



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo Químico de Microorganismos Associados a
Khaya ivorensis (Meliaceae)**

Sebastião da Cruz Silva^{*}

Tese apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Química como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
DOUTOR EM QUÍMICA (área: QUÍMICA
ORGÂNICA)

Orientadora: Profa . Dra. Maria Fátima das G. F. da Silva

^{*}Bolsista FAPESP

São Carlos - SP

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

S586eq

Silva, Sebastião da Cruz.

Estudo químico de microorganismo associados a *Khaya ivorensis* (MELIACEAE) / Sebastião da Cruz Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
219 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Produtos naturais. 2. *Botryosphaeria rhodina*. 3. *Khaya ivorensis*. 4. Lasiodiplodina. I. Título.

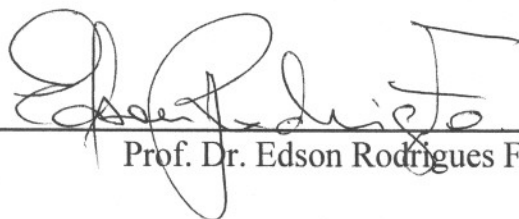
CDD: 547.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

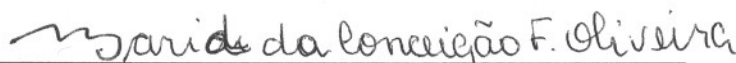
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Sebastião da Cruz Silva** realizado em 23 de novembro de 2007:*



Profa. Dra. Maria Fatima das G. F. da Silva



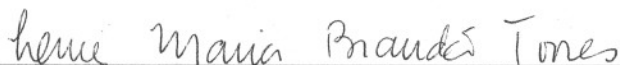
Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira



Profa. Dra. Paulete Romoff



Profa. Dra. Luce Maria Brandão Torres

Dedico este trabalho a minha mãe Jacira da Cruz Silva, aos meus irmãos e irmãs e aos meus sobrinhos, que sempre me incentivaram na busca desta nova conquista, a vocês minha eterna gratidão.

A minha noiva Simone Simote pelo amor e paciência.

Agradecimentos

A Deus, a fonte de tudo

A Profa. Dra. Maria Fátima das G. F. da Silva, pela amizade, orientação e ensinamentos repassados durante o desenvolvimento deste trabalho

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pela amizade e co-orientação prestada durante a realização deste trabalho, pelo suporte e por estar constantemente presente sempre que solicitado

Ao Prof. Dr. Manfred Willy Müller, pelo material cedido para estudo e por mostrar-se sempre disposto a ajudar

Aos Profs. Do laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Dr. Paulo César Vieira e Dr. João Batista Fernandes, pelos ensinamentos e colaboração

À Bióloga Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza, pelas identificações das linhagens dos fungos

À aluna de Doutorado Bianca Ferreira e a aluna de mestrado Luciana, pela ajuda nas análises de LC/MS

Ao aluno de Doutorado Thiago A. Moura Veiga, pelos ensaios sobre síntese de ATP

Ao demais Professores do Departamento de Química da UFSCar, especialmente aos Prof. Dr. Gilberto Ferreira pelos ensinamentos e Prof. Dr. Alzir pela disponibilização de equipamentos

Aos Técnicos Waldir, Paulo, Doraí e em especial a Luciana Vizoto, pela paciência na elaboração dos espectros de RMN

Aos amigos dos laboratórios de Síntese, HPLC, RMN, LaBioMi e Inorgânica, pela amizade e ajuda

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em química da UFSCar: Ariane, Cristina e Luciane

Aos amigos do laboratório de química de Produtos Naturais da UFSCar, pela amizade, troca de experiência e convivência agradável

Aos amigos de Belém do Pará (Adriano, Edson e Joana), pela amizade e convivência que ajudam amenizar a saudade da terrinha

Aos amigos distantes de Belém do Pará, porém sempre lembrados

À minha mãe Jacira, por sempre me guiar o caminho certo, pelo enorme carinho e amor...

Aos meus irmãos e sobrinhos, pelo imenso apoio e amizade que nos unem

À Família Simote em especial a minha noiva Simone Simote, pelo carinho, companheirismo, amor e paciência dado durante a elaboração deste trabalho

À FAPESP, pela bolsa concedida

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTAS DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>dt</i>	Duplo tripleto
δ	Deslocamento químico em parte por milhão
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μm	Micrometro
μm	Micrometro
Ac.	Acetato
AcOEt	Acetato de Etila
ADP	Adenosina difosfato
APCI	
atm	Atmosfera
ATP	Adenosina trifosfato
ATPS	Ácido <i>p</i> -toluilsulfônico
BDA	Batata dextrose agar
CC	Cromatografia Em Coluna
CCDP	Cromatografia Em Camada Delgada Preparativa
CEPLAC	Centro de Pesquisa da Lavoura do Cacau
CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
CNA	Cenoura-Agar
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetil sulfoxido
ES	Electrospray Ionization
ESOMI	Estação Experimental Sosthenes de Miranda
Et	Etila
Fig.	Figura
g	Gramas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSCCC	High-speed Counter Current Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz	Hertz
IE	Impacto Eletrônico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass spectrometry
<i>m</i>	Multiplete
M^+	Pico do íon molecular
<i>m/z</i>	Relação massa carga
Me	Metila
mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
min.	Minuto
MK	Meio <i>Khaya</i>
mL	Mililitro
mmol/L	Milimol por litro
MV	Metilviologênio
nm	Nanômetro
pág.	Pagina
PCR	Reação de cadeia em polimerase
PENDANT	Polarization Enhancement Nurtured During Attached Nucleus Testing
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>qd</i>	Quarteto duplo
<i>qd</i>	Quarteto duplo
RDA	Retro Diels-Alder
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear De Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucléico
SAB	Saborould
SAM	S-adenosil metionina
Tab.	Tabela

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1:	“Triângulo da Doença”	2
Figura 1.2:	Interação entre a Planta e o Patógeno	4
Figura 1.3:	Morte do Caule causado por <i>Botryosphaeria rhodina</i>	11
Figura 1.4:	<i>Khaya ivorensis</i> atacada por fungo	19
Figura 1.5:	Evolução da doença na fase inicial, fase intermediária e fase avançada (CEPLAC/ESOMI)	20
Figura 1.6:	Aspecto da doença, na fase final, antes da indução da brotação das gemas basais (A) e mais tarde quando as lesões já conseguem atingir todo o perímetro do caule provocando um anelamento e induzindo a brotação de gemas basais (B) (CEPLAC/ESOMI)	20
Figura 3.1:	Material Coletado (plantio junho/99)	26
Figura 3.2:	Esquema de assepsia	29
Figura 3.3:	Esquema de Inoculação dos fragmentos do caule em placas de petri	29
Figura 3.4:	Experimento de Biotransformação com o fungo <i>B. rhodina</i>	45
Figura 4.1:	Placas de Petri com o isolamento dos microorganismos de <i>K. ivorensis</i>	50
Figura 4.2:	Microcultivo do Fungo <i>Pestalotiopsis sp.</i> crescido em BDA	53
Figura 4.3:	Microfotografias do fungo <i>Pestalotiopsis sp.</i>	53
Figura 4.4:	Microcultivo do Fungo <i>Phomopsis sp.</i>	54
Figura 4.5:	Microfotografias dos conídios do Fungo <i>Botryosphaeria sp.</i>	55
Figura 4.6:	Microcultivo do Fungo <i>Botryosphaeria sp.</i>	56
Figura 4.7:	Microcultivo do Fungo <i>Rhizopus sp.</i>	57
Figura 4.8:	Microfotografias do Fungo <i>Rhizopus sp.</i>	57
Figura 4.9:	Microcultivo do Fungo <i>Penicillium sp.</i>	58
Figura 4.10:	Microfotografias do Fungo <i>Penicillium sp.</i>	58
Figura 4.11:	Espectro de Massas de S1 (APCI ⁺)	74

Figura 4.12:	Espectro de Massas de S2 (APCI ⁺)	74
Figura 4.13:	Espectro de RMN ¹ H de S1	78
Figura 4.14:	Expansão do espectro de RMN ¹ H de S1	78
Figura 4.15:	Espectro de RMN ¹³ C de S1	79
Figura 4.16:	Expansão do espectro de RMN ¹³ C de S1	79
Figura 4.17:	Espectro de COSY de S1	80
Figura 4.18:	Mapa de contorno de HSQC de S1	80
Figura 4.19:	Mapa de contorno de HMBC de S1	81
Figura 4.20:	Expansão do mapa de contorno de HMBC de S1	81
Figura 4.21:	Expansão do mapa de contorno de HMBC de S1	82
Figura 4.22:	Espectro de RMN ¹ H de S2	82
Figura 4.23:	Expansão do espectro de RMN ¹ H de S2	83
Figura 4.24:	Espectro de RMN ¹³ C de S2	83
Figura 4.25:	Espectro de RMN ¹³ C – PENDANT de S2	84
Figura 4.26:	Espectro de COSY de S2	84
Figura 4.27:	Mapa de contorno de HSQC de S2	85
Figura 4.28:	Mapa de contorno de HMBC de S2	85
Figura 4.29:	Espectro de RMN ¹ H de S3a e S3b	91
Figura 4.30:	Expansão do espectro de RMN ¹ H de S3a e S3b	91
Figura 4.31:	Espectro de RMN ¹³ C de S3a e S3b	92
Figura 4.32:	Espectro de COSY ¹ H – ¹ H de S3a e S3b	92
Figura 4.33:	Mapa de contorno de HSQC de S3a e S3b	93
Figura 4.34:	Mapa de contorno de HMBC de S3a e S3b	93
Figura 4.35:	Expansão do mapa de contorno de HMBC de S3a e S3b	94
Figura 4.36:	Expansão do mapa de contorno de HMBC de S3a e S3b	94
Figura 4.37:	Espectro de massas da mistura de S4 e S5	99
Figura 4.38:	Espectro de massas íons filhos do m/z 183,1	100
Figura 4.39:	Espectro de massas de S4	100
Figura 4.40:	Espectro de massas íons filhos do m/z 185,2	101
Figura 4.41:	Espectro de RMN ¹ H de S4	105
Figura 4.42:	Espectro de RMN ¹ H de S4-S5	105
Figura 4.43:	Espectro de RMN ¹³ C de S4	106

Figura 4.44:	Espectro de RMN ^{13}C de S4-S5	106
Figura 4.45:	Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de S4	107
Figura 4.46:	Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de S4-S5	107
Figura 4.47:	Mapa de contorno de HSQC de S4	108
Figura 4.48:	Mapa de contorno de HSQC de S4-S5	108
Figura 4.49:	Mapa de contorno de HMBC de S4	109
Figura 4.50:	Mapa de contorno de HMBC de S4-S5	109
Figura 4.51:	Espectro de RMN ^1H de S6	115
Figura 4.52:	Expansão do espectro de RMN ^1H de S6	115
Figura 4.53:	Expansão do espectro de RMN ^1H de S6	116
Figura 4.54:	Espectro de RMN ^{13}C de S6	116
Figura 4.55:	Espectro de RMN ^{13}C – PENDANT de S6	117
Figura 4.56:	Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de S6	117
Figura 4.57:	Mapa de contorno de HSQC de S6	118
Figura 4.58:	Mapa de contorno de HMBC de S6	118
Figura 4.59:	Expansão do mapa de contorno de HMBC de S6	119
Figura 4.60:	Expansão do mapa de contorno de HMBC de S6	119
Figura 4.61:	Espectro de CG/MS de S7	124
Figura 4.62:	Espectro de RMN ^1H de S7	124
Figura 4.63:	Espectro de RMN ^1H de S7	124
Figura 4.64:	Espectro de RMN ^1H de S8	127
Figura 4.65:	Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de S8	127
Figura 4.66:	Mapa de contorno de HSQC de S8	128
Figura 4.67:	Mapa de contorno de HMBC de S8	128
Figura 4.68:	Espectro de RMN ^1H de S9	136
Figura 4.69:	Espectro de RMN ^1H de S10	136
Figura 4.70:	Espectro de RMN ^{13}C de S9	137
Figura 4.71:	Espectro de RMN ^{13}C de S10	137
Figura 4.72:	Espectro de CG/MS de S9	137
Figura 4.73:	Espectro de RMN ^1H de S11A, S11b e S11C	140
Figura 4.74:	Espectro de RMN ^{13}C de S11A, S11B e S11C	140
Figura 4.75:	Espectro de RMN ^1H de S12	142
Figura 4.76:	Expansão do espectro de RMN ^1H de S12	143
Figura 4.77:	Espectro de RMN ^1H de S12	143

Figura 4.78:	Expansão do espectro de RMN ¹ H de S12	144
Figura 4.79:	Espectro de RMN ¹³ C de S12	144
Figura 4.80:	Espectro de RMN ¹ H de S13	147
Figura 4.81:	Expansão do espectro de RMN ¹ H de S13	147
Figura 4.82:	Espectro de RMN ¹³ C de S13	148
Figura 4.83:	Espectro de RMN ¹ H de S14	148
Figura 4.84:	Espectro de RMN ¹ H de S15	150
Figura 4.85:	Espectro de RMN ¹ H de S15 acetilado	150
Figura 4.86:	Espectro de RMN ¹³ C - PENDANT de S15	151
Figura 4.87:	Espectro de RMN ¹³ C de S15 acetilado	151
Figura 4.88:	Espectro de RMN ¹ H de S16	152
Figura 4.89:	Padrões de limonóides utilizados neste trabalho	163
Figura 4.90:	Espectro de massas (APCI ⁺) do 7-desacetoxi-7-oxogedunina (P1)	165
Figura 4.91:	Espectro de massas (APCI ⁺), íons filho de <i>m/z</i> 439 do 7-desacetoxi-7-oxogedunina (P1)	165
Figura 4.92:	Proposta de fragmentação para o 7-desacetoxi-7-oxogedunina (P1)	166
Figura 4.93:	Espectro de massas (APCI ⁺) do 7-desacetil gedunina (P2)	166
Figura 4.94:	Espectro de massas (APCI ⁺), íons filhos de <i>m/z</i> 441 do 7-desacetil gedunina (P2)	167
Figura 4.95:	Proposta de fragmentação para o 7-desacetil gedunina (P2)	167
Figura 4.96:	Espectro de massas (APCI ⁺) do Angolensato de metila (P3)	168
Figura 4.97:	Espectro de massas (APCI ⁺), íons filhos de <i>m/z</i> 471 do Angolensato de metila (P3)	168
Figura 4.98:	Proposta de fragmentação para o Angolensato de metila (P3)	169
Figura 4.99:	Espectro de massas (APCI ⁺) do Mexicanolídeo (P4)	170
Figura 4.100:	Espectro de massas (APCI ⁺), íons filhos de <i>m/z</i> 469 do Mexicanolídeo (P4)	170
Figura 4.101:	Proposta de fragmentação para o mexicanolídeo	171

(P4)

- Figura 4.102: Espectro de massas (APCI⁺) do 1 α ,6,8 α ,14 β ,30 β - 172
pentahidroxi-3-oxo-[3.3.1^{10,2}.1^{1,4}]-triciclomeliac-7-
oato de metila (**P5**)
- Figura 4.103: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 517 172
[M-H₂O] do 1 α ,6,8 α ,14 β ,30 β -pentahidroxi-3-oxo-
[3.3.1^{10,2}.1^{1,4}]-triciclomeliac-7-oato de metila (**P5**)
- Figura 4.104: Proposta de fragmentação para o 1 α ,6,8 α ,14 β ,30 β - 173
pentahidroxi-3-oxo-[3.3.1^{10,2}.1^{1,4}]-triciclomeliac-7-
oato de metila (**P5**)
- Figura 4.105: Espectro de massas (APCI⁺) do 8 β -hidroxicarapina 174
3,8-hemiacetal (**P6**)
- Figura 4.106: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 485 174
do 8 β -hidroxicarapina 3,8-hemiacetal (**P6**)
- Figura 4.107: Proposta de fragmentação para o 8 β -hidroxicarapina 175
3,8-hemiacetal (**P6**)
- Figura 4.108: Espectro de massas (APCI⁺) do 2,14-epoxi-1 α ,6,8 α - 176
triidroxi-3-oxo-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-triciclomeliac-7-oato de
metila (**P7**)
- Figura 4.109: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 517 176
do 2,14-epoxi-1 α ,6,8 α -triidroxi-3-oxo-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-
triciclomeliac-7-oato de metila (**P7**)
- Figura 4.110: Proposta de fragmentação para o 2,14-epoxi- 177
1 α ,6,8 α -triidroxi-3-oxo-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-triciclomeliac-
7-oato de metila (**P7**)
- Figura 4.111: Espectro de massas (APCI⁺) do 1 α ,2 β ,3 α ,6,8 α ,14 β - 178
hexahidroxi-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-triciclo-meliac-7-oato de
metila (**P7B**)
- Figura 4.112: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 519 178
[M-H₂O] do 1 α ,2 β ,3 α ,6,8 α ,14 β -hexahidroxi-
[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-triciclo-meliac-7-oato de metila (**P7B**)
- Figura 4.113: Proposta de fragmentação para o 179
1 α ,2 β ,3 α ,6,8 α ,14 β -hexahidroxi-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-

- tríciclo-meliac-7-oato de metila (**P7B**)
- Figura 4.114: Espectro de massas (APCI⁺) do 6- 180
hidroxiangolensato de metila (**P8**)
- Figura 4.115: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 487 180
do 6-hidroxiangolensato de metila (**P8**)
- Figura 4.116: Proposta de fragmentação para o 6- 181
hidroxiangolensato de metila (**P8**)
- Figura 4.117: Espectro de massas (APCI⁺) do Acetato de sapelina 182
E (**P9**)
- Figura 4.118: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 529 182
do Acetato de sapelina E (**P9**)
- Figura 4.119: Proposta de fragmentação para o Acetato de 183
sapelina E (**P9**)
- Figura 4.120: Espectro de massas (APCI⁺) 23-hidroxi-20(22)-em- 183
21,23- γ -lactona-angolensato de metila (**P11**)
- Figura 4.121: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 503 184
do 23-hidroxi-20(22)-em-21,23- γ -lactona-
angolensato de metila (**P11**)
- Figura 4.122: Proposta de fragmentação para o 23-hidroxi-20(22)- 185
em-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (**P11**)
- Figura 4.123: Espectro de massas (APCI⁺) do Grandifoliolenona 186
(**P12**)
- Figura 4.124: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 529 186
do Grandifoliolenona (**P12**)
- Figura 4.125: Proposta de fragmentação para o Grandifoliolenona 187
(**P12**)
- Figura 4.126: Espectro de massas (APCI⁺) do 3-desacetilkhivorina 188
(**P13**)
- Figura 4.127: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 545 188
3-desacetilkhivorina (**P13**)
- Figura 4.128: Proposta de fragmentação para o 3- 189
desacetilkhivorina (**P13**)
- Figura 4.129: Espectro de massas (APCI⁺) do 21-hidroxi-20(22)- 190
em-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (**P15**)

