



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

Roseane Barros Brasil

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE FUNGICIDA DO
EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE
*Azadirachta indica (A. Jusseu)***

Belém – Pará

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE FUNGICIDA DO EXTRATO METANÓLICO
DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica***

Aluna: Roseane Barros Brasil*

Orientador: Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Química. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Universidade Federal do Pará

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva

***Bolsista**



Belém – Pará

2010



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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE FUNGICIDA DO EXTRATO METANÓLICO
DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica***

Roseane Barros Brasil

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva

Orientador

PPGQ – ICEN – UFPA

Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil

Membro da Banca Examinadora

FEQ- ITEC- UFPA

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos

Membro da Banca Examinadora

PPGQ – ICEN – UFPA

Julgado em: 16/ 04 /2010

Conceito: -----

Belém – Pará

2010

Dedico este trabalho às pessoas mais importante para a realização deste:

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo pelo amor, luz e inteligência a mim concedidos.

À minha mãe **Jandira Barros Andrade**

Pelo amor e incentivo.

Aos meus irmãos **Telma Andrade, Socorro Andrade, Tânia Andrade, Sérgio Andrade e Álvaro Andrade** pelo amor e companhia.

Aos meus sobrinhos, pela confiança em mim depositada.

A todos que torceram por mim durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão, em primeiro lugar e eternamente ao meu **Deus**, o autor da Vida, Salvador e Senhor de tudo.

A minha mãe **Jandira Barros Andrade** pela dedicação a mim concedida.

A **meus irmãos** pelo total apoio.

Em especial ao professor **Dr. Milton Nascimento da Silva** pela orientação, confiança, incentivo, ensinamentos e ajuda no momento em que mais precisei.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química: **Dr. Alberto Cardoso Arruda, Dr. José Ciríaco Pinheiro, Dr. José Roberto Zamian, Dr. Lourivaldo da Silva Santos, Dra. Mara Sílvia Pinheiro Arruda**, pelos ensinamentos prestados durante as disciplinas ministradas e pelo incentivo e ajuda que estiveram dispostos a me oferecer.

Ao Programa de **Pós- Graduação em Química da Universidade Federal do Pará**, pela estrutura necessária para realização deste trabalho.

Ao **Dr. Antônio Pedro da Silva Souza Filho**, pelos valiosos ensinamentos e pela colaboração na realização deste trabalho.

A **Dr. Célia Regina Tremacoldi** pela colaboração na realização dos testes fúngicos.

Ao Professor **Dr. Davi do Socorro Barros Brasil** pelo apoio na Banca Examinadora.

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação, **Haydée, Samir e Léia** pela atenção prestada durante esse percurso.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial **Marçal de Souza Luna** pela paciência a mim concedida e pela preparação dos espectros.

A todos os amigos do Laboratório de Química e Pesquisa **Mariana Sarkis Muller, Sávyo Castro Rafael, Reinaldo, Karyme do Socorro de Souza Vilhena, Débora Banna, Cintia Helena** pelo imenso apoio e pela amizade.

Aos amigos da Central de Extração: **Alexandre, Almir, Elinaldo Sampaio, Jamerson, Kátia, Manolo Freitas e Malaquias Amaral**, pela amizade concedida.

A todos os irmãos do Laboratório de Cromatografia Líquida- LABCROL- uma grande família e que sempre estiveram próximos, em especial: **Allan Jones Ayres, Ana Carolina Albuquerque, Ana Carolina Maués dos santos, Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva, Danila Valeriano, Daniele Rodrigues Monteiro da Costa,**

Débora Pinheiro Arruda, Emanuelle Vieira Araújo, Ewerton Afonso Silva da Silva, Geilson Alcântara da Silva, Kelly Christina Ferreira Castro, Leandro Santos de Carvalho, Lívia Trindade Lôbo, Manolo Cleiton Costa de Freitas, Michelle Carolina Albuquerque, Nathália Siso Ferreira, Paulo Roberto da Costa Sá, Raimundo Negrão Neto, Sandra Cristina Monteiro, Sônia das Graças S. R. Pamplona, Thalita Negrão, pela companhia.

Aos meus irmãos da Igreja Adventista do Sétimo Dia Central de Belém, em especial: **Alessandra de Deus Tavares da Silva Pereira, Emerson de Deus Tavares da Silva, Henrique de Jesus Tavares da Silva, Marlene de Deus Tavares da Silva, Wander Murilo Alves Pereira, Dr. José Campos e Dra. Roseneide Campos** pelo companheirismo, amizade, e oração Intercessória ao meu favor, para meu sucesso profissional.

Ao meu amigo **Jefferson Lima Guimarães** pela amizade, ajuda a mim prestada, pela admiração e torcida pelo meu sucesso.

Às demais pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, em especial aos meus familiares.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu;

Há tempo de nascer, e tempo de morrer, tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar e tempo de curar, tempo de derribar e tempo de edificar;

Tempo de chorar e tempo de rir, tempo de prantear e tempo de saltar;

Tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras;

Tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar e tempo de perder, tempo de guardar e tempo de deitar fora;

Tempo de rasgar e tempo de coser, tempo de estar calado e tempo de falar;

Tempo de amar e tempo de aborrecer;

Tempo de guerra e tempo de paz.

Eclesiastes 3: 1-8

“O que sabemos é uma gota;

o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

RESUMO

Azadirachta indica pertencente a família Meliaceae é conhecida popularmente como “Neem”, esta árvore tem grande importância tanto na medicina quanto na agricultura devido a sua grande atividade biológica. O gênero *Azadirachta* tem sido estudado vastamente, em virtude do potencial da espécie *Azadirachta indica*. O extrato metanólico das folhas de *Azadirachta indica*, foi submetido a testes fitopatogênicos os quais demonstraram bons resultados, em seguida o extrato foi fracionado com hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol gerando várias frações, sendo a fração MeOH 100% utilizada para o isolamento dos constituintes químicos. As substâncias foram encaminhadas para avaliação utilizando-se técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e identificadas como pertencentes à classe dos limonóides com base na análise espectral de RMN ^1H , ^{13}C e técnicas de RMN unidimensionais e bidimensionais.

Palavras- Chave: *Azadirachta indica*, Meliaceae, Fungicida, CLAE.

ABSTRACT

Azadirachta indica belongs to the family Meliaceae is known as Neem. This tree has a great importance both in medicine and in agriculture due to its biological activities. The genus *Azadirachta* has been widely studied because of the potential of the species *Azadirachta indica*. The methanol extract of leaves of *Azadirachta indica*, has been tested *pathogens* which showed good results, then the extract was subjected to fractionation which hexane, ethyl acetate and methanol generation various fractions, the fraction MeOH 100% used for isolation the chemical constituents. Two compounds were isolated and purified using techniques High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and identified as belonging to the class of limonoids on the basis of spectral analysis of ^1H NMR, and ^{13}C NMR and two-dimensional.

Keywords: *Azadirachta indica*, Meliaceae, Fungicide, HPLC

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ABREVIATURAS, SIGLA E SÍMBOLOS

1- INTRODUÇÃO	17
2- OBJETIVOS	19
2.1- OBJETIVO GERAL	19
2.2- OBJETIVO ESPECÍFICO	19
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 FUNGOS EM PLANTAS	20
3.1.1- <i>Fusarium sp.</i>	21
3.1.2- Histórico da Taxonomia do Gênero <i>Fusarium</i>	21
3.2 <i>Fusarium solani f. Sp. Piperis</i>	21
3.3- PIMENTA-DO-REINO	22
3.3.1- IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	23
3.3.2- A IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA NO BRASIL	26
3.3.3- MERCADO E COMERCIALIZAÇÃO	28
3.3.4- COMERCIALIZAÇÃO DA PIMENTA-DO-REINO	31
3.3.5- DOENÇA E MÉTODO DE CULTIVO	32
3.5- FITOPATOLOGIA	34
3.6- FAMÍLIA MELIACEAE	34
3.7 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	35
3.8- <i>Azadirachta indica</i> A. Jussieu (Neem)	37
3.8.1- O NEEM NO MUNDO	38
3.8.2- O NEEM NO BRASIL	39
3.8.3- A ÁRVORE	40
3.8.4- PROPRIEDADES AGRÍCOLAS E MEDICINAIS	41
3.8.5- PRODUTOS INDUSTRIAIS DO NEEM	43
3.8.6- CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA	44
3.9-ROTA BIOGENÉTICA DOS LIMONÓIDES	44
3.9.1- GÊNERO <i>AZADIRACHTA</i>	45
3.9.1.1-Substâncias isoladas do gênero <i>Azadirachta</i>	45

3.9.1.1.1	Cicloartanos e Esteróides	46
3.9.1.1.2-	Protolimonóides, Apo-apolimonóides e Limonóides	46
3.9.1.1.3-	Grupo Protolimonóides	46
3.9.1.1.4-	Grupo Apo-protolimonóides	47
3.9.1.1.5-	Grupo Azadirono e seus Análogos naturais	51
3.9.1.1.6-	Grupo Homoazadirono	52
3.9.1.1.7-	Grupo Geduína	52
3.9.1.1.8-	Grupo Vilasinina	53
3.9.1.1.9-	Grupo Nimbina	54
3.9.1.1.10-	Grupo Nimbolídeo	54
3.9.1.1.11-	Grupo Salanina	54
3.9.1.1.12-	Grupo Nimbineno	55
3.9.1.1.13-	Grupo Nimbolinina	55
3.9.1.1.14-	Grupo Azadirachtina	55
3.9.1.1.15-	Grupo Azadirachtol	56
3.9.1.1.16-	Grupo Meliacarpina	57
3.9.1.1.17-	Grupo Meliacarpinina e Azadirachtina	57
4-	PARTE EXPERIMENTAL	58
4.1-	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	58
4.2-	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	58
4.3-	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DAS FOLHAS DE	60
	AZADIRACHTA INDICA	
4.4-	METODOLOGIA DE SEPARAÇÃO POR HPLC	61
4.4.1-	Pré-Tratamento Usado Para A Fração EME	61
4.4.2-	Isolamento das Substâncias	62
4.5-	MATERIAIS E TÉCNICAS UTILIZADAS	66
4.6-	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS UTILIZADOS	66
4.7-	MÉTODOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS	67
	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	
4.7.1-	Técnicas utilizadas	67
4.7.2-	Cromatografia	67
5-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1-	ESTRUTURAS DOS LIMONÓIDES ISOLADOS DE <i>AZADIRACHTA</i>	68

INDICA

5.2 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS L_1 E L_2	69
5.2.1- Determinação Estrutural de L_1	70
5.2.2- Determinação Estrutural de L_2	76
6-CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Pimenta-do-reino afetada por fusariose	33
FIGURA 2- Mapa da Índia, País do Neem	38
FIGURA 3- Regiões onde as mudas do Neem foram introduzidas no Brasil	39
FIGURA 4- Árvore do Neem	40
FIGURA 5- Partes da Árvore do Neem: Caule, Folhas e Sementes	42
FIGURA 6- Produtos industriais feitos de várias partes da árvore do Neem	43
FIGURA 7- Cromatograma A: Perfil Cromatográfico dos constituintes marjoritários da fração FrB	63
FIGURA 8- Espectro de RMN ^1H de L_1 (CDCl_3 , 300 MHz)	70
FIGURA 9- Expansão do Espectro de RMN ^1H de L_1 (CDCl_3 , 300 MHz)	71
FIGURA 10- Espectro de RMN ^{13}C de L_1 (CDCl_3 , 75 MHz)	73
FIGURA 11- Expansão do Espectro de RMN ^{13}C de L_1 (CDCl_3 , 75 MHz)	74
FIGURA 12- Espectro de DEPT ^{13}C de L_1 (CDCl_3 , 75 MHz)	78
FIGURA 13- Correlações a duas e três ligações entre os hidrogênios de L_2	78
FIGURA 14- Espectro de RMN ^1H de L_2 (CDCl_3 , 300 MHz)	79
FIGURA 15- Espectro COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de L_2 (CDCl_3 , 300 MHz)	80
FIGURA 16- Espectro de RMN ^{13}C de L_2 (CDCl_3 , 75 MHz)	81
FIGURA 17- Expansão do Espectro de RMN ^{13}C de L_2 (CDCl_3 , 75 MHz)	82
FIGURA 18- Espectro DEPT de L_2 (CDCl_3 , 300 MHz)	83
FLUXOGRAMA I – Obtenção dos Extratos Brutos e das frações da folhas de <i>Azadirachta indica</i>	59
FLUXOGRAMA II – Fracionamento do extrato Bruto Metanólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i>	60
FLUXOGRAMA III- Fracionamento da fração EME para isolamento das substâncias das folhas de <i>Azadirachta indica</i>	64
FLUXOGRAMA IV- Isolamento das substâncias	65
GRÁFICO 1- Contribuição da pimenta-do-reino no Brasil- Ano 2002	26
GRÁFICO 2- Produção mundial de pimenta-do-reino em 1996	27
TABELA 1 - Expansão da área cultivada com a pimenta-do-reino no Brasil	26
TABELA 2 - Produção mundial em toneladas de pimenta-do-reino em 1996	28
TABELA 3- Maiores produtores de pimenta-do-reino, 1990 a 2002, em 1,0 t	31

TABELA 4- Maiores produtores de pimenta-do-reino, 1990 a 2002, em 1,0 t	31
TABELA 5- Dados espectrais de RMN ^{13}C para L_1 (CDCl_3 , 75 MHz)	76
TABELA 6- Dados espectrais de RMN ^1H L_2 (CDCl_3 , 300 MHz)	84
TABELA 7- Dados espectrais de RMN ^{13}C para L_2 (CDCl_3 , 75 MHz)	85

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt – Acetato de Etila

CCVU – cromatografia em coluna por via úmida

d – duplete

dd – duplo duplete

DEPT – Distorsionless Enhancements by Polarization Transfer

HPLC - High Performance Liquid chromatography

J – constante de acoplamento

kg – quilograma

m - massa

MeOH – metanol

min – minuto

mL – mililitro

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo pirofosfato

nm – nanômetro

pág. – página

RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – singleto

t – tripleto

T_G – tempo total do gradiente

T_{RA} – tempo de retenção da primeira banda

T_{RZ} – tempo de retenção da última banda

v – volume

δ - deslocamento químico

μL – microlitro

1- INTRODUÇÃO

Atualmente, em todos os lugares do mundo onde se pratica uma agricultura econômica, a intervenção para o controle de doenças de plantas é largamente realizada através de pesticidas (KIMATI et al,1997). Sem dúvida o uso racional desses produtos pode ter, em curto prazo, um efeito positivo para o produtor. No entanto em longo prazo, além do surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os impactos para a sociedade como um todo e para o meio ambiente podem se tornar negativos devido a poluição causada pelos resíduos. Nesse contexto, termos como “agricultura alternativa” ou “agricultura sustentável” obtêm expressão política e estimulam novas medidas de proteção das plantas contra as doenças (SCHWAN-ESTRADA et al, 2000).

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle de doenças de plantas, o qual inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas (BETTIOL, 1991).

A indústria de defensivos já tem desenvolvido moléculas, não pesticidas, capazes de protegerem uma cultura contra os patógenos causadores de doenças apenas pela indução dos mecanismos de defesa da planta (ZADOCKS, 1997).

A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais pode se constituir, ao lado da indução de resistência, em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças em plantas cultivadas (SCHWAN-ESTRADA et al, 2000).

Compostos secundários de plantas estão distribuídos em um grande número de famílias botânicas (SCHWAN-ESTRADA et al, 2000), com muitos deles apresentando atividade fungicida como os limonóides com origem Biosintética a partir do óxido de esqualeno.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtido a partir de plantas da flora, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos (SCHWAN-ESTRADA et al, 2000). É o caso da *Azadirachta indica* que vem fascinando cientistas de várias áreas por ter um grande número de compostos biologicamente ativos isolados de toda a planta, sendo assim comercialmente exploráveis (FORIM, 2006). É uma planta na qual seus compostos extraídos não se mostram mutagênicos com mínimos distúrbios ao ecossistema

(FORIM, 2006). O uso do extrato de neem tem sido testado em cultivo líquido contra fungos patógenos do solo, demonstrando inibições do crescimento de algumas espécies do gênero *Fusarium*. *Fusarium solani sp* é a espécie que causa a podridão radicular no caule da pimenta-do-reino, no qual produz metabólitos secundários com propriedades tóxicas capazes de induzir descoloração das nervuras em folhas reduzindo o período útil de exploração da cultura para apenas quatro anos.

As medidas que vêm sendo adotadas para o controle da fusariose, como práticas culturais, obtenção de variedades resistentes e aplicação de fungicidas, têm-se mostrado onerosas ou pouco eficientes.

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas da espécie vegetal *Azadirachta indica*, obtido por maceração, e identificar substâncias isoladas desse extrato com potencial atividade fungicida.

2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Isolar do extrato metanólico os principais constituintes químicos do Neem (*Azadirachta indica*) utilizando técnicas cromatográficas clássicas, bem como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

✓ Determinar as estruturas das substâncias isoladas através da análise dos seus dados espectrométricos, como o RMN Unidimensionais e Bidimensionais.

✓ Avaliar a atividade fungicida de substâncias isoladas do extrato metanólico das folhas de *Azadirachta indica*, sobre o fungo *Fusarium solani sp Piperis*.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- FUNGOS EM PLANTAS

Desde há muito tempo é conhecida a importância das plantas condimentares na necessidade humana. As ervas condimentares têm sido empregadas com frequência no preparo de alimentos dando-lhes aroma sabor ou aspecto agradável ajudando também na conservação. Com a expansão dos cultivos dessas plantas no país e sem um manejo fitossanitário adequado, é inevitável o aparecimento ou agravamento de problemas causados por doenças fúngicas. Os prejuízos podem ocorrer tanto pela diminuição da produção em decorrência de doenças como por alteração produzida na composição da planta, podendo afetar suas propriedades terapêuticas e sabor (KRUPPA et al, 2008).

As doenças fúngicas das plantas condimentares, além de serem causadas por fungos da parte aérea, também são causadas por fungos de solo e de sementes (KRUPPA et al, 2008).

Os fungos de solo afetam principalmente a raiz, o colo, o sistema vascular e os órgãos de reserva das plantas. Podem provocar a podridão de sementes na fase de semeadura, ou interferir na germinação e no crescimento das plântulas, prejudicando a formação de canteiros e viveiros. O ataque na raiz, no colo e no sistema vascular compromete a absorção de água e de nutrientes, afetando o desenvolvimento normal da planta causando redução do crescimento, murcha e conseqüentemente o seu tombamento e morte (KRUPPA et al, 2008).

Os fungos são parasitas facultativos que sobrevivem na ausência do hospedeiro, em restos de cultura e na matéria orgânica do solo, uns são considerados habitantes do solo, outros invasores (KRUPPA et al, 2008). O patógeno penetra nas raízes através dos ferimentos de natureza mecânica ou provocados por insetos e nematóides (KRUPPA et al, 2008).

O controle das doenças fúngicas em plantas condimentares deve ser feito preferencialmente pelo emprego de variedade resistente e pelo uso de sementes, muda ou material propagativo livre de fungos. O controle de patógenos que ocorrem no solo é difícil, pois esse ambiente é muito complexo, além disso, alguns fungos sobrevivem nesse meio por longos períodos de tempo dificultando sua erradicação.

O *Fusarium solani* é um exemplo de fungo que causa doença em uma espécie condimentar, a *Piper nigrum* (Pimenta-do-Reino), a qual tem uma grande

importância econômica mundial, principalmente no Brasil, mais especificamente no Estado do Pará. Esta doença que é conhecida como Fusariose, causou a morte de milhares de pimenteiros resultando em grandes perdas de produção, redução do ciclo produtivo, atingindo a economia do Estado.

3.1.1- *Fusarium sp*

O fungo do gênero *Fusarium* tem ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes ocorrendo predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas, embora algumas espécies tenham íntima associação com os hospedeiros (BURGESS et al, 1994).

No Brasil as espécies de *Fusarium* identificadas entre 1993 e 1996 são principalmente de importância fitopatológica.

3.1.2- Histórico da Taxonomia do Gênero *Fusarium*.

O gênero *Fusarium* foi isolado por Link em 1809 e até o momento, não existe um sistema completo que possibilite a identificação das espécies de *Fusarium*.

3.2- *FUSARIUM SOLANI F. SP. PIPERIS* (TELEMORFO: *NECTRIA HAEMATOCOCCA F. SP. PIPERIS*)

Agente causador da podridão radicular e no caule bacteriano da pimenta preta (*Piper nigrum*), produz metabólitos secundários com propriedades toxigênicas capazes de induzir na veia descoloração soltando folhas murchas.

A Fusariose é efetivamente a doença mais prejudicial à pimenta do reino, na região amazônica. Ocorre nas raízes e na parte aérea da planta, sendo propagada pelo solo, pela chuva e pelo vento.

Os principais sintomas são:

- 1) Apodrecimento do sistema radicular;
- 2) Amarelise das folhas;
- 3) Secamento dos ramos.

A fusariose da pimenta do reino tem causado ao longo dos últimos 30 anos, a redução de vida útil dos pimentais na região amazônica, de doze a quinze anos para quatro a seis anos. As medidas que vêm sendo adotadas para controle da fusariose, como práticas culturais, obtenção de variedades resistentes e aplicação de fungicidas, têm-se mostrado onerosas e pouco eficientes.

Os primeiros sintomas desta doença foram observados a partir de 1960, através do amarelecimento e queda gradativa das folhas entre nós, e morte das plantas que é causada pela infecção das raízes. As condições de temperatura e umidade elevadas da região favoreceram a esporulação do patógeno nas hastes das plantas mortas, e a partir de 1970, devido a disseminação aérea dos esporos passou a ocorrer a infecção dos ramos das plantas, agravando ainda mais a doença (DUARTE e ALBUQUERQUE, 1999).

Devido à ocorrência de doenças severas, entre elas a fusariose, o aumento do preço da mão-de-obra, o custo de produção no Brasil tornou-se mais elevado, para compensar economicamente o produto final para exportação, é necessário desenvolver tecnologias visando o aumento da produtividade ou da lucratividade. Para tanto, a obtenção de cultivares mais produtivas com características de tolerância a fusariose é indispensável para que o Brasil continue a concorrer no mercado internacional.

A fusariose no Estado do Pará é um dos problemas mais sérios para a cultura tendo concorrido para a redução da área cultivada e da produtividade. O aumento da variabilidade genética da pimenta-do-reino poderá possibilitar o desenvolvimento de novos sistemas de produção (ALBUQUERQUE et al,1997).

3.2- PIMENTA-DO-REINO

A pimenta-do-reino é provavelmente originária do Sudoeste da Índia. Há descrição sobre comércio desta cultura no século IV a.C. É uma planta trepadeira pertencente à família Piperaceae sendo a mais comum e importante especiaria. Atualmente, a pimenta-do-reino é produzida principalmente em países do sudoeste Asiático, tais como, Indonésia e Sarawak, além da Índia e do Brasil (ANDO et al,1996).

