comparação aos extratos APF e SPF eluídos entre o intervalo de tempo de retenção de 2,73 e 3,95 min. Os dados de porcentagem relativa relacionados à área indicados na Tabela 8 mostram que a área do pico de ISL excedeu APF e SPF em 55,89% e 77,36%, respectivamente. O estudo inicial utilizando uma coluna de menor comprimento foi baseado em uma investigação analítica da composição de moléculas carregadas. A presença de pelo menos quatro picos no cromatograma da amostra advinda do grupo G1 confirmou melhor separação em comparação com a análise por RP-HPLC. Apesar de um resultado quantitativo significativo no inserto da Figura 13A, a coluna utilizada não apresentou resolução suficiente para separar as moléculas dentro do envelope cromatográfico presente nesta região.

Tabela 8. Parâmetros analíticos quantitativos para os grupos de interesse G1 e G3'. A porcentagem relativa está relacionada aos valores de área. Os valores indicados pela letra *N* referem-se ao número de pratos teóricos.

Coluna de menor dimensão (<i>N</i> = 295,36)					
Grupo 1 (G1)	Tempo de retenção (min)	Largura da base do pico (<i>w</i>)	Intensidade (mV)	Área	Porcentagem relativa (%)
ISL	3,23	0,75	165,88	78,14	100,00
APF	3,13	0,77	66,40	34,46	44,10
SPF	3,15	0,75	34,15	17,69	22,64
Coluna de maior dimensão (<i>N</i> = 595,70)					
Grupo 3' (G3')	Tempo de retenção (min)	Largura da base do pico (<i>w</i>)	Intensidade (mV)	Área	Porcentagem relativa (%)
ISL	12,29	2,01	151,03	225,29	100,00
APF	12,09	2,54	68,11	145,11	64,41
SPF	12,15	2,23	32,13	59,45	26,39

Portanto, outra análise por cromatografia de troca catiônica foi realizada utilizando uma coluna de maior comprimento. Esta nova separação cromatográfica apresentou oito novos picos designados de G1' a G8' (Figura 13B). Este perfil está relacionado a aumentos progressivos de polaridade em direção ao pico G8', pois a metodologia empregada utilizou fase móvel cujo pH era 3,0 e coluna com carga negativa, havendo maior densidade de carga no sentido de G8'. Observou-se larguras de base estreitas e similares na região correspondente ao inserto na Figura 13B (G3') (Tabela 8), semelhantes aos resultados da análise por FR-HPLC e troca catiônica.

O grupo G3' eluído entre o intervalo de tempo de retenção de 10,01 a 15,50 min (Figura 13B) para os três estágios da planta emergiu como a fração de interesse, preservando a relação quantitativa de área e intensidade entre ISL, APF e SPF observada desde a cromatografia em fase reversa. Nesse caso, os resultados apresentados na Tabela 8 e nos insertos da Figura 13B mostram que os valores de área e intensidade para ISL foram significativamente maiores do que os resultados de APF e SPF, e os dados de porcentagem relativa referentes à área mostram que a área

do pico de ISL excedeu APF e SPF em 35,59% e 73,61%, respectivamente. Os resultados das análises estatísticas contidos nos insertos da Figura 13 revelaram que as repetições cromatográficas dentro de cada tipo de extrato não apresentaram diferenças significativas, comprovando a reprodutibilidade dos métodos de extração e cromatografia empregados. Essa consistência garante a confiabilidade dos dados e a robustez das tendências observadas. Por outro lado, os perfis cromatográficos entre os três tipos de extratos pertencentes aos grupos G1 (oriundos da fase reversa) e G3' apresentaram diferenças significativas e sugerem que os compostos presentes nesses extratos podem servir como biomarcadores potenciais para a doença da meleira.

Os resultados apresentados na Tabela 8 comprovam que a cromatografia de troca catiônica com uma coluna de maior comprimento melhorou a resolução do grupo da fração G1 previamente identificado por RP-HPLC. A diferença no número de pratos teóricos (N) serve como um indicador direto da resolução, de forma que um valor N mais alto implica em melhor resolução (Harris 1999; Snyder, Kirkland e Dolan 2009). Este valor N foi maior para a análise com coluna de maior comprimento em comparação com a análise com coluna de menor comprimento e a análise por RP-HPLC ($N = 394,82$). Portanto, pode-se afirmar que o aumento da resolução resultou em uma melhoria na qualidade de separação dos picos cromatográficos.

O delineamento cromatográfico empregado nesta investigação demonstrou o potencial da abordagem FR-HPLC e CTC para a separação e caracterização de biomarcadores relacionados aos vírus responsáveis pela Doença da Meleira do Mamoeiro. A análise por FR-HPLC foi utilizada para observar a diferença entre os estágios da planta e os resultados apresentados na Tabela 7 e Figura 10A foram satisfatórios e suficientes para atingir esse objetivo. Por meio dela, foi possível desenvolver um método sensível o suficiente e reprodutível para identificar diferenças entre os estágios da planta. A cromatografia de troca catiônica de grupos estratégicos teve propósito distinto e relacionado à investigação do envelope carregado do grupo G1 advindo da cromatografia em fase reversa, sendo necessária a posterior identificação de seus compostos correspondentes (por espectrometria de massas).

A cromatografia de troca iônica exibe seletividade de separação complementar à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, aumentando o potencial para identificação de compostos. Por essas razões, o emprego de CTC e FR-HPLC para análise de amostras pode maximizar a elucidação de seus constituintes (Kammerer, 2011; Karu et al., 2012; McHale, Soliven e Schuster, 2021; Oladimeji e Valan, 2020; Ngere et al. 2023). Além disso, a capacidade da cromatografia de troca iônica de separar seletivamente moléculas ionizáveis permite o isolamento de potenciais marcadores de metabólitos secundários de extratos vegetais (Feng et al., 2021; Oladimeji e Valan, 2020; Ngere et al., 2023). A presente investigação revelou enriquecimento de compostos potencialmente relacionados ao metabolismo secundário em de folha em pré-floração, sugerindo expressão diferencial destes em resposta ao complexo viral PMeV.

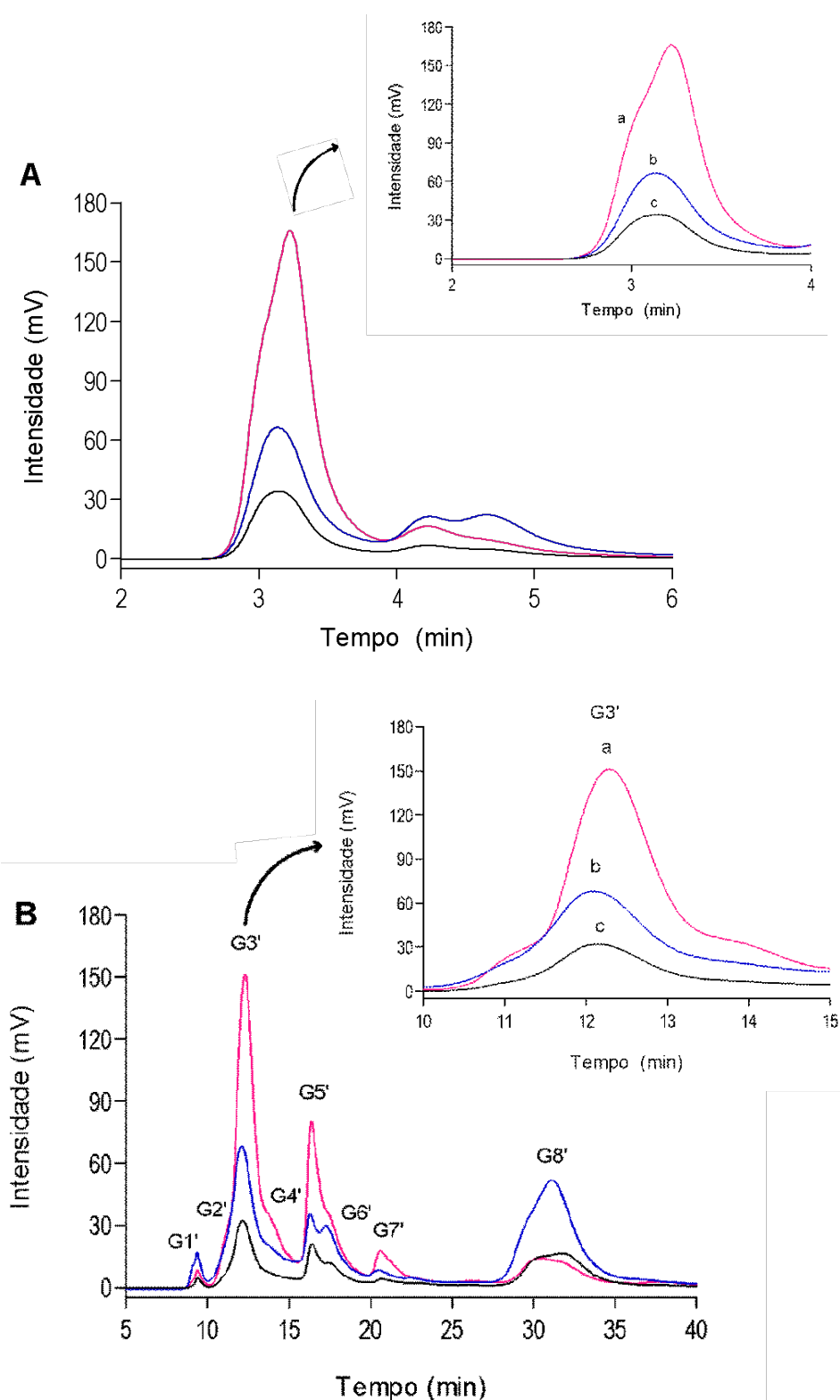


Figura 13. Cromatogramas de troca catiônica dos grupos de fração 1 (G1). A) Cromatograma de troca catiônica de G1 originários de FR-HPLC dos três extratos em fase estacionária catiônica Shimadzu LC Column Shim-Pack WC x 4,0 mm x 5 cm a 258 nm e volume de injeção de 10 μ L e inserto referente à região de interesse. B) Cromatograma de troca catiônica de G1

originários de FR-HPLC dos três extratos em fase estacionária catiônica TSK-GEL-CM-25W LC Column 25 cm X 4,6 mm DI, 5 μm a 258 nm e volume de injeção de 300 μL . O cromatograma representa a média de três repetições. Letras diferentes no inserto do pico cromatográfico G3` indicam diferença significativa pelo Teste T ($P < 0,05$). ISL (linha rosa), APF (linha azul) e SPF (linha preta).