- Figura 4.130: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de *m/z* 503 190
21-hidroxi-20(22)-em-21,23- γ -lactona-angolesato
de metila (**P15**)
- Figura 4.131: Proposta de fragmentação para o 21-hidroxi-20(22)- 191
en-21,23- γ -lactona-angolesato de metila (**P15**)
- Figura 4.132: Cromatogramas (Electrospray⁻) dos padrões 193
Angolesato de metila e 7-desacetoxi-7-oxogedunina
- Figura 4.133: Espectro de massas (ES⁻) dos padrões Angolesato 193
de metila (*m/z* 469) e 7-desacetoxi-7-oxogedunina
(*m/z* 437)
- Figura 4.134: Cromatogramas (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + 194
Angolesato de metila (PK24C) e Meio + Fungo
(PK22C)
- Figura 4.135: Cromatogramas (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + 195
Angolesato de metila (P34C) e Meio + Fungo
(P32C)
- Figura 4.136: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + 195
Angolesato de metila (P34C), contendo o substrato
de partida (*m/z* 469, intacto)
- Figura 4.137: Espectro de massas (APCI⁺) e filhos de *m/z* 471 196
Meio + *Penicillium ssp.* + Angolesato de metila
PK24C (frações 11 a 14)
- Figura 4.138: Espectro de massas (APCI⁺) e filhos de *m/z* 471 197
Meio + *Penicillium ssp.* + Angolesato de metila
PK34C (frações 18 a 23)
- Figura 4.139: Espectro de massas (APCI⁺) Meio + *Pestalotiopsis* 199
crassiuscula + 7-desacetoxi-7-oxogedunina PT34C
(frações 24 a 29)
- Figura 4.140: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + 200
Angolesato de metila (P14A, PK14C)
- Figura 4.141: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + 201
Angolesato de metila (P22B e PK 24B)
- Figura 4.142: Cromatograma (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + 7- 201
desacetoxi-7-oxogedunina (P24B)

- Figura 4.143: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + 202
7-desacetoxi-7-oxogedunina (P24B)
- Figura 4.144: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Phomopsis sojae* 203
+ angolesato de metila, presença do substrato com
m/z 471
- Figura 4.145: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Phomopsis sojae* 204
+ angolesato de metila
- Figura 4.146: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria* 205
rhodina + angolesato de metila (BK14C) e Meio +
Botryosphaeria rhodina (BK12C)
- Figura 4.147: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria* 206
rhodina + angolesato de metila (BK14C) e Meio +
Botryosphaeria rhodina (BK12C)
- Figura 4.148: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria* 206
rhodina + angolesato de metila (BK14C) e Meio +
Botryosphaeria rhodina (BK12C)
- Figura 4.149: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria* 207
rhodina + angolesato de metila (BK14C) e Meio +
Botryosphaeria rhodina (BK12C)
- Figura 4.150: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria* 207
rhodina + angolesato de metila (BK14C) e Meio +
Botryosphaeria rhodina (BK12C)
- Figura 4.151: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria* 208
rhodina + angolesato de metila (BK34C) e Meio +
Botryosphaeria rhodina (BK32C)

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1.1:	Algumas doenças de plantas e seus patógenos	6
Tabela 1.2:	Espécie de <i>Botryosphaeria</i> relatadas na literatura	9
Tabela 1.3:	Produção de Metabólitos Secundários por Fungos do Gênero <i>Botryosphaeria</i> e seu anamorfo <i>Lasiodiplodia</i>	13
Tabela 3.1:	Reagentes utilizados na solução de sais minerais	33
Tabela 3.2:	Extração dos meios reacionais de <i>B. rhodina</i>	46
Tabela 4.1:	Dados de RMN ^{13}C de S1 e S2	72
Tabela 4.2:	Dados de RMN ^1H de S1 e S2	73
Tabela 4.3:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S3A	89
Tabela 4.4:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S3B	89
Tabela 4.5:	Dados de RMN ^1H de S4 e S5	102
Tabela 4.6:	Dados de RMN ^{13}C de S4 e S5	102
Tabela 4.7:	Dados de RMN ^1H de S6	112
Tabela 4.8:	Dados de RMN ^{13}C e PENDANT de S6	113
Tabela 4.9:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S7	121
Tabela 4.10:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S8	126
Tabela 4.11:	Dados de RMN ^1H de S9 e S10	131
Tabela 4.12:	Dados de RMN ^{13}C de S9 e S10	132
Tabela 4.13:	Dados de RMN ^{13}C de S11A , S11B e S11C	139
Tabela 4.14:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S12	142
Tabela 4.15:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de S13	146
Tabela 4.16:	Efeito do composto sobre o transporte de elétrons do FSII desacoplado H_2O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H_2O a SiMo e de DPC a DCPIP	158
Tabela 4.17:	Efeito do composto sobre a membrana ligada a tilacóide (H^+ -ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg^{2+} -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca^{2+} -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF1) de cloroplastos	159
Tabela 4.18:	Padrões Isolados de <i>Khaya ivorensis</i> Sintomática	162

Esquema 4.1:	Correlações de HMBC para S1	70
Esquema 4.2:	Correlações de HMBC para S2	70
Esquema 4.3:	Proposta de fragmentação para de S1 (APCI ⁺)	75
Esquema 4.4:	Proposta de fragmentação para de S2 (APCI ⁺)	76
Esquema 4.5:	Proposta biossintética para a substância S1 e S2	77
Esquema 4.6:	Correlações de HMBC para S3a e S3b	90
Esquema 4.7:	Correlações de HSQC e COSY para S3a e S3b	90
Esquema 4.8:	Proposta biossintética para a substância S3	90
Esquema 4.9:	Proposta de fragmentação para S5	100
Esquema 4.10:	Proposta de fragmentação para S4	101
Esquema 4.11:	Proposta biossintética para as substâncias S4 e S5	103
Esquema 4.12:	Proposta biossintética para a substância S5 (continuação)	104
Esquema 4.13:	Correlações de HMBC para S6	112
Esquema 4.14:	Correlações de HSQC e COSY para S6	112
Esquema 4.15:	Proposta biossintética para a substância S6	114
Esquema 4.16:	Reações químicas sofridas pela glicose para a produção do 5-hidrometil-furfural	122
Esquema 4.17:	Mecanismo de clivagem da glicose pelo CAN em DMF para a formação do 5-hidrometilfurfural	123
Esquema 4.18:	Proposta de fragmentação do 5-hidrometilfurfural	123
Esquema 4.19:	Correlações de HMBC e HSQC de S8	126
Esquema 4.20:	Proposta de fragmentação para S9	130
Esquema 4.21:	Biossíntese do ergosterol e do peróxido de ergosterol a partir do esqualeno	133
Esquema 4.22:	Proposta para formação da carbonila α,β insaturada	134
Esquema 4.23:	Metilação em esteróides mediado por SAM	134
Esquema 4.24:	Perda de três grupos metílicos em esteróides	135
Esquema 4.25:	Proposta biossintética para a formação do angolensato de metila	161

LISTA DE FLUXOGRAMAS E GRÁFICOS

Fluxograma 3.1:	Isolamento dos fungos	30
Fluxograma 3.2:	Extração o meio sólido	32
Fluxograma 3.3:	Extração do meio líquido	34
Fluxograma 3.4:	Fracionamento do extrato etanólico de <i>Botryosphaeria rhodina</i> crescido em arroz (primeira extração)	38
Fluxograma 3.5:	Fracionamento do extrato diclorometânico oriundo da extração ácido-base do meio líquido de <i>Botryosphaeria rhodina</i>	39
Fluxograma 3.6:	Partição líquido-líquido do extrato etanólico do micélio	40
Fluxograma 3.7:	Fracionamento do extrato diclorometânico oriundo da partição líquido-líquido	41
Fluxograma 3.8:	Fracionamento do extrato acetato de etila oriundo da partição líquido-líquido	42
Gráfico 4.1:	Fungos Totais Isolados dos Materiais de <i>K. ivorensis</i> doente e sadia	51
Gráfico 4.2:	Fungos Totais Isolados dos Materiais denominados Fungo Velho e Novo da Espécie <i>K. ivorensis</i>	51
Gráfico 4.3:	Quantidades de Fungos Isolados	59
Gráfico 4.4:	Efeito do composto 1 sobre a síntese de ATP (▼), transporte de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H ₂ O a MV em cloroplastos de espinafre	157

Resumo

ESTUDO QUÍMICO DE MICROORGANISMOS ASSOCIADOS A *Khaya ivorensis* (MELIACEAE) – Este trabalho apresenta o isolamento, a identificação de microorganismos da espécie *Khaya ivorensis* e a identificação do patógeno que vem atacando esta espécie na Bahia. Foram isolados, no total, sete grupos de microorganismos da espécie *K. ivorensis*, mas apenas seis foram identificadas. Dois deles, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, foram identificados de acordo com suas características macro e micro morfológico das estruturas vegetativas e reprodutivas. Quatro fungos foram identificados pelas regiões ITS 1 e/ou ITS 2 do DNA_r, pelas suas características morfológicas e microscópicas e o Blast das seqüências das referidas regiões indicaram ser *Pestalotiopsis crassiuscula* 96%, *Phomopsis sojae* 95%, *Lasiodiplodia theobromae*, além de seu telemorfo *Botryosphaeria rhodina* 98%. Considerando o potencial de fitopatogênia descrito na literatura para os gêneros encontrados, a freqüência e localização dos fungos isolados, pode-se afirmar que *Botryosphaeria rhodina* é o agente causal da doença do plantio de *K. ivorensis* na Bahia. Após a identificação do patógeno de *Khaya* fez-se o estudo fitoquímico deste fungo, levando ao isolamento e identificação de 19 substâncias de diferentes classes: des-metil lasiodiplodina, lasiodiplodina, isocumarina, dois derivados γ -butirolactonas (4-propil-3-carbonil-2-metil-4-butanolideo e 4-propil-2-carbonil-3-metil-4-butenolideo), ácido 11-hidroxijasmônico, 5-hidroximetilfurfural, tirosol, ergosterol, peróxido de ergosterol, esteróides (estigmastenona, sitostenona e campestenona), nucleosídeos (5'-inosil, uridina e uracila), manitol e um triglicerideo, dentre estas substâncias os dois derivados γ -butirolactonas possivelmente são novos na literatura. Os compostos isolados foram identificados pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D e por Espectrometria de massas. Foi realizado o experimento de biotransformação com os limonóides angolesato de metila isolado em grande quantidade de *K. ivorensis* sintomática e 7-desacetoxi-7-oxogedunina isolado de *Carapa guianensis*, frente aos microorganismos *Penicillium ssp.*, *Phomopsis sojae* e *Botryosphaeria rhodina*, para verificar se ocorria ou não a modificação destes compostos junto aos fungos. No entanto, em alguns experimentos não observou-se nenhuma diferença e em outros, apenas supõem-se que tenha ocorrido a modificação. Em um estudo complementar, realizou-se ensaios frente a síntese de ATP com os compostos lasiodiplodina, ergosterol, 5'-inosil e do manitol, sendo que somente a lasiodiplodina apresentou uma boa inibição.

Abstract

CHEMICAL STUDY OF MICROORGANISMS ASSOCIATED TO *Khaya ivorensis* (MELIACEAE) – This work shows the isolation, identification of microorganisms from the species *Khaya ivorensis* and the identification of the pathogen that is attacking this plant on Bahia state (Brazil). In total seven strains of microorganisms from *K. Ivorensis* were isolated, but only six were identified. Two of them, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, were identified according to their characteristics macro and micro morphological structures vegetative and reproductive. Four fungi were identified by the regions ITS 1 and/or ITS 2 of DNAr, by its morphological and microscopic characteristics. In addition, the Blast of the sequences of these regions confirmed the presence of the *Pestalotiopsis crassiuscula* 96%, *Phomopsis sojae* 95%, *Lasiodiplodia theobromae*, and its teleomorfo *Botryosphaeria rhodina* 98%. Literature shows that *Botryosphaeria rhodina* is common in disease Canker in plant, similar occur in *K. ivorensis*, suggesting that this fungi is the pathogen in specie studied. After the identification of *Khaya* pathogen it was studied, yielding to isolation and identification of sixteen compounds from different classes: Des-methyl lasiodiplodin, lasiodiplodin, isocoumarin, two derivatives γ -butirolactones (4-propil-3-carbonyl-2-methyl-4-butanolideo and 4-propil-2-carbonyl-3-methyl-4-butenolideo), 11-hidroxijasmônico acid, 5-hidroximetilfurfural, tirosol, ergosterol, peroxido de ergosterol, steroids (stigmastenon, sitostenon and campestenon), nucleosídeos (5'-inosil, uridine e uracila), manitol and one triglycerides. Both derivatives γ -butirolactonas appear to be new in literature. The isolated compounds were identified by Nuclear Magnetic Ressonance 1D and 2D and Mass Spectrometry. The limonoids methyl angolenasate isolated in large amount from *K. ivorensis* symptomatic and 7-deacetoxy-7-oxogedunin isolated from *Carapa guianensis*, were bioassayed against the microorganisms *Penicillium ssp.*, *Phomopsis sojae* and *Botryosphaeria rhodina*, in order to analyze if these fungi modify the structure of compounds. However, in some experiments were not observe any difference and in others, only hypothesis can be done by MS analyze. In a complementary study, compounds lasiodiplodin, ergosterol, 5'-inosil and mannitol were assayed as inhibitor of ATP synthesis, and only lasiodiplodin presented good results.

SUMÁRIO

1 – Introdução	1
1.1 – Interação Planta – Fitopatógeno	3
1.2 – Como a Planta se Defende de Seus Inimigos?	4
1.3 – Fungos	5
1.4 – Doenças em Plantas Causadas por Fungos	6
1.5 – O Gênero <i>Botryosphaeria</i>	8
1.6 – Doenças causadas por <i>Botryosphaeria spp.</i>	9
1.6.1 – Escoriose	10
1.6.2 – Síndrome do Declínio da Videira	10
1.6.3 – Diplodia: Morte do caule e apodrecimento de cachos	11
1.7 – Controle de Doenças Causadas por <i>Botryosphaeria spp.</i>	12
1.8 – Características Taxonômicas de <i>B. rhodina</i>	12
1.9 – Perfil Químico de <i>B. rhodina</i>	12
1.9.1 – Lasiodiplodinas	15
1.9.2 – Isocumarina	15
1.9.3 – Ácido Jasmônico e seus derivados	16
1.9.4 – Outras Substâncias	17
1.10 – Relato de Doença em <i>Khaya ivorensis</i>	18
2 – Objetivos	21
3 – Parte Experimental	23
3.1 – Materiais e Métodos	23
3.2 – Equipamentos	24

3.3 – Coleta do Material para Isolamento dos Fungos	26
3.4 – Metodologia para Isolamento dos Fungos	27
3.4.1 – Meios de Cultura para Isolamento dos Fungos	27
3.4.2 – Identificação dos Fungos Isolados	29
3.5 – Estudo Fitoquímico de <i>B. rhodina</i>	31
3.5.1 – Crescimento em meio sólido e líquido	31
3.5.2 – Fracionamento dos Extratos Brutos	35
3.6 – Reações Químicas realizadas com algumas substâncias isoladas	43
3.7 – Experimento de Biotransformação	44
4 – Resultados e Discussões	49
4.1 – Resultados Biológicos	49
4.2 – Resultados Químicos	61
Substâncias isoladas	61
4.2.1 – Identificação de S1 e S2	65
4.2.2 – Identificação de S3A e S3B	86
4.2.3 – Identificação de S4 e S5	95
4.2.4 – Identificação de S6	110
4.2.5 – Identificação de S7	120
4.2.6 – Identificação de S8	125
4.2.7 – Identificação de S9 e S10	129
4.2.8 – Identificação de S11A , S11B e S11C	138
4.2.9 – Identificação de S12	141
4.2.10 – Identificação de S13 e S14	145
4.2.11 – Identificação de S15	149
4.2.12 – Identificação de S16	152
4.3 – Ensaio Biológicos	153

4.5 – Experimento de Biotransformação	160
4.5.1 – Biblioteca de espectros de massas de limonóides isolados de <i>K. ivorensis</i> sintomática	161
4.5.2 – Análises das Amostras de Biotransformação por LC-MS	192
4.5.2.1 – Experimento realizado com o fungo <i>Penicillium</i> ssp.	194
4.5.2.2 – Experimento realizado com o fungo <i>Phomopsis sojae</i>	201
4.5.2.3 – Experimento realizado com o fungo <i>Botryosphaeria rhodina</i>	203
5 – Conclusões	209
6 – Referências Bibliográficas	211

1 – Introdução

As plantas, assim como todos os seres vivos, podem sofrer vários efeitos de agentes do meio quer sejam bióticos ou abióticos. Esses agentes causam perturbações no seu desenvolvimento, doenças, ou até mesmo sua decadência podendo levar até a morte. Os estudos de doenças das plantas são de grande importância, uma vez que as destroem e aos seus produtos, dos quais, muitas vezes os humanos dependem para a sua alimentação para serem utilizadas em indústrias, habitação, ambiente, etc. www.naturlink.pt/canais/artigos.asp

As doenças presentes nas plantas são causadoras de elevados danos econômicos, podendo também, provocar efeitos patológicos graves em humanos e em outros animais que venham a consumir os produtos vegetais doentes. São destruidoras de culturas agrícolas e em muitas vezes, numa tentativa de controlar as doenças, são utilizadas enormes quantidades de produtos pesticidas, causando assim outros danos, poluindo águas, o ambiente e até os alimentos. www.naturlink.pt/canais/artigos.asp

As plantas doentes são caracterizadas por mudanças em sua estrutura ou processos fisiológicos provocadas por diversos fatores, tanto dos agentes patogênicos como das condições desfavoráveis do ambiente em que vivem. Os agentes causadores de doenças em plantas são semelhantes aos que causam doenças nos humanos e outros animais. Dentre estes, incluem microrganismos, tais como vírus, bactérias, fungos, protozoários, nematódeos e ainda condições ambientais desfavoráveis como excesso ou falta de nutrientes, umidade, luz, e presença de substâncias tóxicas no ar ou no solo. As plantas sofrem ainda competição com outras plantas indesejáveis e são danificadas por insetos, humanos e outros animais. A causa de uma doença não pode ser atribuída a um único agente, geralmente é mais complexa e envolve a ação conjunta de vários agentes. www.naturlink.pt/canais/artigos.asp

As perturbações causadas pelos agentes patogênicos originam alterações morfológicas ou fisiológicas nas plantas, cuja expressão constitui o conjunto de sintomas que apresentam. Os sintomas não são as doenças em si, mas sendo provocados por ela, indicam a sua existência e ajudam no seu diagnóstico. Paralelamente, pode se verificar qualquer manifestação da doença que evidencia o próprio agente sobre os órgãos lesados da planta. As sintomatologias provocadas

pelas doenças consistem essencialmente em mudanças de cor, alterações de órgãos, modificações anatômicas, produções anormais de substâncias e de diversas alterações do metabolismo. www.naturlink.pt/canais/artigos.asp

Os órgãos atingidos nas plantas podem ser os frutos, sementes, plântulas, raízes, caule, ramos, folhagem, frutos em desenvolvimentos e os vasos vasculares.