No Brasil, a cultura da pimenta-do-reino foi introduzida no Estado da Bahia no século XVIII, e posteriormente nos Estados da Paraíba, Maranhão e Pará,

porém a produção desta cultura era insignificante nestas regiões (ALBUQUERQUE e CONDURÚ, 1971).

Em 1933, algumas estacas de pimenta-do-reino, cultivar Cingapura, foram introduzidas no município de Tomé-Açú, PA, para produção comercial. Devido ao alto lucro, principalmente no período pós-guerra mundial, das décadas de 40 e 50, a cultura foi rapidamente difundida nessa região através de propagação vegetativa, constituindo-se atualmente uma das culturas mais importantes do ponto de vista sócio-econômico da região amazônica, sendo o Estado do Pará o maior produtor, com uma produção de 34000 toneladas de sementes, 82% da produção total do Brasil (ANDO et al,1996).

Por volta de 1960, observou-se o primeiro sintoma de doença “podridão das raízes e do pé” nesta cultura, causada pelo fungo *Fusarium solani f. sp. piperis*. Esta doença propagou-se rapidamente na região, destruindo, em curto tempo, grande área cultivada com pimenta-do-reino (ANDO et al,1996).

Em nível mundial o Brasil já se destacou como um dos maiores países produtores, chegando a produzir 50000 toneladas em 1991. Ao longo dos anos subseqüentes, no entanto a produção brasileira foi decrescendo, registrando 13000 toneladas em 1995, sendo 10000 toneladas produzidas no estado do Pará (OKAJIMA, 1996).

Esta especiaria, produto tipicamente de exportação, apresenta grande oscilação de preço no mercado internacional, às vezes estimulando e outras desestimulando o cultivo. Mas o que vem ocasionando sérios prejuízos, na produção e ciclo econômico é a ocorrência da fusariose a nível epidêmico nas áreas de produção (OKAJIMA, 1996).

3.3.1- Importância econômica

O cultivo da pimenteira-do-reino no Brasil está estreitamente relacionado com a colonização portuguesa. Originária das florestas da Kerala, sul da Índia, é a especiaria que mais atraiu os comerciantes daquela época. Os portugueses, primeiros a descobrir uma rota mais curta para a Índia partindo da Europa, passaram a denominar o produto de pimenta-do-reino, termo como é conhecida até hoje, nos países de língua portuguesa (CAVALCANTE, 2005).

Nenhum outro produto agrícola, como a pimenta-do-reino, influenciou a história ou desempenhou um papel importante em eventos históricos. Há somente um paralelo em toda a história, o petróleo nos tempos modernos (CAVALCANTE, 2005).

A introdução da pimenta-do-reino no Brasil, pelos portugueses no século XVII, ficou restrita aos estados localizados no litoral brasileiro. A cultivar introduzida tinha folhas largas, de cor verde-escuro e produzia espigas curtas. Remanescentes dessa cultivar ainda são encontrados no Ceará, Paraíba e Espírito Santo, onde são conhecidos como pimenteira-da-terra. Possui características morfológicas semelhantes às das cultivares Balankotta ou Kaluvally (CAVALCANTE, 2005).

A pimenteira-do-reino só se estabeleceu como cultivo racional após a introdução da cultivar Cingapura (ecotipo de Kuching) por imigrantes japoneses, em 1933. Com o material de plantio, os japoneses introduziram também o sistema de cultivo intensivo praticado na Malásia e adotado pelos produtores brasileiros (CAVALCANTE, 2005).

Na década de 40, embora produzisse pimenta-do-reino, o Brasil importava parte do que consumia tornando-se auto-suficiente em 1950. O sucesso obtido pelos pipericultores de Tomé Açu estimulou o plantio da pimenteira-do-reino em outros municípios. Hoje é cultivada em mais de 100 municípios do Pará, Espírito Santo, Bahia, Maranhão, Ceará, Paraíba e mais recentemente no Estado do Amapá, que iniciou a revitalização dos pimentais em 2001 (CAVALCANTE, 2005).

Na Região Norte, a cultura tem importância econômica e social. Por se tratar de um produto de exportação a pimenta é considerada um banco verde, ou seja, um produto que o agricultor usa para aumentar a renda familiar devido ao alto preço alcançado no mercado nacional e internacional. Socialmente é uma cultura absorvedora de mão-de-obra, pois cada tonelada de pimenta-do-reino colhida corresponde a um emprego, no campo (CAVALCANTE, 2005).

A cultura da pimenta-do-reino gera divisas de mais de 50 milhões de dólares ao ano e emprega cerca de 70 a 80 mil pessoas, no período da safra, apenas no Pará (CAVALCANTE, 2005).

Até a década de 80, a pimenta-do-reino era cultivada nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, norte dos estados de Tocantins e Minas Gerais, Ceará, Paraíba, Bahia e Espírito Santo. No entanto, houve um

declínio no cultivo na maioria desses estados devido principalmente a ocorrência da podridão das raízes conhecida também como fusariose (CAVALCANTE, 2005).

Na década de 90 houve um declínio da área cultivada e, por conseguinte, da produção, mas observou-se um incremento da área cultivada de no período de 2000 a 2003 caindo novamente em 2004 (Ver Tabela 1, pág.26) (CAVALCANTE, 2005).

Em 2002 as estimativas foram de um incremento de 125% e para 2003 esse incremento seria de 11%, embora haja uma projeção de redução da área cultivada, em 2004 (CAVALCANTE, 2005).

Em 2002, o Pará contribuiu com 85% do total produzido. O restante da produção foi oriundo do Espírito Santo 8,5% e da Bahia 5,5% (Gráfico 1, pág. 26). Os estados do Maranhão, Ceará e Paraíba produziram apenas 1% que corresponde a 0,5 toneladas anuais, segundo o IBGE em 2003. A produção brasileira em 2002 foi de 52 mil toneladas, havendo previsão de produção de 50 mil toneladas em 2003 (CAVALCANTE, 2005).

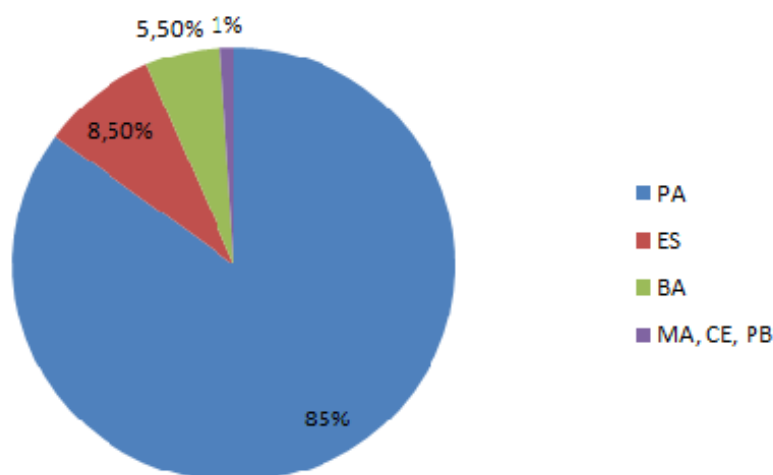
Cerca de 73% da produção brasileira de 2001 foi exportada para cerca de 51 países, nas formas de pimenta preta, pimenta branca e pimenta verde ou em salmoura. Outro tipo, a vermelha, está começando a ser comercializada. O tipo de pimenta depende do estágio de maturação e do processamento (CAVALCANTE, 2005).

Os maiores importadores da pimenta brasileira são os Estados Unidos, Holanda, Argentina, Alemanha, Espanha, México e França. Enquanto a Índia, maior produtor mundial de pimenta-do-reino consome 50% do total produzido, o Brasil consome apenas 10% na forma de grãos inteiros, grãos moídos, em misturas com outros condimentos principalmente cominhos, patês, molhos, maionese e embutidos como, salame, salsicha, mortadela e presunto. Por muitos anos o consumo doméstico não ultrapassou 5%, no entanto a recuperação da economia brasileira melhorou as condições econômicas da população o que estimulou o aumento do consumo, principalmente na forma de embutidos (CAVALCANTE, 2005).

Tabela 1: Expansão da área cultivada com a pimenteira-do-reino no Brasil.

ANO	Área cultivada (ha)	Produção (t/ha)
2000	16.377	38.685
2001	20.750	50.140
2002	45.000	45.000
2003	50.000	50.000
2004	30.000	30.000

Fonte: EMBRAPA- Amazônia Oriental.



Fonte: EMBRAPA - Amazônia Oriental.

Gráfico 1: Produção da Pimenta-do-reino no Brasil- Ano 2002

3.3.2- A importância sócio-econômica no Brasil

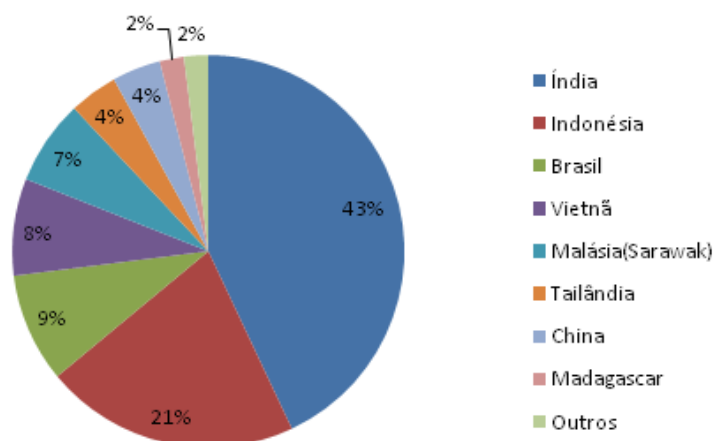
O Brasil tornou-se um dos maiores produtores e exportadores de pimenta-do-reino no mundo. Em 1995, a pimenta-do-reino gerou um volume de divisas para o país de ordem de US\$ 51.890.476,00. O Estado do Pará foi o maior produtor e exportador brasileiro em 1995, e a pimenta-do-reino foi a cultura mais importante para o Estado, gerando US\$ 49.061.718,00, que é cerca de 95% do total exportado (SANTANA et al, 1996).

A área colhida que foi de 36.800 ha em 1991 e que se reduziu para 11.200 ha em 1998, alcançou em 2000 15.900 ha, sendo a produtividade média neste ano 2.868 Kg/ha. Anualmente são exportadas mais de 50% da produção, tendo como principais países importadores os Estados Unidos, Alemanha, Países Baixos e Argentina. O Estado do Pará é o principal produtor brasileiro, com cerca de 90% da produção seguidos pelo Espírito Santo e Bahia.

Os principais países produtores de pimenta-do-reino, considerando média de cinco anos são: Índia, Indonésia, Brasil, Vietnã e Malásia (Ver Gráfico 2, pág.27). O consumo de pimenta-do-reino no Brasil é cerca de 5000 toneladas, anual, sendo a maior parte da produção exportada, cuja tonelada no mercado internacional já alcançou mais de US\$ 3.400,00 para pimenta preta e US\$ 5.000,00 para pimenta branca (Ver Tabela 2, pág. 28).

Sua importância no consumo interno se destaca principalmente na culinária, na condição de condimento de grande aceitação, dadas às suas propriedades organolépticas, no preparo de molhos, saladas, queijos, pizzas e na indústria alimentícia de carne, peixe, embutidos (lingüiça, salsicha, mortadela, salaminho, etc.) e de preservação de frutas e hortaliças em conserva (CAVALCANTE, 2005).

Isso nos mostra a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de controle. Uma das alternativas para fazer esse controle é o desenvolvimento de um método utilizando estruturas químicas isoladas do Neem (*Azadirachta indica*), que é um excelente inseticida e prova ser também um fungicida potente para esses casos. Este trabalho tem este objetivo, de comprovar a potencialidade dessa planta, na qual é caracterizada também como produto orgânico, ou seja, é cultivado sem o uso de adubos químicos ou agrotóxicos. É um produto limpo, saudável, que provém de um sistema de cultivo que observa as leis da natureza e todo o manejo agrícola está baseado no respeito ao meio ambiente e na preservação dos recursos naturais.



Fonte: EMBRAPA- Amazônia Oriental.

Gráfico 2: Produção Mundial de Pimenta-do-reino em 1996

Tabela 2: Produção Mundial em Toneladas de Pimenta-do-reino em 1996

País	1996 (t)
Índia	60.000
Indonésia	30.000
Brasil	13.000
Vietnã	12.000
Malásia (Sarawak)	10.000
Tailândia	6.000
China	5.000
Madagascar	2.500
Outras	3.000
Total	141.500

Fonte: EMBRAPA- Amazônia Oriental

3.3.3- Mercado e comercialização

O Brasil faz parte da Comunidade Internacional da pimenta-do-reino (IPC), criada em 1971, com sede em Jacarta, Indonésia, da qual fazem parte a Índia, Indonésia, Malásia, Sri Lanka e Tailândia. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de pimenta-do-reino. Em 2002, a produção brasileira foi a terceira maior entre os países produtores dessa piperácea, só perdendo para a Índia (maior produtor) e para a Indonésia. Pelos dados das tabelas 3 e 4, na página 31, observa-se que a produção do Brasil correspondeu a 15% da produção mundial, em 2002 (CAVALCANTE, 2005).

A expansão da lavoura da pimenta-do-reino demonstrou a grande capacidade de resposta dos agricultores paraenses aos sinais de mercado e preços favoráveis. Nos anos de 1980 a 1983, o Brasil liderou a produção mundial de pimenta-do-reino. Nos anos de 1980 a 1982 e em 1984 o país alcançou a posição de maior exportador mundial, graças à produção paraense. Em apenas cinquenta anos após a sua re-introdução, a produção do Brasil ultrapassou a de milenares produtores dessa especiaria, como a Índia, a Indonésia e a Malásia. Em 1991, o Brasil alcançou a máxima produção nacional de pimenta-do-reino, com mais de 83 mil toneladas e em 1981, exportou a quantidade máxima, com quase 47 mil toneladas (CAVALCANTE, 2005).

A grande pergunta é se o Estado do Pará terá mercado nos próximos anos para produzir 50 mil toneladas de pimenta-do-reino. No final de 1999 houve euforia no plantio da pimenta-do-reino no Estado do Pará e até em Estados como Ceará, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão, Minas Gerais, entre outros,

contagiados pelos preços que alcançaram até R\$ 11,00 o Kg, preço esse que chegou a atrair a formação de quadrilhas especializadas no roubo do produto, e que chegaram a ser motivo de manchete nacional. A cultura da pimenta sofreu essa consequência durante as décadas de 1980 e 1990. Por ser um produto inelástico, como o sal de cozinha, não se consegue aumentar seu consumo reduzindo seus preços, ao contrário obtém-se maiores lucros mantendo-se seus preços elevados e produzindo em quantidade reduzida (CAVALCANTE, 2005).

Outra consequência dessa febre de plantio foi a inflação nos preços de insumos para a implantação dos pimentais. Em face da dificuldade de obter-se adubo orgânico, da escassez de estações, do interesse no setor de vendas de mudas e as próprias restrições ambientais, a tendência é a limitação da expansão dos pimentais, em termos de novas áreas e da obtenção de estações (CAVALCANTE, 2005).

No ângulo internacional, a participação do Brasil desde 1980 no IPC não tem sido devidamente aproveitada. A Tailândia e o Vietnã conseguiram ocupar o vácuo da produção brasileira durante o período da crise que se estendeu do final da década de 1980 até quase toda a década de 1990. Somente o Vietnã apresenta capacidade de exportar 30 a 35 mil toneladas de pimenta e com baixo custo de mão-de-obra.

A restrição com relação ao futuro da economia de pimenta-do-reino nos países produtores da Ásia está relacionada com países que superam a casa de bilhão de habitantes, como a China e a Índia, e àqueles com alta densidade demográfica, como a Índia, Vietnã, China, Tailândia, Indonésia, Malásia, nessa ordem, que deverá implicar na realocação de recursos produtivos em favor de alimentos básicos e do caminho da industrialização.

Apesar das dificuldades, há necessidade de se definir políticas de controle de produção entre os países membros, troca de material genético de interesse similar e tecnologia de novos produtos (CAVALCANTE, 2005).

No cenário mundial, a Índia tem perdido a posição de maior exportadora, essa queda decorre do efeito combinado do crescimento populacional, baixos preços e mudanças nos padrões de consumo, fazendo com que o consumo interno aumente de 40.000 t para 45.000 t por ano (CAVALCANTE, 2005).

Já o Vietnã tem tendência crescente durante a década de 90, quando o país se tornou o maior exportador de pimenta preta tipo ASTA, e sua produção interna chegou a 2.000 t por ano (CAVALCANTE, 2005).

Na Indonésia a principal região produtora é a Sumatra, que tem apresentado oscilações nas exportações, levando esse país a importar pimenta do Vietnã em 2001 na ordem de 4.000 a 5.000 toneladas para cobrir contratos (CAVALCANTE, 2005).

A Malásia tem sido favorecida pelas boas condições climáticas e da expansão de plantios realizados em 1998. Atualmente devido a baixos preços o plantio tem sido suspenso (CAVALCANTE, 2005).

A produção de pimenta-do-reino na china tem crescido nos últimos anos alcançando 20.000 toneladas, destinada basicamente para o consumo interno. (CAVALCANTE, 2005).

A quase totalidade da pimenta-do-reino produzida no país destina-se ao mercado externo (CAVALCANTE, 2005).

Em geral a pimenta-do-reino possui alto valor comercial podendo ser comercializada na forma de pimenta preta, pimenta branca e pimenta verde em conserva. Dos grãos são extraídos subprodutos que alcançam até três vezes mais que o preço da pimenta, destacando-se dentre estes o óleo. (CAVALCANTE, 2005).

A produção de pimenta-do-reino no Brasil concentra-se nos meses de setembro a novembro, coincidindo em parte com a safra da Indonésia que se estende de agosto a outubro. A safra indiana tem início em janeiro e se estende até março, vindo logo após a safra brasileira. No Vietnã a safra coincide com a indiana uma vez que se estende de fevereiro a abril. Na Malásia, que tem como principal região produtora Sarawak, a safra é logo após a do Vietnã, estendendo-se no período de maio a julho. Dessa forma a comercialização da safra brasileira tem sempre a concorrência da safra da Indonésia e das safras futuras da Índia, do Vietnã e da Malásia (CAVALCANTE, 2005).

Tabela 3: Maiores produtores de pimenta-do-reino, 1990 a 2002, em 1,0 t.

Países	Índia	Indonésia	Brasil	Vietnã	Malásia
1990	55190	69899	78155	8623	31191
1991	47950	62549	83906	8877	29069
1992	52010	65014	33034	7830	26515
1993	50760	65782	42270	7500	18003
1994	51300	54043	34927	8900	16370
1995	60700	58955	33852	9300	15768
1996	61580	52168	32318	10500	16276
1997	56000	46600	22359	13000	18171
1998	57000	49660	23050	15900	19087
1999	66000	52188	27761	31000	21000
2000	66000	55000	38443	37000	21000
2001	66000	57000	49018	37000	21000
2002	58000	57000	45000	37000	22000

FONTE: Fonte: FAO (1990/2002), www.fao.org (19/02/2003)

Tabela 4: Maiores produtores de pimenta-do-reino, 1990 a 2002, em 1,0 t.

Países	China	Sri Lanka	Tailândia	México	Gana	Outros
1990	11083	8732	10345	868	-	766
1991	9090	9938	10443	894	-	892
1992	13120	10888	10500	2, 395	-	11048
1993	12120	14100	9000	734	-	12187
1994	13135	14712	10232	940	-	13231
1995	12135	16000	10949	3599	-	1197
1996	14150	16890	7730	4120	1500	1322
1997	15150	17270	7074	1761	1500	11824
1998	17810	17160	6500	2700	2000	11275
1999	18160	17270	7000	2500	2000	11681
2000	17660	17000	7000	2500	2000	11041
2001	17660	17000	7000	2600	2000	11021
2002	18655	16830	9000	2500	2500	10822

FONTE: FAO (1990/2002), www.fao.org (19/02/2003)

3.3.4- Comercialização da pimenta-do-reino

Existe uma oferta de exportação anual estimada em 220.000 toneladas e a demanda em torno de 175.000 toneladas, indicando um excedente de 45.000 toneladas anual ou cerca de 25% da demanda mundial. Apesar do lucro dos produtores estarem reduzindo, em consequência dos baixos preços, comparados com outras “commodities” a produção de pimenta-do-reino é ainda um negócio atrativo. Considerando os investimentos que já foram realizados e o custo da mão-de-obra relativamente baixo nos países asiáticos, a oferta não cairá tão

drasticamente. Outros países, como o Camboja, seguindo o exemplo do Vietnã, estão enviando esforços no aumento da produção da pimenta-do-reino que, apesar de ser pequena no momento, vem pressionar a oferta mundial (CAVALCANTE, 2005).

3.3.5- Doença e métodos de cultivo

Durante 20 anos, de 1935 a 1955, a cultura da pimenta-do-reino partindo do município de Tomé Açu, espalhou-se por vários municípios do Pará, sem ser afetada por doenças ou pragas agrícolas. O produto alcançava um bom preço nos mercados nacional e internacional e o pipericultor prosperava com os lucros obtidos com a venda da pimenta. A partir de 1957 começaram a surgir os primeiros casos de podridão das raízes conhecida também como fusariose. Essa doença causou a morte de milhares de pimenteiras, resultando em grandes perdas de produção, redução do ciclo produtivo da cultura de 20 anos para 6 a 8 anos e na emigração de mais de 50% dos produtores de Tomé Açu para outros estados da Região Norte, para o Espírito Santo e Bahia. Os problemas sociais causados pela doença incluíram falências, venda de propriedades a baixo custo, mudança de “status” social, pois muitos produtores passaram de patrões a empregados, outros mudaram de profissão. A incidência da doença acrescentou, ainda, um caráter nômade à cultura, pois quando o pimental era dizimado, o pipericultor adquiria outra área longe da área destruída pela doença abandonando toda a infra-estrutura da antiga propriedade. Ecologicamente, tem sido um dos responsáveis pelo aumento dos desmatamentos, devido à necessidade do abate de novas árvores para servirem de tutores para as novas plantas, pois os pimentais são renovados a cada oito anos (CAVALCANTE, 2005).

A infecção pode iniciar pelas raízes e ramos. Se as raízes de uma planta são infectadas, as folhas amarelecem e murcham, ocorre queda de folhas e de internódios e a folhagem fica esparsa. Com o progresso da doença a planta fica totalmente desprovida de folhas e morre (Ver Figura 1, pág.33). Examinando-se o sistema radicular observa-se ausência de radículas e apodrecimento das raízes mais grossas.

Essa podridão pode avançar até 30 cm acima do nível do solo. O apodrecimento pode atingir parte ou todo sistema radicular. Se todo sistema

radicular é atingido, a planta morre subitamente ficando com as folhas presas aos ramos. Cortando-se os tecidos das raízes e da base do caule, observa-se o escurecimento dos vasos condutores devido a obstrução causada pela ação do fungo. O patógeno pode causar o apodrecimento de estacas, no viveiro, quando as estacas são oriundas de plantas doentes (CAVALCANTE, 2005).

