

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIVALDO JOSÉ COSTA CORRÊA

Paspalum maritimum Trin.: Estudo Químico, Isolamento de Endofíticos,
Biotransformações, Sínteses e Atividade Alelopática

BELÉM-PA
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIVALDO JOSÉ COSTA CORRÊA

***Paspalum maritimum* Trin.: Estudo Químico, Isolamento de Endofíticos,
Biotransformações, Sínteses e Atividade Alelopática**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor ao Programa de Pós-Graduação em
Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais.
Instituição: Universidade Federal do Pará.
Área de concentração: Química de Produtos
Naturais.
Orientador: Prof^o. Dr. Lourivaldo da Silva
Santos.

BELÉM/ PA
2010

MARIVALDO JOSÉ COSTA CORRÊA

***Paspalum maritimum* Trin.: Estudo Químico, Isolamento de Endofíticos,
Biotransformações, Sínteses e Atividade Alelopática**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor ao Programa de Pós-Graduação em
Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais.
Instituição: Universidade Federal do Pará.
Área de concentração: Química de Produtos
Naturais.
Orientador: Prof^o Dr. Lourivaldo da Silva Santos.

Data: 12/ 07/ 2010.

CONCEITO: APROVADO.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/ UFPA- Orientador

Prof.Dr. Michelangelo Muzell Trezzi
Universidade Tecnológica Federal do Paraná/ UTFPR- Membro

Prof. Dr. Andrey M. R. Marinho
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/ UFPA- Membro

Prof. Dra. Giselle Maria S.P. Guilhon
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/ UFPA- Membro

Prof. Dra. Fatima Miranda Nunes
Instituto de Ciências Biológicas/ UFPA- Membro

BELÉM-PA
2010

*“Não existe discípulo superior ao mestre.
Todo discípulo perfeito deverá ser como o
mestre.”*

Lucas, 6:40

Aos meus pais, Milton de Souza Corrêa (*in
memorian*) e Lindalva Costa Corrêa, exemplos
eternos de vida.

À minha querida esposa, Rosa Corrêa, e minha filha, Dra. Kellyn Caroline Corrêa, meu precioso tesouro, externo meu agradecimento pelo incentivo durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, companhia de todos os momentos.

À minha família, Pai; Milton Corrêa (in memoriam), Mãe; Lindalva Corrêa, pelo apoio em todos os momentos de minha carreira profissional e especialmente pelos conselhos na longa caminhada da vida e a todos os meus irmãos, Dra. Jerusa Corrêa, Profa. Vera Corrêa, Mario Luis, Mauro Corrêa, Dra. Socorro Corrêa, Dr. Maurício Carlos, em especial ao Dr. Milton Filho pelo seu apoio desde o início de minha carreira profissional.

À Universidade Federal do Pará, instituição que zela pela qualidade do seu corpo docente.

Ao Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos, orientador e amigo de todas as horas, pela orientação competente, ensinamentos e dedicação com que conduziu este trabalho, minha eterna gratidão.

À Prof^a Dra. Giselle Maria S.P. Guilhon, pelo incentivo na elaboração deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Antonio Pedro da Silva Souza Filho, da Embrapa-Amazônia Oriental, pela orientação, incentivo e dedicação, e pelos testes alelopáticos. A sua amizade foi fundamental para o desenvolvimento e a conclusão do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberdan Silva Santos, pelos valiosos ensinamentos. Sua disponibilidade e sinceridade ajudaram para que este trabalho fosse concluído.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química, pela amizade e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao discente Williams Ribeiro, pela valiosa contribuição a este trabalho. Meu sincero agradecimento.

Ao amigo Prof. Dr. Heriberto Bitencourt, pela sua valiosa contribuição e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Davi Brasil, pela valiosa cooperação.

Ao prezado amigo Marçal Luna, agradeço de coração a ajuda que me foi dispensada.

Ao Prof. Dr. Geraldo Narciso, pelo apoio recebido e ter confiado na potencialidade dos resultados que este trabalho frutificou.

A todos os meus amigos.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

Faz-se ciência com os fatos, como se faz uma casa com pedras; mas um acúmulo de fatos não é ciência, assim como um monte de pedras não é uma casa.

Henri Poincaré (1854 – 1912), Matemático francês.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	25
1.1. PLANTAS.....	25
1.1.1. A espécie <i>Paspalum maritimum</i> Trin.	28
1.1.1.1. Considerações Botânicas	28
1.1.1.2. Classificação Botânica	29
1.1.1.3. Descrição botânica de <i>Paspalum maritimum</i> Trin.	29
1.1.1.4. Constituintes químicos isolados da espécie <i>Paspalum maritimum</i>	30
1.1.1.5. Atividade biológica relatada	30
1.2. FUNGO	31
1.2.1. Interações entre fungos e plantas	32
1.2.2. Gênero <i>Aspergillus</i>	33
1.3.SÍNTESES	36
1.3.1.Reações de sínteses	36
1.3.2.Sínteses de chalconas	36
1.3.3.Reações de hidrogenação	38
1.4.BIOTRANSFORMAÇÕES	39
1.4.1.Vantagens da utilização de enzimas	40
1.4.2.Classificação das enzimas	40
1.5.ALELOPATIA	42
1.5.1.Importância da Alelopatia na Agricultura e Pecuária	43
2.OBJETIVOS	45
2.1- GERAL	45
2.2- ESPECÍFICOS	45
3.DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	46
3.1.MATERIAIS	46
3.1.1.Equipamentos	46
3.1.2.Solventes	46
3.1.3.Substratos utilizados para o cultivo em meio sólido	46
3.1.4.Substratos utilizados para o cultivo em meio líquido	46
3.1.5.Reagentes utilizados na sínteses de chalconas e reação de hidrogenação	47
3.1.6. Técnicas cromatográficas TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	47

3.1.7. Substratos utilizados nas biotransformações	47
3.2.MÉTODOS	48
3.2.1. Estudo químico da espécie <i>Paspalum maritimum</i>	48
3.2.1.1. Coleta e Identificação do Material Botânico	48
3.2.1.2.Obtenção dos Extratos Brutos	48
3.2.1.3.Isolamento dos constituintes químicos do extrato hexânico de <i>Paspalum maritimum</i>	49
3.2.1.4. Isolamento dos constituintes químicos do extrato acetato de etila de <i>Paspalum maritimum</i>	50
3.2.1.5. Isolamento dos constituintes químicos do extrato metanólico de <i>Paspalum maritimum</i>	51
3.3. ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO <i>Paspalum maritimum</i>	53
3.3.1. Esterilização do material vegetal e isolamento dos endofíticos	53
3.3.2. Cultivo em Czapek	54
3.3.2.1. Extrato micelial	55
3.3.2.2. Extrato do filtrado	55
3.3.3. Cultivo em meio sólido (arroz)	56
3.3.3.1. Fracionamento dos extratos fúngicos ECAcOEt e ECMeOH obtidos em meio líquido (Czapeck)	58
3.3.3.2. . Fracionamento dos extratos fúngicos EAAcOEt, EAMeOH-1 e EAMeOH-2 obtidos em meio sólido (Arroz).....	58
3.4. SÍNTESES DAS CHALCONAS	58
3.4.1. Procedimento geral para obtenção das chalconas	58
3.4.1.1. Chalcona S1 : (2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona	59
3.4.1.2. Chalcona S2 : (2E)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-prop-2-en-1-ona	59
3.4.1.3. Chalcona S3 : (2E)-1-(4-metóxi-fenil)-3-(2,3,4-trimetóxi-fenil)-prop-2-en-1-ona.....	59
3.4.1.4. Chalcona S4 : (2E)-1-(4-metóxi-fenil)-3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-prop-2-en-1-ona.....	60
3.4.1.5. Chalcona S5 : (2E, 6E)-2,6-bis(benzidileno)-cicloexan-1-ona	60
3.5. REAÇÕES DE HIDROGENAÇÃO	61

3.5.1. Procedimento geral para as reações de hidrogenação.....	61
3.5.1.1. Chalconas utilizadas nas reações de hidrogenação	61
3.6. REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO	61
3.6.1. Procedimento geral para as reações de biorreduções.....	61
3.6.2. Escolha dos microorganismos	62
3.6.3. Escolha dos substratos	62
3.7. ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	65
3.7.1. Análise da atividade alelopática	65
3.7.1.1. Espécies receptoras	65
3.7.1.2. Bioensaio de germinação de sementes	65
3.7.1.3. Bioensaios do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo	66
3.7.1.4. Análise dos efeitos do pH	66
3.7.1.5. Outros procedimentos experimentais	66
3.7.1.6. Delineamento experimental e análise estatística	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DO ESTUDO QUÍMICO PRELIMINAR DE <i>Paspalum Maritimum</i>	67
4.1.1. Substância S6	68
4.1.2. Substância S7	73
4.1.3. Substância S8	78
4.1.4. Misturas de substâncias S8 + S9	83
4.1.5. Substância S10	92
4.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DA BIOMASSA PRODUZIDA PELO FUNGO <i>Aspergillus flavus</i> NO CULTIVO EM CZAPEK E ARROZ	104
4.2.1. Misturas de substância S11+S12	104
4.2.2. Substância S13	111
4.2.3. Substância S14	111
4.3.SUBSTÂNCIAS QUE FORAM SINTETIZADAS NESTE TRABALHO (CHALCONAS)	126
4.3.1. Chalcona S1	126
4.3.2. Chalcona S2	127

4.3.3. Chalcona S3	127
4.3.4. Chalcona S4	128
4.3.5. Chalcona S5	128
4.4. SUBSTÂNCIAS OBTIDAS A PARTIR DAS REAÇÕES DE BIORREDUÇÕES .	134
4.4.1. Didrochalconas	134
4.4.1.1. Reação de biotransformação 1	135
4.4.1.2. Reação de Biotransformação 2	144
4.4.1.3. Reação de Biotransformação 3	146
4.4.1.4. Reação de Biotransformação 4	149
4.4.1.5. Reação de Biotransformação 5	150
4.4.2. Aril-etanol	151
4.5. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DAS REAÇÕES DE REDUÇÕES (HIDROGENAÇÃO)	153
4.5.1. Reação de redução da chalcona S2 e obtenção da didrochalcona S16	153
4.5.2. Reação de redução da chalcona S3 e obtenção da didrochalcona S17	166
5. ATIVIDADE ALELOPÁTICA	176
5.1. ANÁLISE DA TRICINA (S10)	176
5.1.2. Efeitos do pH na atividade alelopática da tricina (S10).....	178
5.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA DOS EXTRATOS FÚNGICOS DA BIOMASSA PRODUZIDA PELO <i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>	180
5.2.1. Atividade alelopática do ácido kójico (S13)	180
5.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DAS SUBSTÂNCIAS INÉDITAS S16 E S17 OBTIDAS POR BIORREDUÇÃO E HIDROGENAÇÃO.....	182
6. CONCLUSÕES	185
REFERÊNCIAS	187

RESUMO

Este trabalho descreve o primeiro estudo químico e alelopático da espécie *Paspalum maritimum* Trin. O perfil químico da espécie inclui metabólitos secundários pertencentes às classes de esteroides e flavonoides. Também, foi realizado pela primeira vez o isolamento de microorganismos endofíticos associados às folhas, rizomas e raízes da espécie vegetal em estudo, de onde foram obtidas sete espécies fúngicas, sendo selecionada uma dessas espécies para ser cultivada (*Aspergillus flavus*), com a posterior obtenção dos extratos fúngicos. Dentre as substâncias isoladas da biomassa produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, duas pertencem à classe de esteróides, uma γ -pirona e uma pertencente à classe de polióis.. Foram conduzidas reações de biotransformações com o fungo endofítico *Aspergillus flavus*, com o objetivo de avaliar a habilidade deste fungo em modificar quimicamente as estruturas dos seguintes substratos: cetonas e chalconas. As cetonas utilizadas foram: acetofenona, na qual ocorreu a bio-redução da carbonila e a 4-nitro-acetofenona, na qual não foi observada nenhuma modificação química. As chalconas foram selecionadas como substratos para reações de biotransformação por apresentarem diversas atividades biológicas. Para servirem como substratos nas biotransformações foram sintetizadas as chalconas: (2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona (**S1**), (2E)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**S2**), (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**S3**), (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**S4**), (2E,6E)-2,6-bis(benzilideno)-cicloexan-1-ona (**S5**). As chalconas **S1**, **S2** e **S3** foram biorreduzidas para as respectivas diidrochalconas **S15**, **S16** e **S17**, com 74,5%; 36,3%; 15,6% de rendimento, respectivamente. As chalconas **S4** e **S5** não apresentaram modificações nas suas estruturas. As chalconas **S15** e **S16** são substâncias inéditas. A tricina, flavona isolada da planta, e o ácido kójico, obtido da biomassa do endofítico *Aspergillus flavus*, foram submetidos a ensaios alelopáticos, por serem os compostos majoritários isolados, assim como as diidrochalconas **S16** e **S17** também foram submetidas a ensaios alelopáticos para verificar a correlação de atividade com a flavona tricina, por serem substâncias pertencentes a mesma classe, flavonóides.

Palavras chaves: *Paspalum maritimum*, esteróides, flavonóides, biotransformações.

ABSCTRACT

This work describes the first chemical and alelopathy studies of the species *Paspalum maritimum* Trin. Chemical profile of the species includes secondary metabolites belonging to the classes of steroids and flavonoids. This study also deals with for the first time of endophytic microorganisms associated with leaves, roots and rhizomes of the species under study. Seven fungal species were isolated, and one of these species was selected to be cultivated (*Aspergillus flavus*), and to obtain the fungal extracts. Among the substances isolated from the biomass produced by the fungus *Aspergillus flavus*, two belong to the class of steroids, one is a γ -pyrone and the other one is a polyol. Biotransformation processes with the endophytic fungus *Aspergillus flavus* were carried out with the aim to evaluate the ability of this fungus to chemically modify the structures of several substrates: ketones and chalcones. The ketones used were acetophenone, on which occurred a bioreduction of the carbonyl and 4-nitro-acetophenone, on which there were no chemical modifications. The chalcones were selected for biotransformation reactions because of their several biological activities. The chalcones synthesized were: (2E)-1,3-diphenyl-prop-2-en-1-one (S1), (2E)-1-phenyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-prop-2-en-1-one (S2), (2E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-prop-2-en-1-one (S3), (2E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-prop-2-en-1-one (S4), (2E, 6E)-2,6-bis(benzylidene)-cyclohexane-1-one (S5). The chalcones S1, S2 and S3 were bioreduced for the dihydrochalcones S15, S16 and S17, in 74.5%, 36.3%, 15.6% yield, respectively. The chalcones S4 and S5 did not show any changes in their structures. The dihydrochalcones S16 and S17 are new compounds. Tricine, a flavone isolated from the plant, and kojic acid, obtained from the biomass of endophytic *Aspergillus flavus* associated with *Paspalum maritimum* were tested for their allelopathic activity once they were the major compounds isolated, as well as the dihydrochalcones S16 and S17, because they are substances belonging to the same class of tricine, flavonoids.

Key words: *Paspalum maritimum*, steroids, flavonoids, biotransformations.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Plantas, fonte de alimentos, medicamentos e de assepsia	25
Figura 2	Atividade pecuária e a qualidade de pastagens	26
Figura 3	Estruturas químicas das principais aflatoxinas	35
Figura 4	Mecanismo geral da reação de condensação aldólica	37
Figura 5	Representação geral da reação de biotransformação.....	39
Figura 6	Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das folhas de <i>Paspalum maritimum</i> Trin.	49
Figura 7	Fracionamento do extrato hexânico- EH	50
Figura 8	Fracionamento do extrato acetato de etila (E- AcOEt)	51
Figura 9	Fracionamento do extrato metanólico (E- MeOH)	52
Figura 10	Fotografias frente e verso da linhagem do fungo FEFLPM3D1	53
Figura 11	Extratos do fungo FEFLPM3D1 (<i>A. flavus</i>), a partir do cultivo em meio líquido Czapek	56
Figura 12	Extratos do fungo FEFLPM3D1 (<i>A. flavus</i>), a partir do cultivo em meio sólido (arroz)	57
Figura 13	(2E)-1,3-difenil-prop-en-1-ona (S1)	59
Figura 14	(2E)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-en-1-ona (S2)	59
Figura 15	(2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,4,5-trimetoxifenil)-prop-en-1-ona (S3)	59
Figura 16	(2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,4,5-trimetoxifenil)-prop-en-1-ona (S4)	60
Figura 17	(2E-6E)-2,6-bis (benzidileno)-cicloexan-1-ona (S5)	60
Figura 18	Redução de cetonas α,β - insaturadas com redutases isoladas de fermento	62
Figura 19	Reações de biotransformações possíveis de ocorrerem em cetonas aromáticas	62
Figura 20	Reação de biorredução esperadas para chalconas	63
Figura 21	Reações de biotransformações possíveis em chalconas	64
Figura 22	Constituintes químicos isolados dos extratos das folhas de <i>P.</i> <i>maritimum</i>	67
Figura 23	Estrutura do α -espinasterol (S6).....	68

Figura 24	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S6	70
Figura 25	Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S6	71
Figura 26	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S6	72
Figura 27	Estrutura do sitosterol (S7)	73
Figura 28	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S7	75
Figura 29	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S7	76
Figura 30	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S7	77
Figura 31	Estrutura do 3-β-glicopiranosil-sitosterol (S8)	78
Figura 32	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, piridina) de S8	80
Figura 33	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, piridina) de S8	81
Figura 34	Espectro de DEPT de S8	82
Figura 35	Mistura dos esteróides 3-β-glicopiranosil-sitosterol e o 3-β-glicopiranosil-estigmasterol (S8+S9).....	83
Figura 36	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, piridina) de S8+S9	85
Figura 37	Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, piridina) de S8+S9 ...	86
Figura 38	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, piridina) de S8+S9	87
Figura 39	Expansão Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, piridina) de S8+S9	88
Figura 40	Expansão Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, piridina) de S8 e S9	89
Figura 41	Espectro de DEPT de S8+S9	90
Figura 42	Expansão do espectro de DEPT de S8+S9	91
Figura 43	Estrutura da flavona tricina S10	92
Figura 44	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO) de S10	95
Figura 45	Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO) de S10	96
Figura 46	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO) de S10	97
Figura 47	Espectro de DEPT de S10	98
Figura 48	Espectro de COSY de S10	99
Figura 49	Espectro de HETCOR de S10	100
Figura 50	Espectro de HMBC de S10	101
Figura 51	Expansão do espectro do espectro de HMBC de S10	102
Figura 52	Expansão do espectro do espectro de HMBC de S10	103
Figura 53	Estruturas do ergosterol (S11) e peróxido de ergosterol (S12)	104
Figura 54	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S11+S12	107

Figura 55	Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S11+S12	108
Figura 56	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S11 e S12	109
Figura 57	Expansão Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S11 e S12 ...	110
Figura 58	Estrutura do ácido kójico (S13)	111
Figura 59	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO) de S13	114
Figura 60	Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO) de S13	115
Figura 61	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO) de S13	116
Figura 62	Espectro de DEPT de S13	117
Figura 63	Espectro de COSY de S13	118
Figura 64	Expansão do espectro de COSY de S13	119
Figura 65	Espectro de HETCOR de S13	120
Figura 66	Principais correlações no espectro de HMBC para S13	121
Figura 67	Espectro de HMBC de S13	121
Figura 68	Estrutura do dulcitol (S14).....	122
Figura 69	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, D ₂ O) de S14	123
Figura 70	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, D ₂ O) de S14	124
Figura 71	Espectro de DEPT de S14	125
Figura 72	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S1	129
Figura 73	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S1	129
Figura 74	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S2	130
Figura 75	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S2	130
Figura 76	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S3	131
Figura 77	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S3	131
Figura 78	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S4	132
Figura 79	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S4	132
Figura 80	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S5	134
Figura 81	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S5	134
Figura 82	Reação de biorredução de S1 e formação de S15	135
Figura 83	Reação de biorredução de S1 (meio de cultura + fungo +substrato e meio de cultura)	135
Figura 84	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S15 + S1	138
Figura 85	Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S15 em	

	mistura com S1	139
Figura 86	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S1 em mistura com S1	140
Figura 87	Espectro de DEPT de S15	141
Figura 88	Espectro de HETCOR de S15	142
Figura 89	Espectro de HMBC de S15	143
Figura 90	Principais correlações dos hidrogênios metilênicos H α e H β no espectro de HMBC de S15	143
Figura 91	Reação de biorredução de S2 (Meio de cultura + fungo +substrato e meio de cultura).....	144
Figura 92	Reação de biorredução de S2 e formação de S16	144
Figura 93	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S16 em mistura com S2	145
Figura 94	Reação de biorredução de S3 (Meio de cultura + fungo +substrato e meio de cultura)	146
Figura 95	Reação de biorredução de S3 e formação de S17	146
Figura 96	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S17	148
Figura 97	Meios de culturas no desenvolvimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> na biorredução de S4	149
Figura 98	Reação de biorredução da chalcona S4	149
Figura 99	Meios de culturas no desenvolvimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> na biorredução de S5	150
Figura 100	Reação de biorredução de S5	150
Figura 101	Reações de biotransformação utilizando <i>Aspergillus flavus</i>	151
Figura 102	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da acetofenona e feniletan-1-ol (S18) em mistura	152
Figura 103	Reação de hidrogenação de S2	153
Figura 104	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S16	157
Figura 105	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S16	158
Figura 106	Espectro de DEPT de S16	159
Figura 107	Espectro de COSY de S16	160
Figura 108	Espectro de HETCOR de S16	161
Figura 109	Principais correlações no espectro de HMBC para S16	162

Figura 110	Espectro de HMBC de S16	162
Figura 111	Expansão do espectro de HMBC de S16	163
Figura 112	Expansão do espectro de HMBC de S16	164
Figura 113	Espectro de massas de S16	165
Figura 114	Proposta de fragmentação para S16	165
Figura 115	Reação de hidrogenação de S3	166
Figura 116	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S17	169
Figura 117	Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S17	170
Figura 118	Espectro de DEPT de S17	171
Figura 119	Espectro de HETCOR de S17	172
Figura 120	Espectro de HMBC de S17	173
Figura 121	Expansão do espectro de HMBC de S17	174
Figura 122	Espectro de massas de S17	175
Figura 123	Proposta de fragmentação para S17	175

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
ATP	Adenosina Trifosfato
J	Constante de acoplamento
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CG	Cromatografia gasosa
δ	Deslocamento Químico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPT	<i>Distortiloeess Enhancement by Polarization Transfer</i>
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
ECAcOEt	Extrato acetato de etila obtido a partir do filtrado em meio líquido Czapek
ECMeOH	Extrato metanólico obtido a partir do micélio em meio líquido Czapek
EAHex	Extrato hexânico obtido a partir do filtrado em meio sólido (Arroz)
EAAcOEt	Extrato acetato de etila obtido a partir do filtrado em meio sólido (Arroz)
EAMeOH-2	Extrato metanólico obtido a partir do filtrado em meio sólido (Arroz)
EAMeOH-1	Extrato metanólico obtido a partir do micélio em meio sólido (Arroz)
Enz	Enzima
EM	Espectrometria de massas
FEFLPM3D1	Fungo endofítico das folhas de <i>Paspalum maritimum</i>
g	Gramas
Hex.	Hexano
HETCOR	<i>Heteronuclear correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
mg	Miligrama

mL	Mililitro
<i>m</i>	Multiplete
p.	Página
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Triplete
<i>tt</i>	Triplo-triplete

LISTA DE TABELAS

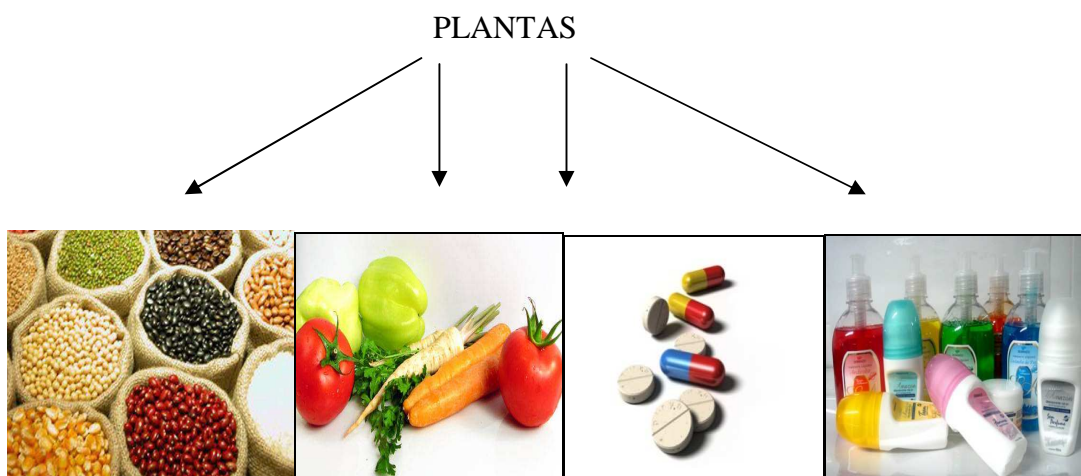
Tabela 1	Classificação das enzimas	37
Tabela 2	Endofíticos isolados de <i>Paspalum maritimum</i>	51
Tabela 3	Meio Czapeck enriquecido com 2 % de extrato de levedura	52
Tabela 4	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de S6	69
Tabela 5	Dados de RMN ¹³ C de S7	74
Tabela 6	Dados de RMN ¹³ C e DEPT de S8	79
Tabela 7	Dados de RMN ¹³ C de S8 e S9	84
Tabela 8	Dados de RMN 1D e 2D de S10	94
Tabela 9	Dados de RMN ¹³ C da mistura S8 e S9	106
Tabela 10	Dados de RMN 1D e 2D de S13	114
Tabela 11	Dados de RMN ¹³ C de S14	123
Tabela 12	Deslocamentos químicos relativos aos sinais dos hidrogênios das substâncias S1 , S2 , S3 , S4 e S5	129
Tabela 13	Deslocamentos químicos relativos aos sinais dos carbonos das substâncias S1 , S2 , S3 , S4 e S5	130
Tabela 14	Dados de RMN 1D e 2D de S15	144
Tabela 15	Dados de RMN 1D e 2D de S16	163
Tabela 16	Dados de RMN 1D e 2D de S17	176
Tabela 17	Efeitos alelopáticos da substância tricina sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de três espécies de plantas de área de pastagens cultivadas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada	187
Tabela 18	Variações na atividade alelopática do aleloquímico Tricina, na concentração de 200 mg L ⁻¹ , em diferentes condições de pH. Dados expressos em percentual de germinação.	188
Tabela 19	Efeitos do ácido kójico sobre a germinação de sementes de plantas de áreas de pastagens cultivadas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada. ..	189
Tabela 20	Efeitos do ácido kójico sobre o desenvolvimento da radícula de plantas de áreas de pastagens cultivadas. Dados expressos em	

	percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	190
Tabela 21	Efeitos do ácido kójico sobre o desenvolvimento do hipocótilo de plantas de áreas de pastagens cultivadas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	192
Tabela 22	Efeitos das substâncias inéditas S16 e S17 sobre a germinação de sementes de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	192
Tabela 23	Efeitos das substâncias inéditas S16 e S17 sobre o alongamento da radícula de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	192
Tabela 24	Efeitos das substâncias inéditas S16 e S17 sobre o alongamento do hipocótilo de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.	193

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTAS

Desde o início de sua existência o ser humano buscou alternativas para solucionar problemas relacionados à sua alimentação, doenças e assepsia corporal. As plantas sempre estiveram presentes no cotidiano do ser humano como fonte de alimento, asseio e de tratamento de doenças, em decorrência de sua abundância na natureza e facilidade de obtenção. A sua utilização no controle de pragas e de diversas doenças talvez seja alternativa mais antiga quanto o próprio aparecimento da humanidade (FRANÇA, 2001). Na Figura 1 são mostrados produtos obtidos a partir de plantas, tais como grãos, hortaliças e legumes, fármacos e produtos de higiene e cosméticos.



Foto, Fonte(Nutrição/UFPA)

Figura 1- Plantas: Fonte de alimentos, medicamentos e de assepsia.

Assim como as plantas fornecem, através da agricultura, os grãos e os legumes necessários para a sua alimentação, e indiretamente as carnes de frango e gado por meio da avicultura e pecuária, torna-se de extrema necessidade a conservação das áreas de cultivo onde essas atividades são desenvolvidas. A produtividade das culturas, em qualquer sistema de cultivo, está associado a um conjunto de fatores, entre eles, os genéticos, os climáticos, os edáficos e os relacionados com o manejo adequado das culturas, tanto sob os aspectos nutricionais e de irrigação, quanto de controle de pragas, moléstias e das plantas daninhas (SILVA, CRISTOFFOLETI e VICTORIA, 1994).

Um dos fatores mais importante para o sucesso da atividade pecuária é a qualidade das pastagens (Figura 2), a qual é, muitas vezes, afetada em consequência da ocorrência de plantas daninhas, principalmente aquelas que são tóxicas aos animais. Tais plantas concorrem com as forrageiras em termos de luz, água, nutrientes e espaço físico, arranham os animais, desvalorizando o couro, e são responsáveis também, quando tóxicas, pela mortalidade de alguns animais (CARVALHO & PITELLI, 1992).



Fotos: Alfredo K. O. Homma; Antônio Pedro S. Souza Filho; Célio A. P. Ferreira e Cláudio V. Araújo.

Fonte: *Criação de bovinos de corte no Estado do Pará (EMBRAPA)*.

Figura 2- Atividade pecuária e a qualidade de pastagens.

Na Região Amazônica, a ocorrência de plantas daninhas é considerada como o mais sério problema de ordem biológica a ser enfrentado pelos pecuaristas, além de ser o seu controle, um dos mais elevados componentes do custo de produção de fazendas. O estabelecimento de estratégias que possibilitem não só reduzir o grau de infestação das pastagens mantendo a longevidade produtiva em longo prazo, em níveis aceitáveis de infestação, sob o ponto de vista bioeconômico, é de fundamental importância para a sobrevivência da atividade na região, quer em bases lucrativas, quer como agente amenizador das insatisfações de ordem social e ambiental que esse tipo de atividade tem despertado no âmbito nacional e internacional (BORGES et al., 2007).

Assim, por exemplo, a busca por herbicidas que possam ser extraídos de fontes naturais é essencialmente importante para as áreas de pastagens cultivadas da Região Amazônica, sendo de fundamental importância para a atividade agropecuária, em decorrência da utilização de métodos ultrapassados ainda serem empregados, como é o caso do uso do fogo e da roçagem, e do emprego de herbicidas sintéticos que agridem o ambiente, causando-lhe degradação.

O conhecimento das principais interações entre as plantas invasoras e cultivadas poderá ser de grande utilidade prática para se desenvolver estratégias de controle eficiente de plantas invasoras (ALTIERE & DOLL, 1978), e principalmente, conhecer a composição química dessas plantas, possibilitará o não desperdício com herbicidas sintéticos cujo princípio ativo esteja entre os metabólitos secundários produzidos pela planta. Nesse sentido, a alelopatia, fenômeno que ocorre largamente em comunidades de plantas, vem merecendo cada vez mais atenção por parte da comunidade científica, como estratégia de controle de invasoras (SMITH, 1987). Em pastagens, a alelopatia pode se tornar um importante fator de manejo, pelo uso de plantas que exercem um certo nível de controle sobre espécies indesejáveis, ou a possibilidade de identificação, isolamento e purificação de compostos alelopáticos com potencial para a produção de bioherbicidas (HALTZIOS, 1987). Dentre outras vantagens do uso de substâncias produzidas pelas próprias plantas no controle de plantas daninhas, está o fato de os pesticidas originados de fontes de plantas serem mais sistêmicos e mais facilmente biodegradáveis do que os pesticidas sintéticos (RIZVI, MUKERJI, MATHUR, 1980).

Entretanto, uma nova área de pesquisa vem sendo reorientada para o estudo de bactérias e fungos utilizando a aplicação de biotransformações, pois os metabólitos secundários produzidos em pequenas quantidades naturalmente pelas plantas, além dos processos de obtenção ser demorados e onerosos, em muitos casos fornecem aleloquímicos com baixa atividade inibitória da germinação de sementes e do desenvolvimento da radícula de espécies receptoras ou, então, as quantidades obtidas são insuficientes para a realização dos bioensaios, permitindo, apenas, a realização dos procedimentos de identificação (DUKE, 2000). Ao contrário, os metabólitos secundários das biomassas produzidas por fungos e bactérias são obtidos em quantidades razoáveis, apresentam a vantagem de serem produzidos de uma maneira ecologicamente aceitável, não havendo a produção paralela de resíduos tóxicos.

De acordo com essas informações e pelo fato da espécie *Paspalum maritimum* já ter apresentado evidências de que apresenta efeitos alelopáticos, um dos objetivos deste trabalho foi a investigação química para o isolamento de metabólito(s) secundário(s) que seja(m) responsável(is) pela atividade alelopática que a planta apresenta (SOUZA FILHO, 2006b), assim como o isolamento de fungos endofíticos associados a esta espécie e posterior obtenção da massa fúngica com a finalidade também de isolar metabólitos e avaliar os seus efeitos alelopáticos.

1.1.1. A espécie *Paspalum maritimum* Trin.

O presente trabalho trata do primeiro estudo químico da espécie vegetal *Paspalum maritimum* Trin., conhecida como capim-gengibre, pertencente à família Poaceae, sendo conhecida como uma espécie de planta daninha que tem por principal característica a alta capacidade de invadir áreas de pastagens cultivadas da região amazônica, com tendências para formar estandes puros, dominando, em poucos anos, tanto as espécies de plantas forrageiras como de outras plantas encontradas nas áreas, como é o caso das plantas daninhas (SOUZA FILHO, 2006b). O fato de se multiplicar tanto por sementes como por partes vegetativas e apresentar alta capacidade para vegetar em condições de solos ácidos e de baixa fertilidade natural, confere, a essa espécie, adicional vantagem competitiva em relação às outras espécies, possibilitando a sua expansão (SOUZA FILHO, 2006b).

1.1.1.1. Considerações botânicas

O Brasil é o país que hospeda o maior número de espécies de *Paspalum* (RUA, 2006). Supõe-se que cerca de 220 espécies ocorram no país, o que está de acordo com a combinação de dois fatores: a grande área territorial do Brasil e a natureza tropical de *Paspalum*. A espécie encontra-se principalmente nas fitofisionomias abertas das Américas como cerrado e campos. Outras espécies do gênero também ocorrem na caatinga, em bordas e interiores de florestas tropicais úmidas, em campos de restinga no litoral, dentre outros ambientes. A maioria das espécies é terrestre, mas há um grupo particular de espécies aquáticas (MORRONE, ZULOOGA, VEJA, 1996).

1.1.1.2.- Classificação Botânica

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Liliopsida
- Ordem: Poales
- Família: Poaceae
- Subfamília: Panicoideae
- Tribo: Paniceae
- Gênero: *Paspalum*
- Espécies: *Paspalum maritimum*

1.1.1.3- Descrição botânica de *Paspalum maritimum* Trin.

Erva perene, cespitosa, com longos rizomas. Colmo florífero 0,5 - 1,0 m comprimento, ereto e semi-prostrado, nós 2-3. Bainha foliar glabra; lígula 2,0 mm comprimento, lâmina foliar 6,0-42,0 x 0,5-1,9 cm, linear a lanceolada, aguda, não se estreitando em direção à base, glabra. Inflorescência 4-9 ramos, 2,5-10 em comprimento, alternos; inflorescência axilar presente, ráquis glabra. Espiguetas 1,8-2,0x0,9-1,0 mm, elíptica, plano-convexa, aguda, pareada, gluma superior mais curta ou igual ao antécio superior, pubescente, tricomas tuberculados, 2-4 nervada, nervuras pouco evidentes, membranácea, antécio inferior neutro, pálea ausente, lema inferior glabro, 2-3 nervado, nervuras pouco evidentes membranácea; antécio superior 1,9-2 x 0,8 -1,3 mm, elíptico, agudo, cariáceo, estramíneo, finamente papiloso (MORRONE, ZULOOGA, VEJA, 1996).

1.1.1.4- Constituintes químicos isolados da espécie *Paspalum maritimum* Trin.

Os dados que constam na literatura, não se referem ao estudo químico de *Paspalum maritimum*, sendo, portanto, pela primeira vez objeto de estudo.

1.1.1.5- Atividade biológica relatada

Souza Filho (2006b) em trabalho que foi realizado com os extratos aquosos das folhas, raízes e solo sob cultivo de *Paspalum maritimum*, detectou efeitos alelopáticos inibitórios expressivos sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento do capim-marandu (*Brachiaria brizantha*), da leguminosa forrageira puerária (*Pueraria phaseoloides*) e das plantas daninhas malícia (*Mimosa pudica*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*), o que confirmou a hipótese de que a capacidade dessa espécie em invadir e dominar áreas de cultivo pode estar associada à produção de substâncias químicas com tais propriedades.

1.2. FUNGO

Da mesma forma que as plantas são importantes para o ser humano, contribuindo para a sobrevivência da humanidade, os fungos também merecem destaque em estudo, pois são especificamente benéficos para os seres humanos, sendo usados industrialmente na produção de medicamentos, vitaminas, ácidos orgânicos, bebidas alcoólicas, e outros produtos de interesse econômico (MURRAY et al., 1992).

A partir de 1969, os fungos passaram a ser classificados como um reino a parte, lado a lado com os reinos vegetal e animal, denominado reino fungi (PELCZAR, REID, CHAN, 1981), ficando difícil definir os fungos tal é a sua diversidade. Entretanto, os mesmos possuem características em comum que os distingue dos outros seres vivos: não sintetizam clorofila, sendo, portanto, heterotróficos; necessitam de material orgânico para viver, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas que são por eles produzidas e que degradam produtos como, por exemplo, celulose e amido; não apresentam celulose na sua parede celular, exceto alguns fungos aquáticos; e não armazenam amido como substância de reserva. Os fungos são seres eucarióticos (HAVEN, RAY, EICHHORN, 1992), ou seja, possuem um núcleo típico no interior de suas células, como as leveduras ou multinucleados, como se observa em alguns fungos filamentosos ou bolores. Seu citoplasma contém mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, nutrem-se de matéria orgânica morta (fungos saprofitos). Suas células apresentam vida independente e não se reúnem para formar tecidos verdadeiros (TORTORA, FUNKE, CASE, 2005). Os fungos são formados por elementos multicelulares chamados de hifas, as quais podem ser contínuas ou cenocíticas e tabicadas ou septadas, e ao conjunto destas dá-se o nome de micélio, o qual pode funcionar como elemento de sustentação, de absorção de nutrientes ou de reprodução (PELCZAR, REID, CHAN, 1981; TRABULSI & ALTERTHUM, 2004). Reproduzem-se por via sexual ou assexual (ALEXOPOULOS & MINS, 1996).

De acordo com Araújo (2009), o reino dos fungos é um dos mais numerosos. Estima-se que existam pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhadas pelo mundo, sendo muito mais do que as espécies vegetais e animais, excluindo-se os insetos. E o mais incrível, acrescenta, apenas cerca de 70.000 espécies de fungos foram até hoje descritas, ou seja, menos de 5% das possivelmente existentes. Então, um futuro promissor ao se

trabalhar com fungos é esperado, pois, nestas espécies descritas, já existem muitas de grande importância, como as que entram na fabricação de alimentos, incluindo bebidas, de ácidos orgânicos, de fármacos e inúmeros outros produtos. Pode-se imaginar o que se espera com a descoberta de novas espécies com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico.

A utilização dos fungos é de grande interesse biotecnológico, em decorrência de que estes, dentre os seres vivos, são os que mais têm contribuído com produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar da população, e é através da biotecnologia que o seu emprego se faz presente, com a utilização de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico ou social.

Uma das maiores descobertas biotecnológicas até o presente momento foi a da penicilina. Esse metabólito fúngico, obtido através do fungo deuteromiceto *Penicillium notatum*, foi descoberto por Fleming em 1929 (CORRÊA, 2004), salvando a vida de pessoas portadoras de infecções bacterianas.

Assim, também, as perspectivas da aplicação de metabólitos secundários fúngicos como fonte de bioerbicidas são promissoras, em razão das quantidades produzidas naturalmente por plantas serem reduzidas. Sugerem a continuidade da pesquisa para fungos e bactérias que se tem verificado nos últimos anos como uma alternativa importante para a obtenção de bioerbicidas (ABBAS & BOYETTE, 1993; ABBAS & DUKE, 1995).

1.2.1- Interações entre fungos e plantas

As interações entre fungos e plantas podem ocorrer de forma benéfica, negativa ou neutra. A simbiose é a relação em que os dois organismos são beneficiados, enquanto que a relação em que um organismo invade de maneira adversa o habitat do outro, denomina-se antagonismo (REDLIN & CARRIS, 1996). Os fungos, entre os microorganismos (vírus, bactérias, fungos), considerados o segundo maior grupo de organismos no mundo após os insetos, são os que se encontram mais frequentemente associados às plantas (PINTO et al., 2000).

Os endofíticos são os fungos que vivem no interior de plantas sem causar aparentemente nenhum dano aos seus hospedeiros e podem estar presentes em todos os tecidos das plantas, podendo ser isolados centenas de endofíticos de uma mesma planta. No

entanto, o número de fungos endofíticos dominantes em uma espécie de planta varia entre 1 a 10 fungos (PETRINI et al., 1992). A localização de um fungo endofítico num dado órgão da planta ocorre de modo específico, onde esta especificidade está relacionada às condições fisiológicas do hospedeiro e aos processos de adaptação (SELOSSE & TACON, 1998). Para penetrar a planta, os fungos endofíticos precisam superar as barreiras físicas e, por sua vez, a planta responde a esta invasão com suas armas de defesa e de reconhecimento, impedindo que o fungo se espalhe pelos tecidos tornando as infecções endofíticas localizadas (PASCHOALATI et al., 1998 ; PETRINI et al., 1992).

Dados de um possível “aprendizado” conhecido por “transferência genética horizontal” entre fungos e plantas, que consiste na capacidade dos organismos associados produzirem a mesma classe de substâncias (ROHR, 1997). Como exemplo pode ser citado o fungo *Gibberella fugikuroi*, associado à planta *Cucurbita maxima*, que produz derivados do ácido giberélico (MCMILLIAN and SUTER, 1958), um diterpeno com atividade hormonal no crescimento de plantas. Várias espécies de fungos endofíticos em *Taxus brevifolia* (*Taxomyces andenea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*), produzem taxol (LI et al., 1998; STIERLE, 1995), um diterpeno com potente atividade anticancerígena.

Relatos de uma possível evidência desse “aprendizado” podem ser demonstrados com a transferência de tricodieno sintetase de fungos de gênero *Fusarium* para a planta *Nicotina tabacum*, a qual leva a planta a produzir tricodieno.

1.2.2. Gênero *Aspergillus*

Os microrganismos do gênero *Aspergillus* estão distribuídos mundialmente e são considerados os fungos filamentosos anemófilos de maior importância quanto à contaminação do ar de recintos fechados. Este gênero na forma anamorfa pertence à divisão Eucomycota, subdivisão Deuteromicotina, classe Hyphomycetes, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* e apresenta mais de cem espécies, as quais são identificadas conforme características morfológicas, sendo atualmente divididas em seis subgêneros: *Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes* e *Circumdati*, com uma ou mais seções (ABARCA, 2000; KLICH, 2002).

Todas as espécies de *Aspergillus* formam colônias filamentosas de diferentes características que, microscopicamente, apresentam hifas septadas de aproximadamente 4 µm de diâmetro, e estruturas de frutificação típica formadas por célula-pé, conidióforo, vesícula,

métula e/ou fiálide que promovem a reprodução assexuada do fungo através da produção de fialoconídios. Algumas espécies de *Aspergillus* apresentam a forma sexuada caracterizada pela presença de cleistotécios, ascos e ascósporos. Nestes casos, o fungo é classificado como teleomorfo e pertencente a um dos oito gêneros *Emericella*, *Eurotium*, *Chaetosartorya*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Hemicarpenales*, *Sclerocleista* ou *Fennellia* (RAPER & FENNELL, 1965).

Cerca de 20 espécies do gênero *Aspergillus* são consideradas patogênicas, com capacidade de causar a aspergilose, doença frequentemente associada à alta mortalidade de pinguins e outras aves marinhas em cativeiro. Esta micose geralmente é adquirida por inalação dos propágulos fúngicos presentes no ambiente, podendo caracterizar uma infecção nosocomial (AINSWORTH & REWELL, 1949; LAIR-FULLERINGER et al., 2003; MARTINEZ et al., 2000). A suscetibilidade das aves a esta micose é determinada, principalmente, por peculiaridades do seu trato respiratório, como ausência de diafragma e presença de sacos aéreos que proporcionam um excelente local de colonização fúngica, com ótimas condições de temperatura e oxigênio e pouca vascularização (TELL, 2005).

Em outro aspecto, o gênero *Aspergillus* é bastante conhecido na literatura devido à produção de aflatoxinas em grãos, principalmente no amendoim. As aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos (bolors). Essas micotoxinas podem ser produzidas por três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que proliferam em diversos substratos (sementes, cereais, alimentos e rações) e acarretam, quase sempre, graves danos à saúde do homem e dos animais.

As aflatoxinas foram descobertas após o acidente econômico ocorrido na Inglaterra em 1960 quando, em poucas semanas, cem mil filhotes de perus e outros milhares de filhotes de outros tipos de aves pereceram de hepatite aguda necrosante após a ingestão de ração à base de amendoim. Posteriormente, as aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) foram identificadas por apresentar uma intensa fluorescência quando expostas à luz ultravioleta (366 nm), devido ao anel furocumarínico (Figura 3) e pela análise de espectroscopia de massas. Muitos produtos agrícolas em geral, e o amendoim, em particular, são viáveis de sofrer infestação por fungos toxigênicos e, conseqüentemente, estar contaminados com aflatoxinas.

A razão da alta ocorrência de aflatoxinas é alta em amendoim em relação a outros produtos agrícolas não foi completamente estabelecida. Entretanto, ela pode ser atribuída ao fato de que *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* dominam na micoflora em solos de

plântio do amendoim. Nesse contexto, a aflatoxicose tornou-se um problema mundial. A prevalência de aflatoxinas em alimentos e rações é relativamente alta nas regiões tropical e subtropical; por isso, a Organização Mundial da Saúde recomenda um controle sistemático dos níveis de aflatoxinas na dieta dessas populações (GOLDBLATT, 1977; NRIAGU & SIMMONS, 1990; DIENER et al, 1982).

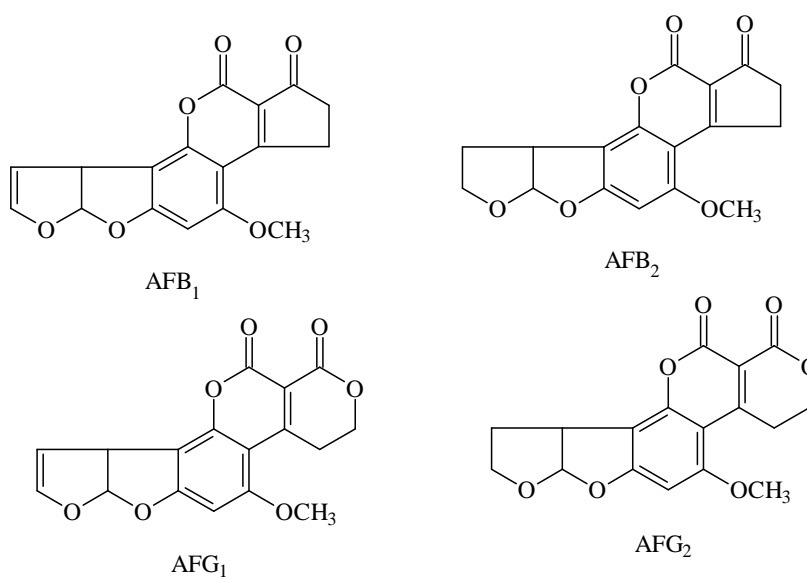


Figura 3- Estruturas químicas das principais aflatoxinas.

1.3- SÍNTESES

1.3.1- Reações de sínteses

A partir da síntese orgânica pode-se buscar o caminho para a construção de novas moléculas, independentemente do seu grau de complexidade estrutural, empregando-se os conceitos fundamentais que regem o comportamento químico dos diferentes grupos funcionais, sendo capaz, inclusive, de se ordenar hierarquicamente esta reatividade, de maneira a introduzir níveis de seletividade comparáveis aos efetuados na natureza pelas enzimas. A busca por moléculas bioativas, extraídas principalmente de fontes naturais (extratos de plantas ou produzidas na biomassa de microorganismos) tem levado a descoberta de muitas drogas usadas clinicamente (HARDMAN et al., 1996). Um dos caminhos para obter quantidades maiores e a diversificação do esqueleto estrutural, pode ser a síntese de produtos naturais, como pode ser exemplificado pelo diterpeno anticancerígeno, taxol, isolado do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se em grande esperança para pessoas portadoras de câncer de ovários e pulmões. O resultado é que ocorreu diminuição do custo e aumento da oferta (STIERLE et al., 1995).

1.3.2- Sínteses de chalconas

A condensação aldólica é uma reação utilizada na formação de ligação carbono-carbono, sendo que a reação entre aldeídos e cetonas em presença de solução básica fornece cetonas α - β -insaturada, também chamada condensação de Claisen-Schmidt. Apesar da condensação entre dois aldeídos diferentes ser possível, é frequentemente impraticável, uma vez que, haverá condensação cruzada e autocondensação. Assim em uma condensação aldólica mista, há quatro possíveis produtos, sendo neste caso de uso limitado. Entretanto, quando um dos dois compostos carbonilados não possui hidrogênios- α , não podendo formar íons enólicos, e o outro composto carbonilado (cetona ou aldeído) possui uma carbonila pouco reativa frente às reações de adições (para impedir a autocondensação), as condensações aldólicas mistas podem funcionar muito bem. A condensação aldólica também oferece caminho conveniente para a síntese de substâncias com anéis de cinco ou seis carbonos, o que

se consegue pela condensação aldólica intramolecular de um aldeído, di-cetona ou ceto-aldeído. Vários são os catalisadores utilizados para a promoção dessas reações, como as hidrotalcitas de Al-Mg (CLIMENT et al., 2004), hidróxido de bário (IGLESIAS et al., 1987), hidróxido de lítio (BHAGAT et al., 2006) e na ausência de solvente, água ou álcool (PALLEROS, 2004) ou com o uso de ultrasom (CALVINO, 2005).

Neste trabalho foram sintetizadas quatro chalconas (**S1**, **S2**, **S3**, e **S4**) e um derivado α,β -insaturado (**S5**) para serem utilizadas como substratos nas reações de biotransformações promovidas pelo fungo *Aspergillus flavus* sendo que também as chalconas **S2** e **S3** foram usadas em reações de hidrogenação para que houvesse a comparação dos produtos obtidos por reações de hidrogenação e biorredução.

O esquema da Figura 4 exemplifica o mecanismo geral de reação de condensação aldólica.

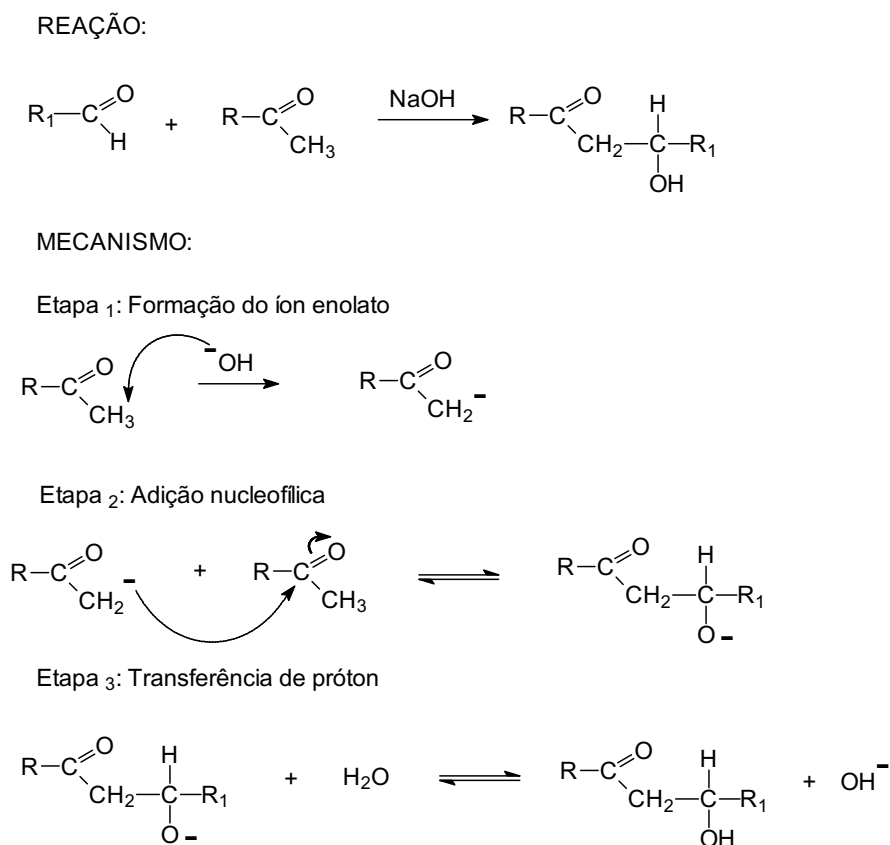


Figura 4- Mecanismo geral da reação de condensação aldólica.

1.3.3- Reações de hidrogenação

O processo unitário hidrogenação refere-se à adição de hidrogênio molecular (H_2) na presença de um catalisador a um composto orgânico. Se as moléculas são clivadas por hidrogênio, a reação é chamada de **hidrogenólise**. Reações como **isomerização**, **ciclização** e outras que ocorrem na presença de hidrogênio molecular e catalisadores também são consideradas reações de **hidrogenação**. São usadas na produção de compostos orgânicos leves e pesados. A adição de hidrogênio também é utilizado em vários processos de purificação, tais como: redução seletiva de traços de acetileno na produção de eteno e de traços de butadieno em buteno, remoção de oxigênio ou monóxido de carbono em misturas gasosas.

As reações de hidrogenação podem ser realizadas de diversas maneiras. Métodos de redução, além da hidrogenação catalítica, também são utilizados:

- Metais em soluções ácidas ou básicas;
- Metais alcalinos em solução alcoólica;
- Eletrólise;
- Metais alcalinos e hidrazina;
- Complexos de hidretos metálicos;
- Transferência de hidrogênio.

Algumas hidrogenações, por exemplo, de óleos e gorduras naturais para obtenção de óleos comestíveis e não comestíveis, são praticadas há muitos anos. Entretanto, hidrogenações industriais tiveram grande desenvolvimento nas últimas décadas. Há um grande número de grupos funcionais que são transformados industrialmente através de redução catalítica por hidrogênio sob condições suaves e na maioria das vezes com alta quimio-regio-estereoseletividade.

As aplicações industriais de hidrogenações mais importantes estão vinculadas às indústrias do petróleo. Nestas, como exemplos, encontram-se as obtenções de intermediários químicos, monômeros e solventes orgânicos. Na chamada indústria graxa, onde são encontrados processos de hidrogenação para obtenção de compostos graxos com diversas aplicações, entre as quais a obtenção de gorduras, vegetal e animal, para aplicações nas áreas alimentícias, detergentes industriais, lubrificantes, cosméticos (BARCZA, 2009).

1.4. BIOTRANSFORMAÇÕES

As biotransformações podem ser consideradas como reações de compostos orgânicos catalizadas pelas enzimas que se apresentam isolada ou no interior dos microorganismos. A molécula de uma determinada substância orgânica pode ser modificada através de uma reação específica, acompanhada ou não de clivagem na cadeia carbônica, portanto, a transformação microbiológica de substâncias naturais e sintéticas, como cetonas aromáticas e as chalconas, que serão utilizadas como substratos neste trabalho, oferecem novos horizontes para modificações estruturais destinadas ao atendimento de diversos objetivos, desde introdução de grupos funcionais a rearranjos moleculares. Estas biotransformações podem ser programadas para a obtenção de produtos com maior e melhor potencial de atividade biológica, além de oferecer a oportunidade de preparação de substâncias com menor ação em efeitos colaterais indesejáveis (GIRI & NARASU, 2000).

As enzimas em sua maioria são proteínas formadas a partir de 20 aminoácidos, cuja sequência e arranjo tridimensional determinam a função bioquímica dessas biomoléculas. A ação enzimática de uma proteína está sempre associada a um sítio ativo, área na superfície da enzima na qual o substrato se encaixa através de forças intermoleculares, conferindo a essa proteína uma especificidade catalítica.

O substrato, que é o composto-alvo da enzima, é convertido em um outro composto denominado produto. A enzima e o substrato combinam-se formando um “complexo enzima-substrato”, que se dissocia formando o produto, conforme representado no Esquema da Figura 5 (FERSHT, 1998):

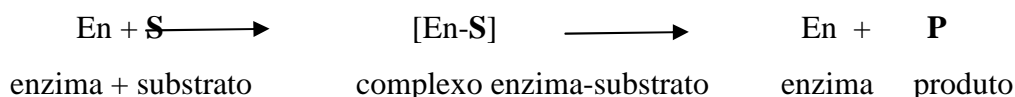


Figura 5- Representação geral da reação de biotransformação.

1.4.1- Vantagens da utilização de enzimas

A utilização das enzimas nas biotransformações para a obtenção de derivados, decorre de algumas vantagens, dentre as quais (FABER, 1997):

- São catalisadores muito eficientes;
- São ambientalmente aceitáveis (degradáveis);
- Trabalham em condições reacionais suaves;
- Possuem uma alta tolerância aos substratos;
- Podem catalisar diferentes reações químicas.

1.4.2- Classificação das enzimas

As enzimas são classificadas de acordo com as reações químicas que catalisam, conforme Tabela 1 apresentada abaixo:

Tabela 1- Classificação das enzimas (FERSHT, 1998)

CLASSES DE ENZIMA	TIPO DE REAÇÃO
-Óxido-redutases	-Reações de transferência de elétrons
-Transferases	-Transferência de grupos funcionais
-Hidrolases	-Reação de hidrólise
-Liasas	-Adição de grupos a ligações duplas e vice-versa
-Isomerase	-Reações de isomerização
-Ligases	-Formação de ligação em clivagem de ATP

Segundo Leadlay (1993) e Patel (1997), alguns biocatalisadores podem realizar reações difíceis de se obterem por métodos tradicionais em Química Orgânica, tornando-os recomendáveis na síntese de compostos enantiomericamente puros. Isto decorre principalmente, a aspectos de seletividade das reações enantioméricas, à fatores como:

▪ Quimiosseletividade:

Algumas enzimas podem reagir com um único grupo funcional, mesmo na presença de outros grupos químicos reativos. Resulta em produtos mais “limpos”, facilitando o processo de purificação.

▪ Regiosseletividade:

Em decorrência de sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula (substrato).

▪ Enantiosseletividade:

A maioria as enzimas são formadas de L-amino-ácidos, portanto, são catalisadores quirais, assim, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é “reconhecida” na formação do complexo enzima-substrato. Portanto, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo, e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico podem reagir a velocidades diferentes.

1.5. ALELOPATIA

O termo alelopatia deriva das palavras gregas *alleton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) e foi primeiramente usado por Molish em 1937, sendo durante algum tempo interpretado de várias maneiras. Alguns autores conferem uma atividade mais ampla ao termo e consideram a alelopatia como todas as interferências entre seres vivos provocadas por substâncias químicas por eles elaboradas quer ocorram ou não no reino vegetal, incluindo ainda insetos e herbívoros (ALMEIDA, 1988). Em 1996 a definição de alelopatia foi ampliada, segundo a IAS (International Allelopathy Society) e diz respeito aos processos que envolvem a produção de metabólitos secundários por plantas, microorganismos, vírus e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos.

As substâncias alelopáticas também são denominadas aleloquímicos ou produtos secundários. Dentre os diversos seres é nas plantas que estes se concentram com maior frequência, independente de células específicas ou órgãos. A produção não é cumulativa e sofre influência de fatores edáficos, climáticos e de sanidade. O objetivo da formação destes compostos nas plantas ainda não é bem determinado, mas sabe-se que obedecem as leis da genética e são produzidos com finalidades específicas como defesos, talvez devido à imobilidade, prevenção da decomposição das sementes, interferência na dormência de sementes e gemas. Os principais grupos de aleloquímicos são os gases tóxicos, ácidos orgânicos e aldeídos, ácidos aromáticos, lactonas simples insaturadas, terpenóides e esteróis, quinonas, flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas e outros. A liberação destas substâncias pode ser por volatilização, exsudação radicular ou lixiviação através da água da chuva ou orvalho, de partes vivas ou mortas de plantas (ALMEIDA, 1988).