Para que ocorra a doença são necessários pelo menos dois componentes: uma planta susceptível e um agente patogênico, que têm que contactar e interagir entre si. Dependendo das condições do meio, o agente patogênico poderá não se desenvolver ou a planta conseguir resistir ao seu ataque e, embora haja contato entre os dois componentes, a doença não é observada. Surge assim um terceiro componente do sistema que se torna determinante para a doença: as condições ambientais. Embora estes três componentes hajam em conjunto, qualquer um deles pode induzir variações consideráveis no sistema afetando a expressão de uma doença numa planta ou população. As interações entre os três componentes determinantes para as doenças das plantas estão representadas no "triângulo da doença" (Figura 1.1, p. 2).



FIGURA 1.1: "Triângulo da Doença". O comprimento de cada lado é proporcional às características que cada componente favorecem na doença e a área do triângulo quantifica a expressão da doença.

www.naturlink.pt/canais/artigos.asp

1.1 – Interação Planta – Fitopatógeno

Segundo Stahl & Bishop, O mecanismo de interação das plantas e de seus fitopatógenos pode ser caracterizado genericamente como uma troca de “sinais” que envolvem um sistema de “ataque e defesa com o contra-ataque”. De um lado, a planta tenta desativar o sistema de ataque do agente invasor e, do outro, o patógeno tenta desativar o sistema de defesa da planta para sobreviver (CURSINO-SANTOS, *et al.*, 2003).

Em geral, podemos dizer que, a princípio, a presença do invasor ativa no hospedeiro a produção de substâncias (fitoalexinas) para evitar a instalação do microorganismo. Se mesmo assim o patógeno conseguir se instalar no tecido vegetal, é ativado um segundo mecanismo com a função de impedir a proliferação do patógeno. Nessa fase, há uma interação específica entre moléculas produzidas pelo invasor para promover a infecção e moléculas produzidas pela planta para inibir o patógeno. Essa é a fase mais crítica do processo, pois é quando se define a evolução da infecção. Se a interação dessas moléculas for suficiente e específica, a infecção será interrompida, caso contrário, a planta não conseguirá inibir o agente invasor e a infecção será efetivada. Além disso, a eficiência desse mecanismo de defesa depende do sistema de sinalização promovido a partir da interação do hospedeiro e do patógeno, acrescido de algumas características do vegetal, como idade, tecido atacado e condições fisiológicas (CURSINO-SANTOS, *et al.*, 2003).

A resistência das plantas a certos patógenos é determinada pela bagagem genética, tanto do patógeno quanto do seu hospedeiro. Quando o microorganismo invade o tecido vegetal, libera para o espaço intercelular ou diretamente dentro da célula da planta o produto de genes *Avr* (genes de avirulência), os quais interagirão de forma específica com o produto de genes *R* (genes de resistência) da planta (CURSINO-SANTOS, *et al.*, 2003).

Se a proteína de avirulência do patógeno encontrar uma proteína *R* correspondente no tecido vegetal invadido, dizemos que a planta é resistente a esse organismo. Isso porque o reconhecimento permitirá a ativação do sistema de defesa da planta e, conseqüentemente, a eliminação do patógeno. Nesse caso, não há evolução da infecção. Entretanto, se não houver uma proteína *R* correspondente à proteína *Avr* do patógeno, a infecção progredirá e surgirão os sintomas, pois o sistema de defesa do vegetal não será acionado (CURSINO-SANTOS, *et al.*, 2003).

A Figura 1.2 ilustra as duas situações: **A)** Condição de resistência ao patógeno, a proteína *AvrRpt2* de *P. syringae* encontra a proteína *R*, correspondente de *Arabidopsis* (*RPS2*), ocorre a ativação dos mecanismos de defesa da planta e eliminação do patógeno. **B)** Condição de sensibilidade à infecção, não há interação das proteínas do patógeno com as da planta em razão da ausência da proteína *R* correspondente, nesse caso a infecção evolui para níveis mais complexos de invasão do tecido vegetal, o que resulta na definição da doença com o aparecimento dos sintomas (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2003).

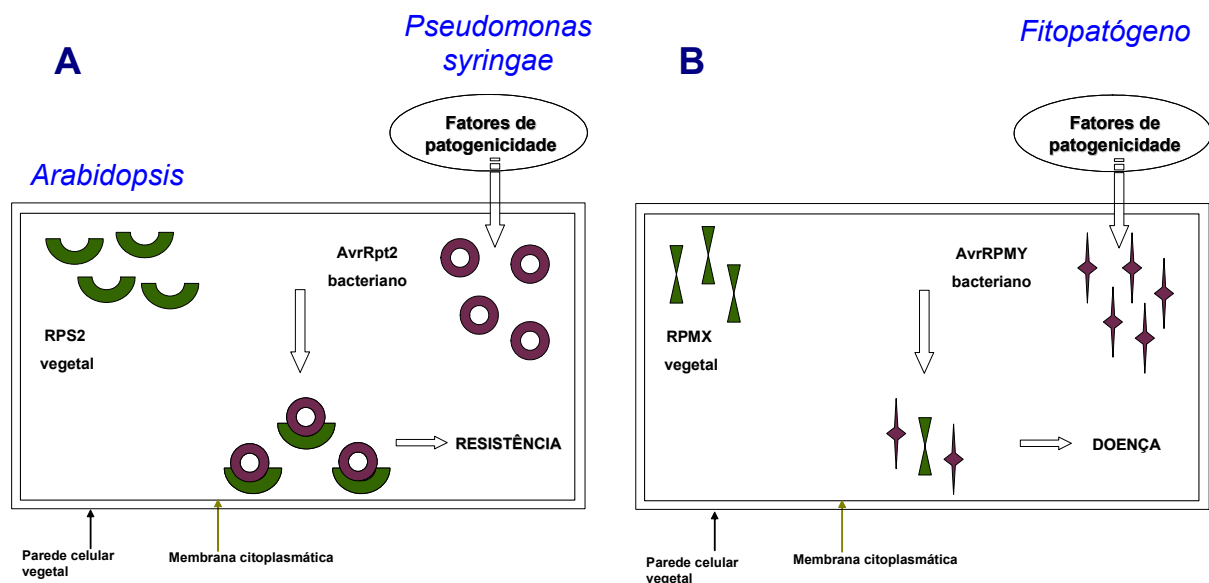


FIGURA 1.2: Interação entre a Planta e o Patógeno.

1. 2 – Como a Planta se Defende de Seus Inimigos?

O local específico onde ocorre o contato da planta com o agente patogênico é conhecido como Região de Resistência adquirida Localizada (LAR). Nessa região ocorre uma seqüência de eventos importantes, conhecida como Resposta Hipersensitiva (HR), caracterizada pela rápida ativação do sistema de defesa da planta, induzida pela presença do fitopatógeno, sendo portanto, um mecanismo de defesa local (CURSINO-SANTOS, *et al.*, 2003).

No início da infecção, algumas proteínas da membrana celular vegetal atuam como sensores que detectam a aproximação do patógeno. Como resposta inicial de defesa na tentativa de promover a inibição da instalação e impedir a

proliferação do agente invasor no hospedeiro, ocorre o reforço da membrana vegetal (lignificação), seguida da ativação de HR (CURSINO-SANTOS, *et al.*, 2003).

Nessa etapa, são produzidos “sinais” moleculares responsáveis pela indução da expressão de vários genes envolvidos com os mecanismos de defesa da planta. Além disso, são ativados mecanismos de morte celular do tecido infectado e induzidas alterações metabólicas. Mais tarde sinais provenientes de HR induzem um segundo sistema de defesa, envolvendo não apenas LAR, mas também células vizinhas não infectadas, o que caracteriza a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (CURSINO-SANTOS, *et al.*, 2003).

1. 3 – Fungos

Os fungos estão entre os principais agentes patogênicos de plantas, sendo os causadores de aproximadamente 70% das principais doenças.

Mais de 10.000 espécies de fungos conhecidos podem causar doenças em plantas, sendo que estas são atacadas por alguns fungos e cada fungo patogênico pode atacar um ou mais tipos de plantas.

A maioria dos fungos patogênicos passa parte do seu ciclo de vida nas plantas que infecta e outra parte no solo ou em restos de plantas em decomposição, outros passam toda a sua vida associados às plantas.

De qualquer forma, os fungos podem, sob condições adversas ao seu desenvolvimento, produzir esporos de resistência que permanecem dormentes no solo durante longos períodos, voltando a germinar e a contaminar as plantas quando as condições ambientais são favoráveis. No ciclo de vida dos fungos patogênicos admitem-se três grandes fases principais: antes, durante e depois da penetração do fungo na planta.

A maior parte dos fungos depende de fatores que favorecem a sua disseminação, como vento, água, insetos e outros animais. O vento é o principal fator de dispersão que pode transportar esporos de fungos a longas distâncias. Após a germinação dos esporos e desenvolvimento do fungo na superfície da planta, surgem fortes barreiras por parte da planta à sua infecção: a cutícula e epiderme que revestem e protegem os órgãos das plantas. No entanto, enquanto alguns fungos conseguem ultrapassar estas barreiras diretamente, outros invadem as plantas em zonas naturalmente frágeis, como os rebentos das plantas, ou em zonas

previamente danificadas, por exemplo, feridas causadas por insetos. Os fungos estão naturalmente munidos de eficazes sistemas enzimáticos que degradam vários componentes das células das plantas e ainda são produtores de toxinas que além de perturbar o funcionamento normal das plantas, acumulam-se nos seus órgãos podendo causar graves doenças a quem os ingere.

As interações entre as plantas e os fungos patogênicos são de extremo interesse para a humanidade, uma vez que grande parte da economia mundial tem por base a utilização de espécies vegetais, as quais podem sofrer sérios danos em virtude da presença de patógenos (BARBIERI *et al.*, 2001).

1. 4 – Doenças em Plantas Causadas por Fungos

Há vários estudos com relatos de plantas infectadas por fungos patogênicos, onde estes podem afetar aos mais diversos órgãos (raízes, frutos, folhagem, ramos, caules entre outros) de seu hospedeiro. A Tabela 1.1 relata algumas espécies atacadas por fungos patógenos.

TABELA 1.1: Algumas doenças de plantas e seus patógenos

Espécies	Doença	Patógeno	Referência
Trigo	Ferrugem do colmo	<i>Puccinia graminis tritici</i>	www.daq.uem.br/trigo/doencas
	Ferrugem da folha	<i>Puccinia recôndita</i>	
	Mancha estriada	<i>Xantomonas campestris</i>	
Maracujazeiro	Antracnose	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	VIANA <i>et al.</i> , 2003
	Verrugose	<i>Cladosporium herbarium</i>	
	Podridão-do-pé ou Podridão-do-colo	<i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>P. nicotianae</i>	
Morango	Podridões das raízes	<i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Cylindrocladium spp.</i> e <i>Phytophthora spp.</i>	SIMON <i>et al.</i> , 2005

	Podridão por <i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus nigricans</i> Ehr.	
Milho	Podridões em colmos e espigas	<i>Diplodia maydis</i> e <i>D. macrospora</i>	http://orbita.starmedia.com/~fitopatologia/diplodia.htm
Limão e Laranja	Secreções gomosas	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	CEDEÑO <i>et al.</i> , 1992
Acácia-negra	gomose	<i>Botryodiplodia spp.</i> , <i>Botrytis spp.</i> , <i>Cladosporium spp.</i> , <i>Cylindrocladium spp.</i>	DOS SANTOS <i>et al.</i> , 1999
Cajá	Antracnose	<i>Glomerella cingulata</i>	www.fruticultura.iciv.br/caja/html
	Resinose	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	
	Verrugose	<i>Sphaceloma spondiadis</i>	
Eucalipto	Tombamento de mudas	<i>Cylindrocladium candelabrum</i> , <i>Phytophthora spp.</i>	DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2001 SILVEIRA <i>et al.</i> , 1998
	Mofo cinzento	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	
	Deficiência de boro	<i>Botryosphaeria ribis</i> , <i>B. rhodina</i> , <i>B. theobromae</i> Pat. (anamorfo de <i>B. rhodina</i>)	
	Mancha de <i>Phaeoseptoria</i>	<i>Phaeoseptoria spp.</i>	
Mamão	Podridão peduncular	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Phoma caricaepapayae</i> , <i>B. theobromae</i>	NERY-SILVA <i>et al.</i> , 2001
Mamoneira	Podridões do caule e dos ramos	<i>B. theobromae</i>	LIMA <i>et al.</i> , 1996

Além destas espécies relatadas, existem outras que são atacadas por fungos patogênicos. E dentre os fungos patógenos o que mais ataca plantas são os gêneros *Botryosphaeria* ou/ e seu anamorfo *Lasiodiplodia*.

1. 5 – O Gênero *Botryosphaeria*

Este gênero utiliza como hospedeiro um grande número de espécies de famílias de plantas tais como: Aceraceae, Anacardiaceae, Betulaceae, Crassulaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Pandanaceae, Pinaceae, Proteaceae, Thymelaeaceae e Urticaceae.

Em 1976, PUNITHALINGAM descreveu várias espécies de *Botryosphaeria* alcançando um total de 18 (Tabela 1.2, p. 09), cuja distribuição geográfica encontra-se limitada principalmente a uma área 40° norte e 40° sul do Equador. Este fungo é conhecido por atacar mais de 100 gêneros de plantas com fraquezas causadas através de vários fatores, tais como: danos por inseto, stress da seca, invernos severos, entre outros. Os sintomas do ataque podem variar dependendo do tipo de planta e a extensão de infecção, sendo os principais sintomas: cancrios, mancha nas folhas e morte do caule. Os cancrios iniciam-se com depressões suaves sob a casca do caule, tal como um tecido caloso ao redor das extremidades. Em algumas plantas aparecem uns escurecimentos do tecido nos galhos e murchamento dos ramos, o que é causado pela interrupção do tecido vascular. Várias espécies de *Botryosphaeria* vêm sendo encontradas atacando videiras, mangueiras e macieiras (PHILLIPS, 2002).

DENMAN e colaboradores (2003) demonstraram que algumas espécies de *Botryosphaeria spp.* podiam atuar como endofíticos em espécies de plantas aparentemente saudáveis ou em fase latente de seu ciclo de vida. Isto devido a estas serem isoladas de várias espécies de árvores lenhosas.

Na África do Sul, *Botryosphaeria* mostrou-se ser um dos patógenos mais importante da videira, sendo este isolado em aproximadamente 9% de todas as plantas doentes. De acordo com Crous e colaboradores (2000), três espécies de *Botryosphaeria* ocorrem em videira na África do Sul: *B. obtusa*, *B. dothidea* e *B. ribis*. *B. sarmentorum*, isolada de *Vitex*, *Malus pumila* e *Ulmus sp.* (VAN NIEKERK *et al.*, 2004; PHILLIPS *et al.*, 2006) e *B. ibérica*, isolada de *Quercus ilex* (PHILLIPS *et al.*,

2006) foram descobertas recentemente. Em estudos sobre o reconhecimento das bases de DNA em comparação com a morfologia de *Lasiodiplodia spp.* (fase assexuada de *Botryosphaeria*), foram encontradas três novas espécies deste gênero: *L. venezuelensis*, *L. crasispora* e *L. rubropurpurea* (BURGESS *et al.*, 2006).

TABELA 1.2: Espécie de *Botryosphaeria* relatadas na literatura

<i>Botryosphaeria australis</i>
<i>Botryosphaeria corticis</i>
<i>Botryosphaeria cortícola</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>
<i>Botryosphaeria eucalyptorum</i>
<i>Botryosphaeria ibérica</i>
<i>Botryosphaeria lútea</i>
<i>Botryosphaeria mamane</i>
<i>Botryosphaeria melanops</i>
<i>Botryosphaeria obtusa</i>
<i>Botryosphaeria parva</i>
<i>Botryosphaeria protearum</i>
<i>Botryosphaeria quercuum</i>
<i>Botryosphaeria rhodina</i>
<i>Botryosphaeria ribis</i>
<i>Botryosphaeria sarmentorum</i>
<i>Botryosphaeria stevensii</i>
<i>Botryosphaeria tsugae</i>

1. 6 – Doenças causadas por *Botryosphaeria spp.*

Embora as doenças das espécies de *Botryosphaeria* não sejam totalmente esclarecidas sobre os diferentes tipos de plantas onde elas estão presentes, são vários os sintomas e doenças associados a elas, podendo ser citados: a escoriose, a síndrome do declínio da videira e diplodia (morte do caule e apodrecimento dos cachos).

1. 6.1 – Escoriose

Os sintomas associados com essa doença são: mortalidade do broto, que leva a redução deste e com isso perda de seu rendimento e ainda quebra do galho da espécie atacada. A doença não se desenvolve rapidamente, o seu acúmulo causa um declínio gradual na eficácia e rendimento de produção (PHILLIPS *et al.*, 1998). Este aspecto acontece em vinhas com 8 anos (LARIGNON *et al.*, 2001).

Por muitos anos, *Phomopsis viticola* foi considerado ser o fungo causador da escoriose nos EUA. Na Europa o fungo causador era o *Botryosphaeria dothidea*. Depois *P. viticola* foi associado a escoriose na Alemanha. A relação destes dois fungos com escoriose conduziu a um estudo por AJL Phillips (1998, 2000) em Portugal, onde a patogenicidade de *Botryosphaeria dothidea* e *P. viticola* foram testadas. Os resultados comprovaram conclusivamente que o causador da escoriose era o *Botryosphaeria* e não *P. viticola* como reportado anteriormente (PHILLIPS *et al.*, 1998, 2000).