Outro dado importante envolveu analisar a relação entre o comprimento e o raio das colunas na cromatografia de troca iônica para determinar as concentrações do grupo G1 de acordo com Harris, 1999. A coluna maior tinha um raio (R1) de 2,3 mm e comprimento de 25 cm, enquanto a coluna menor tinha um raio (R2) de 2,0 mm e comprimento de 5 cm, resultando em uma relação R1/R2 de 1,15. A concentração dos grupos G1 aplicada na menor coluna foi de 0,93 mg.mL^{-1} , determinada a partir da área total sob as curvas na cromatografia de troca catiônica para o extrato bruto e sua concentração de 7,5 mg.mL^{-1} . Para determinar a concentração de G1 na maior coluna, este valor foi multiplicado pela relação de raio² e a concentração foi de 1,23 mg.mL^{-1} (Tabela 9). Apesar da mudança de 0,30 mm no raio da coluna, não houve mudança significativa na concentração, sugerindo que a quantidade de amostra aplicada permaneceu a mesma. No entanto, a resolução foi afetada pelo aumento do comprimento da coluna e pode ser comprovada pela diferença referente ao número de pratos teóricos apresentados acima, os quais estão diretamente relacionados com a resolução.

Tabela 9. Relação entre a concentração do extrato bruto e dos grupos de fração G1 aplicados nas colunas de troca iônica.

Cromatografia de troca catiônica			
Dimensão da coluna	Amostra	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Área total
1	Extrato Bruto	7,50	44936423
	Grupo G1	0,93	5590572
2	Grupo G1 aplicado na coluna de maior raio	1,23	-

4.8 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DOS EXTRATOS BRUTOS - *UMA ABORDAGEM QUALITATIVA*

A cromatografia de troca iônica apresentou diferenças no perfil molecular dos três extratos brutos quando submetidos tanto a trocadores catiônicos quanto aniônicos (Figura 15). Os cromatogramas obtidos para os extratos brutos empregando a cromatografia de troca iônica exibiram menor complexidade em comparação aos extratos brutos analisados por FR-HPLC. Na cromatografia de troca catiônica dos extratos brutos (Figura 14A), houve sobreposição entre o primeiro pico dos três extratos e notou-se uma diferença de intensidade entre os picos dos três extratos relacionada ao intervalo de tempo de retenção entre 4 e 6 min. Neste caso, o extrato APF foi o mais intenso (767 mV), seguido pelo extrato SPF (676 mV) e por último o ISL, que foi o menos intenso (390 mV).

Por outro lado, na cromatografia de troca aniônica, foi observada a presença de quatro picos com intensidade semelhante entre os três extratos, conforme mostrado na Figura 14B. Comparando os três extratos, observou-se que até o tempo 10 min, o primeiro pico do extrato ISL foi o mais intenso entre os três extratos (177 mV) e o último pico do extrato ISL foi o menos intenso (184 mV). O terceiro pico foi mais intenso para o extrato SPF (410 mV) e o quarto e último pico até 10 minutos foi mais intenso para o extrato APF (410 mV), seguido pelo extrato SPf (324 mV), e por último, ISL

(184 mV). Não houve diferença estatística entre as repetições individuais dos mesmos extratos e isso garante a reprodutibilidade da análise cromatográfica. Tanto a cromatografia de troca aniônica do grupo G1 quanto as cromatografias de troca iônicas dos extratos brutos foram realizadas com propósito investigativo, no entanto o objetivo da presente investigação foi alcançado em FR-HPLC e cromatografia de troca catiônica.

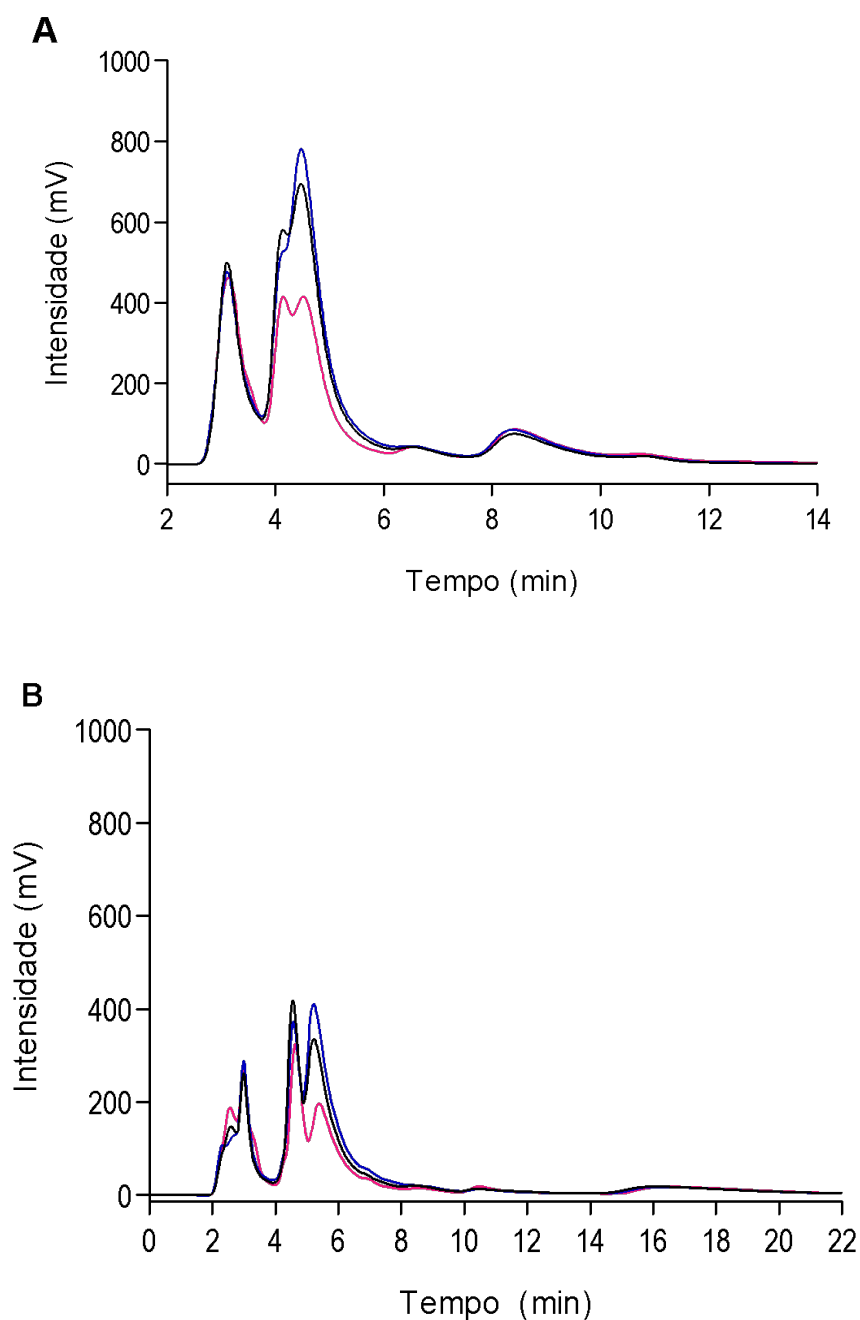


Figura 14. Cromatografia de troca iônica dos extratos brutos a 258 nm, volume de injeção de 10 μL e fluxo de 0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A) Cromatograma de troca catiônica dos três extratos na concentração de 7,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. B) Cromatograma de troca aniônica comparativo dos três extratos na concentração de 7,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. O cromatograma representa a média de três repetições. Não há diferença estatística entre as repetições cromatográficas de um mesmo tipo de extrato (repetições individuais) pelo Teste T ($P < 0,05$). A cor rosa refere-se ao extrato ISL, azul ao extrato APF e preta ao extrato SPF.

4.9 IDENTIDADE DAS MOLÉCULAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após a identificação de regiões estratégicas nas análises por cromatografia que potencialmente poderiam estar relacionadas com a presença dos vírus PMeV e PMeV2, a próxima etapa seria identificar os metabólitos secundários presentes nestes grupos. Dessa maneira, os extratos brutos (ISL, APF e SPF), os grupos G1 coletados de cada estágio de desenvolvimento da planta por FR-HPLC, e G3' coletados através de cromatografia de troca catiônica utilizando uma coluna de maior comprimento (Tabela 10), foram analisados por UHPLC-MS/MS pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo a fim identificar os metabólitos secundários responsáveis pelas diferenças quantitativas observadas, permitindo assim sugerir o possível envolvimento desses compostos na infecção viral.