Os aleloquímicos podem ser interessantes do ponto de vista da pesquisa de substâncias com características de herbicidas naturais com alta especificidade para plantas daninhas em áreas de pastagens cultivadas da Região Amazônica.

1.5.1. Importância da Alelopatia na Agricultura e Pecuária

O Brasil apresenta uma rica e vasta biodiversidade, representada por plantas e microorganismos, a qual é uma fonte inestimável de metabólitos secundários. De acordo com informações recentes, a região amazônica dentro deste contexto, possui potencial enorme a ser explorado, principalmente em fármacos e bioerbicidas.

Com o crescimento populacional, torna-se primordial o desenvolvimento da agricultura e pecuária, para a obtenção de alimentos em escala cada vez maior. É fundamental que essa atividade seja desenvolvida sem comprometer a qualidade dos recursos naturais, em decorrência de que na região amazônica, alguns métodos e práticas empregados ainda são rudimentares, como, por exemplo, as queimadas e a roçagem e, mais recentemente os métodos químicos, os quais utilizam herbicidas sintéticos. A implicação é que esses métodos mostraram-se pouco eficientes em médio prazo, devido aos custos elevados, além de causar grande impacto ambiental.

Um dos fatores mais importantes para o sucesso da atividade pecuária é a qualidade das pastagens, a qual é, muitas vezes, afetada em consequência da ocorrência de plantas daninhas, principalmente aquelas que são tóxicas aos animais. Tais plantas concorrem com as forrageiras em termos de luz, água, nutrientes e espaço físico, arranham os animais, desvalorizando o couro (CARVALHO & PITELLI, 1992). Segundo Muzik (1970), as plantas invasoras causam mais perdas e danos à agricultura do que as pragas e doenças das plantas cultivadas, e se constituem na maior barreira para o desenvolvimento econômico de muitas regiões do mundo.

Na nossa região, os métodos ultrapassados já citados anteriormente, geram efeitos momentâneos e, em pouco tempo, a pastagem está novamente infestada de plantas invasoras que se originam das sementes que foram produzidas pelas espécies existentes ou então introduzidas (via animais, pássaros, ventos e outros agentes), passando a compor o banco de sementes; ou ainda, pelas espécies que rebrotam após a imposição dos métodos de controle. Esse aspecto obriga o produtor a repetir sistematicamente o processo, elevando o custo de manutenção da pastagem. Entretanto, há determinados casos que o grau de infestação atinge níveis tão elevados que o controle das invasoras se torna inviável sob o ponto de vista bioeconômico, levando o produtor a abandonar a pastagem e derrubar novas áreas de

florestas, passando a praticar uma pecuária itinerante, causando problemas de ordem ecológica e insatisfações de ordem social.

Uma vez estabelecidas em um ecossistema, a erradicação de plantas daninhas torna-se uma tarefa árdua e onerosa. Assim, todas as alternativas deverão ser consideradas quando do estabelecimento de estratégias de controle dessas plantas, e nenhum método deverá ser pensado isoladamente como a única solução. Métodos preventivos, cultural, químico e biológico, entre outros, devem ser considerados (EMBRAPA, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Conduzir o estudo químico de *Paspalum maritimum* Trin., assim como, isolar e identificar os fungos endofíticos associados a esta espécie e a partir da biomassa fúngica obtida, investigar a produção e o acúmulo de substâncias de interesse, buscando a obtenção de moléculas bioativas, realizar reações de biotransformações e hidrogenação.

2.2 ESPECÍFICOS

- ▶ Isolar e identificar metabólitos secundários das folhas da espécie *P. maritimum*;
- ▶ Isolar e identificar os fungos endofíticos a partir de folhas, raízes e colmos jovens de *P. maritimum*;
- ▶ Determinar qual o melhor meio de cultura para se obter biomassa fúngica de *Aspergillus flavus*;
- ▶ Isolar e identificar constituintes químicos presentes nos extratos fúngicos;
- ▶ Avaliar a habilidade do fungo *Aspergillus flavus* isolado das folhas de *P. maritimum*, em modificar quimicamente chalconas cetonas aromáticas;
- ▶ Avaliar o potencial alelopático do constituinte químico isolado da planta, e dos extratos fúngicos.

3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

3.1- MATERIAIS

3.1.1- Equipamentos

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Modelo Mercury 300- Varian. 75 MHz (RMN ^{13}C) e 300 MHz (RMN ^1H).
- Evaporador rotativo – MICRONAL.
- Autoclave vertical- Modelo Au 75 PHOENIX.
- Capela de fluxo laminar- Modelo PA 320 PACHANE.
- Câmara de UV da marca Prodicil (365 e 254 nm).
- Espectrômetro de massas- CG-MS, Modelo DSQII, IE (70 ev).

3.1.2- Solventes

- Utilizados nas separações, purificações e recristalizações: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol, dimetilsulfóxido e piridina (Synth, Quimex, Nuclear e Cinética Química).
- Utilizados na obtenção dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C : CDCl_3 , CD_3OD , piridina- d_5 e $\text{DMSO}-d_6$ (Synth e Quimex)

3.1.3- Substratos utilizados para o cultivo em meio sólido

- Arroz “Uncle Beans”

3.1.4- Substratos utilizados para o cultivo em meio líquido

NaNO_3	Glucose
K_2HPO_4	Extrato de levedura
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Dextrose
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Extrato Sabraud
Água destilada	

3.1.5- Reagentes utilizados na síntese de chalconas e reação de hidrogenação

- NaOH 10%
- Acetona
- Acetofenona
- Benzaldeído
- H₂SO₄
- Cicloexanona
- 3,4,5-trimetoxibenzaldeído
- 2,3,4-trimetoxibenzaldeído
- Limalha de ferro

3.1.6- Técnicas cromatográficas

- Cromatografia em coluna (CC): foram empregadas colunas de vidro com diâmetro e altura conforme a massa da amostra e cerca de 20 g de sílica gel 60G (70-230 e 230-440 mesh, Merck e Fluka) por grama da amostra.
- Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC): foram usadas placas de vidro de 5x10 ou 10x20 cm, revestidas camadas de sílica gel 60G (sílica gel 60G-Merck) de 0,30 mm de espessura; na revelação das placas cromatográficas comparativas foram utilizadas soluções de sulfato cérico a 1% em ácido sulfúrico, solução metanol/ ácido sulfúrico 1:1, e/ ou câmara de iodo sublimado.

3.1.7- Substratos utilizados nas biotransformações

- ▶ Chalconas (**S1**, **S2**, **S3** e **S4**) e um derivado de uma cetona aromática α,β -insaturada (**S5**)

Foram sintetizadas as chalconas **S1**, **S2**, **S3**, **S4** e o derivado **S5** no Laboratório de Síntese de Química da UFPA, para serem utilizadas nas reações de redução (**S2** e **S3**) e reações de biorreduções (*Aspergillus flavus*), sob a orientação do Prof. Dr. Heriberto R. Bitencourt.

- ▶ Cetonas aromáticas

As cetonas aromáticas (acetofenona e 4-nitro-acetofenona) foram adquiridas comercialmente (*Fluka* e *ALDRICH*, respectivamente).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Estudo químico da espécie *Paspalum maritimum* Trin.

3.2.1.1. Coleta e Identificação do Material Botânico

As folhas de *Paspalum maritimum* foram coletadas na cidade de Belém, Estado do Pará, no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental e identificada pelo Dr. Joaquim Ivanir Gomes, pesquisador da Instituição, estando uma exsicata depositada no herbário da Instituição, sob registro de número IAN 183337. Por ocasião da coleta as plantas não estavam florando ou produzindo sementes. Foram coletados 8,0 Kg de material vegetal.

3.2.1.2. Obtenção dos Extratos Brutos

2,5 Kg de folhas secas e trituradas de *Paspalum maritimum* foram submetidas à extração sequencial exaustiva com hexano, acetato de etila e metanol, à temperatura ambiente. As soluções obtidas foram concentradas a vácuo, em evaporador rotativo. A Figura 6 (p. 49) apresenta o fluxograma do procedimento.

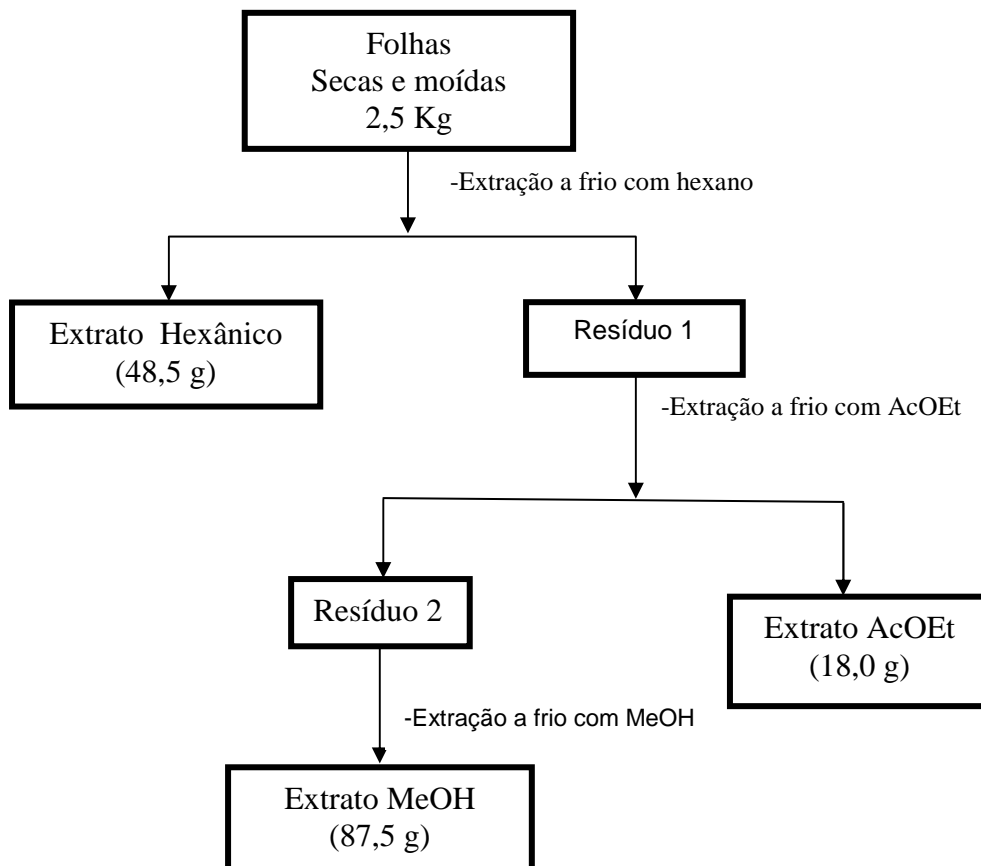


Figura 6- Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das folhas de *Paspalum maritimum* Trin.

3.2.1.3. Isolamento dos constituintes químicos do extrato hexânico de *Paspalum maritimum*

Parte do extrato hexânico bruto (8,50 g) foi submetido ao fracionamento em coluna via úmida (CCVU), sobre sílica-gel (70-230 mesh, proporção de 1:20 de amostra/sílica), utilizando-se como eluentes solventes puros ou misturas dos solventes hexano, acetato de etila e metanol em gradientes de polaridades crescentes, resultando em 78 frações, as quais foram concentradas, monitoradas e analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reunidas, quando necessário (Figura 7, p. 50). A fração 26 (Hex/AcOEt 10%) apresentou-se como cristais incolores, identificados como **S6** (13,2 mg). Da fração 33 (Hex/AcOEt 15%) foram obtidas as substâncias **S7** e **S8** (18,1 mg) e das frações 37 a 39 (Hex:AcOEt 20%), uma mistura de substâncias **S8** + **S9** (33,5 mg).

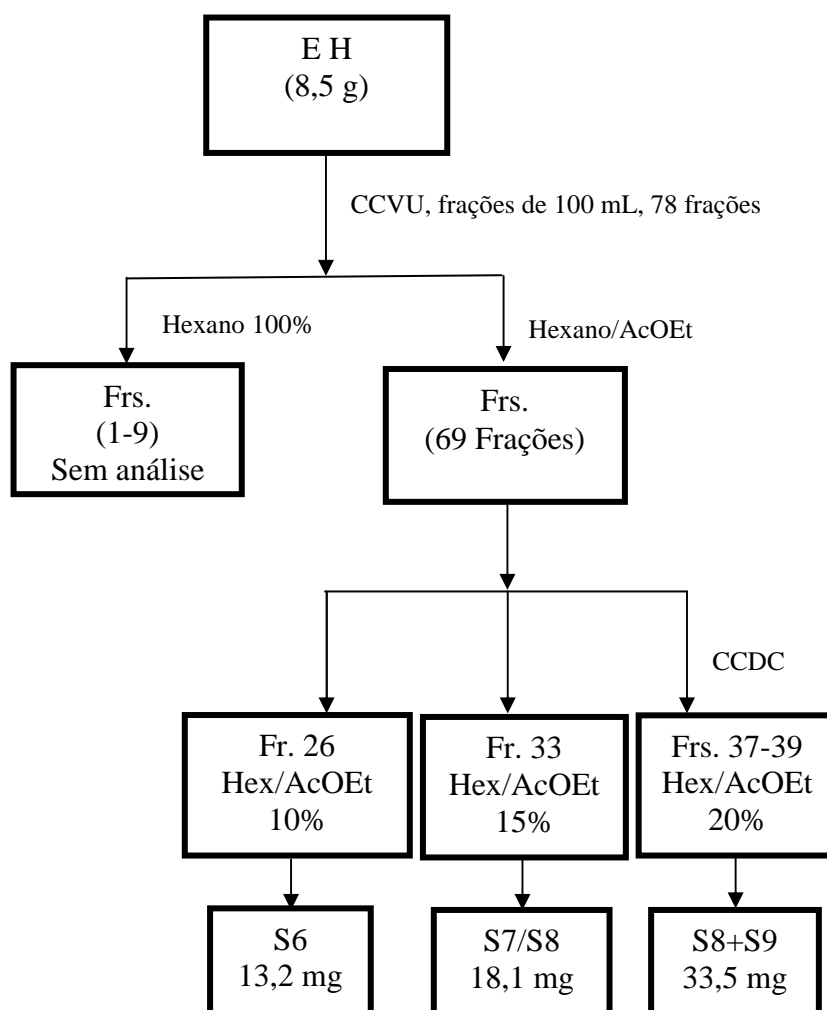


Figura 7- Fracionamento do Extrato Hexânico (E-H).

3.2.1.4. Isolamento dos Constituintes Químicos do Extrato Acetato de Etila de *Paspalum maritimum*

Parte do extrato acetato de etila (3,5g) foi submetido ao fracionamento em coluna via úmida (CCVU), utilizando-se como eluentes solventes puros ou misturas dos solventes hexano, acetato de etila e metanol em gradientes de polaridades crescentes, resultando em 62 frações, as quais foram concentradas, monitoradas e analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reunidas, quando necessário (Figura 8). As frações 25 a 30 (Hex:AcOEt 15%) foram reunidas após análise em CCDC, sendo identificadas como uma mistura de substâncias **S8** + **S9** (13,4 mg) já isoladas anteriormente no extrato hexânico, e as

frações 42 a 45 (AcOEt/MeOH 5%) foram reunidas e submetidas também a análise em CCDC e RMN. Após a análise mostrou-se pura, sendo denominada **S-10** (5,7 mg).

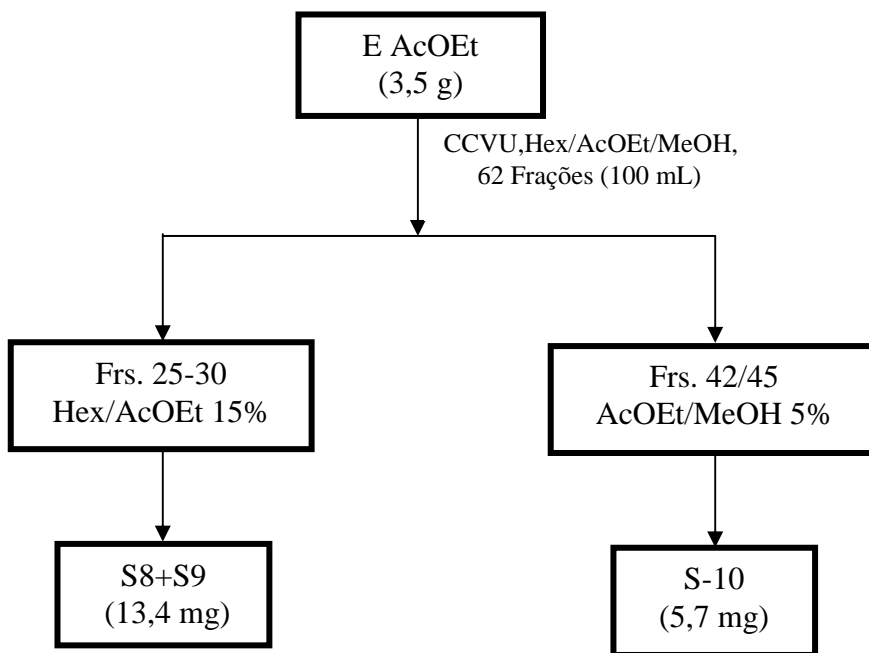


Figura 8- Fracionamento do Extrato Acetato de Etila (E-AcOEt).

3.2.1.5. Isolamento dos Constituintes Químicos do Extrato Metanólico Bruto de *Paspalum maritimum*.

Parte do extrato metanólico bruto (17,5 g) foi submetido ao fracionamento em coluna via úmida (CCVU), utilizando-se misturas de: hexano, acetato de etila e metanol em gradientes de polaridades crescentes como eluentes, resultando em 76 frações, as quais foram concentradas, monitoradas e analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reunidas, quando necessário (Figura 9, p. 52). As frações 27 a 32 (Hex:AcOEt 15%) foram reunidas após análise em CCDC, sendo identificadas como uma mistura de substâncias **S8+S9** (4,3 mg), já isoladas anteriormente no extrato hexânico e no extrato acetato de etila, e as frações 28 a 31 (AcOEt/MeOH 10%) foram reunidas e submetidas também à análise em CCDC, indicando trata-se da substância **S10** (102,4 mg), a qual já tinha sido isolada em pequena quantidade também no extrato acetato de etila.

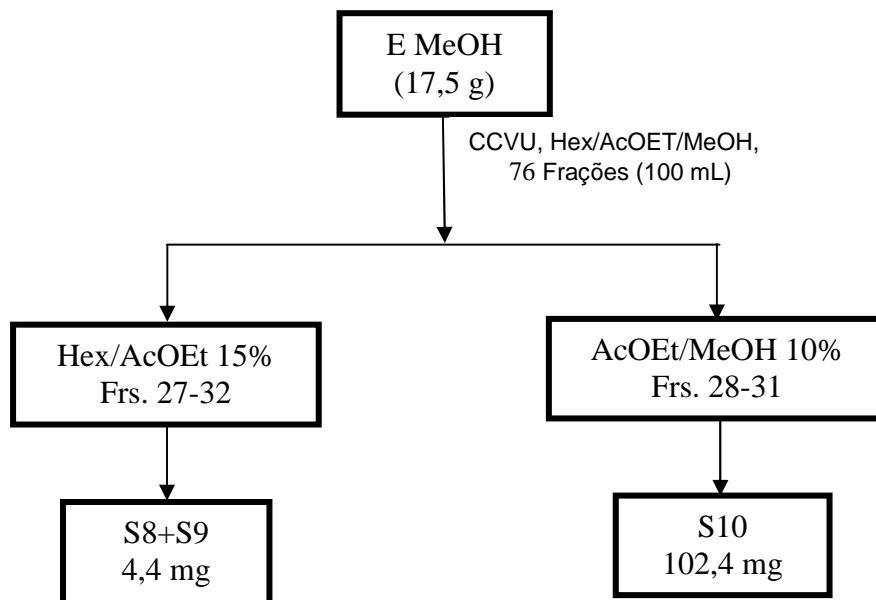


Figura 9- Fracionamento do Extrato Metanólico (E MeOH).

3.3. ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A *P. Maritimum*

3.3.1- Esterilização do material vegetal e isolamento dos endofíticos

O material botânico coletado foi processado dentro de duas horas, após a coleta, tendo sido lavado abundantemente com água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epifíticos. Em seguida, em câmara asséptica, o material foi imerso em álcool 70% por 1 minuto, em seguida em hipoclorito de sódio a 3% por 4 minutos e, novamente, em álcool 70% por 30 s, para retirar o excesso de hipoclorito. Finalmente em água destilada estéril que foi usada para fazer o controle da assepsia.

Após a assepsia, cinco pequenos fragmentos de folhas, rizomas e raízes foram plaqueados em meios de extrato de malte e Sabouraud, acrescido de clorofenicol (1mg/mL) para inibir o crescimento bacteriano no decorrer do processo de isolamento dos fungos endofíticos. As placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo os fragmentos foram incubadas a 25°C, sendo que o material vegetal foi distribuído em triplicatas nas placas, contendo cada uma cinco fragmentos de material vegetal. A partir do sétimo dia de incubação, pequenos fragmentos dos meios com hifas dos fungos recém-desenvolvidos foram transferidos para outras placas contendo os meios de extrato malte e sabouraud. Após a transferência dos endofíticos, a purificação dos mesmos foi feita pela técnica de repiques sucessivos. Os endofíticos isolados foram conservados em triplicata (H₂O estéril) conforme a metodologia descrita na literatura (CASTELLANI, 1939). A linhagem do fungo FEFLPM3D1 (Tabela 2, p. 54), selecionado para ser objeto de pesquisa neste trabalho encontra-se nas fotografias da Figura 10.



FEFLPM3D1- Frente



FEFLPM3D1-Verso

Figura 10- Fotografias frente e verso da linhagem do fungo FEFLPM3D1.

Segundo a metodologia descrita foram isoladas das folhas, rizomas e raízes de *Paspalum maritimum* sete espécies fúngicas (Tabela 2), das quais uma linhagem foi selecionada para estudo codificada como FEFLPM3D1 e com posterior obtenção de suas biomassas para realização de estudo químico e alelopático. Não houve crescimento de colônias na placa controle, indicando que a assepsia foi correta.

Tabela 2- Endofíticos isolados de *Paspalum maritimum*

PARTE DA PLANTA	ISOLADOS
FOLHAS	FEFLPM3A2 FEFLPM3B2 FEFLPM3D1
RAÍZES	FERZPM3B2 FERZPM3C2 FERZPM3D2
RIZOMAS	FECPM3A2

FEFFLPM: fungo endofítico das folhas de *P. maritimum*, FERZPM: fungo endofítico das raízes de *P. maritimum*, FERMPM: fungo endofítico do rizoma de *P. maritimum*. As letras em maiúsculas representam as placas de petri de origem.

3.3.2. Cultivo em meio líquido (Czapek).

Para o cultivo em meio líquido, Czapek (Tabela 3, p. 55), enriquecido com 2 % de extrato de levedura, foram utilizados 36 erlenmeyers de 1 L contendo com 300 mL do meio de cultivo, aos quais, após autoclavagem por 15 minutos a 121⁰C , foram introduzido três pequenos discos do fungo FEFLPM3D1 (*Aspergillus flavus*). O material foi incubado a 28 °C durante trinta dias, modo estático.

Tabela 3: Meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura.

REAGENTES	QUANTIDADES
NaNO ₃	3,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Glicose	30 g
Extrato de levedura	20 g
H ₂ O	qsp 1L

Após os 30 dias de incubação do fungo FEFLPM3D1 (*Aspergillus flavus*) no meio Czapek, foram obtidos dois materiais por filtração (o micélio e o filtrado), utilizando-se algodão como filtro.

3.3.2.1. Extrato micelial

Ao micélio foi adicionado metanol. O sistema micélio + metanol foi mantido em repouso por um período de cinco horas, para que o metanol, destruísse os esporos, evitando-se o risco de contaminação durante o manuseio. Após as cinco horas, esse sistema foi submetido a uma filtração. Em seguida a solução metanólica foi concentrada sob pressão reduzida, levando à obtenção do extrato metanólico do micélio (EMeOH-1). Em seguida, o micélio foi seco em estufa a uma temperatura de 45 °C.

3.3.2.2. Extrato do filtrado

O filtrado obtido após 30 dias de incubação foi submetido à partição líquido-líquido com 300 mL de acetato de etila, três vezes na proporção de 1:1. A fase acetato de etila foi concentrada para a obtenção do extrato acetato de etila. Os procedimentos descritos nos dois itens acima são representados na Figura 11 (p. 56).

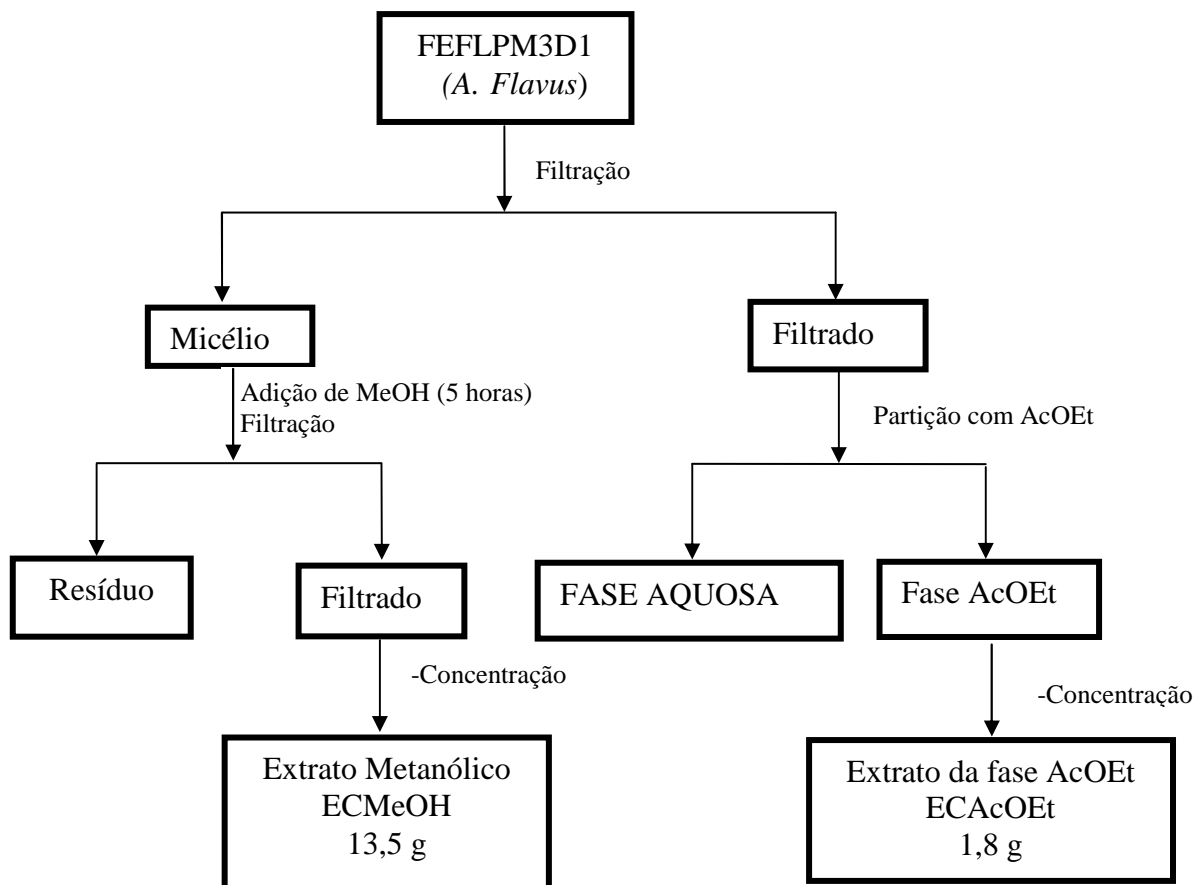


FIGURA 11- Extratos do fungo FEFLPM3D1 (*A. flavus*), a partir do cultivo em meio líquido (Czapek).

3.3.3- Cultivo em meio sólido (Arroz)

O cultivo em meio sólido foi feito em arroz (Uncle Beans). Foram utilizados 4,0 Kg do cereal, que foram distribuídos uniformemente em 40 erlenmeyer de 500 mL de capacidade, ou seja, 100 g de cereal a cada erlenmeyer, em seguida foram adicionados 30 mL de água destilada e autoclavou-se este conjunto por 45 minutos à temperatura de 121⁰C. Deixou-se o material atingir a temperatura ambiente e introduziu-se o fungo nos erlenmeyer, os quais foram incubados a 25 °C por 30 dias.

Após o período de incubação, foi acrescentado metanol aos erlenmeyer com o mesmo objetivo já descrito no item 3.2.2.1. Transcorrido o período de cinco horas, o conjunto foi submetido à filtração, utilizando-se algodão como filtro, em seguida o filtrado foi concentrado para a obtenção do extrato EAMeOH-1. Após a filtração, o cereal+ fungo foi seco em estufa a

45 °C por 4 horas, e em seguida submetido a extração por percloração com hexano, acetato de etila e metanol (Figura 12).

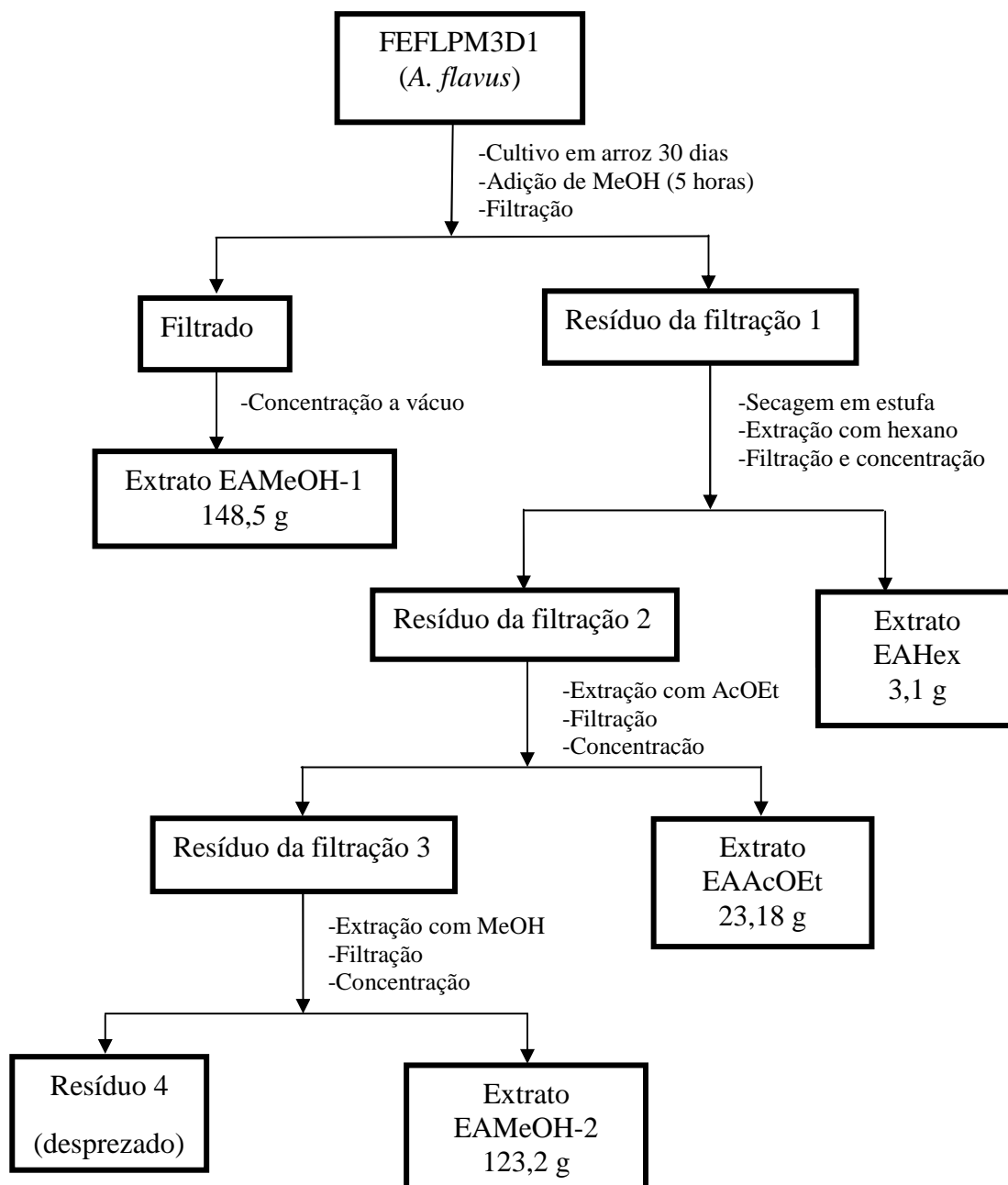


FIGURA 12- Obtenção dos extratos do fungo FEFLPM3D1 (*Aspergillus flavus*), a partir do cultivo em meio sólido (arroz).

3.3.3.1- Fracionamento dos extratos fúngicos ECAcOEt e ECMeOH obtidos em meio líquido (Czapek)

No estudo químico dos extratos obtidos a partir da biomassa produzida por FEFL3D1 (*Aspergillus flavus*) em meio líquido (Czapek) foram identificadas quatro substâncias, as substâncias **S11** e **S12** em mistura, substância **S13** como cristais amarelos e a substância **S14** como cristais incolores na forma de agulhas.

3.3.3.2- Fracionamento dos extratos fúngicos EAAcOEt, EAMeOH-1 e EAMeOH-2 obtidos em meio sólido (Arroz)

No estudo químico dos extratos obtidos a partir da biomassa produzida por FEFL3D1 (*Aspergillus flavus*) em meio sólido foram identificadas as quatro substâncias já identificadas nos extrato fúngicos em meio líquido. As substâncias **S11** e **S12** em mistura, substância **S13** como cristais amarelos e a substância **S14** como cristais incolores na forma de agulhas.

3.4. SÍNTESES DAS CHALCONAS

3.4.1- Procedimento geral para obtenção das chalconas

Em balão de fundo chato e boca esmerilhada (125 mL), colocado em banho de gelo, foram adicionados na seqüência: o solvente (15 mL; EtOH ou MeOH), a cetona (10mmol), o catalisador (15 mL de solução de NaOH 10%) e o aldeído (11 mmol, excesso de 10%). A mistura de reação foi mantida em agitação magnética à 40 °C por 40 minutos. Posteriormente, foi resfriada e deixada em freezer durante 48h. Após esse período foi feita uma filtração a vácuo. O produto obtido foi recristalizado em metanol.

3.4.1.1. Chalcona **S1**: (2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona

A substância **S1** (Figura 13) foi sintetizada utilizando acetofenona (10 mmol) e benzaldeído (11 mmol), como materiais de partida.

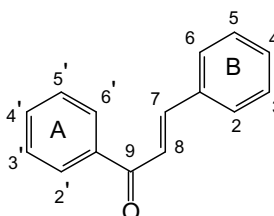


Figura 13- (2E)-1,3-difenilprop-en-1-ona (**S1**)

3.4.1.2. Chalcona **S2**: (2E)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona

A substância **S2** (Figura 14) foi sintetizada utilizando acetofenona (11 mmol) e 3,4,5-trimetoxibenzaldeído (12 mmol), como materiais de partida.

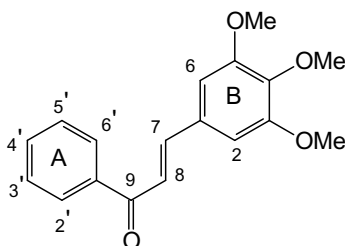


Figura 14- (2E)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**S2**)

3.4.1.3. Chalcona **S3**: (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona.

A substância **S3** (Figura 15) foi sintetizada utilizando 4-metoxi-acetofenona (11 mmol) e 2,3,4-trimetoxibenzaldeído (12 mmol), como materiais de partida.

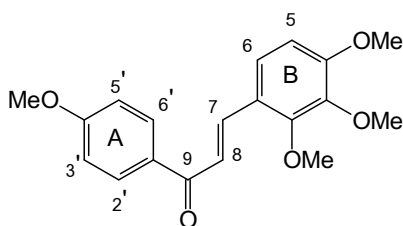


Figura 15- (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**S3**)

*A numeração utilizada é usual para chalconas.

3.4.1.4. Chalcona **S4**: (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona.

A substância **S4** (Figura 16) foi sintetizada utilizando 4-metoxi-acetofenona (11 mmol) e 3,4,5-trimetoxibenzaldeído (12 mmol), como materiais de partida.

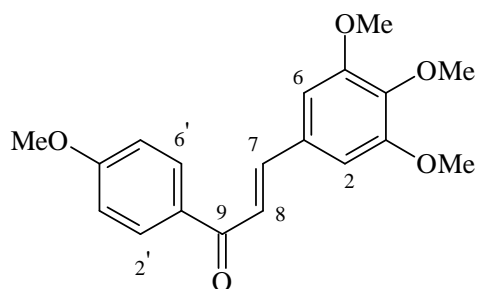


Figura 16- (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-prop-2-en-1-ona (**S4**)

3.4.1.5. Substância **S5**: (2E, 6E)-2,6-bis(benzidileno)-cicloexan-1-ona

A substância **S5** (Figura 17) foi sintetizada utilizando-se cicloexanona (11 mmol; 1,1 mL) e benzaldeído (24 mmol; 2,4 mL), como materiais de partida.

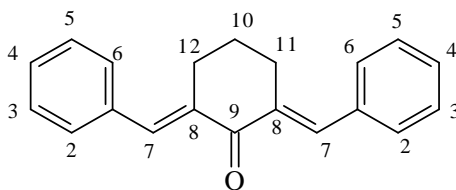


Figura 17- (2E, 6E)-2,6-bis(benzidileno)-cicloexan-1-ona (**S5**)

3.5. REAÇÕES DE HIDROGENAÇÃO

3.5.1- Procedimento geral para as reações de hidrogenação

Em balão volumétrico (125 mL), foram adicionados na sequência: etanol (15 mL), a chalcona (0,5 g) e o catalisador: Pd/Carvão ativado (25 mg). Conectado a este balão através de uma mangueira (25 cm), outro balão de 125 mL foi utilizado, sendo adicionado: 3 mL H₂O destilada, 1 mL de H₂SO₄ conc. e 2 barras de limalha de ferro (100 mg). A reação foi mantida em agitação magnética à temperatura ambiente por 12 horas. Após este período, foi feita uma filtração, evaporação do solvente e o sólido obtido, recristalizado em metanol.

3.5.1.1- Chalconas utilizadas nas reações de hidrogenação

As chalconas **S2** e **S3** obtidas por síntese foram reduzidas por reação de hidrogenação, obtendo-se as respectivas diidrochalconas **S16** e **S17**, para que fossem comparadas com os produtos obtidos por biorredução.

3.6. REAÇÕES DE BIORREDUÇÃO

3.6.1- Procedimento geral para as reações de biorreduções

Inicialmente o fungo já isolado das folhas e raízes de *Paspalum maritimum* Trin. (três discos de 5 mm de diâmetro) foi retirado diretamente da placa de Petri onde já se encontrava o fungo repicado em meio de cultura Sabouraud, e este contendo o inóculo foi transferido de forma asséptica para seis erlenmeyers de 500 mL, cada um contendo 250 mL do meio de cultura Sabouraud (reduzido a fonte de carbono em 50 %), previamente autoclavados a 121°C durante 15 minutos, e em seguida foram adicionadas os substratos: 50 µg se líquido e 50 mg se sólido nestes erlenmeyers, os quais ficaram sob agitação no shaker orbital (160 rpm, 28 °C), por um período de dez dias. Após este período, o material foi filtrado, obtendo-se o filtrado e o micélio. O filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. Ao micélio, foi acrescentado metanol, e após cinco horas foi filtrado e concentrado. As análises foram realizadas em triplicata.

3.6.2- Escolha dos microorganismos

O fungo *Aspergillus flavus* (FEPMFL3D1) foi selecionado para ser utilizado nas reações de biotransformações, por apresentar um rápido crescimento em todos os meios de culturas testados, e principalmente, pelos inúmeros trabalhos encontrados na literatura. Sua identificação foi realizada pela Dra. Maria Inês de Moura Sarkis (Laboratório de Coleção de fungos/Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-RJ).

Um exemplo que se encontra na literatura é a reação de redução de cetonas α - β -insaturadas (ANDRADE et al., 2004), onde ocorre a redução de ligações duplas carbono-carbono através de redutases isoladas de *Saccharomyces cerevisiae*, fermento de pão, possibilitando reações seletivas com cetonas α - β -insaturadas, conforme figura 18.

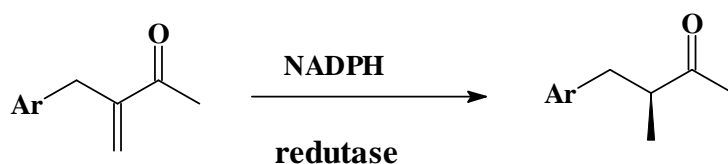


Figura 18- Redução de cetonas α - β -insaturadas com redutases isoladas de fermento.

3.6.3- Escolha dos substratos

As cetonas aromáticas acetofenona e a 4-nitro-acetofenona foram selecionadas neste trabalho, por apresentarem as características relacionadas com as substâncias utilizadas em biotransformações já citadas na literatura, não sendo nocivas aos microorganismos nas quantidades previamente testadas. As reações de biotransformações esperadas nos substratos selecionados estão representadas na Figura 19.

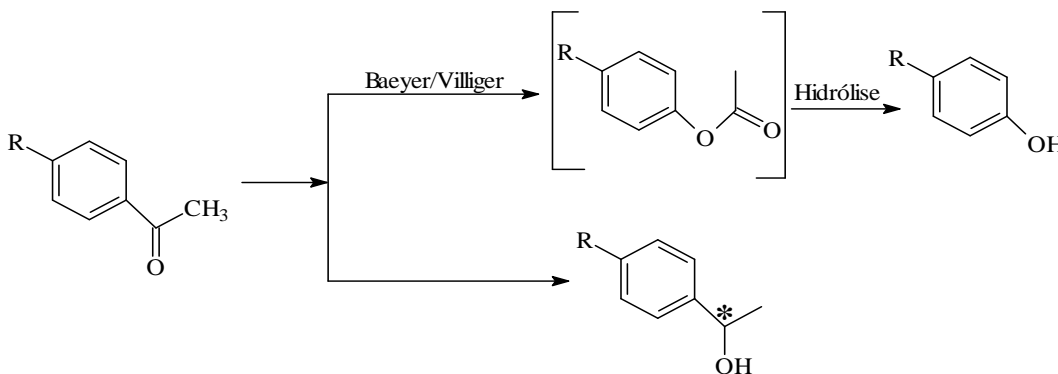


Figura 19- Reações de biotransformações possíveis de ocorrerem em cetonas aromáticas.

As chalconas também foram selecionadas, por apresentarem perspectivas da formação de produtos quimio-regio-enantiosseletivos, com possibilidades da obtenção de um dos produtos em maiores proporções conforme demonstrado na Figura 20.

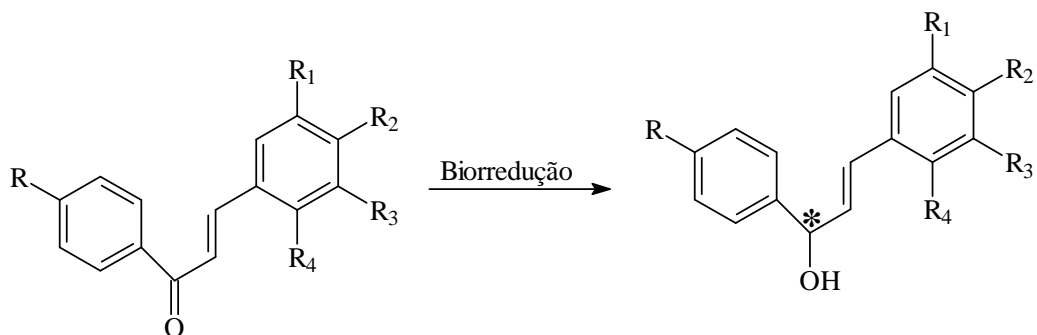


Figura 20- Reação de biorredução esperadas para chalconas.

Há possibilidades de ocorrerem também reações de biotransformações com a formação do epóxido, diol ou adição de hidrogênios (Figura 21, p.64). Estas reações são possíveis de serem realizadas, visto que são exemplos de reações em síntese, cujos exemplos se encontram na literatura: epoxidação (AMARESH & PERUMAL, 1995; BERKESSEL et al., 2006); hidroxilação (BERNINI et al., 2004) hidrogenação (KROHN et al. 2002).

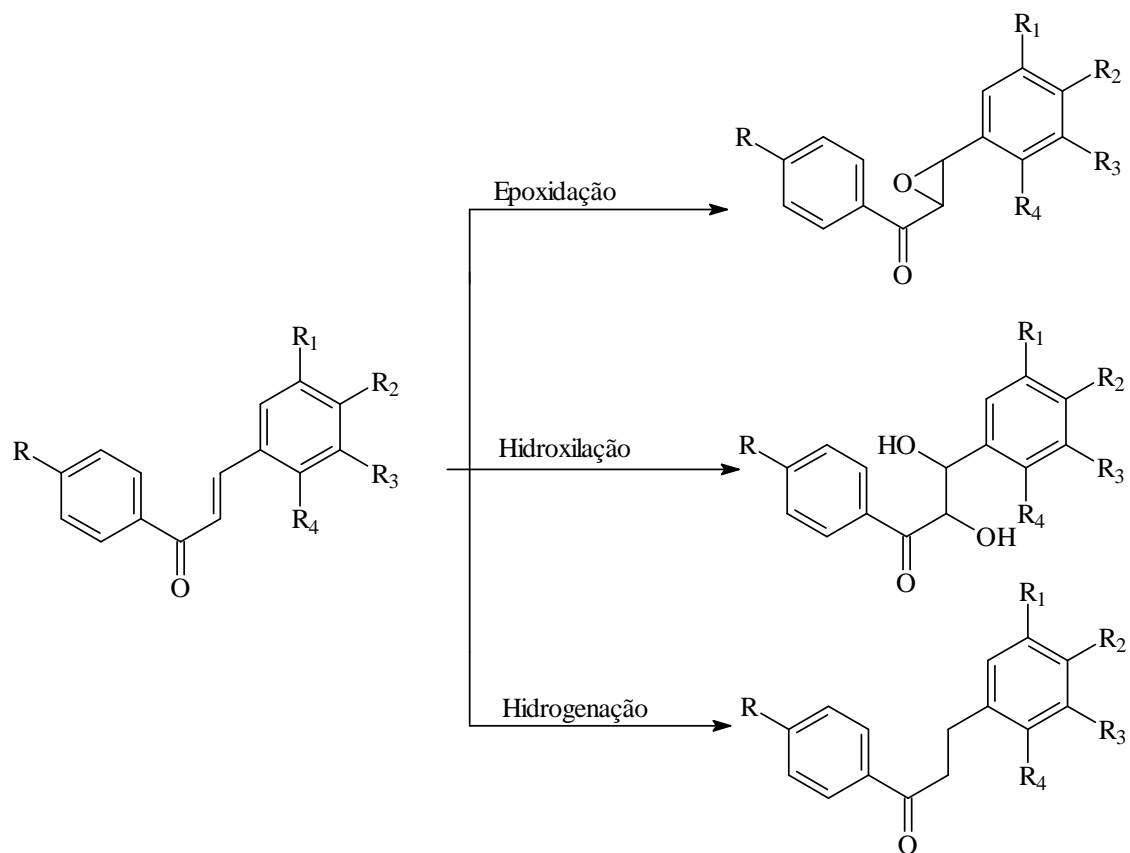


Figura 21- Reações de biotransformações possíveis em chalconas.

3.7. ATIVIDADE ALELOPÁTICA

A substância isolada **S10** da planta, a substância **S13** obtida da biomassa produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* e as diidrochalconas inéditas obtidas por biorreduções e hidrogenação (**S16**) e (**S17**) foram submetidas ao ensaio alelopático. As substâncias **S10** e **S13** por serem os metabólitos majoritários obtidos e por ser um dos objetivos do trabalho verificar o potencial alelopático das substâncias que iriam ser isoladas e a correlação existente no efeito alelopático sobre as espécies receptoras. As diidrochalconas **S16** e **S17** também foram utilizadas para correlacionar com os efeitos da flavona isolada da planta, já que ambas pertencem a mesma classe de substâncias: flavonóides.

3.7.1. Análise da atividade alelopática

3.7.1.1. Espécies receptoras

Como plantas indicadoras dos efeitos alelopáticos, foram utilizadas as plantas daninhas malícia (*Mimosa pudica*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*) e a leguminosa forrageira puerária (*Pueraria phaseoloides*). As sementes das duas espécies de plantas daninhas foram coletadas em áreas de pastagens cultivadas, no Município de Terra Alta, Estado do Pará, e as sementes de puerária foram adquiridas em fornecedores de Belém. As sementes passaram por processo de limpeza e tratamento para superação da dormência, via imersão em ácido sulfúrico concentrado.

3.7.1.2. Bioensaio de germinação de sementes

A germinação foi monitorada durante dez dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. O bioensaio foi desenvolvido em câmara de germinação, em condições controladas de 25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 horas. Cada placa de Petri, de 9,0 cm de diâmetro, recebeu 30 sementes. Foram consideradas sementes germinadas, aquelas que apresentavam extensão de 2,00 mm de raiz primária.

3.7.1.3. Bioensaios de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo

O bioensaio foi desenvolvido em câmara e germinação, em condições controladas de 25 °C de temperatura e fotoperíodo de 24 horas. Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro recebeu três sementes pré-germinadas, com aproximadamente dois dias de germinação, e ao final do período de 10 dias de crescimento, mediu-se o comprimento das radículas e do hipocótilo.

3.7.1.4. Análise dos efeitos do pH

Para a avaliação dos efeitos do pH na atividade alelopática da tricina, foram preparadas soluções com pH de 3,0, 6,0 e 9,0, utilizando-se ácido clorídrico (HCl), para baixar o pH, e hidróxido de potássio (KOH), para elevar o valor do pH. A tricina foi testada na concentração de 200 mg L⁻¹. Especificamente para essa avaliação, os efeitos foram quantificados apenas sobre a germinação das sementes das espécies receptoras. O bioensaio foi desenvolvido à semelhança daquele descrito no bioensaio de germinação de sementes.

3.7.1.5. Outros procedimentos experimentais

A tricina (**S10**) foi testada nas concentrações de 200 ppm e 300 ppm, o ácido kójico (**S13**) nas concentrações de 10, 30 e 50 ppm e as diidrochalconas **S16** e **S17** nas concentrações de 80 e 160 ppm, utilizando-se como solvente o metanol. Cada placa de Petri, de 9,0 cm de diâmetro, recebeu 3,0 mL da solução teste. Após a evaporação do eluente, adicionou-se o mesmo volume de água destilada, mantendo-se, dessa forma, a concentração original. As substâncias foram adicionadas apenas uma vez, quando do início dos bioensaios, sendo, a partir de então, adicionado apenas água destilada, sempre que se fazia necessário.

3.7.1.6. Delineamento experimental e análise estatística

Para todos os bioensaios, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, tendo, como testemunha a água destilada. Os dados foram analisados pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). Para análise dos dados, utilizou-se o programa SAS (SAS INSTITUTE, 1989).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DO ESTUDO QUÍMICO DE *Paspalum maritimum*

No estudo químico dos extratos obtidos a partir das folhas de *Paspalum maritimum* foram isoladas e identificadas cinco substâncias: **S6**, **S7**, **S8**, **S9**, **S10**. A seguir encontram-se as estruturas das substâncias isoladas (Figura 22).

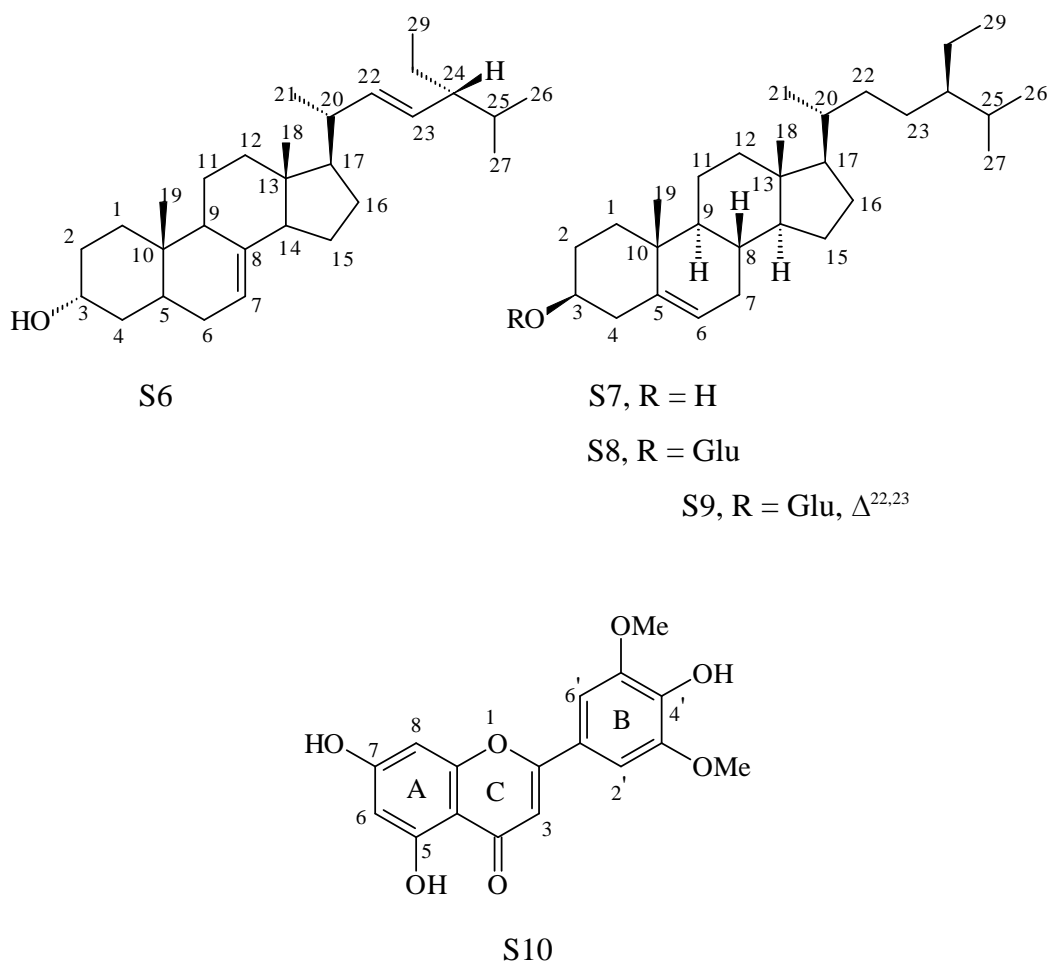


Figura 22- Constituintes químicos isolados dos extratos das folhas de *P. maritimum*.

4.1.1- Substância S6

A substância **S6** (Figura 23) foi identificada como o esteróide α -espinaesterol e encontrava-se em mistura com triacilgliceróis

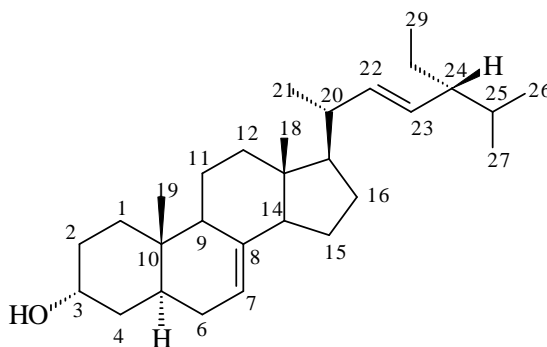


Figura 23: Estrutura do α -espinaesterol.

O espectro de RMN ^1H (Figuras 24 e 25, p. 70 e 71) de **S6** + mistura de triacilgliceróis apresenta sinais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,14 (*m*, H-7 e H-22). No mesmo espectro, observa-se o sinal referente ao hidrogênio ligado ao carbono oximetínico C-3 em δ_{H} 3,61 (*m*, 1H) e os sinais dos hidrogênios metílicos na região em δ_{H} 0,54 - δ_{H} 0,85, destacando-se os sinais em δ_{H} 0,54 (*s*, H-18) e em δ_{H} 1,02 (*d*, $J = 6,6$ Hz, H-21).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 26, p.72) registra a presença de sinais de 29 átomos de carbonos. Desses sinais, pode-se destacar o sinal de carbono em δ_{C} 71,1 característico de carbono oximetínico na posição 3 e em δ_{C} 117,4; 129,4; 138,1 e 139,5, os sinais de carbonos olefínicos de duas insaturações. Estes sinais são característicos de compostos com esqueletos esteroidais com uma das insaturações localizada entre C-7 e C-8 (δ_{C} 117,4 e δ_{C} 138,1) e a outra entre C-22 e C-23 (δ_{C} 129,4 e δ_{C} 139,5) (GARG & NES, 1984).

Na Tabela 4 (p. 69) encontram-se os dados de RMN ^1H e de ^{13}C de **S6** em comparação com os dados da literatura para o α -espinaesterol (GARG & NES, 1984).

Tabela 4- Dados de RMN ^1H e de ^{13}C da substância S6 comparados com dados da literatura (GARG & NES, 1984)*

C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	$\delta_{\text{H}}(\text{S6})$	$\delta_{\text{H}}^*\text{Lit.}$	$\delta_{\text{C}}(\text{S6})$	$\delta_{\text{C}}^*\text{Lit.}$
1			37,1	37,0
2			28,4	27,6
3	3,59 (m)	3,59 (m, 1H)	71,1	72,0
4			33,7	33,9
5			40,2	40,4
6			29,6	29,4
7	5,14 (sl)	5,17 (sl, 1H)	117,4	117,2
8			139,5	139,6
9			49,4	49,0
10			34,2	34,4
11			21,5	21,7
12			39,4	39,6
13			43,2	43,1
14			55,1	55,6
15			23,0	23,1
16			28,7	28,4
17			55,8	55,8
18	0,55 (s)	0,55 (s, 3H)	12,0	12,0
19			13,0	12,5
20			40,8	40,2
21	1,20 (d, $J = 6,6$ Hz)	1,20 (d, 3H)	21,3	21,0
22	5,02 (dd, $J = 14,7$ Hz e $J = 8,7$ Hz)	5,02 (dd, 1H)	138,1	138,0
23			129,4	129,6
24			51,2	51,3
25			31,9	31,8
26	0,80 (d, $J = 7,2$ Hz)	0,800 (d, 3H)	18,9	19,2
27	0,85 (d, $J = 7,2$ Hz)	0,851 (d, 3H)	21,0	21,0
28			25,3	25,5
29	0,79 (m, 3H)	0,757 (t, 3H)	12,2	12,6

* GARG & NES, 1984 (RMN ^1H : 400 mMHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3).