1. 6.2 – Síndrome do Declínio da Videira

Entre 1996 e 1999, AJL Phillips desenvolveu uma pesquisa sobre videira em Portugal para determinar qual espécie de *Botryosphaeria* estava associado à videira. Foram feitos isolamentos de fungos de videiras com cinco sintomas diferentes, sendo estes chamados de síndrome do declínio da videira. Foi mostrado que um ou todos estes sintomas podem acontecer em uma mesma vinha infectada. Destes sintomas foram isolados *B. parva*, *B. obtusa*, *B. stevensii*, e em alguns casos, foi isolado *B. parva*, *B. obtusa* e *B. dothidea* de plantas jovens onde a união do enxerto falhou.

A espécie *B. obtusa* ocorre em uma grande variedade de árvores, pode viver saprofiticamente em madeiras mortas ou vivas (CASTILLO-PANDO *et al.*, 2001) e foi reconhecida como o patógeno de feridas, podendo causar sintomas de morte do caule e também cancrios. Em Portugal, *B. obtusa* foi associado à diminuição do crescimento, reduzindo brotos e levando a morte de galhos (PHILLIPS 2002). Na Austrália e Califórnia, *B. obtusa* também foi isolado do sintoma de deformação (PASCOE 1998a, 1998b).

1. 6.3 – *Diplodia*: morte do caule e apodrecimento de cachos

O organismo causador de *Diplodia*, morte do caule (Figura 1.3, p. 11) e apodrecimento do cacho é reportado como sendo o *B. rhodina*. Esta doença começa depois da estação de verão com brotos morrendo em direção a base. As partes marrons mortas em volta da parte infectada que tornam cinza, são manchas do picnídio. Cancros também se desenvolvem nos brotos e podem esparramar em qualquer direção ao longo do broto. Podem ser vistos picnídios pretos nas partes infectadas da vinha.

Quando os frutos são infectados, eles parecem estar encharcados com água no início e é como se a putrefação desenvolvesse uma rachadura e os frutos fossem cobertos com uma massa branca de micélio. Os frutos eventualmente secam e aparecem como picnídios pretos que emergem na superfície do fruto seco. Estes frutos raramente são vistos devido ao fato destes serem infectados com fungos secundários (oportunistas) e leveduras que causam um agrupamento para se transformar em uma massa podre, conhecida como putrefação do cacho (HEWITT 1994).

No inverno, o fungo fica dentro da parte doente da vinha ou na terra. Na primavera, quando a temperatura aumenta, leva a ativação da vinha e a propagação de *B. rhodina* também reaviva, sendo que o fungo pode resistir a podas, permanecendo enterrados no chão do vinhedo. A doença é esparramada através de esporos do fungo que são espalhados pelo vento (conídio) ou esguicho dispersos de gotas de água da chuva ou borrifada da irrigação.



FIGURA 1.3: Morte do Caule causado por *Botryosphaeria rhodina* (VAN, et al. 2000)

1. 7 – Controle de doenças causadas por *Botryosphaeria spp.*

O controle das doenças causadas por *Botryosphaeria* é difícil, sendo este especialmente químico é muito limitado. Em muitas instâncias as medidas de controle recomendadas variam de uma região a outra, e até mesmo de um país para outro (MILHOLLAND, 1991). Atualmente não há nenhum fungicida registrado para o uso contra a morte do caule causada por *Botryosphaeria* na África do Sul (NEL, *et al.*, 1999). A França é um dos muitos países onde um fungicida é registrado para controle da morte do caule que é causado por *B. obtusa*, *B. dothidea* e em alguns casos *B. stevensii*. Eles utilizam arseniato de sódio como fungicida (LARIGNON & DUBOS, 2001; LEHOCZKY, 1974; 1994). Outra medida de controle, recomendada amplamente para a maioria das doenças causada pelas várias espécies de *Botryosphaeria*, é a boa prática de serviço de saúde pública. Depois de podar, o escombro deve ser removido do vinhedo e preferencialmente queimado, já que este material pode ser uma fonte de inoculação e que pode causar novas infecções.

1. 8 – Características Taxonômicas de *Botryosphaeria rhodina*

O nome *Botryosphaeria* é aplicado a coleções de ascomicetos, nos quais os ascos bitunicados são produzidos dentro do estromatico, ascoma e pseudetelio. Os ascomas variam de uniloculata de forma relativamente simples a estruturas de multioculata grandes ou agregações do ascoma unilocular, unidos freqüentemente num estroma basal comum. Eles podem ser embutidos no tecido do hospedeiro ou podem ser estourados ficando na parte de fora da superfície. As formas do ascoma são variáveis dentro de uma espécie que é indubitavelmente um resultado das condições sob as quais eles foram formados, dos substratos nos quais eles se desenvolveram, qualidade e disponibilidade do nutriente, condições ambientais, como temperatura e disponibilidade de água.

1. 9 – Perfil Químico de *Botryosphaeria rhodina*

Dentro do perfil químico do fungo em estudo, são relatados alguns tipos de metabólitos secundários, sendo o ácido jasmônico e seus derivados as

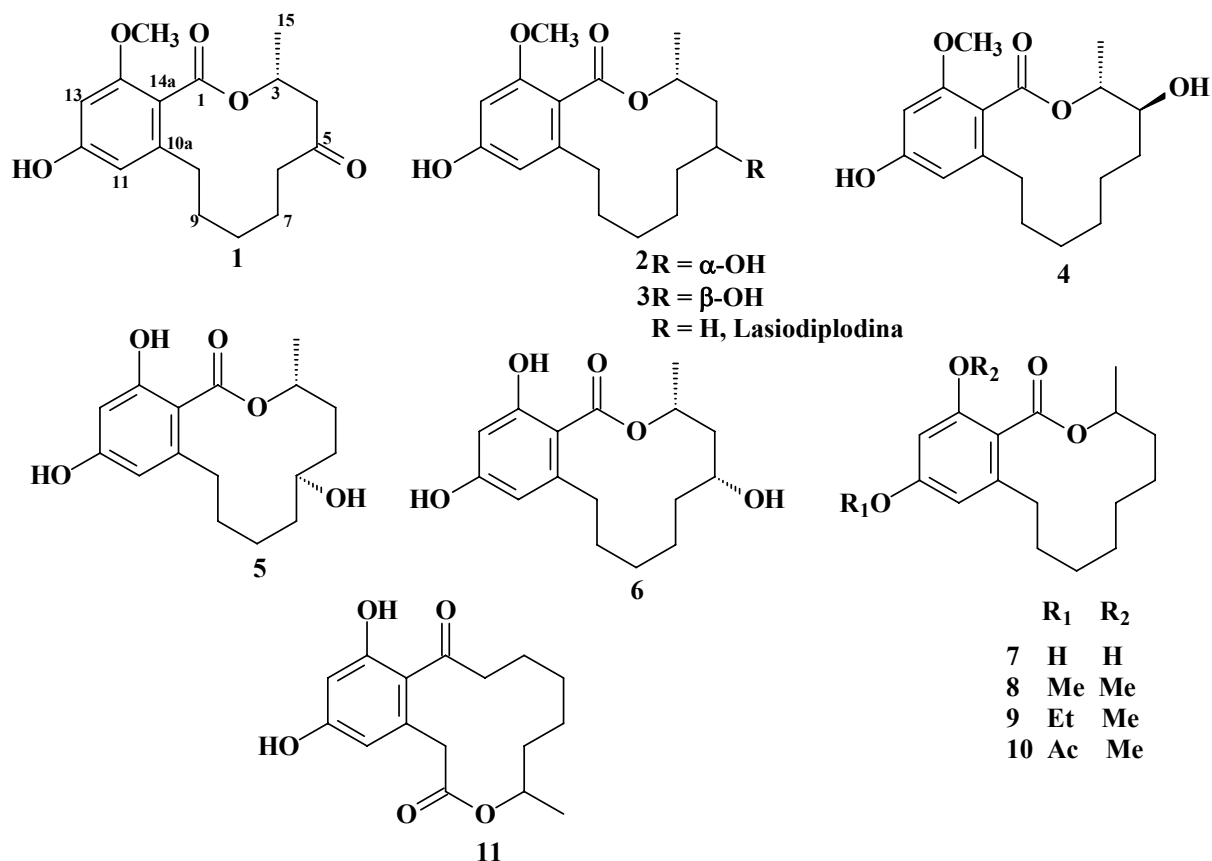
substâncias mais encontradas, seguidas de alguns policetideos, tais como lasiodiplodina e isocumarina entre outras classes de compostos, Tabela 1.3.

TABELA 1.3: Produção de Metabólitos Secundários por Fungos do Gênero *Botryosphaeria* e seu anamorfo *Lasiodiplodia*

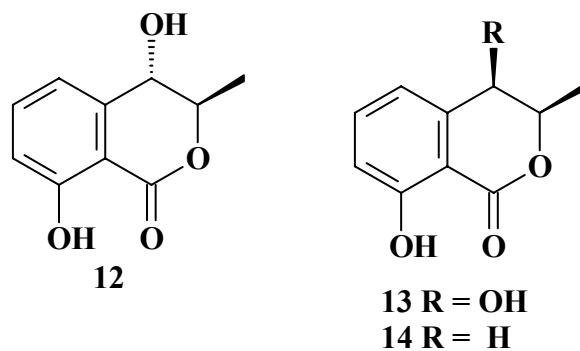
Metabólito	Referência
5-oxolasioldiplodina (1)	YANG, 2000; MATSUURA, 1998.
5 α -hidroxilasioldiplodina (2)	YANG, 2000;
5 β -hidroxilasioldiplodina (3)	MATSUURA, 1998.
(3R),(4S)-4-hidroxilasioldiplodina (4)	YANG, 2000.
(3R),(6R)-6-hidroxi-des-O-metillasioldiplodina (5)	YANG, 2000.
(3R),(5R)-5-hidroxi-des-O-metillasioldiplodina (6)	YANG, 2000
Des-O-metillasioldiplodina (7)	ALDRIDGE, 1971
Lasioldiplodina metil éter (8)	ALDRIDGE, 1971
Lasioldiplodina etil éter (9)	ALDRIDGE, 1971.
12-O-acetil Lasioldiplodina (10)	ALDRIDGE, 1971.
Curvularina (11)	ALDRIDGE, 1971.
<i>Trans</i> -4-hidroximeleina (12)	ALDRIDGE, 1971.
<i>Cis</i> -4-hidroximeleina (13)	ALDRIDGE, 1971.
<i>Cis</i> -meleina (14)	
Ácido <i>trans</i> -2-pentilciclopentano (15)	ALDRIDGE, 1971.
<i>Trans</i> -1-(2'-hidroxietil)-2-pentilciclopentano (16)	
Acido 4-acético,2H-ciclopenta[b]furano hexahidro-2-oxo (17)	ALDRIDGE, 1971.
Lasiolactona (18)	NAGO, 1994; MATSUMOTO, 1994.
Massoialactona (19)	NAGO, 1994; MATSUMOTO, 1994.
Theobroxida (20)	MATSUURA, 1998.
1,3-benzodioxol-2-ona,3a,4,5,7a-tetrahidro-4,5dihidroxi-6-	MATSUURA, 1998.

metil (21)	
1,3-benzodioxol-2-ona,4,5-bis(acetiloxi)-3a,4,5,7a-tetrahidro--	
6-metil (22)	
1,3-benzodioxol-2-ona,5-(Bezoiloxi)-3a,4,5,7a-tetrahidro-4-	
hidroxi-6-metil (23)	
1,3-benzodioxol-2-ona,4-(benzoiloxi)-3a,4,5,7a-tetrahidro-5-	
hidroxi-6-metil (24)	
1,3-benzodioxol-2-ona,4,5-bis(bezoiloxi)-3a,4,5,7a-tetrahidro-	
-6-metil (25)	
Ácido 7-iso-jasmônico (26)	MIERSCH, 1991; MIERSCH, SCHNEIDER 1991; MIERSCH, 1989
Ácido (-)-jasmônico (27)	MIERSCH, 1991; MIERSCH, SCHNEIDER 1991
Ácido (11S)-(-)- hidroxijasmônico (28)	MIERSCH, 1991
Ácido (11R)-(-)- hidroxijasmônico (29)	
Ácido (-)-12-hidroxijasmônico (30)	MIERSCH, 1991.
Derivados do ácido jasmônico (31-37)	MIERSCH, 1991.
Ácido 5 α -cucurbico (38)	MIERSCH,
Ácido 5 β -cucurbico (39)	SCHNEIDER 1991; MIERSCH, 1989
Ácido (+)-9,10-diidro-7-iso-jasmônico (40)	MIERSCH, SCHNEIDER 1991.
Ácido (+)-11,12-disidro-7-isojasmônico (41)	MIERSCH, SCHNEIDER 1991.
Derivados do ácido jasmônico (42-44)	MIERSCH, SCHNEIDER 1991.
Etil (+)-7-iso-jasmônico (45)	MIERSCH, 1989
Etil (-)-7-iso-jasmônico (46)	MIERSCH, 1989
Ácido (+)-4,5-desidro-7-iso-jasmônico (47)	MIERSCH, 1989.
Ácido (-)-4,5-desidro-7-iso-jasmônico (48)	MIERSCH, 1989.
Derivados do ácido jasmônico (49-50)	MIERSCH, 1989.

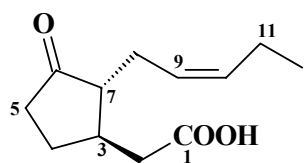
1. 9.1 – Lasiodiplodinas



1. 9.2 – Isocumarinas

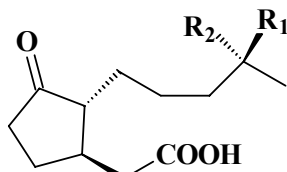


1. 9.3 – Ácido Jasmônico e seus derivados



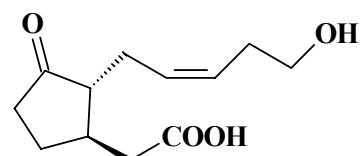
26 Trans

27 Cis

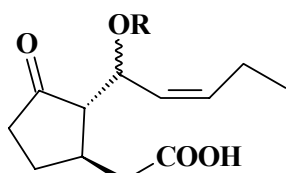


28 R1 = H, R2 = OH

29 R1 = OH, R2 = H

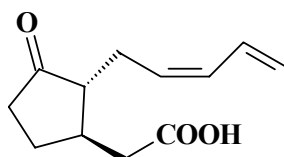


30



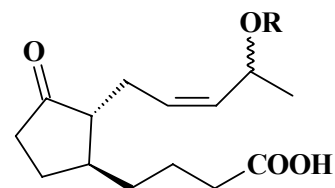
31 R = H

32 R = Me



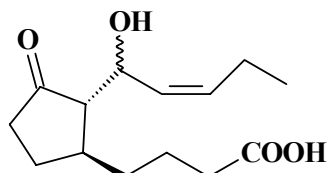
33 Trans

41 Cis

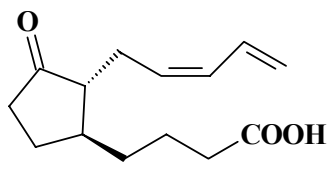


34 R = H

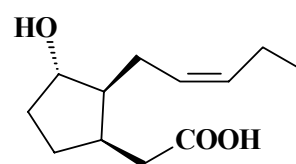
35 R = Ac



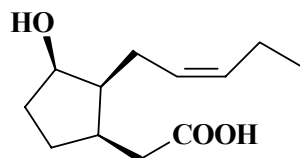
36



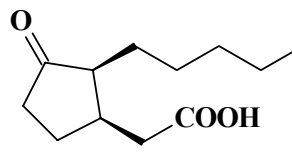
37



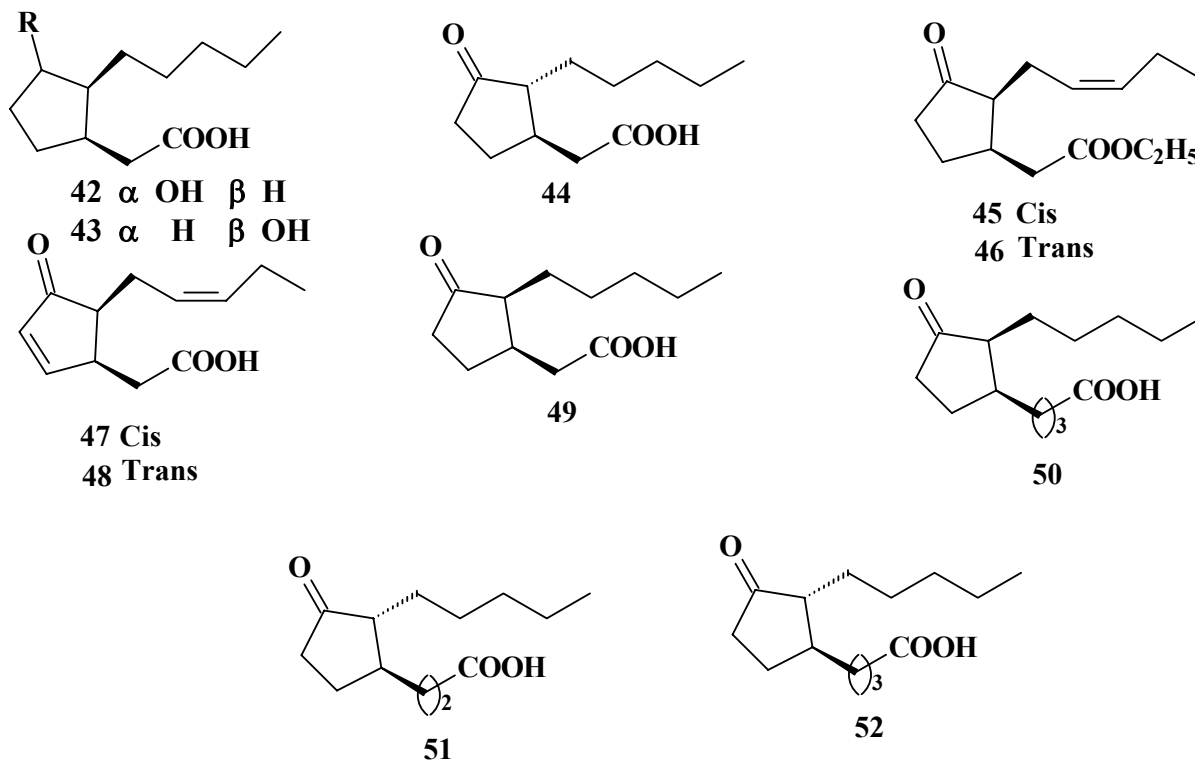
38



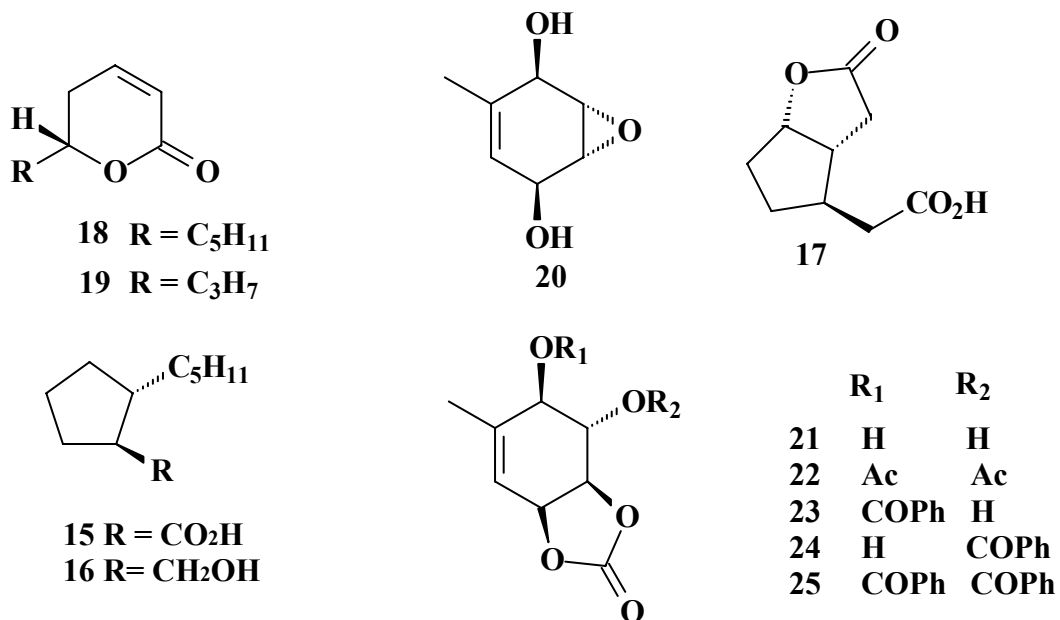
39



40



1. 9.4 – Outras classes de substâncias



1. 10 – Relato de Doença em *Khaya ivorensis*

A espécie *Khaya ivorensis* pertence à família Meliaceae, a qual é composta principalmente de árvores tropicais que produzem madeira de alto valor comercial. As espécies desta família encontram-se distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais da América, África e Ásia. São encontradas aproximadamente 51 gêneros de plantas lenhosas e, provavelmente, o número de espécies não ultrapasse 550. No Brasil são encontrados sete gêneros, dos quais *Carapa* (andiroba), *Cedrela* (cedro-branco, cedro-rosa, cedro-vermelho) e *Swietenia* (mogno) apresentam grande interesse econômico por parte das indústrias madeireiras, artesãos e consumidores (RIZZINI *et al.*, 1971).