Quando a doença inicia pela parte aérea, em plantas bem vigorosas, observa-se entre a folhagem verde escura, um ramo plagiotrópico amarelado. Examinando-se o ramo até o ponto de inserção no ramo ortotópico observação uma lesão escura na região do nó. Com o progresso da doença, essa lesão se estende para cima e para baixo do ramo principal causando o Secamento de vários ramos. Na fase final da doença, surge uma exsudação negro-brilhante na base da planta. A doença se espalha rapidamente fazendo com que as plantas morram num período de dois anos.

A doença é causada pelo fungo *Nectria haematococca f. sp. piperis* (estádio assexual: *Fusarium solani f. sp. piperis*). A infecção radicular ocorre durante o período chuvoso, de janeiro a maio, mas as plantas exibem os sintomas característicos da doença durante a estação seca. As condições que favorecem a doença são excesso de umidade no solo, excessos de adubos nitrogenados, estresse hídrico (CAVALCANTE, 2005).



FONTE: Soelange Bezerra Nascimento

Figura 1: Pimenteira-do-reino afetada por Fusariose.

3.5- FITOPATOLOGIA

É uma palavra de origem grega (Phyton: Plantas; Pathos: Doença e Logos: estudo), e indica a ciência que estuda as doenças das plantas, abrangendo todos os seus aspectos, desde a diagnose, sintomatologia, etiologia, epidemiologia, até seu controle (FERNANDES, 2005).

O desenvolvimento da Fitopatologia como ciência data de período relativamente curto, ela desenvolveu-se ao longo dos anos. Atualmente, o crescente e contínuo aumento na população mundial faz crescer a preocupação com a quantidade e qualidade dos alimentos produzidos. Uma projeção futurista faz-nos levar imaginar que não teremos alimentos suficientes para alimentar a população terrestre nos próximos anos. Desta forma torna-se necessário buscarmos instrumentos que permitam um aumento na produção de alimentos. Entretanto, o desenvolvimento da agricultura está diretamente relacionado com algumas questões básicas como a influência de solos, clima, pragas e doenças, além do desenvolvimento de avanços tecnológicos (FERNANDES, 2005).

A fitopatologia apresenta-se como ferramenta crucial para subsidiar o desenvolvimento da produção agrícola, buscando solucionar os problemas relacionados com o aparecimento de doenças que reduzem quantidade e a qualidade dos alimentos produzidos (FERNANDES, 2005).

3.6- FAMÍLIA MELIACEAE

A família Meliaceae possui 51 gêneros e cerca de 1400 espécies, quase todas lenhosas, nativas de regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios (FORIM, 2006). Apresenta-se como uma das mais importantes famílias com espécies de grande interesse econômico e de alto potencial madeireiro no mundo, e por este motivo são exploradas intensivamente em florestas tropicais mundiais. A madeira de muitas espécies desta família está entre as mais procuradas como madeiras comerciais do mundo (GOUVÊA, 2005), principalmente para a indústria moveleira, além da possível utilização na arborização urbana, e de possuírem compostos ativos como metabólitos secundários conhecidos como limonóides e meliacinas (GOUVÊA, 2005). Essas substâncias são utilizadas como repelentes de insetos, como ação inseticida, fungicida, bactericida e antiviral em plantas e ainda

observa-se a ocorrência de numerosas substâncias com efeitos medicinais em humanos e animais(GOUVÊA, 2005).

A excessiva exploração de espécies de Meliaceae tem causado uma redução considerável na população dessas espécies. No Brasil, esta desordenada exploração ocorre principalmente na região amazônica (GOUVÊA, 2005).

Os gêneros do velho mundo *Melia* e *Azadirachta*, os quais constituem a tribo Melieae, são gêneros de maior destaque em ações contra insetos, partilham um número de características anatômica interessantes, que nunca foram encontradas em outras Meliáceas. Estes dois gêneros estão como os mais estudados na fotoquímica, pois para esses gêneros tem sido observada a ocorrência da subclasse de limonóides C-seco. O limonóide C-seco de maior interesse nos últimos anos tem sido a azadiractina, que é encontrada em *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* (FORIM,2006).

Pennington & Styles (1975) realizaram ampla revisão bibliográfica sobre a família Meliaceae e seus respectivos gêneros, sendo apontado por Muellner et al. (2003), como um dos estudos mais importantes e completos da família. Pennington & Styles (1975) reconheceram a existência de quatro subfamílias: Melioideae, com sete tribos contendo 35 gêneros, entre as quais *Melia*, *Trichilia* e *Guarea*, e Swietenioideae, com treze gêneros, incluindo *Cedrela*, *Swietenia* e *Toona* organizada em três tribos. As subfamílias Quivisianthoideae e Capuronianthoideae possuem apenas um gênero cada, *Quivisianthe* e *Capuronianthus*, respectivamente (GOUVÊA, 2005).

A característica Química marcante da família Meliaceae é a presença de substâncias amargas conhecidas como meliacinas ou limonóides que apresentam um esqueleto básico de 26 átomos de carbono em que também são encontrados, nas famílias Rutáceas e Cneuraceae (da SILVA, 2006).

3.7- METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Segundo Balandrin et al., (1985), muitas plantas acumulam substâncias orgânicas que podem ser extraídas em quantidades suficientes para serem economicamente utilizadas para as mais variedades aplicações científicas, tecnológicas e comerciais. As substâncias químicas extraídas das plantas são normalmente classificadas em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos

secundários são compostos derivados biossinteticamente dos metabólitos primários, mas têm distribuição limitada a determinados grupos taxonômicos do Reino Vegetal. Eles não têm função aparente no metabolismo primário das plantas, mas freqüentemente tem papel ecológico, como, atrativos polinizadores, representam adaptações químicas à pressão ambiental ou servem como defensores químicos contra microorganismos, insetos e predadores superiores e até mesmo contra outras plantas. Os metabólitos secundários são freqüentemente armazenados pelas plantas. Eles são usados comercialmente como compostos ativos biologicamente, farmacêuticos conferindo sabor ou aroma, pesticidas, inseticidas (LÔBO, 2009).

Os produtos naturais secundários freqüentemente têm estruturas altamente complexas, que determinam a atividade biológica e muitas vezes não podem ser economicamente sintetizadas. Um bom exemplo desta situação é a Azadirachtina, extraída da planta conhecida por neem, que é uma Meliaceae, e possui uma estrutura bastante complexa e é utilizada como inseticida vantagem econômica, é que tanto os metabólitos primários quanto os secundários podem ser obtidos por processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (LÔBO, 2009).

As substâncias secundárias têm sido amplamente discutidas quanto às seguintes funções ecológicas, alelopáticas, de atração de polinizadores, de defesa contra herbívoros, patógenos, e algumas como reguladoras do desenvolvimento de plantas superiores (LÔBO, 2009).

A procura de substâncias de plantas com atividade biológica, sempre foi um desafio para a ciência e uma questão necessária à sobrevivência do homem. As plantas produzem metabólitos secundários que desempenham importante função na manutenção da espécie. Os metabólitos secundários são úteis na defesa da planta contra predadores e patógenos, alguns desses compostos possuem valor agrônomo, industrial e medicinal, de modo que as plantas podem ser consideradas como uma fonte rica para obtenção e descoberta de fármacos, produtos agroquímicos e outros compostos, que possam ter valor agregado, seja pela natureza da atividade intrínseca, seja mediante transformações químicas que acrescentem valor no mercado e potencializem a sua ação (FORIM, 2006).

Os produtos metabólicos secundários de plantas desempenham um importante papel no processo de descoberta de novos fungicidas, principalmente aqueles considerados ecologicamente corretos. Fungicidas não tóxicos aos animais

nem ao homem e não persistentes, ou seja, que se degrada com maior velocidade que os sintéticos existentes não deixando resíduos nos alimentos ou no meio ambiente. Dentro de um amplo universo de classes de compostos com características ou potencial fungicida, destacam-se os limonóides.

Os limonóides são tetranortriterpenos modificados, também conhecidos como meliacinas. São compostos encontrados em plantas da ordem Rutales. Em particular, caracterizam os membros da família Meliaceae, onde são diversos e abundantes (FORIM, 2006).

Azadirachta indica está entre as meliáceas mais estudadas com aproximadamente 200 derivados do Tirucalol ou Eufol isolados e identificados

3.8- *Azadirachta indica* A. Jussieu (Neem)

O neem é uma árvore milenar, nativa da Índia (Figura 2, pág. 38), que vem sendo utilizada há séculos para o tratamento de doenças humanas e controle de pragas. A planta neem vem fascinando cientistas de várias áreas, à medida que seus biocompostos encontram uso na agricultura e medicina. Um grande número de compostos biologicamente ativos tem sido isolados de toda a planta, sendo assim comercialmente exploráveis. A pesquisa que envolve a planta vem crescendo significativamente, uma vez que seus princípios ativos podem desempenhar um papel importante no manejo integrado de sistemas e na medicina alternativa. Compostos extraídos do neem se mostram seletivos, não-mutagênicos, rapidamente degradáveis, com baixa toxicidade para organismos não-alvo e benéficos, com mínimos distúrbios ao ecossistema. A árvore possui mais de 135 compostos isolados e divididos em duas classes principais, os isoprenóides e outros. Os isoprenóides incluem diterpenóides e triterpenóides, como nimbin, salanin e azadiractina. Azadiractina principal limonóide isolado do neem, tem demonstrado várias atividades biológicas, altamente eficientes no controle de pragas. O uso de extrato de neem tem sido testado em cultivo líquido contra fungos patógenos do solo, demonstrando inibição do crescimento de algumas espécies dos gêneros *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* e *Sclerotinia*. Várias partes da planta vêm sendo estudada, desde a folha até o óleo extraído da semente em relação a essas doenças fitopatogênicas reduzindo o crescimento e a esporulação de fungos. Assim existe uma necessidade contínua para o desenvolvimento de estratégias para o controle de

fungos patógenos de plantas por meio de uso de extrato naturais que preservem o meio ambiente, fornecendo um controle mais eficiente e melhorando a qualidade e rendimento de cultivos. O neem pertence a família Meliaceae, na qual apresenta diversas espécies de árvores conhecidas pela madeira de grande utilidade (FORIM, 2006).

3.8.1- O Neem no mundo



Figura 2: Mapa da Índia, país do Neem.

Fonte: <http://www.sitesatlas.com/Maps/Maps/ind-pol.htm>

Originária do sudoeste da Ásia e é cultivado em diversos países da Ásia, em todos os países da África, na Austrália, América do Sul e Central. Ela foi revelada para o mundo ocidental pelos trabalhos do Professor Dr. Heinrich Shmutterer, da Alemanha, que constatou que durante as migrações destruidoras dos gafanhotos nas regiões africanas, apenas restavam intocadas as árvores do Neem.

Seguiram-se estudos sobre a composição química da planta, descrição de moléculas e a identificação do principal composto, a Azadiractina (FORIM, 2006).

3.8.2- O Neem no Brasil



Figura 3: Regiões onde as mudas do neem foram introduzidas no Brasil.
Fonte: <http://www.riogrande.com.br/Clipart/mapasbr/BRASIL3.BMP>

No Brasil, as primeiras plantas introduzidas para estudo como planta inseticida foram feitas pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) (Figura 3, pág. 39), em Londrina em 1986 (FORIM, 2006), sendo hoje cultivada, de norte ao sul do país. Adapta-se bem a solos de baixa fertilidade como os solos de cerrado que apresentam pH ácidos, altos teores de alumínio, baixos teores de fósforo, cálcio, magnésio, potássio e zinco, baixos teores de matéria orgânica, baixa capacidade de troca catiônica, baixas soma e, saturação de bases (FORIM, 2006).

3.8.3- A Árvore



Figura 4: Árvore do Neem

Fonte: http://evolutionagro.blogspot.com/2009_10_01_archive.html

A árvore (Figura 4, pág. 40) alcança normalmente de 10 a 15 metros de altura e 2,5 metros de circunferência, seus galhos formam coroas de até 10 metros de diâmetro e seu tronco apresenta-se, geralmente, reto e curto, dotado de uma casca grossa e enrugado. Suas folhas, sempre abundantes, exceto em períodos de seca prolongada, são verde-escuras, compostas e imparipenadas, com freqüente aglomeração na extremidade dos ramos simples. As flores hermafroditas possuem coloração branca e são aromáticas, estando reunidas em inflorescências densas. São bastante procuradas pelas abelhas, que desempenham importante papel na sua polinização, se não prejudicadas nessa atividade. O fruto é uma baga ovalada, com 1,5 a 2,0 cm de comprimento e, quando maduro, apresenta polpa amarelada e casca branca, contendo óleo marrom no interior de uma semente ou, raramente, em duas. Originário de clima tropical, o neem se desenvolve bem em temperatura acima de 20⁰ C, com precipitação pluviométrica anual entre 400 e 800 mm e em altitudes superiores a 700 metros. É capaz de resistir a longos períodos secos e floresce, até mesmo, em solos pobres em nutrientes, porém, não suporta locais encharcados e salinos. O pH ideal do solo é de 6,2 a 7,0. Seu florescimento se dá de fevereiro a

maio e seus frutos amadurecem de junho a agosto e a produção dos frutos ocorre após o segundo ano de campo, chegando, cada planta, a produzir mais de 25 Kg depois do quinto ano de plantio (FORIM, 2006).

3.8.4- Propriedades Agrícolas e Medicinais

O neem tornou-se famoso por suas propriedades medicinais e agrícolas. Por séculos tem sido desta forma explorado pelos povos indianos. Existem registros autênticos do seu uso medicinal em Arthashastra (Tratado de Polity) por Kautilya no quarto século antes de Cristo. Várias partes de árvore foram empregadas por Ayurveda um famoso médico Hindu (1000 d.C). Vários usos da árvore do Neem no passado forma medicinal. As cascas, as folhas e as sementes (Figura 5, pág.42) têm sido amplamente usadas nesse propósito. É muito comum o preparo de extratos com estas partes da planta para uso medicinal, como por exemplo, a casca é considerada um tônico amargo, adstringente, antiséptico, antiperiódico, e febrífugo. Ela é útil em casos de sede, náuseas, vômitos, úlceras e doenças na pele. Já as folhas são usadas como antiséptico, anti-helmíntico e também em urticária, dor de ouvido, tumores glandulares, erupção pustural, icterícia, erupções causadas por coceira, queimaduras e úlceras, além de outras erupções posturais, leucoderma, diabetes. Os frutos são usados como purgante e emoliente. São também considerados úteis contra vermes internos e doenças urinárias. O óleo da semente é considerado um poderoso remédio contra tuberculose, hanseníase, reumatismo, vermífugo e também tônico capilar e contraceptivo. As flores e os galhos, também apresentam seus valores medicinais. Os ramos finos são usados como escova dental considerado muito refrescante e higiênico. Apesar da grande aceitação popular das propriedades medicinais do neem, poucos estudos científicos foram realizados comprovando sua eficácia, necessitando de mais investimentos e pesquisa nessa área. Desde a descoberta do neem para o mundo ocidental centenas de trabalhos foram desenvolvidas na busca de comprovações científicas e entendimento de suas ações biológicas. Atualmente o neem tem ação comprovada sobre mais de 400 espécies de insetos e ácaros causando os mais diversos efeitos como repelência, redução de alimentação, repelência de postura, interrupção de desenvolvimento e da acdise, atraso no desenvolvimento, redução da fertilidade e

fecundidade e diversas outras alterações no comportamento e na fisiologia dos insetos, que podem levar até a morte (FORIM, 2006).



Figura 5: Partes da árvore do Neem: Caule, Folhas e Sementes.

Fonte: <http://www.plantaneem.com.br/arvore.htm>

Do ponto de vista prático, algumas características tornam o neem bastante promissor para o uso no controle de pragas, a planta não precisa ser destruída para se produzirem os extratos possuem uma multiplicidade de compostos o que torna mais difícil aos insetos adquirirem resistência, a concentração dos compostos ativos é alta, os compostos são solúveis em água, são fáceis de extrair e com baixo custo, pela sua forma de ação os compostos são mais tóxicos às pragas do que aos inimigos naturais, os produtos são praticamente inócuos ao ambiente e ao homem, são totalmente biodegradáveis, com baixa persistência no ambiente (FORIM, 2006).

3.8.5- Produtos Industriais do Neem



Figura 6: Produtos industriais feitos de várias partes da árvore do Neem

Fonte: <http://www.neembrasil.com.br/produtos.html>

Devido às várias propriedades do Neem tanto para a agricultura como medicinal, no mercado mundial surgiu produtos (Figura 6, pág.43) para atender as várias necessidades nessas áreas, ou seja, das várias partes da árvore da vida surgem produtos como o óleo do neem que é usado em lamparinas e também como lubrificante para máquinas. Suas folhas e ramos, no alimento de gado. Suas folhas e sementes também são utilizadas na reforma de solos desgastados e como adubo. A polpa do fruto é um rico substrato para a produção de gás metano. Sua madeira é um excelente para a fabricação de mobílias, tábuas, painéis, brinquedos, arado e lenhas. O neem ainda é usado como quebra vento e sombreamento às margens de plantações e em reflorestamento por sua fácil adaptação em diversos tipos de solos e regiões climáticas. A árvore do neem é também conhecida como amargosa milagrosa, é uma árvore multiuso. A indústria de cosméticos também faz uso desta árvore, como para a fabricação de Xampu, óleo para cabelo, tônico capilar e óleo para unha. Na Alemanha, do tanino da casca e do caule fabricam-se sabonete e pasta dental. Mas também encontramos outros produtos fabricados a partir da árvore do neem como, por exemplo, geléia, lápis, chá, cremes faciais, velas,

Incensos, formigantes e outros produtos acabados de alta qualidade em todo mundo.

3.8.6- Classificação Botânica

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Sapindales

Família: Meliaceae

Gênero: *Azadirachta*

Espécie: *Azadirachta indica*

3.9- ROTA BIOGENÉTICA DOS LIMONÓIDES

Os limonóides são compostos que se originam do óxido de esqualeno (DEWICK, 1998). O óxido de esqualeno pode se ciclizar sincronizadamente gerando um carbocátion precursor das estruturas policíclicas terpênicas. Dependendo da enzima envolvida, o óxido pode ser moldado e ciclizar na conformação cadeira-barco-cadeira-barco gerando o cátion protoesteril ou na conformação cadeira-cadeira-barco formando o cátion dammarenila apresentando cada cátion uma estereoquímica diferente entre si.

O cátion protoesteril seguido por uma série de migrações simultâneas de Wagner-Meerwein de metilas e hidretos dá origem aos triterpenóides lanosterol e cicloartenol. O grupo cicloartenol se caracteriza pela presença de um ciclo propano entre C-9 e C-10. Uma característica adicional ao cátion protoesteril é que a Me-19 e H-5, também estão na posição trans-axial podendo ocorrer outras migrações de metilas e hidretos, rearranjo de Wagner-Meerwein, não necessariamente levando a formação da ligação dupla entre C-8/C-9, mas levando a formação de ligação dupla entre C-5/C-6.

Com a migração de hidretos e metilas no cátion dammarenila obtêm-se os isômeros Eufol (C-20(S)) e Tirucalol (C-20(R)). Muitos quassinóides e triterpeno C30 apresentam configuração C-20 (R) sugerindo o Tirucalol como precursor, porém nas folhas de *Azadirachta indica* o Eufol foi convertido para o limonóide nimbolido mais

eficiente que o Tirucalol. Então tanto o Eufol quanto o Tirucalol são precursores dos limonóides (FORIM, 2006).

Em um primeiro momento ocorre uma migração na dupla ligação desses compostos para o C-7 formando uma classe de triterpeno denominada protolomonóides representada pelo Butirospermol. Os protolomonóides também são conhecidos por conterem cadeia lateral intacta com 8 átomos de carbono (FORIM,2006).

Derivados dos protolomonóides e precursores mais diretos dos limonóides há o grupo dos apo- limonóides que são formados por protolomonóides que apresentam uma dupla ligação em C-14, com um grupo metílico com configuração em posição β em C-8, além de um grupo hidroxílico em posição α em C-7 (FORIM,2006).

Estruturalmente os limonóides são considerados derivados dos protolomonóides por uma série de reações oxidativas acompanhadas de rearranjos moleculares. As oxidações são preferencialmente epoxidações de ligações duplas ou lactonizações do tipo Bayer-Villinger de cetonas catalisadas pela enzima mono-oxigenase. Há interesse considerável na maneira pela qual a cadeia lateral do triterpeno precursor dos limonóides é transformada no anel furano β -substituído com a perda de quatro átomos de carbono. Duas propostas são bem aceitas sugerindo transformação na cadeia lateral através de reações de oxidação (FORIM, 2006).

O gênero *Azadirachta* apresenta inúmeros limonóides que foram classificados. Cada composto foi alocado dentro de um grupo de acordo com suas características estruturais. A seqüência dos grupos segue uma ordem biogenética proposta sendo cada um nomeado por seu principal representante (FORIM, 2006).

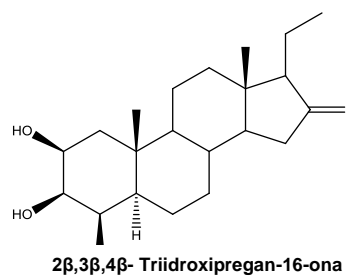
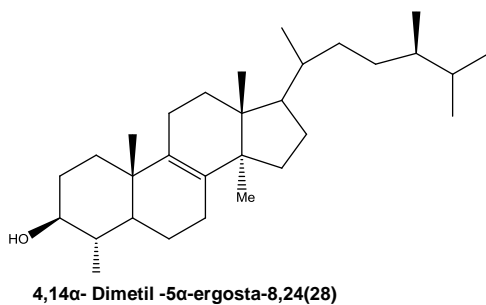
3.9.1- Gênero *Azadirachta*

Pertencente à subfamília Melioideae da família Meliaceae, o gênero *Azadirachta* constitui a tribo Meliaea e é composto pelas espécies *indica* e *excelsa*. A seguir encontra-se a revisão dos compostos isolados em cada gênero com seus respectivos nomes.

3.9.1.1- Substâncias isoladas do Gênero *Azadirachta*

3.9.1.1.1- Cicloartanos e Esteróides

Este grupo possui compostos derivados da rota Biosintética dos cicloartanos e esteróides. Os esteróides se caracterizam por não apresentarem metilas ligadas ao C-4 e C-8 eliminadas em etapas posteriores a ciclização do óxido de esqualeno (FORIM, 2006).