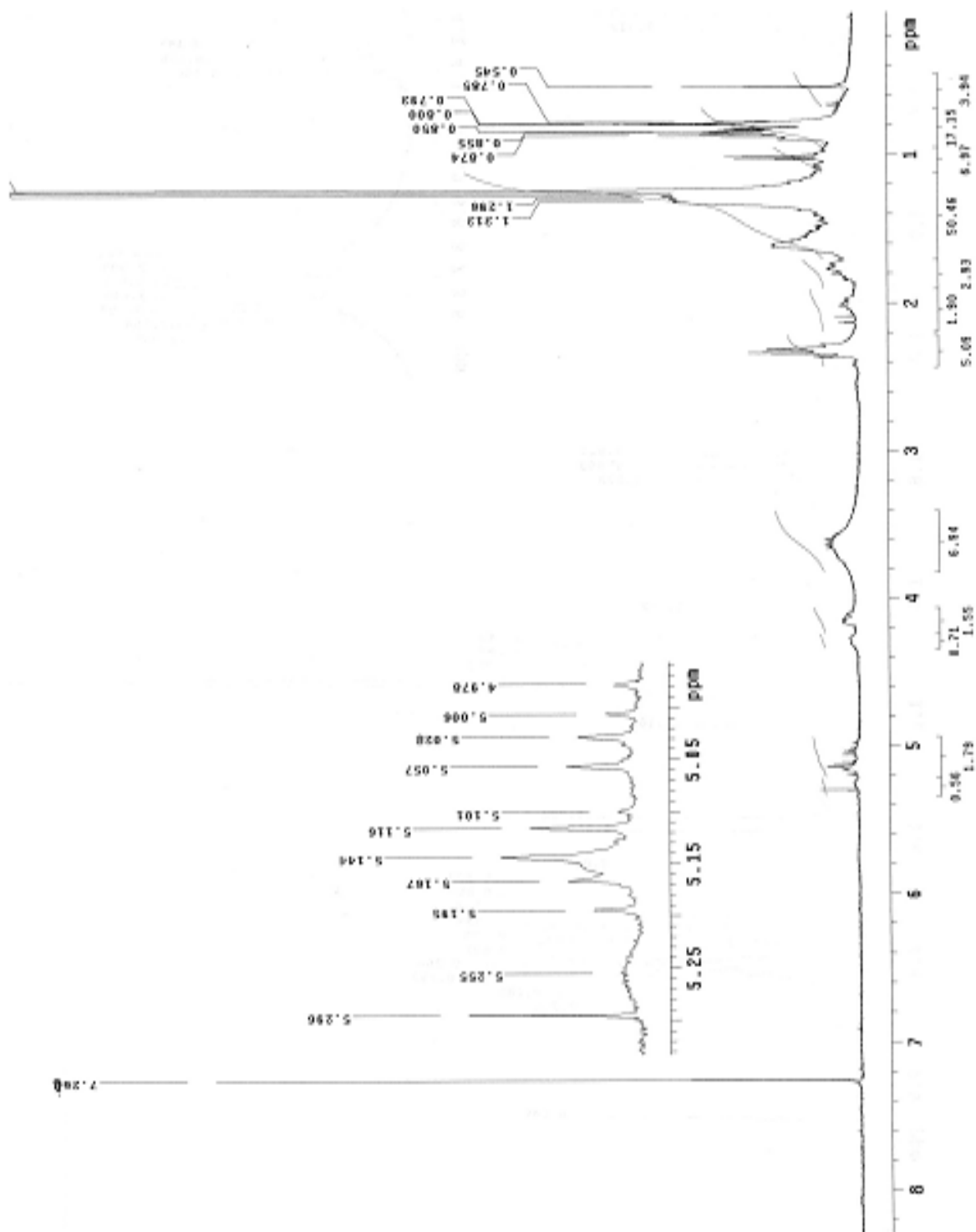


Figura 24- Espectro de RMN^1H (300 MHz, CDCl_3) de S6 + mistura de triacilgliceróis.

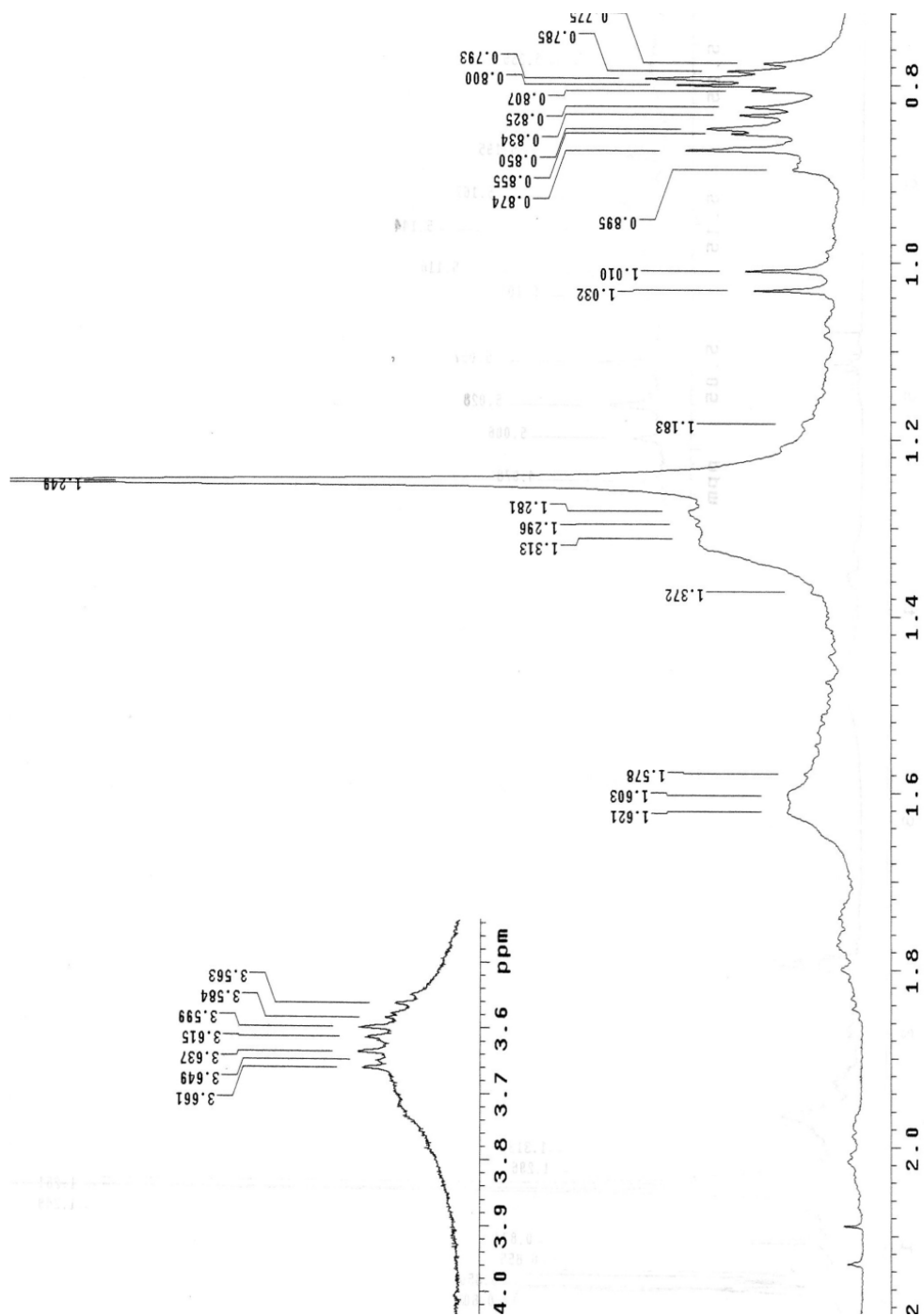


Figura 25- Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S6** + mistura de triacilgliceróis.

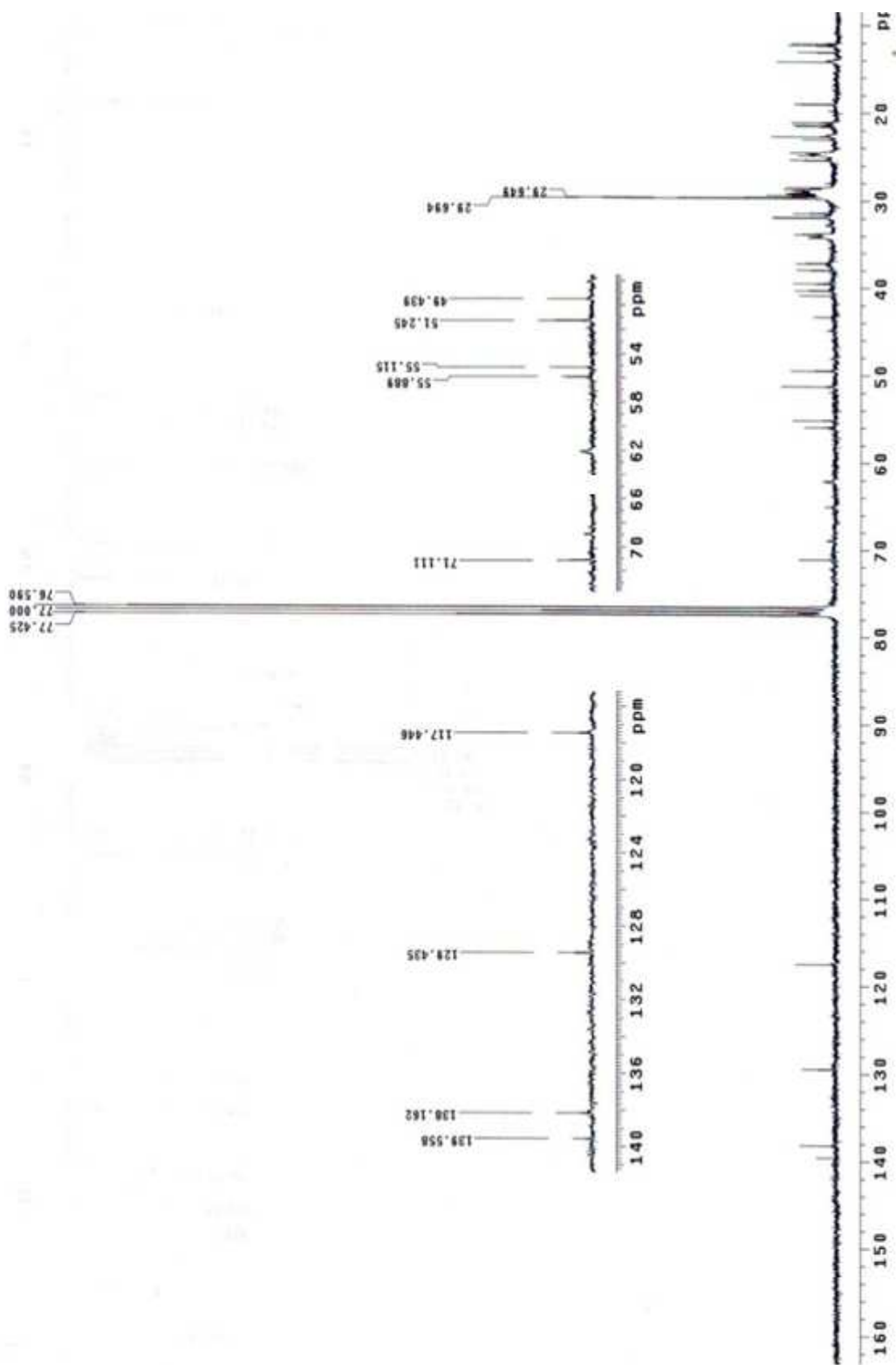


Figura 26- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S6 + mistura de triacilgliceróis.

4.1.2- Substância S7

A substância **S7** (Figura 27) foi identificada como sendo o esteróide sitosterol.

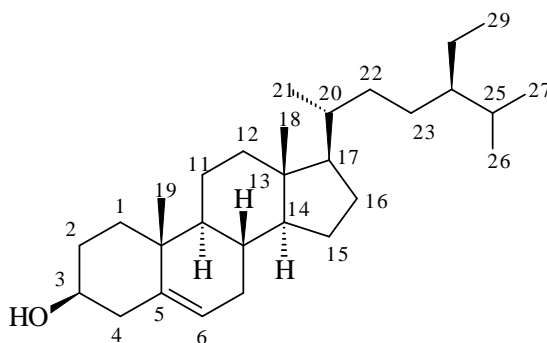


Figura 27- Estrutura do Sitosterol (**S7**)

O espectro de RMN ^1H (Figura 28, p.75) evidencia a presença de um duplete largo em δ_{H} 5,34, relativo ao hidrogênio olefínico H6, um multiplete em δ_{H} 3,52 correspondente ao hidrogênio oximetínico H3, e os demais sinais referem-se aos hidrogênios ligados aos carbonos dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal (KOJIMA et al., 1990; SUBHADHIRASAKUL & PECHPONGS, 2005).

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 29 e 30, p. 76 e 77), apresenta os sinais em δ_{C} 140,7 e δ_{C} 121,7 relativos aos sinais dos carbonos olefínicos C-5 e C-6 e em δ_{H} 71,7, o sinal referente ao carbono oximetínico C-3, além de outros sinais assinalados na Tabela 5 (p. 74), na qual são confrontados os os dados obtidos de RMN ^{13}C de **S7**, com os dados da literatura (KOJIMA et al, 1990; SUBHADHIRASAKUL & PECHPONGS, 2005). Esse conjunto de informações deixa claro que a substância **S7** trata-se do sitosterol.

Tabela 5- Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância **S7**, em comparação com dados da literatura (KOJIMA et al, 1990, CDCl_3 ; SUBHADHIRASAKUL & PECHPONGS, 2005).

C	S7 (δ_{H})	*Lit.	DEPT	S7 (δ_{C})	**Lit.
1			CH	37,2	37,36
2			CH ₂	31,6	31,90
3	3,52 (1H, m)	3,52 (1H, m)	CH	71,7	71,77
4			CH ₂	42,2	42,29
5			C	140,7	140,75
6	5,34 (1H, dl, $J=5,1$ Hz))	5,35 (1H, sl)	CH	121,7	121,69
7			CH ₂	31,8	31,65
8			CH	31,6	31,93
9			CH	50,0	50,13
10			C	36,1	36,50
11			CH ₂	21,0	21,09
12			CH ₂	39,7	39,78
13			C	42,2	42,32
14			CH	56,7	56,77
15			CH ₂	24,2	24,31
16			CH ₂	28,2	28,26
17			CH	55,9	56,06
18	0,67 (3H, s, H18)	0,68 (3H, s)	CH ₃	11,9	11,86
19	1,00 (3H, s)	1,00 (3H, s)	CH ₃	19,3	19,40
20			CH	36,4	36,15
21	0,91(3H)	0,9 2(3H, d)	CH ₃	18,7	18,79
22			CH ₂	33,8	33,95
23			CH ₂	25,9	26,07
24			CH	45,7	45,83
25			CH	29,0	29,16
26	0,81 (3H)	0,83 (3H, d)	CH ₃	19,7	19,83
27	0,82 (3H)	0,81 (3H,t)	CH ₃	19,3	19,04
28	0,84 (3H)	0,84 (3H,t)	CH ₂	23,0	23,07
29			CH ₃	11,8	11,99

*Principais sinais observados no espectro de RMN ^1H para **S7** (KOJIMA et al, 1990, CDCl_3).

**SUBHADHIRASAKUL & PECHPONGS, 2005 (RMN ^1H : 500 MHz; ^{13}C 125 MHz; CDCl_3).

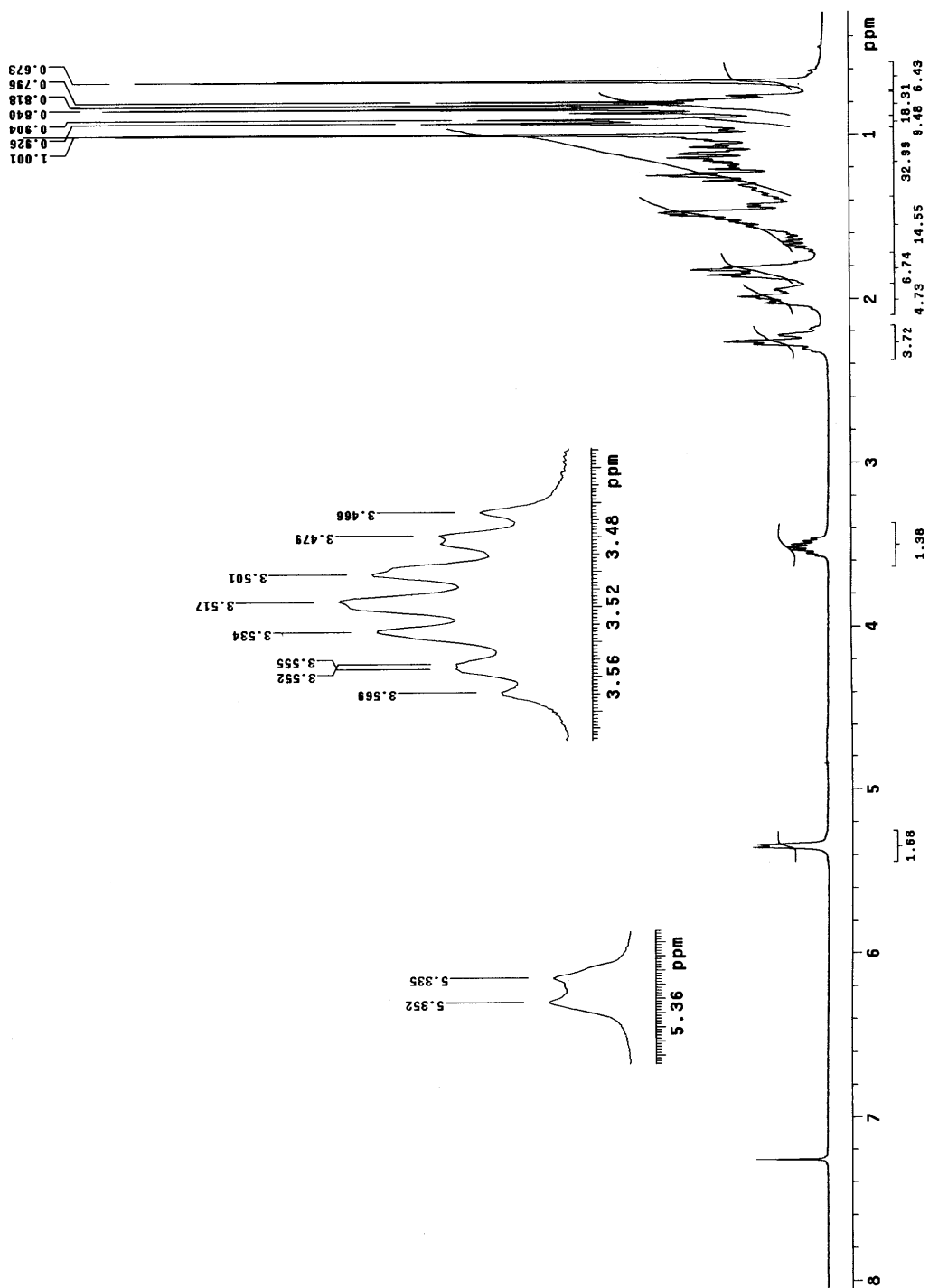


Figura 28- Espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) de S7.

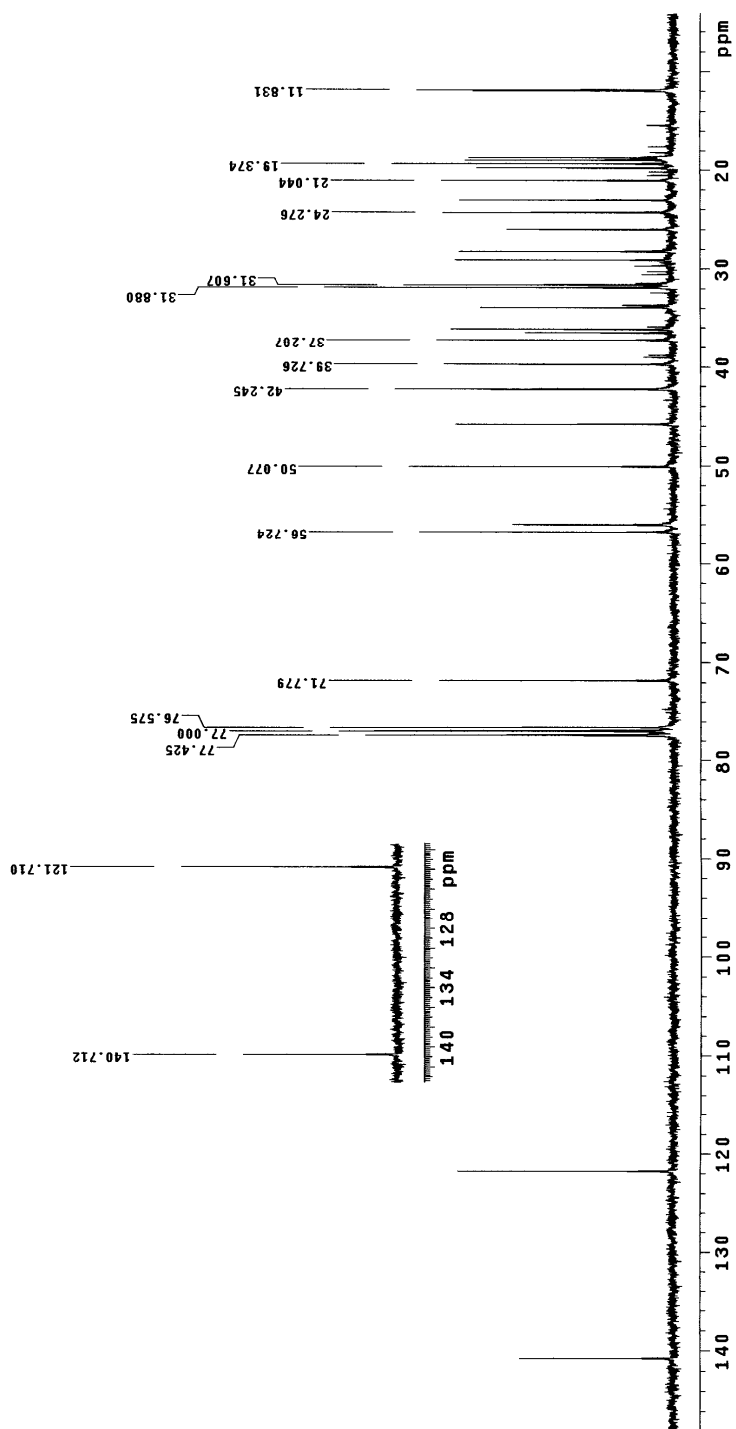


Figura 29- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S7.

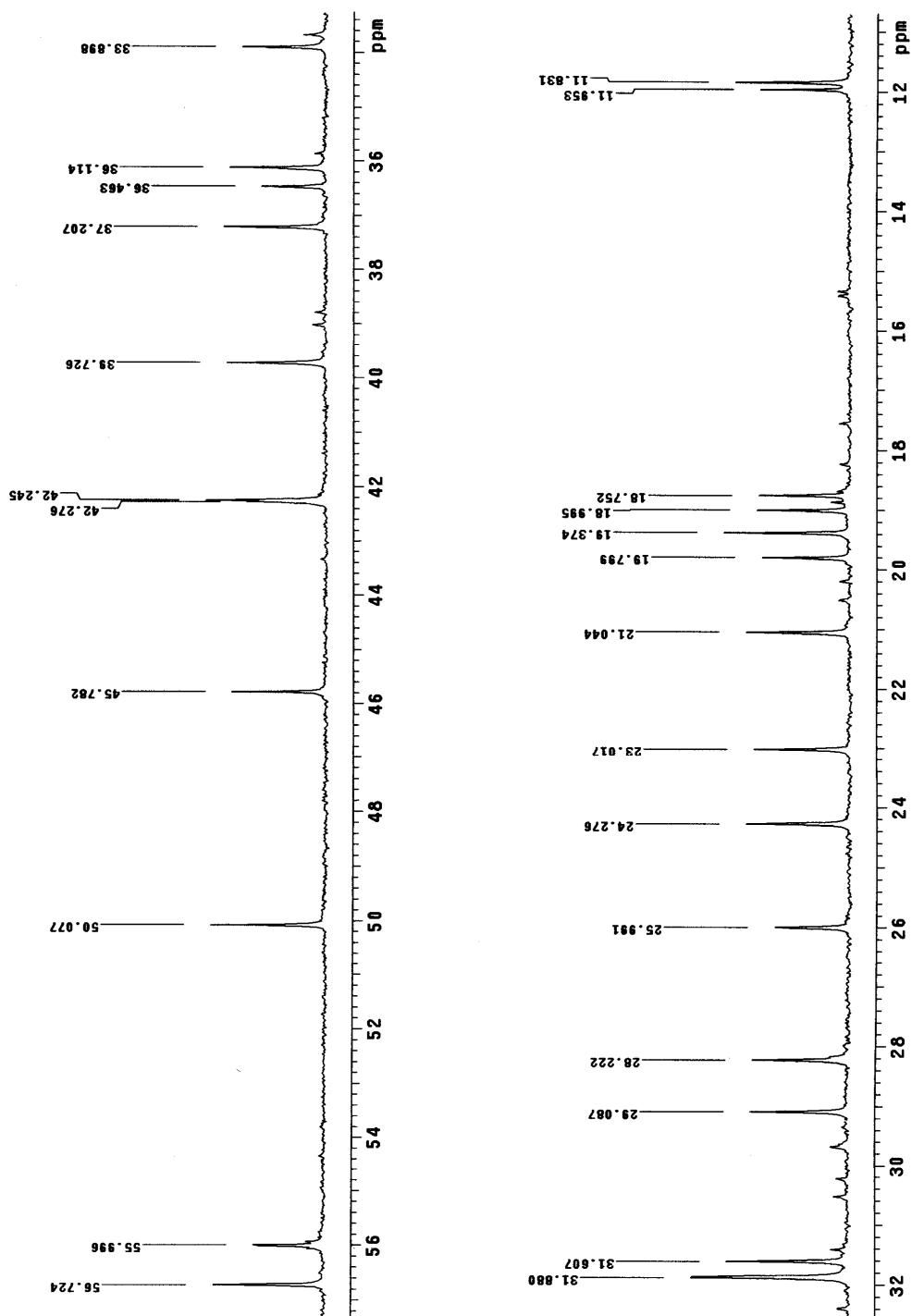


Figura 30- Expansão do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S7.

4.1.3- Substância S8

A substância **S8** (Figura 31) foi identificada como sendo o esteróide 3- β -glicopiranosíl-sitosterol.

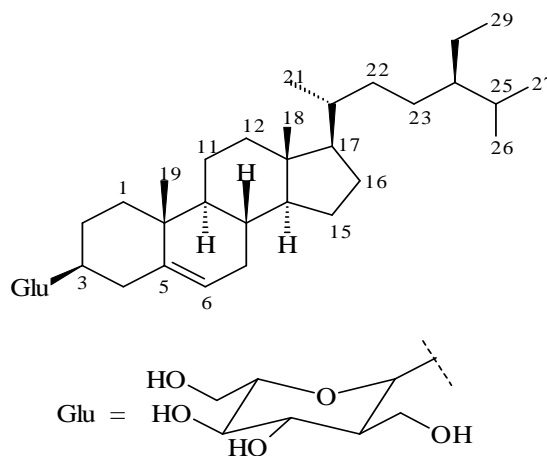


Figura 31- Estrutura química do 3- β -glicopiranosíl-sitosterol

O espectro de RMN ^1H (Figura 32, p. 80) apresenta um duplete largo em δ_{H} 5,17 relativo ao sinal do hidrogênio olefínico H6, um conjunto de sinais 4,00 a δ_{H} 4,60 referentes aos hidrogênios característicos de grupamento açúcar do tipo D-glicopiranosíl, e os demais sinais referem-se aos hidrogênios ligados aos carbonos dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 33, p. 81) da substância **S8** apresenta sinais que confirmam a estrutura de **S8** como sendo o esteróide 3- β -glicopiranosíl-sitosterol, onde destacam-se os sinais em δ_{C} 140,7 e δ_{C} 121,7 relativos aos sinais dos carbonos olefínicos C-5 e C-6 e o sinal em δ_{C} 102,5 atribuído ao carbono anomérico do grupo D-glicopiranosíl-sitosterol, além de sinais de carbonos oximetilênicos de açúcar na região de δ_{C} 62,8 a δ_{C} 78,5 e em δ_{C} 78,6 atribuído ao carbono oximetínico C-3.

O espectro de DEPT (Figura 34, p.82) mostra os sinais de olefínicos em δ_{C} 140,71 e δ_{C} 121,71 atribuídos a um carbono totalmente substituído (C-5) e um carbono metínico (C-6). O conjunto de informações espectrais associados aos dados da literatura (AHMAD, GHAZALA & UDDIN, 1992; ALAM et al., 1996) confirma que a substância em questão trata-se do esteróide 3- β -glicopiranosídil-sitosterol (Tabela 6, p. 79).

Tabela 6- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, piridina- d_5) e DEPT da substância **S8**, em comparação com dados da literatura (AHMAD, GHAZALA & UDDIN, 1992).

SUBSTÂNCIA S8				
C	DEPT	δ_C		Lit*
1	CH	37,4		37,6
2	CH ₂	30,2		30,3
3	CH	78,5		78,4
4	CH ₂	39,9		40,0
5	C	140,8		140,9
6	CH	121,9		121,9
7	CH ₂	32,1		32,2
8	CH	32,0		32,1
9	CH	50,3		50,4
10	C	36,9		36,9
11	CH ₂	21,2		21,4
12	CH ₂	39,3		39,4
13	C	42,4		42,6
14	CH	56,7		56,9
15	CH ₂	24,4		24,6
16	CH ₂	28,5		28,6
17	CH	56,2		56,3
18	CH ₃	11,9		12,1
19	CH ₃	19,4		19,3
20	CH	36,3		36,4
21	CH ₃	19,1		19,1
22	CH ₂	34,1		34,3
23	CH ₂	26,3		26,5
24	CH	46,0		46,1
25	CH	29,4		29,5
26	CH ₃	19,4		19,5
27	CH ₃	19,9		20,0
28	CH ₂	23,3		23,5
29	CH ₃	12,1		12,2
1'	CH	102,6		102,6
2'	CH	75,3		75,3
3'	CH	78,5		78,2
4'	CH	71,6		71,7
5'	CH	78,0		77,3
6'	CH ₂	62,8		62,9

*Ahmad, Ghazala & Uddin, 1992.

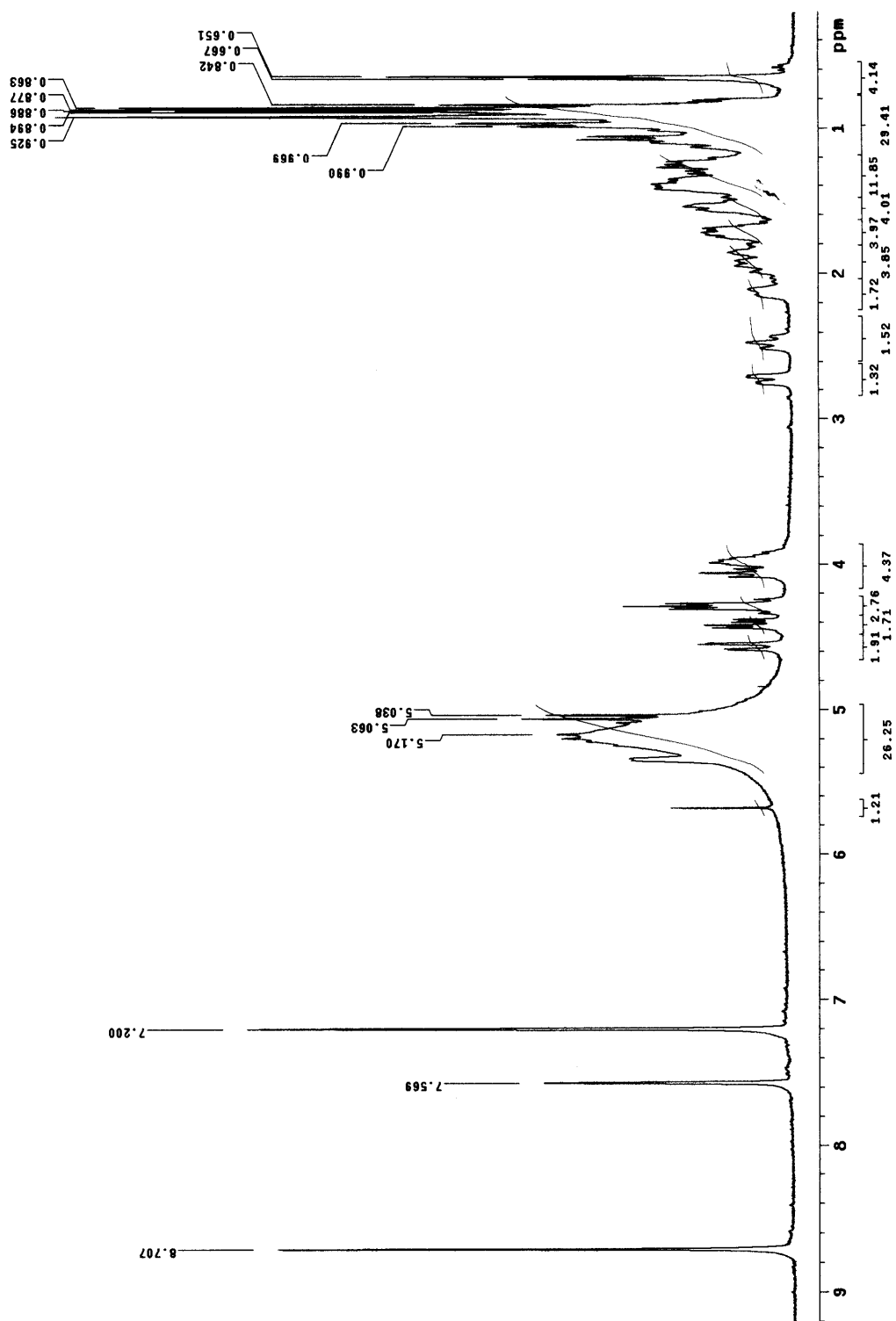


Figura 32- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, piridina- d_5) de S8.

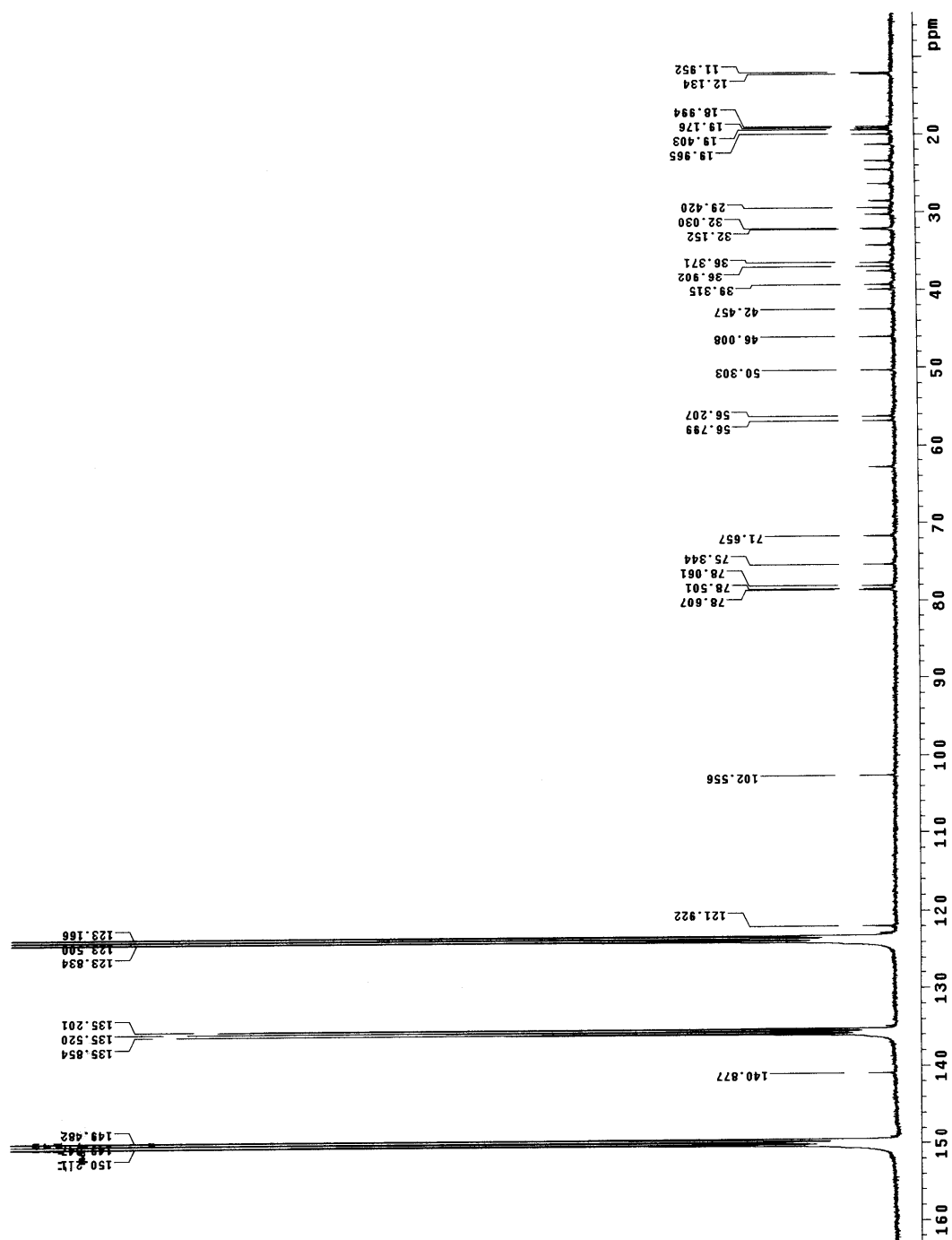


Figura 33- Espectro de RMN¹³C (75 MHz, piridina-d₅) de S8.

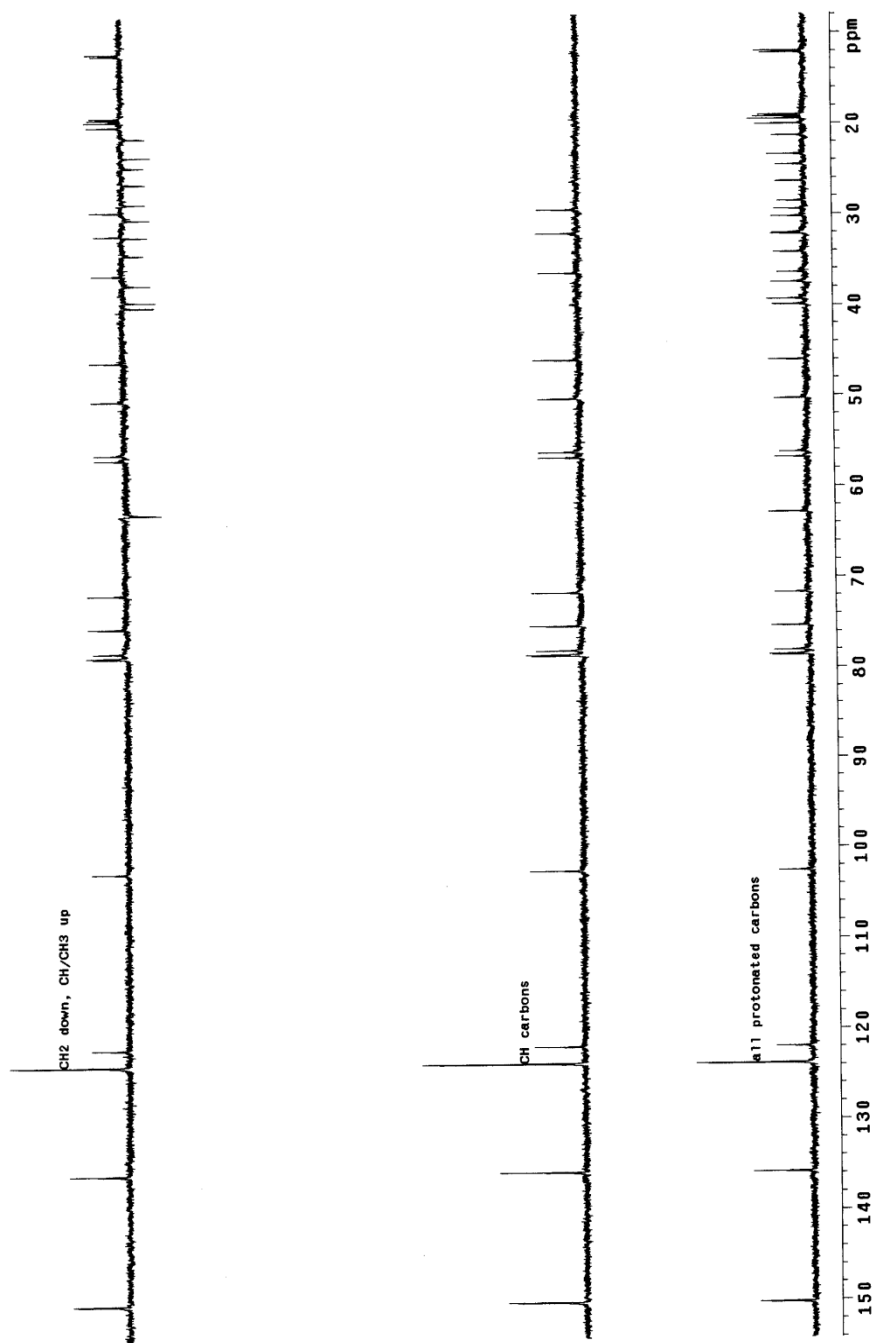


Figura 34- Espectro de DEPT de S8.

4.1.4- Misturas de substâncias S8 + S9

A mistura de substâncias **S8+S9** (Figura 35) foi identificada como uma mistura dos esteróides 3-β-glicopiranosíl-sitosterol e o 3-β-glicopiranosíl-estigmasterol.

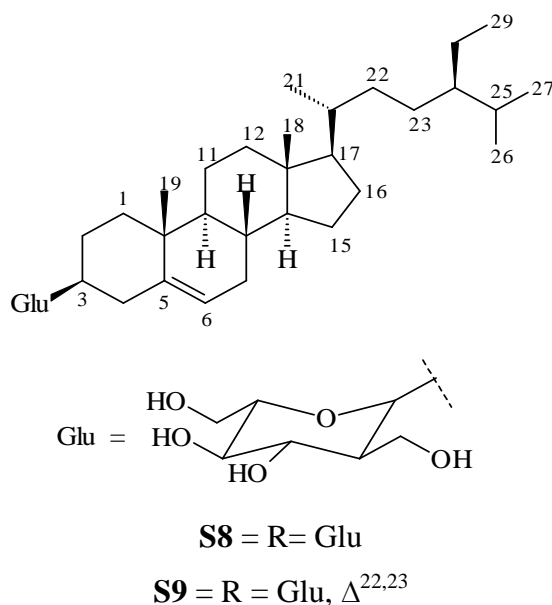


Figura 35- Mistura dos esteróides 3-β-glicopiranosíl-sitosterol e o 3-β-glicopiranosíl-estigmasterol.

A identificação da substância **S8** já foi discutida no item 5.1.6. O espectro de RMN ¹H (Figuras 36 e 37, p. 85 e 86) da mistura observa-se um dubleto largo localizado em δ_H 5,33 relativo ao hidrogênio H-6, dois duplo dubletos em δ_H 5,19 e δ_H 5,04 referentes aos hidrogênios H-22 e H-23 do 3-β-glicopiranosíl-estigmasterol (**S9**), um multipletto em δ_H 3,96 correspondente ao hidrogênio H-3, e os demais sinais referem-se aos hidrogênios ligados aos carbonos dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal.

O espectro de RMN¹³C (Figuras 38, 39, e 40, p.87, 88 e 89), apresenta os sinais em δ_C 140,7 e δ_C 121,7 relativos aos carbonos olefínicos C-5 e C-6, respectivamente, em δ_C 138,8 e δ_C 129,4 os sinais referentes aos carbonos olefínicos C-22 e C-23 de **S9** e em δ_C 78,5, o sinal do carbono oximetínico C-3. Os demais sinais estão assinalados na Tabela 7 (p. 84).

Os sinais dos carbonos metínicos, metilênicos e metílicos são representados no espectro de DEPT (Figuras 41 e 42, p. 90 e 91). Os dados obtidos de RMN ¹³C para a mistura das substâncias **S8 + S9**, quando comparados com os encontrados na literatura (ALAM et al., 1996; SEKI et al., 1985), indicam que a mistura de substâncias **S8 + S9**, trata-se dos esteróides 3-β-glicopiranosíl-sitosterol e o 3-β-glicopiranosíl-estigmasterol.

Tabela 7- Dados de RMN ^{13}C para **S8** + **S9** (δ ppm, piridina- d_5 , 75 MHz) comparados com dados da literatura (ALAM et al., 1996)

C	S8	Lit*	S9	Lit*
1	37,4	37,22	37,4	37,20
2	30,2	29,47	32,1	33,94
3	78,4	78,4	78,4	78,92
4	39,9	38,94	42,4	42,4
5	140,8	140,36	140,8	140,36
6	121,9	122,15	121,9	122,16
7	32,0	31,89	32,0	31,94
8	32,1	31,89	32,1	31,87
9	50,2	50,19	50,2	50,17
10	36,8	36,72	36,8	36,13
11	21,4	21,07	21,4	21,20
12	39,2	39,76	39,9	40,45
13	42,4	42,35	42,4	42,33
14	56,7	56,77	56,7	56,75
15	24,4	24,30	24,4	24,29
16	28,5	28,24	29,4	28,22
17	56,1	56,07	56,1	56,05
18	12,1	11,86	12,1	11,98
19	19,3	19,36	19,3	19,34
20	36,3	36,13	36,2	36,72
21	19,1	18,79	18,9	18,77
22	34,1	33,97	138,8	138,27
23	26,6	26,11	129,4	129,31
24	45,9	45,87	51,3	51,42
25	29,4	29,19	32,1	31,87
26	19,9	19,82	21,4	21,54
27	19,9	19,06	19,3	19,80
28	23,3	23,10	25,6	25,7
29	12,5	12,00	12,5	11,85
1'	102,5	102,6	102,5	102,62
2'	75,2	75,32	75,2	75,38
3'	78,5	78,21	78,5	78,62
4'	71,6	71,53	71,6	71,60
5'	78,0	77,30	78,4	78,43
6'	62,7	62,13	62,7	62,90

* ALAM et al., 1985

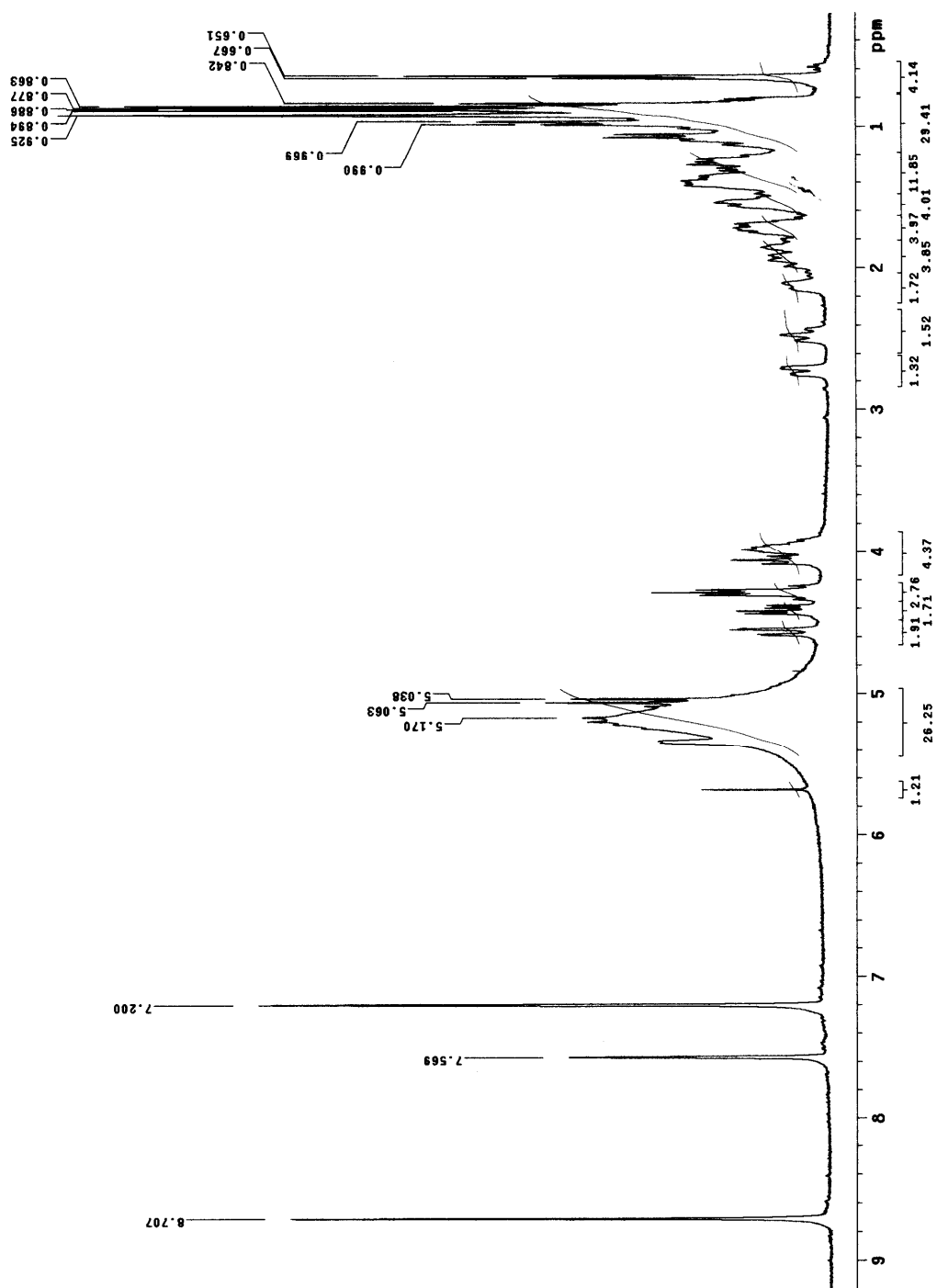


Figura 36- Espectro de RMN¹H (300 MHz, piridina-d₅) de S8 + S9.

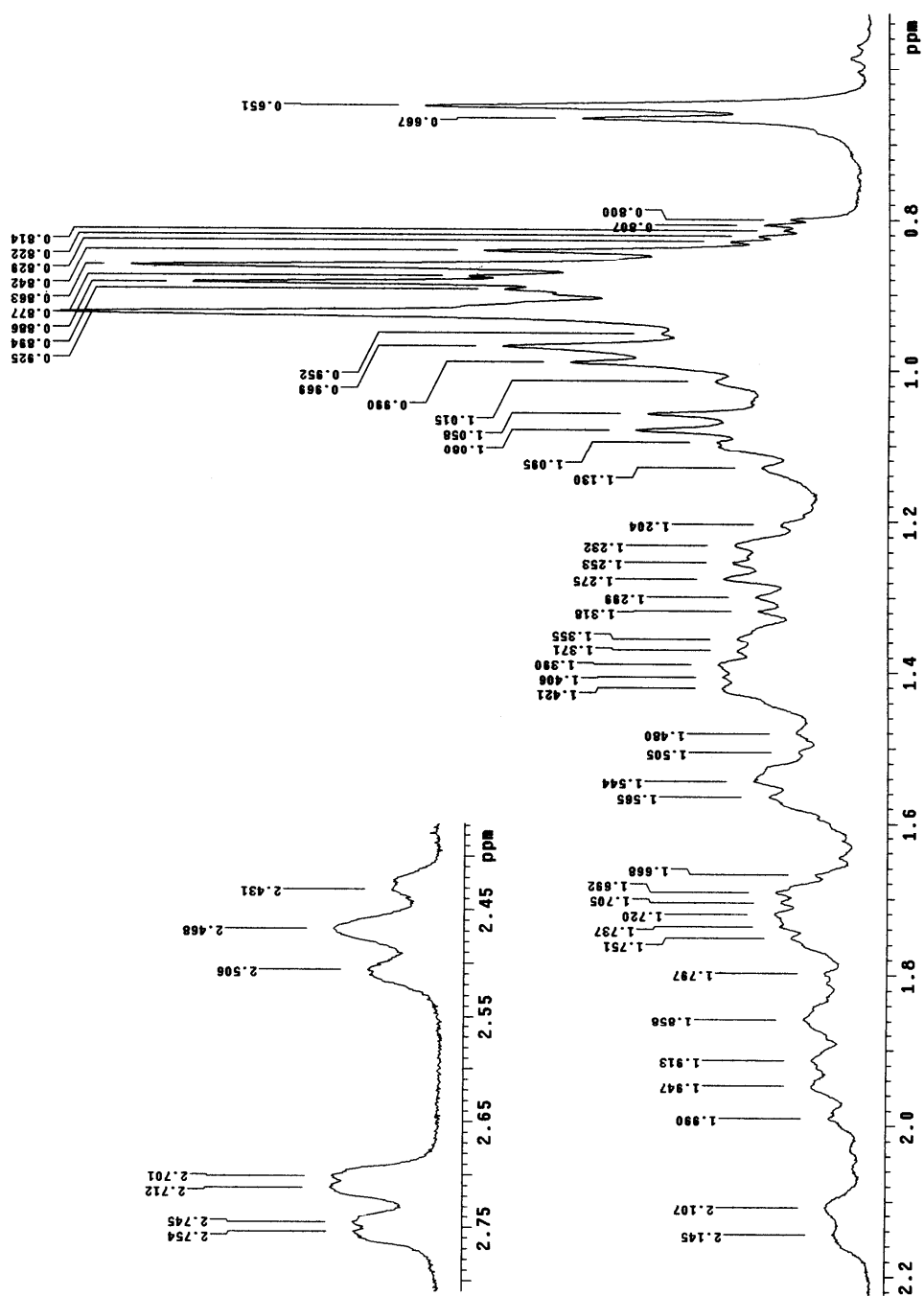


Figura 37- Expansão do espectro de RMN^1H (300 MHz, piridina- d_5) de S8 + S9.

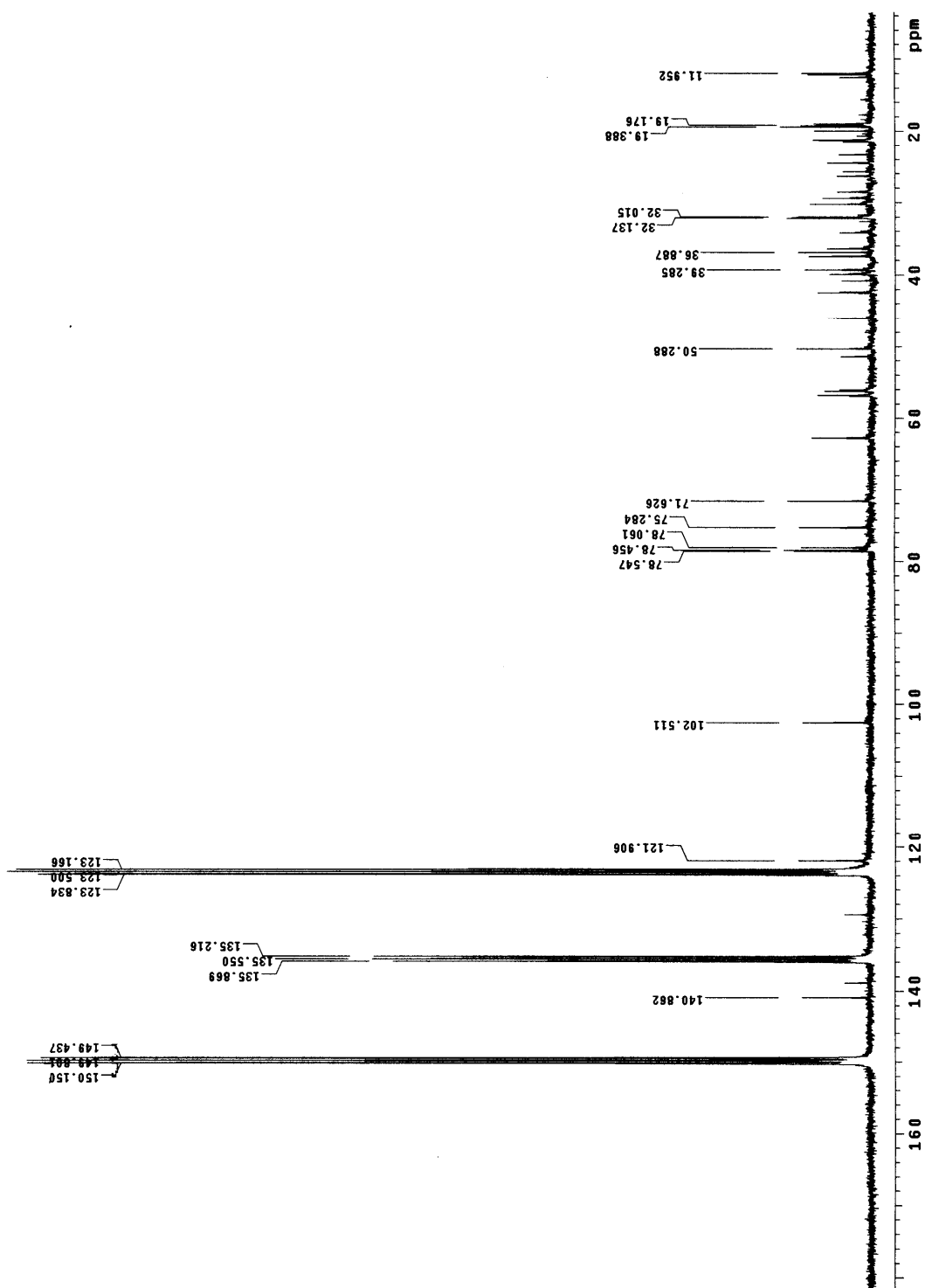


Figura 38- Espectro de RMN¹³C (75 MHz, piridina-d₅) de S8 + S9.

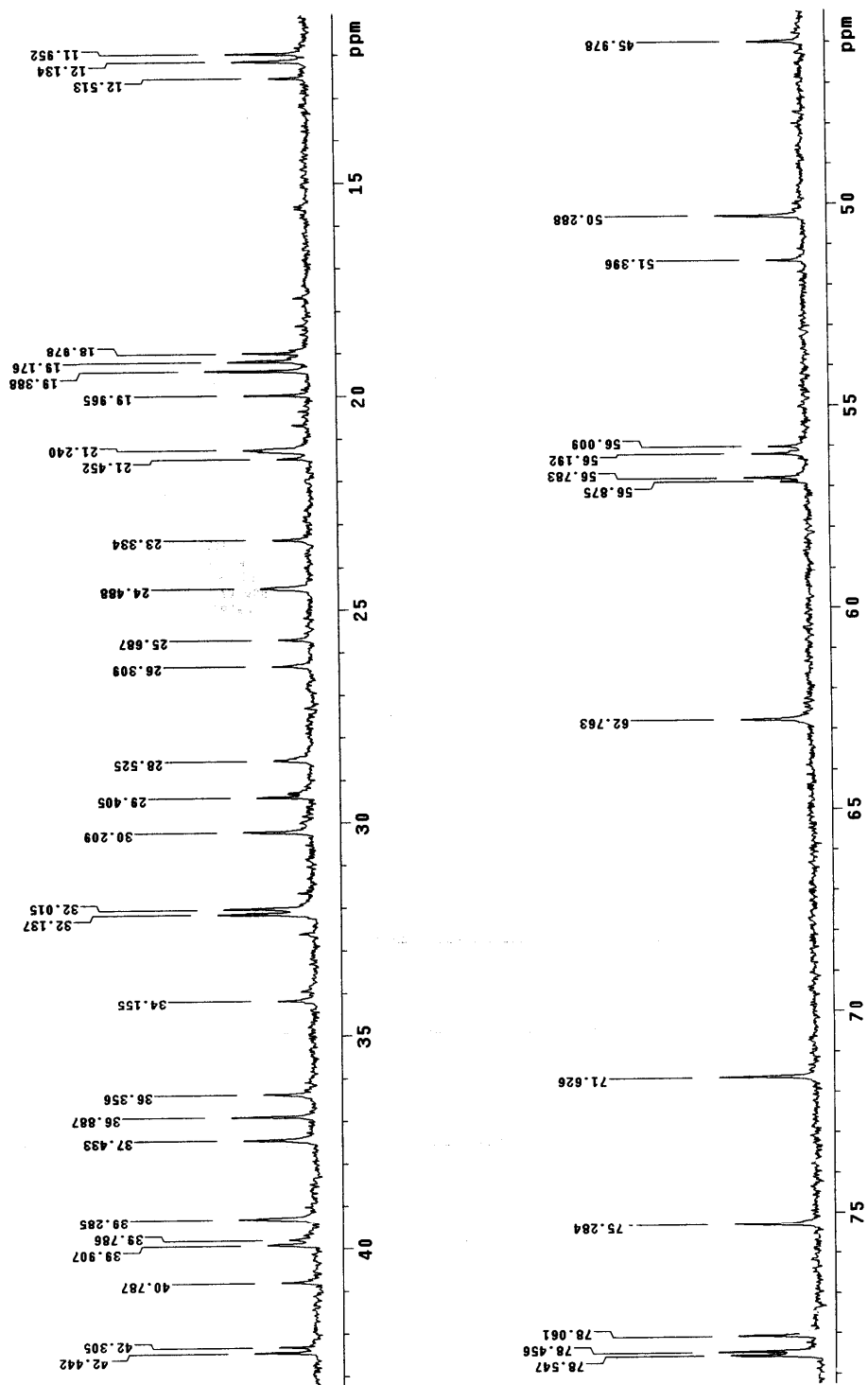


Figura 39- Expansão do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, piridina- d_5) de S8 + S9.