Devido à exploração intensiva e ao desmatamento desordenado das matas, para a agricultura e pecuária, as reservas naturais de espécies desses gêneros vêm diminuindo sensivelmente. Desta forma, tem se intensificado o plantio dessa espécie, mas sem grande sucesso. Isto porque os brotos jovens dessas plantas sofrem ataques drásticos de larvas de um microlepidóptero do gênero *Hypsipyla*. Esse ataque chega a provocar a morte dos brotos, estimulando a formação de vários outros, levando a ramificação na copa do vegetal jovem. Como conseqüência, tem-se a formação de árvores adultas com muitos ramos, de troncos curtos e não homogêneo, perdendo assim o interesse de extração pelas indústrias madeireiras.

Devido à alta suscetibilidade do mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla* King) ao microlepidóptero (*H. grandella*), essa essência florestal vem sendo substituída pelos mognos africanos *Khaya ivorensis*, *K. senegalensis*, *K. nyasica* e *K. antotheca*. Estas espécies apresentaram grande resistência por antibiose à *H. grandella*, quando introduzidas na América Latina tropical, contudo são susceptíveis à *H. Robusta* na África (KRIJPMA, 1970/MÜLLER *et al.*, 2002).

As espécies de *Khaya* correspondem ao mogno africano de ótima qualidade, e devido a este fato tem-se intensificado a introdução de espécies deste gênero em substituição ao nosso mogno *Swietenia macrophylla*, já que elas vêm se mostrando resistentes a *Hypsipyla grandella*. Contudo, o Dr. Manfred Willy Müller da **CEPLAC** - Superintendência Regional da Bahia, Salvador, observou que *K. ivorensis* vem sendo encontrada com doenças ocasionadas por fungos em plantações modelo no CEPLAC (MÜLLER *et al.*, 2002).

A Figura 1.4 (p.19) mostra um exemplar de *K. ivorensis* sintomática ao fungo, mostrando nódulos de resposta da árvore. Estes nódulos tornam a madeira de menor valor comercial. Segundo o pesquisador Müller, já existem várias plantações no Brasil, visando à exploração desta madeira, tais como Pará e Manaus, onde também há incidências de infestação de fungos. (POLTRONIERI *et al.*, 2002; GASPAROTTO *et al.*, 2001).



FIGURA 1.4: *Khaya ivorensis* sintomática a fungos

Foram observadas erupções no córtex em plantios após três anos, sendo no início lesões salientes (Figura 1.5A, p. 20) evoluindo, posteriormente, até formar grandes áreas tumorosas, dilaceradas, com aspecto de cancro (Figuras 1.5B e 1.5C, p. 20). Inicialmente as lesões comprometiam os vasos floema somente em pontos localizados, dificultando, conseqüentemente, a distribuição de fotoassimilados para algumas partes da planta, principalmente para as raízes, retardando desta forma o crescimento vegetativo. Sete anos após o plantio, as plantas apresentam lesões generalizadas no córtex, atingindo todo o perímetro do caule, chegando a promover brotações de gemas basais localizadas abaixo das lesões, um sintoma nítido de anelamento da planta (Figuras 1.6A e 1.6B, p. 20).



FIGURA 1.5: Evolução da doença observada em *K. ivorensis* na fase inicial (A), fase intermediária (B) e fase avançada (C) (CEPLAC/ESOMI).

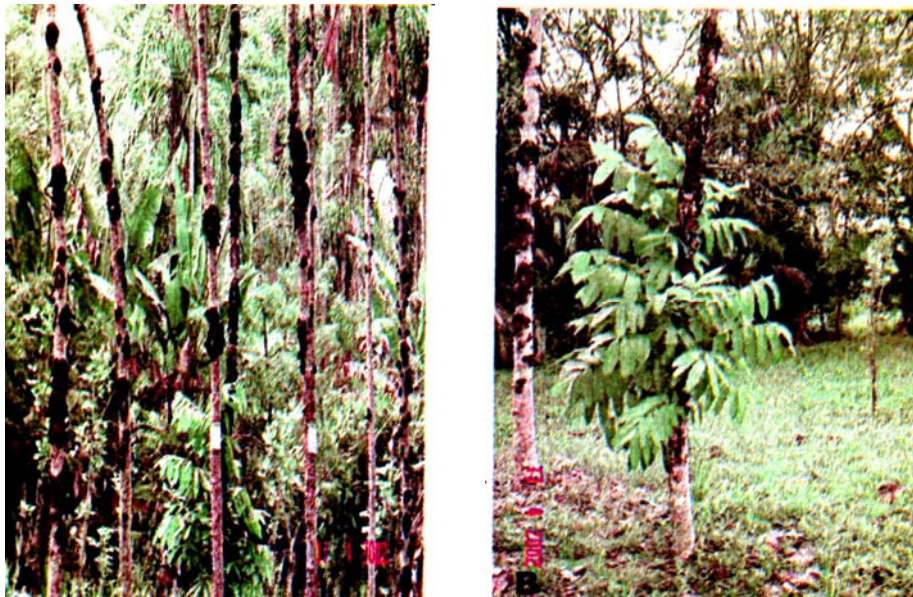


FIGURA 1.6: Aspecto da doença de *k. ivorensis*, na fase final, antes da indução da brotação das gemas basais (A) e mais tarde quando as lesões já conseguem atingir todo o perímetro do caule provocando um anelamento e induzindo a brotação de gemas basais (B) (CEPLAC/ESOMI).

2 – Objetivos

Os principais objetivos desse trabalho foram:

- Isolar e identificar o fungo que vem ocasionando doenças na espécie *Khaya ivorensis*;
- Realizar o estudo químico do provável patógeno;
- Ensaaiar as possíveis fitoalexinas de *Khaya ivorensis* sintomática, frente ao desenvolvimento do fungo;
- Realizar experimento de biotransformação com os limonóides angolensato de metila e 7-desacetil-7-oxogedunina.

3 – Parte Experimental

3.1 – Materiais e Métodos

Suporte para cromatografia em coluna (CC)

Sílica gel 60 (70-230 mesh)

Sílica gel (230-400 mesh)

Sephadex LH-20

Solventes para Cromatografia

Solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar

Cromatografia em Coluna

Colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades das amostras a serem cromatografadas

Cromatografia em camada delgada

Folhas de alumínio (com sílica gel 60 F₂₅₄, $\Phi = 02$ mm)

Cromatografia em camada delgada preparativa

Placas preparativas (20 x 20 cm) de sílica gel 60 com indicador UV

Reveladores utilizados

Câmara de UV (254 e 360 nm)

Vanilina em ácido sulfúrico

Iodo

Solventes para obtenção de espectros de RMN

Deuterados: CDCl₃, MeOD e DMSO-d₆

Reagentes utilizados para a reação de acetilação

Piridina PA

Anidrido acético PA

Na₂SO₄ PA

HCl

Reagentes utilizados para metilação

N-metil-*N*-nitroso-4-toluosulfonamida (diazald)

KOH

Éter etílico

Reagentes utilizados para a reação de transesterificação

Ácido *p*-tolueno sulfônico

Na₂SO₄ PA

Substâncias e materiais utilizados para o cultivo do fungo

Álcool 70 %

Dextrose

Arroz (ancle ben's)

Batata inglesa

Ágar

Nitrato de sódio

Cloreto de potássio

Sulfato de zinco

Sulfato ferroso

Extrato de levedura

Fosfato de potássio

3.2 – Equipamentos

Rota evaporadores

Büchi, R-114 e Büchi R-200

Espectômetro de Ressonância Magnética Nuclear

ARX – 200 MHz Bruker e DRX – 400 MHz Bruker

CG/EM

Cromatógrafo a gás: Shimadzu GC – 17A, coluna DB-1 30 m x 0,25 mm e HP-5

Contra Corrente (HSCCC)

Mk5 Quikprep 500 – Quattro CCC equipado com 4 colunas; Bomba Series II – Lab Alliance

α_D

Polarímetro Bellinghan – Perkin Elmer 241, Cubeta de 0,8 mL

Equipamento de CLAE

Shimadzu SCL – 10Avp, equipado com desgaseificador de membrana Shimadzu DGU – 14A, Bombas Shimadzu LC – 10ADvp e detectores de fotodiodo Shimadzu SPD – M10Avp.

ÄKTA, equipado com: válvula de injeção inv-907, bombas P-900 (P-901/903) e detector de UV-900

Autoclaves verticais

Phoenix AV 75

Phoenix AV 30

Phoenix AV 50

Estufa incubadora (BOD)

Fanem – 347 CD

Fanem – 315 SE

Capela de fluxo laminar

Veco VL FS – 12M

pHmetro

Tecnal TEC – 3MP

Microscópios Óticos

PZO STUDAR

Nikon E200 – ECLIPSE

Espectrômetro de massas

Quatro-LC da Micromass, equipado com uma fonte do tipo “Z-spray”

3. 3 – Coleta do Material para Isolamentos dos Fungos

O material para isolamento do fungo foi coletado no dia 20 de outubro de 2003, na Estação Experimental Sosthenes de Miranda, unidade experimental do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPLAC), localizada no município de São Sebastião do Passe, região do Recôncavo Bahiano (FIGURA 3.1, p. 26). No ato da coleta do material foi observado que os estágios da doença expostos apresentavam ser jovens e outros velhos, sendo os mesmos retirados do caule da espécie *Khaya ivorensis* doente e guardados em jornais para evitar o contato com a umidade do ar.

Foi coletada também uma amostra do caule, tanto da espécie doente como da espécie sadia, de aproximadamente 12 x 16 cm de tamanho. Estes materiais foram armazenados em sacos autoclavados (estéril) em um isopor contendo gelo para melhor conservação e evitar o ataque de outros microorganismos.

A coleta foi auxiliada pelo Dr. Manfred Willy Muller. Além do material para isolamento do fungo, também foi coletada a espécie *Khaya ivorensis* (doente) sintomática ao fungo e a não sintomática (sadia). *Khaya ivorensis* sintomática ao fungo foi estudada no Laboratório de Química dos Produtos Naturais da UFSCar pela aluna de Doutorado Karine Valadares Guimarães.



FIGURA 3.1: Foto da espécie *k. ivorensis*, a qual foi coletado o material para estudo (plantio junho/99)

3. 4 – Metodologias para isolamento dos fungos

3. 4.1 – Meios de cultura para Isolamento dos fungos

Foram preparados cinco meios diferentes de cultura para o isolamento dos fungos: batata-dextrose-ágar acrescido de 0,2% de extrato de levedura (BDA); aveia; Sabouroid; cenoura-ágar (CNA) e um meio com a cultura da planta como substrato para auxiliar no isolamento do patógeno. A forma de preparo dos meios está descrita abaixo.

a) Meio BDA

Para 1 litro de meio BDA:

200g de batata portuguesa (sem casca).

20g de dextrose.

15g de Agar.

1L de água destilada.

b) Meio de Cenoura (CNA)

Para preparação de 1 litro de meio CNA:

300g de cenoura (sem casca).

20g de dextrose.

15g de Agar.

1 L de água destilada.

c) Meio de Aveia (AV)

Para preparação de 1 litro de meio Aveia:

40g de aveia.

20g de dextrose.

15g de Agar.

Em copos Becker foram cozidos separadamente a batata, a cenoura e a aveia e em seguida o material foi filtrado. Ao filtrado foi acrescentado a dextrose e o extrato de levedura, completando-se 1 litro com água destilada. O material foi dividido em 4 alíquotas de 250mL em frascos de Erlenmeyer de 500mL e acrescentou-se o agar. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave à temperatura de 121⁰C, à pressão de 1 atm por 12-15 minutos.

d) Meio Sabouroud (SAB)

Para preparação de 1 litro de meio Sabouroud:

30g de Sabouroud.

20g de dextrose.

15g de ágar.

1L de água destilada.

Solubilizou-se o Sabouroud em 1 litro de água e aos poucos foi acrescentado a dextrose. Dividiu-se em 4 alíquotas de 250mL em frascos de Erlenmeyer de 500mL e acrescentou-se o ágar. Depois o meio foi esterelizado no autoclave à temperatura de 121⁰C e pressão de 1 atm por 12-15 minutos.

e) Meio *Khaya* (MK)

Para preparação de 1 litro de meio *Khaya*:

40g do caule *Khaya*.

20g de dextrose.

15g de Agar.

1L de água destilada.

Cozinhou-se a *Khaya* e posteriormente o material vegetal foi filtrado. Ao filtrado foi adicionado água até completar 1L e aos poucos, foi acrescentado a dextrose e o agar. O meio foi esterelizado no autoclave à temperatura de 121⁰C e pressão de 1 atm por 12-15 minutos.

Solução estoque de antibiótico (Terramicina)

Uma cápsula de Terramicina de 500mg foi solubilizada em 5 mL de álcool 70 %, acrescentou-se 5 mL de água estéril para solução estoque. O antibiótico foi adicionado aos meios de cultura na proporção de 0,4 mL da solução estoque para cada 200 mL de meio, obtendo-se uma concentração final de 100 µg/mL, afim de inibir o crescimento bacteriano.

Os meios de culturas com o antibiótico foram distribuídos em placas de petri. Após a solidificação dos meios, foram adicionados fragmentos do caule (5mm x 5mm) de plantas sadias com assepsia e de plantas doentes com e sem assepsia. Inoculou-se também, fragmentos das lesões denominados velhos e novos devido à progressão da doença na planta. As placas de petri foram incubadas à temperatura

de 25⁰C e acompanhadas por 30 dias consecutivos. Todo o experimento foi realizado dentro da capela de fluxo laminar, com material esterilizado e em triplicata. Posteriormente foi realizado um novo isolamento das lesões novas e velhas com assepsia para confirmação dos dados obtidos. Na Figura 3.2 e no Fluxograma 3.1 estão representados a fase de assepsia e isolamentos dos fungos e a Figura 3.3 ilustra os fragmentos do caule nas placas de petri para os isolamentos dos patógenos.

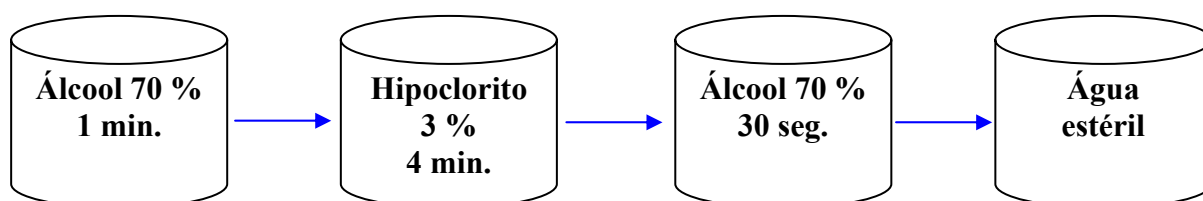


FIGURA 3.2: Esquema de assepsia.