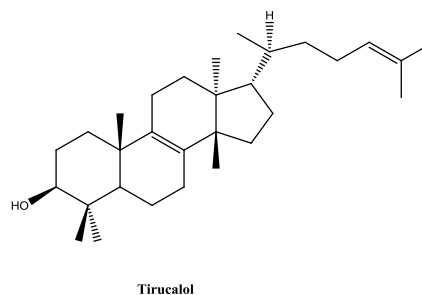
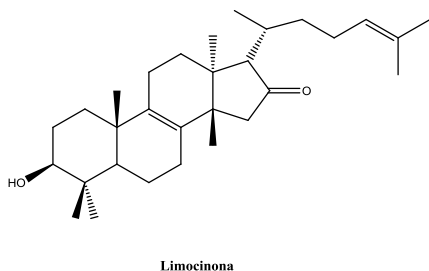


3.9.1.1.2- Protolimonóides, apo- protolimonóides e limonóides

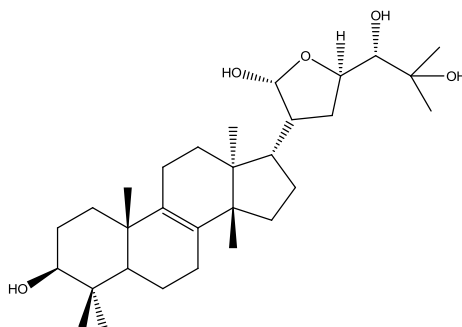
3.9.1.1.3- Grupo Protolimonóides

Os protolimonóides são considerados os precursores biossintéticos dos limonóides contendo ainda os 8 átomos de carbono na cadeia lateral.

Protolimonóides derivados do Eufol/Tirucalol

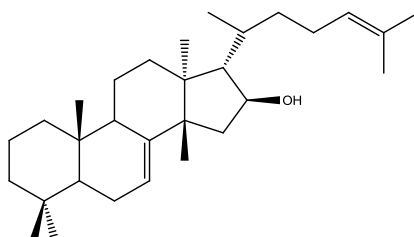


Protolimonóide derivado do Butirospermol



Meliantriol

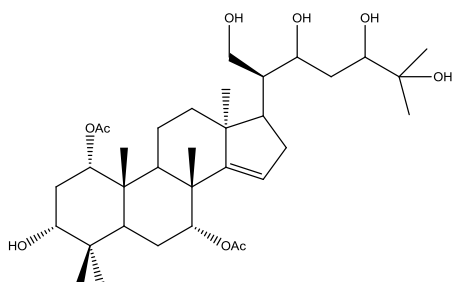
Protolimonóide derivado do Butirospermol Oxidados no C-16



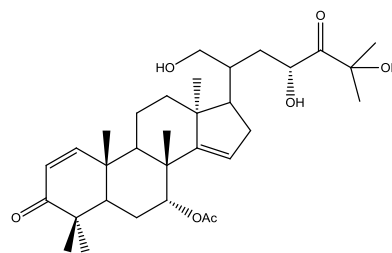
Limocinol

3.9.1.1.4- Grupo Apo-protolimonóides

Os apo-protolimonóides são caracterizados pela presença de Δ^{14} supostamente formados a partir dos protolimonóides após um apo rearranjo. São considerados os precursores mais diretos dos limonóides uma vez que esses normalmente apresentam a mesma insaturação ou posterior oxidação da ligação dupla.

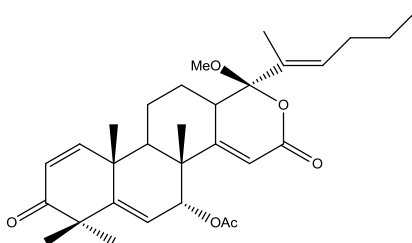


1 α ,7 α – Diacetoxipotirucal-14-eno-3 α ,21,22,24,25- Pentaol



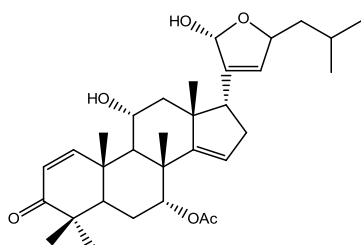
Azadirol

A estrutura abaixo é apo-protolimonóide com o anel D expandido após sofrerem uma reação de Baeyer-Villinger:

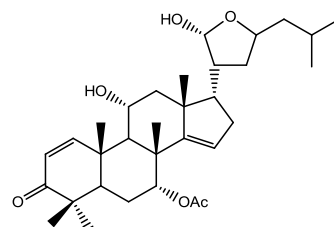


Meliacinina

As estruturas abaixo são apo-protolimonóides com anel de 5 membros na cadeia lateral:

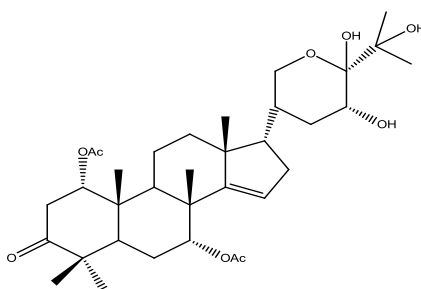


Azadirachtol (20,22-desidroazadirachnol)



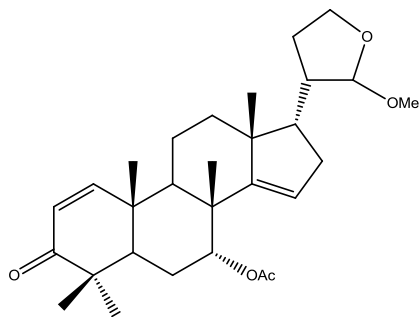
Azadirachnol

A estrutura abaixo é apo-protolimonóide com anéis de 6 membros na cadeia lateral:

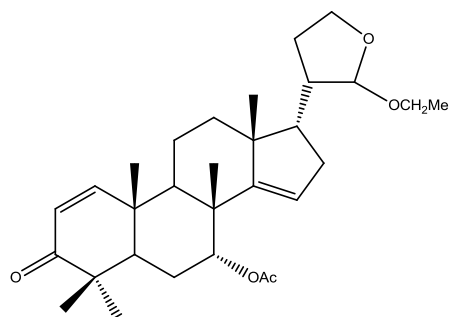


Diepoxiazadirol

Apo-protolimonóides derivados da perda de quatro átomos de carbono na cadeia lateral:

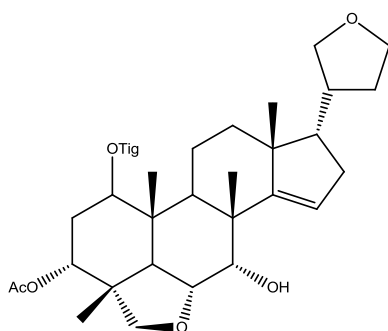


Limocina A

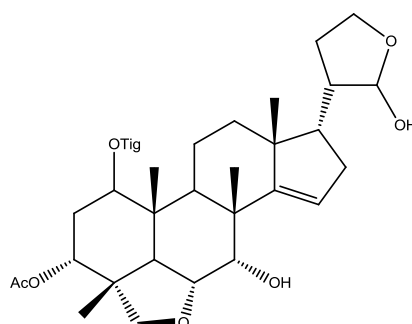


Limocina C

Apo-protolimonóides derivados da perda de quatro átomos de carbono na cadeia lateral com uma ponte éter entre C-28/C-6:

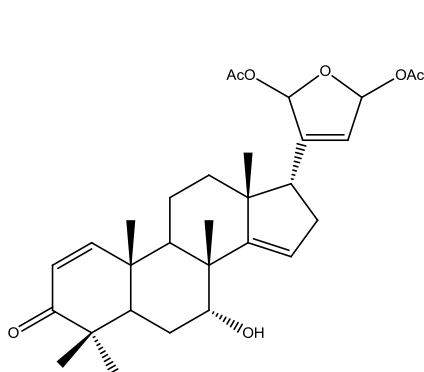


Desoxiazadirachtolido

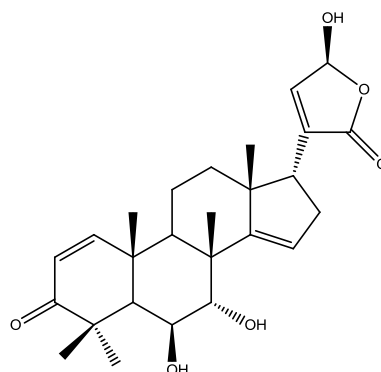


Não nomeado

Apo-protolimonóides com um grupo γ -hidroxibutenolídeo

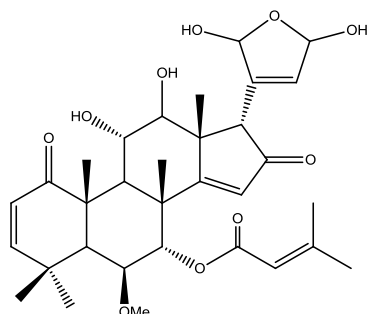


Salimuzalina

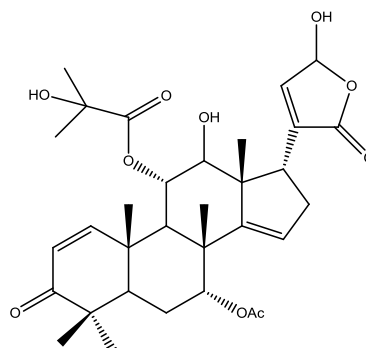


Nimocinolido

Apo-protolimônóides com um grupo γ -hidroxibutenolídeo com diversas oxidações:

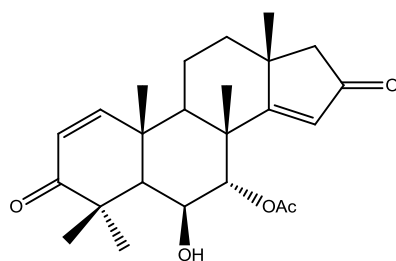


Meliatetraoleno

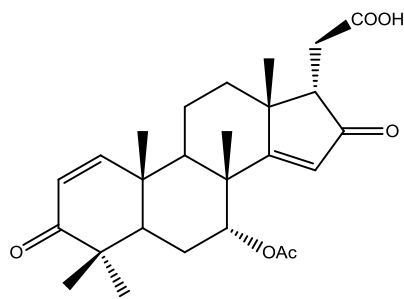


Nimbocinólido

Apo-protolimônóides derivados da perda da cadeia lateral:



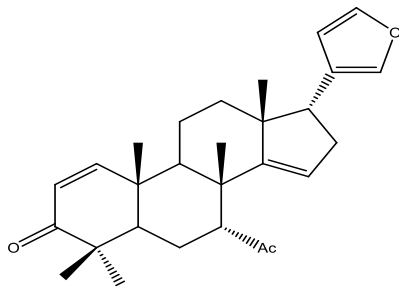
Desfurano-6a-hidroxiázadiradiono



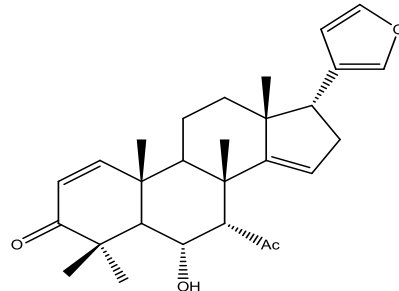
Ácido Nimolícinoico

3.9.1.1.5- Grupo Azadirono e seus análogos naturais

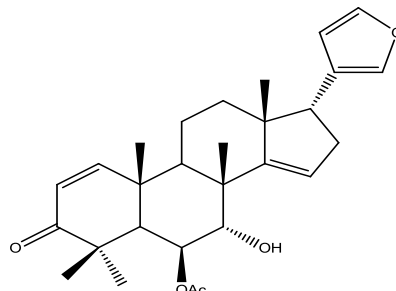
Esse grupo é constituído por limonóides com todos os anéis triterpênicos intactos.



Azadirono

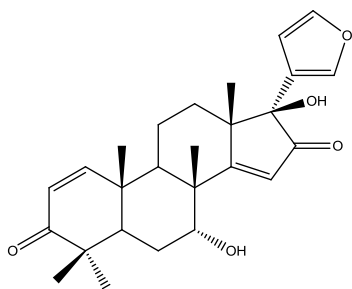


Nimonol (6a-Hidroxiiazadirona)

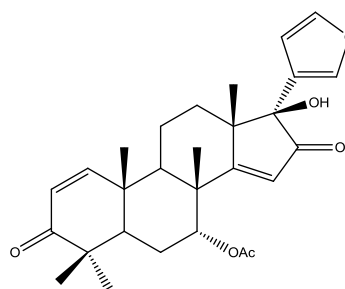


Meldenina

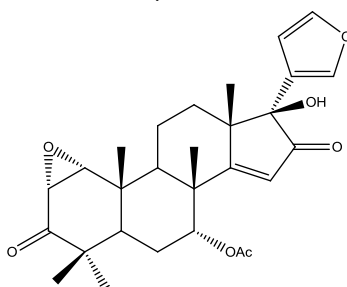
Compostos Oxidados do Grupo Azadono:



17β-Hydroxinimbocinol (7-Desacetil-17β-hidroxiiazadiradiono)



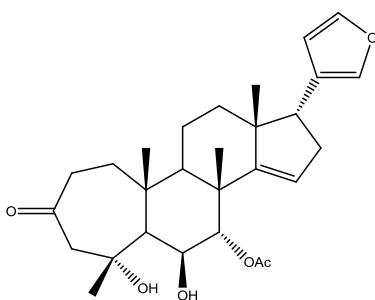
17β-Hidroxiiazadiradiono



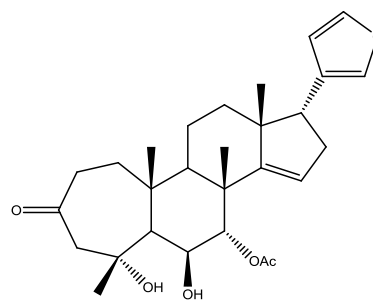
1α,2α-Epoxi-17β-hidroxiiazadiradiono

3.9.1.1.6- Grupo Homoazadirono:

É um grupo caracterizado por compostos homólogos do azadirona tendo o anel A sete membros. A extensão ocorreu pela incorporação de uma das metilas do C-4.



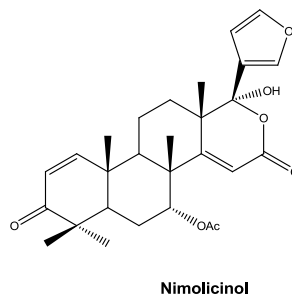
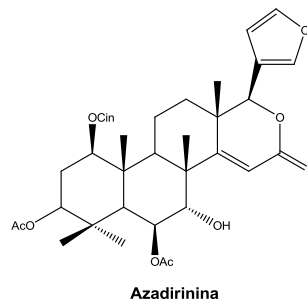
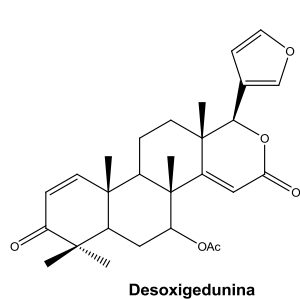
1,2- Diidro- 4α, 6α- A-homoazadirono(4α-Hidroxi- A-isomeldenina)



4α,6α-Diidroxi-A-homo-azadirono

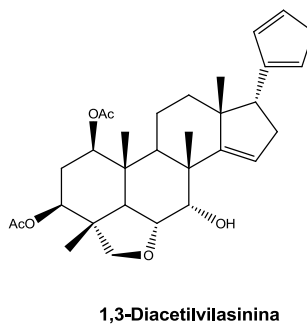
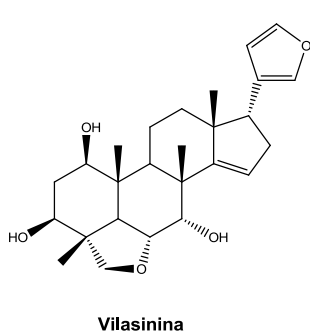
3.9.1.1.7- Grupo Gedunina

Compostos caracterizados por uma extensão oxidativa do tipo Baeyer-Villinger no anel D.

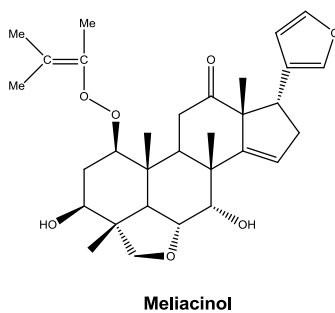


3.9.1.1.8- Grupo Vilasinina

Fazem parte deste grupo os limonóides com o esqueleto triterpênico intacto apresentando uma ponte éter entre C-28/C-6.

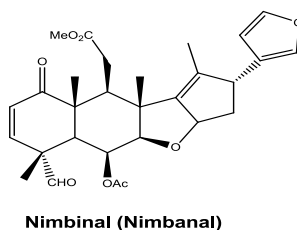
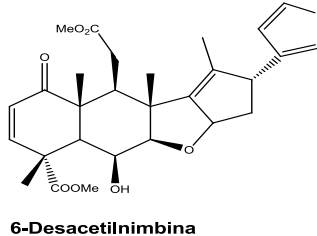
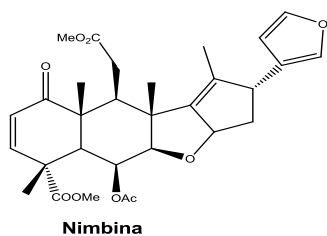


Neste grupo pode ser acrescentado o meliacinol possivelmente biossintetizado a partir da vilasinina.



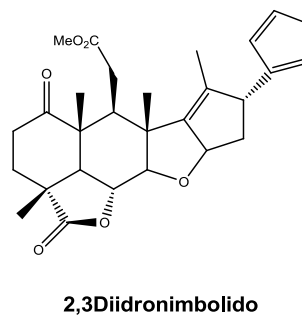
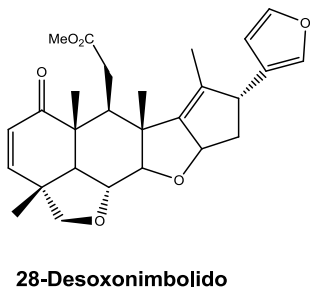
3.9.1.1.9- Grupo Nimbina

Grupo caracterizado pela presença de um anel C-seco e uma ponte éter entre C-7/C-15.



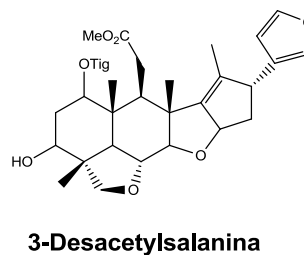
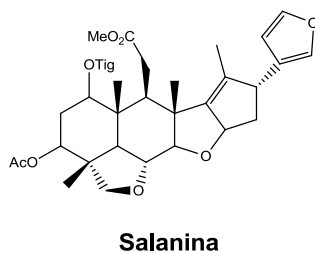
3.9.1.1.10- Grupo Nimbolídeo:

Compostos C-seco com ponte éter entre C-28/C-6.

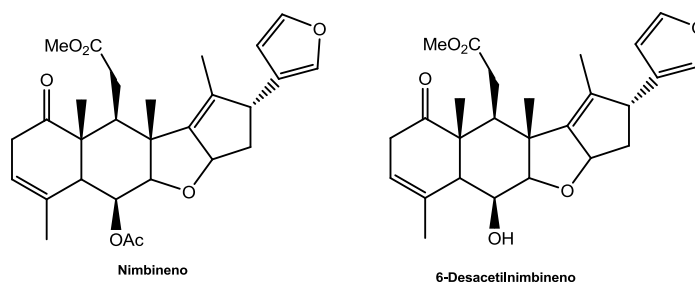


3.9.1.1.11- Grupo Salanina

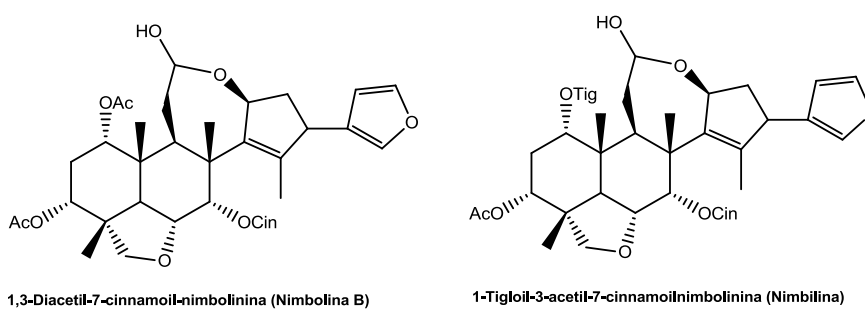
Limonóides C-seco não apresentando o grupo cêtonico no anel A.



3.9.1.1.12- Grupo Nimbineno: Grupo formado por 28 *nor*-limonóides.

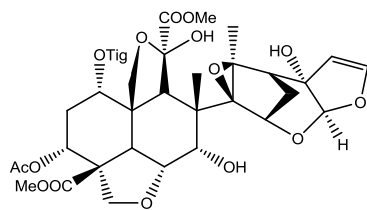


3.9.1.1.13- Grupo Nimbolinina: São compostos derivados de limonóides C-seco rearranjados em um anel C de sete membros.

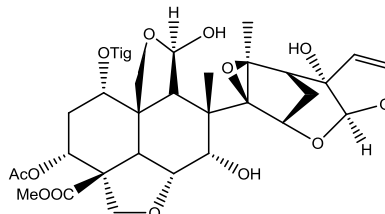


3.9.1.1.14- Grupo Azadiractina

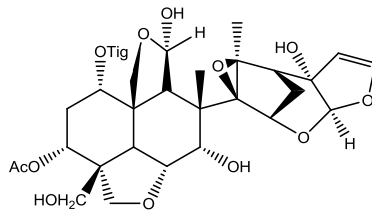
Constituído por limonóides C-seco com variadas modificações no esqueleto triterpênico e diversos grupos funcionais. Seu principal representante é azadiractina A.



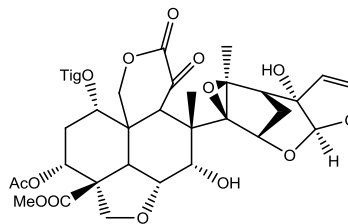
Azadirachtina A



Azadirachtina H



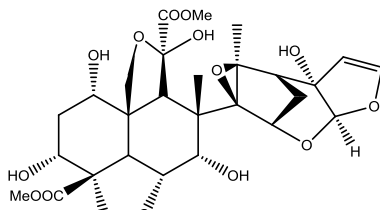
Azadirachtina M



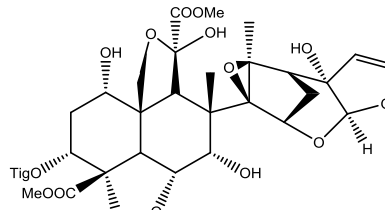
Azadirachtina K

3.9.1.1.15- Grupo Azadirachtol

Tem como principal composto a Azadirachtina B. Estes compostos se diferenciam do grupo Azadirachtina por não apresentarem um grupo hidroxila em C-11.