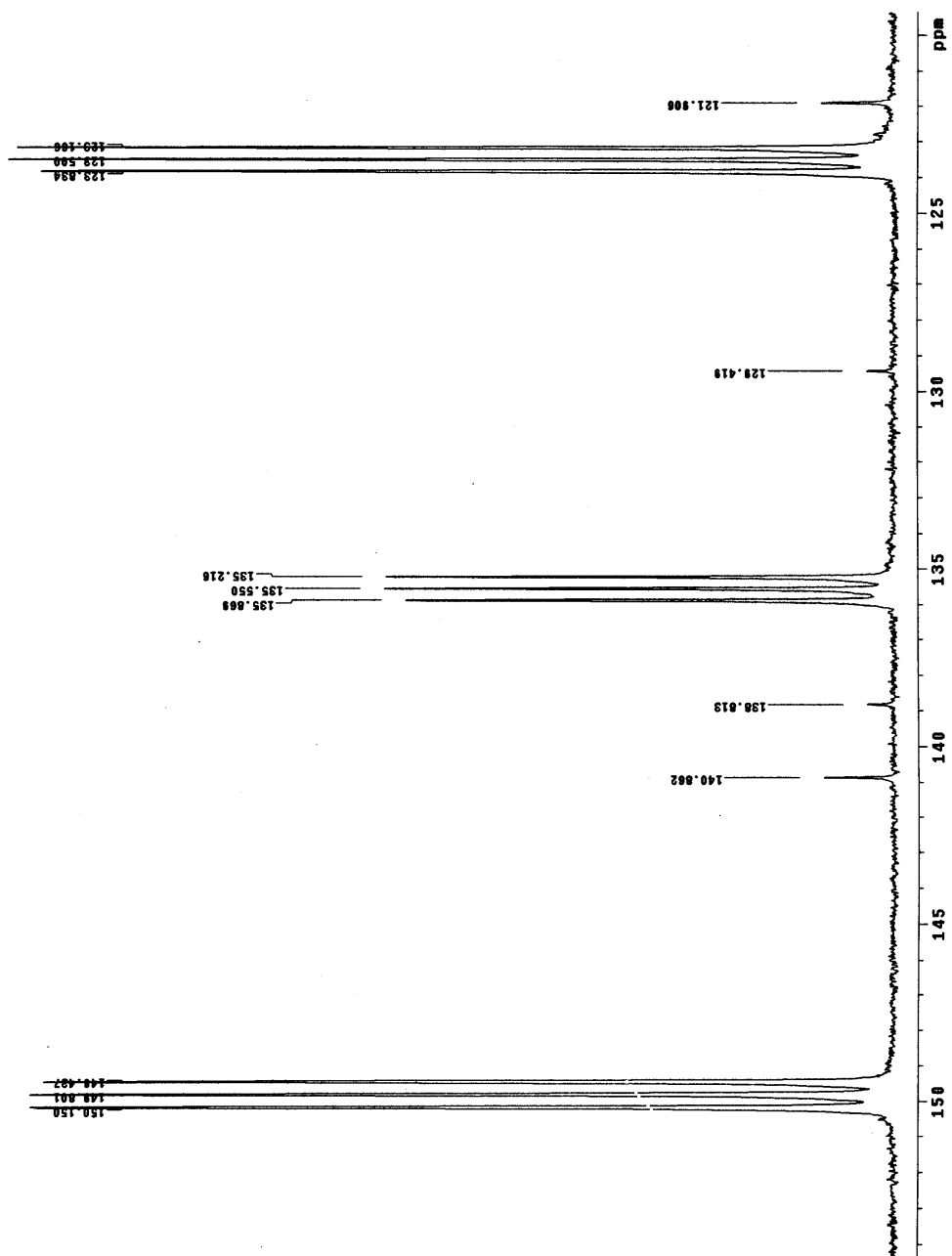


Figura 40- Expansão do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, piridina- d_5) de S8 + S9.

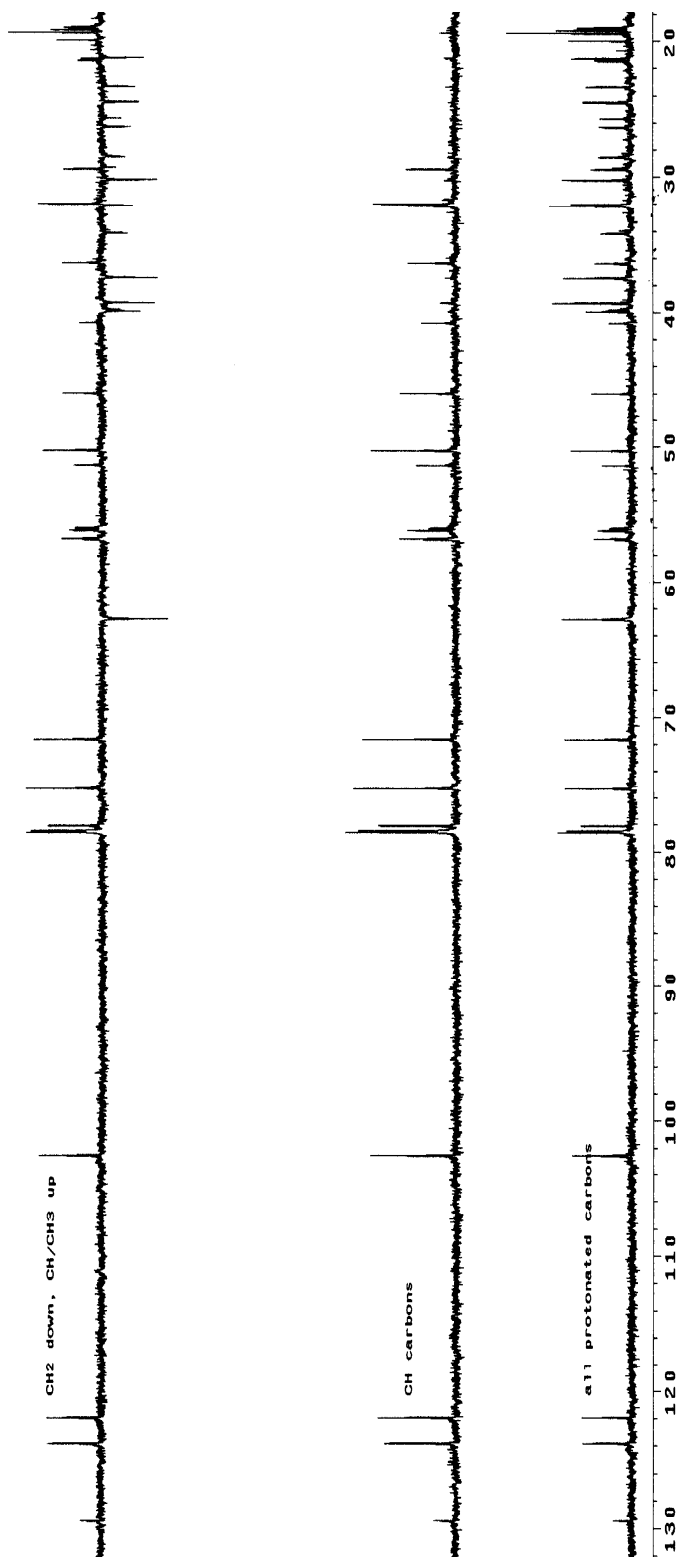


Figura 41- Espectro de DEPT de S8 + S9.

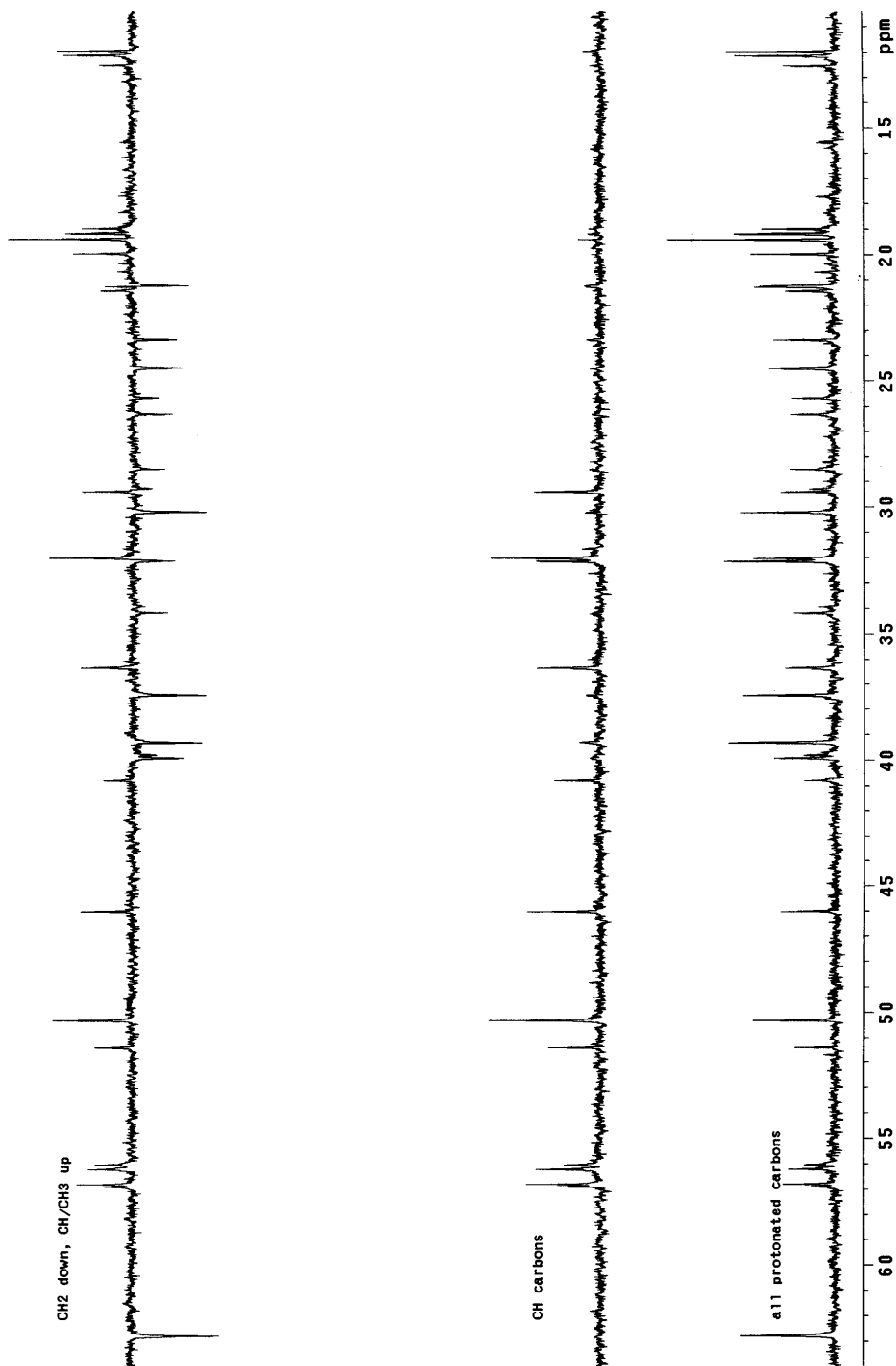


Figura 42- Expansão do espectro de DEPT de S8 + S9.

4.1.5- Substância S10

A substância **S10** foi identificada como a flavona tricina (3',5'-dimetóxi-7,5,4'-triidroxiflavona) cuja estrutura encontra-se representada abaixo (Figura 43).

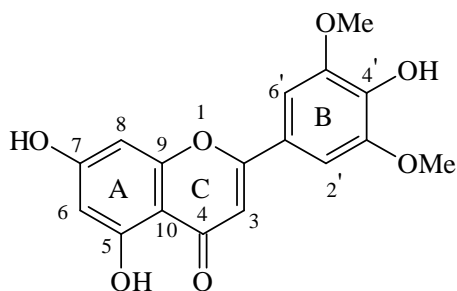


Figura 43- Estrutura da flavona tricina (**S10**)

O espectro de RMN ^1H de **S10** (Figuras 44 e 45, p. 95 e 96) apresenta dois duplos dupletos (acoplados em meta) em δ_{H} 6,20 ($J=1,8$ Hz) e δ_{H} 6,56 (d, $J=1,8$ Hz), um singlete em δ_{H} 12,96, referente ao hidrogênio de uma hidroxila quelada à carbonila, além de um singlete em δ_{H} 7,32 (2H) atribuído a átomos de hidrogênios equivalentes de anel aromático, um singlete em δ_{H} 3,88 (6H) hidrogênios de duas metoxilas aromáticas equivalentes e um singlete em δ_{H} 6,99 (1H) de um hidrogênio olefínico. Esse conjunto de sinal caracteriza a presença de uma 5-hidróxi-3',5'-dimetoxiflavona com substituições nas posições 7 e 4'. A ausência de outros sinais é indicativo que grupos hidroxilas estão ligadas nas posições 7 e 4'.

No espectro de RMN ^{13}C de **S10** (Figura 46, p. 97) são observados 13 sinais (Tabela 8, p. 94). O sinal em δ_{C} 56,6 é referente aos carbonos das metoxilas equivalentes (OCH_3 , C3' e C5'). Os sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 94,5 e δ_{C} 104,5 são típicos de carbonos aromáticos não oxidados; os sinais entre δ_{C} 139,7 e δ_{C} 164,7 são típicos de carbonos aromáticos oxidados e o sinal em δ_{C} 182,1 é referente ao carbono da carbonila C-4 de uma flavona.

O DEPT (Figura 47, p. 98) confirma a presença das duas metoxilas equivalentes, e quatro sinais de carbonos metínicos aromáticos.

O espectro de COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (Figura 48, p. 99) confirma o acoplamento dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,20 (H-8) e em δ_{H} 6,56 (H-6) entre si, assim como mostra que os sinais em δ_{H} 7,32 (H-2'/H-6') referentes aos hidrogênios do anel **B** e em δ_{H} 6,99 (H-3), não apresentam acoplamento.

O espectro de HETCOR (Figura 49, p.100) mostra quatro correlações sendo: duas correlações em δ_H 6,20 (H-8) e δ_H 6,56 (H-6) com os sinais em δ_C 99,2 (C-8), e δ_C 94,5 (C-6), respectivamente. Uma correlação entre o sinal em δ_H 6,99 (H-3) com o sinal em δ_C 103,8 (C-3) e a correlação do sinal em δ_H 7,32 (H-2'/H-6') com o sinal em δ_C 104,5 (C-2' e C-3'), confirmando as atribuições já discutidas anteriormente.

O espectro de HMBC (Figuras 50, 51 e 52, p.101, 102 e 103) apresenta as seguintes correlações: o sinal em δ_H 7,32 (s, H-2'/H-6') correlaciona-se com os sinais em δ_C 164,68 (C-2) e em δ_C 139,70 (C-4') a 3J e com os sinais em δ_C 120,68 (C-1') e em δ_C 148,46 (C-3'/C-5') a 2J . A correlação do singlete em δ_H 6,99 (s, H-3) com o sinal em δ_C 164,2 a 2J , reforça esta atribuição já assinalada ao sinal referente ao carbono C-2, o sinal de H-3 correlaciona-se também a 2J com sinal em δ_C 182,07 referente ao C-4 (carbono carbonílico) e mostra uma correlação a 3J com o sinal em δ_C 120,68 (C-1'). A correlação do duplete em δ_H 6,56 (H-6) com os sinais em δ_C 103,90 e em δ_C 99,21 a 3J define as posições do carbono C-10 e reforça o assinalamento ao carbono C-8, a correlação de H-6 com os sinais em δ_C 157,57 e δ_C 163,97 a 2J , define as posições dos carbonos C-5 e C-7, respectivamente. O duplete em δ_H 6,20 (H-8) correlaciona-se com o sinal em δ_C 161,65 (C-9) a 2J e em δ_C 103,90 (C-10) a 3J . Na Tabela 8 (p. 94), encontram-se os dados de RMN 1D e 2D da substância **S10**.

Os sinais dos carbonos C-6 e C-8, assim como os sinais dos carbonos C-10 e C-1', encontram-se invertidos com os valores atribuídos da literatura, em relação aos valores assinalados de acordo com as correlações 2 D obtidas neste trabalho.

Tabela 8. Dados de RMN 1D e 2D (300 MHz e 75 MHz, DMSO- d_6) da substância **S10** (BHATTACHARYYA et al, 1978).

	δ_C	DEPT	δ_H	HETCOR	HMBC		δ_C
				J_{CH}	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	
2	164,6	C	-	-	H-3	H2'/H3'	164,6
3	103,8	CH	6,99 (1H,s)	H-3	-	-	103,6
4	182,0	C	-	-	H-3	-	181,6
5	157,6	C	12,06 (1H,s)	-	H-6	-	157,2
6	94,5	CH	6,56 (1H,d, $J=1,8$)	H-6	-	-	98,8**
7	163,9	C	-	-	H-6	-	163,5
8	99,2	CH	6,20 (1H,d, $J=1,8$)	H-8	-	H-6	94,1**
9	161,6	C	-	-	H-8	-	161,3
10	103,9	C	-	-	-	H-6/H-8	120,8**
1'	120,6	C	-	-	H2'/H6'	H-3	139,7**
2',6'	104,5	CH	7,32 (2H,s)	H2'/H6'	-	-	104,3
3',5'	148,4	C	-	-	H2'/H6'	-	148,0
4'	139,7	C	-	-	-	H2'/H6'	164,0
OMe	56,6	CH ₃	3,88(6H,s)	-	-	-	56,3

*Bhattacharyya et al, 1978 (DMSO- d_6)

**Sinais de carbonos assinalados de acordo com as correlações 2D, invertidos com os valores atribuídos da literatura.

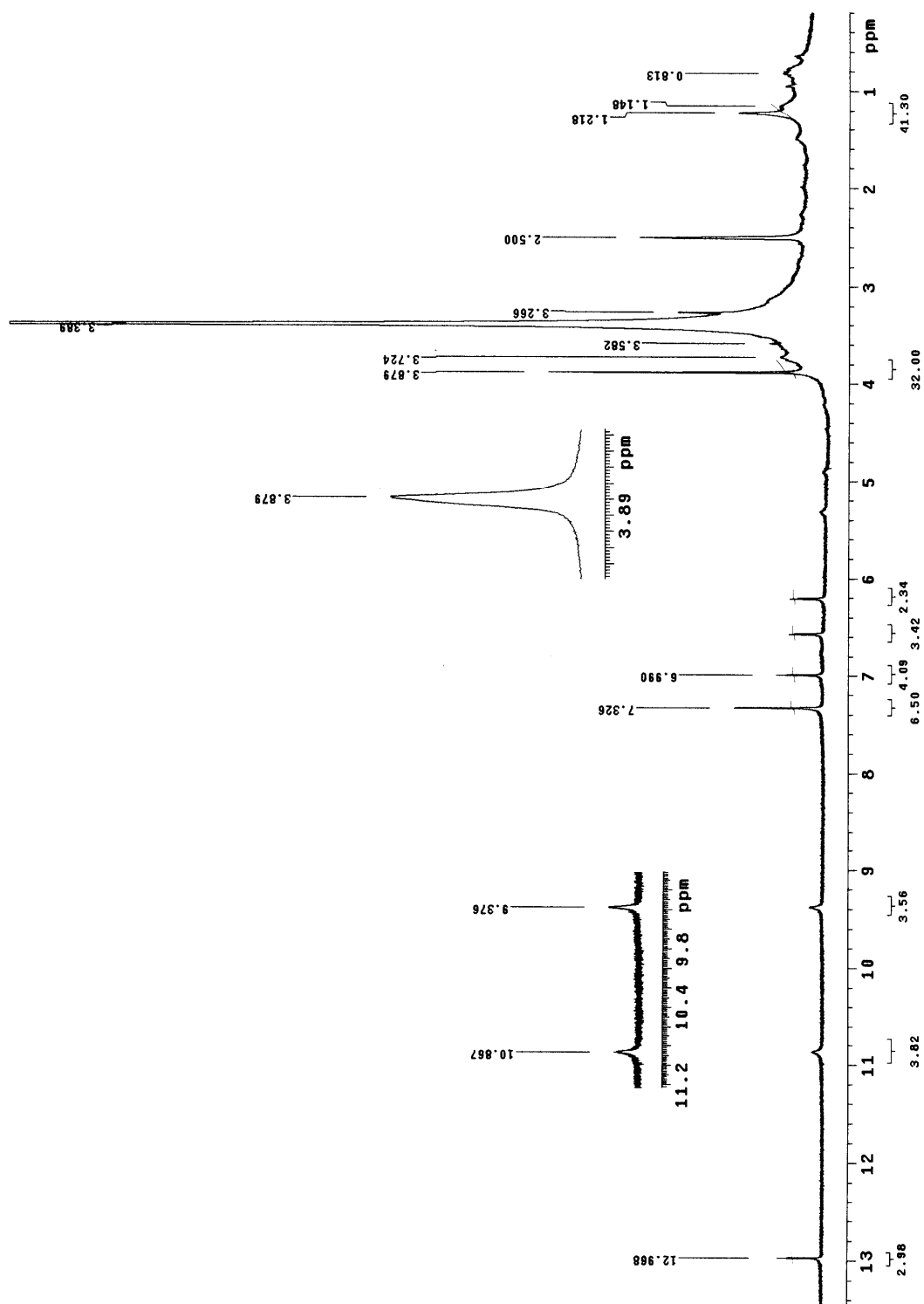


Figura 44- Espectro de RMN^1H (300 MHz, DMSO-d_6) de S10.

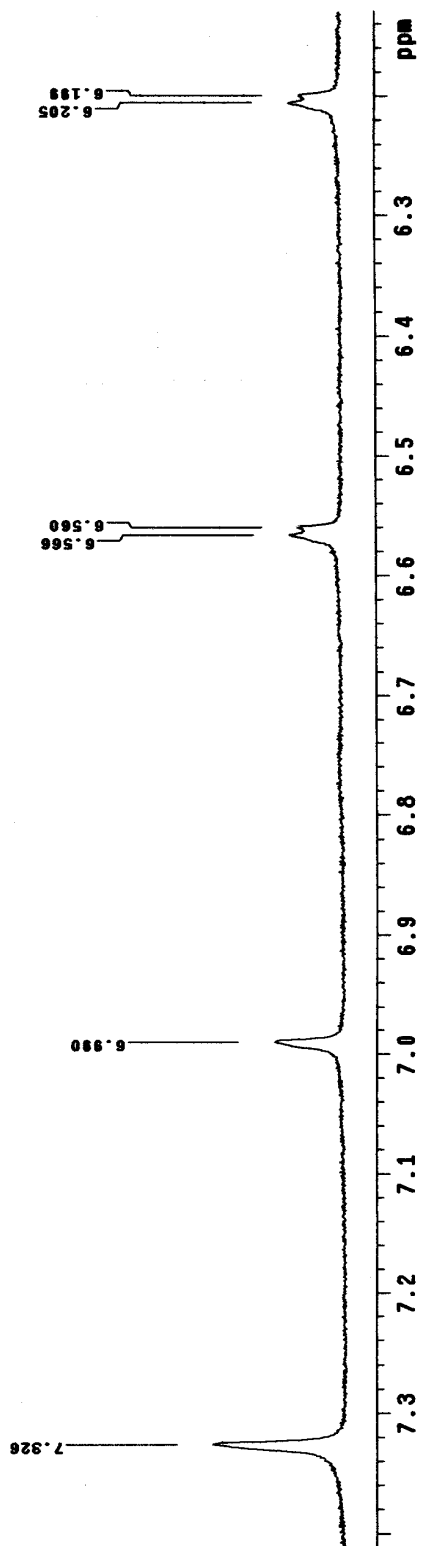


Figura 45- Expansão do espectro de RMN^1H (300 MHz, DMSO-d_6) de S10.

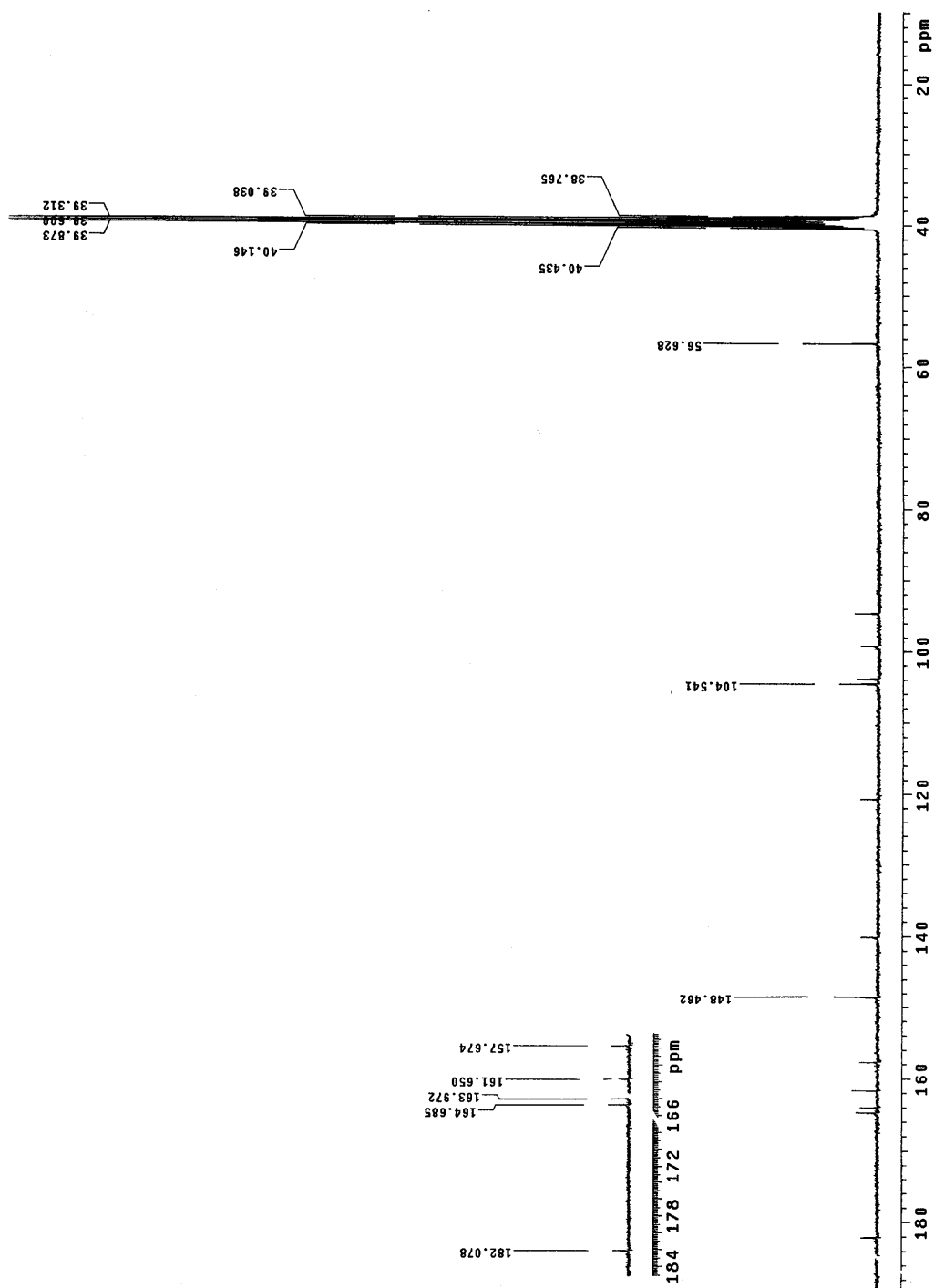


Figura 46- Espectro de RMN¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) de S10.

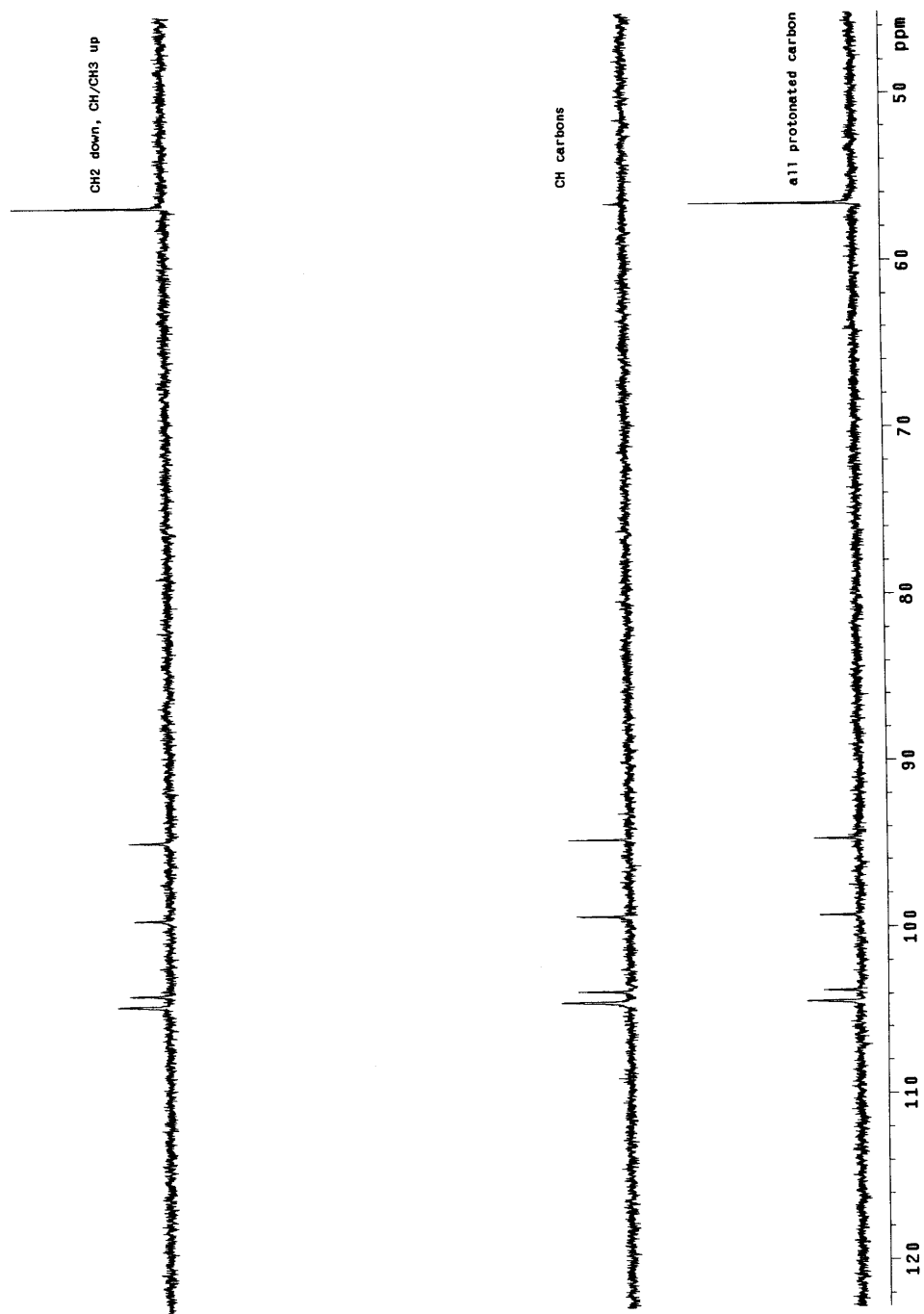


Figura 47- Espectro de DEPT de S10.

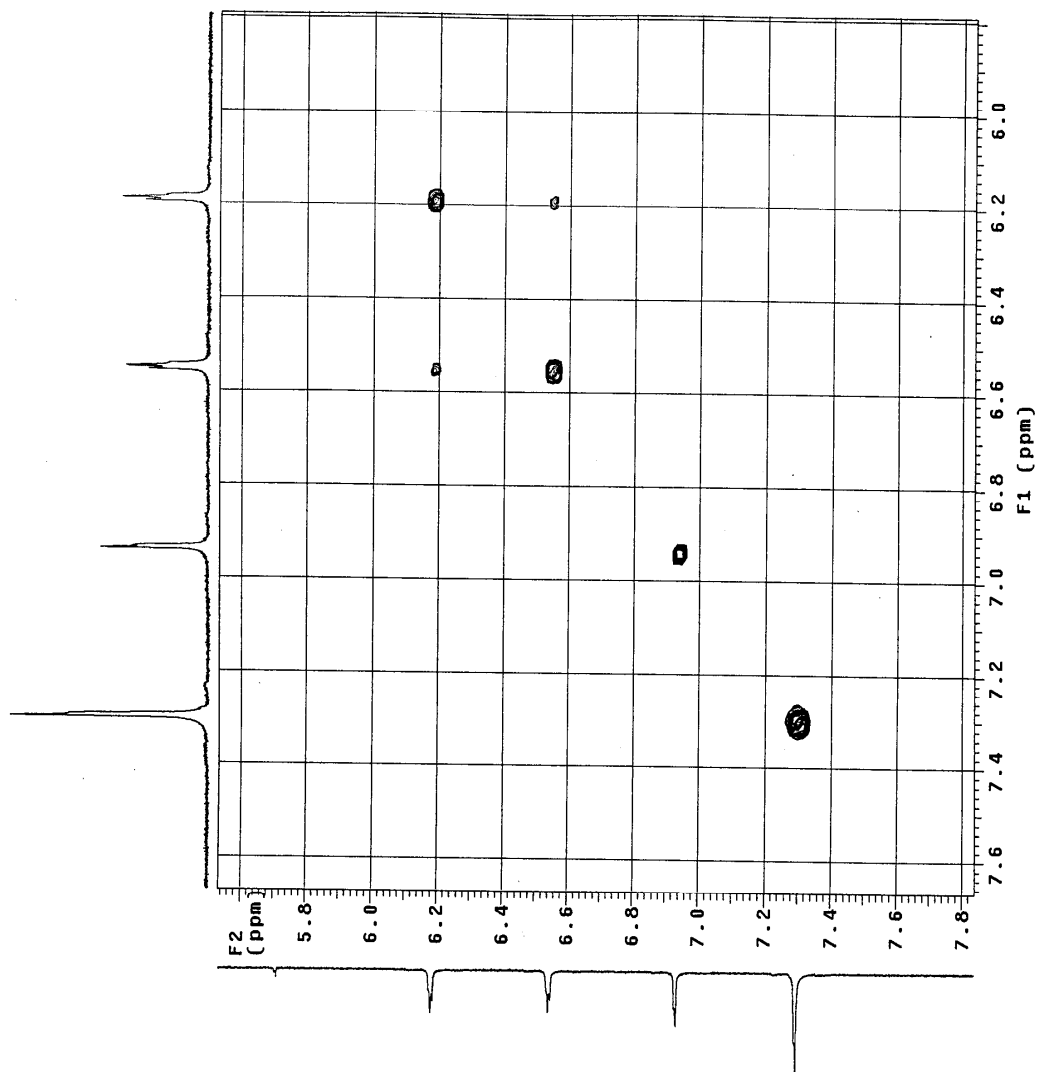


Figura 48- Espectro de COSY de S10.

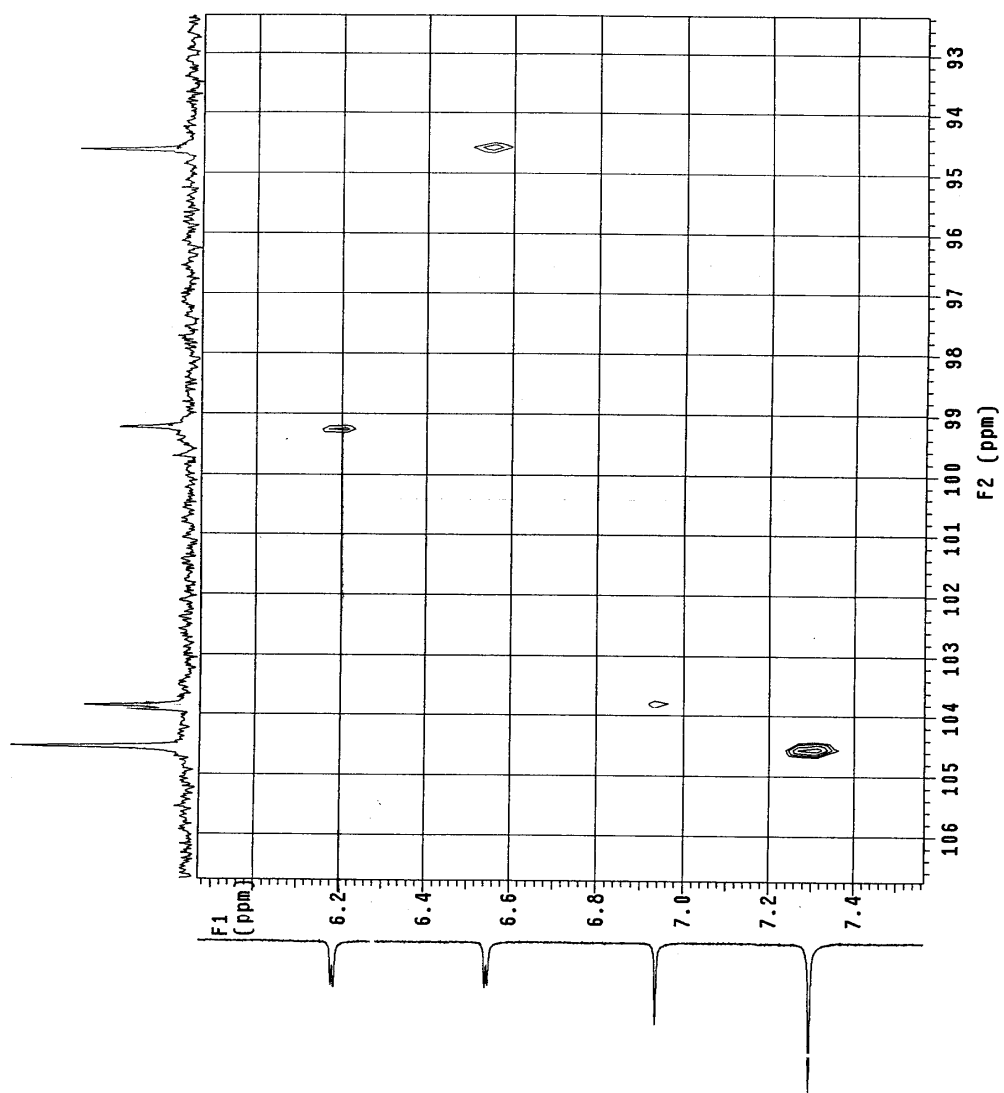


Figura 49- Espectro de HETCOR de S10.

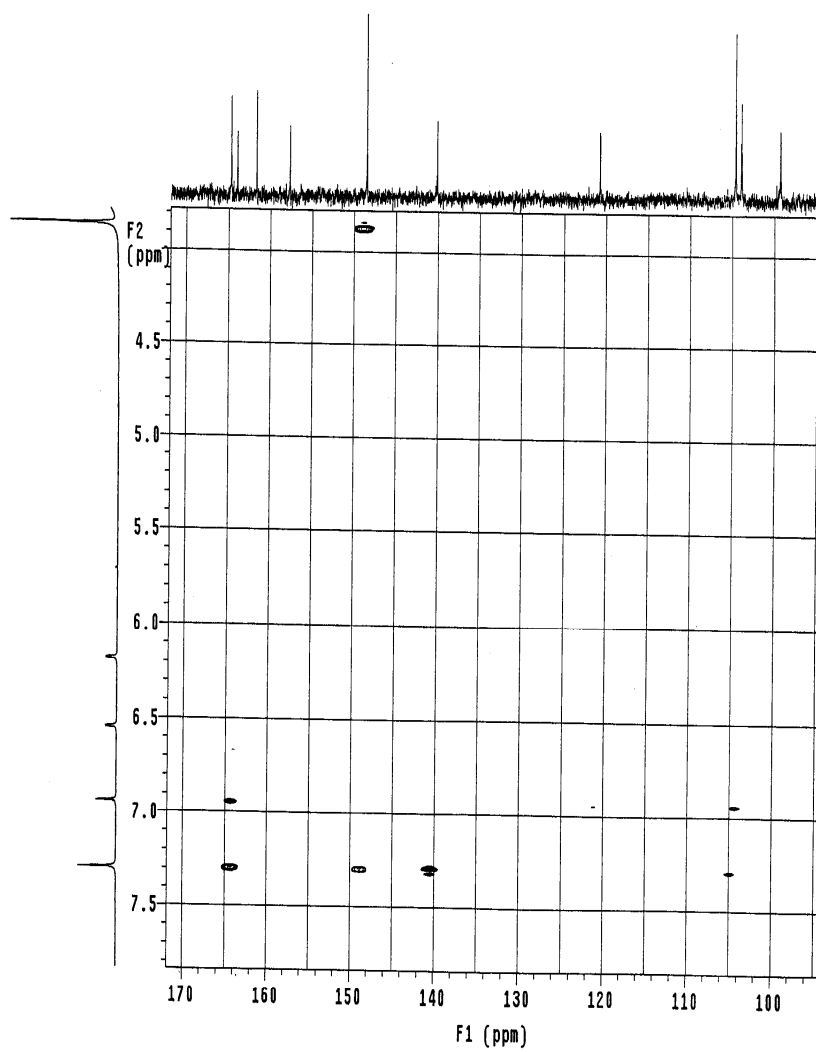


Figura 50- Espectro de HMBC de S10.

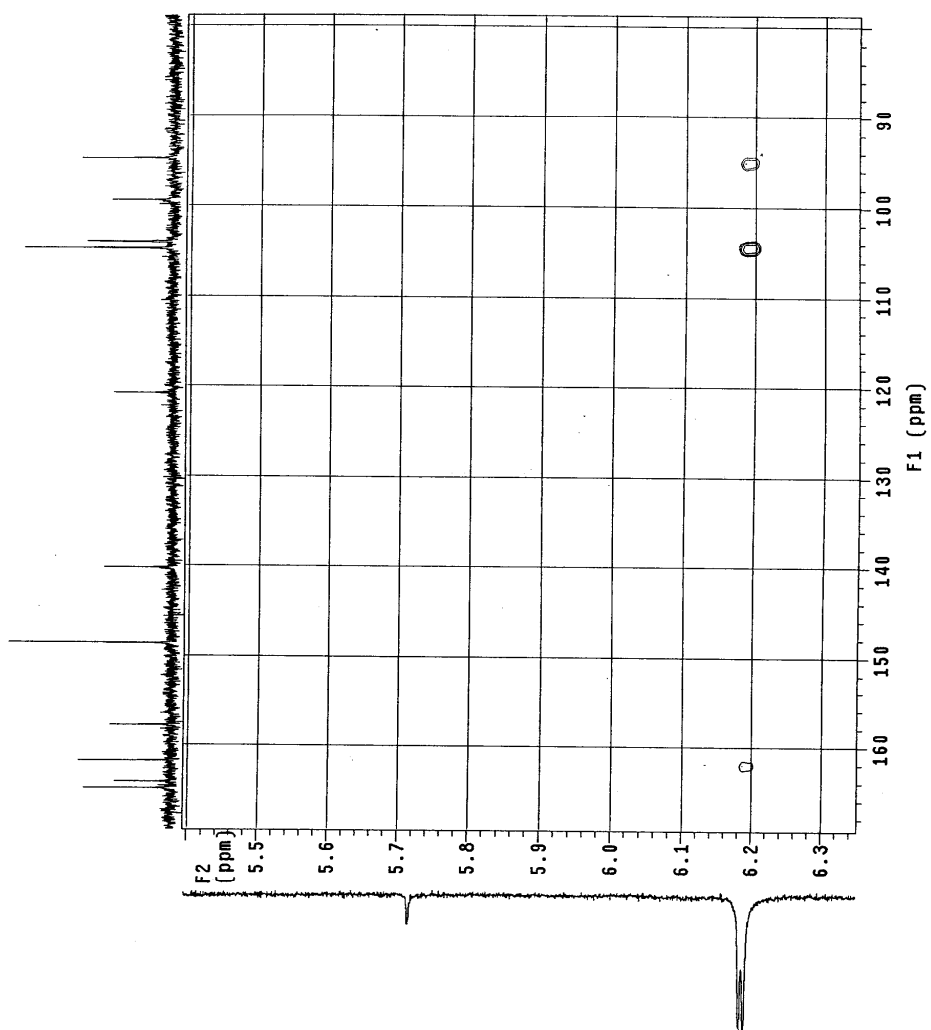


Figura 51- Expansão do espectro de HMBC de S10.

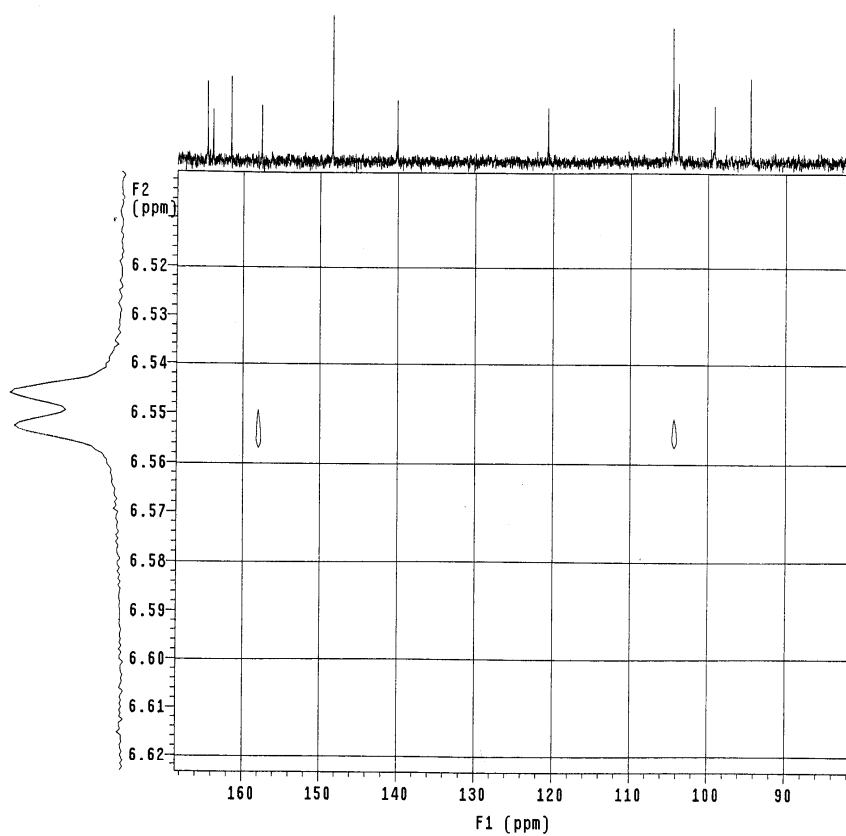


Figura 52- Expansão do espectro de HMBC de S10.

4.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DA BIOMASSA PRODUZIDA PELO FUNGO *Aspergillus Flavus* NO CULTIVO EM CZAPEK E ARROZ

4.2.1- Misturas das substâncias S11 + S12

As substâncias da mistura **S11** + **S12** (Figura 53) pertencem à classe de esteróides. Neste trabalho foram isoladas do cultivo em meio líquido (Czapek) e meio sólido (arroz). O ergosterol e o peróxido de ergosterol são esteróides bastante comuns nos fungos, fazendo parte da sua estrutura celular. Os esteróides derivam do cicloartenol quando biossintetizados por plantas e do lanosterol quando biossintetizados por animais e fungos (DEWICK, 2001).

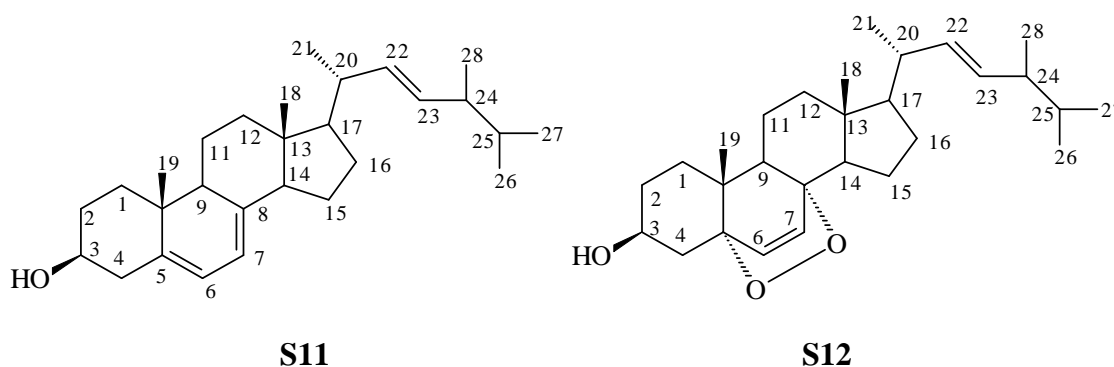


Figura 53- Estruturas do ergosterol (**S11**) e peróxido de ergosterol (**S12**)

A análise dos espectros de RMN ^1H da mistura para a substância **S11** (Figuras 54 e 55, p. 107 e 108) evidencia a presença de um multipeto centrado em δ_{H} 3,63 referente ao hidrogênio oximetínico H-3 e de um multipeto em δ_{H} 5,19 referente aos sinais dos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 de **S11** e **S12**. Observa-se ainda a presença de um dupleto em δ_{H} 5,36 ($J = 1,8$ Hz) atribuído ao H-7 e um dupleto largo em δ_{H} 5,56 atribuído ao H-6, ambos de **S11** apenas. Em δ_{H} 6,23 e δ_{H} 6,50, a presença de dois dupletos ($J = 8,4$ Hz) são referentes aos sinais dos hidrogênios H-6 e H-7 de **S12**, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C da mistura (Figuras 56 e 57, p.109 e 110) apresenta sinais de oito carbonos olefínicos em δ_{C} 116,2; δ_{C} 119,5; δ_{C} 130,9; δ_{C} 131,9; δ_{C} 135,5; δ_{C} 139,6 e δ_{C} 141,50 . Observa-se ainda a presença de um sinal em δ_{C} 70,42 atribuído ao carbono oximetínico C-3 de **S11** e em δ_{C} 66,40; δ_{C} 79,42 e δ_{C} 82,13 sinais referentes aos carbonos C-3, C-8 e C-5 oximetínicos de **S12**. A comparação com os dados da literatura (MARINHO,

MARINHO & RODRIGUES FILHO, 2007), confirma que a mistura de substância **S11** e **S12** em questão tratam-se do ergosterol e do peróxido de ergosterol, respectivamente (Tabela 9, p. 106).

Tabela 9- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da mistura **S11** e **S12** em comparação com dados da literatura (MARINHO, MARINHO e RODRIGUES FILHO, 2007).

C	S11	*Lit.	S12	*Lit.
1	38,2	38,3	39,7	30,1
2	31,9	31,9	29,7	34,7
3	70,4	70,4	64,3	66,5
4	40,7	40,7	39,0	39,3
5	139,6	141,3	79,4	82,1
6	119,5	119,6	135,5	135,2
7	116,2	116,3	130,9	130,7
8	141,5	139,7	82,1	79,4
9	46,2	46,2	51,3	51,1
10	37,0	37,0	36,9	37,0
11	21,1	21,1	20,8	20,6
12	27,7	28,2	39,7	37,0
13	42,7	42,8	42,8	44,6
14	54,5	54,5	51,6	51,7
15	22,9	23,0	29,1	23,4
16	39,0	39,1	22,9	28,6
17	55,8	55,7	56,0	56,2
18	12,0	12,0	12,8	12,9
19	16,5	16,2	17,6	18,2
20	40,4	40,3	39,7	39,7
21	19,6	19,6	19,6	20,9
22	131,9	132,0	135,5	135,4
23	135,5	135,5	131,9	132,3
24	42,8	42,8	42,8	42,8
25	19,9	19,9	33,0	33,1
26	33,0	33,0	19,9	19,6
27	21,1	21,0	21,1	19,9
28	17,6	17,5	17,58	17,5

* MARINHO, MARINHO e RODRIGUES FILHO, 2007 (RMN ^{13}C , 50 MHz, CDCl_3).

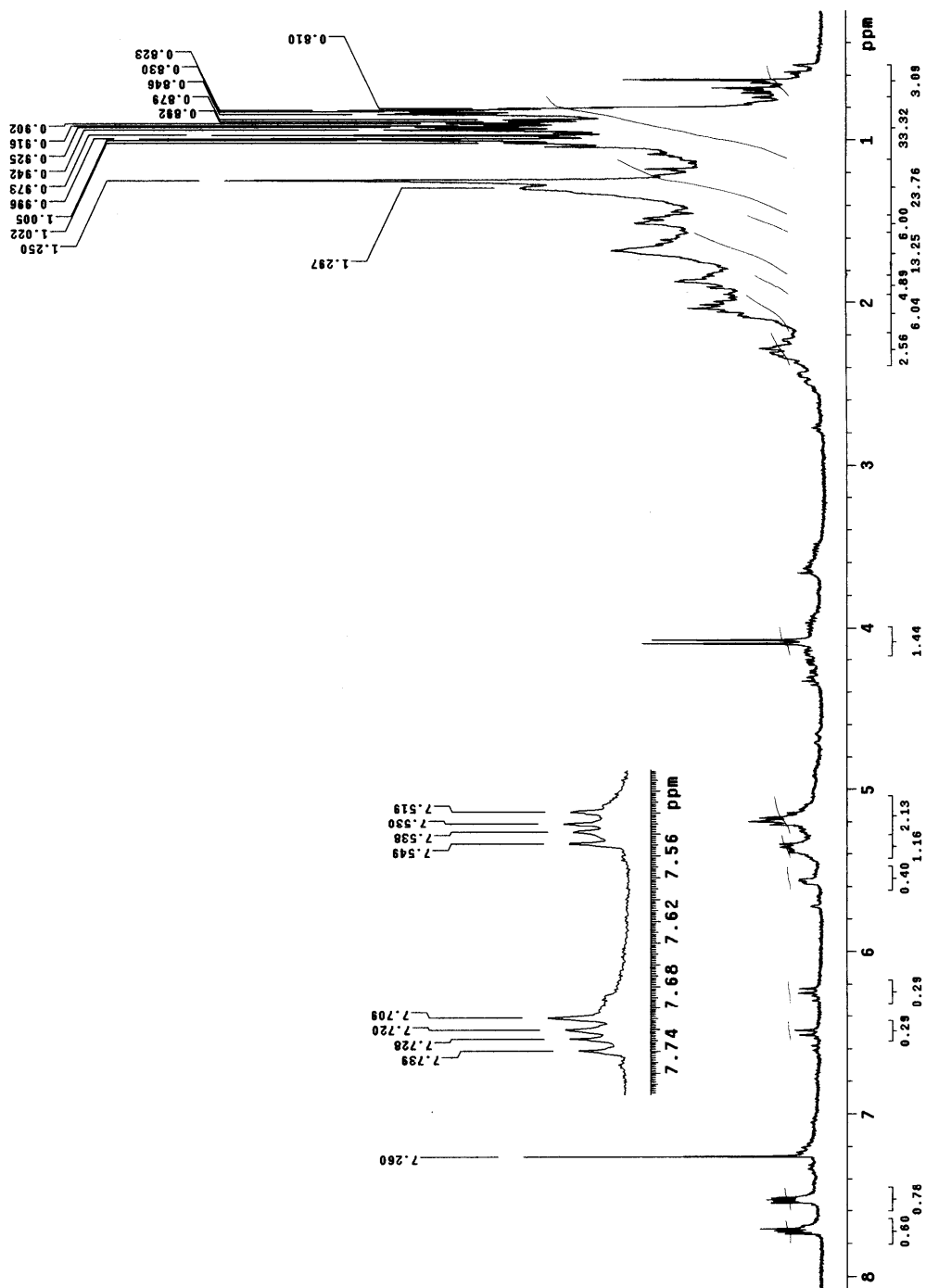


Figura 54- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S11 + S12.

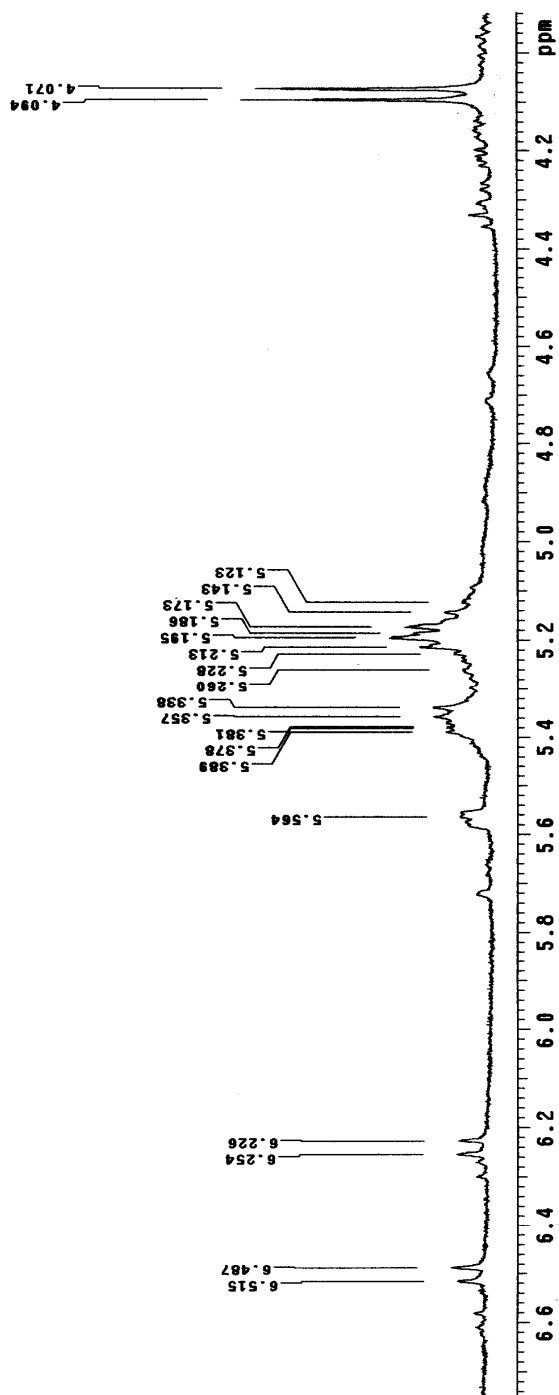


Figura 55- Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S11 + S12.

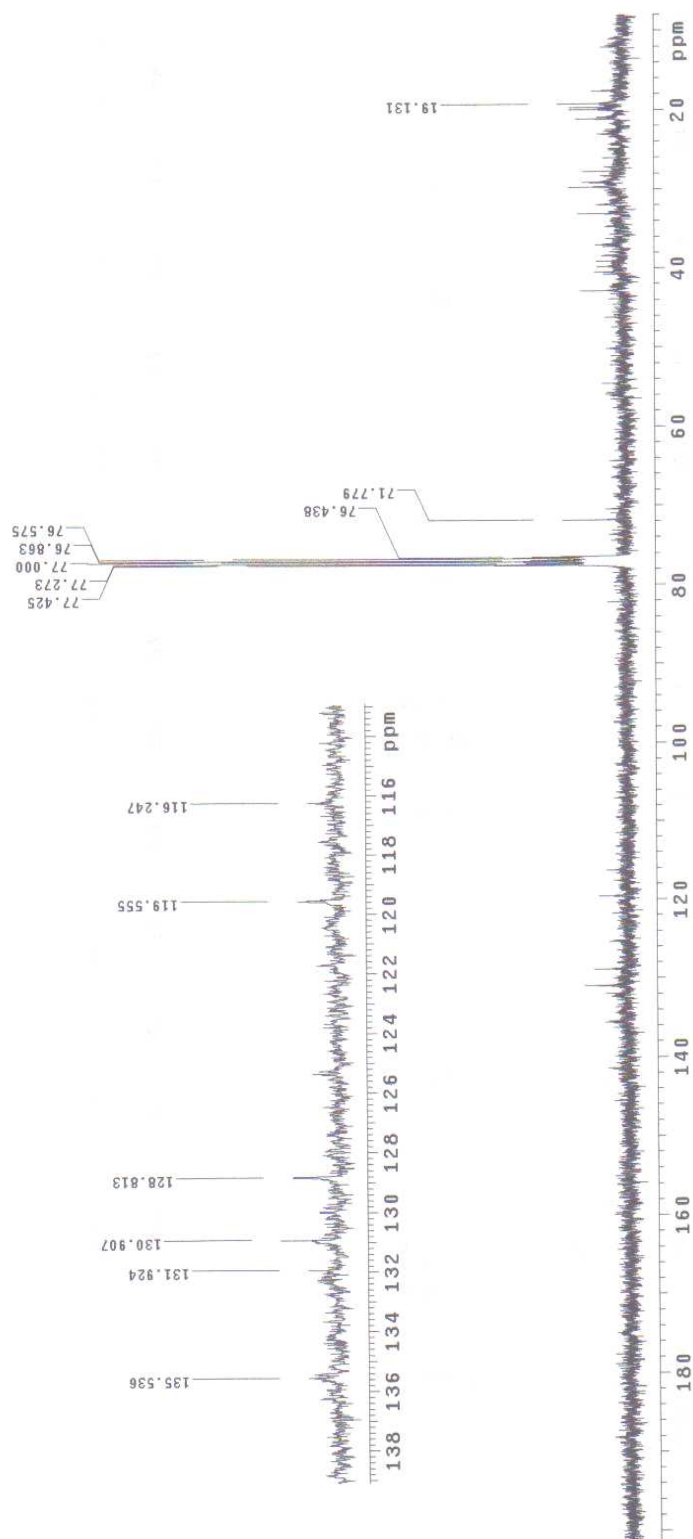


Figura 56- Espectro de RMN^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S11 + S12.