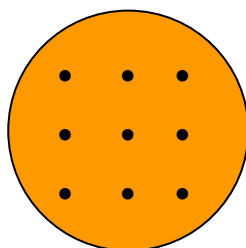


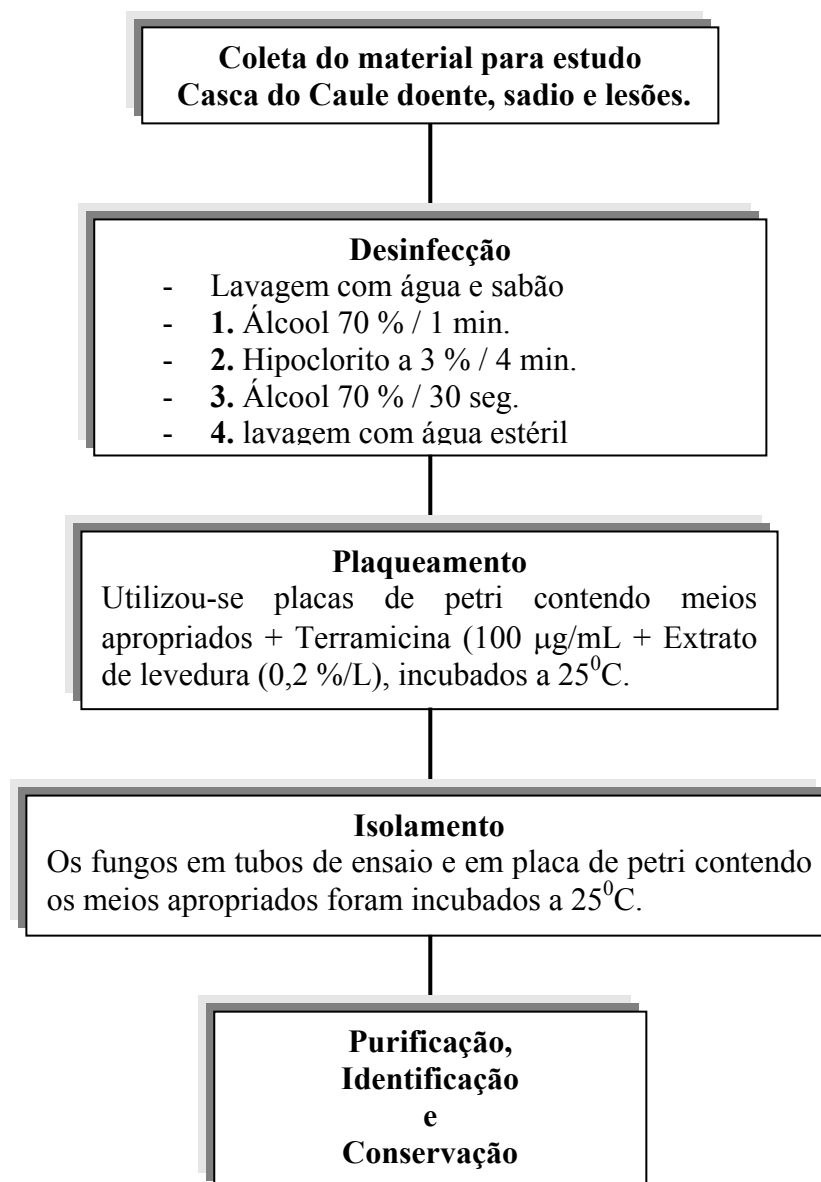
FIGURA 3.3: Esquema de Inoculação dos fragmentos do caule em placas de petri.

As placas foram observadas diariamente e, tão logo os fungos iniciaram seu crescimento, pequenos fragmentos de micélios foram repicados várias vezes em outras placas de petri até se ter uma cultura mais ou menos pura. Os fungos que pareciam estar puro foram repicados para tubos de ensaio previamente identificados com os códigos adotados de acordo com o material de onde foram isolados. Os tubos que continham o meio BDA inclinado foram incubados a temperatura ambiente e assim que estes apresentavam esporos foi feito lâminas para certificar que realmente se tinha apenas um fungo, caso contrário este seria purificado sendo repicado novamente em placa de petri contendo meio BDA.

3.4.2 – Identificação dos fungos isolados

A identificação dos fungos isolados foi realizada pela análise de suas estruturas de reprodução sexual e assexual. Os fungos que, mesmo nessas condições, permaneceram na sua forma miceliana não puderam ser identificados. Estes fungos foram identificados pela Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza.

Os fragmentos dos fungos foram fixados e corados em lactofenol, para análise de suas características morfológicas e estruturas reprodutivas utilizando microscópico ótico. Após a identificação dos fungos isolados de *Khaya ivorensis* foi realizado o estudo fitoquímico do patógeno.



FLUXOGRAMA 3.1: Isolamento dos fungos

3. 5 – Estudo Fitoquímico de *Botryosphaeria rhodina*

Para o estudo químico de *B. rhodina*, fez-se o crescimento em meio sólido (arroz) e em meio líquido. Foram inoculados 6 fragmentos de BDA contendo hifas dos fungos ou 50µL de suspensão de esporos, em 200mL de meio líquido e 90g de meio sólido em frascos de Erlenmeyer de 500mL. Em seguida, os materiais foram incubados a temperatura ambiente no escuro.

3. 5.1 – Crescimento em meio sólido e líquido

A linhagem de *Botryosphaeria* foi reativada em BDA e depois foi inoculada em meio sólido e em um meio líquido específico (MIERSCH, *et al.*, 1987, 1989, 1991).

– Procedimento para preparação do meio sólido

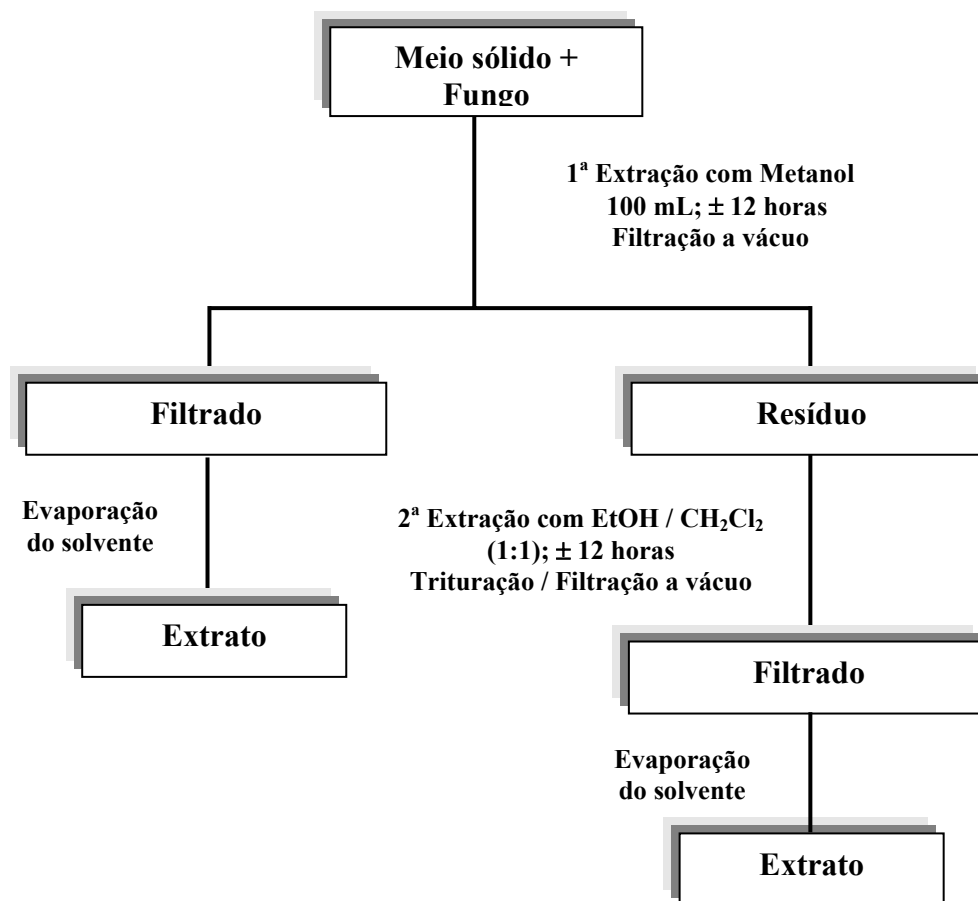
Para o crescimento dos fungos foram utilizados 15 frascos de Erlenmeyer de 1000 mL, onde colocou-se 200 g de arroz e posteriormente foi adicionado 165 mL de água destilada, os frascos foram tampados e autoclavados duas vezes com duração de 40 minutos cada. Destes, dois serviram como branco e nos frascos restantes foram inoculados os fungos.

O fungo cresceu durante 40 dias em meio sólido, sendo necessário às vezes, agitá-los para melhor homogeneização.

Processo de Extração

Após 40 dias, os frascos foram colocados na capela de fluxo laminar e acrescidos de 80 mL de metanol deixando por um período de 12:00 h para matar totalmente os microorganismos e ajudar na obtenção dos metabólitos intracelulares, em seguida, adicionou-se uma mistura de 100 mL de metanol/diclorometano (1:1) e após 12 h triturou-se o material fungico, repetindo-se o procedimento de extração e filtrações a vácuo. Os extratos obtidos foram concentrados em rota evaporadores

(Fluxograma 3.2, p. 32). Depois de concentrados, os extratos foram analisados por CCDC.



FLUXOGRAMA 3.2: Extração do meio sólido

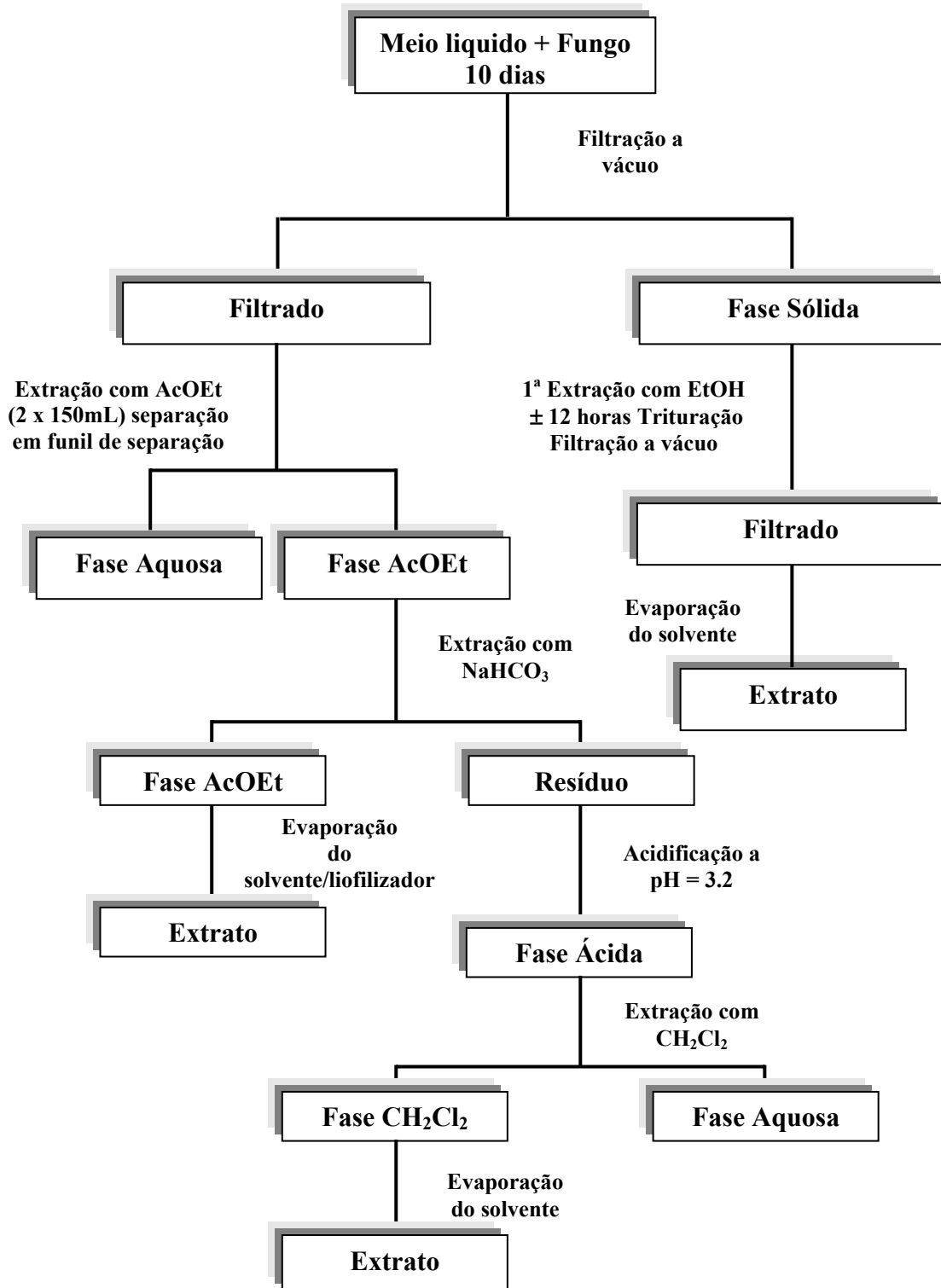
Para o crescimento do fungo em meio líquido utilizou-se 30 g de sacarose; 5g de farinha de soja; 15mL de caldo de milho e 100 mL de solução de sais minerais (Tabela 3.1, p. 33), diluídos para um litro de água. Posteriormente, foi ajustado a solução para pH 5,58 com HCl 0,1M, em seguida, 200 mL do meio foram distribuídos em 48 frascos de Erlenmeyer de 500 mL, que foram autoclavados duas vezes por 20 minutos cada. Neste caso os fungos foram cultivados por 10 dias.

TABELA 3.1: Sais minerais utilizados na solução nutritiva

Reagente	Quantidade
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,8 mg

A extração do meio líquido foi feita com base em dados encontrados na literatura (MIERSCH *et al.*, 1987, 1989, 1991). Os frascos de Erlenmeyer, contendo o meio, foram colocados na capela de fluxo laminar e realizou-se uma filtração à vácuo, os filtrado foi transferido para funil de separação e posteriormente foi extraído com acetato de etila e esta foi extraída com NaHCO_3 , separando-se a fase orgânica e a fase aquosa. A fase aquosa do meio foi extraída duas vezes com 150 mL de acetato de etila em funil de separação e a fase orgânica foi tratada com bicarbonato de sódio 0,1 M, a fim de se separar os compostos ácidos. O pH do resíduo de bicarbonato de sódio foi ajustado para 3,2, e posteriormente fez-se a extração desta fase com diclorometano. As soluções obtidas foram concentradas em rota evaporadores, obtendo-se assim os extratos (Fluxograma 3.3, p.34).

O micélio do meio líquido foi deixado em contato com etanol durante 12 horas, em seguida foi triturado e realizando a extração com etanol três vezes, obtendo-se assim seu extrato (Fluxograma 3.3, p.34).



FLUXOGRAMA 3.3: Extração do meio líquido (MIERSCH, *et al.*, 1987, 1989, 1991)

3. 5.2 – Fracionamento dos extratos brutos

Fracionamento do extrato metanólico de *Botryosphaeria rhodina* crescido em meio sólido

Uma parte do extrato metanólico (2,5 g) de *Botryosphaeria rhodina* crescido em meio sólido foi fracionado em uma coluna a pressão reduzida, utilizando-se como fase estacionária sílica-gel e como fase móvel hexano/diclorometano/metanol em ordem de polaridade crescente, obtendo-se assim um total de 16 frações, as quais foram reunidas obtendo-se um total de 9 frações finais. Da extração com diclorometano/metanol, fracionou-se a fração BA2-11 (*Botryosphaeria* meio sólido) em coluna cromatográfica utilizando-se sílica gel 230-400 mesh como fase estacionária e hexano/diclorometano/metanol como fase móvel, isolando-se assim a substância BA2-11-15 (**S8**). A fração BA2-11-3 foi submetida à CCDP em um sistema de hexano/diclorometano (1:1), resultando no isolamento de BA2-11-3a (**S11**). A fração BA2-10, foi fracionada em coluna cromatográfica utilizando-se o mesmo sistema de solvente, isolando-se a substância BA2-10-5 (**S16**). As frações BA2-9 e BA2-17 foram fracionadas, obtendo-se as substâncias BA2-9-6 (**S10**), BA2-9-8 (**S12**), BA2-17-6a (**S13**) e BA2-17-6b (**S14**) (Fluxograma 3.4, p. 38).

Fracionamento do extrato diclorometânico oriundo da extração ácido-base do meio líquido de *Botryosphaeria rhodina*

O extrato diclorometânico (0,54 g) obtido da extração do meio líquido foi submetido a um fracionamento em coluna de sephadex LH-20, utilizando-se metanol como fase móvel. Deste fracionamento, obteve-se 11 frações, sendo as frações BLD 5 e BLD 6 (*Botryosphaeria* meio líquido extrato diclorometânico) fracionadas em CC usando sílica gel 230-400 mesh como fase estacionária e hexano/diclorometano/metanol como fase móvel em ordem de polaridade crescente. Dos sucessivos fracionamentos foram isoladas as substâncias BLD 5-6-4 (**S6**), BLD 6-4 (**S4-5**) e BLD 6-2 (**S4**) (Fluxograma 3.5, p. 39).