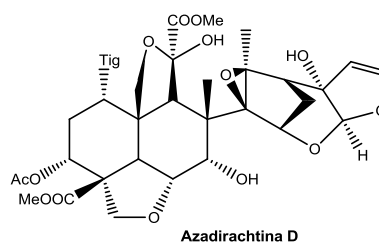
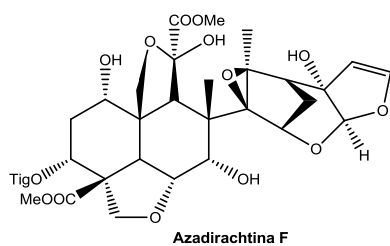
Azadirachtol



Azadirachtina B (3-Tigloiazadirachtol)

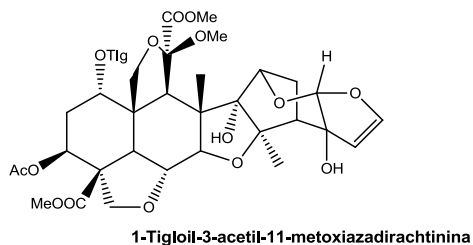
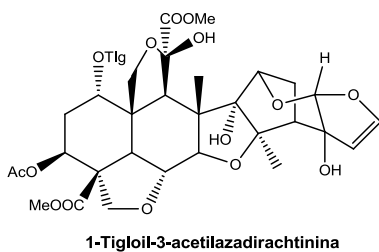
3.9.1.1.16- Grupo Meliacarpina

Estes compostos possuem um grupo metílico e não o carboximetila em C-4 presentes nos compostos dos grupos Azadirachtina e Azadirachnol.



3.9.1.1.17- Grupo Meliacarpina e Azadirachtina

Os compostos deste grupo são meliacarpinas e azadirachtinas rearranjadas através da formação de uma ponte entre C-7/C-13 pela abertura do epóxido C-13/C-14.



4- PARTE EXPERIMENTAL

4.1- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

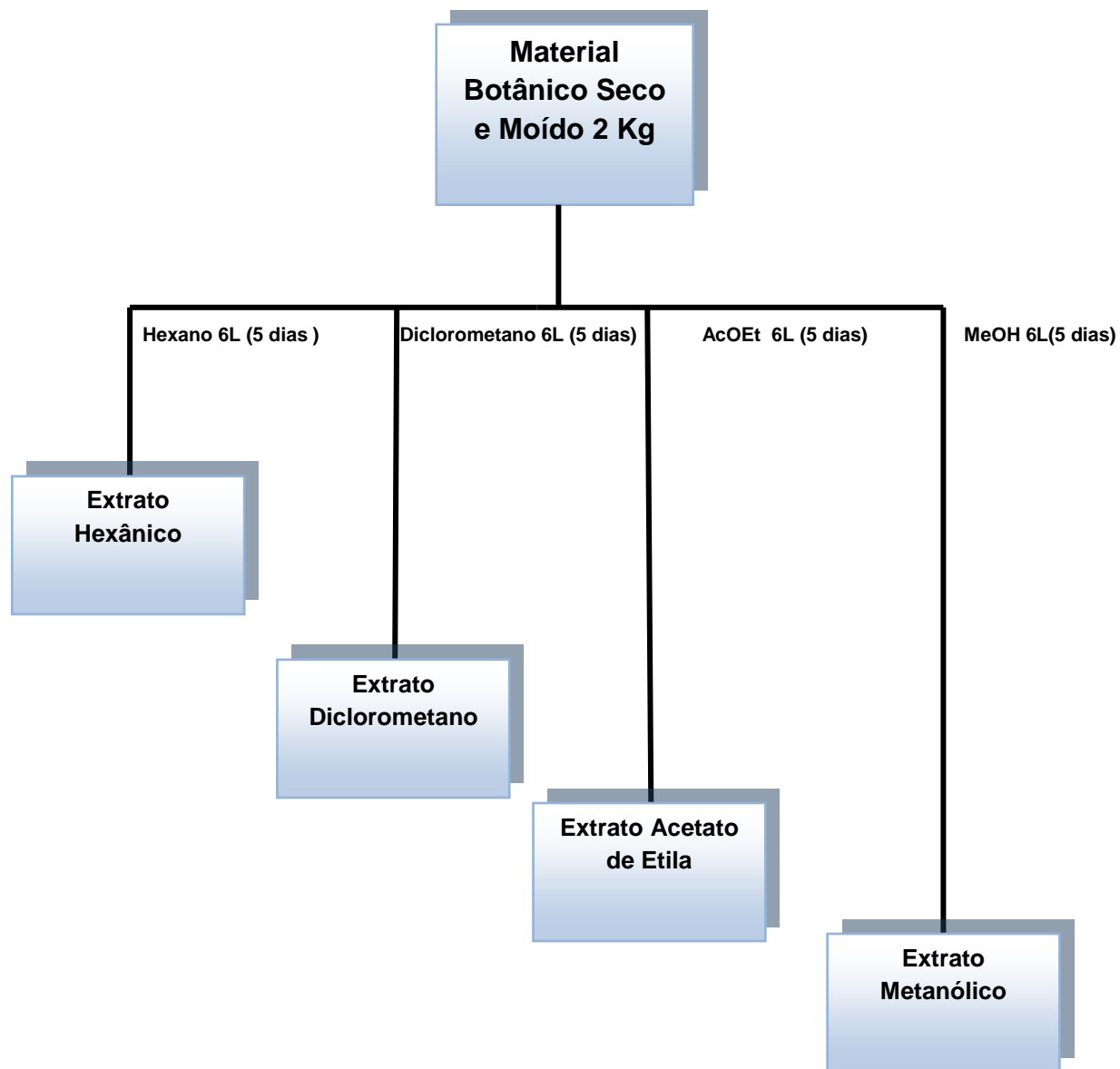
A coleta do material botânico foi realizada na reserva florestal da EMBRAPA- Amazônia Oriental em Belém-Pará, pelo professor Dr. Antônio Pedro da Silva Souza Filho. Foram coletadas 10 Kg de folhas da espécie fresca. As amostras foram cuidadosamente escolhidas e identificadas.

4.2- OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS

As folhas de *Azadirachta indica* foram secas em estufa com circulação de ar, à temperatura de 45⁰ C e posteriormente trituradas em moinho de facas, resultando em um total de 2 Kg . Em seguida, realizou-se a extração a frio em período de cinco dias, utilizando-se 6 litros de hexano para cada período de 5 dias, resultando em extrato bruto hexânico e resíduo. Ao resíduo foram adicionados 6 litros de diclorometano durante cinco dias, resultando em extrato bruto diclorometano e outro resíduo. Ao segundo resíduo obtido foi adicionado 6 litros de acetato de etila durante cinco dias com a obtenção do extrato acetanólico mais o resíduo. No terceiro resíduo adicionou-se metanol no mesmo período de tempo resultando o extrato bruto metanólico. O extrato utilizado para análise foi o metanólico, que esta sendo citado em todo trabalho.

Nos fluxogramas **I, II, III e IV** são relatadas as metodologias utilizadas para a obtenção dos extratos brutos, fracionamento do extrato metanólico, fracionamento da fração EME e isolamento das substâncias, respectivamente.

FLUXOGRAMA I: OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E DAS FRAÇÕES DA FOLHAS DE *Azadirachta indica*.



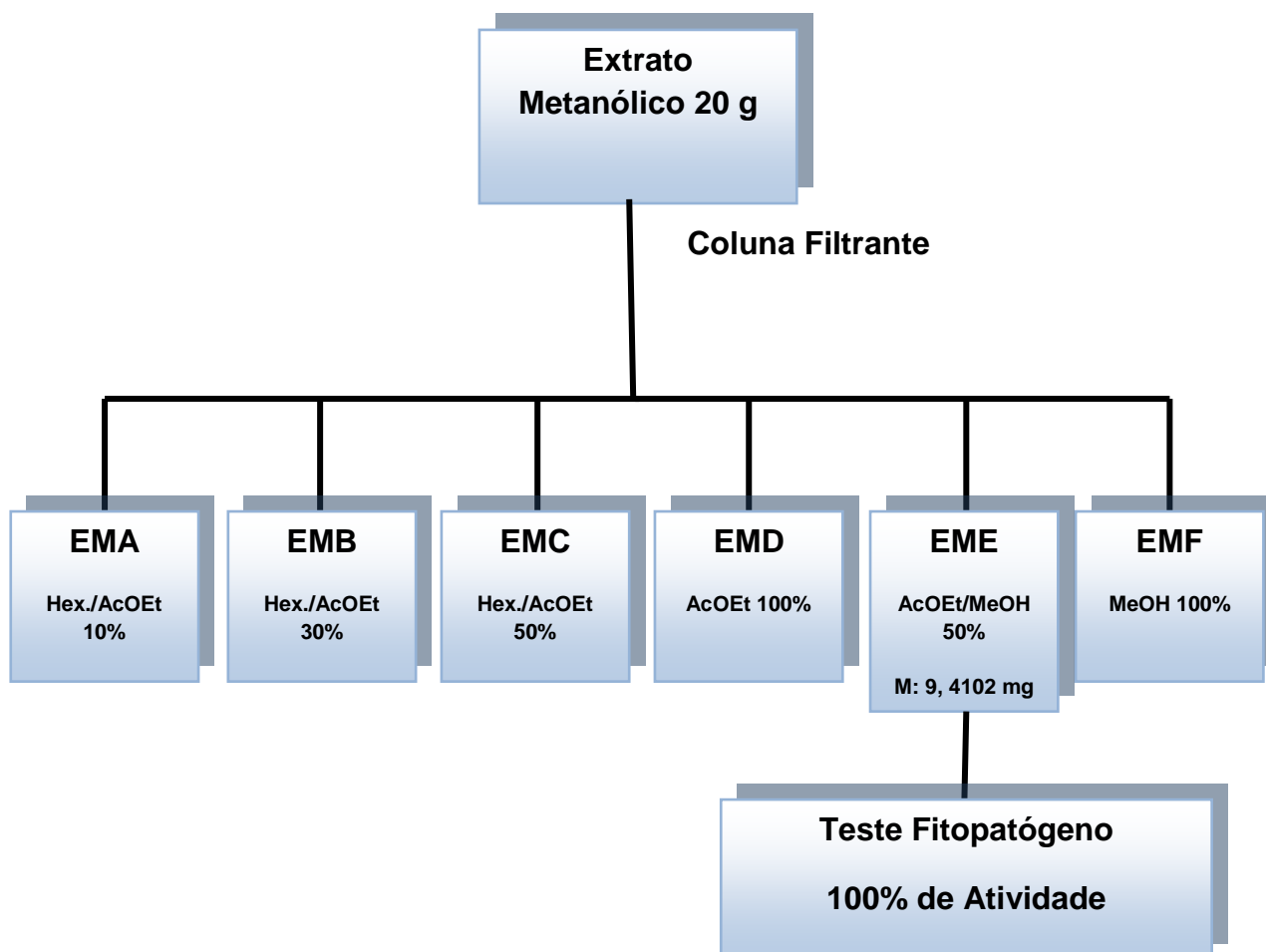
4.3- FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica*

Uma amostra do extrato metanólico das folhas de *Azadirachta indica* (20g), foi fracionada por CCVU filtrante em sílica gel, utilizando-se misturas de solventes com polaridades crescentes, em um volume calculado* de 180 mL de cada sistema: Hexano/acetato de etila 10%, Hexano/ acetato de etila 30%, hexano/acetato de etila 50%, Acetato de etila 100%, Acetato de etila/ Metanol 50% e Metanol 100%, Obtendo-se após a evaporação dos solventes as seguintes frações: **EMA, EMB, EMC, EMD, EME e EMF**. Após testes fitopatogênicos no Laboratório de fitopatologia da Embrapa, obteve-se um resultado de 100% de atividade em relação ao fungo estudado, da fração **EME (9.4102 g)**.

*Equação para o cálculo do volume: $V = \pi r^2 h$

Onde, **r** é o raio da coluna e **h** a altura da sílica após o empacotamento.

FLUXOGRAMA II: FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica*.



4.4- METODOLOGIA DE SEPARAÇÃO POR CLAE

4.4.1- Pré-tratamento usado para a fração EME.

O método empregado foi a Extração em Fase Sólida (EFS), buscando-se reter as impurezas e/ou interferentes deixando passar o analito de interesse.

Foi utilizado cartucho strata-C18 Phenomenex com 10 mg de fase estacionária e 1 mL de volume. O cartucho foi condicionado com 800 µL de acetonitrila e 1 mL de água. À fração **EME** foram adicionados 800 µL de acetonitrila e para facilitar a solubilização esta fração foi levada ao ultrassom e em seguida foram adicionados 200 µL de água e novamente levada ao ultrassom, sendo em seguida inoculada no cartucho. O sistema cromatográfico foi composto por:

Uma coluna C18 Gemini (150 x 4,6 mm, 5µ), com pré-coluna.

A Fase Móvel é composta por Solvente A, água, solvente B, Acetonitrila, variando de 5 a 100% de B em 60 minutos, vazão de 1 mL/ min.

A solução foi aplicada no cartucho, recolhendo-se a solução de interesse e em seguida, o solvente foi evaporado na capela.

Após a evaporação do solvente, o resíduo foi ressuspensionado em 1mL de Acetonitrila, onde retirou-se uma alíquota de 20 µL, injetando-a no cromatógrafo líquido, com um intuito de se obter um perfil cromatográfico da amostra na programação de Gradiente Exploratório variando-se de 5% a 100% do modificador orgânico, em 60 minutos de análise. A vazão da fase móvel foi de 1 mL por minuto, e o detector de absorvância na região do ultra-violeta do sistema CLAE analítico estava operando com os comprimentos de onda de 215 a 220 nm.

Considerando-se o perfil cromatográfico da fração **EME** e objetivando-se a otimização para o isolamento das substâncias de interesse, realizou-se tal gradiente para prever a possibilidade de elucidação no modo isocrático. Baseado na relação $(T_{rz} - T_{ra}) / T_g$ que apresentou valor inferior 0,4 segundo SNYDER, KIKERLAND e GLAJCH (1997), foi realizado o cálculo e o resultado obtido para a relação foi de 0,28 demonstrando que a separação podia ser realizada no modo isocrático.

4.4.2- Isolamento das substâncias

Depois de determinado o melhor sistema de separação das substâncias no modo isocrático, a fração **EME** que deu 100% de atividade em testes fitopatogênicos em relação ao fungo da fusariose, foi recromatografada em CCVU resultando em 38 frações. Da reunião das frações 9 a 12 surgiu uma fração **EME₉₋₁₂** que também foi recromatografada em CCVU, no sistema CH₂Cl₂:AcOEt:MeOH (55%:40%:5%) obtendo-se as seguintes subfrações: FrA (87,8mg), FrB (277 mg), FrC (96,8 mg), FrD (71,4mg), FrE (63,5 mg) e FrF (50,5 mg). A sub-fração FrB (277 mg) foi submetida a isolamento em HPLC semi- preparativo, usando para isso:

Um cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Varian Polaris, composto por duas bombas modelo Prostar 210-215, detector com duplo canal de absorvância na região do ultravioleta e do visível, operando com comprimento de onda 220 a 254 nm, modelo Prostar 325, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 20 µL para o analítico e 200 µL para o semi preparativo; interface de comunicação Varian, modelo RS-485/422 LCs acoplado a microcomputador Pentium IV software de integração Star WS WinXP.

Como fase estacionária utilizou-se uma coluna semi- preparativa Gemini C 18 5µ 15 cm e pré-coluna de C 18. Como fase móvel utilizou-se uma mistura dos solventes, água ultra-pura, obtida de um sistema Millipore (Direct- Q[®] 3), Metanol grau HPLC (TEDIA). Os solventes foram filtrados em membrana de nylon de 0,45 µm, usando-se um fluxo de 4,6 mL/min.

O cromatograma A, mostrado na figura 7, página 62, representa o modo como as frações foram coletadas no processo de separação, em escala semi-preparativa, de alguns constituintes majoritários presentes na fração FrB. Isto resultou em 05 novas frações como: **FrB₁₀₄ (4,1 mg)**, **FRrB₁₁₀ (7,5 mg)**, **FRrB₁₁₁(5,3 mg)**, **FrB₁₁₂ (5 mg)** e **FrB₁₁₃ (6,2 mg)**, sendo que apenas três (**FRrB₁₁₀**, **FRr₁₁₁** e **FrB₁₁₃**) estão em análise fitopatogênicas.

As substâncias isoladas nas subfrações **FRrB1₁₀** , e **FRrB1₁₂** tiveram suas estruturas determinadas por métodos espectrométricos de análise e então receberam as seguintes denominações **L₁** e **L₂** respectivamente.

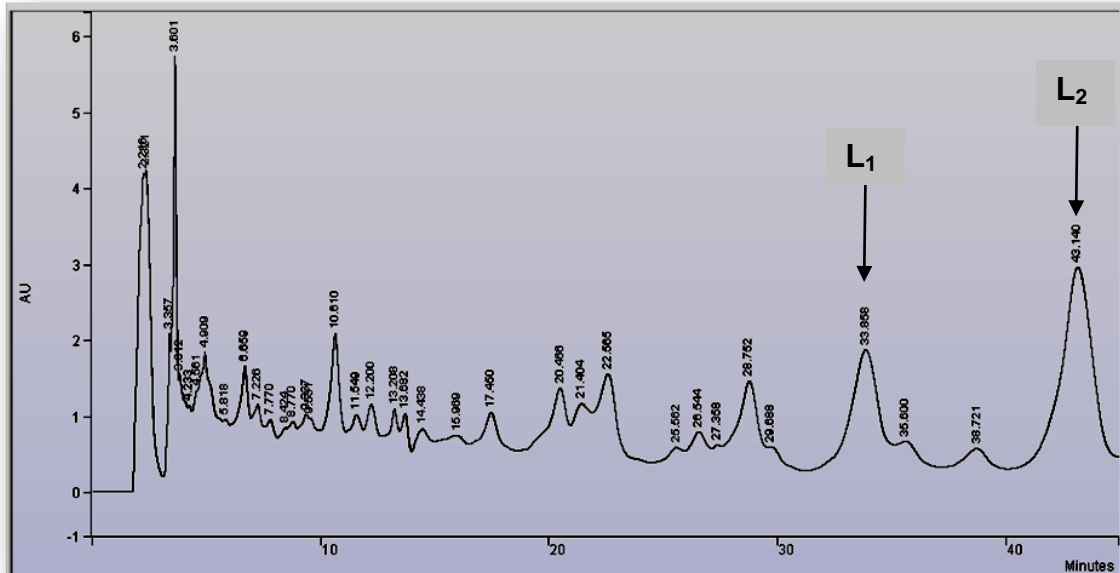
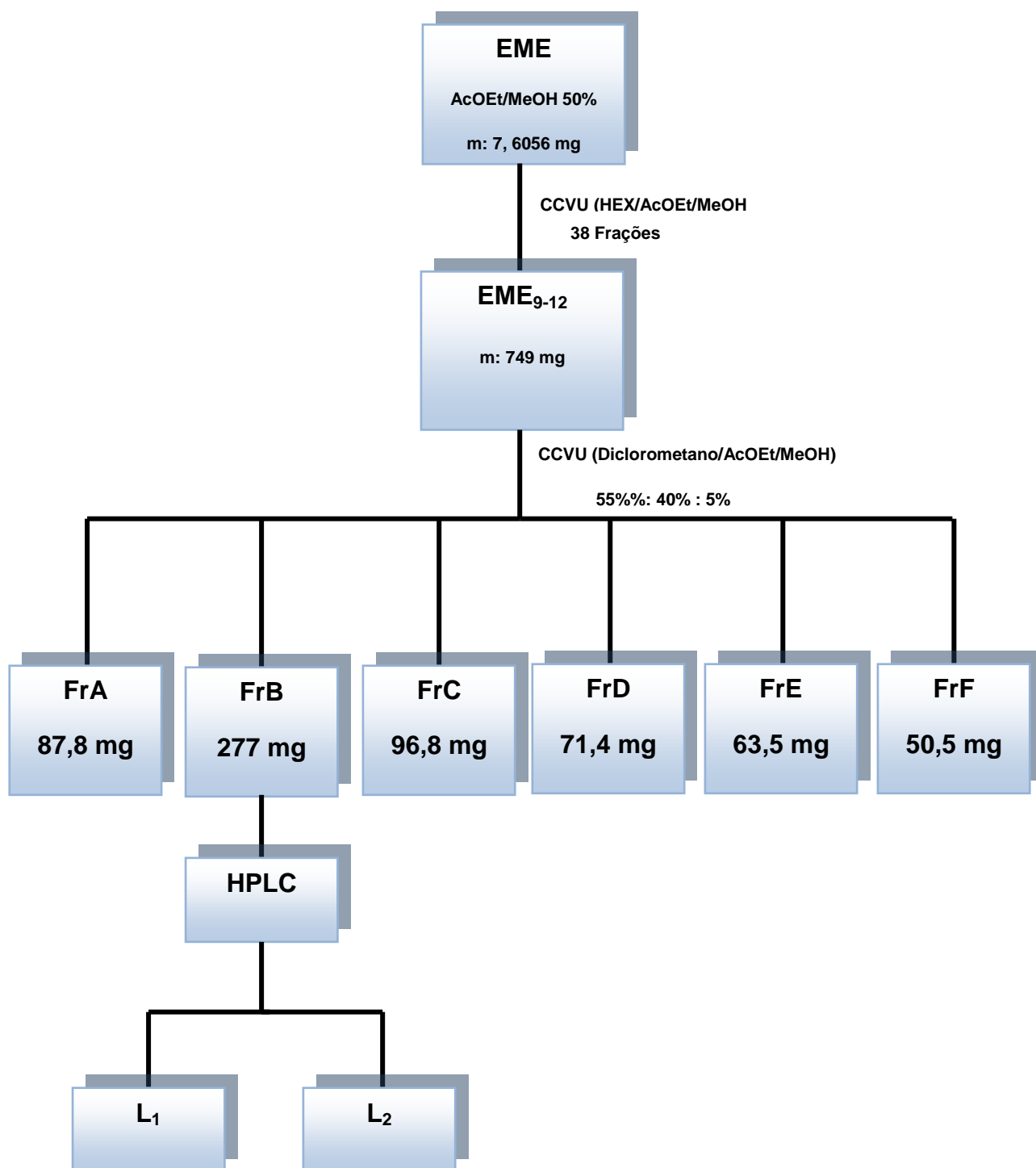
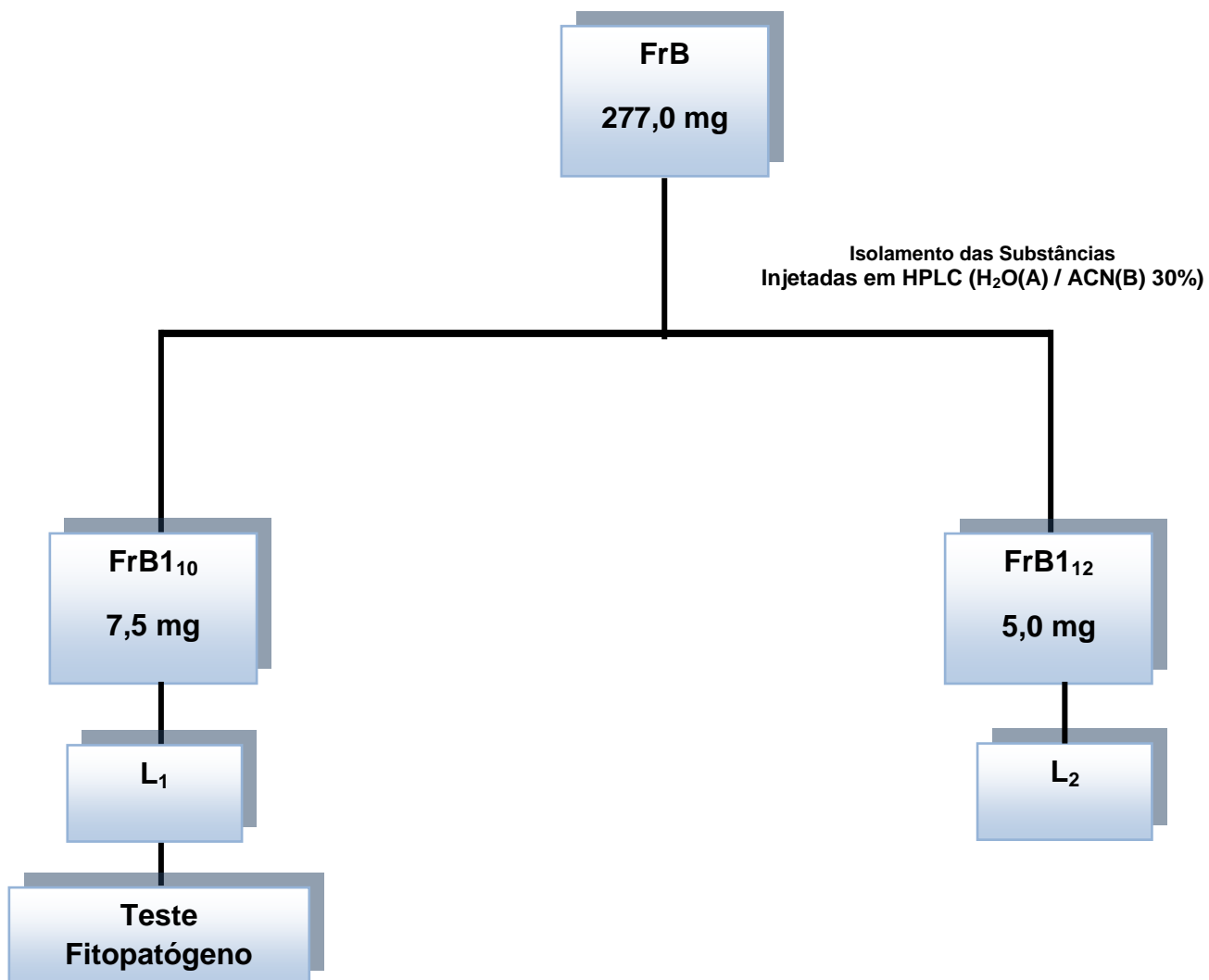


FIGURA 7: Cromatograma A: Perfil cromatográfico dos constituintes majoritários da Fração EME. Fase móvel composta por Solvente A=H₂O e Solvente B= Acetonitrila, variando, variando de 5% a 100% de B, em 60 minutos. Detecção de 215 a 220 nm.