A Tabela 11 fornece as possíveis identificações referentes aos extratos brutos e grupos de frações. Os compostos denominados como "1" foram utilizados como referência para comparação na literatura (Alencar et al., 2020; Gondin et al., 2022; Zhou et al., 2023). Os grupos G1 (024, 025 e 026), coletados durante a etapa de FR-HPLC, e G3' (005, 007, 010, 013 e 015), obtidos através da cromatografia de troca catiônica, foram identificados como contendo metabólitos secundários pertencentes classes de flavonoides e alcaloides. Foram observadas diferenças significativas dos extratos em pré e pós-floração entre os grupos G1 e G3' durante as análises cromatográficas e estas diferenças foram atribuídas à presença dos vírus PMeV e PMeV2. Em vista dos resultados de UHPLC-MS/MS, conclui-se, que os flavonoides identificados nestes grupos estão associados à infecção viral, especificamente os compostos *kaempferol glucoside rhamnoside*, derivados de caempeferol, *Kaempferol-3-O-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside*, isômero de *Kaempferol-3-O-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside*, rutina, isômeros de *quercetin-3-O-rutinoside*, *quercetin-3-O-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside* os quais pertencem à classe dos flavonoides (flavonois) (Figura 15).

Com base nos resultados da cromatografia e espectrometria de massas apresentados, sugere-se que os grupos G1 e G3' são constituídos por flavonoides e que as diferenças quantitativas observadas podem estar correlacionadas com o mecanismo de defesa da planta *C. papaya* contra a infecção pelos vírus PMeV e

PMeV2. Durante o estágio pré-floração, a maior área e intensidade dos picos podem estar associadas ao acúmulo e à atividade desses metabólitos secundários, que eficientemente protegem a planta, juntamente com outros eventos fisiológicos que acontecem nesse período (Antunes et al., 2020; Maurastoni et al., 2023), os quais podem conter a manifestação dos sintomas virais. No entanto, a presença do PMeV2 na pós-floração pode implicar em redução da produção desses metabólitos secundários, refletindo na alteração na área e intensidade dos picos correspondentes. Assim, o complexo viral pode ter sido capaz de suprimir a defesa da planta, levando à manifestação dos sintomas da doença da meleira.

Tabela 10. Amostras enviadas para análise por UHPLC-MS/MS. ISL, APF e SPF correspondem aos extratos brutos. Os G1s correspondem aos grupos de frações coletados por FR-HPLC e G3's correspondem aos grupos G3' coletados na cromatografia de troca catiônica de maior comprimento.

Numeração	Amostra correspondente
001	ISL
002	APF
003	SPS
004	G3'- ISL
005	G3'- ISL
006	G3'- ISL
007	G3'- ISL
008	G3'- ISL
09	G3'- APF
010	G3'- APF
011	G3'- APF
012	G3'- APF
013	G3'- APF
014	G3'- APF
015	G3'- APF
016	G3'- SPF
017	G3'- SPF
018	G3'- SPF
019	G3'- SPF
020	G3'- SPF
021	G3'- SPF
022	G3'- SPF
023	G3'- SPF
024	G1 ISL
025	G1 APF
026	G1 SPF

Tabela 11. Identidade das moléculas analisadas por UHPLC-MS/MS em modo positivo e negativo.

Tentativa de identificação	Tempo de retenção (min)	Relação m/z [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	Fragmentos MS2	Amostras
Kaempferol glucoside Rhamnoside	4,8	593/-	575 (4), 327 (2), 285 (100)	1_024
Derivado kaempferol	5,0 - 5,9	593/-	547 (7), 447 (20), 430 (15), 429 (81), 327 (10), 284 (100), 255 (20), 227 (3)	1
Derivado kaempferol	4,08	593/-	575 (19), 547 (32), 447 (12), 430 (17), 429 (76), 327 (10), 285 (66), 284 (100), 255 (25)	1_025, 1_026
Quercetin-3-O-rutinoside (rutin)	6,3	609/-	591 (3), 563 (4), 343 (8), 301 (100), 300 (30), 271 (4), 179 (2)	1, 1_002, 1_003
Isômero quercetin-O-rutinoside (rutin)	4,6	609/-	591 (3), 577 (5), 563 (4), 343 (7), 301 (100), 300 (32), 271 (6), 179 (2)	1_001
Isômero quercetin-O-rutinoside (rutin)	5,1-5,3	609/	591 (13), 563 (44), 343 (5), 301 (100), 271 (5), 179 (2)	1_024, 1_025
Kaempferol-3-O-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside	6	739/-	693 (11), 593 (16), 575 (100), 393 (2), 327 (12), 285 (31), 284 (31), 255 (12)	1
Isômero Kaempferol-3-O-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside	1,8-2,1	739/-	693 (9), 593 (18), 575 (100), 576 (22), 473 (7), 393 (6), 327 (12), 285 (32), 284 (30), 255 (7)	1_001
Isômero Kaempferol-3-O-(2G- α -L-rhamnosyl)-rutinoside	4,0-4,5	739/-	593 (24), 575 (100), 576 (26), 473 (10), 393 (8), 327 (15), 285 (35), 284 (38), 255 (14)	1_002, 1_003, 1_024, 1_025, 1_026

Quercetin-3-O-(2G- α -Lrhamnosyl)-rutinoside	3,5-4,5	755/-	609 (34), 591 (86), 489 (50), 343 (21), 300 (100), 271 (18), 255 (12)	1_002, 1_003, 1_024, 1_025, 1_026
Quercetin-3-O-(2G- α -Lrhamnosyl)-rutinoside	5,18	755/-	609 (34), 591 (86), 489 (50), 343 (21), 300 (100), 271 (18), 255 (12)	1
Glucotropaeolin	1,52	408/-	328 (17), 275 (37), 259 (100), 230 (20), 211 (35)	1, 1_001
3' -Hydroxydaidzein	9,19	-/271	255 (22), 253 (27), 241 (100), 227 (38), 211 (18), 208 (14), 196 (8), 183 (6), 159 (6)	1
5,6,7,3',4' - Pentahydroxyisoflavone	5,43	-/303	285, 257, 229, 187, 169 (100), 156	1
Derivado de carpaína	7,12	-/477	459 (100), 385 (51), 343 (17), 317 (14), 225 (4)	1
Derivado de carpaína	5,3	-/477	459 (100), 403 (9), 385 (3), 361 (92), 343 (49), 317 (8), 287 (16), 269 (12), 225 (4), 150 (3)	1_003, 1_005, 1_010
Derivado de carpaína	5,2	-/477	459 (96), 403 (10), 385 (4), 361 (100), 343 (54), 317 (7), 287 (18), 269 (13), 225 (19), 150 (3)	1_007, 1_013, 1_015

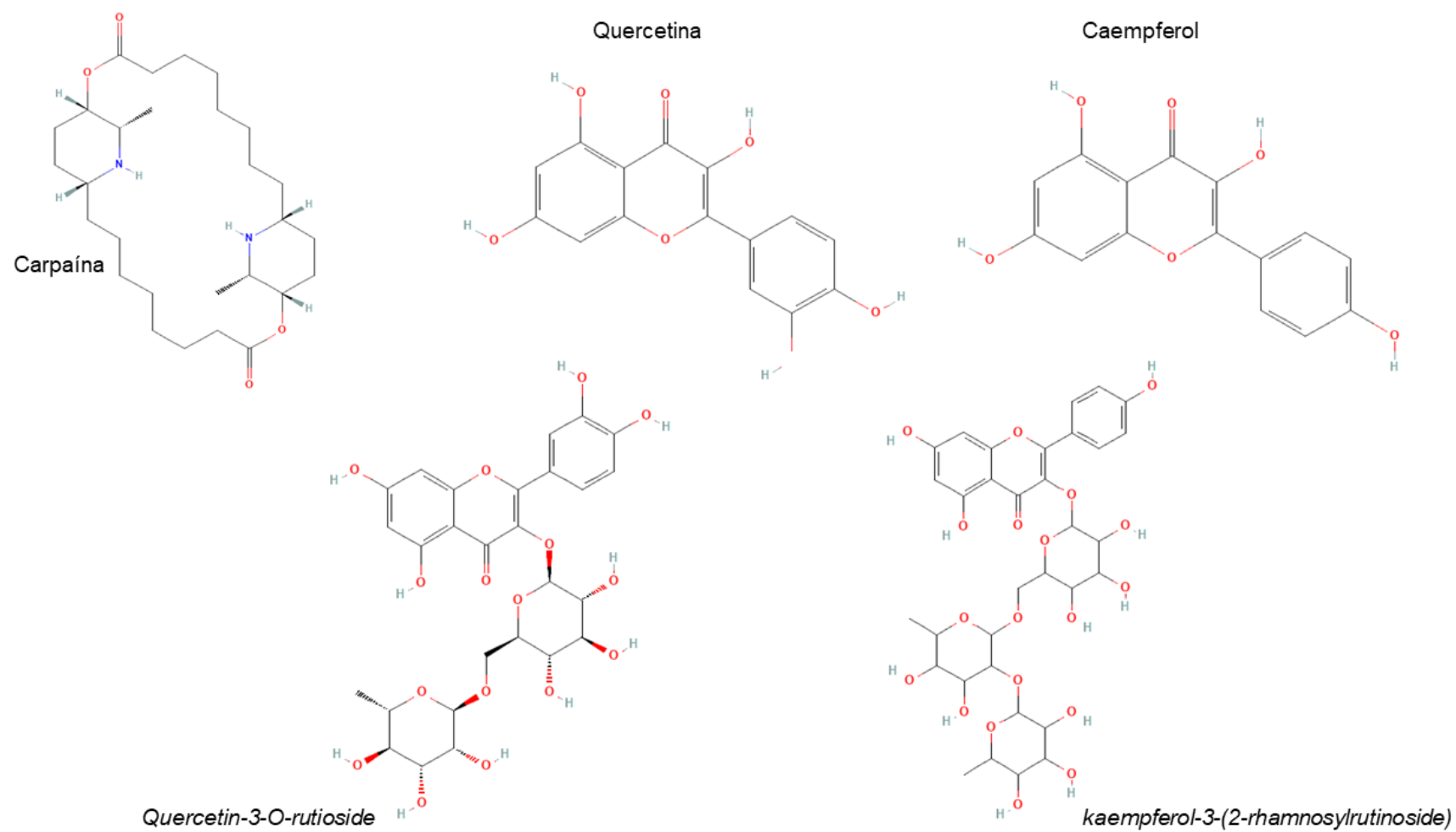


Figura 15. Metabólitos secundários identificados por UHPLC-MS/MS e relacionados com a doença da meleira do mamoeiro.