Partição líquido-líquido do extrato etanólico do micélio obtido do meio líquido

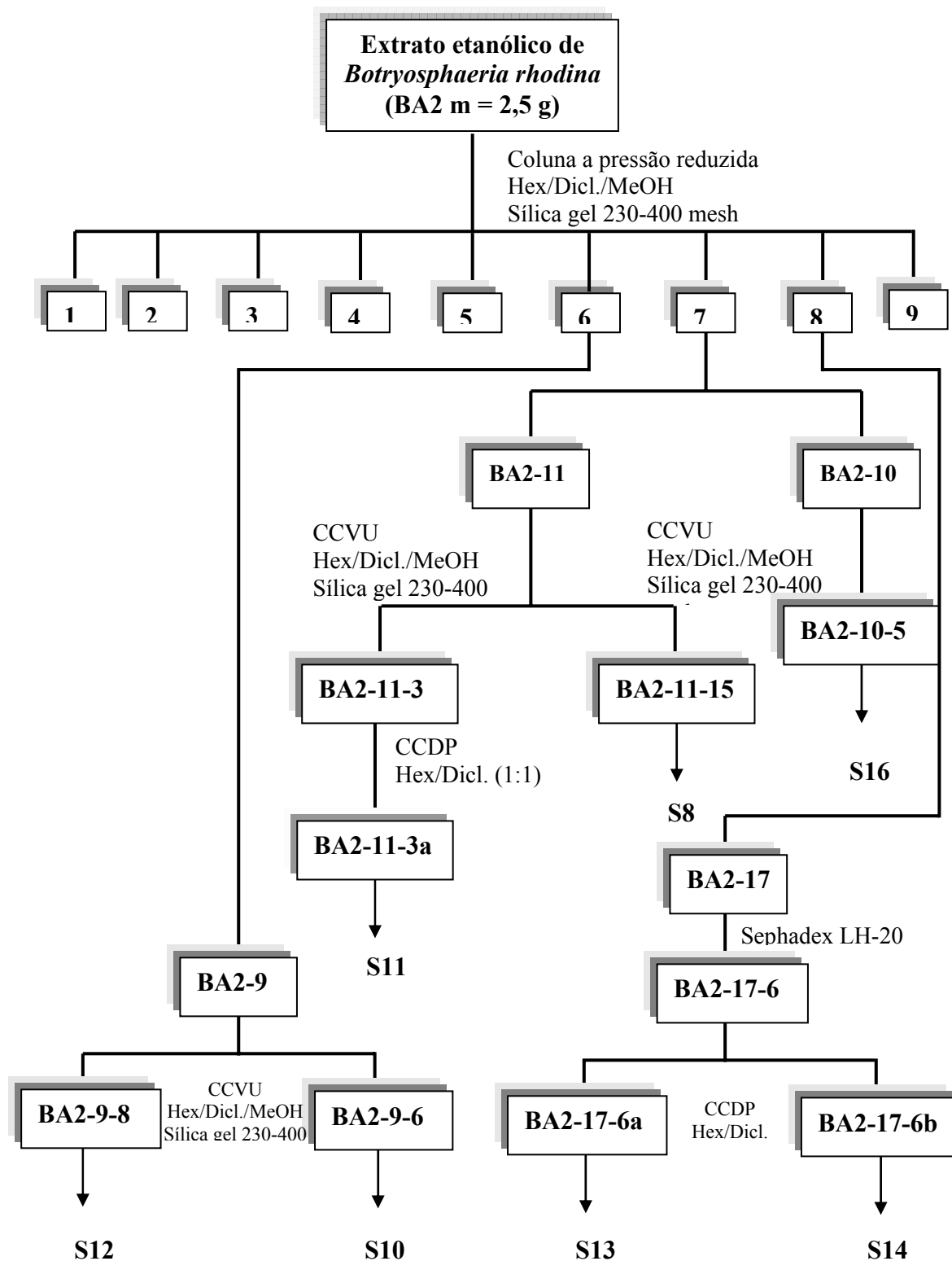
O extrato etanólico do micélio (9,98 g) foi dissolvido em uma mistura de MeOH – H₂O (3:1) e submetido a partição líquido-líquido, com hexano, diclorometano e acetato de etila, sucessivamente (Fluxograma 3.6, p. 40). A fração hexânica (0,83 g) foi fracionada em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase estacionária sílica gel 230-400 mesh e como fase móvel hexano/diclorometano/metanol, isolando-se a substância BMH 9 (*Botryosphaeria* extrato metanólico/fase hexânica) (**S9**). Do fracionamento em sílica-gel da fração BMH-12 isolou-se a substância BMH-12-3 (**S1**). A fração acetato de etila (0,0556 g) foi fracionada em coluna sephadex LH – 20, utilizando metanol como fase móvel, foram obtidas um total de 8 frações. A fração BMA 7 (*Botryosphaeria* extrato metanólico/fase acetato de etila) foi fracionada em coluna cromatográfica com o sistema de solvente 80% acetona e 20% de metanol, resultando em 7 frações. A fração BMA 7-5 foi lavada com diclorometano obtendo-se um precipitado que foi identificado como sendo a substância BMA 7-5p (**S15**) (Fluxograma 3.8, p. 42).

A fração diclorometânica (1,71 g) obtida da partição foi fracionada em coluna cromatográfica utilizando-se sílica gel 230-400 mesh e hexano/diclorometano/metanol como fase móvel, sendo que as frações BMD4, BMD9, BMD8 e BMD5 (*Botryosphaeria* extrato metanólico/fase diclorometânica) foram submetidas à CCDP utilizando-se hexano/acetato de etila 10, 20, 15 e 10 % respectivamente, como eluente, resultando no isolamento das substâncias BMD 4a (**S3**), BMD 9a (**S1**), BMD8-1 (**S2**) e BMD5-4 (**S2**). A fração BMD 17 também foi fracionada em coluna cromatográfica utilizando como suporte sílica gel 230-400 mesh e como fase móvel hexano/acetato etila obtendo-se um total de 13 frações e resultando no isolamento da substância BMD 17-7 (**S6**) (Fluxograma 3.7, p. 41).

Fracionamento da fase diclorometânica do meio sólido em cromatografia contracorrente

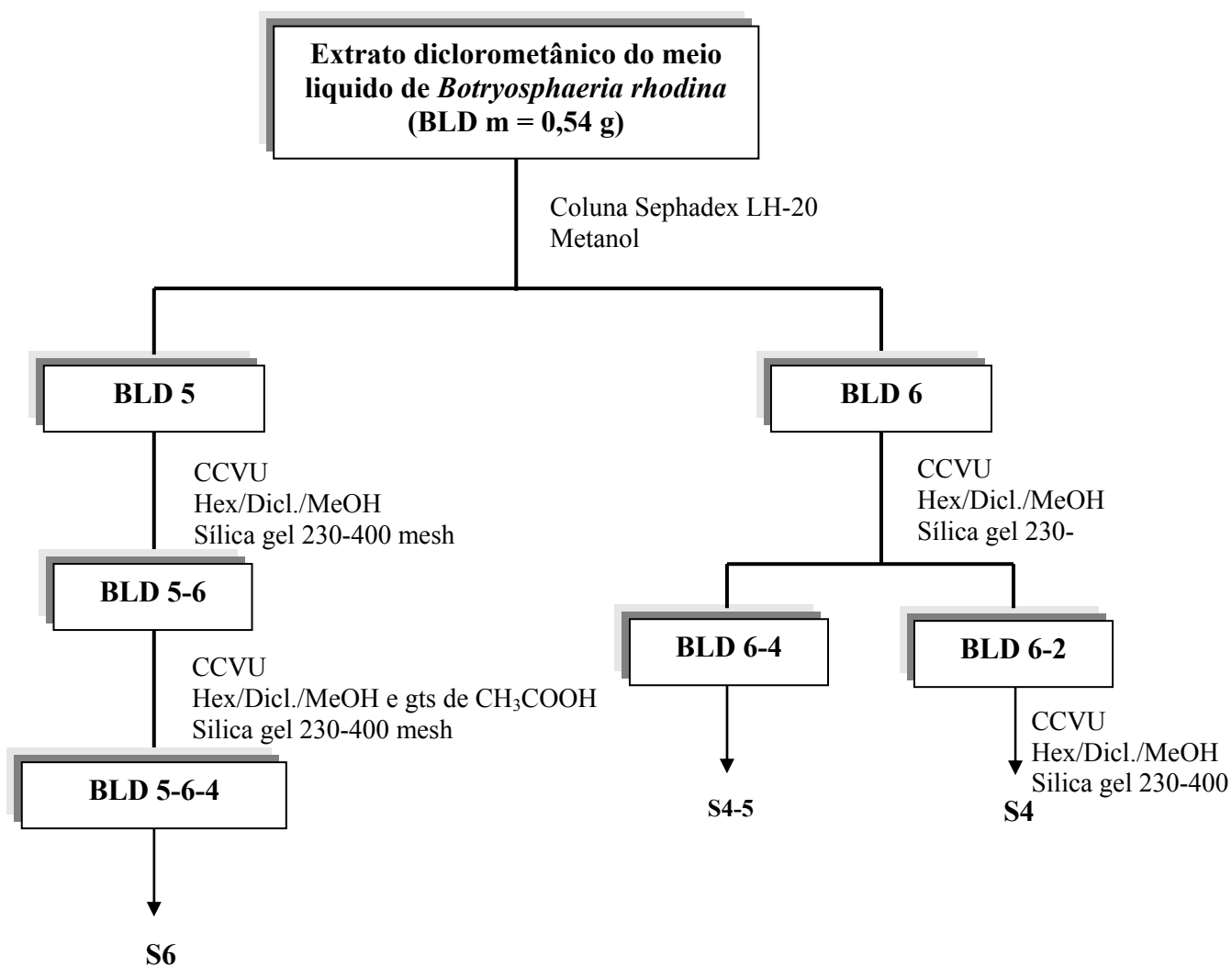
O isolamento de **S7** foi realizado através da HSCCC, utilizando-se como sistema de solvente Hexano/acetato de etila/Metanol/Água (50:100:50:50 v/v/v/v), sendo a fase superior a móvel e a inferior a estacionária. A otimização do sistema de solventes foi realizada com base em CCDA e partição líquido-líquido de pequenas quantidades da amostra.

O equipamento utilizado possui quatro colunas, mas foram utilizadas apenas as duas primeiras colunas de 50 e 200 mL. As colunas foram conectadas em cabeça – calda, primeiro foram preenchidas com a fase estacionária numa rotação de 793 rpm e depois com a fase móvel num fluxo de 2 mL/min, o loop utilizado foi de 500 µL, o comprimento de onda utilizado foi de 254 nm. A substância eluiu nas frações 25 – 27.

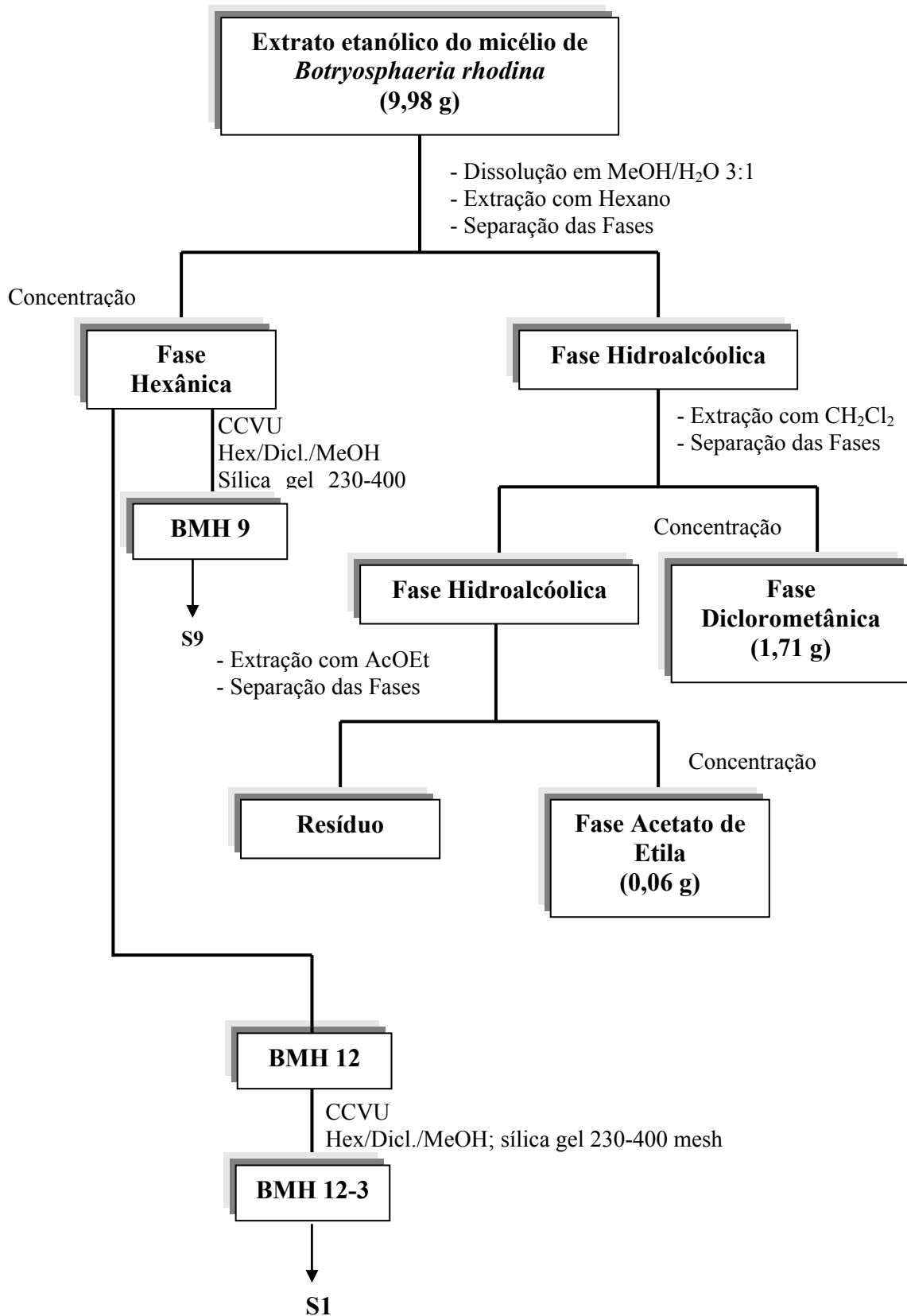


- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 1- Hexano 100% | 6- Diclorometano/Metanol (9:1) |
| 2- Hexano/Diclorometano (9:1) | 7- Diclorometano/Metanol (3:7) |
| 3- Hexano/Diclorometano (7:3) | 8- Diclorometano/Metanol (7:3) |
| 4- Hexano/Diclorometano (3:7) | 9- Metanol (100%) |
| 5- Diclorometano (100%) | |

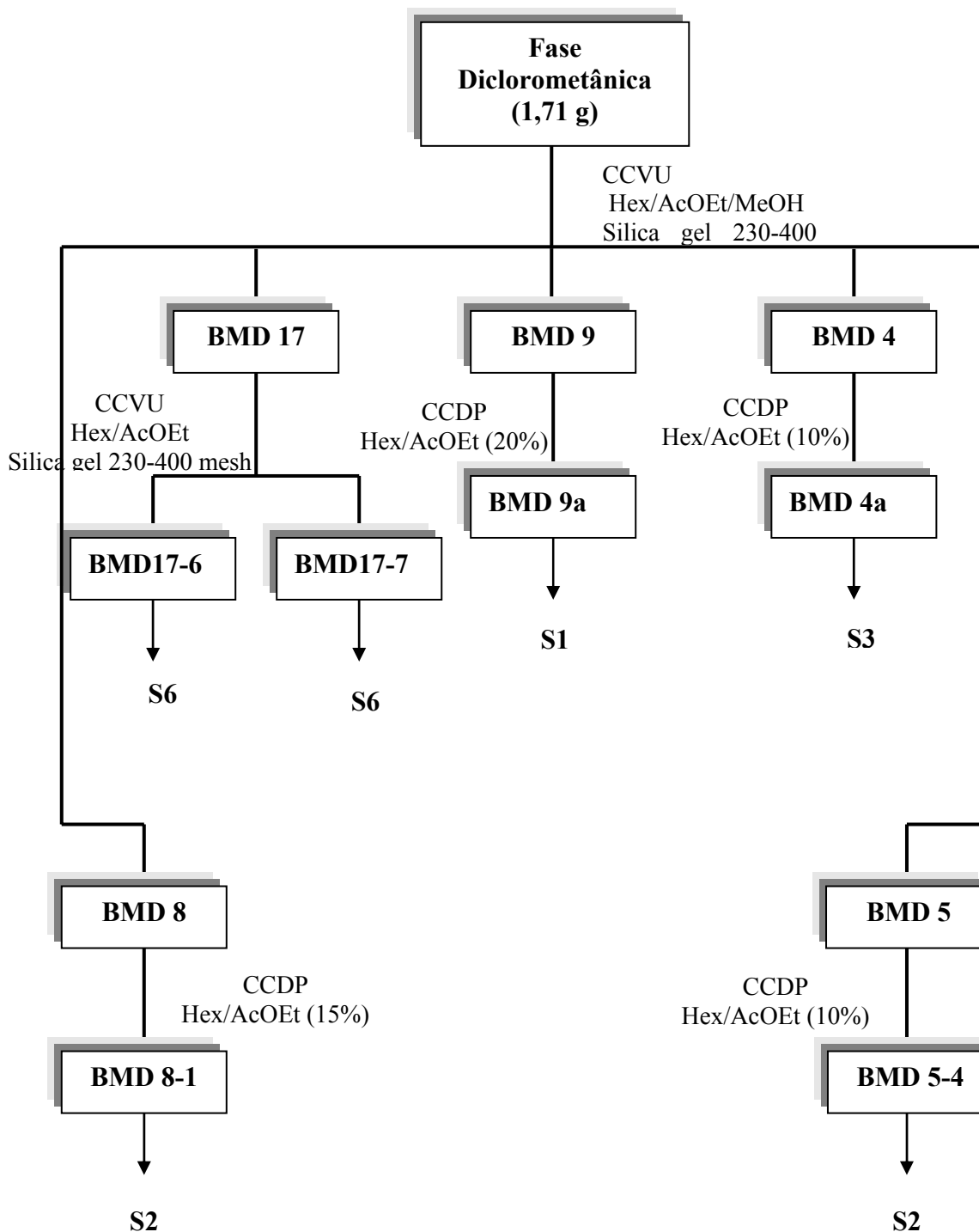
FLUXOGRAMA 3.4: Fracionamento do extrato etanólico de *Botryosphaeria rhodina* crescido em meio sólido (primeira extração)



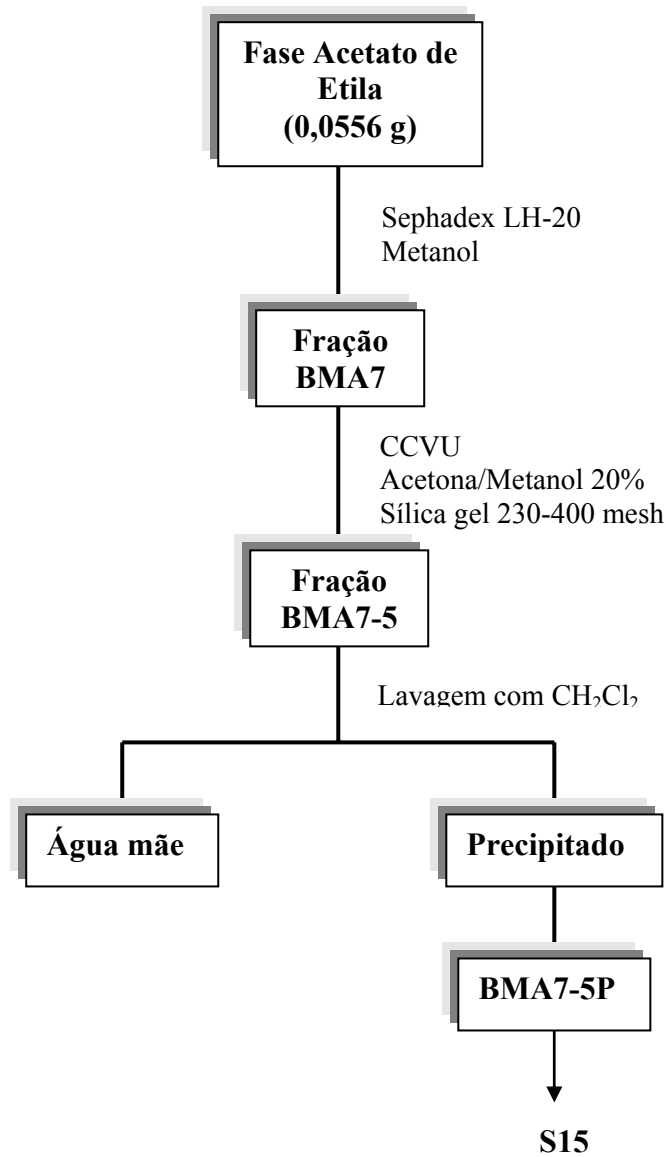
FLUXOGRAMA 3.5: Fracionamento do extrato diclorometânico oriundo da extração ácido-base do meio líquido de *Botryosphaeria rhodina*.