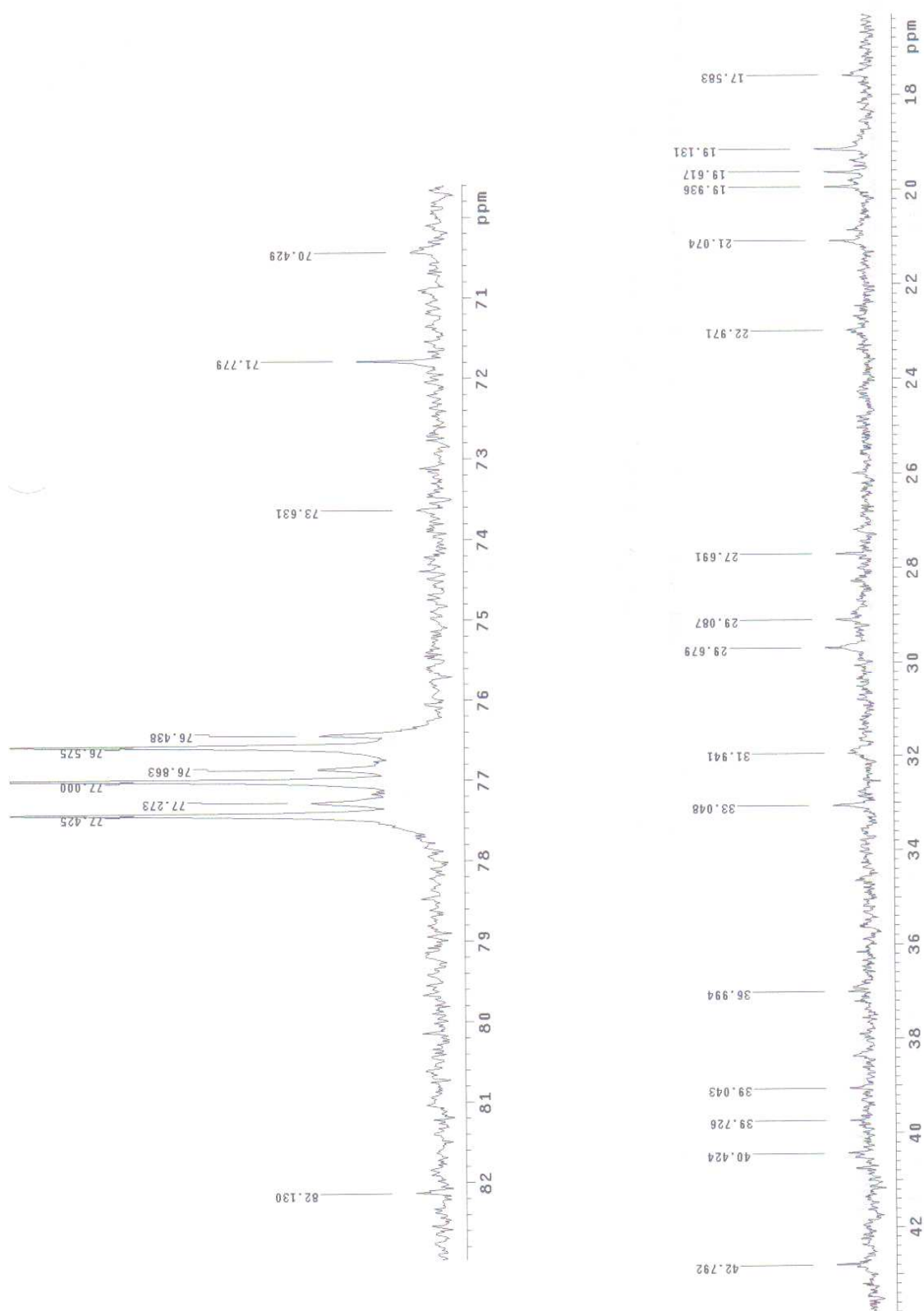


Figura 57- Expansão do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S11 + S12**.

4.2.2- Substância S13

A substância **S13**, identificada como ácido kójico (5-hidróxi-2-hidroximetil- γ -pirona, Figura 58) foi isolada como cristais na forma de agulhas de coloração branco-amarelada, a partir tanto do cultivo em Czapek, como em arroz. A substância é um agente quelante produzida por várias espécies de fungos, principalmente *Aspergillus oryzae*; é obtida também de um cogumelo japonês chamado koji. É um subproduto do processo e fermentação do malte de arroz, bastante utilizado no Japão para a fabricação do vinho de arroz japonês, o saquê (FUTAMURA et al., 2001). Apresenta características como ligeiro inibidor da formação de pigmento nos tecidos animais e vegetais, sendo, por isso, utilizado em alimentos e cosméticos, para preservar ou alterar as cores das substâncias (VARGA et al., 2003) como exemplo, em frutas cortadas para evitar escurecimento oxidativo, em mariscos para preservar cores rosa e vermelho e, em cosméticos, para retirar manchas da pele (GOMES et al., 2001). No mercado de cosméticos, o ácido kójico é citado como um dos despigmentantes naturais mais eficientes, e por isso, tem sido muito usado com excelentes resultados. A vantagem desse produto está na suavidade de ação sobre a pele, não causando irritação nem fotossensibilização no usuário, possibilitando seu uso até mesmo durante o dia. Além disso, o ácido kójico não oxida como muitos clareadores cutâneos e pode ser associado ao ácido glicólico. Sua atuação é inibindo a melanina, quelando os íons cobre e bloqueando a ação da tirosinase, acabando com as manchas (GOMES et al., 2001)

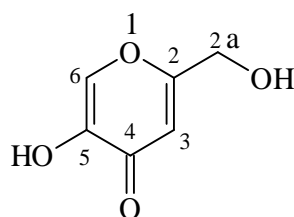
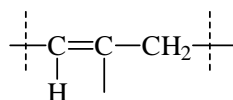


Figura 58- Estrutura do ácido Kójico (**S13**)

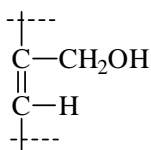
O espectro de RMN ^1H (Figuras 59 e 60, p.114 e 115) apresenta um singlete em δ_{H} 9,07 de um hidrogênio bastante desprotegido (OH, CHO ou COOH), um duplete largo em δ_{H} 4,28 (2H, $J=6,0$ Hz) referente a hidrogênios oximetilênicos, um triplete em δ_{H} 5,67 (1H, $J=6,0$ Hz), um triplete em δ_{H} 6,33 (1H, $J=0,9$ Hz) e um singlete em 8,03 (1H).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 61, p.116) apresenta seis sinais, dos quais apenas três são hidrogenados de acordo com dados de DEPT (Figura 62, p. 117): δ_{C} 59,6 de um carbono oximetilênico, em δ_{C} 109,9 e 139,3 de carbonos olefínicos. Os demais sinais correspondem a carbonos não hidrogenados: δ_{C} 174,0 de uma carbonila e 145,8 e 168,1 de carbonos olefínicos.

O espectro de COSY (Figuras 63 e 64, p.118 e 119) mostra picos de correlação entre os sinais em δ_{H} 4,28 e δ_{H} 5,67 e entre os sinais δ_{H} 4,28 e δ_{H} 6,33, indicativos de acoplamento entre um dos hidrogênios olefínicos e os hidrogênios oximetilênicos:

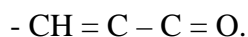


O espectro de HETCOR (figura 65, p.120) apresenta apenas três correlações bem evidentes: a correlação dos sinais em δ_{C} 59,5 com o sinal em δ_{H} 4,28 do grupo $\text{---CH}_2\text{O---}$; entre δ_{C} 109,91 e δ_{H} 6,33 e entre δ_{C} 139,34 e δ_{H} 8,03. O sinal em δ_{C} 5,67 (1H) não correlaciona com nenhum carbono, de onde se conclui que o hidrogênio correspondente está ligado a outro elemento, provavelmente um oxigênio. Assim a estrutura deve incluir a estrutura parcial



Ao analisar o espectro de HMBC (figura 66, p.121) é possível assinalar as correlações entre os sinais em δ_{H} 4,28 e δ_{C} 109,9 e em δ_{C} 168,17; do sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,67 com os sinais de carbono em δ_{C} 59,5 e em δ_{C} 168,1 e do sinal em δ_{H} 6,33 mostra correlação com os sinais de carbono em δ_{C} 59,6, δ_{C} 145,8 e em δ_{C} 174,0, além da correlação entre o sinal em δ_{H} 8,03 com os sinais em δ_{C} 145,8; δ_{C} 168,1 e em δ_{C} 174,0.

A partir desses dados pode-se inferir que a estrutura em questão tem seis carbonos que inclui duas ligações duplas trissubstituídas (uma delas em conjugação com uma carbonila) e um grupo CH₂O, como no grupo,



De acordo com as informações obtidas nos espectros de RMN uni e bidimensionais e em comparação com os dados da literatura, a substância **S13** trata-se do ácido kójico (HAMPDEN et al., 1999).

Na Tabela 10, estão apresentados os dados espectrométricos obtidos de **S13** em comparação com os dados da literatura.

Tabela 10- Dados de RMN 1D e 2D de **S13** em comparação com os dados da literatura (ZERINGUE et al., 1999)

C	δ S8 (DMSO- <i>d</i> ₆)						Lit*	
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	DEPT	COSY	HETCOR	HMBC		
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	168,17	C	-	-	H2a/H3	H-6	-
2a	4,28	59,64	CH ₂	OH(C2a)	H2a	H(OH/C2a)	-	4,28
	(d,2H,J=6,0Hz)							
-	5,67	-	-	2H(C2a)	-	-	-	5,67
	(t,OH,J=6,0Hz)							
3	6,33	109,91	CH	2H(C2a)	H3	-	H(C2a)	6,33
	(t,1H,J=0,9Hz)							
4	-	174,00	C	-	-	-	H6	-
5	9,07 (s, OH)	145,80	C	-	-	H6	H3	9,07
6	8,03(s, 1H)	139,34	CH	-	H6	-	-	8,03

* ZERINGUE, 1999 (RMN ¹H, 500 MHz, DMSO-*d*₆)

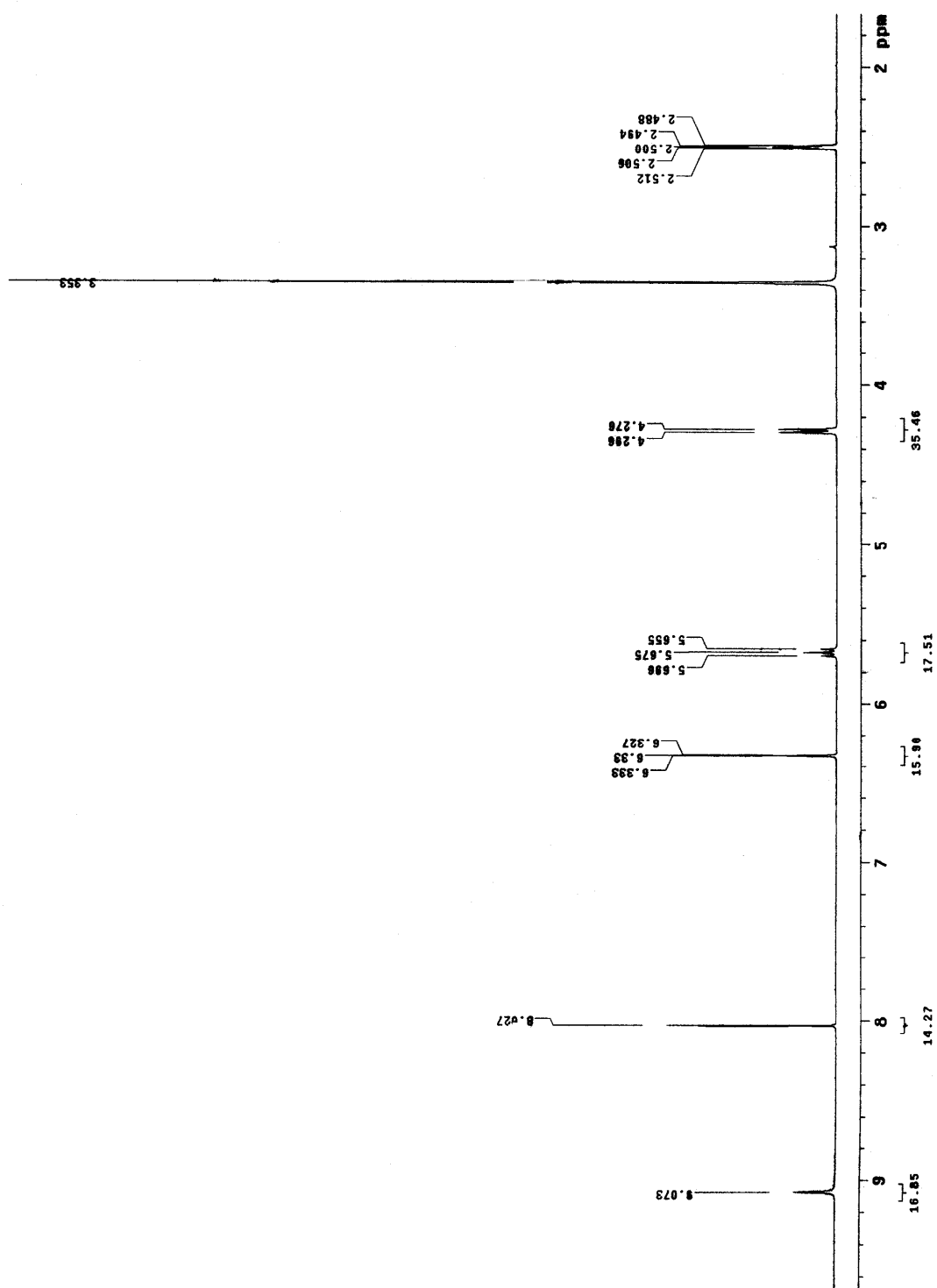


Figura 59- Espectro de RMN^1H (300 MHz, DMSO-d_6) de S13.

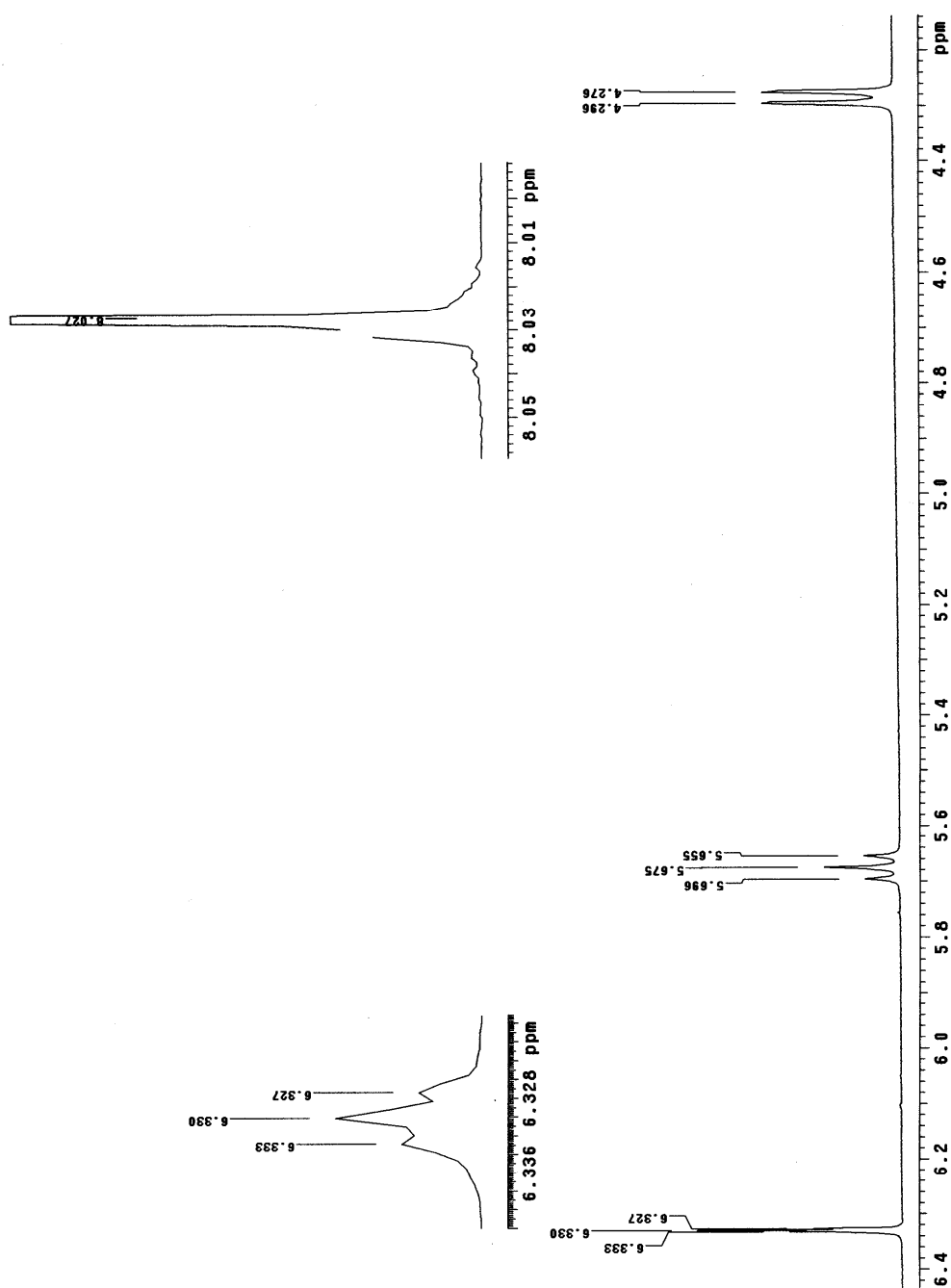


Figura 60- Expansão do espectro de RMN^1H (300 MHz, DMSO-d_6) de S13.

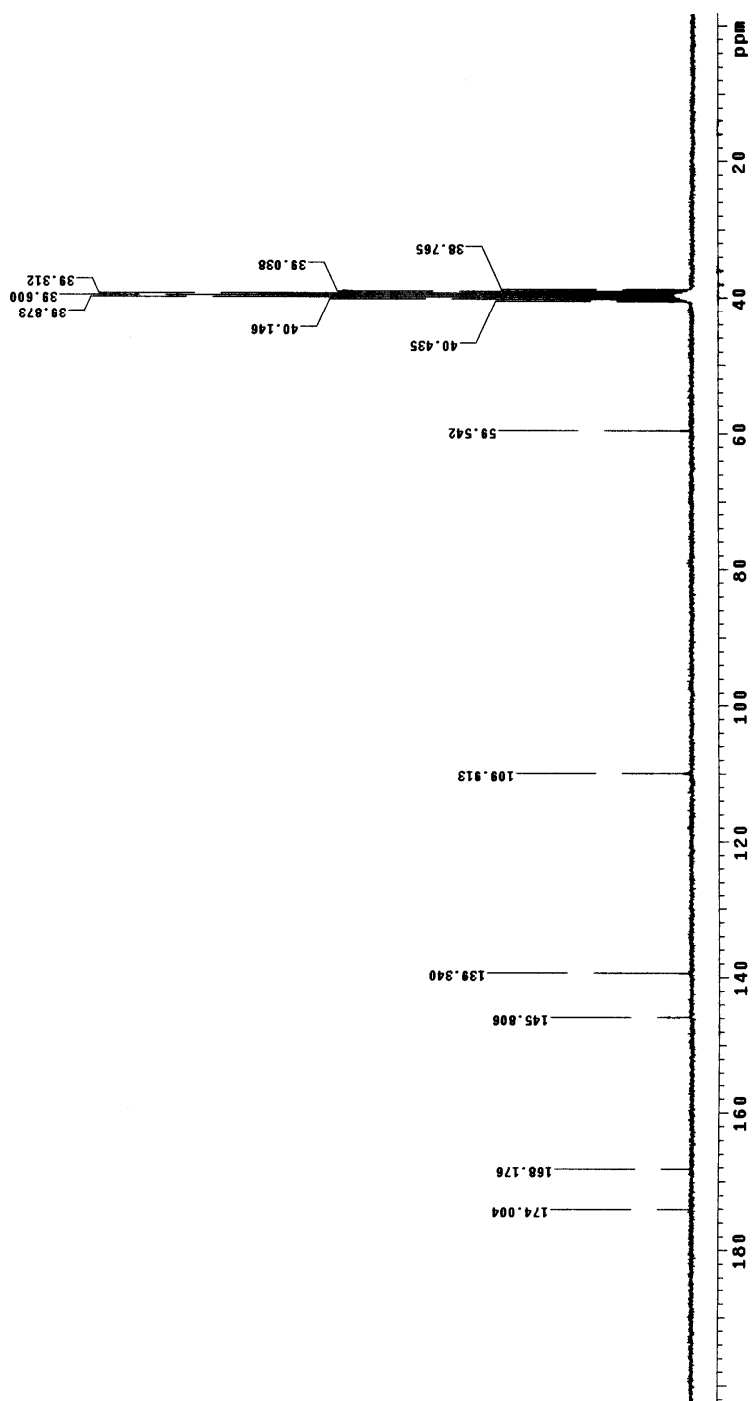


Figura 61- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) de S13.

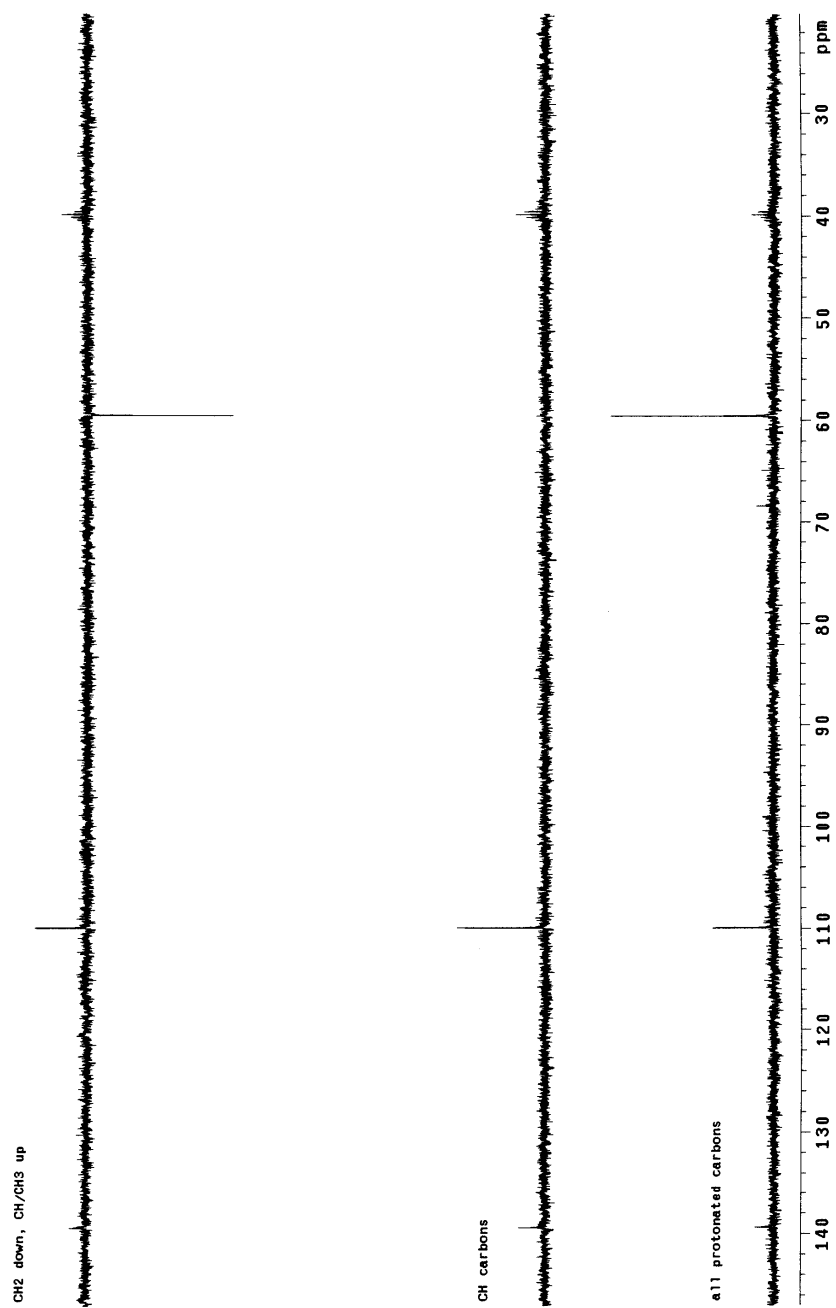


Figura 62- Espectro de DEPT de S13.

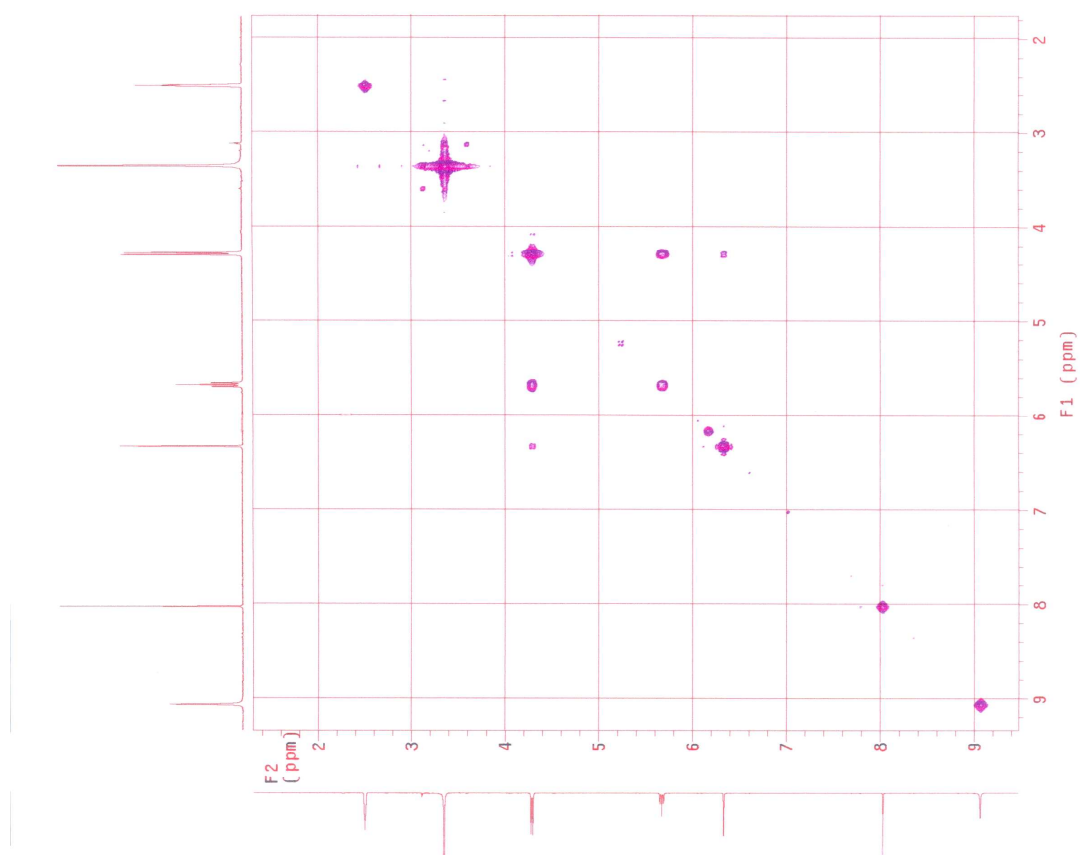


Figura 63- Espectro de COSY de **S13**.

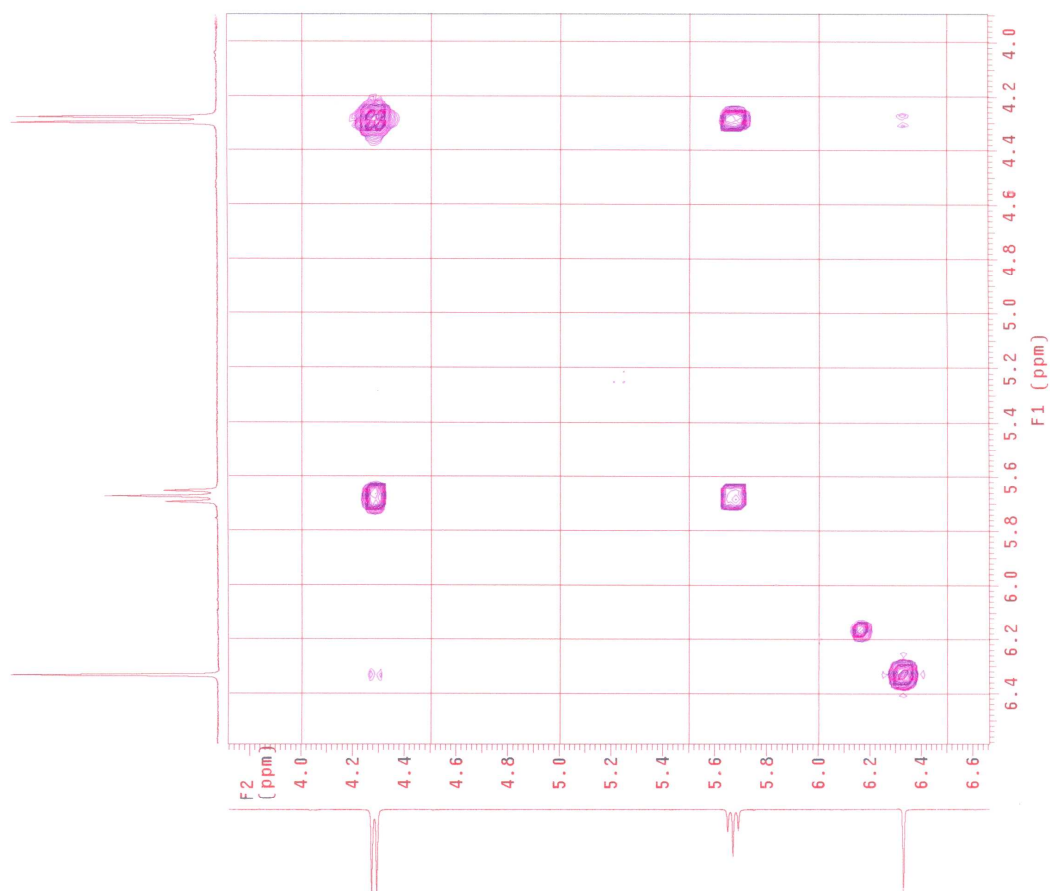


Figura 64- Expansão do espectro de COSY de S13.

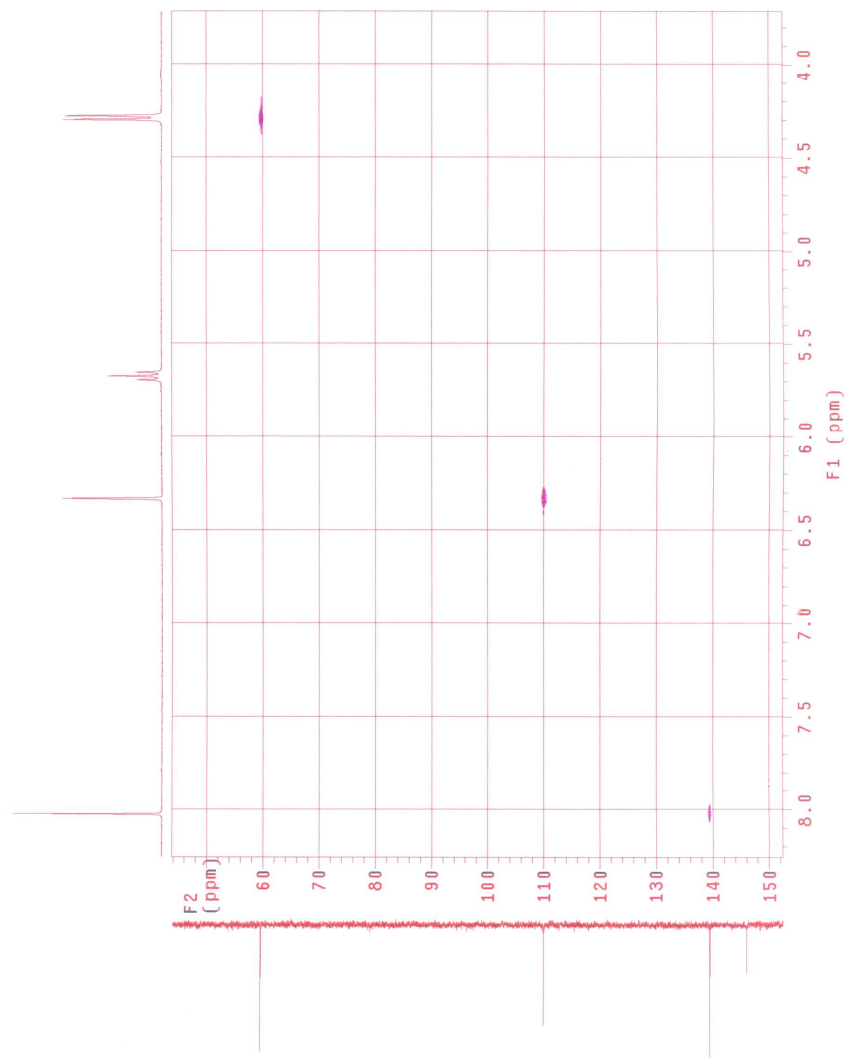


Figura 65- Espectro de HETCOR de S13.

A figura 66 apresenta as principais correlações observadas no espectro de HMBC para S13.

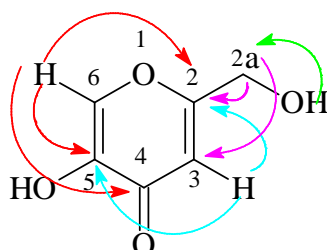


Figura 66- Principais correlações no espectro de HMBC para S13.

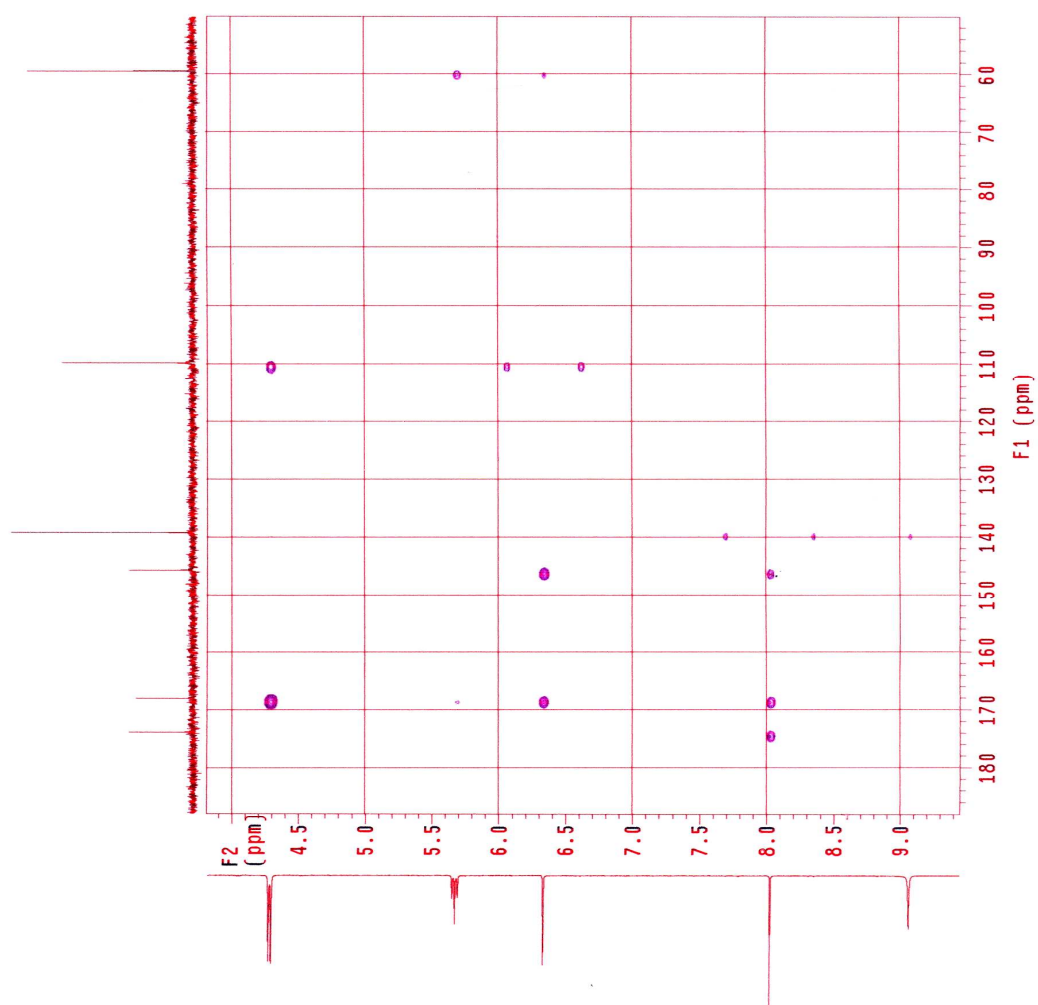


Figura 67- Espectro de HMBC de S13.

4.2.3- Substância S14

A substância **S14** (Figura 68) foi obtida em cultivo em meio sólido (arroz) e também em meio líquido, como cristais incolores em forma de agulhas e solúvel em água.

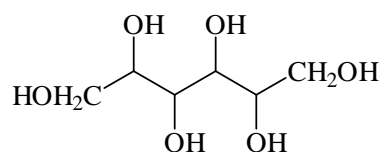


Figura 68- Estrutura química do dulcitol (**S14**)

O espectro de RMN ^1H de **S14** (Figura 69, p. 123), apresenta um conjunto de sinais na região de δ_{H} 3,50 a δ_{H} 3,78 atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos hidroxilados de açúcar ou derivado. A ausência de sinais em torno de δ_{H} 5,10 referentes aos hidrogênios anoméricos, dão indício de que o composto tem cadeia aberta, ou seja, é um alditol ou polioli.

No espectro de RMN ^{13}C de **S14** (Figura 70, p. 124), observam-se apenas três sinais. Ao comparar os dados de carbono de **S14** com os dados de RMN para a substância dulcitol (MARINHO, MARINHO e RODRIGUES FILHO, 2007) observam-se semelhanças de sinais (Tabela 11).

O espectro de DEPT (Figura 71, p. 125) apenas reforça a proposta estrutural de **S14**, pois mostra a presença de carbonos metínicos e metilênicos. O número de sinais observados tanto no espectro de carbono, quanto no espectro de DEPT é função da simetria existente em **S14** (MARINHO, MARINHO e RODRIGUES FILHO, 2007).

Tabela 11- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) de **S14**, comparados com os dados da literatura (MARINHO, MARINHO e RODRIGUES FILHO, 2007).

C	S14	*Lit.
	$\delta(\text{D}_2\text{O})$	$\delta(100 \text{ MHz, D}_2\text{O})$
1/6	62,8	63,2
2/5	68,8	69,3
3/4	70,3	70,9

*MARINHO, MARINHO e RODRIGUES FILHO, 2007

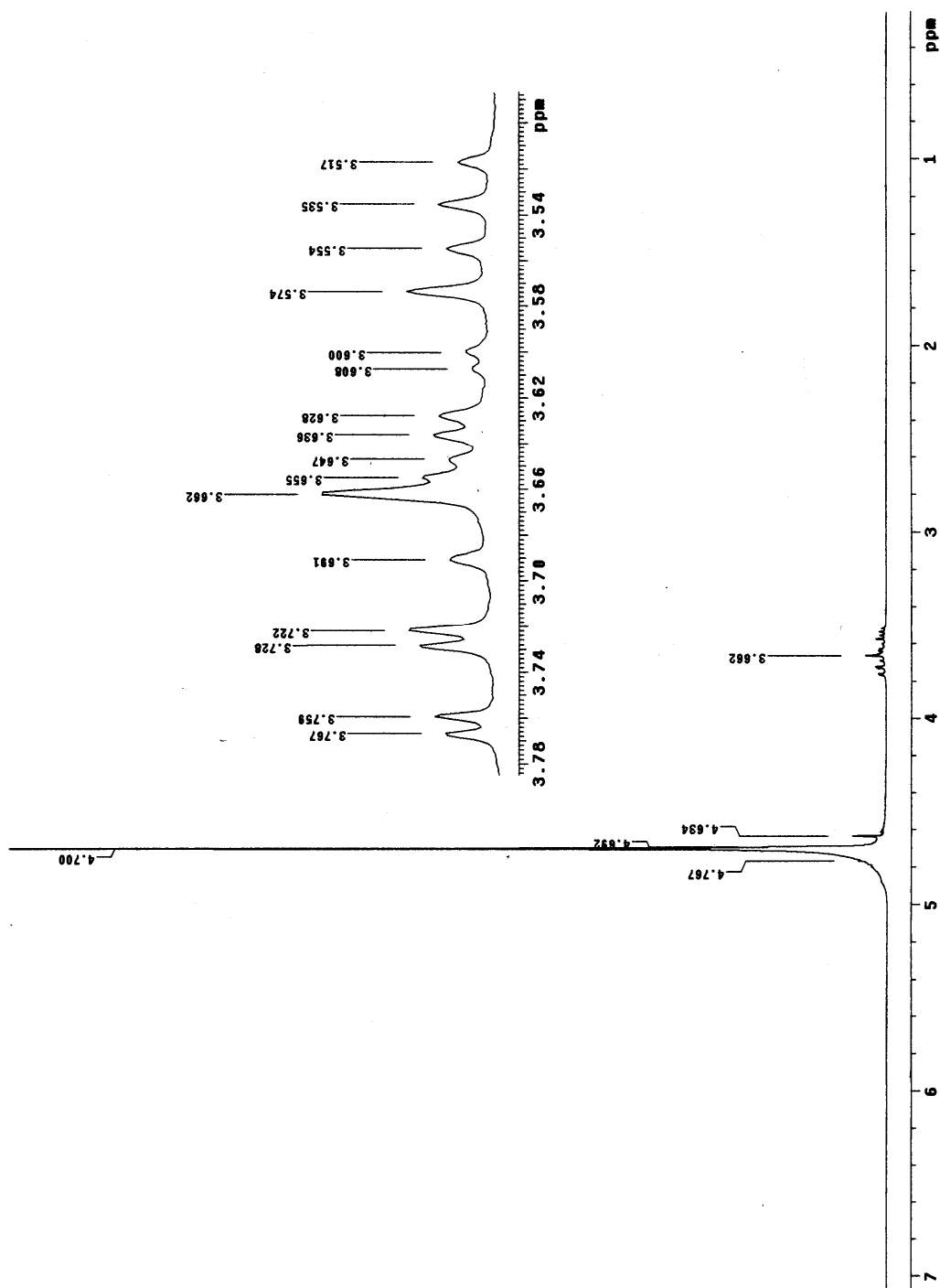


Figura 69- Espectro de RMN^1H (300 MHz, D_2O) de S14.

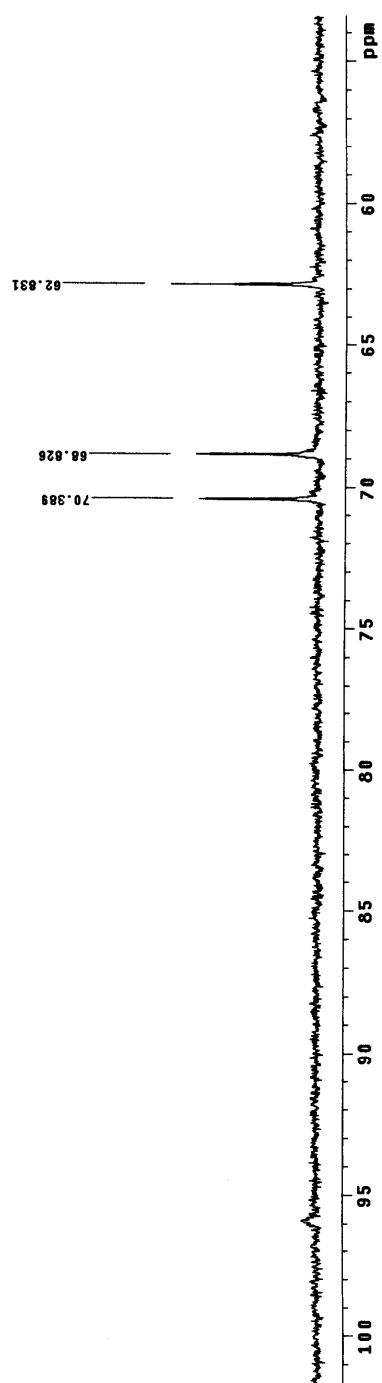


Figura 70- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, D $_2$ O) de S14.

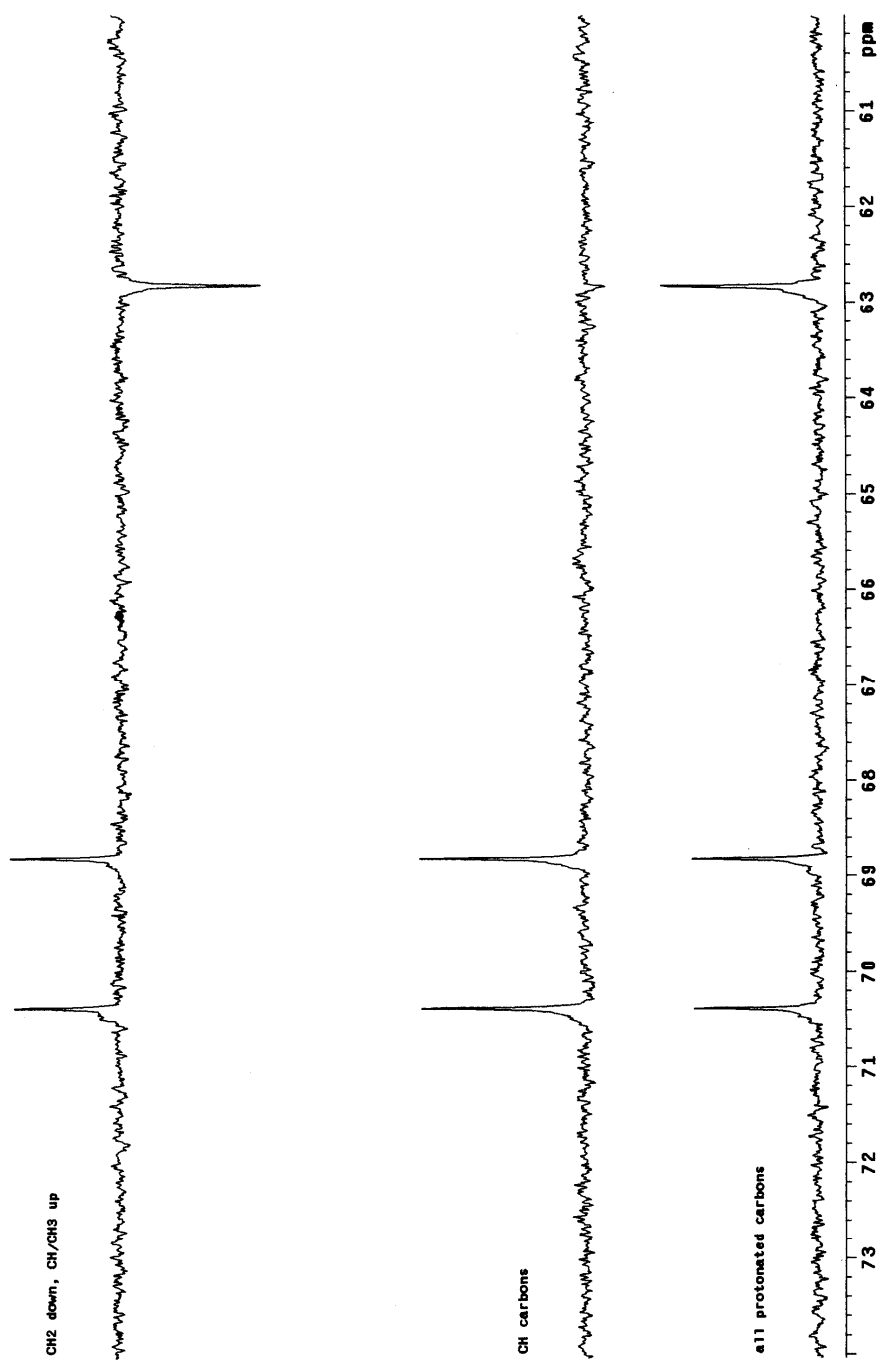
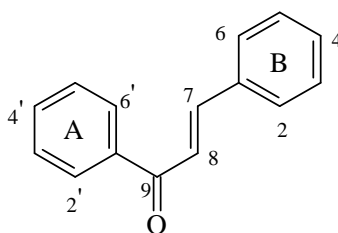


Figura 71- Espectro de DEPT de S14.

4.3. SUBSTÂNCIAS QUE FORAM SINTETIZADAS NESTE TRABALHO

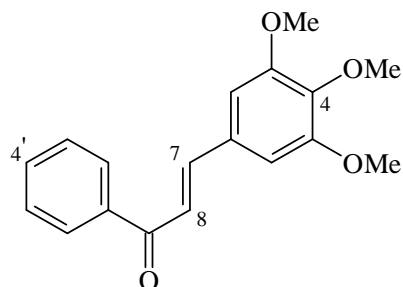
As substâncias **S1**, **S2**, **S3**, **S4** e o derivado **S5** foram sintetizadas neste trabalho com o objetivo de serem utilizadas como substratos nas reações de biotransformações, com o emprego do fungo *Aspergillus flavus*, isolado como endofítico das folhas e raízes de *Paspalum maritimum*. A escolha para que as chalconas e o derivado fossem utilizadas como substratos, foi como base no isolamento da flavona tricina (**S10**) das folhas de *Paspalum maritimum* no estudo químico, cuja classe pertence aos flavonóides, sendo as chalconas precursoras desta classe de substâncias. Foram identificadas com base na análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C e em comparação com dados encontrados na literatura.

4.3.1. Chalcona S1



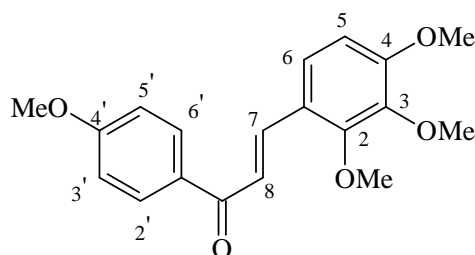
Os dados obtidos de RMN ^1H (Figura 72, p. 129) e ^{13}C (Figura 73, p. 129) de **S1**, estão de acordo com os dados encontrados na literatura para essa substância. Rendimento de 68,5% (IRIE & WATANABE, 1980).

4.3.2. Chalcona S2



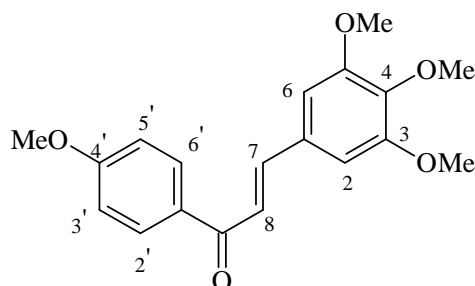
Os dados de RMN ^1H (Figura 74, p. 130) e ^{13}C (Figura 75, p. 130) de **S2**, estão de acordo com os dados encontrados na literatura para essa substância. Rendimento de 68,5% com rendimento de 75% (EDWARDS et al. 1990; TEH et al. 2006).

4.3.3. Chalcona S3



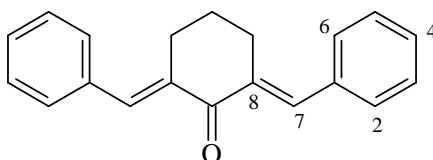
Os dados de RMN ^1H (Figura 76, p. 131) e ^{13}C (Figura 77, p. 131) de **S3**, estão de acordo com os dados encontrados na literatura para essa substância. Rendimento de 86% (NG et al. 2006).

4.3.4. Chalcona S4



Os dados de RMN ^1H (Figura 78, p. 132) e ^{13}C (Figura 79, p. 132) de **S4**, estão de acordo com os dados encontrados na literatura para essa substância. Rendimento de 88% (WEBER et al. 2005).

4.3.5. (2E,6E)-2,6-bis(benzidileno)-cicloexan-1-ona (S5)



Os dados de RMN ^1H (Figura 80, p. 133) e ^{13}C (Figura 81, p. 133) de **S5**, estão de acordo com os dados encontrados na literatura para essa substância. Rendimento de 64,5% (LAKSHMI & RAMAMURTHI, 2005).

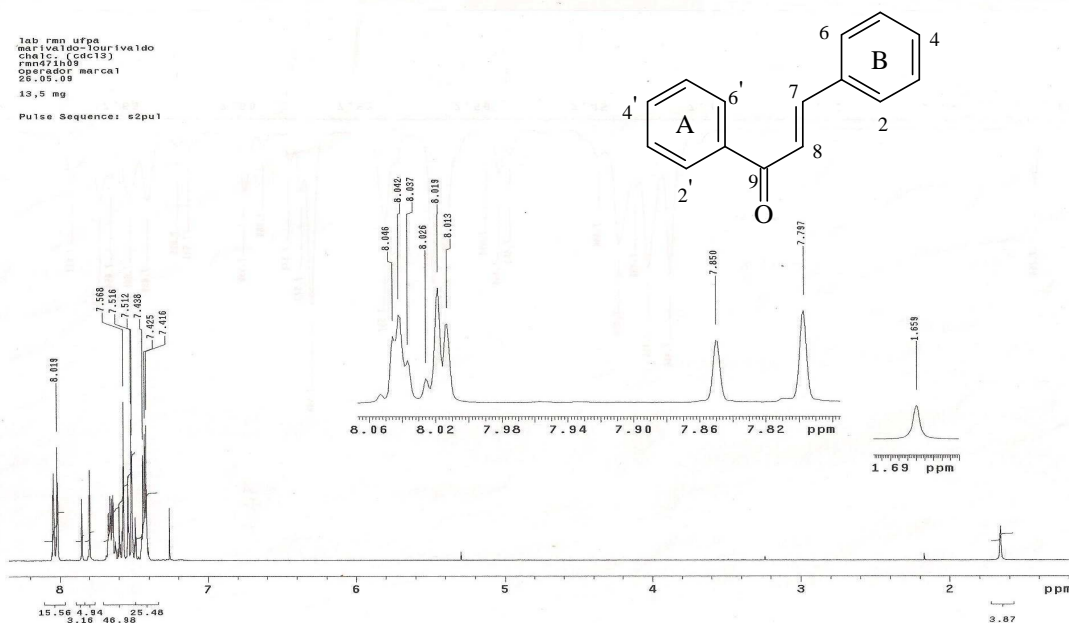


Figura 72- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S1.

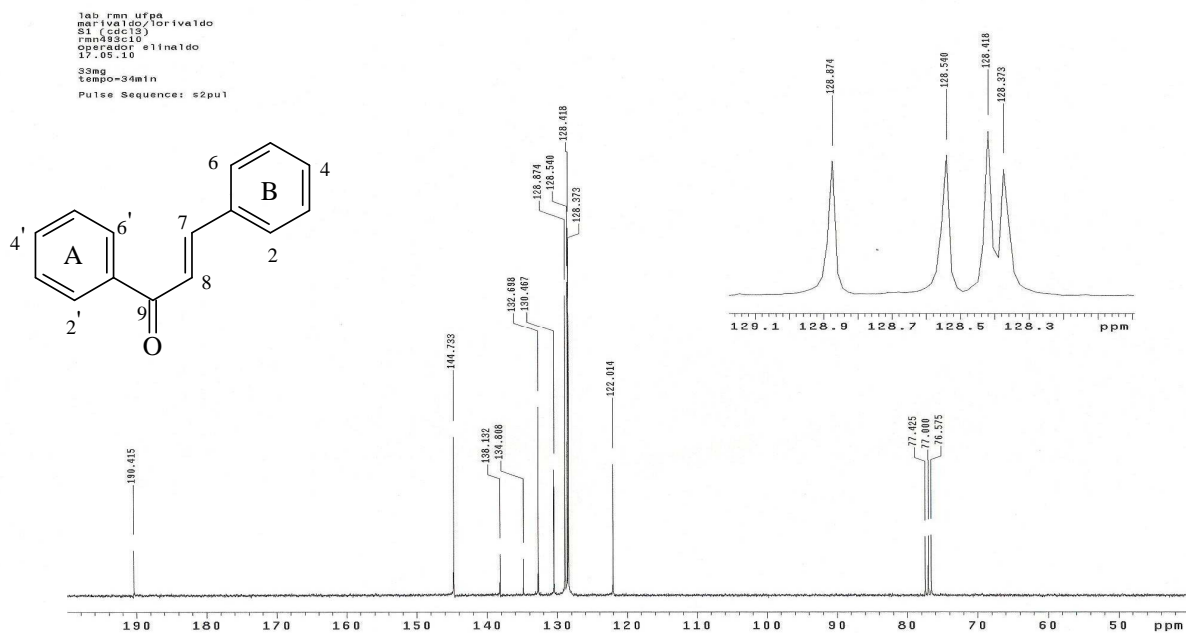


Figura 73- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S1.

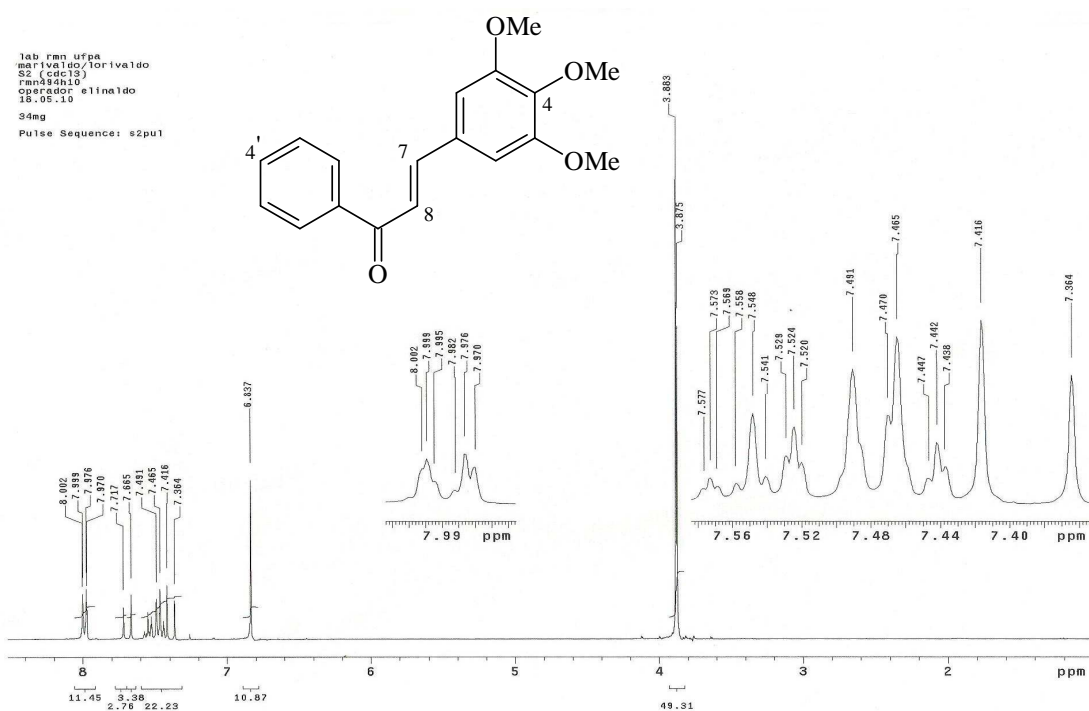


Figura 74- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S2.