FLUXOGRAMA III: FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO EME PARA ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS DE FOLHAS DE *Azadirachta indica*.



FLUXOGRAMA IV: ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS



4.5- MATERIAIS E TÉCNICAS UTILIZADAS

✓ Nas separações cromatográficas em coluna, foi utilizada como adsorvente sílica gel (65x250 mesh) SORBENT TECHNOLOGIES.

✓ A cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi efetuada usando sílica gel TLC plates, w/UV 254, aluminium backed, 200µm, 20x20 cm SORBENT TECHNOLOGIES.

✓ Foi utilizado como revelador solução de sulfato cérico.

✓ Os solventes utilizados foram da marca TEDIA BRASIL, grau HPLC. Todos foram utilizados após serem filtrados a vácuo em um sistema de filtração PHENOMENEX[®] com um funil de 300 mL e frasco coletor de 1L, utilizando-se membranas de nylon 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm.

✓ A água pura utilizada na composição das fases móveis foi obtida em um sistema Millipore DIRECT-Q3[®] (18,2 MΩ. cm).

✓ A homogeneização das amostras foi realizada em agitador vórtex VERTEX[®] QL-901.

✓ Para pesagem das frações foi utilizada uma balança analítica SARTORIUS[®] BP 210 S com precisão de 0,0001 g.

4.6- EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS UTILIZADOS

✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Modelo MERCURY 300- Varian.

✓ Cromatógrafo Líquido de alta Eficiência Shimadzu, composto por duas bombas, modelo LC-10AD, detector com único sinal de absorbância na região do ultravioleta, operando com comprimento de onda em 215 a 220 nm modelo SPD-10AV, degaseificador de membrana, modelo DGU-14A, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 20 µL, interface de comunicação Shimadzu, modelo CBM-10 acoplado a microcomputador Pentium II com software de integração Class LC-10A.

✓ Seringas Hamilton com capacidade de 20 e 200µL.

4.7- MÉTODOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Na determinação das estruturas das substâncias L₁ e L₂ foram empregados métodos espectrométricos de análise de RMN unidimensionais (¹H, ¹³C e DEPT além de UV).

4.7.1- Técnicas Utilizadas

4.7.1.1- Cromatografia

✓ Para a cromatografia em coluna foi utilizada a fase estacionária sílica-gel (65x250 mesh) SORBENT TECHNOLOGIES, numa proporção de cerca 0,2 g de amostra. Já para a fase móvel foram utilizados os solventes: Hexano, Acetato de Etila e Metanol.

✓ Foi realizado em coluna de vidro, sendo o diâmetro e a altura da coluna variando em função da quantidade de amostra. A fase estacionária foi colocada na coluna após ser misturada a um solvente de escolha prévia e a amostra escolhida foi fracionada com misturas de solventes em ordem crescente de polaridade (fase móvel).

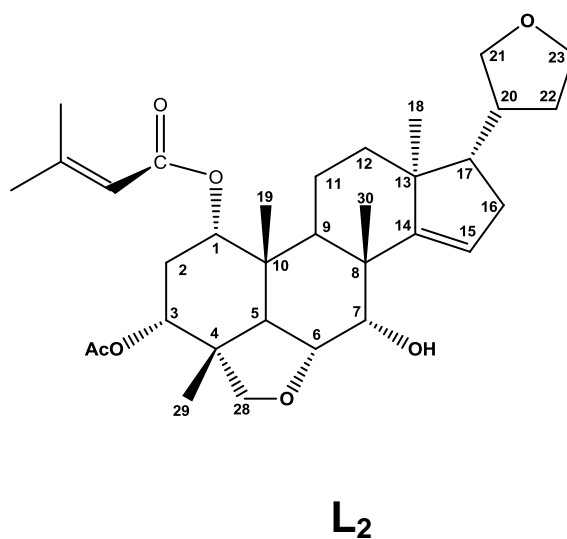
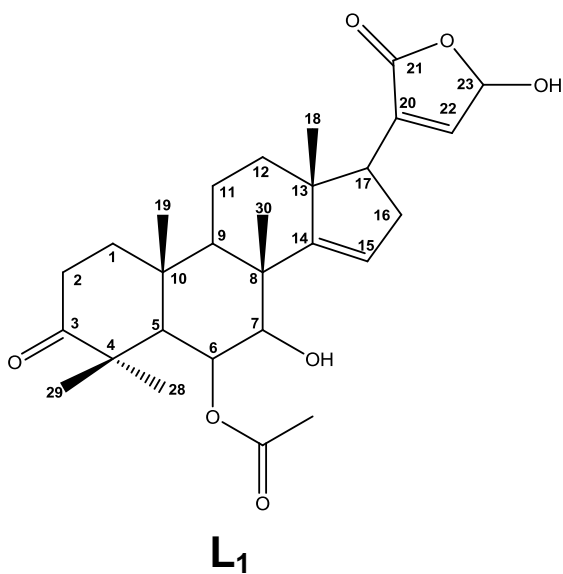
✓ As colunas para CLAE usada: coluna semi-preparativa Gemini[®] C 18 5μ 15 cm e pré-coluna de C 18.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na investigação química das folhas do Neem (*Azadirachta indica*) foram isoladas cinco substâncias pertencentes à classe dos limonóides, sendo que apenas duas tiveram suas estruturas determinadas (**L₁** e **L₃**), as quais foram obtidas da fração 100% MeOH, oriunda do fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Azadirachta indica*.

A determinação estrutural das substâncias isoladas foi feita com base na análise dos dados espectrométricos de RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY ¹H x ¹H, DEPT, HETCOR e HMBC, e por comparação com a literatura. A análise dos espectros das substâncias isoladas evidenciou deslocamentos químicos muito semelhantes o que levou a classificar tais substâncias como pertencentes a mesma classe.

5.1- ESTRUTURAS DOS LIMONÓIDES IDENTIFICADOS DE *Azadirachta indica*



5.2- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS L₁ e L₃

5.2.1- Determinação estrutural de L₁

As substâncias foram obtidas em mistura, por HPLC, da fração **FRB₁** obtida a partir do refractionamento do extrato hexânico das folhas de *Azadirachta indica*. A determinação estrutural foi feita a partir de análises dos espectros de RMN ¹H e ¹³C bem como comparação com a literatura.

A definição da estrutura da substância **L₁** foi iniciada analisando os espectros de RMN a partir de sinais bem característicos para limonóides. O espectro de RMN ¹H (**FIGURAS 8 e 9, pág. 70 e 71**), mostrou sinais característicos de hidrogênios olefinicos, metilênicos e metílicos, levando a sugerir uma substância de esqueleto limonoídico. A presença de singletos em δ_H 5,67 a 5,95 de hidrogênios olefinicos sugere a presença de duplas, também característicos de limonóides (FORIM, 2006). Outros deslocamentos que caracterizam o esqueleto triterpênico são os sinais que aparecem entre os deslocamentos δ_H 0,98 e 2,08 características de metilas. Um sinal marcante nos espectros de RMN de hidrogênio que caracterizam os limonóides são os sinais referentes ao anel furânico (δ_H 7,19 [s]; 6,24 [s] e 7,34 [s]), o que para esta mistura notou-se a ausência destes sinais, nos levando a supor que o anel furânico sofreu modificação na sua estrutura. Como a quantidade de massa obtida a partir do isolamento foi inferior a 10 mg os espectros não obtiveram uma resolução suficiente para assinalar a intensidade e multiplicidade dos sinais.

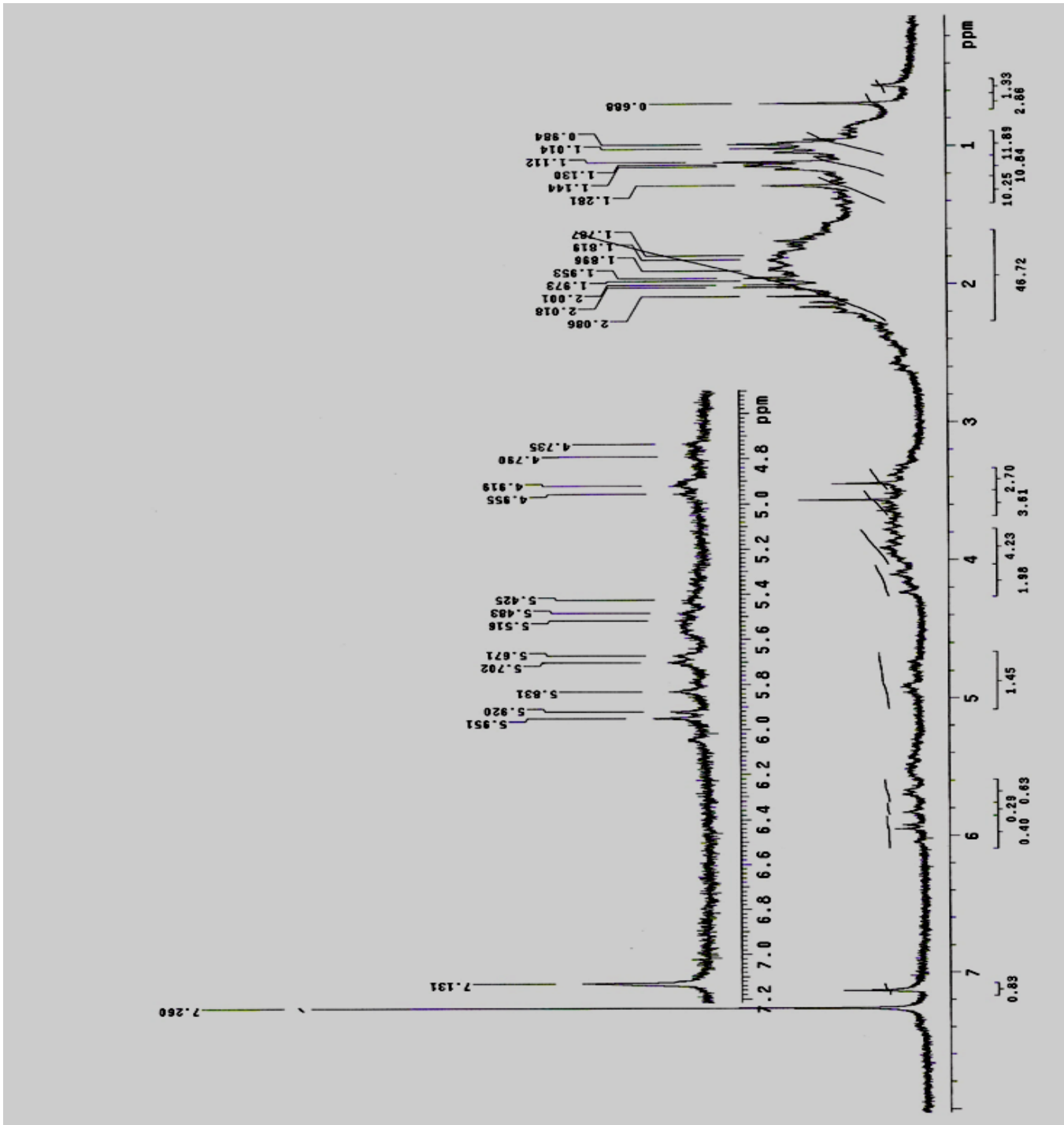


FIGURA 8: Espectro de RMN ^1H de L_1 (CDCl_3 , 300 MHz)

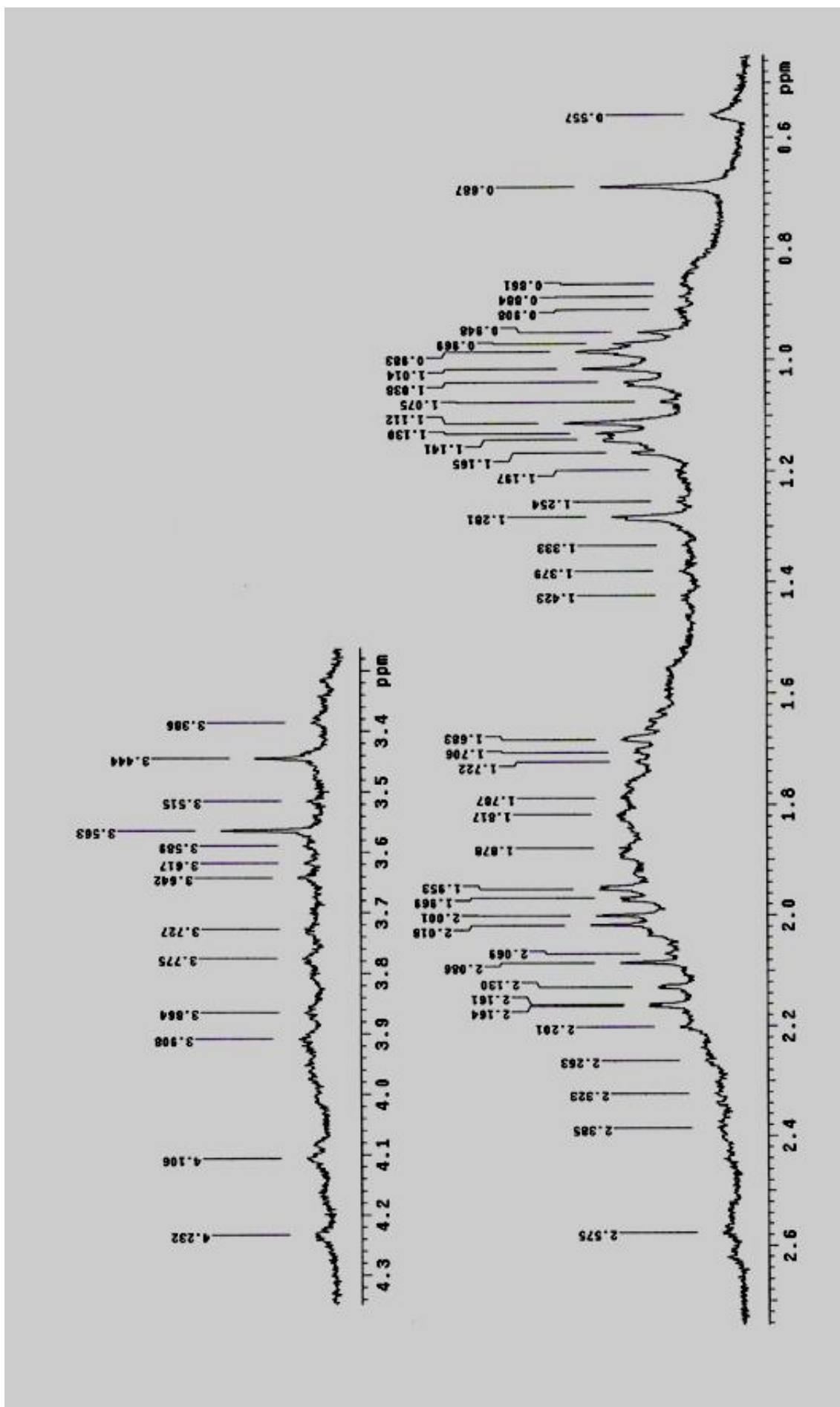


FIGURA 9: Expansão do Espectro de RMN ^1H de L_1 (CDCl_3 , 300 MHz)

O espectro de RMN ^{13}C (**FIGURAS 10 e 11, págs. 73 e 74**) quando assinalado em conjunto com o espectro de DEPT (**FIGURA 12, pág. 75**) permite relacionar 50 sinais de carbono de esqueleto tetranortriterpênico, indicando mistura de 2 e 3, dos quais podemos destacar:

- Três carbonos carbonílicos, sendo um de cetona (δ_{C} 219,5); um de anel lactônico (δ_{C} 174,75) e um de grupo acetato (δ_{C} 164,6).
- Quatro sinais de CH olefinico (δ_{C} 114,7; 114,9; 118,8 e 119,9).
- Três C olefinicos não hidrogenados (δ_{C} 130,2; 130,4 e 149,5).
- Onze C saturados oxigenados (δ_{C} 70,9; 71,70; 72,0; 72,2; 74,9; 78,0; 86,07; 87,8; 88,1; 97,6 e 98,6).
- Três C saturados não hidrogenados (δ_{C} 38,4; 39,0; 39,1;)
- Doze CH_2 alifáticos (δ_{C} 17,6; 20,2; 24,9; 30,2; 30,4; 30,6; 30,9; 32,3; 33,8; 34,7; 37,6; 38,0).
- Quatorze CH_3 (δ_{C} 12,7; 13,0; 13,4; 13,5; 15,0; 15,7; 16,7; 16,8; 19,1; 19,7; 19,8; 20,4; 20,8; 27,6)

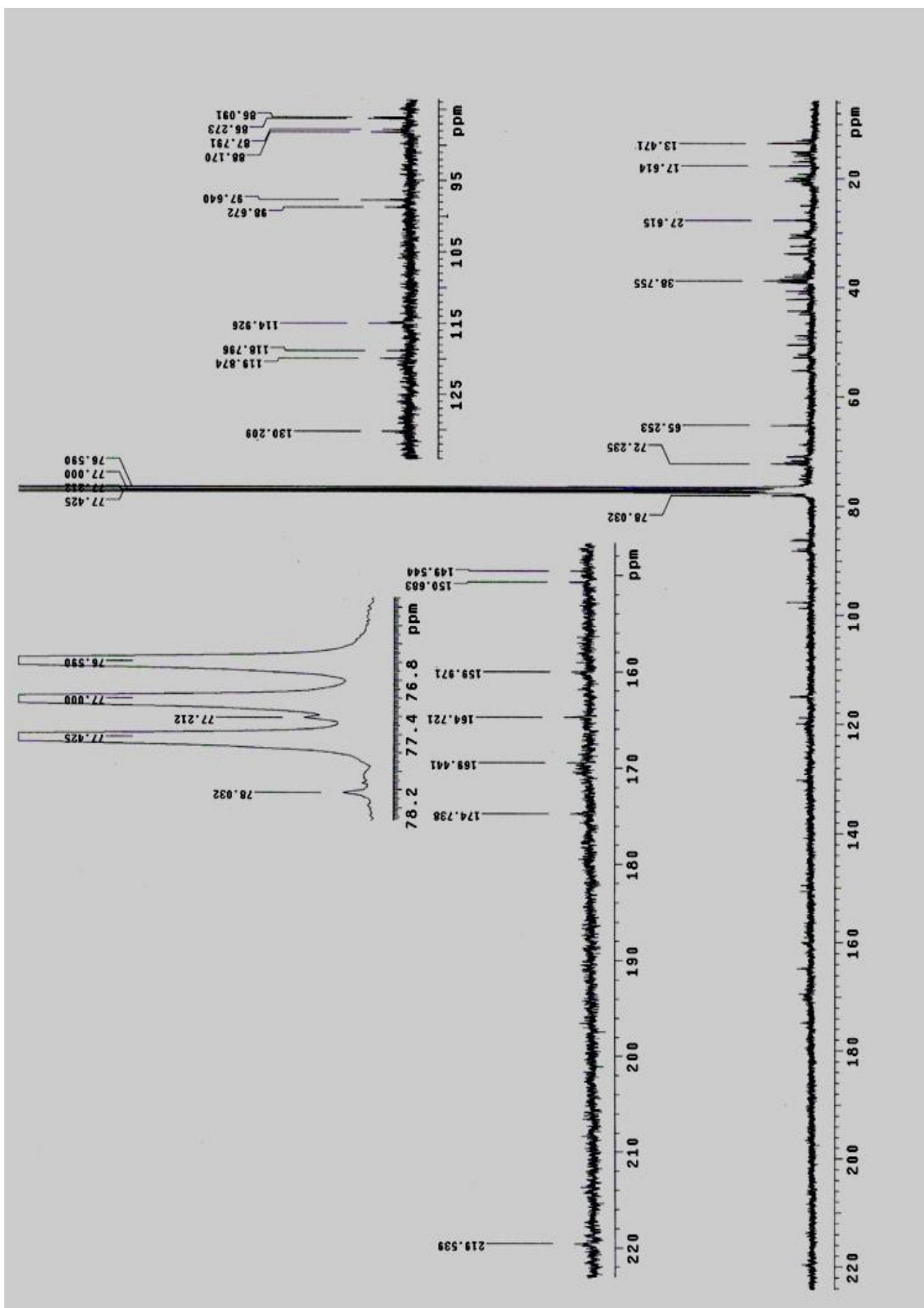


FIGURA 10: Espectro de RMN ^{13}C de L_1 (CDCl_3 , 75 MHz)