Testes histoquímicos em látex de plantas que desenvolveram os sintomas da meleira após serem infectadas pelo vírus detectaram acúmulo de alcaloides e fenol, o que não foi observado para látex de plantas saudáveis, sugerindo uma resposta antiviral da planta (Rodrigues, S P et al., 2009). No presente trabalho, o que foi observado foi maior concentração de alcaloide no estágio de pré-floração do extrato etanólico de folha de *C. papaya* e o fato de a literatura já reportar que alcaloides da espécie *Cynanchum komarovii* possuem atividade inibitória contra o *Tobacco mosaic virus* (An et al., 2001) fortalece a hipótese de que o acúmulo de alcaloides na pré-floração desempenha atividade inibitória contra o papaya meleira vírus. A literatura relata que alguns flavonoides metilados reduziram a infectividade do TMV, devido ao enfraquecimento das interações entre as subunidades do capsídeo, resultando em aumento da suscetibilidade do RNA genômico às RNAses do hospedeiro (Rusak et al., 2007).

Estudos de proteômica foram conduzidos em folhas de *Carica papaya* infectadas pelo complexo viral PMeV, inicialmente germinadas em casa de vegetação e posteriormente transferidas para um campo experimental. A análise em diferentes estágios de desenvolvimento da planta revelou poucos genes com expressão diferencial envolvidos no metabolismo secundário entre os estágios pré e pós-floração. No estágio de pré-floração, a enzima chalcona-flavanona isomerase mostrou-se induzida e ela catalisa a reação de conversão da chalcona (precursora dos flavonoides) em flavanona, pertencente à biossíntese de flavonoides (Soares, 2016) indicando aumento da produção dos metabólitos desta classe, o que também suporta os resultados cromatográficos e de espectrometria de massas observados na presente investigação. A abordagem utilizada neste estudo de proteômica não foi focada no metabolismo secundário, o que sugere a possibilidade de muitos compostos relevantes não terem sido identificados. Esta limitação pode ter impactado na identificação de um número menor de enzimas envolvidas nas vias metabólicas responsáveis pela produção de metabólitos secundários. O presente trabalho propõe abordagens cromatográficas focadas em investigar o metabolismo secundário, visando identificar diferenças entre os estágios de desenvolvimento da planta e a incidência da doença da meleira.

Estudos sobre a ação de infecções virais no conteúdo de flavonoides mostram seu aumento em diversas plantas. Foram observados aumentos nos níveis de flavonoides

em folhas e frutos de maracujazeiros infectados pelo vírus CMV, em folhas de algodoeiros (*Gossypium hirsutum* L.) infectados pelo complexo de espécies de Begomovirus causador da doença do enrolamento da folha do algodão e em sépalas de botões florais de hibisco-vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) infectadas pelo Hibiscus chlorotic ringspot virus (HCRSV, *Betacarmovirus*) (Shafie, 2019; Lan et al., 2020; Rehman et al., 2021). Em videiras assintomáticas cultivadas em vasos, a concentração de flavonóis como miricetina, caempferol, derivados de quercetina e ácidos hidroxicinâmicos, incluindo derivados de ácido cafeico, aumentou após a infecção pelo Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) (Montero et al., 2016). Por outro lado, o GLRaV-3 induziu um aumento de 24% nos níveis de flavonoides em folhas sintomáticas de uva vermelha para vinho (cv. Merlot) comparado a folhas verdes não infectadas, sendo a quercetina, seguida de miricetina, os compostos predominantes. Os resultados indicaram que a via biossintética dos flavonoides foi modulada em folhas infectadas, levando à síntese de duas novas classes de antocianinas (Gutha et al., 2010). De maneira geral, os genes da via biossintética dos flavonóides apresentaram níveis de expressão mais altos em folhas sintomáticas infectadas pelo vírus, em comparação com folhas verdes livres de vírus. No caso de *C. papaya* e o complexo-viral PMeV, foi observado pelo presente trabalho aumento da concentração de flavonoides no estágio da pré-floração quando apenas o vírus PMeV estava presente, de forma que pode ser interpretado como um mecanismo de defesa da planta contra a progressão viral e desencadeamento de sintomas.

Os alcaloides são substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, derivadas principalmente de aminoácidos, com papel defensivo contra herbívoros e patógenos, e efeitos farmacológicos significativos em humanos e animais (Duarte et al., 2023; Zaim et al., 2014; Zhao et al., 2017). Apesar de seu papel na defesa vegetal, alguns vírus conseguem superar essas barreiras e infectar plantas. Na presente investigação, os níveis de alcaloide foram maiores em folhas de *C. papaya* em pré-floração quando apenas o vírus PMeV estava presente. No entanto, os níveis decaíram na pós-floração quando ambos os vírus PMeV e PMeV 2 estavam presentes. Existem relatos semelhantes na literatura. O poppy mosaic virus (PMV-P, *Potyvirus*) em papoula (*Papaver somniferum* L.), fonte importante de opioides e alcaloides, induz aumento no conteúdo de papaverina, mas reduz o teor de morfina (Zaim et al., 2014). Em

trombeteira (*Datura stramonium* L.) infectada pelo potato virus X (PVX, *Potexvirus*) e em infecções simples ou duplas por CMV e PVX, observou redução nos teores de alcaloides (El-hammady et al., 1982; Duarte et al., 2008; Duarte et al., 2023). Similarmente, plantas de trombeta-roxa (*Datura metel* L.) inoculadas com PVY e abóboras (*Cucurbita moschata* Duchesne) infectadas pelo Moroccan watermelon mosaic virus (MWMV, *Potyvirus*) mostraram redução nos níveis de alcaloides totais (El-dougDoug et al., 2007; Mofunanya e Edu, 2015). Em contraste, infecção por PVX em batatas aumentou significativamente os níveis do alcaloide β -feniletilamina e da expressão da enzima tiramina-hidroxicinamoil transferase (THT) (Niel et al., 2006). Plantas de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don), importantes fontes de alcaloides antineoplásicos, quando infectadas por CMV e tratadas com rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR), apresentaram aumento nos teores de alcaloides em plântulas saudáveis e infectadas (Al-zahrani et al., 2018). Além do impacto direto dos vírus no metabolismo dos alcaloides, a infecção viral pode facilitar a adaptação de insetos fitófagos, como observado em tomateiros infectados pelo TMV, que mostraram aumento no teor de nitrogênio total e do alcaloide tomatina, favorecendo a adaptação da larva do coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* (Hare e Dodds, 1987).

Há poucos estudos sobre os modos de ação dos metabólitos secundários (Duarte et al., 2023; Mishra et al., 2020; Zaynab et al., 2018, 2019). Embora o mecanismo de ação dessas substâncias (alcaloides e flavonoides) ainda não seja completamente elucidado, é possível que envolva reações com várias moléculas da planta hospedeira que podem incluir modificações covalentes de proteínas e bases do DNA, interações não covalentes com proteínas, interações com biomembranas e ácidos nucleicos, além de atuarem como antioxidantes e promoverem perturbações nesse sistema pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem funcionar tanto como sinalizadores quanto como agentes defensivos ativos contra patógenos (Duarte et al., 2023).

Relacionando um possível mecanismo de ação desses metabólitos secundários com espécies reativas de oxigênio, a literatura relata que em plantas de *C. papaya* com meleira, ocorre acúmulo de peróxido de hidrogênio nos laticíferos, redução da atividade proteolítica e dos níveis de proteases no látex, o que aumenta a fluidez do látex e o espalhamento do vírus pela planta (Antunes et al., 2020; Rodrigues, S P et

al., 2009). Tudo isso parece estar interligado, com o peróxido de hidrogênio modulando negativamente a atividade de cisteíno proteases, associadas ao processo de coagulação do látex. Essa pode ser uma estratégia do complexo viral para retardar a morte celular programada nos laticíferos e minimizar a degradação de partículas virais (Abreu, P M V et al., 2015; Rodrigues, S P et al., 2009, 2012). O desbalanço osmótico nos laticíferos de plantas doentes, devido ao acúmulo de água, potássio, fósforo, cristais de oxalato de cálcio e diminuição nos níveis de cálcio durante a infecção pelo complexo viral, está associado à fluidez e exsudação do látex, bem como à ruptura celular (Antunes et al., 2020; Rodrigues, S P et al., 2009). As espécies reativas de oxigênio podem regular a ativação de defesa da planta, incluindo a sinalização de hormônios, como ácido salicílico (AS). Em plantas infectadas pelo complexo viral PMeV, os genes envolvidos com a sinalização do AS estão induzidos na pré-floração e a aplicação exógena deste hormônio diminuiu a carga viral. No entanto, genes antagonistas do AS também estão induzidos na pré-floração, limitando a contenção da doença na planta. Na pós-floração de plantas doentes, os genes envolvidos com a sinalização do AS estão reprimidos e moduladores negativos estão induzidos, o que leva a uma resposta de defesa incompleta da planta pois os sintomas se manifestam (Antunes et al., 2020; Madroñero et al., 2018).