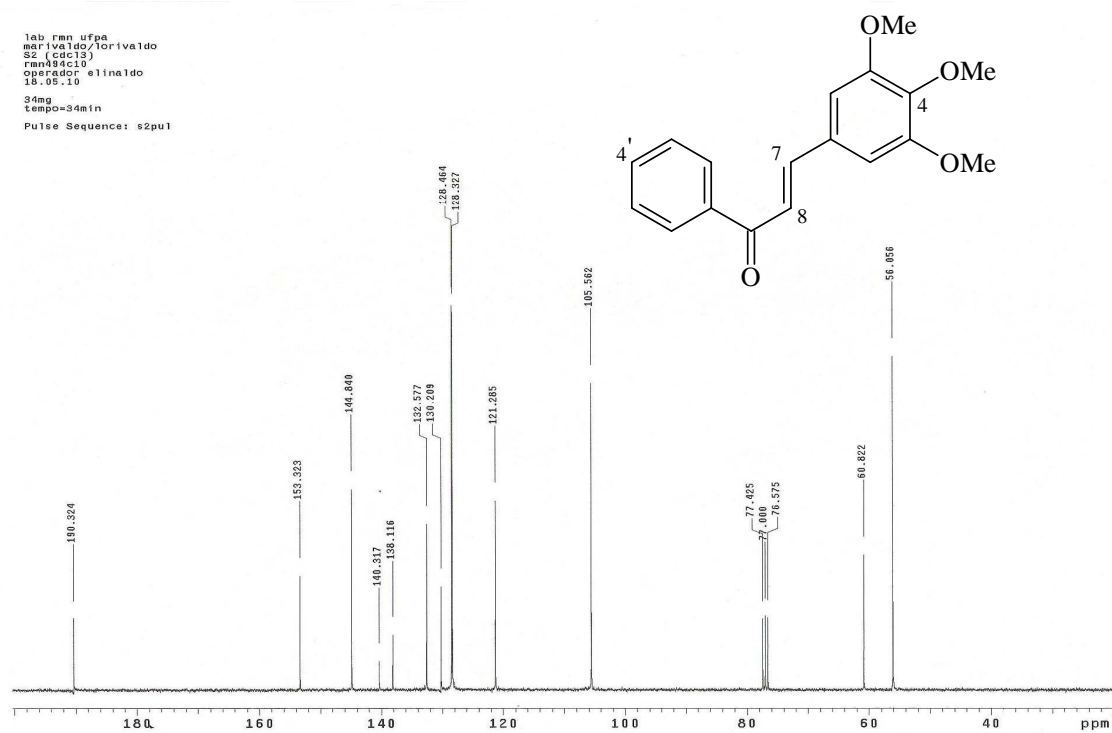


Figura 75- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S2

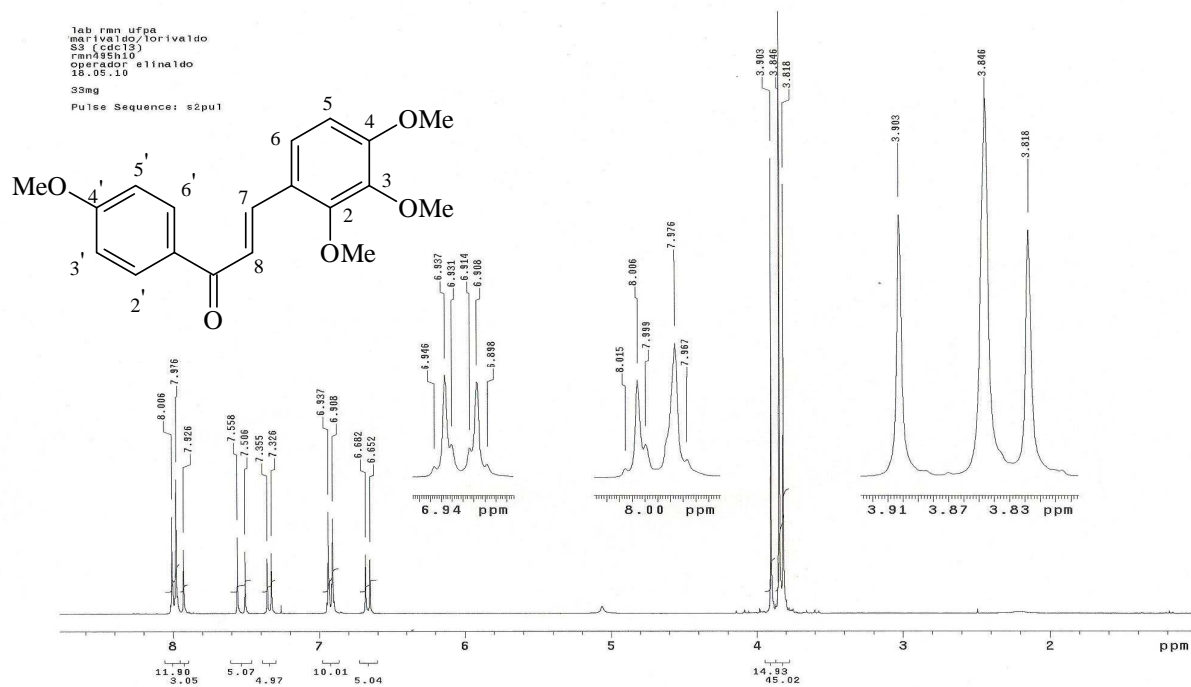


Figura 76- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S3.

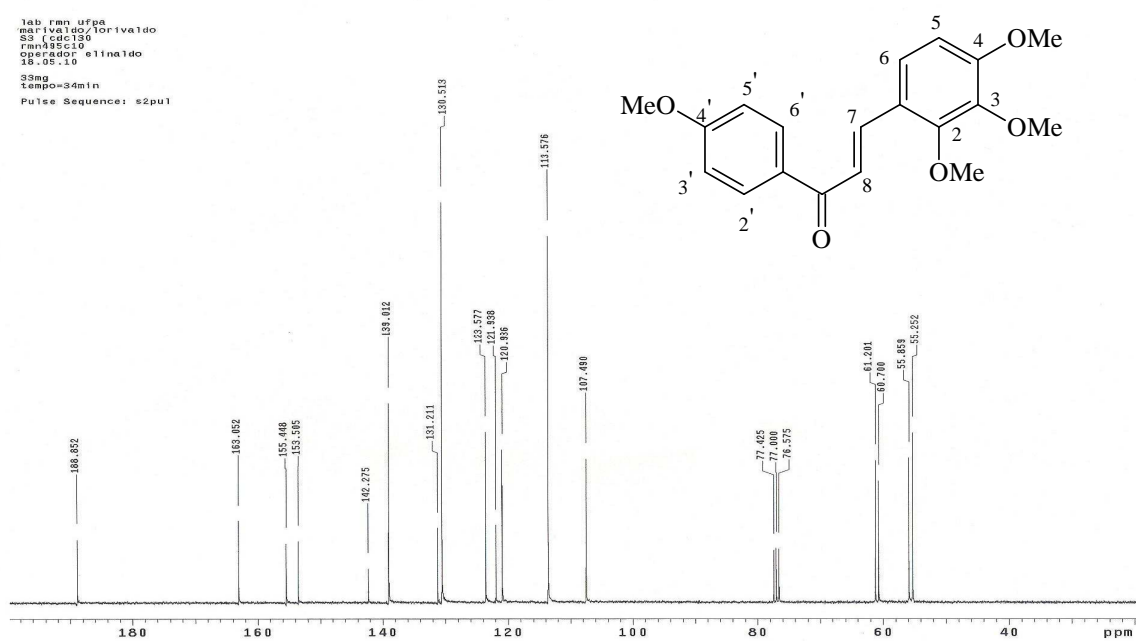


Figura 77- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S3.

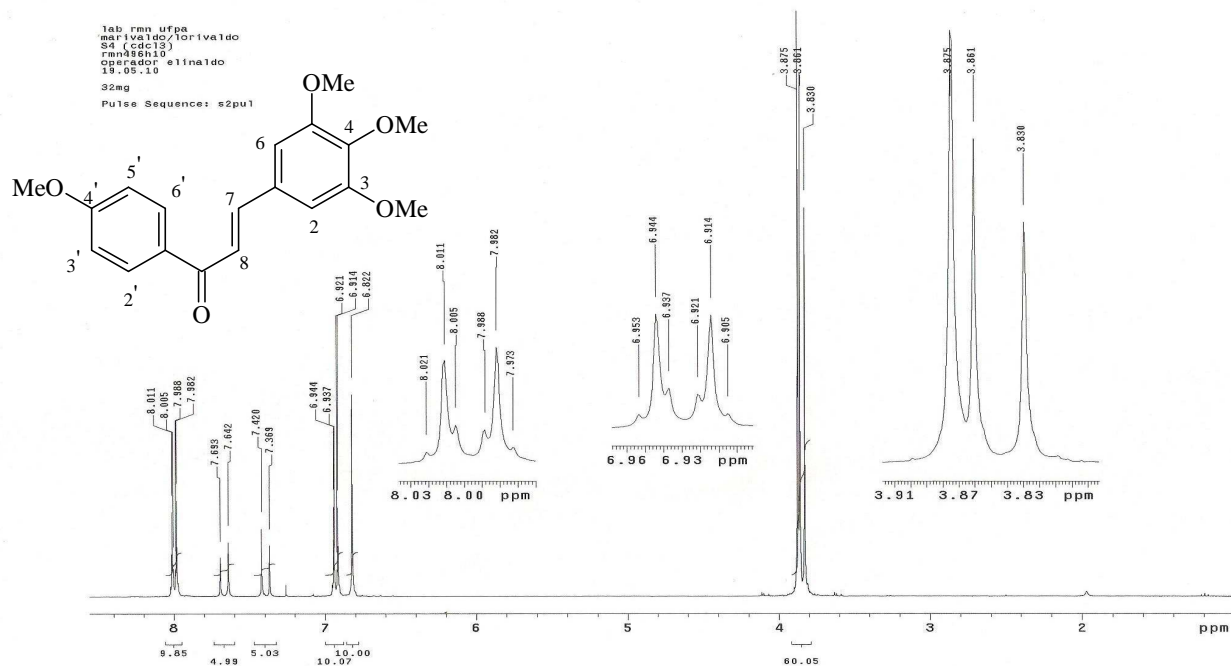


Figura 78- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S4.

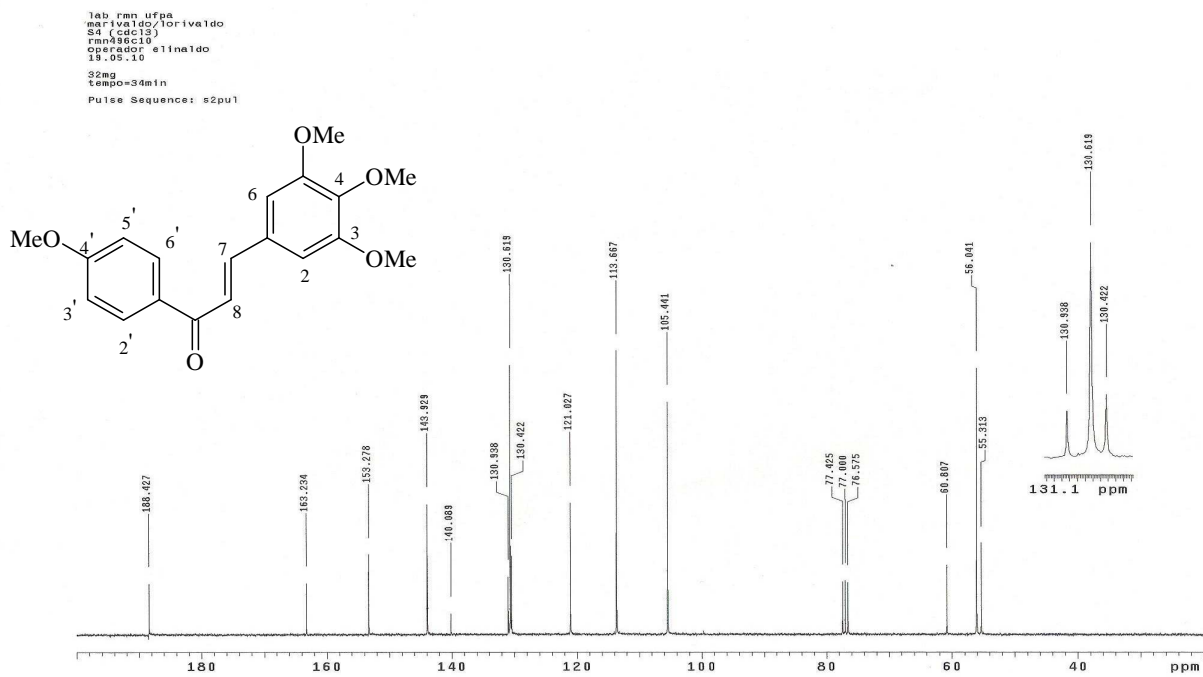


Figura 79- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S4.

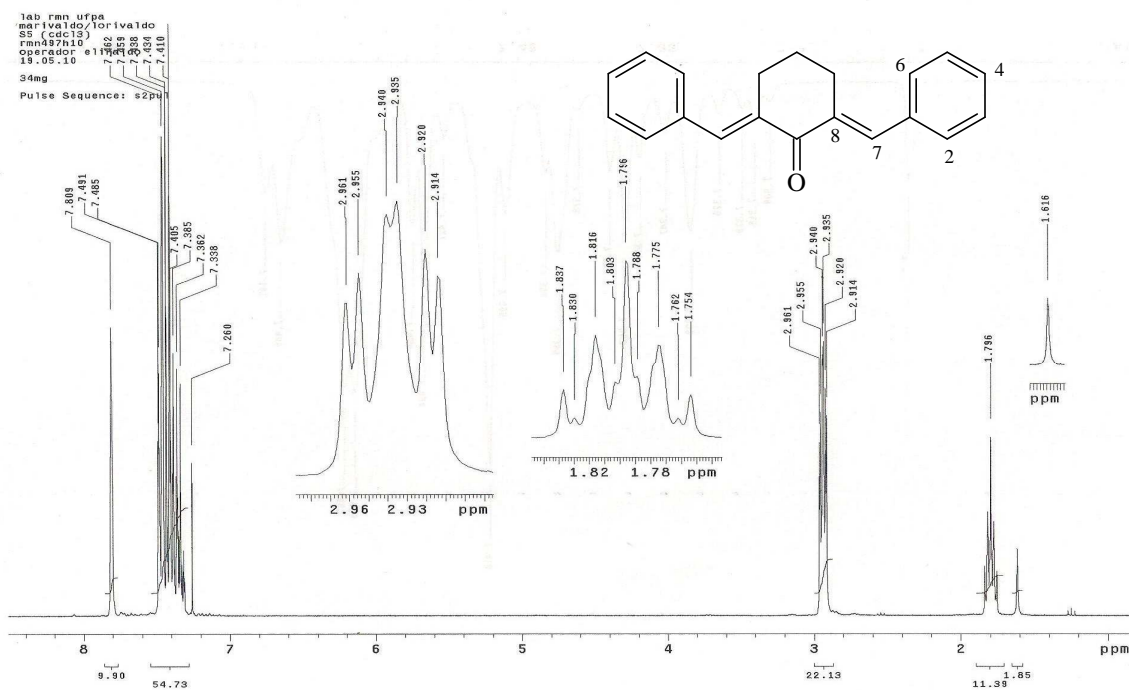


Figura 80- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S5.

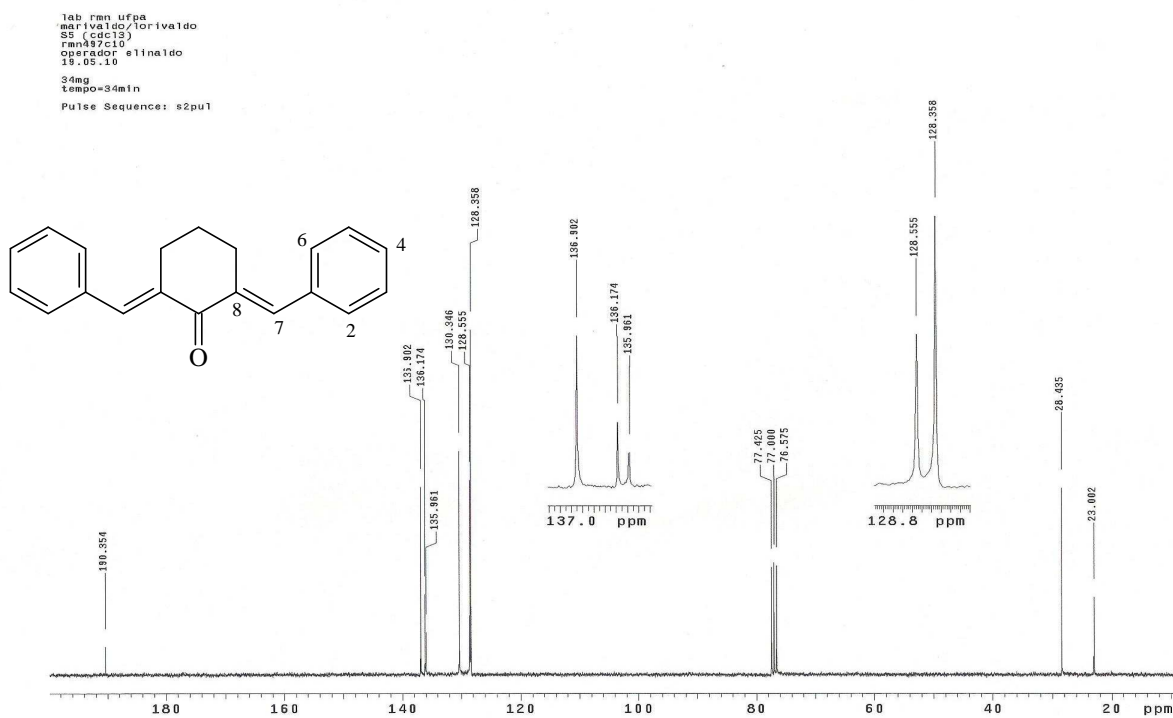


Figura 81- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S5.

4.4- SUBSTÂNCIAS OBTIDAS A PARTIR DAS REAÇÕES DE BIORREDUÇÕES

Devido à grande habilidade que alguns microorganismos têm de modificar quimicamente alguns compostos orgânicos, o metabolismo do fungo *Aspergillus flavus*, excelente produtor de aflatoxinas, vem sendo bastante pesquisado. Essas modificações químicas nas estruturas das moléculas são denominadas biotransformações e são de grande importância por serem quimio, regio e enantioseletivas, resolvendo assim, muitos problemas sintéticos existentes na obtenção de compostos opticamente puros.

Neste trabalho foram analisadas as biotransformações das chalconas **S1**, **S2**, **S3**, **S4** e o derivado α,β -insaturado **S5** e as cetonas aromáticas acetofenona e 4-nitro-acetofenona, utilizando o fungo *Aspergillus flavus* (FEFLPM3D1).

4.4.1- Diidrochalconas

Os produtos obtidos nas biotransformações a partir das chalconas como substratos, forneceram as respectivas diidrochalconas, quando utilizado o *Aspergillus flavus*, o qual se desenvolveu bastante no meio de cultura quando foi utilizada 0,05 g das chalconas, promovendo a biorredução da dupla ligação nos carbonos C- α e C- β , das chalconas **S1**, **S2** e **S3**, o que foi confirmado pela análise dos espectros de RMN dos produtos. Não foram observadas modificações nas ligações da carbonila do sistema cetônico α - β -insaturado, fato que pode ser explicado pela diferença de energia de ligação de C=C ($\Delta E_{C=C}$ 146,51-151,00 kcal/mol) e de C=O ($\Delta E_{C=O}$ 173,00-181,00 kcal/mol), sendo, portanto, mais favorável a ruptura da ligação C=C (LOWERING & LAIDER 1990; LEVI e BALANDIN, 1960).

A chalcona **S4** e o derivado α,β -insaturado **S5** não sofreram biorredução quando submetidas às mesmas condições de **S1** a **S3**, fato que pode ser explicado pela regioselectividade das enzimas, em decorrência de sua estrutura tridimensional complexa, onde o substrato tem que se encaixar para que ocorra a formação do complexo enzima-substrato, com posterior liberação do produto.

4.4.1.1. Reação de biotransformação 1

Substrato Chalcona **S1**: (2E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona

Produto diidrochalcona **S15**: 1,3-difenil-propan-1-ona

A figura 82 representa a reação entre o substrato e o *Aspergillus flavus*, responsável pela biorredução da dupla ligação do substrato **S1**, fornecendo o produto **S15** (diidrochalcona).

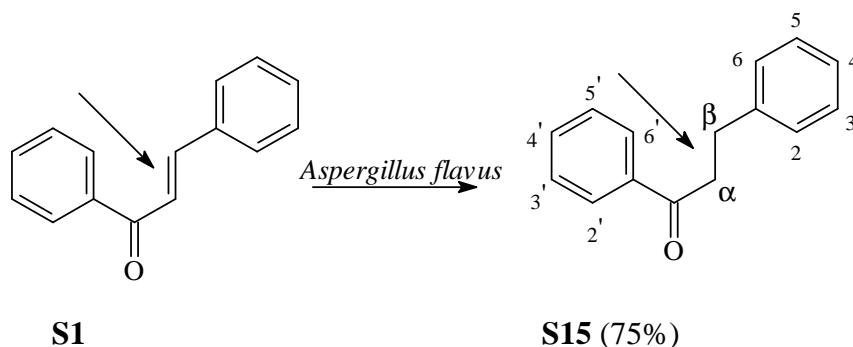


Figura 82- Reação de biorredução da chalcona **S1** e formação da diidrochalcona **S15**

Nas reações de biotransformação é recomendado que o fungo desenvolva-se por um determinado período, para então o substrato ser adicionado. A adição do substrato junto com o fungo pode inibir o crescimento fúngico e assim prejudicar o desenvolvimento do experimento. O tempo ideal para a adição do substrato deve ser estabelecido de acordo com o crescimento do fungo utilizado. Entretanto, como o fungo selecionado neste trabalho desenvolve-se com rapidez, optou-se em adicionar o substrato junto com o fungo, e observou-se que não ocorreu interferência (Figura 83).

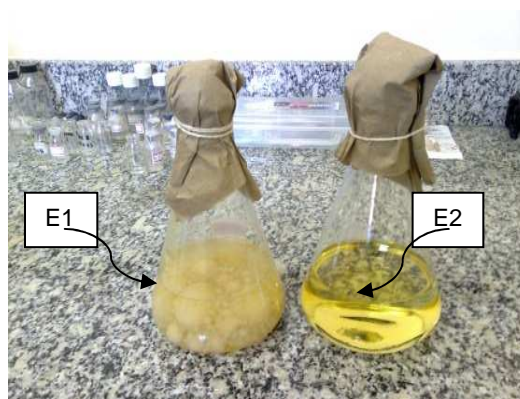


Figura 83- Reação de biorredução da chalcona **S1**(E1: Meio+fungo+substrato/E2: meio de cultura).

No espectro de RMN¹H da substância **S15** em mistura de **S1** (Figuras 84 e 85, p.138 e 139), são observados os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,10 (t, $J= 7,2$ Hz, 2H) e δ_{H} 3,30 (t, $J= 7,02$ Hz, 2H), além de outros sinais de **S15** e **S1**.

No espectro de RMN ¹³C (Figura 86, p. 140) observa-se os sinais relativos aos carbonos metilênicos em δ_{C} 40,4 (C α) e δ_{C} 29,6 (C- β), respectivamente, evidenciando a biorredução.

No espectro de DEPT (Figura 87, p.141), os sinais em δ_{C} 40,4 e em δ_{C} 29,6 confirmam a presença dos carbonos metilênicos (CH₂).

No espectro de HETCOR (Figura 88, p.142) são observadas as correlações dos sinais relativos aos hidrogênios metilênicos H α e H β , com os sinais relativos aos carbonos correspondentes em δ_{C} 40,4 (C α) e δ_{C} 29,6 (C- β).

A Figura 89 (p. 142) apresenta as principais correlações no espectro de HMBC para a substância **S16**. O espectro de HMBC (Figura 90, p. 142) observa-se a correlação a ²J em δ_{H} 3,31 do hidrogênio (H- α) com os sinais dos carbonos em δ 40,4 (C β) e δ_{C} 199,2 (C=O) e a ³J com o sinal do carbono em δ_{C} 141,2 (C1), a correlação a ²J do hidrogênio H- β em δ_{H} 3,07 com os sinais em δ 30,1 (C α) e δ_{C} 141,2 (C1) e a ³J com o sinal do carbono em δ_{C} 199,2 (C=O). Os sinais dos hidrogênios H3/H5 em δ 7,28 (m, H-5, H-3, Ar-H) correlacionam-se a ³J com o sinal do carbono em δ 141,2 (C1) e as demais correlações encontram-se na Tabela 12 (p. 137).

Tabela 12- Dados de RMN do produto **S15**, em comparação com os dados da literatura (HERMOSO, 2003; BRIOT, 2004)

C	RMN ¹ H S18 δH(ppm)	RMN ¹ H *,** δH(ppm)	RMN ¹³ C		COSY	HETCOR JCH	HMBC	
			S18 δC(ppm)	RMN ¹³ C * δC(ppm)			² J	³ J
1	-	-	141,2	141,3	-	-	Hβ	Hα
2	7,25(m,5H,H-2 Ar-H)	7,28(m,5H,H-2 Ar-H)	128,4	128,3	H3/H4	H2	H3/H5	-
3	7,25(m,5H,H-3 Ar-H)	7,28(m,5H,H-3 Ar-H)	128,5	128,5	H2/H4	H3	-	-
4	7,25(m,5H,H-4 Ar-H)	7,28(m,5H,H-4 Ar-H)	126,1	126,2	H2/H6	H4	-	-
5	7,25(m,5H,H-5 Ar-H)	7,28(m,5H,H-5 Ar-H)	128,5	128,5	H4/H6	H5	-	-
6	7,25(m,5H,H-6 Ar-H)	7,28(m,5H,H-6 Ar-H)	128,4	128,3	H4/H5	H6	-	-
β	3,07(t,J=7,2 Hz, 2Hβ)	3,09(t,J=7,2 Hz, 2Hβ)	30,1	30,2	H α	H β	H α	-
α	3,31(t,J=7,2 Hz, 2Hα)	3,33(t,J=7,5 Hz, 2Hβ)	40,4	40,5	H β	H α	H β	-
C=O	-	-	199,2	199,2	-	-	Hα	H2'/H6' Hβ
1'	-	-	136,8	136,9	-	-	H2'/H6';H3'/H5'	-
2'	7,96(d,J=7,5Hz,2H)	7,96(d,J=7,3Hz,2H)	128,0	128,1	H3'/H4'	H2'	H6'/H4'	-
3'	7,45(d,J=7,2Hz,2H)	7,57(d,J=7,3Hz,1H)	133,0	133,1	H2'/H4'	H3'	H2'	H5'
4'	7,53(d,J=7,2Hz,1H)	7,57(d,J=7,3Hz,1H)	128,5	128,6	H2'/H3' H5'/H6'	H4'	H2'/H6'	-
5'	7,45(d,J=7,2Hz,2H)	7,57(d,J=7,3Hz,1H)	133,0	133,1	H4'/H6'	H5'	H6'	H3'
6'	7,96(d,J=7,5Hz,2H)	7,96(d,J=7,3Hz,2H)	128,0	128,1	H4'/H5'	H6'	H2'	-

*Hermoso, 2003; **Briot, 2004

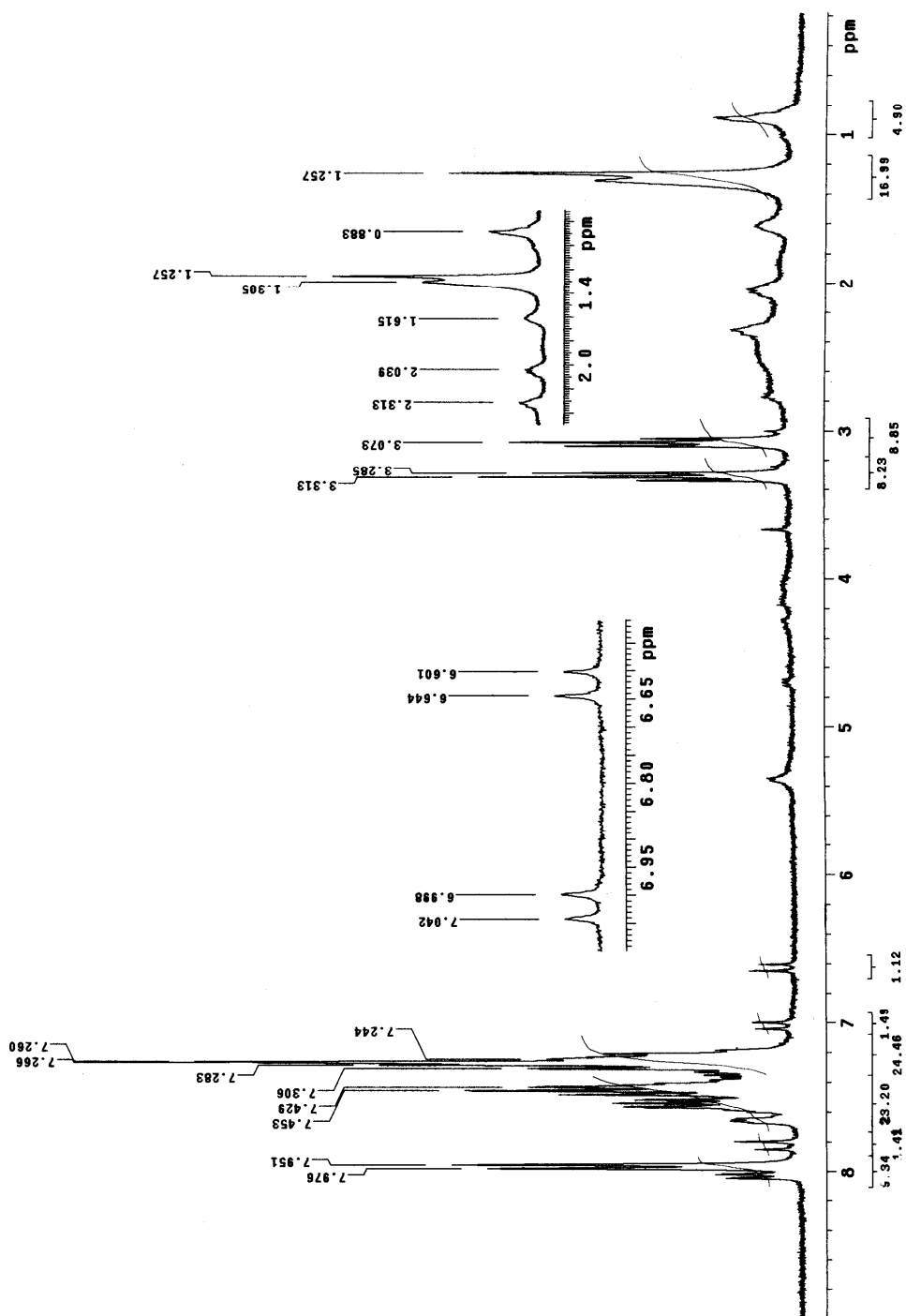


Figura 84- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S15 em mistura com S1.

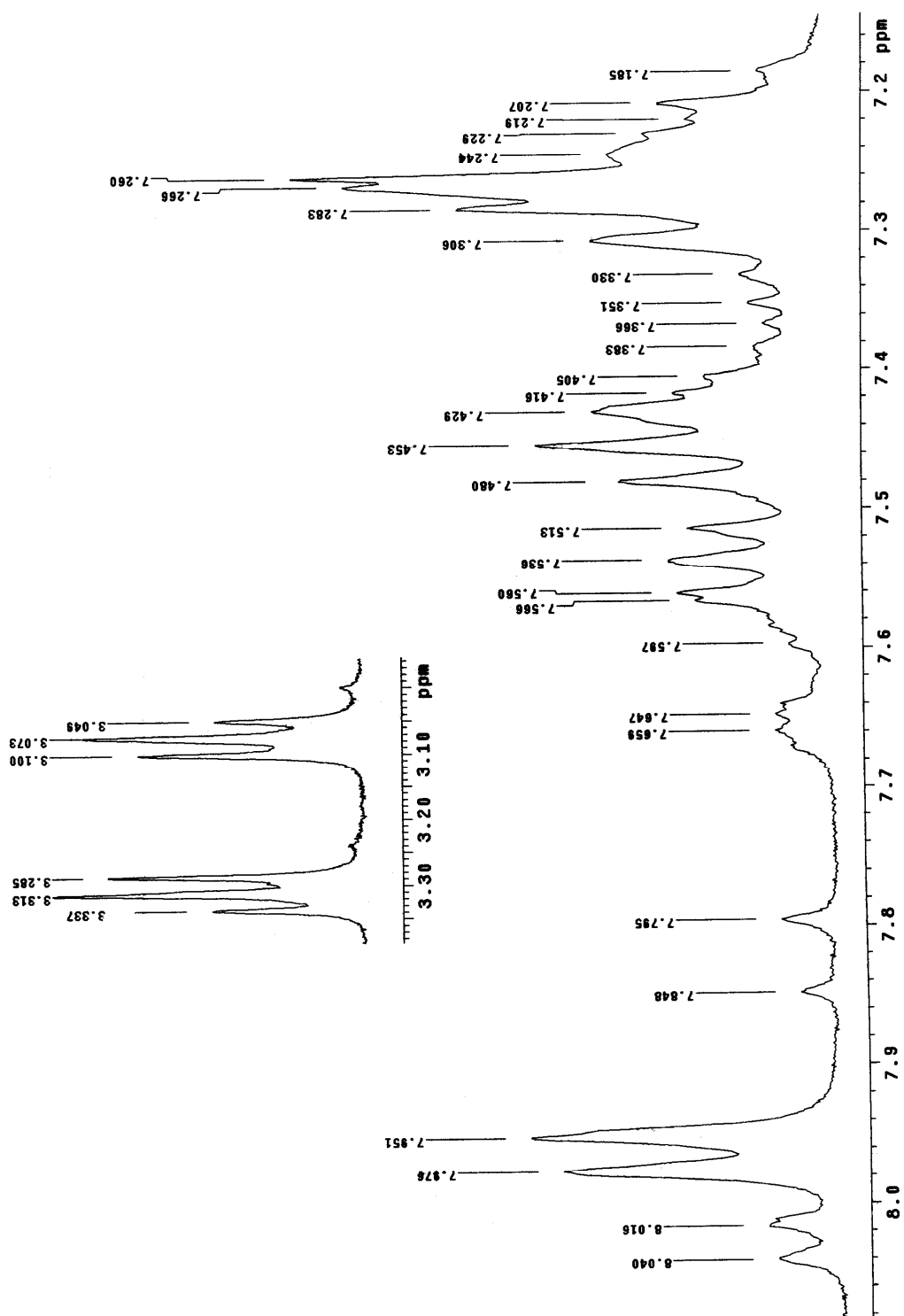


Figura 85– Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S15 em mistura com S1.

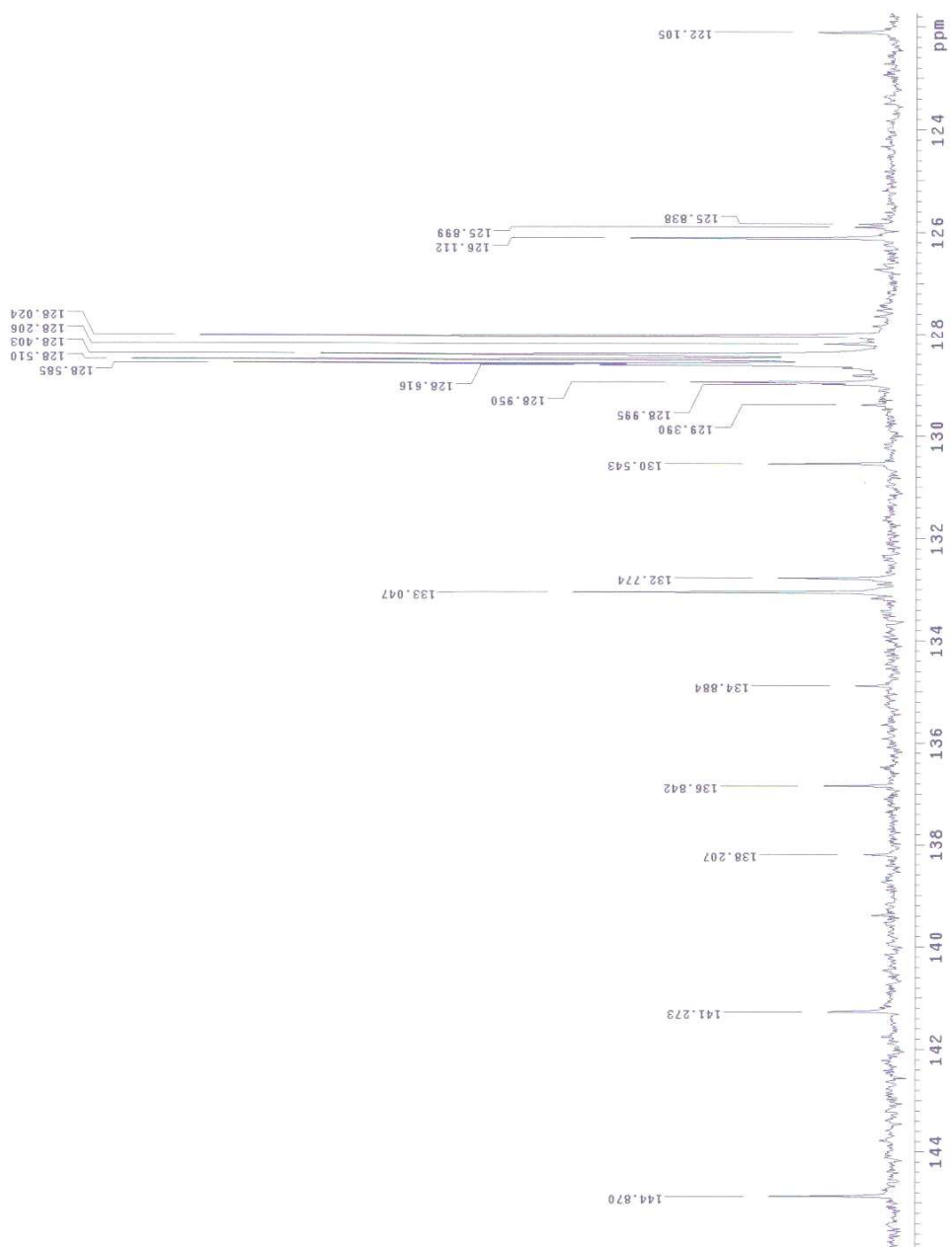


Figura 86- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S15** em mistura com **S1**.

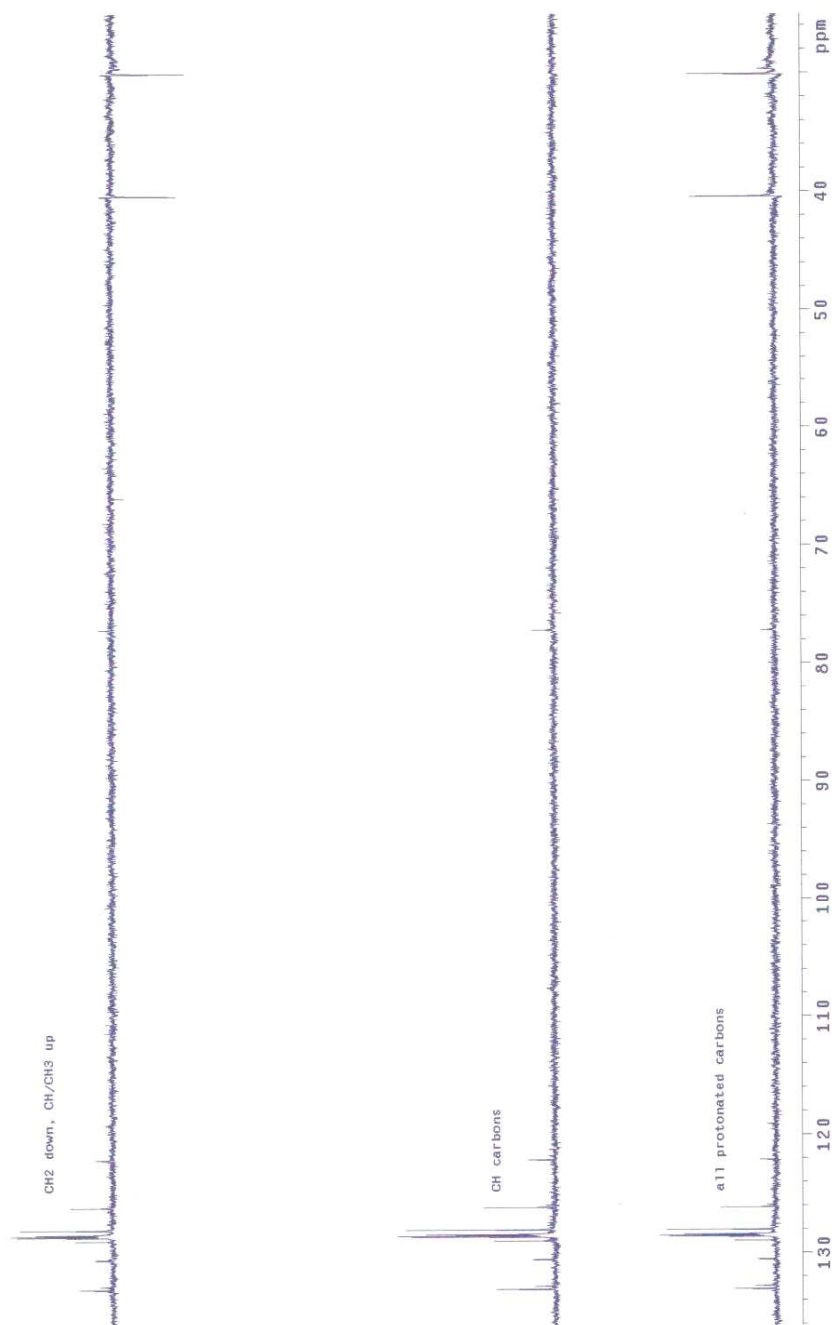


Figura 87- Espectro de DEPT de **S15** em mistura com **S1**.

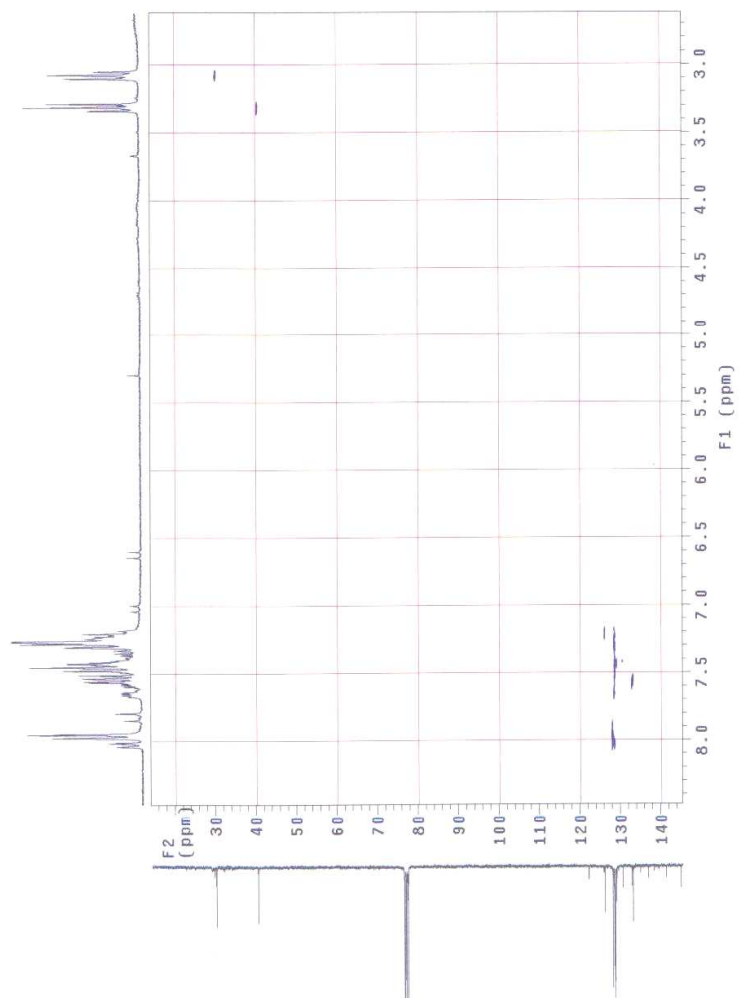


Figura 88- Espectro de HETCOR de **S15** em mistura com **S1**.

A Figura 89 apresenta as principais correlações dos hidrogênios metilênicos $H\alpha$ e $H\beta$ no espectro de HMBC para a substância **S15**.

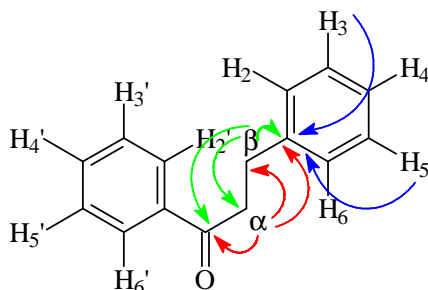


Figura 89- Principais correlações dos hidrogênios metilênicos $H\alpha$ e $H\beta$ no espectro de HMBC da substância **S15**.

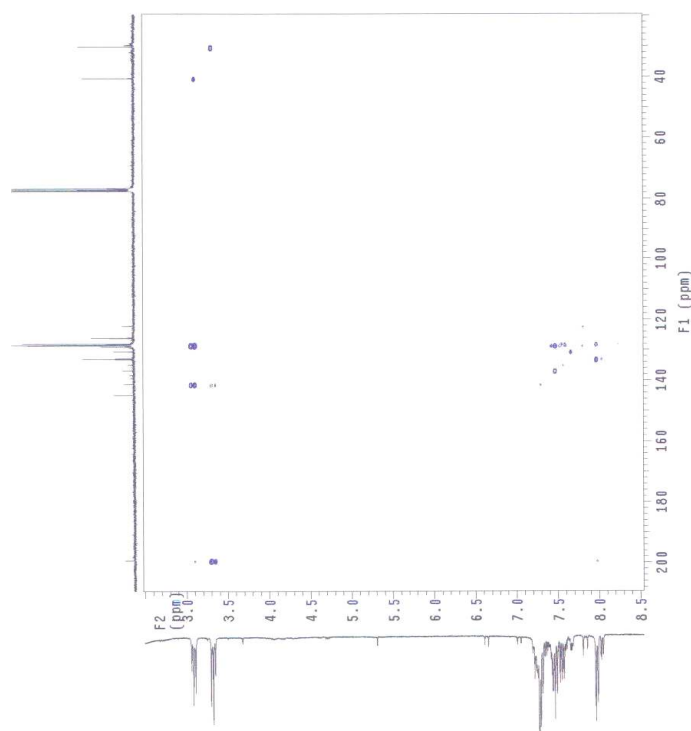


Figura 90- Espectro HMBC de **S15** em mistura com **S1**.

4.4.1.2. Reação de Biotransformação 2

Substrato Chalcona **S2**: (2E)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-prop-2-en-1-ona

Produto diidrochalcona **S16**: 3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-1-fenilpropan-1-ona

Neste experimento (Figura 91) foi observado o desenvolvimento satisfatório do fungo *Aspergillus flavus*, ocorrendo a biorredução da chalcona **S2**, fornecendo a diidrochalcona **S16**, fato confirmado por dados obtidos de RMN.

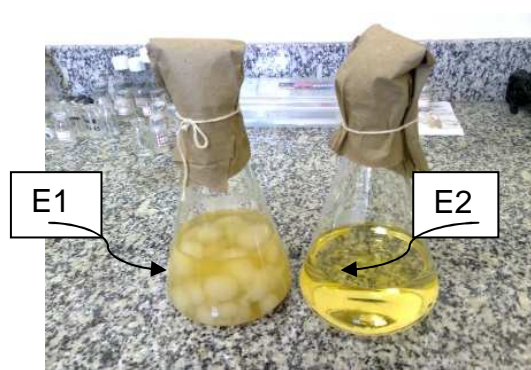


Figura 91- Reação de biorredução da chalcona **S2**(E1: Meio+fungo+substrato/ E2: meio de cultura)

O produto formado **S16**, é uma diidrochalcona inédita, não se encontra a sua estrutura mencionada na literatura (Figura 92).

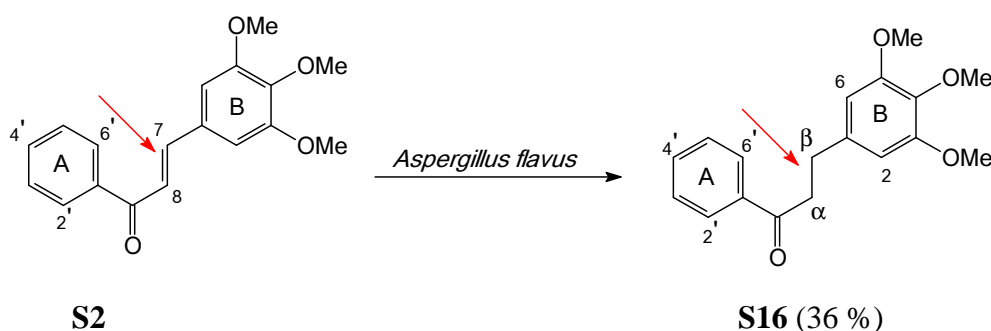


Figura 92- Reação de biorredução da chalcona **S2** e formação da diidrochalcona **S16**

A substância **S2** foi obtida a partir da reação entre acetofenona e 3,4,5-trimetoxibenzaldeído conforme descrito na parte experimental (p. 57). No espectro de RMN ^1H de **S16** em mistura com **S2** (Figura 93, p. 145), são observados sinais referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos H- β em δ_{H} 3,01 (t, 2H, J 7,5 Hz) e aos hidrogênios α -carbonilados H- α em δ_{H} 3,31 (t, 2H, J 7,5 Hz), e dois dupletos em δ_{H} 7,40 e δ_{H} 7,60 referentes aos sinais dos hidrogênios H-8 e H-7 da chalcona **S2** de partida indicando que a reação não foi completa no período de dez dias. A diidrochalcona **S16**, também foi obtida por síntese.

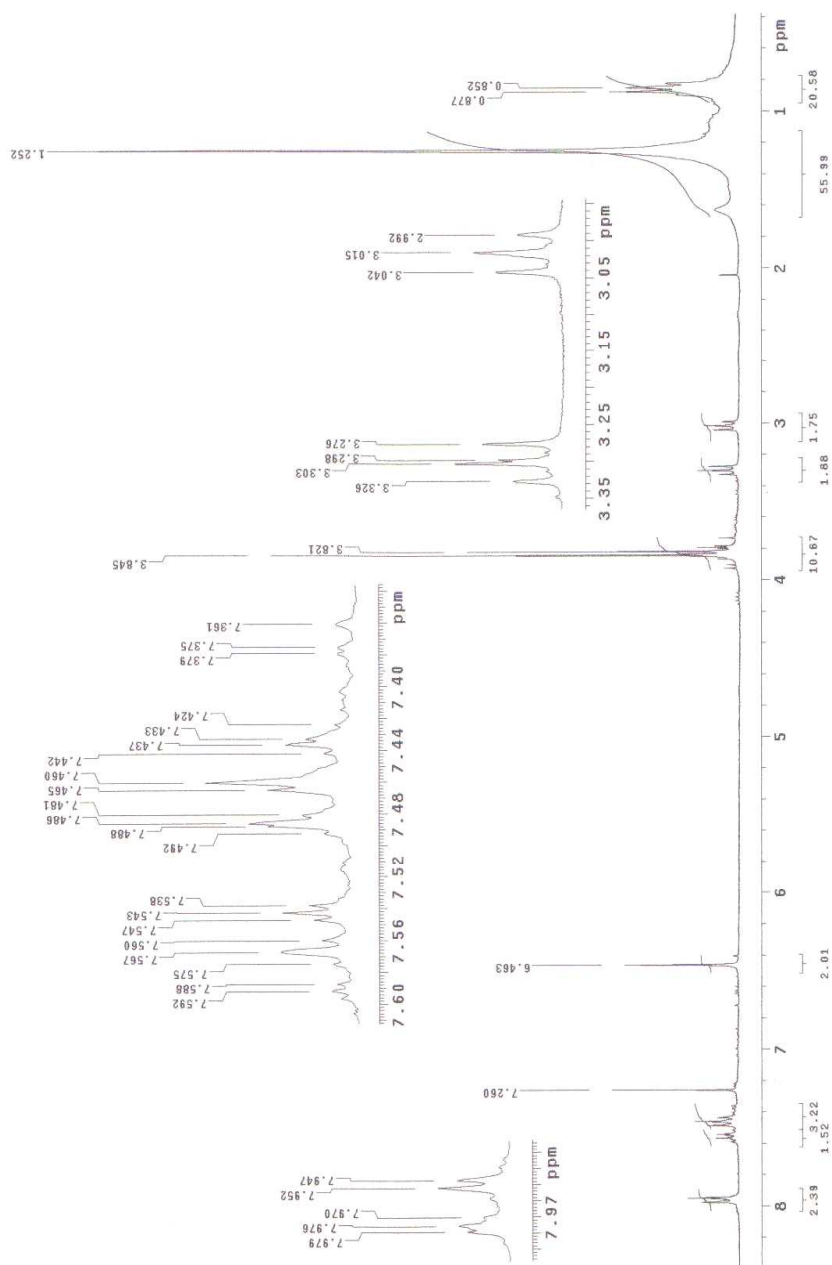


Figura 93- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S16 em mistura com S2.

4.4.1.3. Reação de Biotransformação 3

Substrato Chalcona **S3**: (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona.

Produto diidrochalcona **S17**: 3-(2,3,4-trimetóxifenil)-1-(4-metoxifenil)-propan-1-ona.

A Figura 94 mostra que o desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus* foi satisfatório, ocorrendo a biorredução da chalcona **S3**, fornecendo a diidrochalcona **S17**.



Figura 94- Reação de biorredução da Chalcona **S3** (E1: Meio+fungo+substrato/ E2: meio de cultura)

O produto formado **S17**, é também uma diidrochalcona inédita, pois não foram encontrados relatos dessa substância na literatura (Figura 95).

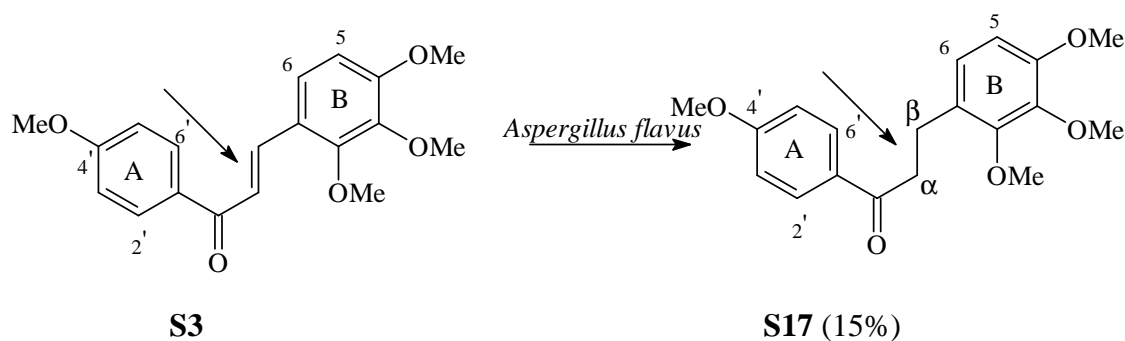


Figura 95- Reação de biorredução da chalcona **S3** e formação da diidrochalcona **S17**

A substância **S3** utilizada como substrato na reação de biorredução, foi sintetizada a partir da reação de 4-metoxiacetofenona e com o 2,3,4-trimetoxibenzaldeído.

No espectro de RMN ^1H de **S17** em mistura com **S3** (Figura 96, p. 148) são observados sinais referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos H- β em δ 2,96 (t, 2H, J 8,4 Hz) e aos hidrogênios α -carbonilados H- α em δ 3,18 (t, 2H, J 8,4 Hz) e a presença de dois dupletos em δ_{H} 7,97 e δ_{H} 7,56 são referentes aos sinais dos hidrogênios H-7 e H-8 da chalcona **S3** de partida indicando que a reação não foi completa no período de dez dias. Como pode ser observado, o rendimento das reações de biorreduções diminuem à medida que as chalconas vão sendo substituídas por grupos de metóxilas (OCH_3).

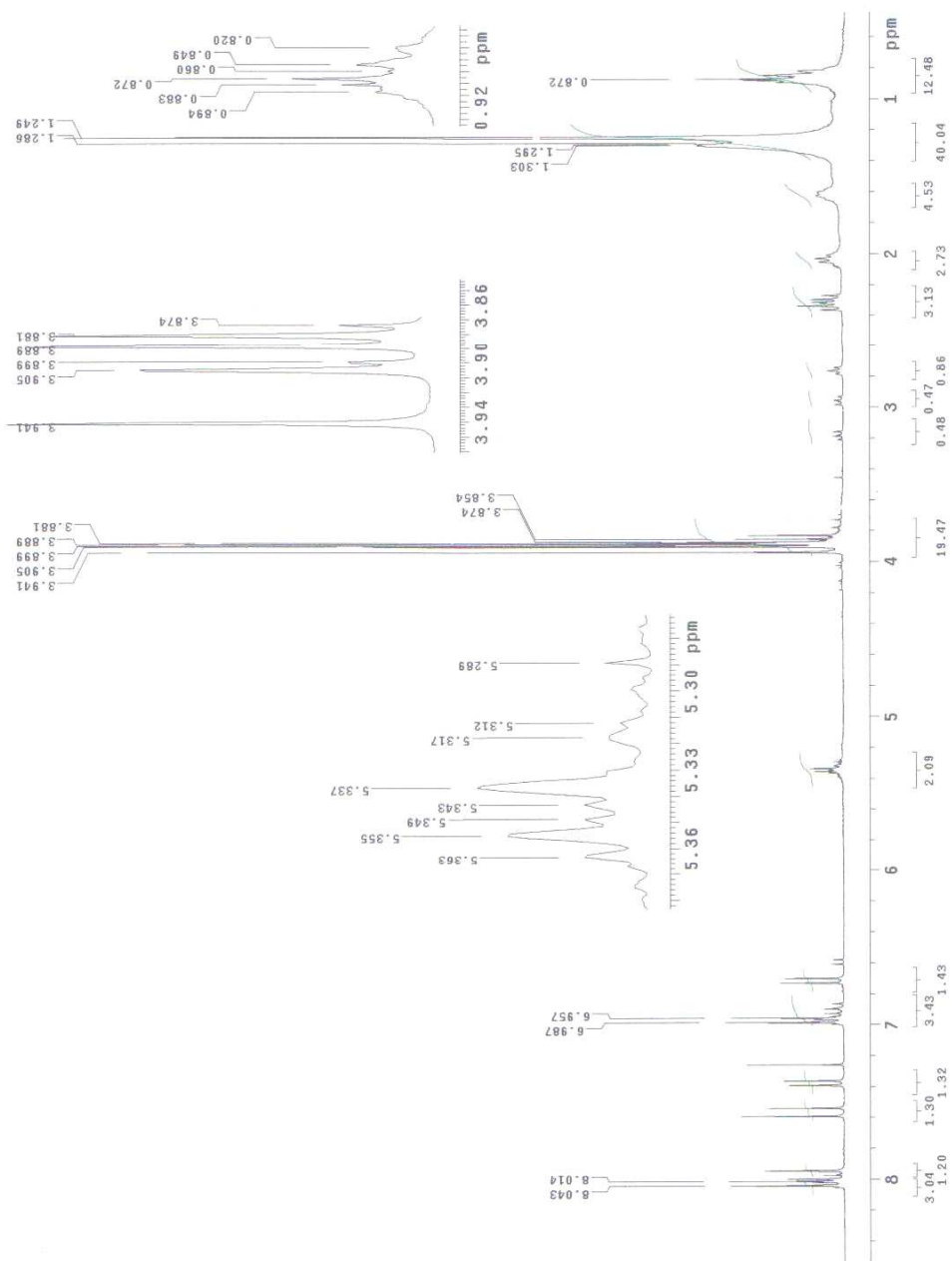


Figura 96- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S17

4.4.1.4. Reação de Biotransformação 4

Substrato Chalcona **S4**: (2E)-1-(4-metóxfenil)-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-prop-2-en-1-ona.

O fungo *Aspergillus flavus*, na reação de biotransformação, quando foi usada a chalcona **S4** como substrato, não ocorreu a biorredução (Figura 97). Observa-se que não houve desenvolvimento do fungo no meio reacional, e na análise do espectro de RMN ^1H da substância que foi isolada, após dez dias de reação, os sinais dos hidrogênios corroboram integralmente com os sinais dos hidrogênios da chalcona **S4**.