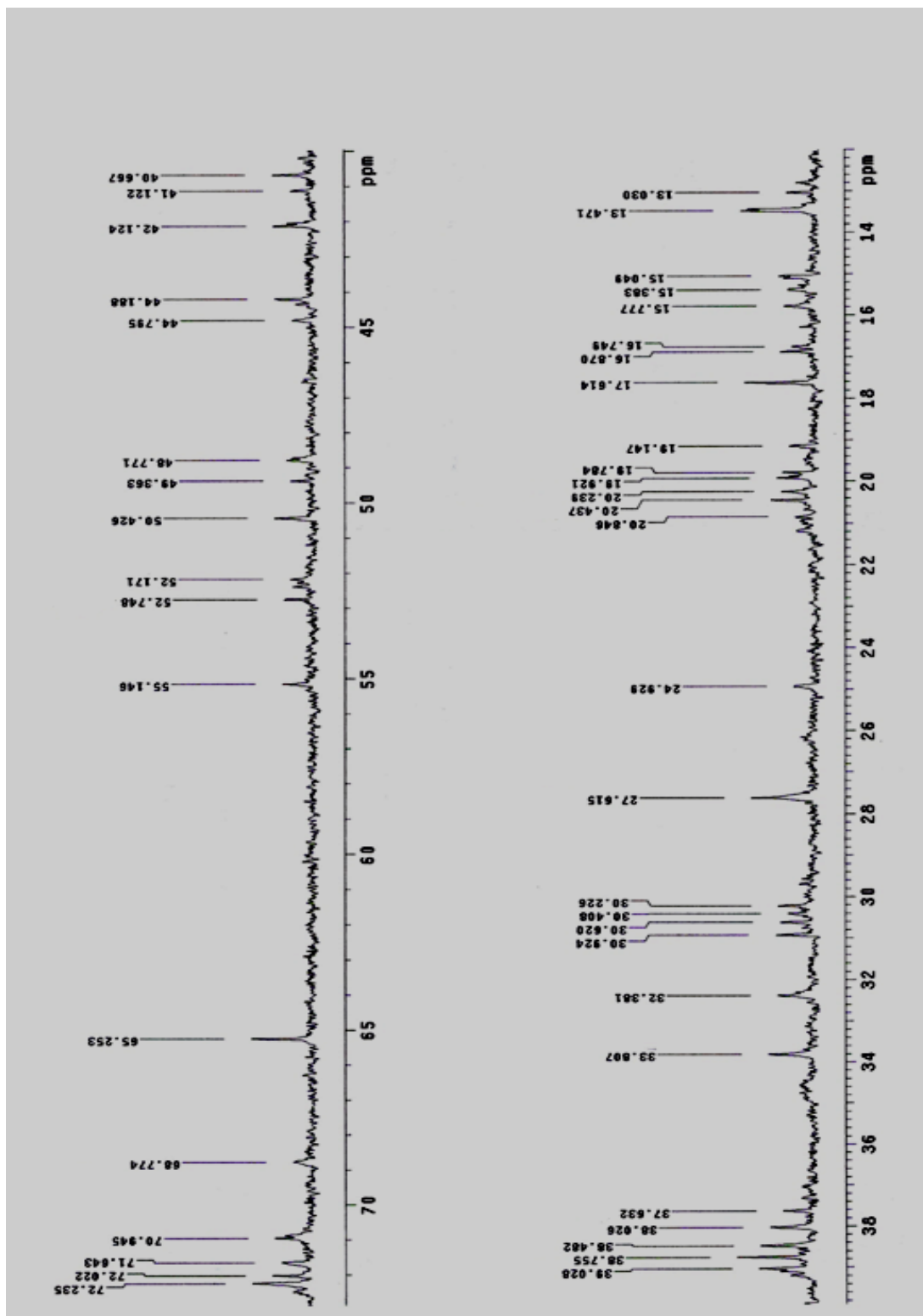


FIGURA 11: Expansão do Espectro de RMN ^{13}C de L_1 (CDCl_3 , 75 MHz)

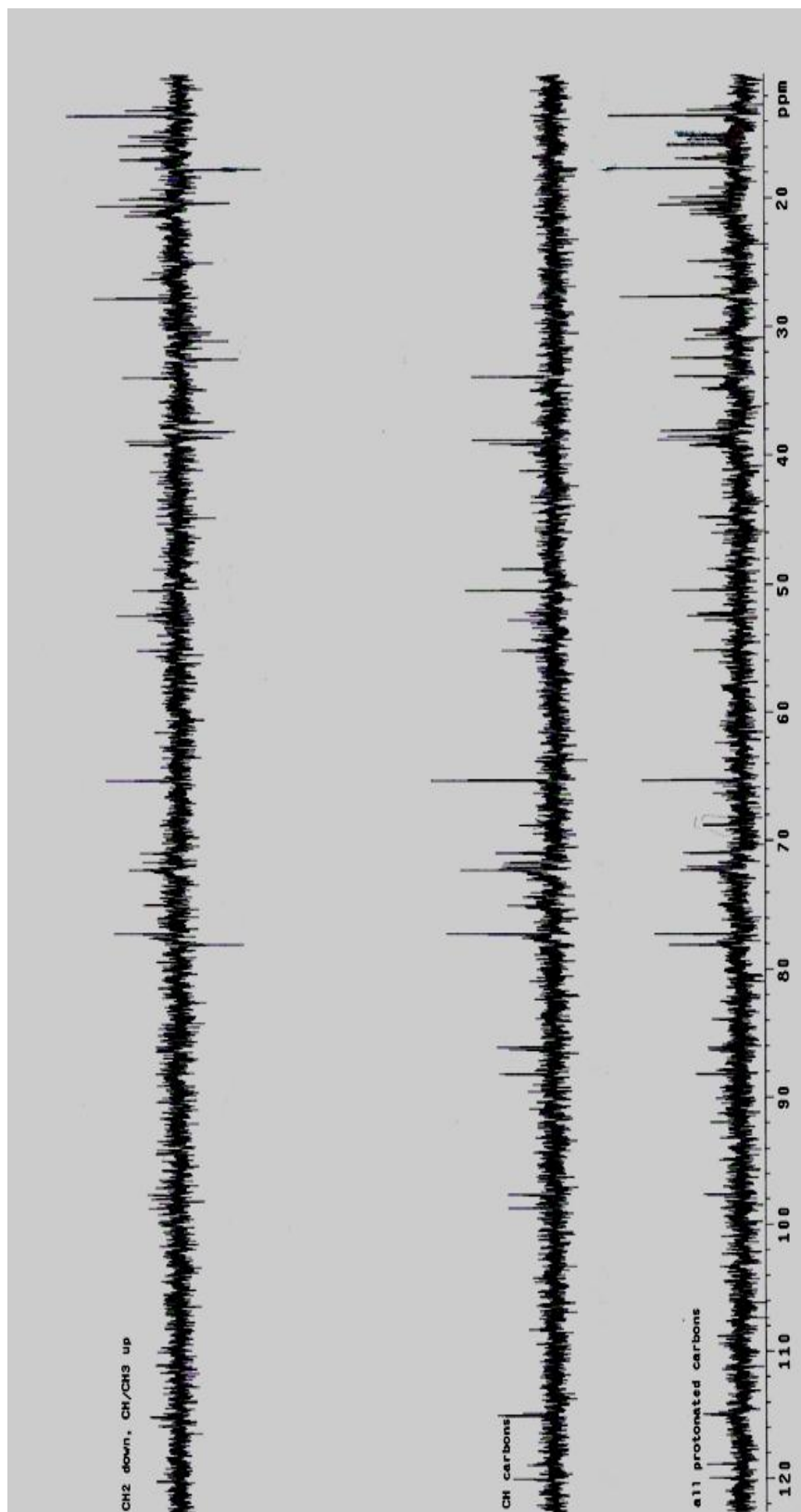


FIGURA 12: Espectro de DEPT ^{13}C de L_1 (CDCl_3 , 75 MHz)

A partir da interpretação desses conjuntos de sinais e análise dos espectros de RMN ^{13}C comparados com os dados da literatura (**Tabela 5, pág. 76**), foi possível confirmar a presença do limonóide pertencente ao grupo Meldenino substância L_1 .

TABELA 5: Dados espectrais de RMN ^{13}C para L_1 (CDCl_3 75 MHz).

C	δ_{C} de L_1	δ_{C} Lit. (FORIM, 2006; JARVIS, 1997) CDCl_3
1	37,6	38,1
2	32,3	32,6
3	219,5	217,7
4	N.O	46,3
5	47,7	47,7
6	72,0	72,2
7	72,3	73,3
8	44,1	44,5
9	39,1	39,7
10	39,0	38,1
11	15,7	16,0
12	32,3	32,3
13	48,7	47,1
14	159,6	160,1
15	119,9	120,4
16	34,7	34,3
17	50,4	51,5
18	20,4	20,4
19	16,7	16,3
20	130,2	130,2
21	169,4	145,3
22	78,3	77,0
23	98,7	-
28	30,9	31,1
29	19,1	19,4
30	24,9	25,4
AcO	169,4	170,2

N.O: Não Observado

5.2.2- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE L_2

A substância L_2 foi isolada por HPLC, da fração FrB obtida a partir do refractionamento do extrato hexânico das folhas de *Azadirachta indica*. A

determinação estrutural foi feita a partir de análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C bem como comparação com a literatura.

A definição da estrutura da substância L_2 também foi iniciada analisando os espectros de RMN ^1H a partir de sinais de hidrogênios característicos de limonóides. O espectro de RMN ^1H (**FIGURA 14, pág. 79**) mostrou sinais característicos de hidrogênios olefínicos, metilênicos e metílicos, levando a sugerir uma substância de esqueleto tetranortriterpênico, principalmente por ter sido observado, neste espectro, um número grande de sinais singletos na região de hidrogênios metílicos, seis no total, que podem ser atribuídos a sete metilas, sendo quatro ligadas à carbonos totalmente substituídos (δ_{H} 1,19; δ_{H} 1,06; δ_{H} 1,01 e δ_{H} 0,96) duas metilas ligadas a carbono olefínico totalmente substituído (δ_{H} 2,20 e δ_{H} 1,88) e uma metila (δ_{H} 1,96) de grupo acetato. A presença de dois hidrogênios metínicos ligados a carbonos oxigenados fica comprovada pela exibição de dois sinais tripletos em δ_{H} 4,90 ($J=3,0$ Hz) e δ_{H} 4,78 ($J=3,0$ Hz). Neste espectro observam-se também sinais duplo dupletos em δ_{H} 5,51 ($J=1,74$ e $3,0$ Hz); δ_{H} 4,14 ($J=3,3$ e $12,0$ Hz) e δ_{H} 4,12 ($J=3,3$ e $12,0$ Hz) integrando para 1H cada, caracterizando-os como um hidrogênio olefínico e dois hidrogênios metínicos ligados a carbono oxigenado respectivamente. Ainda no espectro observa-se um singlete largo em δ_{H} 5,68 integrando para 1H caracterizando um hidrogênio olefínico ligado a um carbono conjugado a carbonila de éster.

O espectro de RMN ^{13}C de L_2 (**FIGURAS 16 e 17, pág. 81 e 82**) quando assinalado em conjunto com o espectro de DEPT (**FIGURA 18, pág. 83**) permite relacionar 33 sinais de carbonos de esqueleto limonoídico, dos quais podemos destacar:

- Dois carbonos carbonílicos sendo um de acetato δ_{C} 170,46 e um de éster conjugado δ_{C} 165,67.
- Dois carbonos olefínicos não hidrogenados δ_{C} 160,42 e δ_{C} 157,43.
- Dois CH olefínicos δ_{C} 120,60 e δ_{C} 115,97.
- Quatro CH saturados oxigenados δ_{C} 77,42; 74,07; 73,02; 71,81 e 71,12.
- Três CH_2 saturados oxigenados δ_{C} 77,42; 64,22 e 60,74.
- Quatro C saturados não hidrogenados δ_{C} 46,63; 45,70; 42,24; 39,72.

- Quatro CH saturados δ_C 54,29; 39,77; 39,27 e 33,35.
- Cinco CH₂ alifáticos δ_C 34,77; 34,33; 33,12; 27,46 e 15,59.
- Sete CH₃ δ_C 27,63; 26,20; 20,46; 19,52; 19,86; 15,59; 15,42.

A análise do espectro de correlação COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (**FIGURA 15, pág. 80**) permitiu confirmar os acoplamentos entre os hidrogênios a 2J e 3J as quais podemos visualizar na **figura 13**, indicando as correlações mais relevantes:

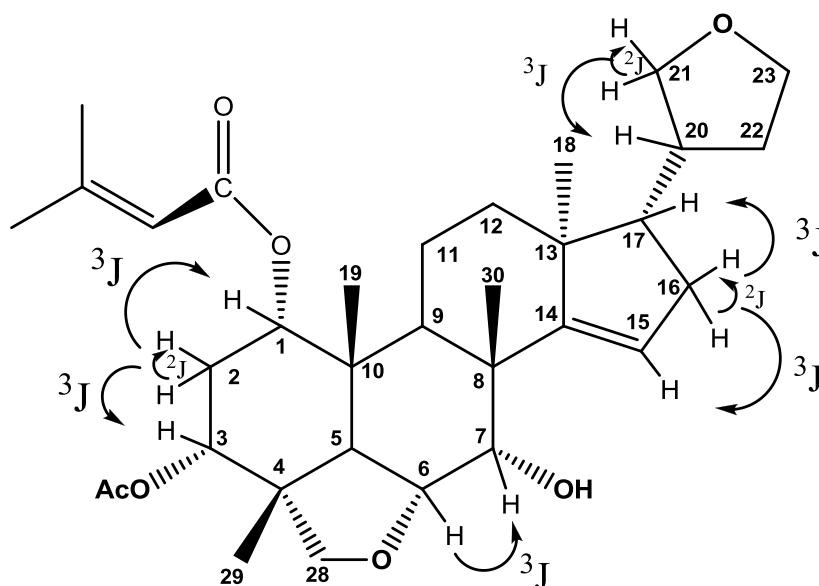


FIGURA 13: Correlações a duas e três ligações entre os hidrogênios de L₂.

Com as informações obtidas dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e por comparação com os dados citados na literatura (RAGASA, *et al.*, 1997) podemos concluir que L₂ é deoxiazadirachtolideo.

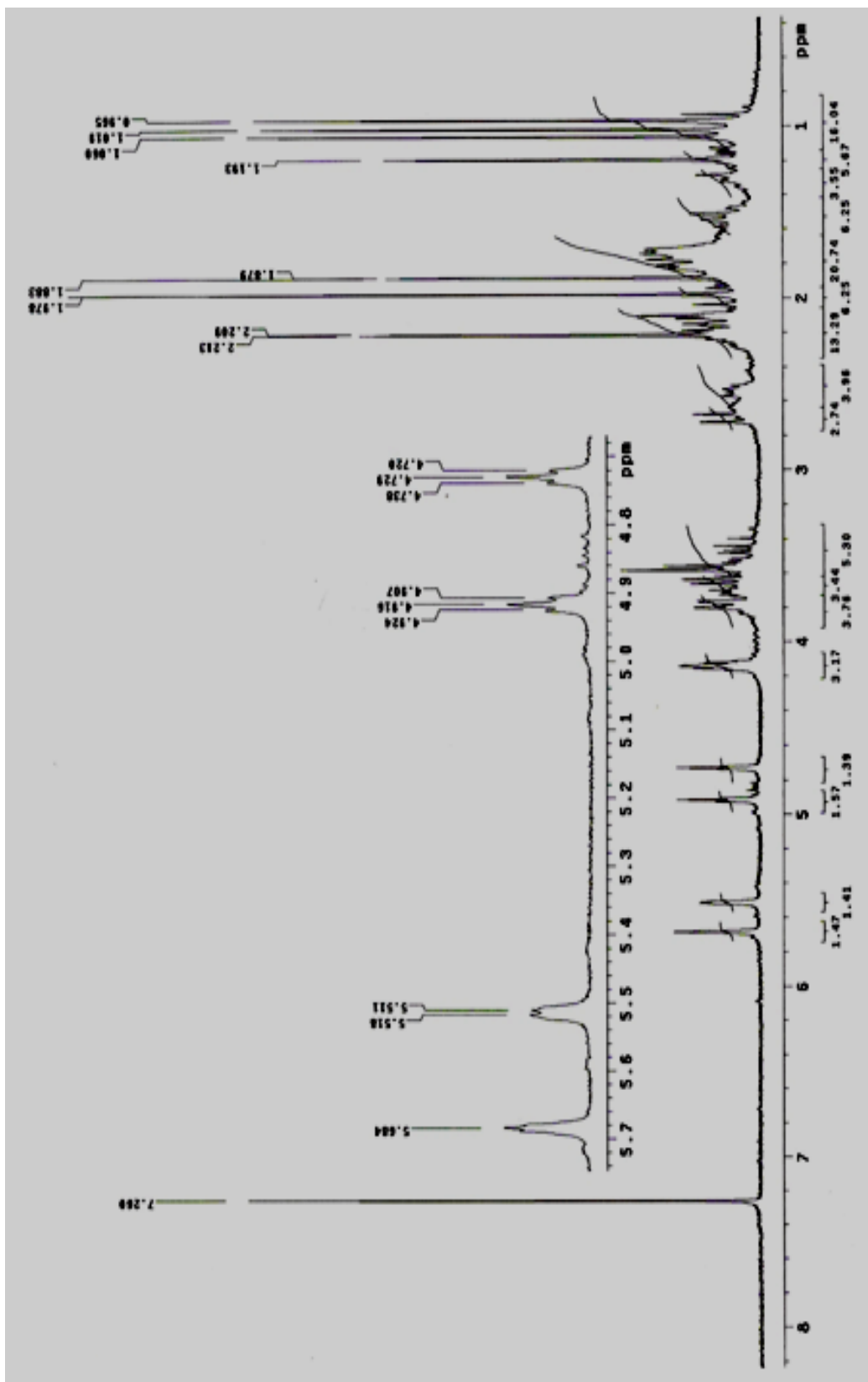


Figura 14: Espectro de RMN ^1H de L_2 (CDCl_3 , 300 MHz)

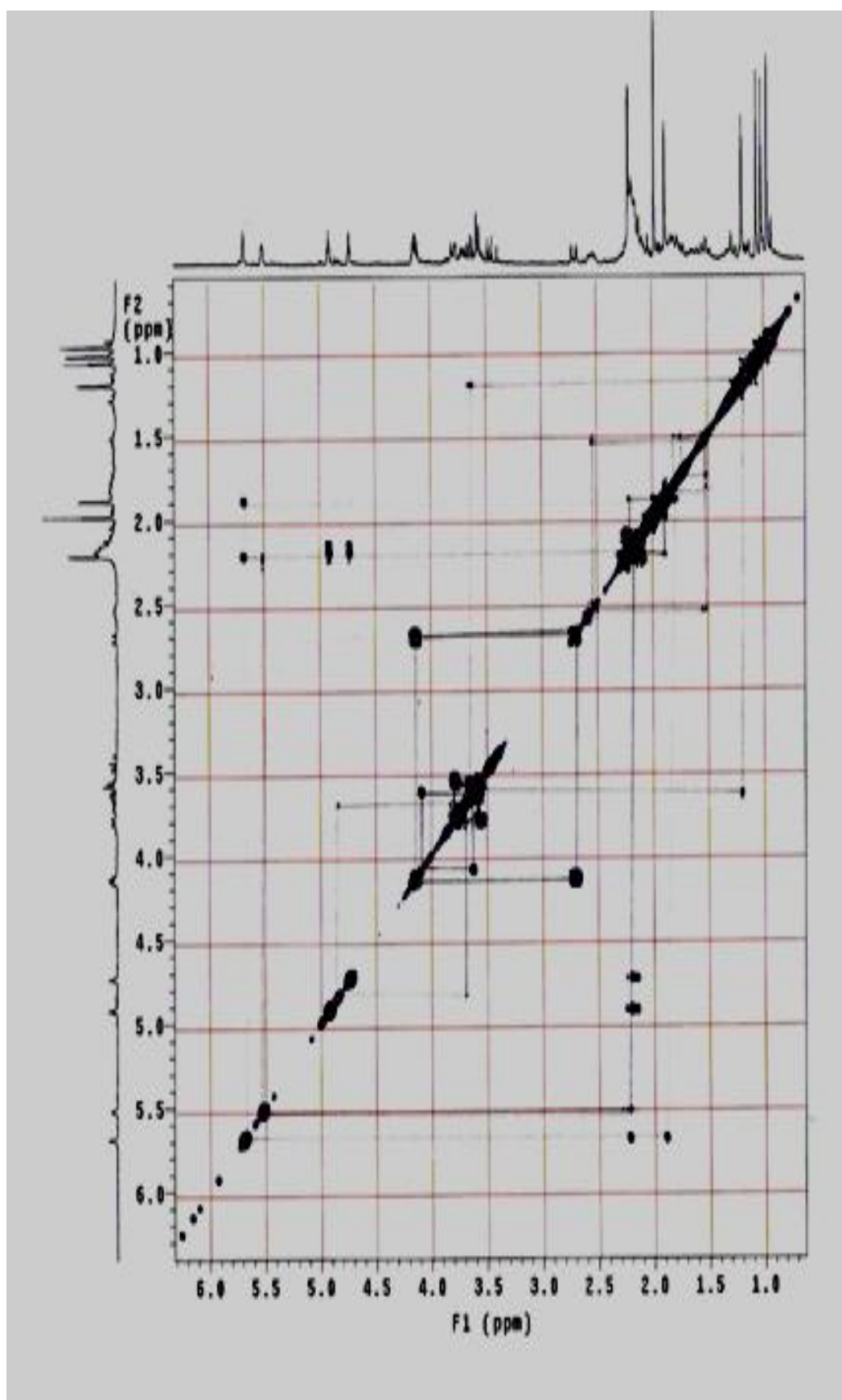


FIGURA 15: Espectro COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de L_2 (CDCl_3 , 300 MHz)

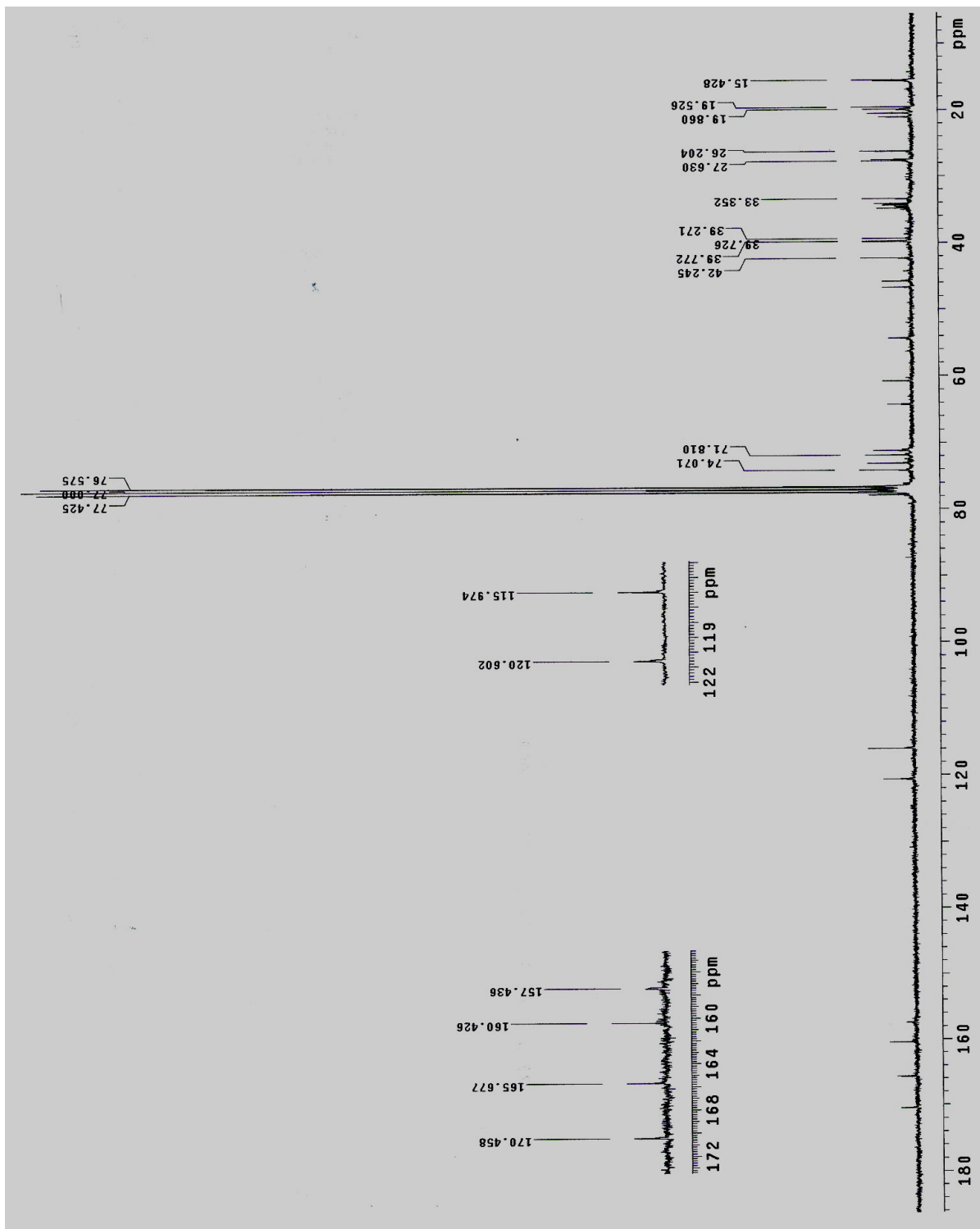


Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C de L_2 (CDCl_3 , 75 MHz) .