Os eventos bioquímicos, fisiológicos e moleculares já estudados no patossistema *C. papaya*-Complexo viral PMeV (Antunes et al., 2020; Maurastoni et al., 2023) se interligam com os mecanismos de ação dos metabólitos secundários, de forma que é imprescindível considerá-los nos estudos. A literatura aponta para a importância do entendimento de como os vírus alteram o metabolismo das plantas e suas respostas à infecção. Os patógenos podem modificar a expressão genética das plantas para suprimir defesas ou induzir componentes favoráveis à infecção e compreender essas interações em nível molecular é essencial para desenvolver estratégias de defesa eficazes, crucial para culturas economicamente importantes (Duarte et al., 2023; Zaynab et al., 2019). O presente trabalho representa uma compreensão como os alcaloides e flavonoides de *C. papaya* se relacionam com a doença da meleira do mamoeiro pela infecção do complexo viral PMeV, sendo potenciais biomarcadores para serem utilizados em ferramentas diagnósticas da doença da meleira no campo.

5. CONCLUSÃO

A presente pesquisa determinou o rendimento dos extratos brutos obtidos por percolação exaustiva e comprovou a estabilidade cinética deles ao longo do tempo, assegurando a integridade química do material. Além disso, demonstrou a diferença quantitativa dos extratos das folhas de *Carica papaya* em pré-floração em comparação aos estágios pós-floração, com e sem sintomas da doença da meleira do mamoeiro. Entre as concentrações testadas, $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ destacou-se por apresentar as maiores diferenças nas áreas e intensidades dos picos cromatográficos. Os grupos G1 foram considerados estratégicos e a região do cromatograma que eles se encontravam era a mais polar e com poucos picos cromatográficos sendo selecionados para a continuidade da pesquisa. Os resultados cromatográficos obtidos tanto por fase reversa quanto por troca iônica, baseados em parâmetros analíticos, sugerem uma relação entre a presença dos vírus PMeV e PMeV2 e as alterações observadas na produção de metabólitos secundários da planta. Foi desenvolvido um método robusto para diferenciar os estágios da planta, com alta sensibilidade e reprodutibilidade. As técnicas cromatográficas empregadas neste estudo oferecem métodos valiosos para explorar o *fingerprint* molecular das folhas de *C. papaya*, permitindo a separação e identificação dos metabólitos secundários presentes nos grupos de interesse. Foram identificados flavonoides e alcaloides nos grupos G1 e G3' e foi sugerido que estes metabólitos secundários estão relacionados com a resposta de defesa da planta frente à infecção pelo complexo viral PMeV. A cromatografia provou ser uma ferramenta poderosa para descobrir potenciais alterações metabólicas associadas à doença em campo e abriu caminho para o desenvolvimento de um possível diagnóstico a ser realizado em microescala. Este diagnóstico poderá utilizar reagentes baratos e acessíveis, além de equipamentos espectrofotométricos de rotina, proporcionando uma abordagem prática e econômica para a detecção de doenças em plantas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos, recomenda-se a aplicação dos extratos brutos em cartuchos de coluna C18, seguida por coletas sequenciais e análises cromatográficas para verificar a reprodutibilidade dos resultados observados visando o desenvolvimento de um potencial método diagnóstico. Paralelamente, seria interessante tentar reproduzir esses experimentos em condições controladas de casa de vegetação. Adicionalmente, sugere-se a implementação do mesmo desenho experimental para outros vírus que também infectam o mamoeiro, como o Papaya ringspot virus (PRSV), causador da doença do mosaico do mamoeiro. Esta abordagem permitirá determinar se a resposta observada é uma reação geral de defesa da planta contra infecções virais ou se é uma resposta específica aos vírus PMeV e PMeV2.

7. REFERÊNCIA

ABREU, E. F. M., DALTRO, C. B., NOGUEIRA, E. O. P. L., ANDRADE, E. C., ARAGÃO, F. J. L. Sequence and genome organization of papaya meleira virus infecting papaya in Brazil. **Archives of virology**, v. 160, n. 12, p. 3143–3147, 2015. 10.1007/s00705-015-2605-x

ABREU, P. M. V., ANTUNES, T. S. F., MAGAÑA-ÁLVAREZ, A., PÉREZ-BRITO, D., TAPIA-TUSSELL, R., VENTURA, J. A., FERNANDES, A. A. R., FERNANDES, P. M. B. A current overview of the Papaya meleira virus, an unusual plant virus. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1853–1870, 2015. <https://doi.org/10.3390/v7041853>

ABREU, P. M. V., GASPAR, C. G., BUSS, D. S., VENTURA, J. A., FERREIRA, P. C. G., FERNANDES, P. M. B. *Carica papaya* microRNAs are responsive to Papaya meleira virus infection. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e103401, 2014. 10.1371/journal.pone.0103401

ABREU, P. M. V., PICCIN, J. G., RODRIGUES, S. P., BUSS, D. S., VENTURA, J. A., FERNANDES, P. M. B. Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 180, n. 1–2, p. 11–17, 2012. 10.1016/j.jviromet.2011.12.003

ACCIPE, L., ABADIE, A., NEVIERE, R., BERCIO, S. Antioxidant Activities of Natural Compounds from Caribbean Plants to Enhance Diabetic Wound Healing. **Antioxidants** (Basel), v. 12, n. 5, p. 1079, 2023. <https://doi.org/10.3390/antiox12051079>

AGARWAL, A., KUMAR, A., SINGH, B., TRIDEVI, N., JHA, K. K. A review on extraction and phytochemical screening methods. *Research in Pharmacy and Health Sciences*, v. 2, n. 2, p. 130-137, 2016. <https://doi.org/10.32463/rphs.2016.v02i02.25>

AHUJA, S. High Pressure Liquid Chromatography. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier 2006.

ALMEIDA, A. A., LEITE, J. P. V., SIMÃO, M. V. R. C., SILVA, H. R. V. Molecular bioprospecting of plant extracts: Experience report of the BIOPROS/UFV group in the search for antitumor compounds. **Revista Fitos**, v. 16, n. Supl. 2, p. 238–246, 2022. <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2022.1285>

ALMEIDA, A. A., LIMA, G. D. A., SIMÃO, M. V. R. C., MOREIRA, G. A., SIQUEIRA, R. P., ZANATTA, A. C., VILEGAS, W., MACHADO-NEVES, M., BRESSAS, G. C., LEITE, J. P. Screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of *Athenaea velutina* (Solanaceae) as a novel source of antimetastatic

agents. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 101, n. 3–4, p. 106–121, 2020. 10.1111/iep.12351

ALVES, J. R., ASSIS, J. N., PÁDUA, C. C. A., BALBINO, H. M., LIMA, L. L., GOUVEIA, A. S., VITAL, C. E., BUONIICONTRO, D. S., FREITAS, L. G., LEITE, J. P. V., RAMOS, H. J. O. Phytochemical potential of *Ficus* species for the control of the phytonematode *Meloidogyne javanica*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 60, n. 2, 2020. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.133314>

ALTEMIMI, A., LAKHSSASSI, N., BAHARLOUEI, A., WATSON, D. G., LIGHTFOOT, D. A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **MDPI Plant**, v. 6, n. 42, p. 1-23, 2017. 10.3390/plants6040042

AL-ZAHRANI, H. S. M., ELBESHEHY, E. K. F., ALDHEBI-ANI, A. Y., ELBEAINO, T. Effect of cucumber mosaic virus (CMV) infection on antineoplastic alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) cultured in the Mecca region and resistance induction by plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32p. 49-57, 2018. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1395298>

ANTUNES, T. S. F., AMARAL, R. J. V., VENTURA, J. A., GONHO, M. T., AMARAL, J. G., SOUZA, F. O., ZERBINI, P. A., ZERBINI, F. M., FERNANDES, P. M. B. The dsRNA virus papaya meleira virus and an ssRNA virus are associated with papaya sticky disease. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155240, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155240>

ANTUNES, T F S. Associação do papaya meleira virus e de um segundo vírus de ssRNA à meleira do mamoeiro. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

AN, T., HUANG, R., TANG, Z., ZHANG, D. Alkaloids from *Cynanchum komarovii* with inhibitory activity against the tobacco mosaic virus. *Phytochemistry*, v. 58, n. 8, p. 1267–1269, 2001. 10.1016/S0031-9422(01)00382-X

ANTUNES, T. F. S., MAURASTONI, M., MADROÑERO, L. J., FUENTES, G., SANTAMARIA, J. M., VENTURA, J. A., ABREU, E. F., FERNANDES, A. A., FERNANDES, P. M. B. Battle of three: The curious case of papaya sticky disease. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 2754–2763, 2020 <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2622-FE>

ARAÚJO, M. M. M., TAVARES, E. T., SILVA, F. R., MARINHO, V. L. A., SOUZA JÚNIOR, M. T. Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 146, n. 1–2, p. 305–310, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.022>

ASHRAF, D., MORSI, R., USMAN, M., MAEETANI, M. A. Recent Advances in the Chromatographic Analysis of Emerging Pollutants in Dairy Milk: A Review (2018–2023). **Molecules**, v. 29, n. 6, p- 1296, 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29061296>

BABALOLA, B. A., AKINWANDE, A. I., GBOYEGA, A. E., OTUNBA, A. A. Extraction, purification and characterization of papain cysteine-proteases from the leaves of *Carica papaya*. **Scientific African**, v. 19, p. 1–13, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01538>

BAEZA-BAEZA, J. J., COQUE, M. C. Prediction of peak shape as a function of retention in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1002, n. 1-2, p. 17-24, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.059>

BRASIL.

Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca. 2024 Espírito Santo é o maior produtor e exportador de mamão do Brasil. Acesso em 13 de junho de 2024. Disponível em: <https://seag.es.gov.br/Not%C3%ADcia/espírito-santo-e-o-maior-produtor-e-exportador-de-mamao-do-brasil>

BRITTO, I. O., ARAÚJO, S. H. C., TOLEDO, P. F. S., LIMA, G. D. A., SALUSTIANO, I. V., ALVES, J. R., MANTILLA-AFANADOR, J. G., KOHLHOFF, M., OLIVEIRA, E. O., LEITE, J. P. V. Potential of *Ficus carica* extracts against *Euschistus heros*: Toxicity of major active compounds and selectivity against beneficial insects. **Pest Management Science**, v. 77, n. 10, p. 4638–4647, 2021. <https://doi.org/10.1002/ps.6504>

BURDICK e JACKSON, 1990. *Burdick e Jackson Solvent Guides*, 3 ed, 1990.

CANINI, A., ALESIANI, D., D'ARCANGELO, G., TAGLIATESTA, P. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. **J Food Compos Anal**, v. 20, p. 584-590, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.03.009>

CANUTO, G. A. C., COSTA, J. L., CRUZ, P. L. R., SOUZA, A. R. L., FACCIO, A. T., KLASSEN, A., RODRIGUES, K. T., TAVARES, M. F. M. Metabolomics: definitions, state-of-the-art and representative applications. **Química Nova**, v. 41, p. 75–91, 2018.

CANNELL, R. J. P. *Natural Products Isolation*. Human Press Inc. New Jersey, 165-208, 1998.

CORNEJO-FRANCO, J. F., REYES-PROANO, E., ALVAREZ-QUINTO, R. A., FLORES, F. J. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of a newly discovered fusagra-like virus infecting *Carica papaya* in Ecuador. **Archives of Virology**, v. 169, n. 7, 2024. [10.1007/s00705-024-06075-7](https://doi.org/10.1007/s00705-024-06075-7)

COSTA, S. F., BUSS, L., ESPINOZA, E. P. S. Performance of a qualitative rapid chromatographic immunoassay to diagnose COVID-19 in patients in a middle-income country. **J Clin Virol**, v. 131, p. 104592, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104592>

D'ATRI, V., FEKETE, S., CLARKE, A., VEUTHEY, J. Recent Advances in Chromatography for Pharmaceutical Analysis. **Anal Chem**, v. 91, n. 1, p. 210-239, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05026>

DAÍ, J., MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v.15, p. 7313-7352, 2010.

<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

DUARTE, L. M. L., ALEXANDRE, M. A. V., CHAVES, A. L. R., NAGAI, A., SANTOS, D. Y. A. C. Substâncias naturais de plantas relação com a defesa em infecções virais e aplicação na agricultura sustentável. Revisão Anual De Patologia De Plantas, 2024. 10.31976/0104-038321v290004

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

<https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000100013>

EL-DOUGDOUG, K.A., MOHAMED, H., ABO-SENNA, A. Effect of PVY viral infection on alkaloid contents of cultivated medicinal plants. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, p. 558-563, 2007.

EL-HAMMADY, M., SHATLA, M. N., GIRGIS, N. A., EL-HALWAGY, M. H. Virus diseases of some medicinal plants in Egypt. III. Effect of single and double infection with CMV and PVX on the alkloids of *Datura stramonium* L. leaves. **Acta Phptopatologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 17, p. 47-51, 1982.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2024). MAJOR TROPICAL FRUITS Market Review Preliminary Results 2023.

FENG, K., WANG, S., HAN, L., QIAN, Y., LI, H., LI, X., JIA, L., HU, Y., WANG, H., LIU, M., HU, W., GUO, D., YANG, W. Configuration of the ion exchange chromatography, hydrophilic interaction chromatography, and reversed-phase chromatography as off-line three-dimensional chromatography coupled with high-resolution quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the multicompon characterization of *Uncaria sessilifructus*. **Journal of Chromatography A**, v. 1649, p. 462237, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462237>

FERNANDES, P. M. B., FERNANDES, A. A., VENTURA, J. A., ANTUNES, T. F. S., QUADROS, O., MODROÑERO, J., CARMINATI, L., MAURASTONI, M. Um novo complexo viral: o caso da meleira do mamoeiro. VII Simpósio do Papaya Brasileiro. Produção e Sustentabilidade Hídrica, Vitória, Espírito Santo, Brazil. 2018.

FILCHAKOVA, O., DOSSYM, D., ILYAS, A., KUANYSHEVA, T., ABDIZHAMIL, A., BUKASOV, R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. **Talanta**, v. 44, n. 123409, p. 1-32, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123409>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), Center for Drugs and Biologics. (1987). Guideline for Submitting Documentation for Stability of Human Drugs and Biologics. U.S. Department of Health and Human Services (DHHS).

GHAFFAR, A., MUNIR, B., JAHANGEER, M., ASHIQ, M., QAMAR, S. A., AHMAD, B. Bioactivity prospection, antimicrobial, nutraceutical, and pharmacological potentialities of **Carica papaya**. **Antiviral and Antimicrobial Smart Coatings**, p. 587–606, 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99291-6.00020-7>

GONDIN, C. N. F., BEZERRA, D. A., SAMPAIO, N. F. L., ALENCAR, M. A. S., COSTA, R. H. S., M ABREU, L. S., SILVA, J. P. R., PEREIRA, F. N., TAVARES, J. F., SILVA, M. S., RIBEIRO-FILHO, J., COUTINHO, H. D. M. HPLC-DAD-ESI-MS profile, antibacterial activity, and modulation of the activity of antibiotics by *Carica papaya* L. against *Escherichia coli* serotypes. **Phytomedicine Plus**, v, 2, n. 3, 1-6, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100306>

GUTHA, L. R., CASASSA, L. F., HARBERTSON, J. F., NAIDU, R. A. Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 187, 2010. (<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-187>).

HAKEEM, K. R., BANAGANAPALI, B., SHAKI, N., ELANGO, R. Essentials of Bioinformatics, Volume III: In Silico Life Sciences: Agriculture. [S.l.]: Springer, 2019. 10.1007/978-3-030-19318-8

HANDA, S. S., KHANUJA, S. P. S., LONGO, G., RAKESH, D. D. Extraction Technologies For Medicinal and Aromatic Plants, 1st ed. International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy, p22-33, 2008.

HARE, J.D., DODDS, J.Á. Survival of the Colorado potato beetle on virus-infected tomato in relation to plant nitrogen and alkaloid content. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 44, p. 31- 35, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1987.tb02236.x>

HARVEY, A. L., EDRADA-EBEL, R., QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015. 10.1038/nrd4510

HAWRYŁ, A., HAWRYŁ, M., WAKSMUNDZKA-HAJNOS, H. Liquid chromatography fingerprint analysis and antioxidant activity of selected lavender species with chemometric calculations. **Plos One**, v. 14, n. 7, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218974>

INGLE, K. P., DESHMUKH, A. G., PADOLE, D. A., DUDHARE, M. S., MOHARIL, M. P., KHELURKAR, V. C. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 32-36, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Producao de mamão. 2022. Acesso em 14 de junho de 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mamao/br>

JADHAV, K., AHIR, K., DESAI, S., DESAI, S., ACHARYA, S. Isolation and characterization of carpaine and dihydroxy derivative of carpaine from leaves of *Carica papaya*: Development of fast HPLC method and standardization of formulations. *J Chromatogr B*, v. 1213, p. 123533, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123533>

JULIANTI, T., OUFIR, M., HAMBURGER, M. Quantification of the antiplasmodial alkaloid carpaine in papaya (*Carica papaya*) leaves. **Planta medica**, v. 80, n. 13, p. 1138–1142, 2014. 10.1055/s-0034-1382948

KALUŻNA-CZAPLIŃSKA, J., JÓŻWIK, J. Current applications of chromatographic methods for diagnosis and identification of potential biomarkers in cancer. **TRAC**, v. 56, p. 1-12, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.007>

KAMMERER, J., SCHWEIZER, C., CARLE, R., KAMMERER, D. R. Recovery and fractionation of major apple and grape polyphenols from model solutions and crude plant extracts using ion exchange and adsorbent resins. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1755–1767, 2011. 10.1111/j.1365-2621.2011.02681.x

KARU, N., DICINOOSKI, G., HANNA-BROWN, M., SRINIVASAN, K., POHL, C. A., HADDAD, P. R. Determination of pharmaceutically related compounds by suppressed ion chromatography: III. Role of electrolytic suppressor design. **J Chromatogr A**, v. 1233, p. 71-77, (2012).

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.008>

KHALID, M; BILAL, M; HUANG, D. Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens—A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 1, p. 211–230, 2019. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62555-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62555-4)

KHADAM, S., AFZAL, U., GUL, H., HIRA, S., SATTI, M., YAQUB, A., AJAB, H., GULFRAZ, M. Phytochemical screening and bioactivity assessment of leaves and fruits extract of *Carica papaya*. **Pak J Pharm Sci**, v. 32, n. 5, p. 1941-1948, 2019.

KITAJIMA, E. W. Association of isometric virus-like particles, restricted to laticifers, with "meleira" ("sticky disease") of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatol Bras**, v. 18, p. 118–122, 1993.