E1=Meio+substância+ fungo/E2=meio de cultura

Figura 97- Meios de culturas no desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus* na reação **S4**

A Figura 98 indica que não ocorreu a biorredução quando utilizada a chalcona **S4**.

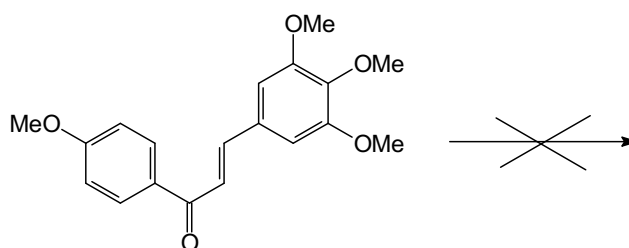
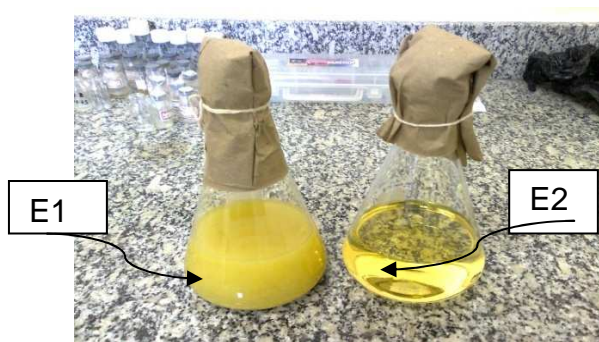


Figura 98- Reação de biorredução da chalcona **S4**.

4.4.1.5. Reação de Biotransformação 5

Substrato: **S5**: (2E, 6E)-2,6-bis (benzidileno)-cicloexan-1-ona

O fungo *Aspergillus flavus*, na reação de biotransformação usando a substância **S5** como substrato, não resultou em biorredução (Figura 99). Observa-se que não houve desenvolvimento do fungo no meio reacional, e também na análise do espectro de RMN ^1H da substância que foi isolada, após dez dias de reação, os sinais dos hidrogênios desta corroboram integralmente com os sinais dos hidrogênios do substrato **S5**.



E1=Meio+substância+ fungo/E2=meio de cultura

Figura 99- Meios de culturas no desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus* na reação **S5**

A Figura 100 indica que não ocorreu a biorredução quando utilizado o derivado **S5**.

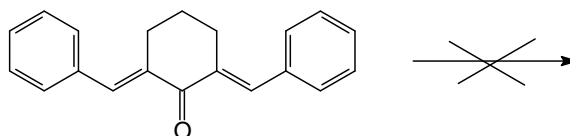


Figura 100- Reação de biorredução do derivado **S5**

4.4.2- Aril-etanol

O produto obtido na biotransformação a partir da acetofenona forneceu o álcool (**S18**), feniletan-1-ol (Figura 101) confirmado pelo espectro de RMN¹H (Figura 102, p. 152), que apresenta os sinais de hidrogênios em δ_H 4,93 (q, 1H) devido ao hidrogênio da cadeia lateral; δ_H 1,50 (d, 3H), devido ao grupo metila. O espectro da Figura 102 mostra sinais da mistura acetofenona com o produto de biorredução (**S18**).

Na reação de biotransformação quando foi utilizada a 4-nitroacetofenona, não foi observada nenhuma modificação no espectro obtido, o que confirma os dados encontrados na literatura que mostram o baixo potencial de biorredução de fungos do gênero *Aspergillus* na redução de acetofenonas para-substituídas (KURBANOGLU et al., 2007).

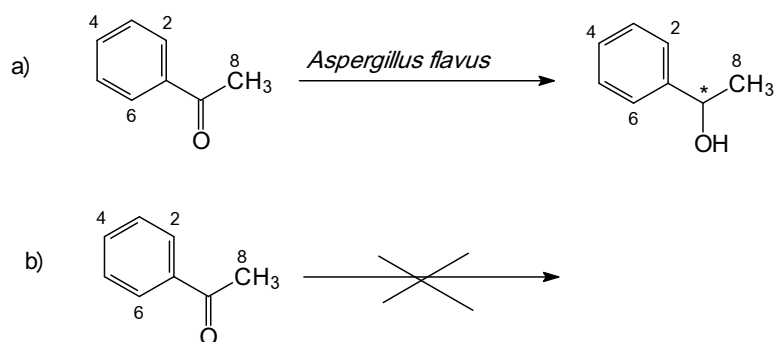


Figura 101 - Reações de biotransformação utilizando *Aspergillus flavus*, a partir de (a) acetofenona e (b) 4-nitroacetofenona

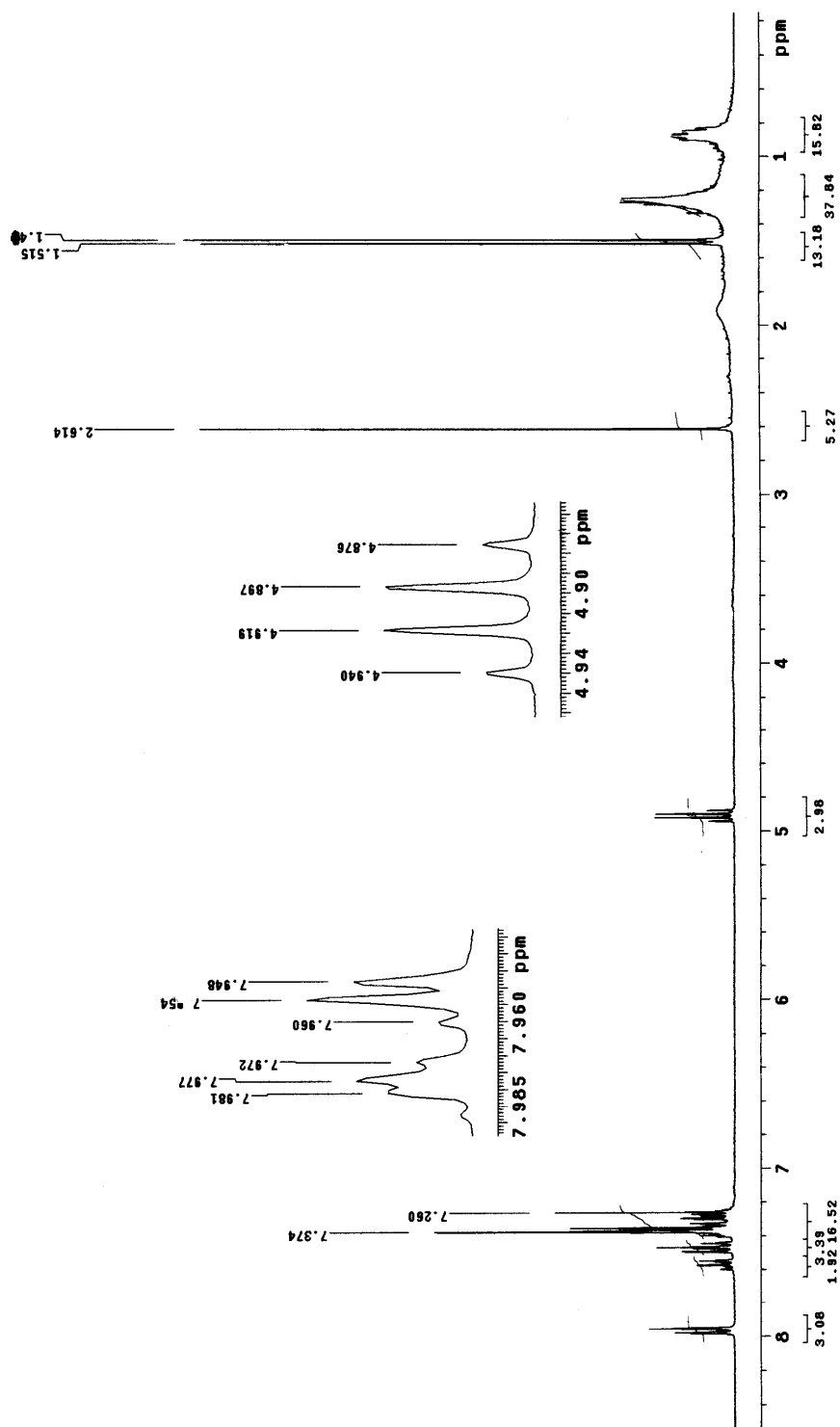


Figura 102- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da acetofenona e feniletan-1-ol (S18) em mistura.

4.5-SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DAS REAÇÕES DE REDUÇÕES (HIDROGENAÇÃO)

As chalconas **S2** e **S3** foram utilizadas na reação de redução de hidrogenação para a obtenção das respectivas diidrochalconas **S16** e **S17**, para que fossem comparados com os dados obtidos na reação de biorredução utilizando o fungo *Aspergillus flavus*.

4.5.1. Reação de redução da chalcona **S2** e obtenção da diidrochalcona **S16**, 3-(3,4,5-trimetóxilifenil)-1-fenilpropan-1-ona (Figura 103).

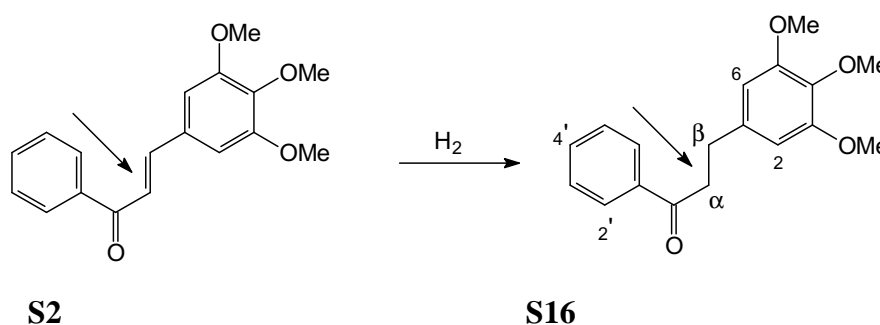


Figura 103- Reação de hidrogenação da chalcona **S2**

A diidrochalcona **S16** foi obtida a partir da reação de redução (hidrogenação) para que houvesse uma comparação com o produto obtido na reação de biorredução, já que as duas reações forneceram como produto a respectiva diidrochalcona **S16**.

Na análise do espectro de RMN ^1H de **S16** (Figura 104, p. 157) foram observados sinais referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos H- β em δ_{H} 3,01 (t, 2H, $J=7,7$ Hz) e aos hidrogênios α -carbonilados H- α em δ_{H} 3,31 (t, 2H, $J=7,7$ Hz). Na região de hidrogênios aromáticos observam-se os sinais em δ_{H} 7,96 (dd, $J=7,5$ Hz e $J=1,8$ Hz, 2H) referentes aos hidrogênios equivalentes H-2'/H-6', em δ_{H} 7,56 (tt, $J=7,5$ Hz e $J=1,5$ Hz, 1H) atribuído ao H-4' e em δ_{H} 7,45 (dd, $J=7,5$ Hz, 2H) sinal referente aos hidrogênios equivalentes H-3'/H-5' (anel **A**). Um singleto em δ_{H} 6,46 (s, 2H, ArH) foi atribuído aos hidrogênios equivalentes H-2/H-6 (anel **B**) e em δ_{H} 3,84 e δ_{H} 3,82 são referentes aos sinais dos hidrogênios das metoxilas (s, $\text{CH}_3\text{O-C3}$; s, $\text{CH}_3\text{O-C4}$; s, $\text{CH}_3\text{O-C5}$).

No espectro de RMN ^{13}C de **S16** (Figura 105, p.158) observaram-se 12 sinais (Tabela 14, p. 163). O sinal em δ_{C} 56,10 é referente aos carbonos das metoxilas equivalentes ($\text{OCH}_3\text{-C3}$ e $\text{OCH}_3\text{-C5}$) e em δ_{C} 60,83 é referente ao carbono da metoxila di-orto substituída ($\text{OCH}_3\text{-C4}$). Os sinais em δ_{C} 30,62 e δ_{C} 40,57 são referentes aos carbonos metilênicos C- β e C- α , respectivamente. Os sinais em δ_{C} 153,20 e δ_{C} 137,08 são típicos de carbonos aromáticos oxidados; os sinais entre δ_{C} 105,36 a δ_{C} 133,42 são típicos de carbonos aromáticos não oxidados e o sinal em δ_{C} 199,24 é referente ao carbono da carbonila C-4.

O espectro de DEPT (Figura 106, p.159) confirma a presença dos sinais dos dois carbonos metilênicos C- β (δ_{C} 30,62) e C- α (δ_{C} 40,57), os sinais referentes aos carbonos das três metoxilas e quatro sinais de carbonos metínicos aromáticos.

O espectro de COSY ($^1\text{Hx}^1\text{H}$) (Figura 107, p.160) confirma o acoplamento dos hidrogênios metilênicos benzílicos H- β e hidrogênios α -carbonilados H- α entre si, assim como mostra os acoplamentos entre os hidrogênios em δ_{H} 7,96 (H-2'/H-6'), δ_{H} 7,56 (H-4') e em δ_{H} 7,45 (H-3'/H-5') do anel **A** de **S16**.

O espectro de HETCOR (Figura 108, p.161) mostra sete correlações sendo: três correlações em δ_{H} 7,96 (H-2'/H-6'), δ_{H} 7,56 (H-4') e δ_{H} 7,45 (H-3'/H-5') com os sinais em δ_{C} 128,02 (C-2'/C-6'), δ_{C} 133,10 (C-4') e δ_{C} 128,61 (C-3'/C-5'), respectivamente, a correlação do sinal em δ_{H} 6,46 (H-2/H-6) com o sinal δ_{C} 105,44 (C-2/C-6), as duas correlações dos sinais em δ_{H} 3,82 e δ_{H} 3,84 (hidrogênios das metoxilas) com os sinais em δ_{C} 56,10 e δ_{C} 60,83 (carbonos das metoxilas) e as duas correlações dos hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,01 (H- α) e δ_{H} (H- β) com os sinais dos carbonos em δ_{C} 30,62 (C- β) e δ_{C} 40,57 (C- α), respectivamente.

A Figura 109 apresenta as principais correlações no espectro de HMBC para a substância **S16** (p. 162). O espectro de HMBC (Figuras 110, 111 e 112, p. 162, 163 e 164) apresenta as seguintes correlações, corroborando com as atribuições já mencionadas anteriormente. O sinal em δ_{H} 7,96 (H-2'/H-6') correlaciona-se com os sinais em δ_{C} 128,82 (C3'/C5') a 2J e em δ_{C} 133,42 (C-4') e em δ_{C} 199,24 (C=O) a 3J . Observa-se a correlação do sinal em δ_{H} 7,56 (H-4') com o sinal em δ_{C} 128,02 (C-2'/C-6') a 3J e do sinal em δ_{H} 7,45 (H3'/H5') com os sinais em δ_{C} 128,82 (C3'/C5') e δ_{C} 137,08 (C-1') a 3J . No mesmo espectro verifica-se correlação do sinal singleto em δ_{H} 6,46 (H2/H6) com os sinais de carbonos em δ_{C} 3,01 (C- β) e δ_{C} 105,36 (C2/C6) a 3J e em δ_{C} 137,08 (C-1) e δ_{C} 153,20 (C3/C5) a 2J . O sinal dos hidrogênios metilênicos benzílicos H- α em δ_{H} 3,30 correlacionam com os sinais dos carbonos em δ_{C} 199,24 (C=O) e δ_{C} 105,36 (C2/C6) a 3J e em δ_{C} 137,08 (C-1) e δ_{C} 40,57 (C- α)

a 2J . O sinal em δ_H 3,30 (H- α) correlaciona-se com o sinal em δ_C 137,08 (C-1) a 3J e em δ_C 199,24 (C=O) e δ_C 30,62 (C- β) a 2J . As correlações de **S16** encontram-se na tabela 14 (p.163). A diidrochalcona **S16** é uma substância inédita. A Figura 109 apresenta as principais correlações no espectro de HMBC para a substância **S16** (p. 162).

O espectro de massas de **S16** (Figura 113, p.165), além do pico do íon molecular em m/z 300, exibiu picos em m/z 195 (100%), 181 (36%), 165 (42%) e 77 (36%), em acordo com sua estrutura. A Figura 114 apresenta a proposta de fragmentação para **S16** (p. 165).

*Tabela 13- Dados de RMN 1D e 2D de S16

C	RMN ¹ H δ_H	RMN ¹³ C δ_C	COSY ¹ H- ¹ H	HETCOR J_{CH}	HMBC ² J_{CH} ³ J_{CH}
1	-	137,08	-	-	-
2	6,46 (s)	105,36	-	H2	- H6
3	-	153,20	-	-	H2 -
4	-	137,08	-	-	- H2/H6
5	-	153,20	-	-	H6 -
6	6,46 (s)	105,36	-	H6	- H2
β	3,01 (t, 7,5)	31,1	H α	H β	H α H2H6
α	3,30 (t, 7,5)	40,7	H β	H α	H β -
C=O	-	199,25	-	-	H2'/H6'
1'	-	137,08	-	-	H3'/H5'
2'	7,96 (dd, 7,5 and 1,5)	128,02	H3' H4'	H2'	H6'
3'	7,45 (t, 7,5)	133,42	H2' H4'	H3'	- -
4'	7,56 (tt, 7,5 and 1,5)	128,82	H2'H6' H3'H5'	H4'	H2'H6'
5'	7,45 (t, 7,5)	133,42	H4' H6'	H5'	- -
6'	7,96 (dd, 7,5 and 1,5)	128,02	H4' H5'	H6'	H2
C3	3,84 (s)	56,07			
C4	3,82 (s)	60,83			
C5	3,84 (s)	56,07			

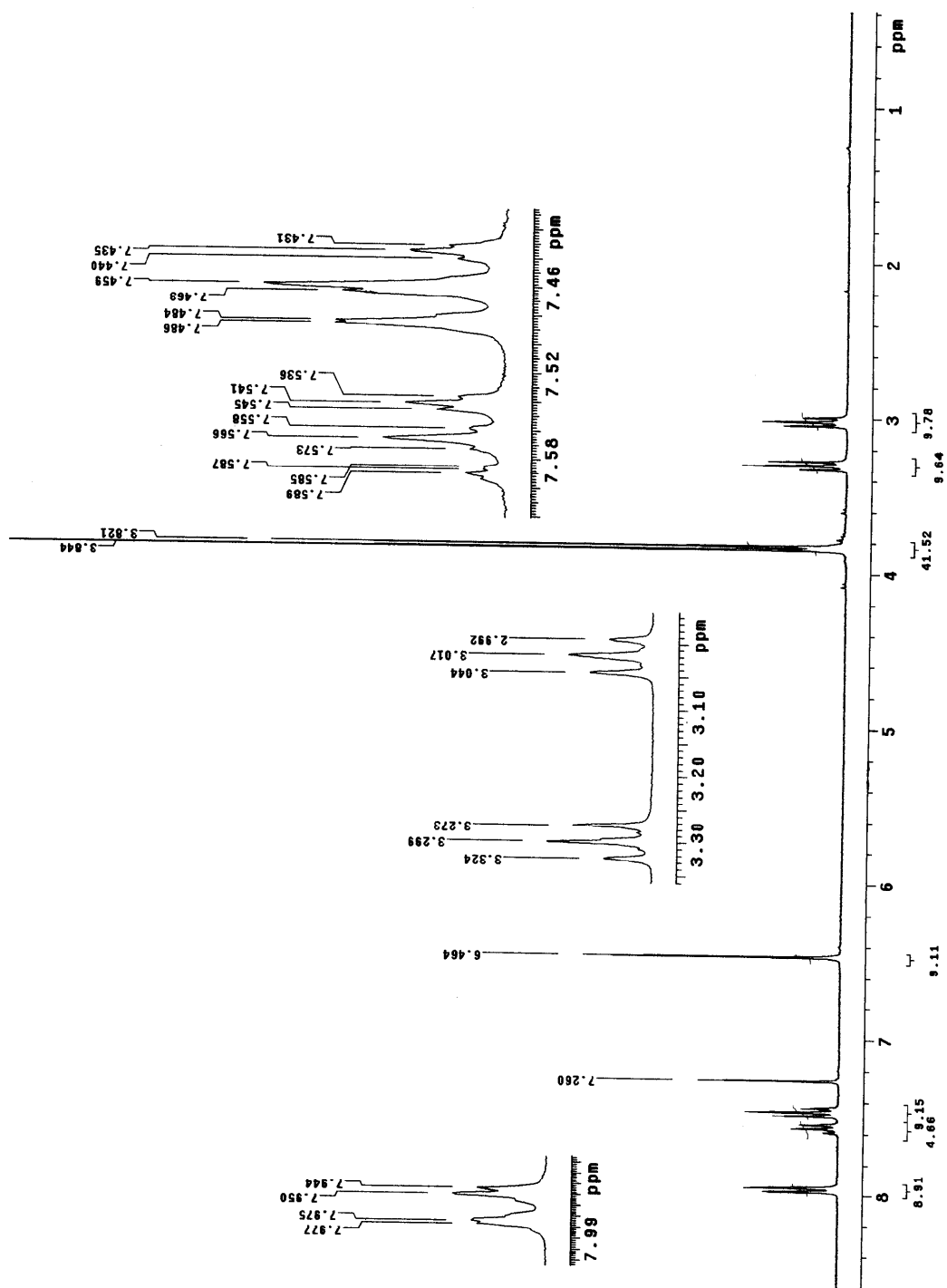


Figura 104- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S16.

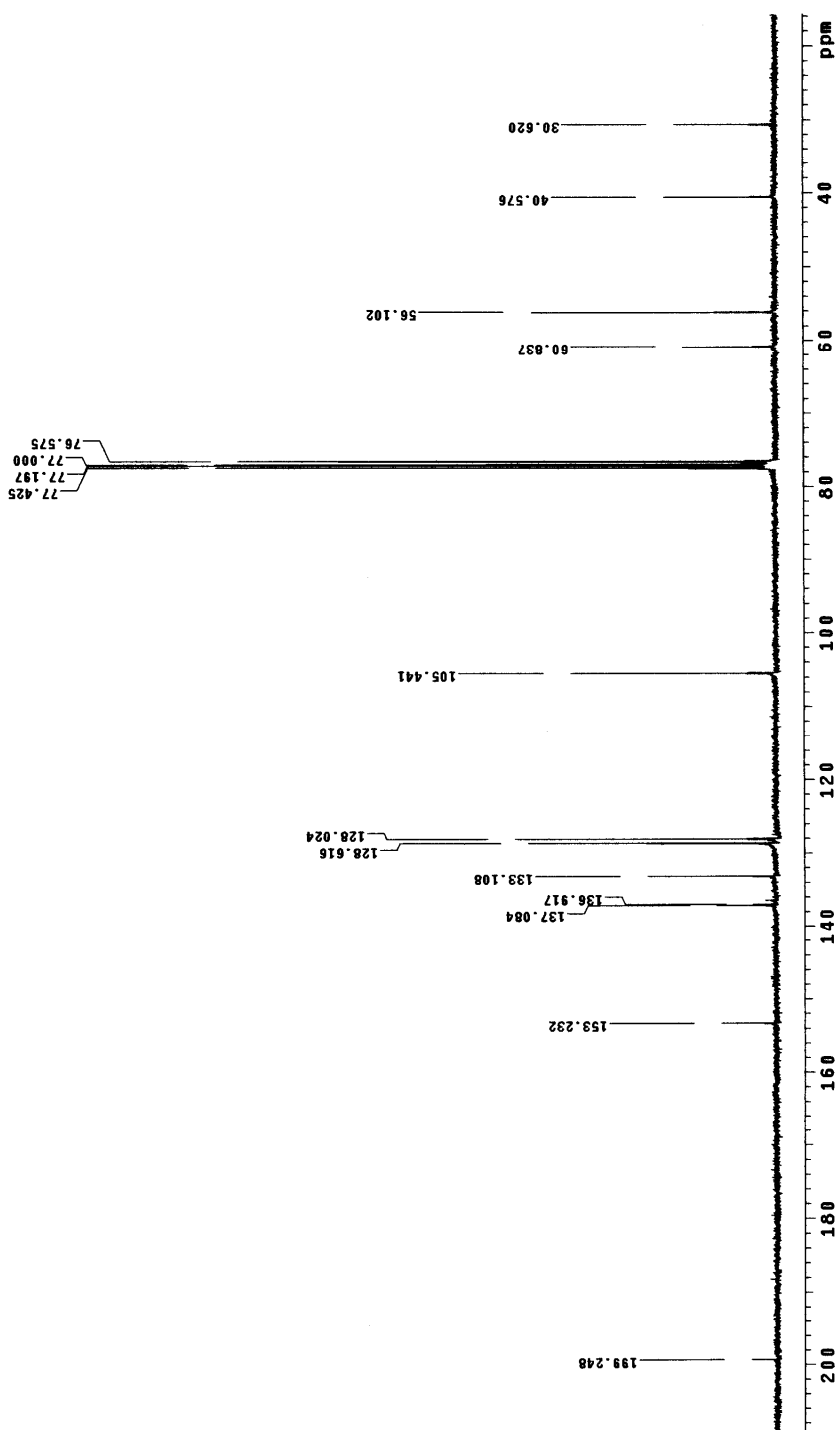


Figura 105- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl₃) de S16.

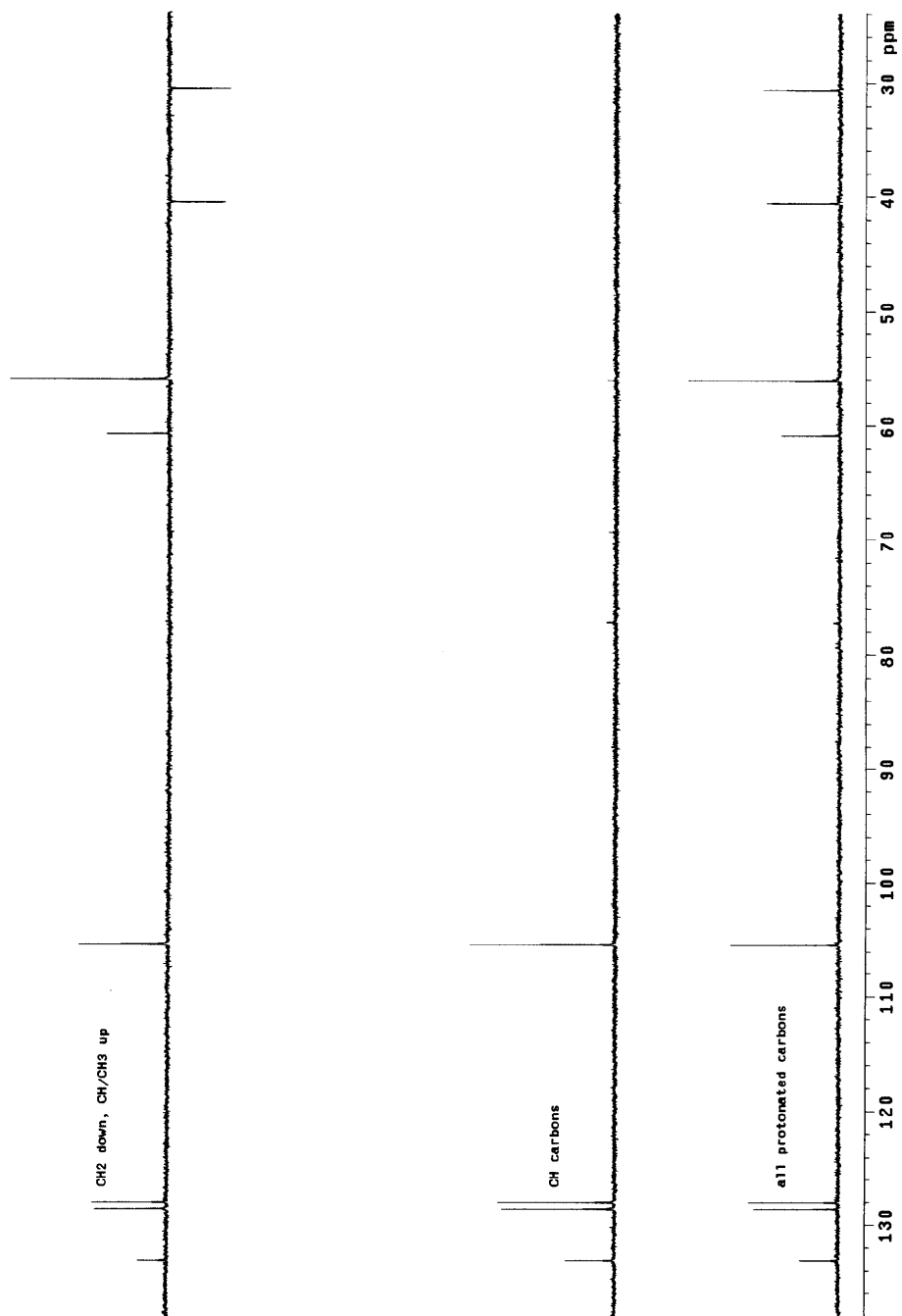


Figura 106- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (75 MHz, CDCl_3) de S16.

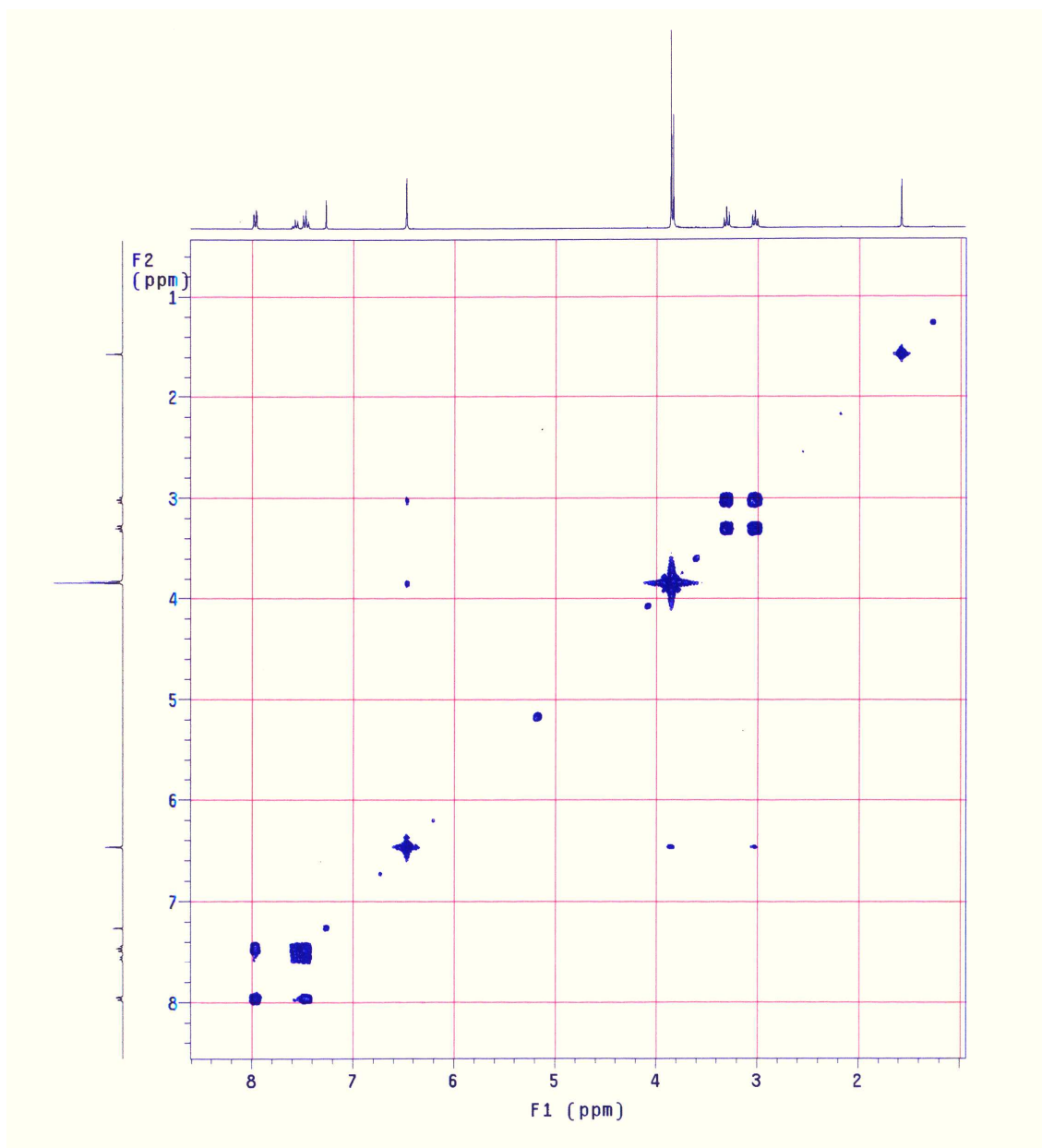


Figura 107- Espectro COSY de S16.

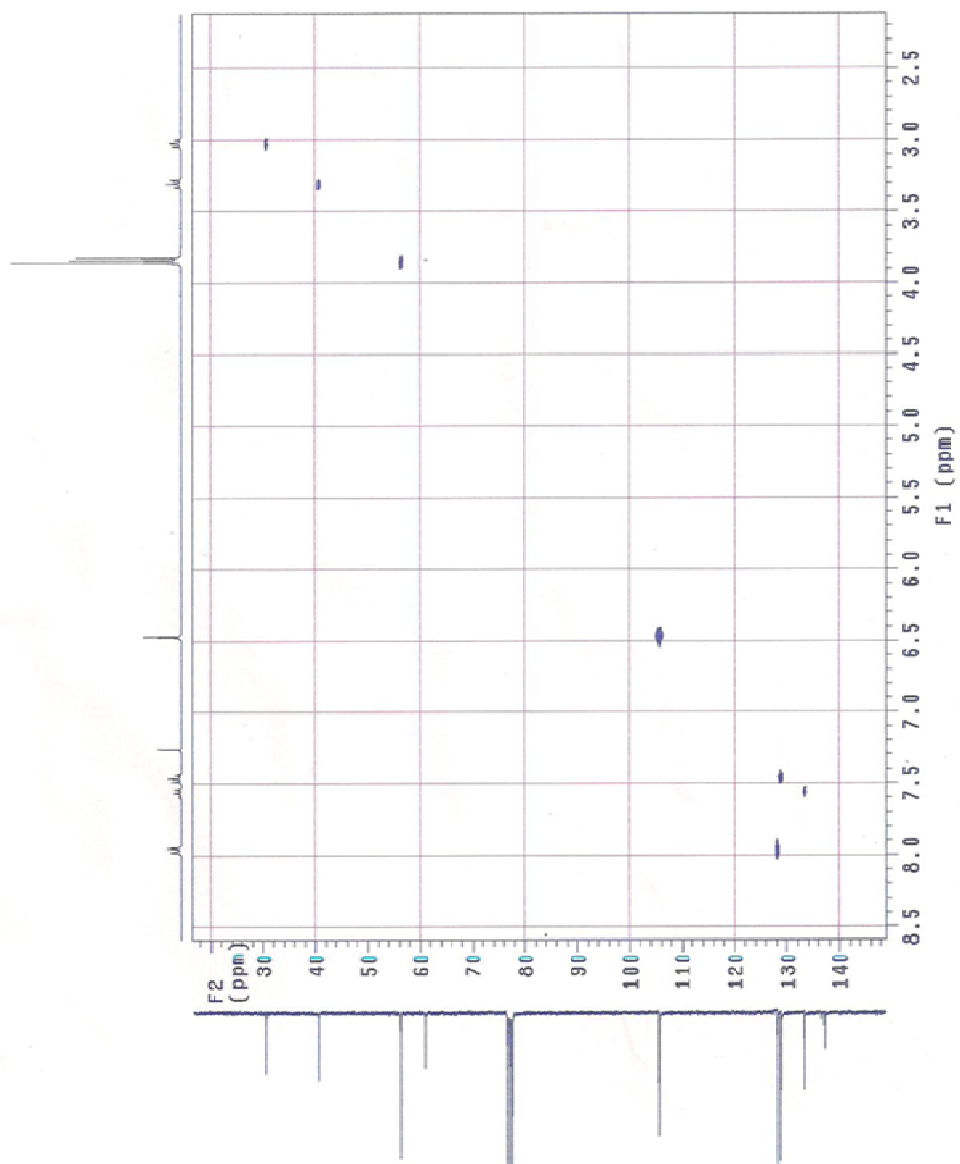


Figura 108- Espectro de HETCOR de S16.

A Figura 109 apresenta as principais correlações no espectro de HMBC para a substância **S16**.

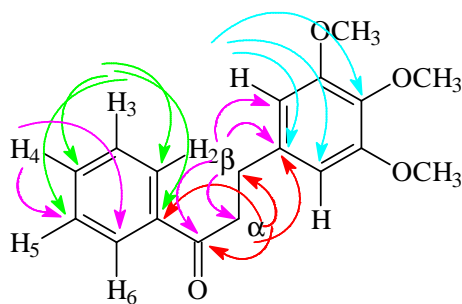


Figura 109- Principais correlações no espectro de HMBC para **S16**.

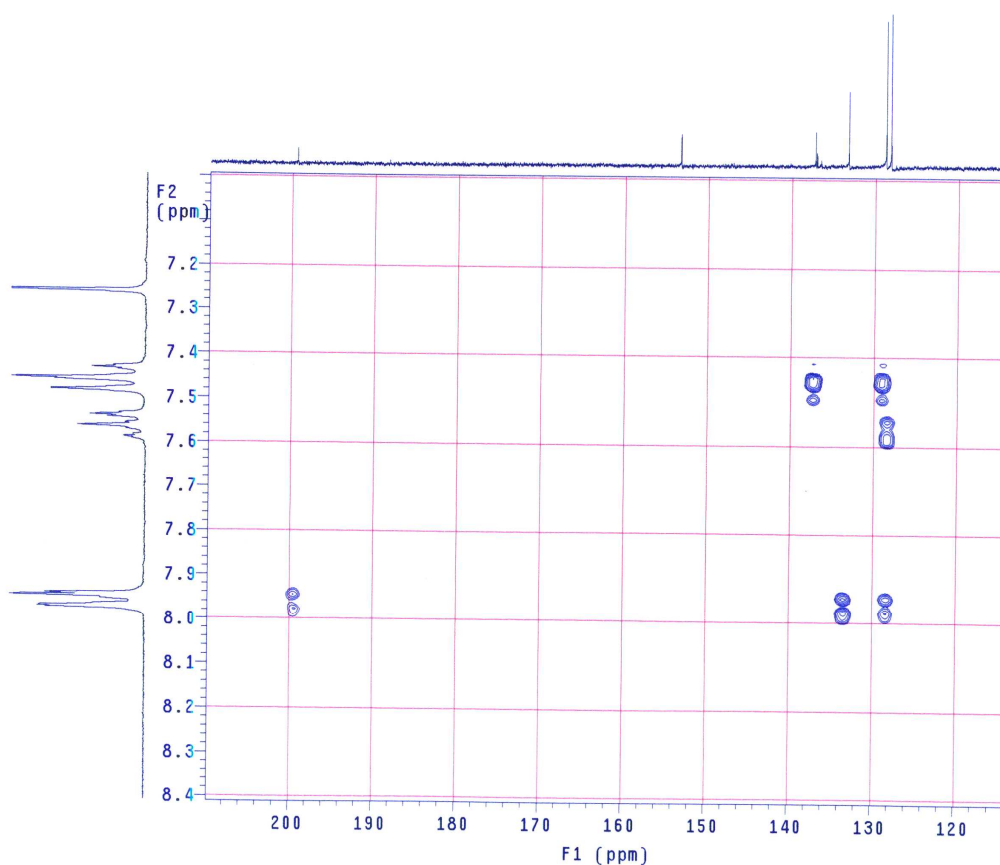


Figura 110- Expansão do espectro de HMBC de **S16**.

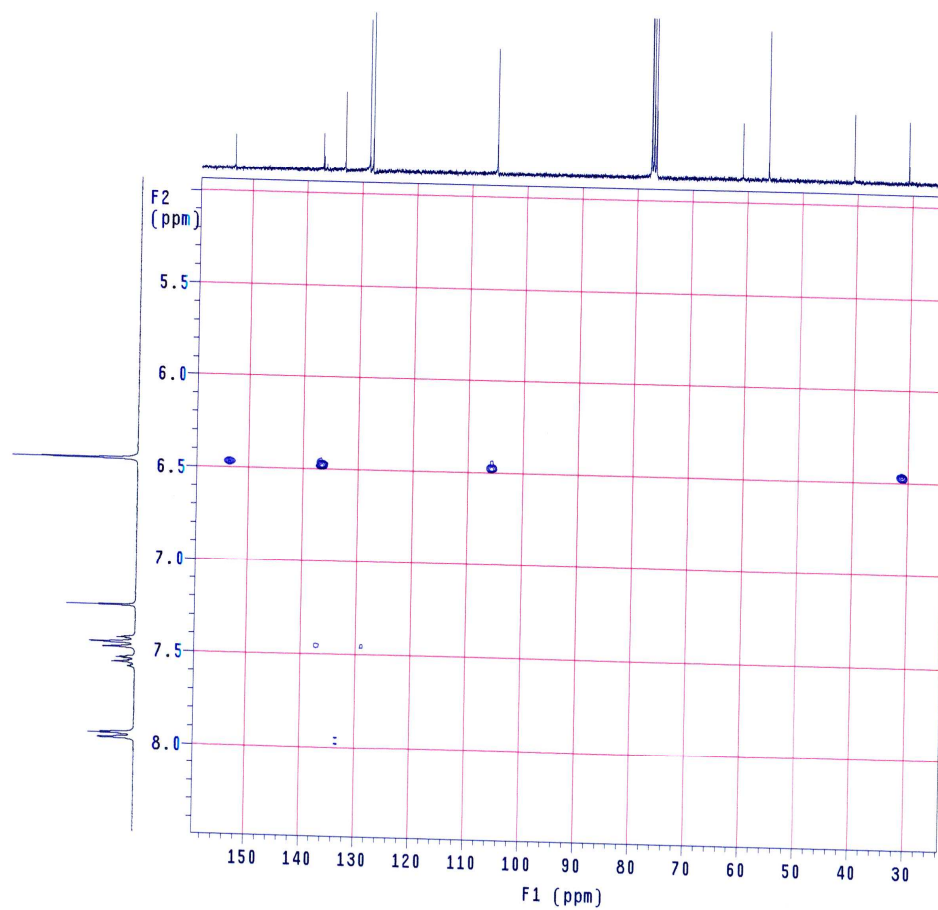


Figura 111- Expansão do espectro de HMBC de S16.

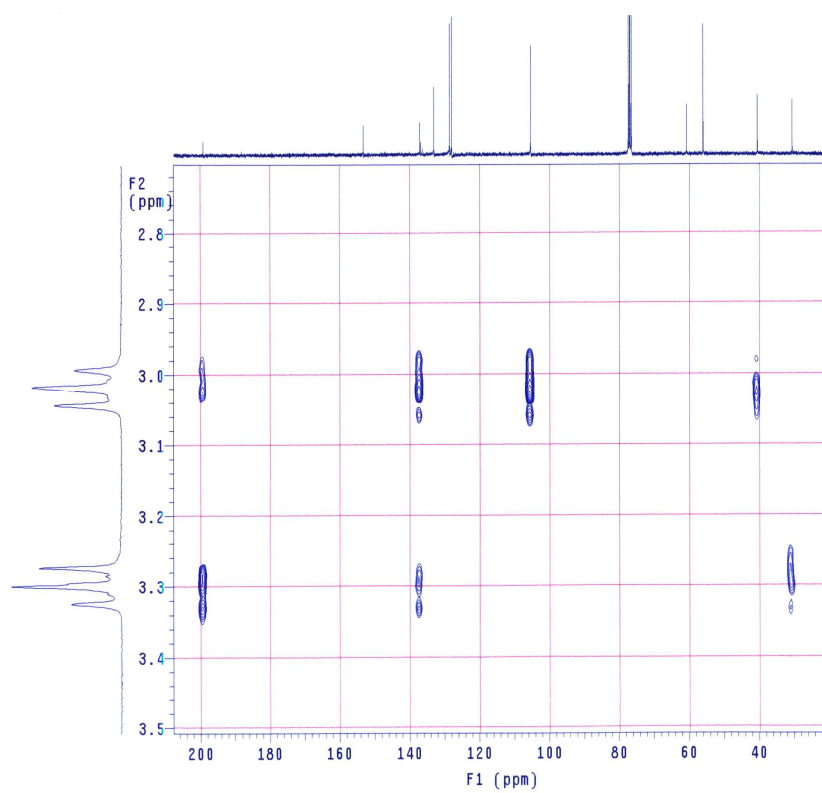


Figura 112- Expansão do espectro de HMBC de S16.

DC1 #798 RT: 16,97 AV: 1 NL: 2,23E8
T: + c Full ms [41,00-450,00]

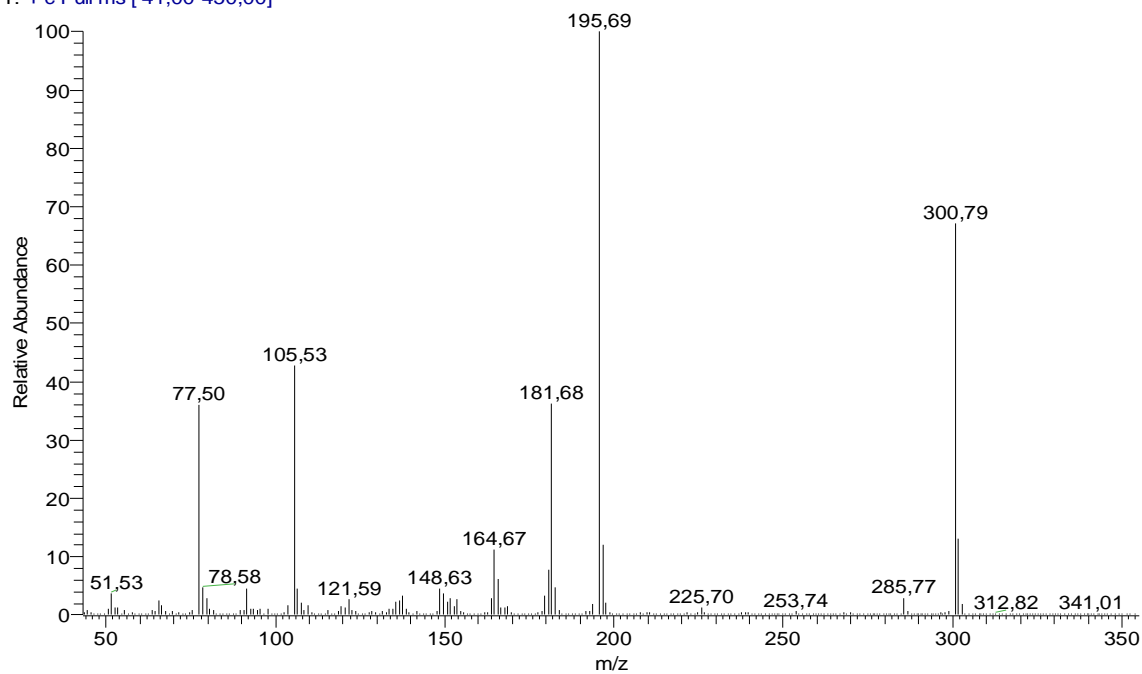


Figura 113- Espectro de massas de S16.

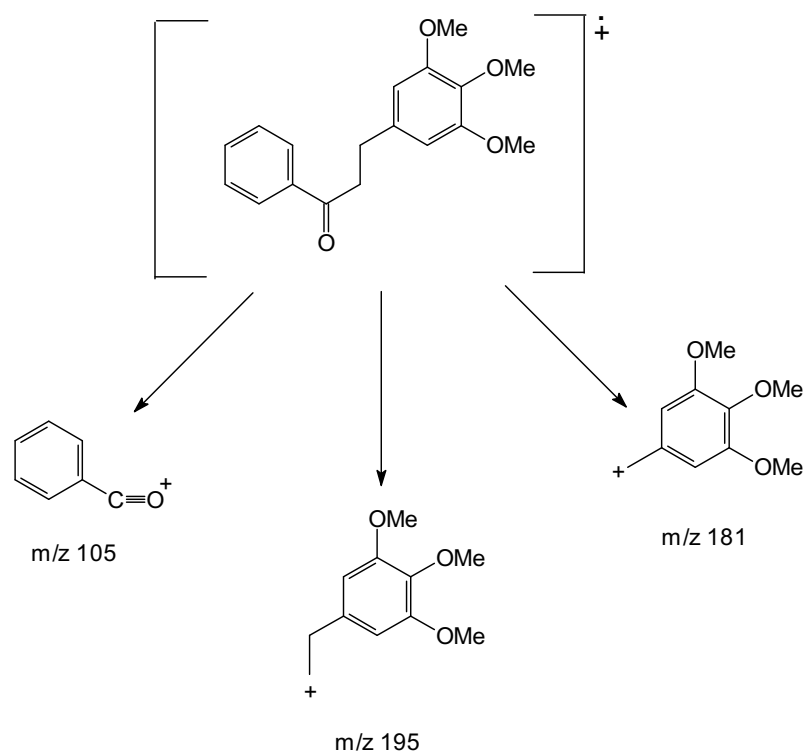


Figura 114- Proposta de fragmentação para S16.

4.5.2. Reação de redução da chalcona **S3** e obtenção da diidrochalcona **S17**, 3-(2,3,4-trimetoxifenil)-1-(4-metóxi)-fenilpropan-1-ona.

4.5.2.1. Diidrochalcona **S17**: 3-(2,3,4-trimetoxifenil)-1-(4-metóxi)-fenilpropan-1-ona.

A diidrochalcona **S17** foi obtida a partir da reação de redução (hidrogenação) da chalcona **S3** para que houvesse também uma comparação entre os dados obtidos do produto na reação de biorredução quando foi utilizado o *Aspergillus flavus*, já que as duas reações forneceram como produto a respectiva diidrochalcona **S17** (Figura 115).

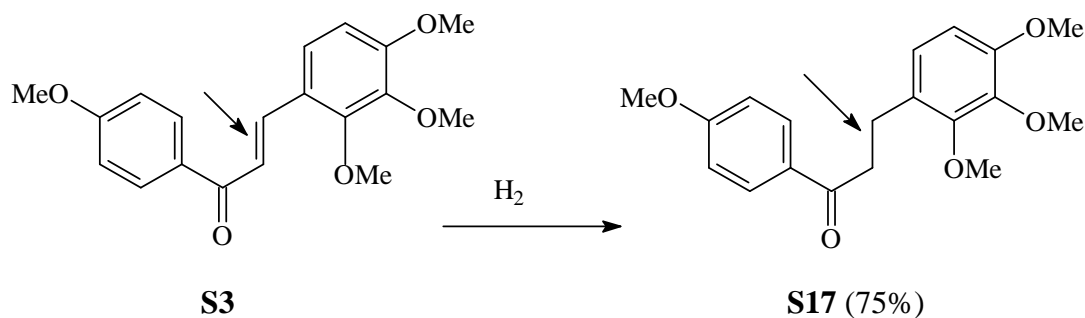


Figura 115- Reação de hidrogenação da chalcona **S3**.

O espectro de RMN ^1H de **S17** (Figura 116, p. 169) foi observado sinais referentes aos hidrogênios metilênicos benzílicos H- β em δ_{H} 2,96 (t, 2H, $J=8,4$ Hz) e aos hidrogênios α -carbonilados H- α em δ_{H} 3,18 (t, 2H, $J=8,4$ Hz). Na região de hidrogênios aromáticos foram observados dois sinais dupletos orto relacionados ($J=8,4$ Hz, 1H cada) em δ_{H} 6,59 e δ_{H} 7,95 atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-5 do anel **B** de **S17**. Os hidrogênios do anel **A** de **S17** foram observados como dois sinais relativos a dupletos orto relacionados (d, $J=8,4$ Hz, 2H cada) que caracteriza um sistema de acoplamento AA'BB' em δ_{H} 7,95 e δ_{H} 6,59 atribuídos aos hidrogênios equivalentes H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C de **S17** (Figura 117, p. 170), pode ser destacado o sinal referente ao carbono carbonílico em δ_{C} 198,39, os sinais entre δ_{C} 142,3 a δ_{C} 163,3 são típicos de carbonos aromáticos oxidados; os sinais entre δ_{C} 107,20 a δ_{C} 130,30 são típicos de carbonos aromáticos não oxidados. Os sinais entre δ_{C} 55,38 a δ_{C} 60,68 são referentes aos

carbonos das metoxilas. Os sinais em δ_C 25,27 e δ_C 39,48 são referentes aos carbonos metilênicos C- β e C- α , respectivamente.

O espectro de DEPT (Figura 118, p.171) confirma a presença dos sinais dos dois carbonos metilênicos C- β (δ_C 25,27) e C- α (δ_C 39,48), os sinais referentes aos carbonos das quatro metoxilas e quatro sinais de carbonos metínicos aromáticos.

O espectro de HETCOR (Figura 119, p.172) mostra oito correlações sendo: quatro correlações em δ_H 7,95 (H-2'/H-6'), δ_H 6,92 (H-3'/H-5'), δ_H 6,87 (H-6) e δ_H 6,60 (H-5) com os sinais em δ_C 130,31 (C-2'/C-6), δ_C 113,82 (C-3'/C-5'), δ_C 123,95 (C-6) e δ_C 107,21 (C-5) respectivamente, as correlações dos sinais dos hidrogênios das metoxilas com os sinais dos respectivos carbonos e as duas correlações dos hidrogênios metilênicos em δ_H 3,18 (H- α) e δ_H 2,98 (H- β) com os sinais dos carbonos em δ_C 25,27 (C- β) e δ_C 39,48 (C- α), respectivamente.

O espectro de HMBC (Figuras 120 e 121, p.173 e 174) e sua expansão apresentam as seguintes correlações, reforçando os dados já mencionados anteriormente. O sinal em δ_H 7,95 (H-2'/H-6') correlaciona-se com os sinais em δ_C 163,32 (4') e em δ_C 130,31 (C-2'/C-6') a 3J . A correlação do sinal em δ_H 6,92 (H-3'/H-5') com o sinal em δ_C 129,9 (C-1) é observada e o sinal em δ_H 6,60 (H-5) correlaciona-se com os sinais em δ_C 142,3 (C-3) e a δ_C 127,2 (C-1) a 3J .

O espectro de massas de **S17** (Figura 122, p. 175), além do íon molecular em m/z 330, exibiu picos em m/z 195 (24%), 181 (98%), 166 (48%), 135 (100%) e 107 (165), em acordo com sua estrutura. A Figura 123 apresenta proposta de fragmentação para **S17** (p.175).

A Tabela 14 apresenta os dados de RMN 1D e 2D da diidrochalcona **S17**.

Tabela 14- Dados de RMN de 1D e 2D de **S17**

C	RMN ¹ H 6 $\delta_H(\text{ppm})$	RMN ¹³ C 6 $\delta_C(\text{ppm})$	COSY	HETCOR J_{CH}	HMBC $^2J_{CH}$ $^3J_{CH}$	
1	-	127.2	-	-	-	H5/H α H6
2	-	151.8	-	-	-	
3	-	142.3	-	-	-	H5
4	-	152.2	-	-	-	H6
5	6.59(<i>d</i> , <i>J</i> 8.4)	107.2	H6	H5	-	-
6	6.87(<i>d</i> , <i>J</i> 8.4)	123.9	H5	H6	-	H3
β	2.95(<i>t</i> , <i>J</i> 8.4)	25,5	H α	H β	H α	H6
α	3.18(<i>t</i> , <i>J</i> 8.4)	39.4	H β	H α	H β	-
C=O	-	198.3	-	-	H α	H2'/H6' H β
1'	-	129.9	-	-	-	-
2'	7.95(<i>d</i> , 9.3)	130.3	H3'	H2'	H3'	H6'
3'	6.92(<i>d</i> , 9.3)	113.6	H2'	H3'	-	-
4'	-	163.3	-	-	-	H2'H6'
5'	6.92(<i>d</i> , 9.3)	113.6	H6'	H5'	-	-
6'	7.95(<i>d</i> , <i>J</i> 9.3)	130.3	H5'	H6'	H5'	H2'
C2	3.90 (<i>s</i>)	60.8	-	-	-	-
C3	3.88 (<i>s</i>)	60.6	-	-	-	-
C4	3.85 (<i>s</i>)	55.9	-	-	-	-
C4'	3.83 (<i>s</i>)	55.3	-	-	-	-

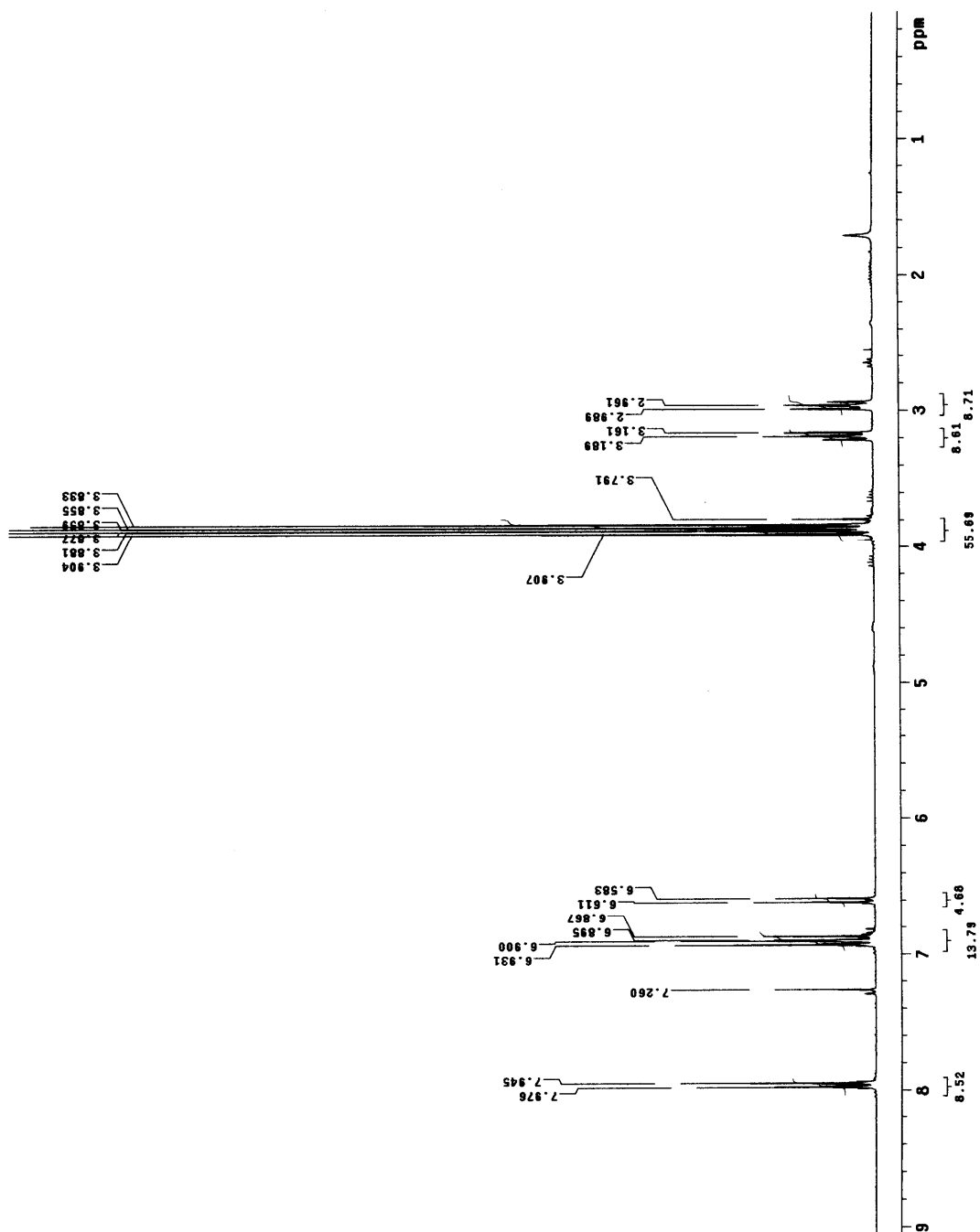


Figura 116- Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S17.