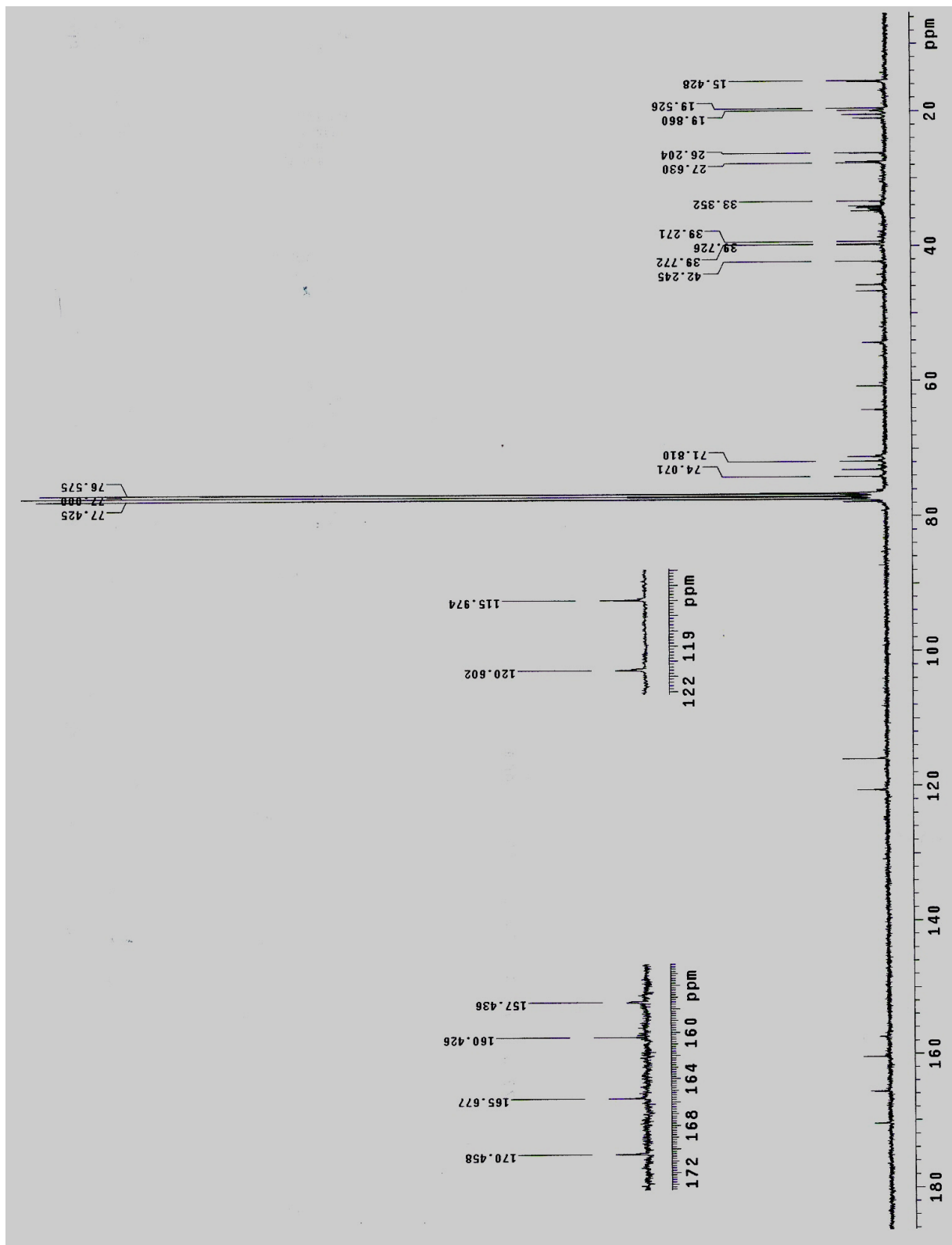


FIGURA 17: Expansão do Espectro de RMN ^{13}C de L_2 (CDCl_3 , 75 MHz).

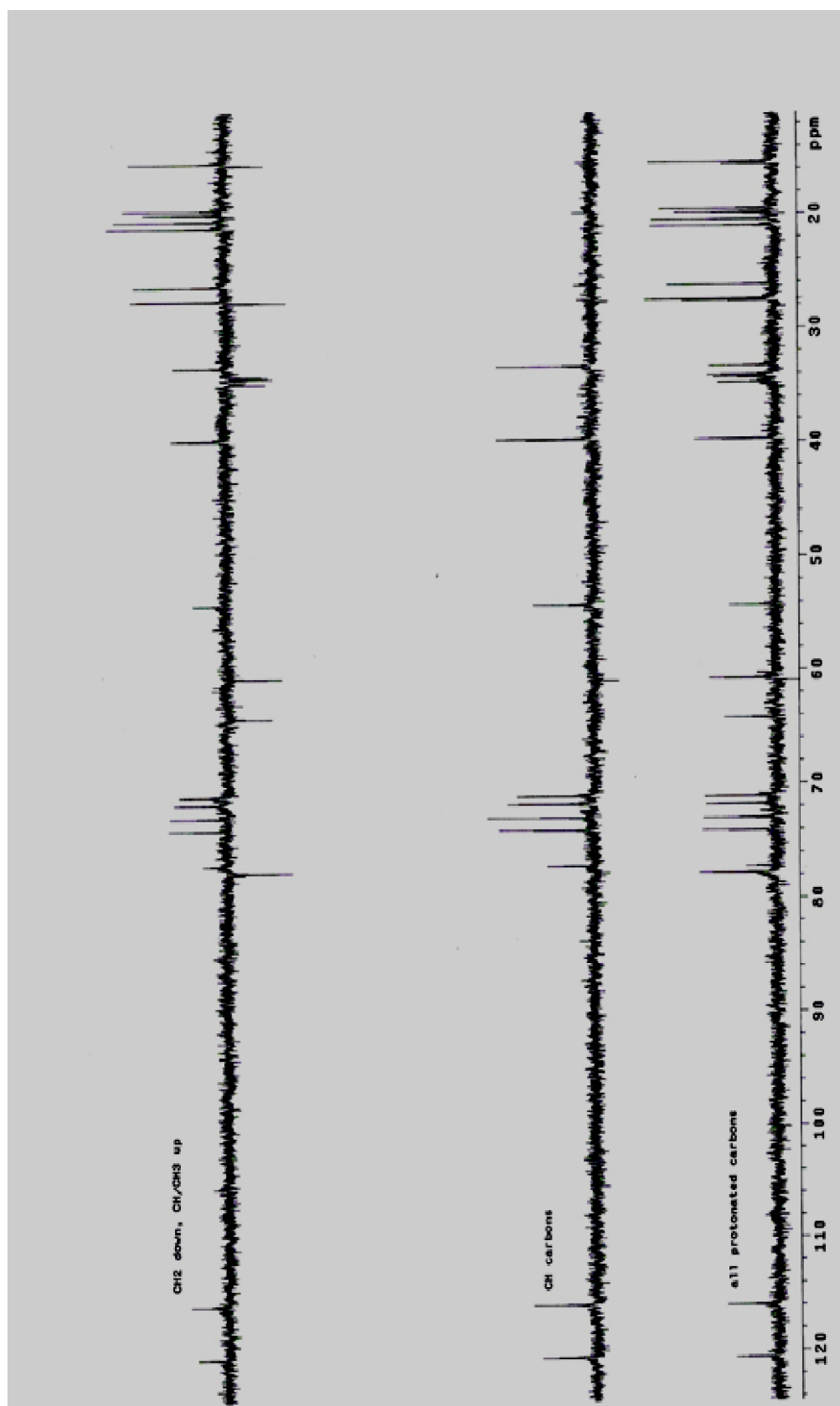


FIGURA 18: Espectro de DEPT de L₂ (CDCl₃, 75 MHz).

TABELA 6: Dados espectrais de RMN ^1H L₂ (CDCl₃, 300 MHz).

Hidrogênio	δ Literatura (RAGASA <i>et al.</i> , 1997)	δ L ₂
1	4,70 (t, 3.0 Hz)	4,72(t, 2.7 Hz)
2,2'	2,15 (m)	2,15(m)
3	4,90 (t, 3.0 Hz)	4,90(t, 2.7 Hz)
5	2,65 (m)	2,67(m)
6	4,11 (dd, 3.3,12 Hz)	4,12(dd, 3.0,10.2 Hz)
7	4,14 (s, br)	4,14(s, br)
9	1,65 (m)	1,64(m)
11,11'	1,38 (m), 1,55 (m)	1,35(m), 1,54(m)
12,12'	1,60 (m), 2,55(m)	1,61(m), 2,55(m)
15	5,50 (dd, 1.74, 3.0 Hz)	5,51(d, 2.1)
16	2,25 (m), 2.20 (m)	2,25(m), 2,18(m)
17	1,80 (m)	1,80(m)
18	1,0 (s)	1,01(s)
19	0,97 (s)	0,96(s)
20	2,70 (m)	2,69(m)
21,21'	4,14 (t,7.7Hz), 3,78(t, 7.7 Hz)	4,15(t,3.3Hz), 3,79(t,10.8 Hz)
22	2,25 (m), 2,52 (m)	2,26(m), 2,53(m)
23	3,45(m), 3,55(m)	3,46(m), 3,55(m)
28,28'	3,56 (d,7.6 Hz), 3,63 (d,7.6 Hz)	3,58(d,7.5 Hz), 3,63(d,7.8 Hz)
29	1,19 (s)	1, 19(s)
30	1,05 (s)	1,06(s)
1'	5,70 (s,br)	5,68(s)
2'	1,88 (s,br)	1,88(s)
3'	2,20 (s,br)	2,20(s)
OCH ₂ CH ₃	1,96 (s)	1,97(s)

TABELA 7: Dados espectrais de RMN ¹³ C para L₂ (CDCl₃, 75 MHz).

Posição do C	δ Literatura (RAGASA, et al., 1997)	δ L ₂
1	71,2	71,1
2	27,5	27,4
3	71,8	71,8
4	42,3	42,2
5	39,8	39,7
6	74,1	74,0
7	73,0	73,0
8	45,7	45,7
9	33,4	33,3
10	39,7	39,7
11	15,6	15,5
12	34,4	34,3
13	46,7	46,6
14	160,5	160,4
15	120,6	120,6
16	34,8	34,7
17	54,4	54,2
18	19,9	19,8
19	15,4	15,4
20	39,3	39,2
21	64,2	64,2
22	33,4	34,1
23	60,8	60,7
28	77,8	77,4
29	19,6	19,5
30	26,3	26,2
1'	165,7	165,6
2'	116,0	115,9
3'	157,5	157,4
4'	27,5	27,6
5'	20,5	20,4
OCH ₂ CH ₃	170,5	170,4
CH ₂	21,0	21,0

6- CONCLUSÕES

Os resultados realizados com os extratos Metanólicos das folhas de *Azadirachta indica* (Meliaceae), mostrou percentuais relevantes de inibição da fusariose, dados esses que motivaram a seleção dessa Meliaceae para estudo Fitoquímico e Fitopatógeno.

O extrato Metanólicos das folhas de *Azadirachta indica* foram fracionados e da fração **FrB** foram isoladas duas substâncias, sendo apenas 1 está em teste e pertencentes à classe dos limonóides (**L₁** e **L₂**). A substância que foi submetida a testes fitopatogênicos obtendo-se efeito inibitório em relação à fusariose quando avaliado in-vitro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBUQUERQUE, F.C.; CONDURÚ, J. M. P.: **Cultura da pimenta-do-reino na região amazônica.** Belém: IPEAN, 1971. 149 p. (IPEAN, Fitotecnia, v.2, n.3).

ALBUQUERQUE, F.C.; DUARTE, M. L.R.; NUNES, A. M. L.; STEIN, R. L. B.; OLIVEIRA, R.P.: **Comportamento do germoplasma de Pimenta-Do-Reino em áreas de ocorrência de fusariose no estado do Pará. Anais do Seminário Internacional sobre a pimenta-do-reino e cupuaçú, 1, 1996, Belém, Pará.** Embrapa Amazônia Oriental/Jica, 1997, 440 p., (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89)

ANDO, A.; ALBUQUERQUE, F. C.; POLTRONIERI, M. C.; NETO, A. T.: **Obtenção de mutantes resistentes à fusariose (*Fusarium solani f. sp. piperis*) em pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*) através de irradiação gama.** Seminário Internacional sobre pimenta-do-reino e cupuaçú, 1., 1996, Belém, PA. Anais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/Jica, 1997. 440 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).

ARAÚJO, L.V.C.: **Características Físico-químicas e Energéticas da Madeira de Nim Indiano.** Scientia Forestalis, 57, 2000, 153-159.

ASCHER, K.R.S.; SCHMUTTERER, H.: **Natural Pesticides from the Neem Tree (*Azadirachta indica A. Juss*) and other Tropical Plants.** Proceedings of the Third International Neem Conference, Nairobi, Kenya, 1986.

BETTIOL, W.: **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna: Embrapa – CNPDA, 1991. 338 p. (EMBRAPA – CNPDA. Documentos, 15).

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D.: **Laboratory manual for Fusarium research,** Sydney, University of Sydney, 1994.

CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E.P.R.; SILVA, I.O.: **Ocorrência de *Fusarium f. sp.* em *Piper Nigrum* no estado de Alagoas.** Summa Phytopathol, Botucatu, v. 33, n.1, p. 96-97, 2007.

CAVALCANTE, M. J. B.: **Sistema de Produção da Pimenteira-do-Reino. Cultivo da Pimenta-do-Reino na Região Norte.** Pará: EMBRAPA, 2005. Disponível em: <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenteira-doReino/index.htm>. Acesso em Julho de 2009.

DE SANTANA, A.C.; DA COSTA, R.M.Q. E SOUZA, R.F.: Comercialização da pimenta-do-reino no Mercado interno, Seminário Internacional sobre Pimenta-do-reino e cupuaçú, 1996, Belém – Pará.

DEWICK, P.M.: Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. John Wiley& Sons. Chichester: 1998. 464 p.

DUARTE, M. DE L. R. & ALBUQUERQUE, S.A.: Produção de toxinas em vitro por *Fusarium solani* f. SP. *piperis*, Relatório Técnico da EMBRAPA Amazônia Oriental, 1999.

FERNANDES, C. F.: Importância da Fitologia. EMBRAPA, 2005. Disponível em: <http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php>. Acessado em Dezembro de 2009.

FORIM, M. R.: Estudo Fitoquímico do Enxerto de *Azadirachta indica* sobre a *Melia azadirach*: Quantificação de substâncias Inseticidas. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química. (2006). Tese de Doutorado.

FORTES, N. L.P.: Taxonomia e Identificação de *Fusarium sp.* Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia. Departamento de Ciências Agrárias. Taubaté, São Paulo.

GOVINDACHARI, T.R.: GOPALAKRISHNAN, G. 13,14-Desepoxyazadirachtin- A, A Tetranortriterpenoid from *Azadirachta indica*, *Phytochemistry*, 45 (2), 1997, 397 – 399.

GOUVÊA, C. F.: Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas da família Meliaceae. 2005. 101 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

GOVINDACHARI, T.R.; MALATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, G.; SURESH, G.; RAJAN, S.S.: – Isolation of a new tetranortriterpenoid from the uncrushed green leaves of *Azadirachta indica*, *Phytochemistry*, 52, 1999, 1117 – 1119.

KIMATI, H.; GIMENEZ – FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W.: Guia de Fungicidas Agrícolas – Recomendações por cultura, vol. 1, 2ª Ed. Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia.

KRUPPA, P. C.; RUSSOMANNO, O.M.: Fungos em Palntas Medicinais, Aromáticas e Condimentares- solo e semente. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. São Paulo, número 93, 2008.

KUMAR, Ch. S.S.R.; SRINIVAS, M. and YAKKUNDI, S.: Limonoids from the Seeds of *Azadirachta indica* – Phytochemistry, 43 (2), 1996, 451 – 455.

LEMOS, O. F.: Mutagênese e Tecnologia in vitro no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003. 159 Páginas. Tese de doutorado.

Manual de Segurança e Qualidade para a cultura da pimenta-do-reino- Brasília, DF: Campo PAS, 2004. 65 p.- (Série qualidade e segurança dos alimentos).

MOSSINI, S. A. G., KEMMELMEIER. A árvore Nim (*Azadirachta indica A. Juss*): Múltiplos usos. Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica. Acta Farm. Bonaerense 24 (1): 139- 48 (2005).

NAGL, G.; PÖHNL, H.; SADLO, H.; VOGLER, B. Structure Determination by NMR of Azadirachtin and Related Compounds from *Azadirachta indica A. Juss* of *Azadirachta indica*. Phytochemistry, 43(2), 1996, 451-455.

NAKATANI, M.; SHIMOKORO, M.; ZHOU, J.B.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K.; NAKAYAMA, N. AND NAOKI, H. - Limonoids from *Melia toosendan*, Phytochemistry, 52 (4), 1999, 709-714.

OKAJIMA, H.: Colheita, Produção, Beneficiamento e Mercado Externo da Pimenta-Do-Reino. Anais do Seminário Internacional sobre a pimenta-do-reino e cupuaçu, 1996. Embrapa Amazônia Oriental. 440 p.

RAGASA,C.Y; NACPIL.D.ZENaida; NATIVIDAD.G.M; TADA, M. – Tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. Phytochemistry, 46, n° 3, 1997, 555 – 558.

RAMJI, N.; VENKATAKRISHNAN, K.; MADYASTHA, K.M. 11-Epi-azadirachtin D: an Epimeric Azadirachtin Analogue from *Azadirachta indica*. Phytochemistry,49 (1), 1998, 265-267.

SANTANA, A.C.; COSTA, R.M.Q da; SOUZA, R.F.- Comercialização da Pimenta-do-Reino no mercado interno. Seminário Internacional sobre pimenta-do-reino e cupuaçu, 1., 1996, Belém, PA. Anais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/Jica, 1997. 440 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).

SCHWAN – ESTRADA, K. R.F.; STANGARLIN, J.R.; Cruz, M. E. S. – Uso de Extratos Vegetais no Controle de Fungos Fitopatogênicos. Floresta, 1-2 (30), 129 – 137. 2000.

SIDDIQUI, B. S.; AFSHAN, F.; GULZAR, T.; HANIF, M. – Tetracyclic Triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica* – Phytochemistry, 65, 2004, 2363 – 2367.

SIDDIQUI, B.S.; GHASUDDIN; FAIZI, S. Tetracyclic Triterpenoids of the Fruit Coats of *Azadirachta indica* – Phytochemistry, 47 (8), 1998, 1631-1636.

SIDDIQUI, B.S.; RASHEED, M.; GHASUDDIN; FAIZI. S.; NAQVI, S.N.H.; TARIQ, R.M. – Three New Triterpenoids from *Azadirachta* and Biologically Active Triterpenoids of Biogenetic Interest from the Fresh Fruit coats of *Azadirachta indica* – Tetrahedron 56, 2000, 3547 – 3551.

SIDDIQUI, S.; MAHMOOD, T.; SIDDIQUI, B.S.; FAIZI, S. - Tricycle Diterpenoids From The Stem Bark Of *Azadirachta indica*. Journal of Natural Products, 51 (6), 1988, 1054

SIDDIQUI, S.; MAHMOOD, T.; SIDDIQUI, B.S.; FAIZI, S. - Two New Tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica* – Journal of Natural Products, 49 (6), 1986, 1068 -1073.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI. B.S. ; GHASUDDIN ; FAIZI, S. - Tetracyclic Triterpenoids and Their Derivatives from *Azadirachta indica*, Journal of Natural Products, 51 (1), 1988, 30-43.

SILVA, M.N., Tese de Doutorado - Estudo Fitoquímico de *Swietenia macrophylla*: uma contribuição ao controle Dan broca do mogno , UFSCar – São Carlos – SP, 2006.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC Method Development. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 765 pp., 1997.

TARIQ, R.M. Biologically Active Triterpenoids of Biogenetic Interest from the Tetranortriterpenoid from *Azadirachta indica*. Journal of Natural Products., 49(6), 1986, 1068.

XIAODONG LUO, YUNBAO MA, SHAOHUA WU, DAGANG WU. Two Novel Azadirachtin Derivatives from *Azadirachta indica*. Journal of Natural Products, 62, 1999, 1022-1024.

ZADOCKS, J. C. Modern plant protection. Developments and perspectives. In: Zambolim, L.; VALE, F. X. R. (Ed.). Palestras do XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Fitopatologia Brasileira, 16-26 p., 1997.

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](#)