KUMAR, S. S., KRISHNAKUMAR, K., JHON, M. Flavonoids from the butanol extract of *Carica papaya* L. cultivar 'Red Lady' leaf using UPLC-ESI-Q-ToF-MS/MS analysis and evaluation of the antioxidant activities of its fractions. **Food Chemistry Advances**, v.1, p.100126, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100126>

LAN, H., LAI, B., ZHAO, P., DONG, X., WEI, W., YE, Y., WU, Z. Cucumber mosaic virus infection modulated the phytochemical contents of *Passiflora edulis*. *Microbial Pathogenesis*, v. 138, n. 103828, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103828>

- LI, C., GAO, M., LI, J., MIAO, K., LIU, T., LI, J., ZHU, G., LI, Q. Synthesis, characterization, antiviral and antifungal activities of aromatic acyl hydrazono dithiocarbonates. **Journal of Molecular Structure**, v. 1311, 138336, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138336>
- LIMA, M. N., FERNANDES, B. L. M., ALVES, G. F., SOUZA, J. C. Q., SIQUEIRA, M., NASCIMENTO, M. P., SUSSULINI, A., OLIVEIRA, M. A. L. Mass spectrometry applied to diagnosis, prognosis, and therapeutic targets identification for the novel coronavirus SARS-CoV-2: A review. **Anal Chem**, v. 1195, n. 339385, p. 1-19, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339385>
- LIRA, B., BARBIERI, M. MAMÃO/CEPEA: Brasil fecha 2023 como o segundo maior exportador do mundo. 2024. Acesso em 9 de maio de 2024. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/mamao-cepea-brasil-fecha-2023-como-o-segundo-maior-exportador-do-mundo.aspx>.
- LOWELL, A. N., SANTORO, N., SWANEY, S. T., MCQUADE, T. J., SCHULTZ, P. J., LARSEN, M. J., SHERMAN, D. H. Microscale Adaptation of In Vitro Transcription/Translation for High-Throughput Screening of Natural Product Extract Libraries. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 86, n. 6, p. 1331-1338, 2015. 10.1111/cbdd.12614
- LU, W., SU, X., KLEIN, M. S., LEWIS, I. A., FIEHN, O., RABINOWITZ, J. D., Metabolite measurement: pitfalls to avoid and practices to follow. Annual review of Biochemistry, v. 86, p. 277–304, 2017. 10.1146/annurev-biochem-061516-044952
- LUCENA, C., GERUM, A., SANTANA, M., SOUZA, J. A Cultura do Mamoeiro: Aspectos Socioeconômicos. 2021. Capítulo 1. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1150328/1/A-CULTURA-MAMOEIRO-ed01-2021-cap-1.pdf>
- MACIEL-ZAMBOLIM, E., KUNIEDA-ALONSO, S., MATSUOKA, K., CARVALHO, M. G., ZERBINI, F. M. Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v.52, n. 3, p. 389–394, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00855.xok>
- MADROÑERO, J., RODRIGUES, S., ANTUNES, T. F. S., ABREU, P., VENTURA, J. A., FERNANDES, A. A., FERNANDES, P. M. B. Transcriptome analysis provides insights into the delayed sticky disease symptoms in *Carica papaya*. **Plant Cell Rep**, v. 37, n. 7, p. 967–980, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2281-x>
- MAURASTONI, M., ANTUNES, T. F. S., ABREU, E. F. M., RIBEIRO, S. G., MEHTA, A., SANCHES, M. M., FONTES, W., KITAJIMA, E. W., CRUZ, F. T., SANTOS, A. M. C., VENTURA, J. A., GOMES, A. C. M. M., ZERBINI, F. M., SOSA-ACOSTA, P., NOGUEIRA, F. C. S., RODRIGUES, S. P., ARAGÃO, F. J. J., WHITFIELD, A. E., FERNANDES, P. M. B. A Capsid Protein Fragment of a Fusagra-like Virus Found in *Carica papaya* Latex Interacts with the 50S Ribosomal Protein L17. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 1–21, 2023. <https://doi.org/10.3390/v15020541>

- MAURASTONI, M., ANTUNES, T. F. S., OLIVEIRA, S. A., SANTOS, A. M. C., VENTURA, J. A., FERNANDES, P. M. B. A multiplex RT-PCR method to detect papaya meleira virus complex in adult preflowering plants. **Arch. Virol**, v. 165, n. 5, p. 1211–1214, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04588-5>
- MCCLOUD, T. G. High through put extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4526-4563, 2010. 10.3390/molecules15074526
- MCHALE, C., SOLIVEN, A., SCHUTER, S. A simple approach for reversed phase column comparisons via the Tanaka test. **Microchem J**, v.62, n. 105793, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105793>
- MERCHÁN-GAITÁN, J. B., MENDES, J. H. L., NUNES, L. E. C., BUSS, D. S., RODRIGUES, S. P., FERNANDES, P. M. B. The Role of Plant Latex in Virus Biology. **Viruses**, v. 16, n. 1, p. 47, 2024. <https://doi.org/10.3390/v16010047>
- MESSNER, C. B., DEMICHEV, V., WANG, Z., HARTL, L., KUSTATSCHER, G., MÜLLEDER, M., RALSER, M. Mass spectrometry-based high-throughput proteomics and its role in biomedical studies and systems biology. **Proteomics**, v. 23, n. 2200013, 2022. <https://doi.org/10.1002/pmic.202200013>
- MISHRA, J., SRIVASTAVA, R., TRIVEDI, P. K., VERMA, P. C. Effect of virus infection on the secondary metabolite production and phytohormone biosynthesis in plants. **3 Biotech**, v. 10, n. 12, p. 547, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02541-6>
- MOFUNANYA, A. A. J., EDU, E.A. Physiological and biochemical changes in *Cucurbita moschata* Duch. Ex. Poir inoculated with a Nigerian strain of Moroccan watermelon mosaic virus (MWMV): *Lagenaria breviflora* isolate. **International Journal of Plant Pathology**, v. 6, p. 36-47, 2015. <https://doi.org/10.3923/ijpp.2015.36.47>
- MONTERO, R., PÉREZ-BUENO, M. L., BARÓN, M., FLOREZ-SARASA, I., TOHGE, T., FERNIE, A. R., OUAD, H. E. A., FLEXAS, J., BOTA, J. Alterations in primary and secondary metabolism in *Vitis vinifera* ‘Malvasía de Banyalbufar’ upon infection with grapevine leafroll-associated virus 3. **Physiologia Plantarum**, v. 157, p. 442–452, 2016. <https://doi.org/10.1111/ppl.12440>
- MOREIRA, O. B. O., SOUZA, J. C. Q., CANDIDO, J. M. B., NASCIMENTO, M. P., PENNA, E. A., CHELLINI, P. R., OLIVEIRA, M. A. L. Capillary Electrophoresis Applied to Human Urine Analysis for Clinical Diagnosis: New Trends and Perspectives. **Braz J Anal Chem**, v. 10, n. 39, p. 17-51, 2023. <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.RV-13-2022>
- NGERE, J. B., EBRAHIMI, K. H., WILLIAMS, R., PIRES, E., WALSBY-TICKLE, J., MCCULLAGH, J. S. O. Ion-Exchange Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Life Science, Environmental, and Medical Research. **Anal Chem**, v. 95, n. 1, p. 152-166, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04298>

NGUYEN, T. T., PARAT, M. SHAW, P. N., HEWAVITHARANA, A. K., HODSON, M. P. Traditional aboriginal preparation alters the chemical profile of *Carica papaya* leaves and impacts on cytotoxicity towards human squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0147956, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147956>

NUGROHO, A., HERYANI, H., CHOI, J. S., PARK, H. Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 7, n. 3, p. 208-213, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.009>

OLAJIMEDI, A., VALAN, M. HPLC techniques for phytochemistry. **International Journal of Chemical Studies**, v. 8, n. 6, 2590-2596. 2020. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i6ak.11174>

PANG, Z., CHEN, J., WANG, T., GAO, C., LI, Z., GUO, L., XU, J., CHENG, YI. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. **Front Plant Sci**, v. 12, p. 621276, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>

PATHANIA, N., JUSTO, V., MAGDALITA, P., DE LA CUEVA, F., HERRADURA, L., WAJE, A., LOBRES, A., CUETO, A., DILLON, N., VAWDREY, L., HUCKS, L., CHAMBERS, D., SUN, G., CHEESSMAN, J. Integrated disease management strategies for the productive, profitable and sustainable production of high quality papaya fruit in the southern Philippines and Australia (FR2019-89). Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, 2019.

POOLE, C. F. The essence of chromatography. Elsevier Science B. V. 2023

POSERT, R., BACONGUIS, I Appia: Simpler chromatography analysis and visualization. **PLoS One**, v. 18, n. 1, p. :e0280255, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280255>

PRATHAP, B., DEY, A., ARTHANARISWARAN, G. H., JOHNSON, P., ARTHANARISWARAN, P. A Review - Importance of RP-HPLC in analytical method development. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3:15-23. 2013.

QUITO-AVILA, D., REYES-PROAÑO, E., ANAÑA, G., CORNEJO-FRANCO, J. F., ALVAREZ-QUINTO, R., MOREIRA, L., GRINSTEAD, S., MOLLOV, D., KARASEV, A. V. Papaya Sticky Disease Caused by Virus “Couples”: A Challenge for Disease Detection and Management. **Plant Disease**, v. 107, n. 6, p. 1649–1663, 2023. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-22-2565-FE>

QUITO-AVILA, D., ALVAREZ, R. A., IBARRA, M. A., MARTIN, R. R. Detection and partial genome sequence of a new umbra-like virus of papaya discovered in Ecuador. **Eur J Plant Pathol**, v. 143, p. 199–204, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0675-y>

REHMAN, A. U., ZIA, M. A., MUBIN, M., SHAHID, M. Alterations in the antioxidant metabolites in cotton leaf curl disease infected and healthy cotton leaves. *BioRxiv preprint*, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.11.10.468097>

RODRIGUES, C. H., VENTURA, J. A., MAFFIA, L. A. Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.118, 1989.