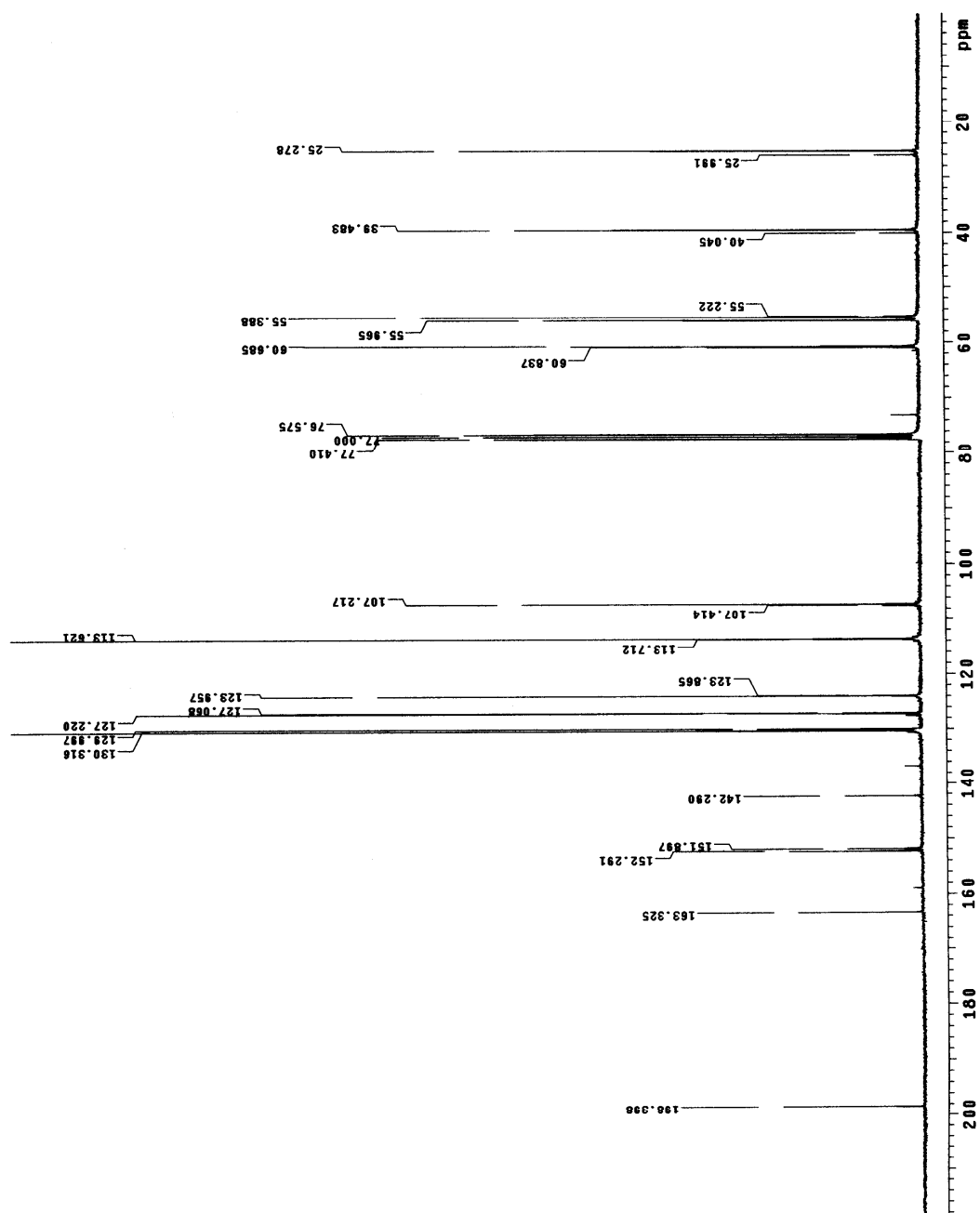


Figura 117- Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S17.

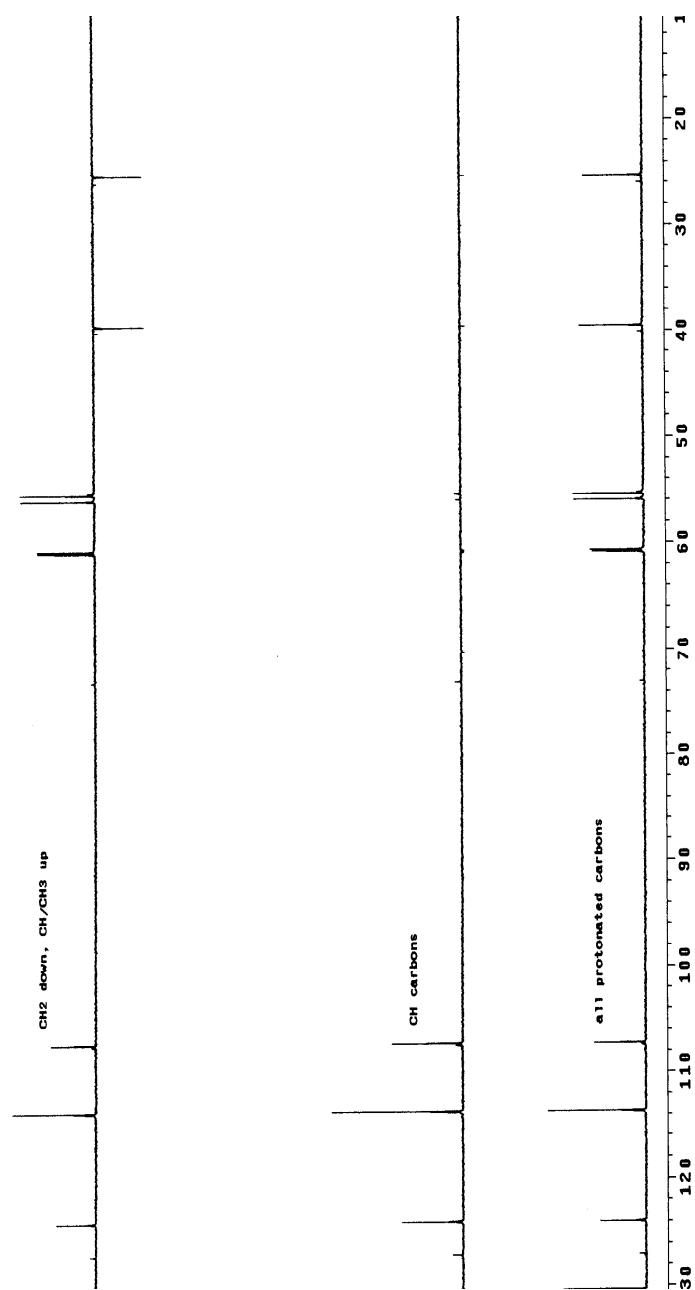


Figura 118- Espectro de DEPT de S17.

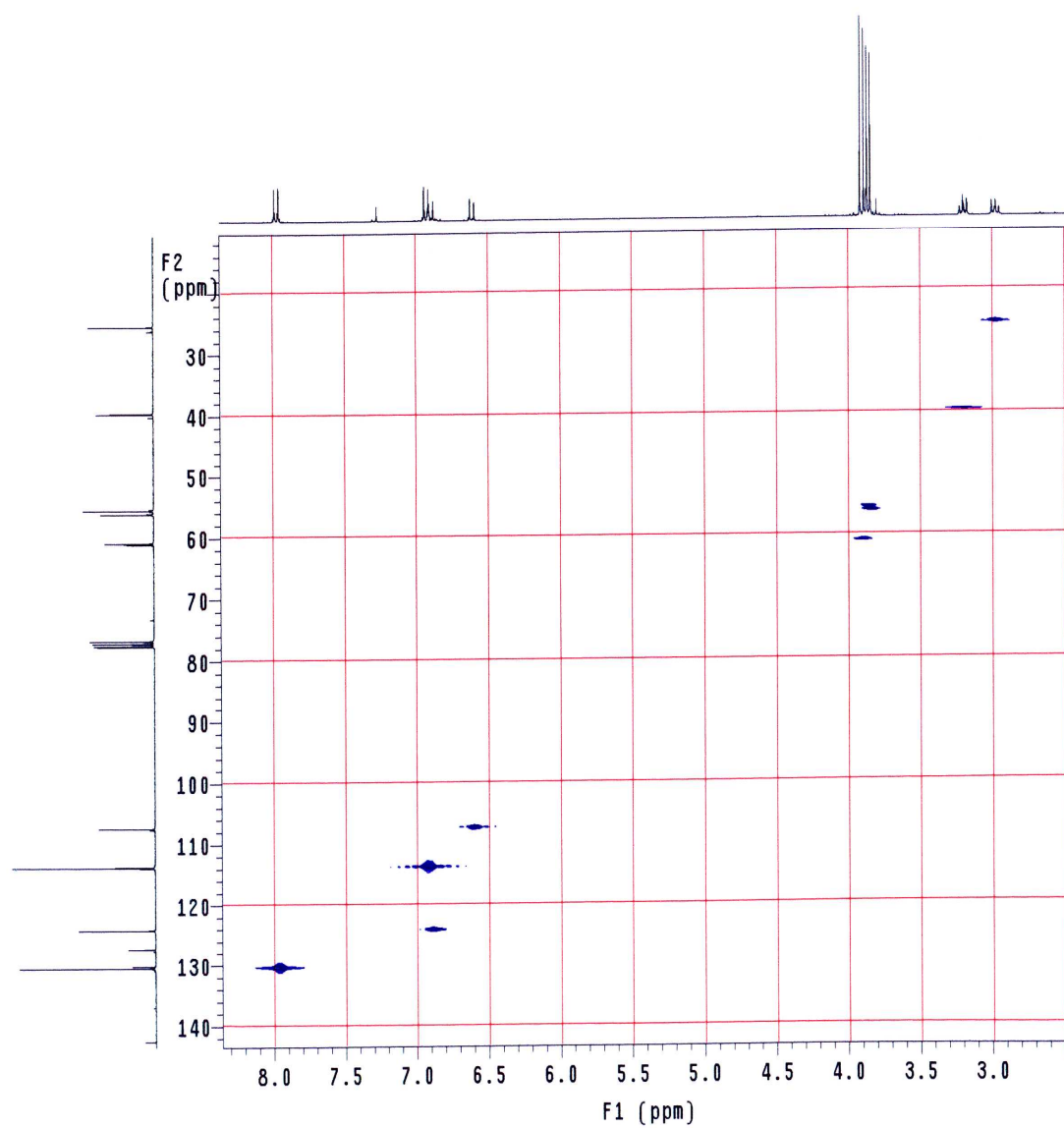


Figura 119- Espectro de HETCOR de S17.

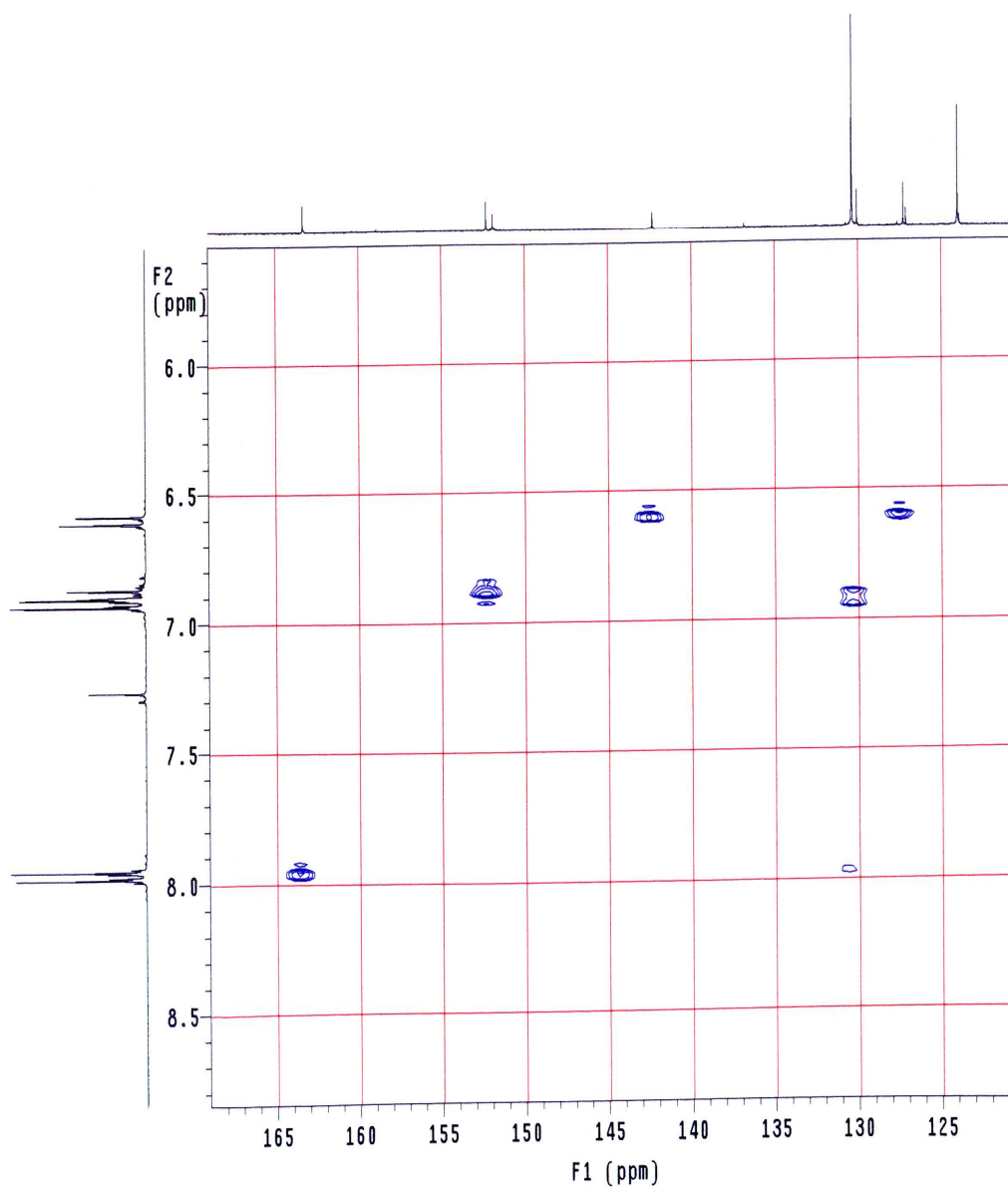


Figura 120- Expansão do espectro de HMBC de S17.

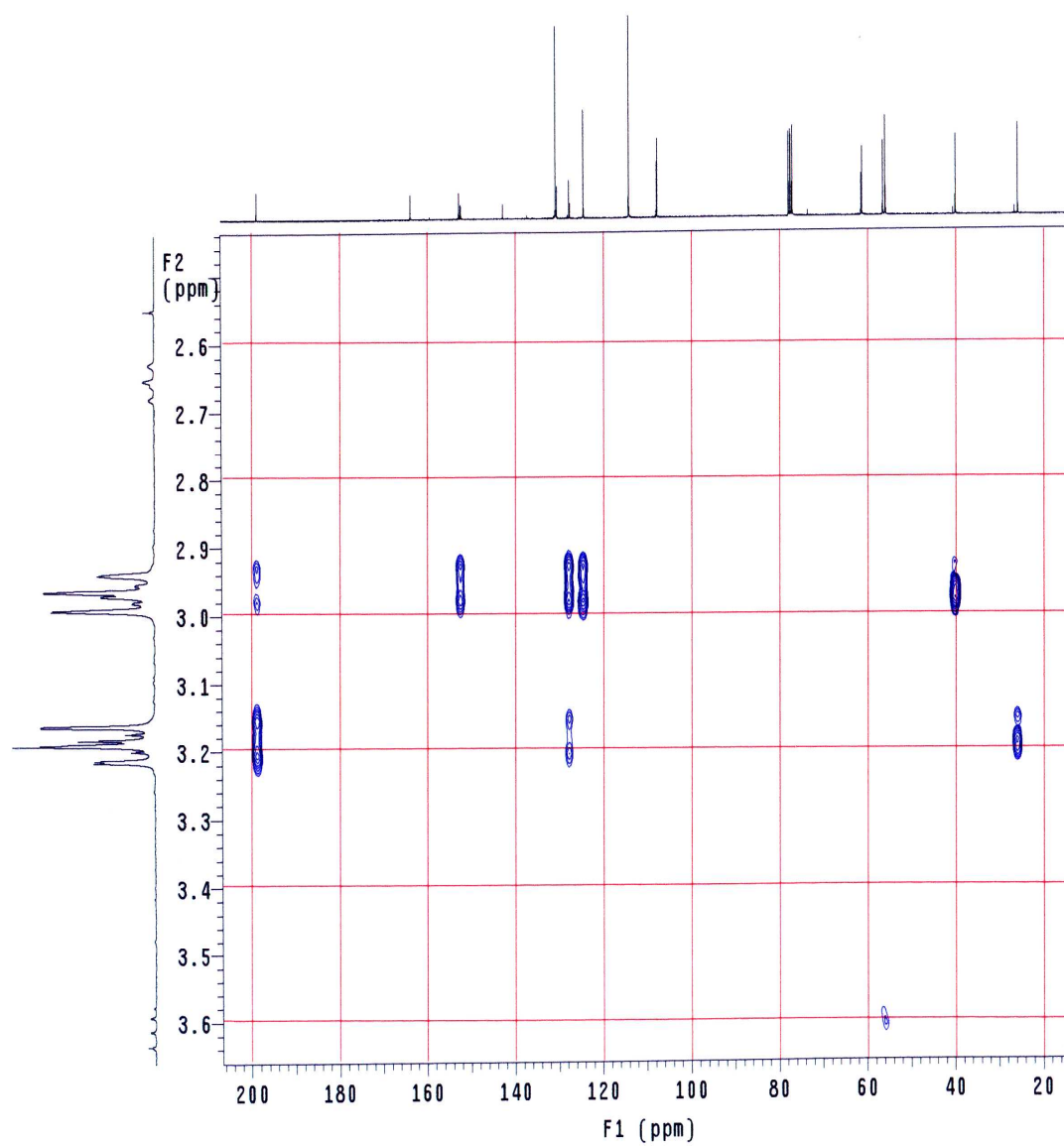


Figura 121- Expansão do espectro de HMBC de S17.

DC #904 RT: 18,74 AV: 1 NL: 1,29E8
T: + c Full ms [41,00-450,00]

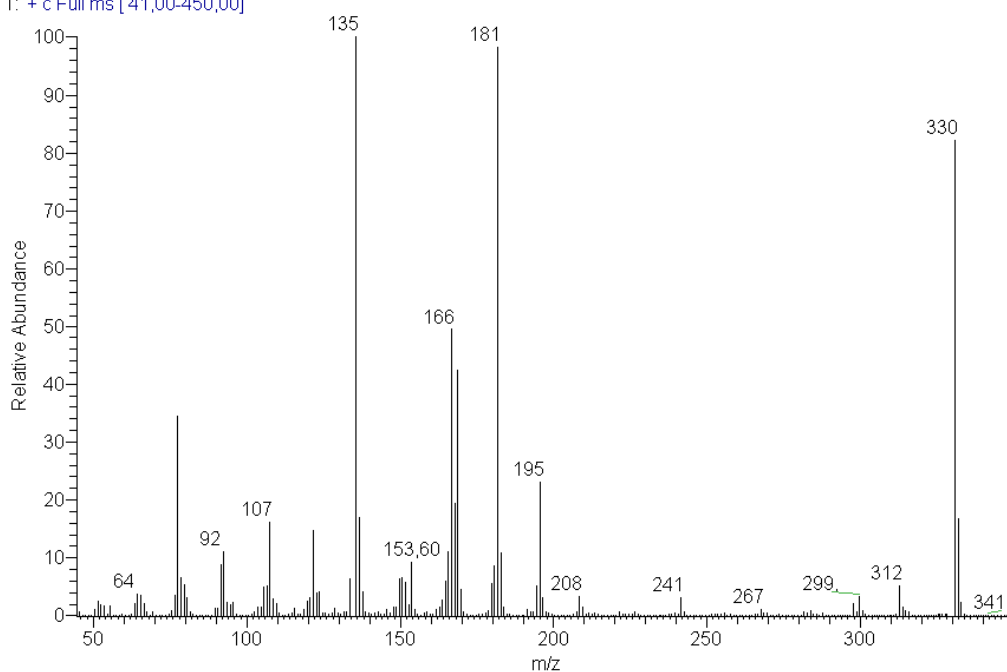


Figura 122- Espectro de Massa de **S17**.

A Figura 123 apresenta a proposta de fragmentação para **S17**.

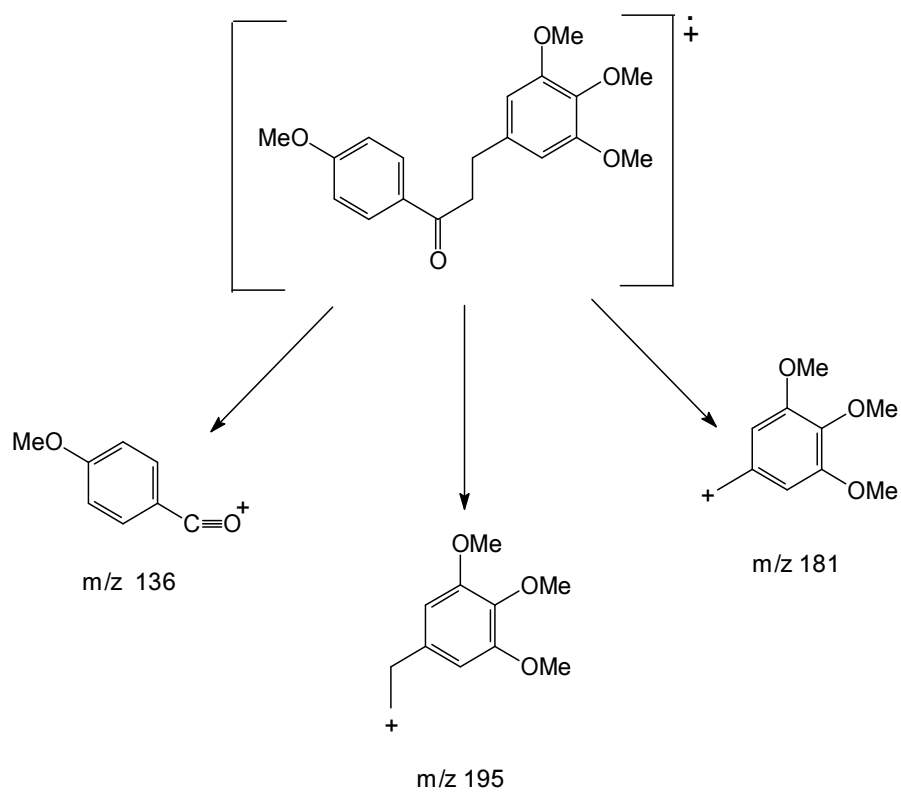


Figura 123- Proposta de fragmentação para **S17**.

5- ATIVIDADE ALELOPÁTICA

5.1.. ATIVIDADE ALELOPÁTICA DA TRICINA (S10)

Os efeitos da tricina sobre a germinação, desenvolvimento da radícula e hipocótilo das espécies malícia, mata-pasto e puerária encontram-se na Tabela 15.

TABELA 15 – Efeitos alelopáticos da substância tricina (**S10**) sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de três espécies de plantas de área de pastagens cultivadas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Bioensaio	Concentração (mg L ⁻¹)	Espécie receptora		
		Malícia	Mata-pasto	Puerária
Germinação	200	32,0Ba	15,0Bb	15,0Bb
	300	47,0Aa	35,0Ab	30,0Ac
Radícula	200	36,0Ba	24,0Bb	22,0Bb
	300	63,0Aa	40,0Ab	34,0Ac
Hipocótilo	200	28,0Ba	20,0Bb	18,0Ab
	300	43,0Aa	38,0Ab	20,0Ac

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, dentro de cada bioensaio, não diferem pelo teste de Tukey (5%), dentro de cada bioensaio.

A intensidade dos efeitos alelopáticos da tricina (**S10**) variou em função da concentração, das espécies receptoras malícia, mata-pasto e puerária e do tipo de bioensaios realizados: germinação de sementes e desenvolvimento da radícula e do hipocótilo. A intensidade dos efeitos esteve positivamente associada ao aumento da concentração, com inibições mínimas e máximas obtidas nas concentrações de 200 e 300 mg L⁻¹, respectivamente, tanto para a germinação das sementes, quanto para desenvolvimento da radícula e do hipocótilo (Tabela 15), sendo as inibições efetivadas na concentração de 300 mg L⁻¹ sempre superior estatisticamente ($p < 0,05$) à concentração de 200 mg L⁻¹. Independentemente do fator da planta analisada, seja ele germinação, desenvolvimento da radícula ou desenvolvimento do hipocótilo, as inibições efetivadas pela tricina sobre a espécie malícia foram de maior magnitude ($p < 0,05$) em comparação às inibições sobre mata-pasto e

puerária, indicando maior sensibilidade da malícia aos efeitos alelopáticos da tricina. Independentemente da concentração e das espécies receptoras, o desenvolvimento da radícula foi o fator da planta mais intensamente afetado pela substância, havendo pouca variação entre a germinação de sementes e o desenvolvimento do hipocótilo.

As plantas daninhas produzem dois tipos básicos de interferências em áreas onde ocorrem: a) alelospolia - que envolve a competição por fatores essenciais e b) alelopatia- que envolve liberação de substâncias químicas para o ambiente. A literatura contempla vários trabalhos ressaltando a importância da alelopatia na interferência promovida pelas plantas daninhas nos mais variados tipos de cultivos (HIRAI et al., 2000; KONG et al., 2002; KHANH, 2005). As plantas, aí incluídas as daninhas, produzem, estocam e posteriormente liberam para o ambiente um sem-número de compostos químicos com potencial para afetar a germinação de sementes e o desenvolvimento de outras espécies de plantas em suas vizinhanças (DUKE et al., 2002; PHILLIPS et al., 1995). Entre esses compostos os flavonóides merecem destaque pela importante que representam em termos de atividade alelopática (LÔBO et al., 2008; TANG & ZHANG, 1986).

A literatura disponível fornece vários e bons exemplos do potencial alelopático inibitório de várias substâncias químicas pertencentes à classe dos flavonóides. Lobo et al. (2008), por exemplo, encontraram efeitos alelopáticos marcantes de dois flavonóides sobre a germinação e o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo das espécies daninhas malícia e mata-pasto. Em outro estudo, Arruda et al. (2005), encontraram efeitos alelopáticos inibitórios expressivos de duas flavonas sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de espécies invasoras. Especificamente para a substância tricina (**S10**), efeitos alelopáticos sobre a germinação de semente foram documentados por Weston et al. (1981). O conjunto dessas informações permite inferir que a substância tricina provavelmente esteja envolvida na dinâmica que o capim-gengibre exerce nas áreas de pastagens cultivadas da Região Amazônica.

As diferentes intensidades inibitórias promovidas pela tricina (**S10**) sobre as duas plantas daninhas e da leguminosa forrageira assumem aspectos relevantes sobre a ótica de manejo das pastagens cultivadas da Região Amazônica. Os efeitos sobre a germinação de sementes reduzem o fluxo de novos indivíduos, comprometendo a renovação das espécies, enquanto os efeitos sobre o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo são especialmente importantes na medida em que reduzem a capacidade competitiva das espécies por fatores

essenciais à sobrevivência. A principal consequência desses efeitos é a alteração do padrão e da densidade das espécies (SOUZA FILHO et al., 2001). No caso das pastagens cultivadas da Região Amazônica invadida pelo capim-gengibre, a tendência dessa espécie formar estandes puros, pode ser atribuída, em parte, à capacidade de produzir e liberar, para o ambiente, a substância tricina. Adicionalmente, o conjunto dessas informações aponta para a necessidade de se estabelecer estratégias permanentes de controle de espécies de plantas daninhas com as características semelhantes ao do capim-gengibre, com vistas a reduzir os efeitos deletérios sobre a produtividade e longevidade das pastagens.

5.1.2. Efeitos do pH na atividade alelopática da tricina (S10)

As variações na atividade alelopática da tricina, na concentração de 200 mg L⁻¹ sobre o percentual de germinação em diferentes condições de pH, das espécies malícia, mata-pasto e puerária encontram-se na Tabela 18.

TABELA 16. Variações na atividade alelopática do aleloquímico tricina, na concentração de 200 mg L⁻¹, em diferentes condições de pH. Dados expressos em percentual de germinação.

Espécie receptora	Valores de pH		
	3,0	6,0	9,0
Malícia	77,0Aa	72,0Bb	45,0Cc
Mata-pasto	80,0Aa	78,0Aa	68,0Ab
Puerária	76,0Aa	73,0Ba	55,0Bb

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

A intensidade dos efeitos alelopáticos da substância tricina (**S10**) variou ($p < 0,05$) consideravelmente em função do pH. Os efeitos inibitórios foram mais intensos ($p < 0,05$) em condições de pH alcalino (9,0) do que em condições de pH neutro ou ácido (Tabela 16, p. 178). Poucas variações foram encontradas nos efeitos alelopáticos da substância entre as condições ácida e neutra. Quando considera-se os efeitos do pH em relação às espécies de plantas empregadas como receptoras, observa-se que para todas as três espécies, os efeitos foram mais intensos em pH 9,0, sendo a malícia aquela com maior sensibilidade aos efeitos, seguida de puerária e mata-pasto. Esses dados revelam a possibilidade de manipular a atividade da substância tricina com alterações do pH da solução e que esses efeitos podem ser de maior ou menor magnitude, dependendo da espécie-alvo.

A literatura disponível relativa aos efeitos do pH na atividade alelopática de um dado aleloquímico é extremamente limitada. Entre os poucos trabalhos disponíveis estão o de Harper & Balke (1981), no qual os autores encontraram efeitos expressivos do pH na atividade alelopática do ácido salicílico. Em outro trabalho, Santos et al. (2008), analisando os efeitos do pH na atividade alelopática de dois triterpenos pentacíclicos verificaram que as duas substâncias manifestaram exigências diferenciadas em relação ao pH, com a fridelina apresentando máximos efeitos em condições ácidas, enquanto que o epifridelinol, em condições alcalinas. Embora as informações disponíveis sejam limitadas, aparentemente, as exigências dos aleloquímicos em relação ao valor do pH são diferenciadas e específicas para cada aleloquímico. Dessa forma, o conhecimento dessa informação é essencial para o estabelecimento de estratégias que possibilitem potencializar a atividade de cada aleloquímico.

As variações observadas na atividade alelopática da substância tricina, neste trabalho (Tabela 16), podem ser atribuídas, exclusivamente, ao aumento da atividade alelopática inibitória, pois, aparentemente, o pH na faixa de 3,0 a 9,0 não exerce efeitos negativos na germinação de sementes. Souza filho et al. (2001), estudando os efeitos do pH na faixa de 3,0 a 11,0 não observaram variações na germinação de sementes das plantas daninhas malícia e mata-pasto, duas das espécies utilizadas neste trabalho. O trabalho de Batra & Kumar (1993) mostra que a germinação de sementes só é afetada pelo pH, em condições de extrema acidez e alcalinidade, o que não aconteceu no presente trabalho.

5.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA DOS EXTRATOS FÚNGICOS DA BIOMASSA PRODUZIDA PELO *ASPERGILLUS FLAVUS*.

5.2.1. Atividade alelopática do ácido kójico (S13)

A metodologia empregada foi a mesma utilizada nos bioensaios para a tricina (S10), e os resultados obtidos estão representados nas tabelas 17 e 18, demonstrando que o ácido Kójico não apresenta atividade alelopática., não contribuindo para a atividade alelopática que a espécie vegetal *Paspalum maritimum* apresenta.

A tabela 17 apresenta os efeitos do ácido kójico sobre a germinação de sementes de áreas de pastagens cultivadas, indicando que quase nenhuma atividade foi observada, com exceção na concentração de 50 mgL⁻¹ onde ocorreu inibição de apenas 12,5% na germinação de sementes de puerária, o que mostra que esta substância apresenta pequeno efeito alelopático. Nas plantas malícia e mata-pasto, praticamente não houve efeito inibitório.

TABELA 17. Efeitos do ácido kójico sobre a germinação de sementes de plantas de áreas de pastagens cultivadas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Concentração (ppm)	Espécies receptoras		
	Malícia	Mata-pasto	Puerária
10	1,0 Aa	1,0 Aa	5,3 Ba
30	1,0 Aa	3,0 Aa	7,4 ABa
50	2,0 Aa	4,5 Aa	12,4 Ab

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

No bioensaio do desenvolvimento da radícula observa-se pelos resultados, um pequeno efeito quando foi utilizada a concentração de 50 ppm do ácido kójico, de 9,0% no desenvolvimento da radícula de malícia. Nas outras espécies utilizadas como receptoras, quase nenhum efeito inibitório foi observado (Tabela 18).

TABELA 18. Efeitos do ácido Kojico sobre o desenvolvimento da radícula de plantas de áreas de pastagens cultivadas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Concentração (mgL ⁻¹)	Espécies receptoras		
	Malícia	Mata-pasto	Puerária
10	3,0 Ba	2,0 Aa	1,0 Aa
30	5,0 ABa	2,5 Aa	1,0 Aa
50	9,0 Aa	3,0 Ab	3,0 Ab

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

O bioensaio realizado sobre o desenvolvimento do hipocótilo das plantas receptoras malícia, mata-pasto e puerária, praticamente não foi observado nenhum efeito significativo, conforme dados da tabela 21.

Tabela 19. Efeitos do ácido Kójico sobre o desenvolvimento do hipocótilo de plantas de áreas de pastagens cultivadas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Concentração (ppm)	Espécies receptoras		
	Malícia	Mata-pasto	Puerária
10	1,0 Aa	2,0 Aa	1,0 Aa
30	2,5 Aa	3,0 Aa	2,0 Aa
50	3,0 Aa	4,0 Aa	3,0 Aa

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%)

5.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DAS SUBSTÂNCIAS INÉDITAS **S16** E **S17** OBTIDAS POR BIORREDUÇÃO E HIDROGENAÇÃO.

A metodologia empregada foi a mesma utilizada nos bioensaios para a tricina (**S10**) e para o ácido kójico, e os resultados obtidos estão representados nas tabelas 20, 21 e 23. Nos bioensaios para determinação do potencial de inibição das substâncias inéditas **S16** e **S17**, foram utilizadas duas concentrações: 80 e 160 mg L⁻¹.

A intensidade dos efeitos alelopáticos das substâncias **S16** e **S17**, conforme foi observado para a tricina (**S10**), também variou em função da concentração, das espécies receptoras malícia e mata-pasto e do tipo de bioensaios realizados: germinação de sementes, e desenvolvimento da radícula e do hipocótilo. Verificou-se também que a intensidade dos efeitos esteve positivamente associada ao aumento da concentração, com inibições mínimas e máximas obtidas nas concentrações de 80 e 160 mg L⁻¹, respectivamente, tanto quando foram analisados os efeitos sobre a germinação das sementes, como do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo (Tabelas 20, 21 e 22; p. 183 e 184). As inibições efetivadas pelas substâncias **S16** e **S17** sobre a espécie malícia foram de maior magnitude ($p < 0,05$) em comparação à inibição sobre mata-pasto, tanto na germinação de sementes como no desenvolvimento da radícula e do hipocótilo, indicando maior sensibilidade da malícia aos efeitos alelopáticos das substâncias **S16** e **S17**. A substância **S17** na concentração de 160 mg L⁻¹ apresentou um efeito alelopático na germinação de sementes em percentual de inibição de 65%, enquanto que a substância **S16** na mesma concentração apresentou um efeito alelopático de 54%. Com relação ao alongamento da radícula **S17** apresentou um efeito alelopático em percentual de inibição de 49% na concentração de 160 mg L⁻¹, enquanto que **S16** foi mais efetiva, apresentando na mesma concentração um efeito alelopático em percentual de inibição de 61%. Efeitos alelopáticos de **S16** e **S17** sobre o alongamento do hipocótilo foi o fator da espécie malícia menos afetado.

Os efeitos alelopáticos das substâncias **S16** e **S17** não apresentaram efeitos significativos sobre a outra espécie receptora utilizada, mata-pasto.

TABELA 20. Efeitos de duas substâncias químicas sobre a germinação de sementes de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Concentração (mg L ⁻¹)	Substância	Espécies receptoras	
		Malícia	Mata-pasto
80	S16	33 Ca	8,0 BCb
80	S17	27 Da	6,0 Cb
160	S16	54 Ba	12 Ab
160	S17	65 Aa	16 Ab

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

TABELA 21. Efeitos de duas substâncias químicas sobre o alongamento da radícula de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Concentração (mg L ⁻¹)	Substância	Espécies receptoras	
		Malícia	Mata-pasto
80	S16	26,0 Ca	6,0 Db
80	S17	25,0 Ca	11,0 Cb
160	S16	61,0 Aa	37,0 Ab
160	S17	49,0 Ba	26,0 Bb

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

TABELA 22. Efeitos de duas substâncias químicas sobre o alongamento do hipocótilo de duas plantas daninhas. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha, água destilada.

Concentração (mg L ⁻¹)	Substância	Espécies receptoras	
		Malícia	Mata-pasto
80	S16	11,0 Ba	7,0 Ca
80	S17	12,0 Ba	6,0 Ca
160	S16	38,0 Aa	21,0 Ab
160	S17	38,0 Aa	14,0 Bb

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey (5%).

6- CONCLUSÕES

- Este foi o primeiro estudo fitoquímico com a espécie *Paspalum maritimum* Trin. e apresentou componentes majoritários presentes nos extratos brutos analisados, esteróides e flavonóide.
- Das classes das substâncias isoladas das folhas de *Paspalum maritimum* Trin., a flavona tricina pertencente à classe de flavonóides, torna-se um dado importante, devido a ampla variedades de atividades farmacológica e alelopática que são relatadas a esta classe de compostos.
- O estudo do isolamento dos fungos endofíticos das folhas, raízes e rizomas de *Paspalum maritimum* Trin. produziu sete linhagens fúngicas dentre as quais foi identificada uma linhagem, *Aspergillus flavus* (FEFLPM3D1), e os demais fungos estão em fase de identificação. Esses microorganismos estão depositados na Coleção de Cultura do Laboratório de Investigação Sistemática de Microbiologia da Universidade Federal do Pará.
- A interação entre a planta *Paspalum maritimum* Trin. e o fungo *Aspergillus flavus* isolado como endofítico das folhas, aparentemente não apresentaram correlações com a atividade alelopática que esta espécie apresenta, em virtude dos metabolitos majoritários isolados secundários quando utilizados nos bioensaios, apresentarem resultados totalmente diferentes. A flavona tricina quando testada apresentou um razoável nível de inibição, isolada das folhas da planta, enquanto que a substância ácido kójico, isolado da biomassa do fungo *Aspergillus flavus* não apresentou resultado significativo.
- A utilização do microorganismo *Aspergillus flavus* na reação de biorredução de chalconas evidenciou principalmente a redução da dupla ligação entre os carbonos C- α e C- β das chalconas originais, indicando um caminho seguro para a obtenção de dihidrochalconas, evitando a utilização de solventes nocivos à saúde e ao ambiente e também o uso de catalisadores, normalmente de valores econômicos elevados. Neste estudo, não foi observado a formação de produtos de oxidação Baeyer-Villiger ou de outros produtos de interesse. Os resultados indicaram também que à medida que as chalconas são substituídas por grupos metoxilas, o rendimento da biorredução decresce significativamente, o que pode ser explicado pela dificuldade da assimilação destas substâncias pelo fungo, provavelmente devido a baixa permeabilidade nas membranas celulares ou a efeitos tanto estéricos, quanto eletrônicos provocados por esses substituintes.

- Os efeitos alelopáticos das diidrochalconas inéditas **S16** e **S17** obtidas a partir das chalconas **S2** e **S3** por biotransformação e hidrogenação, quando utilizadas nos bioensaios alelopáticos realizados, apresentaram resultados significativos sobre a germinação e o alongamento da radícula da planta malícia, indicando boas perspectivas na busca de bioerbicidas seletivos, já que não ocorreram efeitos alelopáticos inibitórios significativos na outra planta testada, mata-pasto.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K. & BOYETTE, C. D. Biological control of weeds using AAL-toxin. United States Patent Number, v- 5, p. 256-628, 1993.
- ABBAS, H. K. & DUKE, S. O. Phytotoxins from plant pathogens as potential herbicides. *Journal of Toxicology – Toxins Reviews*, v- 14, p. 523-543, 1995.
- ABARCA, M. L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, v- 17, p. 79-84, 2000.
- AHMAD, V.U.; GHAZALA; UDDIN, S. A Triterpenoid Saporin from *Zygophyllum propinquum*. *Phytochemistry*, v- 31, n- 3, p. 1051-1054, 1992.
- AINSWORTH, G. C.; REWELL, R. E. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v- 59, p. 213-224, 1949.
- ALMEIDA, F. S. Alelopatia e as plantas. Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, 1988.
- ALAM, M. S.; CHOPRA, N.; ALI, M.; NIWA, M. Oleanen and stigmaterol derivatives from *Ambroma augusta*, *Phytochemistry* v- 41, p. 1197-1200, 1996.
- ALEXOPOULOS, C. J. & MINS, C. W. *Intrutory Mycology*. 4^a ed., Nova York, J. Wiley & Sons, 1996.
- ALTIERE.; M.A; DOLL, J.D. The potential of allelopathy as a tool for weed management in crop fields. *Pans*, v- 24, n- 4, p. 499-502, 1978.
- AMARESH, R. R and PERUMAL, P. T. Ring Open of Chalcone Epoxides with Vilmeier Reagent. *Tetrahedron Letters*, v- 36, n- 40, p. 7287-7288, 1995.
- ANDRADE, L. H.; KEPLER, F. A.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v- 31, p. 129-135, 2004.
- ARAÚJO, W. L. Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia. Disponível em <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.HTM>, acesso em 24/04/2009.
- ARRUDA M. S. P., ARAÚJO, M. Q., LÔBO, L. T., SOUZA FILHO, A. P. S., ALVES, S. M., SANTOS, L. S., MÜLLER, A. H., ARRUDA, A. C., GUILHOM, G. M. S. P. 2005. Potential allelochemicals isolated from *Puerária phaseoloides*. *Allelopathy Journal*, v- 15, p. 211-220, 2005

BATRA, I. & KUMAR, A. Effects of alkalinity on germination, growth and nitrogen content of whistling (*Cassuaria equisetifolia*) and bufwood (*C. glauca*). Indian Journal Agriculture Science. v- 63, p. 412-416, 1993.

BARCZA, M. V. Hidrogenação e Desidrogenação. Escola de Engenharia de Lorena/ Processos Unitários Orgânicos. Disponível em: <http://www.dequi.eel.usp.br/hidrogenação-barcza>, acesso em 4/01/2009.

BERKESSEL, A.; KOCH, B.; TONIOLO, C.; RAINALDI, M.; BROXTERMANN, Q. B. and KARPTEIN, B. Asymmetric enone epoxidation by short solid-phase bound peptides: Further evidence for catalyst helicity and catalytic activity of individual peptides strands. Peptide Science, v- 84, n- 1, p. 90-96, 2006.

BERNINI, R.; MINCIONE, E.; CORATTI, A.; FABRIZI, G.; and BATTISTUZZI, G. Epoxidation of chromones and Flavonoids in Ionic Liquids. Tetrahedron, v- 60, n- 4, p. 967-71, 2004.

BHATTACHARYYA, J.; STAGG, D.; MODY, N.V.; MILES, D.H. Constituents of *Spartina cynosuroides*: Isolation and ¹³C-NMR Analise of Tricin. Journal Pharmaceutical Sciences, v- 67, p. 1325-1326, 1978.

BITENCOURT, H. R.; SANTOS, L. S. e SOUZA FILHO, A. P. S. Allelopathic Activity of Synthetic Chalcones, Its Precursores and of Related Cetones and Aldehydes. Planta Daninha, v- 25, n- 4, p.747-753, 2007.

BHAGAT, S.; SHARMA, R.; SAWANT, D. M.; SHARMA, L.; CHAKRABORT, A. K. LiOH.H₂O as a novel dual activation catalyst for highly efficient and easy synthesis of 1,3-diaryl-2-propenones by Claisen-Schmidt condensation under mild conditions. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v- 244, p. 20-24, 2006.

BORGES, F. C. ; SANTOS, L. S ; CORREA, M. J. C. ; OLIVEIRA, M. N. ; SOUZA FILHO, A. P. S. . Atividade alelopática de duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). Planta Daninha, v- 25, n- 1, p. 51-59, 2007.

BRIOT, A.; BAER, C.; BROUILLARD, R.; WAGNER, A. and MIOSKOWSKI, C. Concise Synthesis of Dihydrochalcones via Palladium-Catalyzed Coupling of Aryl Halides and 1-Aryl-2-propen-1-ols. Journal of Organic Chemistry, v- 69, p. 1374-1377, 2004.

CALVINO, V.; PICALLO, M.; LÓPEZ-PEINADO, A. J.; MARTÍN-ARANDA, R. M.; DURÁN-VALLE, C. J. Ultrasound accelerated Claisen-Schmidt condensation: A green route to chalcones. Applied Surface Science, v- 252, p. 6017-6074, 2006.

CARVALHO, S.L.; PITELLI, R.A. Levantamento e análise fitossociológica das principais espécies de plantas daninhas de pastagens da região de Selvíria (MS). Planta Daninha, v- 10, n- 1/2, p. 25-32, 1992.

CASTELLANI, A. Viability of mold culture off ungi in destiled water. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v- 42, p. 225, 1939.

- CLIMENT, M. J.; CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. Activated hydrotalcites as Catalysts for Synthesis of Chalcones of Pharmaceutical Interest. *Journal Catalyzes*, v- 221, p. 474-482, 2004.
- CHEN, J. S.; WEI, C.; MARSHALL, M. R. Inhibition mechanism of Kojic acido on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v- 39, n. 11, 1991.
- CORRÊA, J. C. *Antibióticos no dia-a-dia*. 3^a. Ed. Rubio. Rio de Janeiro. 2004.
- DIENER, U.L.; PETTIT, R.E.; COLE, R.J. Aflatoxins, and other mycotoxins in peanuts. IN: PATTEE, H.E.; YOUNG, C.T., EDS. *Peanut science and technology*. American Peanut Research and Education Society, Yoakum, p. 486-519, 1982.
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. & RIMANDO, A. M. Natural products and herbicide discovery. In A. H. COBB & R. C. KIRK-WOOD (eds) *Herbicides and their Mechanisms of Action*, p. 105-133, 2000.
- EDWARDS, M. L.; STEMERICK, D. M.; SUNKARA, P. S. Chalcones: a new class of antimetabolic agents. *Journal Medicinal Chemistry*, v- 33, p. 1948-1954, 1990.
- EMBRAPA. Embrapa Amazônia Oriental, Sistemas de Produção. Criação de Bovinos de Corte no Estado do Pará. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte>, acessado em 28/5/2010.
- FABER, K. *Biotransformation in organic chemistry*. 3^a ed., Germany: Springer – Verlag Heidelberg, p. 402, 1997.
- FERSTL, A. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. W. H. Freeman and Company, p. 381, 1998.
- FUTAMURA, T.; OKABE, M.; TAMURA, T.; TODA, K.; MATSONUBU, T. Improvement of production of Kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae*, MK 107-39. *The Journal of Bioscience and Bioengineering*, v- 91, p. 272-276, 2001.
- FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2^a Ed. Florianópolis/Porto Alegre. UFSC/UFRS, p. 199-525, 2001.
- GARG VK & NES WR . Studies on the C-24 configurations of Δ^7 -sterols in the seeds of *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry*, v- 23, p. 2919-2924, 1984.
- GIRI, A. & NARASU, M.L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, v- 18, p. 1-22, 2000.
- GOLDBLATT, L.A. Mycotoxins — past, present and future. *American Journal Oil Chemical Society*, Chicago, v- 54, p. 302A-310A, 1977.

- GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N. and TADESCO, A. C. The anti oxidant action of Poypodium leucotomos extract and Kojic acid: reactions whit reactive oxygen species. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v- 34, p. 1487-1494, 2001.
- HATZIOS, K.K. Biotechnology applications in weed management. Now and in the future. Advances in Agronomy, v- 41, p. 325-373, 1987.
- HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., MOLINOFF, P. B., R. W. GILMAN, A. G. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 5^a. Ed. McGraw-Hill, p. 1793, 1996.
- HAVEN, P. H.; RAY, F. E. & EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal, 5^a Ed., Guanabara Koogar S.A, 1992.
- HERMOSO, A.; JIMÉNEZ, I. A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI, I. L.; PIÑERO, J. E.; RAVELO, A. G. and VALLADARES, B. Antileishamianial Activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and Synthetic Related Compounds. Structural Requirements for Activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v- 11, p. 3975-3980, 2003.
- HIRAI, N.; SAKASHITA, S.; SANO, T.; INOURE, T.; OHIGASHI, H.; PREMASTHIRA, C.; ASAKAWA, Y.; HARADA, J.; FUJII, Y. 2000. Allelochemicals of the tropical weed *Aphenoclea zeylanica*.. Phytochemistry, v- 55, p. 131-140, 2000.
- IGLESIAS, M.; MARINAS, J. M.; SINISTERRA, J. V. Ba(OH)₂ as Catalyst in Organic Reactions, Part XVI- Contribution to the Study of the Michael Addition Mechanism to chalcone in interfacial solid- liquid conditions. Tetrahedron, v- 43, p. 2335-2342, 1987.
- IRIE, K. and WATANABE, K. I. Aldol condensations with Metal (II) complex catalyst. Bulletin of the Chemical Society of Japan, v- 53, p. 1366-1371, 1980.
- KHANH, T.D.; CHUNG, M.I.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. The exploitation of crop allelopathy in sustainable agriculture production. Journal Agronomy. Crop Science. v- 191, p. 172-184, 2005.
- KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol Glucosides from *Prunella vulgaris*. Phytochemistry, v- 29, p. 2351-2355, 1990.
- KLICH, M. A. Identification of common Aspergillus species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, p. 116, 2002.
- KROHN, K.; STEINGRÖVER, K.; and RAO, M. S. Isolation and Synthesis of chalcones with Different Degrees of Saturation. Phytochemistry. v- 61, p.931-36, 2002.
- KONG, C.; HU, F.; XU, X. Allelopathic potential and chemical constituents of volatiles from *Agerantum conyzoides* under stress. Journal Chemical Ecology, v-28, p. 1173-1182, 2002.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8^a Ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

- LAIR-FULLERINGER, S.; GUILLOT, J.; DESTERKE, C.; SEGUIN, D.; WARIN, S.; BEZILLE, A.; CHERMETTE, R.; BRETAGNE, S. Differentiation between Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Breeding Turkeys and Their Environment by Genotyping with Microsatellite Markers. *Journal of Clinical Microbiology*, v- 41, n- 4, p.1798-1800, 2003.
- LAKSHMI, K. U. and RAMAMURTHI K. Growth and Characterization of 2,3-dibenzylidene-cyclohexanone single crystal. *Crystal Research Technology*, v- 40, p. 1165-1168, 2005.
- LEADLAY, P. F. Introduction to enzyme chemistry. Reino Unido: Athenaeum Press Ltda, p. 82, 1993.
- LEVI, G. I.; BALANDIN, A. A. Bond Energies.
- LI, J. Y., SIDHU, R.S., FORD, E.J., HESS, W.M., STROBEL, G.A. "The induction of taxol production in the endophytic fungus-*Periconia* sp from *Torreya grandifolia*". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v- 20, p. 259-264, 1998.
- LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; SOUZA FILHO, A. P. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). *Química Nova*, v- 31, n.3, p. 493-497, 2008.
- LOWERING, E. G.; LAIDLER, K. J.; Chemical Kinetics. *Chemical Journal*, v- 38, p. 2367, 1990.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. "The Systematic Identification of flavonoids", Springer, Heidelberg, West Germany, 1970.
- MACIEL, J. R. *Paspalum* L. (Poaceae) em Pernambuco: Taxonomia e Biogeografia. Dissertação de Mestrado. PPGBV. UFPE, Recife-PE. 2008.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes Químicos de *Penicillium* sp, um Fungo Endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v- 9, n. 2, p. 189-199, 2007.
- MARTINÉZ, R. R.; CERECERO, J.; CERVANTES, J. Brote de aspergilosis em gaviotas. *Veterinaria Mexico*, v- 31, n. 3, p. 259-260, 2000.
- MCMILLIAN, J. and SUTER, P. J. Constituents of the *Cucumbita maxima*. *Naturwissenschaften*, v- 45, p. 46, 1958.
- MODESTO JUNIOR, M. S.; MASCARENHAS, R. E. B. Levantamento da infestação de plantas daninhas associadas a uma pastagem cultivada de baixa produtividade no nordeste paraense. *Planta Daninha*, v- 19, p. 11-21, 2001.

MORRONE, O.; VEJA, A. S. & ZULOOGA, F. O. Revisión de las especies del género *Paspalum maritimum* L. (Poaceae: Panicoideae. Paniceae), grupo Dissecta (s. str.) Candollea, v- 51, p. 103-138, 1996.

MURRAY, P. R.; DREW, W. L.; KOBAYASHI, G. S.; THOMPSON, J. H. Microbiologia Médica, 1^a ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1992.

MUZIK, T.J. Weed biology and control. New York: McGraw-Hill, p. 273,1970.

NG, S. L.; PATIL, P. S.; RAZAK, I. A.; FUN, H. K.; DHARMAPRAKASH, S. M. A cocrystal of 1-(4-methoxy-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-prop-2-em-1-one. Acta Crystallographica Section E, v- 62, p. 1228-1230, 2006.

NOMA, Y., YamasaKI, S. & Asakawa, Y. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. Phytochemistry, v- 31, p. 2725–2727, 1992.

NRIAGU, J.O.; SIMMONS, M.S. Food contamination from environmental sources. Academic Press, New York, p. 643, 1990.

PALLEROS, D. R. Solvent-free synthesis of chalcones. Journal Chemical Education, v- 81, p. 1345-1347, 2004.

PAULO, A.; DIAS, C.; JIMENO, M.L.; BORGES, C.; NASCIMENTO, J. A. A new $\Delta^{7,22}$ sterol from the bulbs of *Autonöe madeirensis*. Fitoterapia, v- 76, p. 765-767, 2005.

PATEL, R. N. Stereoselective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates. In: Advanced Applied Microbiology, v- 43, p- 91-140, 1997.

PASCHOALATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; LEITE, B.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Mecanismos de patogenicidade em fungos. Revisão Annual de Patologia de Plantas, v- 6, p. 1-47, 1998.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Infecções humanas transmitidas pelos alimentos e pela água. In: PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, v- 2, p. 689-722, 1981.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L. & VIRET, O. “Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi”. Natural Toxis, v- 1, p. 185-196, 1992.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N . P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. Química Nova, v- 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 686, 1965.

REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. Endophytic Fungi in Grass and evolution. Journal of the Torrey Botanical Society, v- 124, n. 2, p. 216, 1996.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de Plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2 ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p. 41-62, 2001.

RICE, E. L. Allelopathy. 2. ed. Orlando: Academic Press, p. 422, 1984.

RIDENOUR, W. M. and CALLAWAY, R. M. The relative importance of allelopathy in interference: the effect of an invasive weed on a native bunchgrass. *Oecologia*, v-126, p. 444-450, 2001.

RINALDO, M. B. Hidrocarbonetos. Disponível em <http://www.rochabergamin.com.br>. Acesso em 5/01/2009.

RIZVI, S.J.H.; MUKERJI, D.; MATHUR, S.N. A new report on a possible source of natural herbicide. *Indian Journal of Experimental Biology*, v- 18, p.777-778, 1980.

ROHR, J. "Biosynthesis of taxol". *Angewandte Chemie-International Edition English*, v- 36, n. 20, p. 2190-2195, 1997.

RUA, G. H. Estudos filogenéticos em Paniceae: os casos de *Paspalum* e *Digitaria*. In: Os avanços da botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética (J. E. A. MARIOTH & R. P. SANTOS, orgs.). Sociedade Botânica do Brasil, Porto Alegre, p. 170-173, 2006.

SANTOS, L. S.; BORGES, F. C.; OLIVEIRA, M. N.; FERREIRA, F. C. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SOUZA FILHO, A. P. S., SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MÜLLER, A. H.; SANTOS, L. S.; SANTOS, J. C. L., SOUZA FILHO, A. P. S.; CORRÊA, M. J. C.; VEIGA, T. A. M.; FREITAS, V. C. M.; FERREIRA, I. C. S.; GONÇALVES, N. S.; SILVA, C. E. e GUILHON, G. M. S. P. Atividade Alelopáticas de substâncias químicas isoladas do capim-marandu e suas variações em função do pH. *Planta Daninha*, v- 26, n. 3, p. 531-538, 2008.

SANTOS, R. M. G. Metabolismo secundário de Fungos endofíticos associados à *Melia azedarach* (Meiliaceae). Tese de Doutorado. São Carlos-SP, 2001.

SAS INSTITUTE. *Statistical Analysis System*. User's Guide. Version 6.4 ed. Cary. p. 846, 1989.

SELOSSE, M. A.; Le TACON, F. The land flora: a phototroph-fungus partnership ?. *Trends in Ecology & Evolution*, v- 13 n.1, p. 15-20, 1998.

SILVA, C.B.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTORIA FILHO, R. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. *Planta Daninha*, v- 12, n.1, p.13-20, 1994.

SMITH, A.E. Increasing importance and control of mayweed chamomile in forage crop. *Agronomy Journal*, v-79, n. 4, p. 657-660, 1987.

SOUZA FILHO, A. P. S. DUTRA, S.; SILVA, M. A. M. M.; TEIXEIRA, J. F. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. *Planta Daninha*, v- 16, n. 1, p. 67-74, 1998.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFFI, S.; BELÉM PINHIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* betham. *Acta Amazonia*. v- 34, p. 185-195, 2004.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, L. S, BORGES, F. C. Analise Comparativa Dos Efeitos Alelopáticos das Substâncias Químicas Tironina e Tironina Acetilada. *Planta Daninha*, v- 24, n. 2, p. 2005-2010, 2006.

SOUZA FILHO, A. P. S. *Alelopatia e as plantas*, EMBRAPA – CPATU, Belém/PA, 159, 2006a.

SOUZA FILHO, A.P.S. Interferência potencialmente alelopática do capim-gengibre (*Paspalum maritimum*) em áreas de pastagens cultivadas. *Planta Daninha*, v. 24, n.3, p. 451-456, 2006b.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. “The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal Natural Products*, v- 58, n. 9, p. 1315-1324, 1995.

SUBHADHIRASAKUL, S.; PECHPONGS, P. Terpenoid and two steroids from *Mammea siamensis*. *Songklanakarinn Journal Science Technology*, v- 27 n. 2, p. 555-561, 2005.

TAKASUGI, M.; NIINO, N.; ANETAI, T. M.; SHIRATA, A.; TAKAHASHI, K. Eight Minor Phytoalexins from Diseased Paper Mulberry. *Chemical Letters*, p. 689-692, 1984.

TAKIZAWA, T.; IMAI, T.; ONOSE, J.; UEDA, M.; TAMURA, T.; MITSUMORI, K.; IZUMIK, K.; HIROSE, M. Enhancement of Hepatocarcinogenesis by Kojic acid in Rat Two-Stage Models after Inhibition with N-bis(2-hydroxy-propyl)nitrosamine or N-diethylnitrosamine. *Toxicological Sciences*, v- 81, p. 43-49, 2004.

TEH, J. B.; PATIL, P. S.; FUN, H. K.; RAZAK, I. A.; DHARMAPRAKASH, S. M. 1-Phenyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-prop-2-en-1-one, *Acta Crystllographica*, Section E, v- 62, p. 890-892, 2006.

TELL, L. A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*, v- 43, p. 1-73, 2005.

TEIXEIRA, L.B.; CANTO, A.C.; HOMMA, A.F.O. Controle de ervas invasoras em pastagens na Amazônia Ocidental. Manaus: IPEAAOc, 1973, p. 18, (IPEAAOc. Circular, 3).

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*, Livrarias Atheneu, 8^a ed., 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. Livrarias Atheneu, 4^a ed., 2004.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÓTH, B.; TÉREN, J. and KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary Relations hips among *Aspergillus spicies* producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, v- 41 n.1, p. 29-36, 2003.

VILLASENOR, I.M., LEMON, P., PALILEO, A., BREMNER, J. B. Antigenotoxic spinasterol from *Cucurbita maxima* flowers. *Mutat Res*, v. 360, p, 89-93, 1996.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, v- 51, p. 239-254, 1996.

WEBER, W. M.; HUNSAKER, L. A.; ABCOUWER, S. F.; DECK, L. M.; JAGT, D. L. V. Anti-oxidant activities of cutcumin and related enones. *Bioorganic & Medicinal. Chemistry*, v- 13, p. 3811-3820, 2005.

Jr. ZERINGUE, H. J.; SHICH, B. Y.; MASKOS, K.; GRIMM, D. Identification of the bright-greenish-yellow-fluorescence (BGY-F) compound on cotton lint associated with aflatoxin contamination in cottonseed. *Phytochemistry*, v-52, p. 1391-1397, 1999.

ZHANG, C. *et al.* Studies of flavonoids from leaves of *Lindera aggregata* (Sims) Koterm. *Zhongguo Yaowu Huaxue Zachi*, v- 11, n.5, p. 274-276, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)