RODRIGUES, S. P., CUNHA, M., VENTURA, J. A., FERNANDES, P. M. B. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Rep**, v. 28, p. 861-871, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0673-7>

RODRIGUES, S. P., VENTURA, J. A., AGUILAR, C., NAKAYASU, E. S., CHOI, H., SOBREIRA, T. J. P., NOHARA, L. L., WERMELINGER, L. S., ALMEIDA, I. C., ZINGALI, R. B., FERNANDES, P. M. B. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* L. plants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 11, p. 3191–3198, 2012. 10.1016/j.jprot.2012.03.021

RODRIGUES, S. P., VENTURA, J. A., AGUILAR, C., NAKAYASU, E. S., ALMEIDA, I. C., FERNANDES, P. M. B., ZONGALI, R. B. Proteomic analysis of papaya (*Carica papaya* L.) displaying typical sticky disease symptoms. *Proteomics*, v. 11, n. 13, p. 2592–2602, 2011. 10.1002/pmic.201000757

RODRIGUES, S. P., GALVAO, O. P., ANDRADE, J. S., VENTURA, J. A., FERNANDES, P. M. B. Simplified molecular method for the diagnosis of Papaya meleira virus in papaya latex and tissues. *Summa Phytopathologica*, v. 31, n. 3. P. 281–283, 2005.

RUSAK, G., KRAJACIC, M., KRSNIK-RASOL, M., GUTZEIT, H. O. Quercetin influences response in *Nicotiana megalosiphon* infected by satellite-associated cucumber mosaic virus. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 114, p. 145-150, 2007. <https://doi.org/10.1007/BF03356210>

RUSLI, H., PUTRI, R. M., ALNI, A. Recent Developments of Liquid Chromatography Stationary Phases for Compound Separation: From Proteins to Small Organic Compounds. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 907, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27030907>

SALUSTIANO, I V. Bioprospecção de compostos com atividade antimicrobiana de extratos de *Maclura tinctoria* (L.) D. don ex Steud. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, 2018.

SASIDHARAN, S., CHEN, Y., SARAVANAN, D., SUNDRAM, K. M., YOGA LATHA, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SHAFIE, R. M. Hibiscus chlorotic ringspot virus (HCRSV) affecting roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Egypt. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 9, p. 50-62, 2019.

SHARMA, A., BACHHETI, A., SHARMA, P., BACHHETI, R. K., HUSEN, A. Phytochemistry, pharmacological activities, nanoparticle fabrication, commercial

products and waste utilization of *Carica papaya* L.: A comprehensive review. **CRBIOT**, v. 2, p. 145–160, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.11.001>

SHEN, S., CHEN, D., LI, X., LI, T., YUAN, M., ZHOU, Y., DING, C. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla*. **Carbohydr Polym**, v. 10, p. 80-86, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.006>

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia, do produto natural ao medicamento. Artmed, Brasil, 2016.

SINGH, S. P., KUMAR, S. V., MATHAN, S. V., TOMAR, M. S., SINGH, R. K., VERMA, P. K., KUMAR, A., KUMAR, S., SINGH, R. P., ACHARYA, A. Therapeutic application of *Carica papaya* leaf extract in the management of human diseases. **J Pharm Sci**, p.1-10, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00348-7>

SKIRYCH, A., KIERSZNIOWSKA, S., MÉRET, M., WILLMITZER, L., TZOTZOS, G. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado?. **Trends Biotechnol**, v. 34, n. 10, p. 781-790, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.006>

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., DOLAN, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2009 <http://dx.doi.org/10.1002/9780470508183>

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 1973. 2 ed. JOHN WILEY & SONS, INC. New York, Chichester, Brisbane, Toronto

SNYDER, L. R. High Performance Liquid Chromatography. Vol 3, Nova York: Academic Press, 1983.

SOARES, E. A., WERTH, E. G., MADRONERO, L. J., VENTURA, J. A., RODRIGUES, S. P., HICKS, L. M., FERNANDES, P. M. B. Label-free quantitative proteomic analysis of pre-flowering PMeV-infected *Carica papaya* L. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 275–283, 2017. 10.1016/j.jprot.2016.06.025

SOARES, E. A. Proteômica quantitativa, livre de marcação, de *C. papaya* L. em resposta à doença da meleira do mamoeiro. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.

SON, K., KONDO, R., LEE, J., WANG, J., GOTO, E. Effect of low root-zone temperature and UV radiation on growth and gene expression of secondary metabolite pathways in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Stress**, n. 7, n. 100136, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100136>

SOUZA, R., GASPAROTI, P., PAULA, J. Obtenção De Extratos De Plantas Medicinais: Uma Revisão De Escopo Dos Métodos Extrativos Modernos Em Comparação Ao Método Clássico Por Soxhlet. **Revista Movimenta**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.31668/movimenta.v15i1.12870>

TAGLIENTI, A., TIBERINI, A., CIAMPA, A., PISCOPO, A., ZAPPIA, A., TOMASSOLI, L., POIANA, M., DELL'ABATE, M. T. Metabolites response to onion yellow dwarf virus (OYDV) infection in 'Rossa di Tropea' onion during storage: a ¹H HR-MAS NMR study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 3418-3427, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10376>

THORNBURG, C. C., BRITT, J. R., EVANS, J. R., AKEE, R. K., WHITT, J. A., TRINH, S. K., HARRIS, M. J., THOMPSON, J. R., EWING, T. L., SHIPLEY, S. M., GROTHAUS, P. G., NEWMAN, D. J., SCHNEIDER, J. P., GRKOVIC, T., O'KEEFE, B. R. NCI Program for Natural Product Discovery: A Publicly-Accessible Library of Natural Product Fractions for High-Throughput Screening. **ACS Chem Biol**, v. 13, n. 9, p. 2484-2497, 2018. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00389>.

TIWARI, P., KUMAR, B., KAUR, M., KAUR, G., KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, P. 98-106, 2011.

TRIKAS, E. D., PAPI, M. R., KYRIAKIDIS, D. A., ZACHARIADIS, G. A. Evaluation of Ion Exchange and Sorbing Materials for Their Adsorption/Desorption Performane towards Anthocyanins, Total Phenolics, and Sugars from a Grape Pomace Extract. **Separations**, v. 4, n. 1, p. 2-17. <https://doi.org/10.3390/separations4010009>

URBANO, M., LUQUE DE CASTRO, M. D., PÉREZ, P. M., GARCÍA-OLMO, J. GÓMEZ-NIETO, M.A. Ultraviolet–visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines. **Food Chem**, v. 97, p. 166–175, 2006.

VENTURA, J. A., LIMA, I. M., MARTINS, M. V. V., CULIK, M. P., COSTA, H. Impact and management of diseases in the propagation of fruit plants. **Rev Bras Frutic** 41. 2019

VENTURA, J. A., COSTA, H., TATAGIBA, J. S. Papaya diseases and integrated control. *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II: Diagnosis and Management*, 201–268. 2004

VIEIRA, M.S., CABRAL, R.L.F., FAVARATTO, I., MACIEL, L.S., XAVIER, A.S., ZERBINI, F.M., FERNANDES, P.M.B. Tropical Fruit Virus Resistance in the Era of Next Generation Plant Breeding. **Preprints**. 2024. <https://doi.org/10.20944/preprints202405.1165.v1>

VIJ, T., PRASHAR, Y. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn. **Asian Pac J Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2015. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60617-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60617-4)

WEISS, J., WESSISS, T. *Handbook of Ion Chromatography*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2004.

WU, F., JIANG, Y., YANG, H., MA, L. Development of Detection Antibody Targeting the Linear Epitope in SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein with Ultra-High Sensitivity. **Mol Sci**, v. 25, n. 8, p. 4436, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25084436>

YE, D., LI, X., SHEN, J., XIA, X. Microbial metabolomics: From novel technologies to diversified applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 148, p. 116540, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116540>

ZAYNAB, M., FATIMA, M., ABBAS, S., SHARIF, Y., UMAIR, M., ZAFAR, M. H., BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microb Pathog**, v. 124, p. 198–202, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>

ZAYNAB, M., FATIMA, M., SHARIF, Y., ZAFAR, M. H., ALI, H., KHAN, K.A. Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, n. 103728, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103728>

ZAIM, M., LAL, R. K., VERMA, R. K., AND, PANDEY. R. Studies on effect of poppy mosaic virus infection on poppy produce and some secondary metabolites. **Acta Horticulturae**, v. 1036, p. 151-156, 2014. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1036.16>

ZHAO, C., CHIK, W., ZHANG, H. J. Capítulo 22 - Bioprospecting and bioassay-guided isolation of medicinal plants—A tool for drug Discovery. **Evidence-Based Validation of Herbal Medicine**, p. 511-537, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85542-6.00028-7>

ZHAO, L., FENG, C., WU, K., CHEN, W., CHEN, Y., HAO, X., WU, Y. Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: A review. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 15-26, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.07.003>

ZHOU, Y., CAO, Y., LI, J., AGAR, O. T., BARROW, C., DUNSHEA, F., SULERIA, H. A. R. Screening and characterization of phenolic compounds by LC-ESI-QTOF-MS/MS and their antioxidant potentials in papaya fruit and their by-products activities. **Food Bioscience**, v. 52, 102480, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102480>

8. ANEXOS

1 - O artigo vinculado a esta tese intitulado `` **Stage-Specific Biomarkers for Papaya Sticky Disease Using the Molecular Profile of *Carica papaya* (L.) Leaf Extracts: A Chromatographic Approach**`` encontra-se em under peer review na revista Food Analytical Methods, Qualis A1 em Biotecnologia, estando a aluna apta à defesa segundo o regimento do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

2 – Os resultados da análise por UHPLC-MS/MS chegaram dia 29 de junho em forma de tabela, em vias de enviar a tese para a banca, de forma que não foi possível disponibilizar os cromatogramas e espectros correspondentes.