FLUXOGRAMA 3.6: Partição líquido-líquido do extrato etanólico do micélio



FLUXOGRAMA 3.7: Fracionamento do extrato diclorometânico oriundo da partição líquido-líquido.



FLUXOGRAMA 3.8: Fracionamento do extrato acetato de etila oriundo da partição líquido-líquido

3. 6 – Reações químicas realizadas com algumas substâncias isoladas

Acetilação

A reação de acetilação foi feita com a fração BMA7-5p (4,0 mg) adicionando-se anidrido acético e piridina, 1,0 e 1,5 mL respectivamente. A mistura reacional foi deixada sobre agitação por aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. Fez-se a extração com o solvente acetato de etila, após a adição de água destilada. A fase orgânica foi lavada com solução de ácido clorídrico 10% para eliminação do excesso de piridina. O solvente foi evaporado após a secagem com sulfato de sódio anidro.

Transesterificação

Em balão de fundo redondo, contendo 6,0 mg de ATPS, adicionou-se 30,0 mg do composto a sofrer a reação, diluído em 2,0 mL de metanol. A mistura foi aquecida a temperatura de 50⁰C e agitada com refluxo durante 12 horas, o solvente em seguida foi evaporado em rota evaporador. O material obtido lavado para a retirada do ácido.

3. 7 – Experimento de Biotransformação

Nestes experimentos foram utilizadas três linhagens de fungos isolados de *Khaya ivorensis*, sendo eles: *Botryosphaeria rhodina*, *Penicillium sp.*, *Phomopsis sojae*. Como substrato foram utilizados os limonóides angolesato de metila, isolado em grande quantidade da espécie *Khaya ivorensis* atacada pelo fungo, e o 7-desacetoxi-7-oxo-gedunina isolado de *Carapa guianensis*.

Os fungos foram reativados em placas de petri contendo o meio BDA mais o antibiótico terramicina.

Meio de cultura para crescimento dos fungos frente aos substratos

Utilizou-se o meio líquido C'zarpeks para crescimento dos fungos: NaNO_3 (3,0g), K_2HPO_4 (1,0g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO_4 (0,1g), glucose (25g) e extrato de levedura (20g), que foram diluídos para um litro de água. A diminuição da fonte de carbono, ou seja, de glucose foi para induzir os fungos a modificarem os substratos dados a eles.

Ensaio de Toxicidade e Degradação

Para verificar se os solventes (Diclorometano e DMSO), nos quais os substratos foram solubilizados eram tóxicos aos fungos, fez-se um teste de toxicidade, ou seja, os fungos foram inoculados em placas de petri durante sete dias e posteriormente foram colocados fragmentos dos mesmos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura e 2mL de diclorometano em um experimento e DMSO para um segundo. Após um período de 15 dias, observou-se o crescimento dos fungos, tornando-se viável utilizar um dos dois solventes para o experimento. O solvente utilizado foi o diclorometano, devido os substratos não serem totalmente solúveis em DMSO.

Após verificar que os solventes não eram tóxicos aos fungos, foi necessário verificar se os substratos não degradariam a uma temperatura alta quando autoclavados no meio de cultura + fungo + substrato. Isto foi feito e observou-se através de cromatografia em camada delgada comparativa e RMN ^1H que não houve degradação dos substratos.

Início do Experimento

Os experimentos foram feitos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL sendo distribuídos da seguinte forma:

Frasco 1 – Meio de cultura

Frasco 2 – Meio de cultura + fungo

Frasco 3 – Meio de cultura + substância

Frasco 4 – Meio de cultura + fungo + substância

Os experimentos foram feitos em duplicatas, num total de 6 frascos de cada meio, conforme mencionado acima, totalizando 48 frascos por experimento. Os frascos foram retirados de dois em dois, a cada 5 dias. Em cada Erlenmeyer foi adicionado 150 mL de meio de cultura.

Utilizou-se 10,0 mg de cada substrato, diluídos em 1,0 mL de diclorometano, que foram posteriormente adicionados ao meio de cultura e autoclavados. Os frascos ficaram na mesa agitadora durante 15 dias a 120 rpm (Figura 3.4, p. 45).



FIGURA 3. 4: Experimento de biotransformação com o fungo *Botryosphaeria rhodina*

Extração do meio reacional

As extrações foram feitas em cinco, dez e quinze dias (Tabela 3.2, p. 46). Nos frascos 2 e 4 que continham fungo foi adicionado 10,0 g de NaCl para matar os fungos e após quatro horas foram realizadas as extrações, utilizando acetato de etila três vezes e em seguida etanol. Posteriormente esses extratos foram evaporados em rota evaporador.

TABELA 3. 2: Extração dos meios reacionais de biotransformação

	1 ^o Exp. <i>B. rhodina</i> subst. A*	2 ^o Exp. <i>B. rhodina</i> subst. B*	2 ^o Exp. <i>Penicillium</i> sp. subst. A*	2 ^o Exp. <i>Penicillium</i> sp. subst. B*	5 ^o Exp. <i>P. sojae</i> subst. A*	6 ^o Exp. <i>P. sojae</i> subst. B*
DIAS	19/09	1 ^a extração				
	24/09	2 ^a extração				
	29/09	3 ^a extração				
	04/10		1 ^a extração			
	09/10		2 ^a extração			
	14/10		3 ^a extração			
	19/10			1 ^a extração		
	24/10			2 ^a extração		
	29/10			3 ^a extração		
	03/11				1 ^a extração	
	17/11				2 ^a extração	
	21/11				3 ^a extração	
	26/11					1 ^a extração
	01/12					2 ^a extração
	06/12					3 ^a extração
	11/12					
16/12						2 ^a extração
21/12						3 ^a extração

A* (Angolesato de metila), B* (7-desacetoxi-7oxo-gedunina)

Pré – purificação dos extratos

Após a extração dos extratos com acetato de etila e etanol, os meios reacionais contendo meio + fungo e meio + fungo + substrato foram pré – purificados em coluna cromatografia, usando como suporte sílica gel e os sistemas de solvente hexano/ diclorometano (7:3 e 3:7) e diclorometano e metanol (7:3 e 3:7).

Após a evaporação do solvente as frações foram pesadas obtendo-se uma quantidade pequena de massa, posteriormente foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa, para verificar o aparecimento ou não dos padrões utilizados na reação. Após a análise prévia por CCD, foi realizado um screening das 122 amostras por LC/MS, a fim de verificar se houve alguma modificação.

As condições das análises por LC/MS: Iniciou-se a corrida com 60% de água e 40% de metanol, por 30 minutos o metanol foi aumentando grandativamente até 100%, o qual ficou passando durante 5 minutos, a coluna foi estabilizada por 15 minutos utilizando-se 60% de água e 40% de metanol para que uma nova injeção fosse realizada. Fluxo constante de 0,8 mL/min na coluna dividindo-se no split e passando 0,3 mL/min para a fonte de ionização do espectrômetro de massas; coluna C18 com partículas de 10 μ m; volume de injeção de 20 μ L.

As demais condições para a análise das amostras por full scan foram;

- a) Eletron spray positivo
- b) Capilar = 3,97 kvolts
- c) Cone = 38 volts
- d) Extrator = 4 volts
- e) Lentes RF = 0,35 volts
- f) Temperatura de solvatação = 300°C
- g) Source Block Temp = 70°C
- h) LM Resolution: 15.0
- i) HM Resolution: 15.0
- j) Fluxo do gás de nebulização = 58 litros/hora
- k) Fluxo do gás de desolvatação = 822 litros/hora
- l) Gradiente

Tempo	Água	Metanol
0,00	60,0	40,0
30,00	0,0	100,0
35,00	0,0	100,0
35,01	60,0	40,0
50,0	60,0	40,0

4 – Resultados e Discussões

4.1 – Resultados Biológicos

Isolamento e Identificação dos Microorganismos

Isolamento

Após a incubação dos fragmentos de *Khaya ivorensis*, verificou-se a presença de hifas que foram transferidas para placas de petri (Figura 4.1, p. 50). No total foram isoladas 139 linhagens de fungos, os quais foram agrupados em sete grupos. Nos fragmentos das plantas não sintomática e sintomática sem assepsia o aparecimento de fungos foi mais rápido do que das plantas com assepsia. Este fato já era esperado devido a muitos microrganismos se encontrarem na parte externa dos tecidos vegetais (epifíticos).

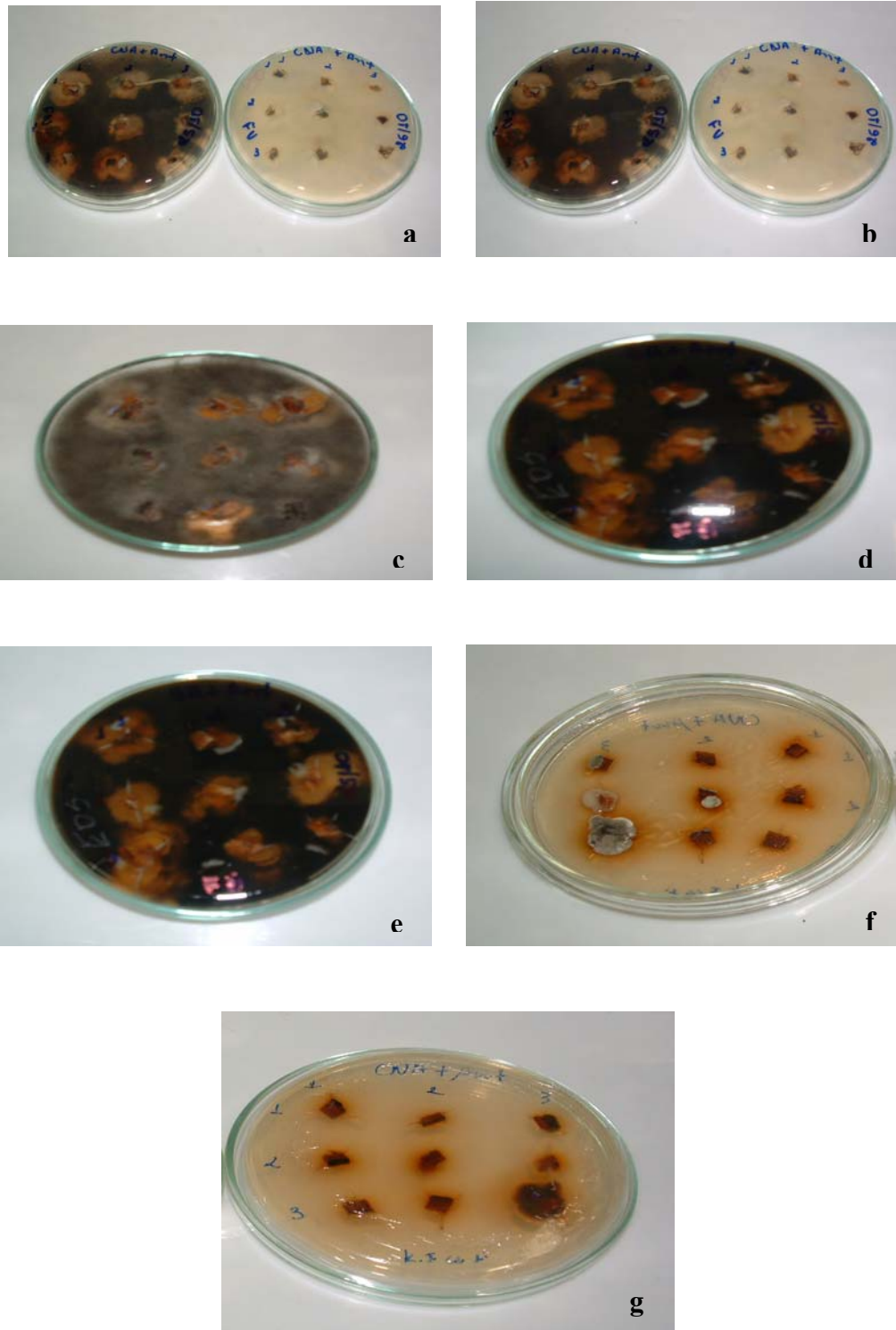


FIGURA 4.1: Placas de Petri com os microrganismos de *Khaya ivorensis*. a, b, e e g em meio de cultura com cenoura f, c e d em meio de cultura com *K. ivorensis* como fonte de carbono.

O gráfico 4.1 (p. 51) apresenta a diferença entre a freqüência relativa de fungos isolados dos fragmentos da planta doente com assepsia (Kice') e sem assepsia (Kice' s/a) frente a sadia com assepsia (Kice). Observou-se uma maior freqüência de fungos na planta sadia do que nos outros dois experimentos com a planta doente, sendo que pode ser que neste material possa ter fungos epifíticos além dos endofíticos. Outro fato interessante é a diversidade de fungos presente na planta sadia quando comparada com a planta doente podendo-se inferir que algum fungo que estar presente no material doente possa ter inibido o crescimento de outros fungos. O mesmo resultado foi encontrado para o isolamento direto das lesões, onde as lesões recentes, chamadas de fungo novo (Kifn), apresentaram uma maior quantidade de fungos isolados que as lesões mais adiantadas, chamadas de fungo velho (Kifv) (Gráfico 4.2, p. 51).

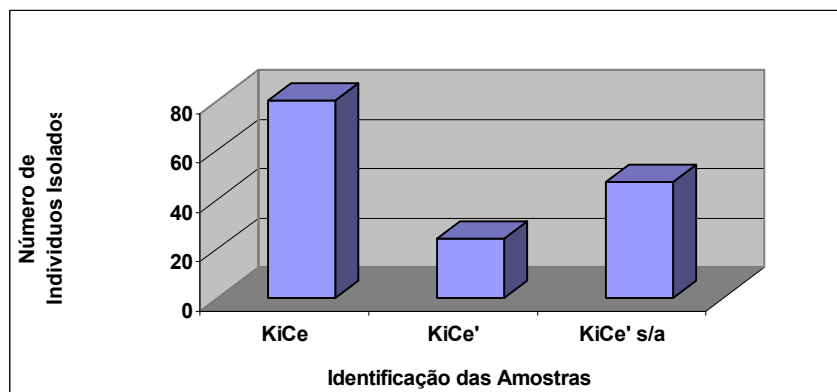


GRÁFICO 4.1: Fungos totais isolados dos materiais de *Khaya ivorensis* doente e sadia.

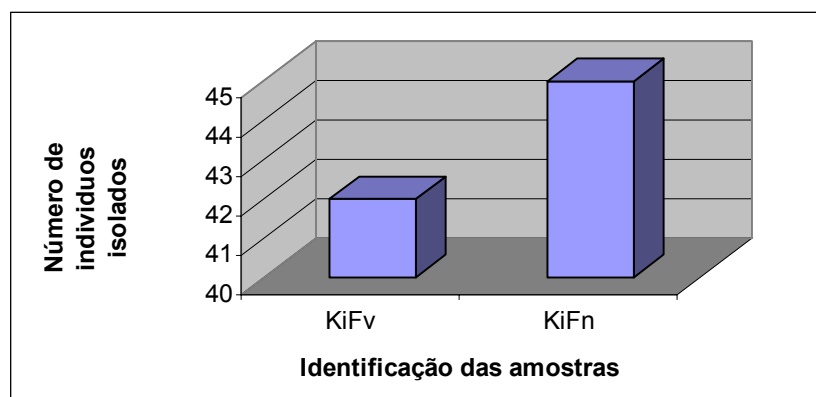


GRÁFICO 4.2: Fungos totais isolados dos materiais denominados fungo novo e velho da espécie *Khaya ivorensis*.

Identificação

A morfologia dos fungos apresentada pelo crescimento miceliano sobre o meio de cultura não foi suficiente para as suas identificações, sendo assim foi necessário fazer uma análise minuciosa dos aspectos morfológicos de suas estruturas reprodutivas.

Os fungos semelhantes foram reunidos (com base nas características macromorfológicas), totalizando sete grupos.

Identificação do grupo I

A presença de esporos (Figura 4.2, p. 53) facilitou a identificação deste fungo, suas colônias caracterizaram-se por apresentar coloração branca, micélio vigoroso, algodinoso e esporulação abundante, em massas negras de conídios. E uma vez que estes esporularam foram feitas lâminas a fresco para observação das estruturas microscópicas vegetativas e reprodutivas em microscópio ótico (Figura 4.3, p. 53). Após a observação de suas estruturas conídias que se caracterizam, com duas ou três células centrais castanho escuro, e com dois ou mais apêndices ou pêlos apicais. Estas características levaram a identificação do fungo como sendo do gênero *Pestalotiopsis*. Este é citado na literatura como sendo um fitopatógeno fraco, oportunista e patógenos pós-colheita de diversas frutas tropicais, como banana, mamão, uva, e laranja (CLAY 1988). No entanto sua maior importância está no fato de muitos indivíduos deste grupo terem sido isolados como endofíticos de plantas do gênero *Taxus* e assim como a hospedeira, produzem taxol, um importante anti-cancerígeno (CARROL 1988). Na Figura 4.2, pode-se observar o microcultivo do fungo *Pestalotiopsis sp.* crescido em meio BDA.

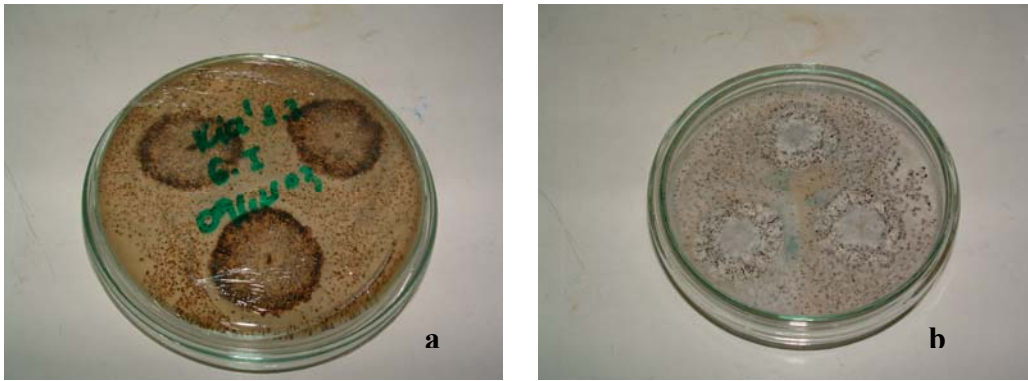


FIGURA 4.2: Microcultivo do fungo *Pestalotiopsis sp.* crescido em meio BDA. Verso (a) e frente (b)

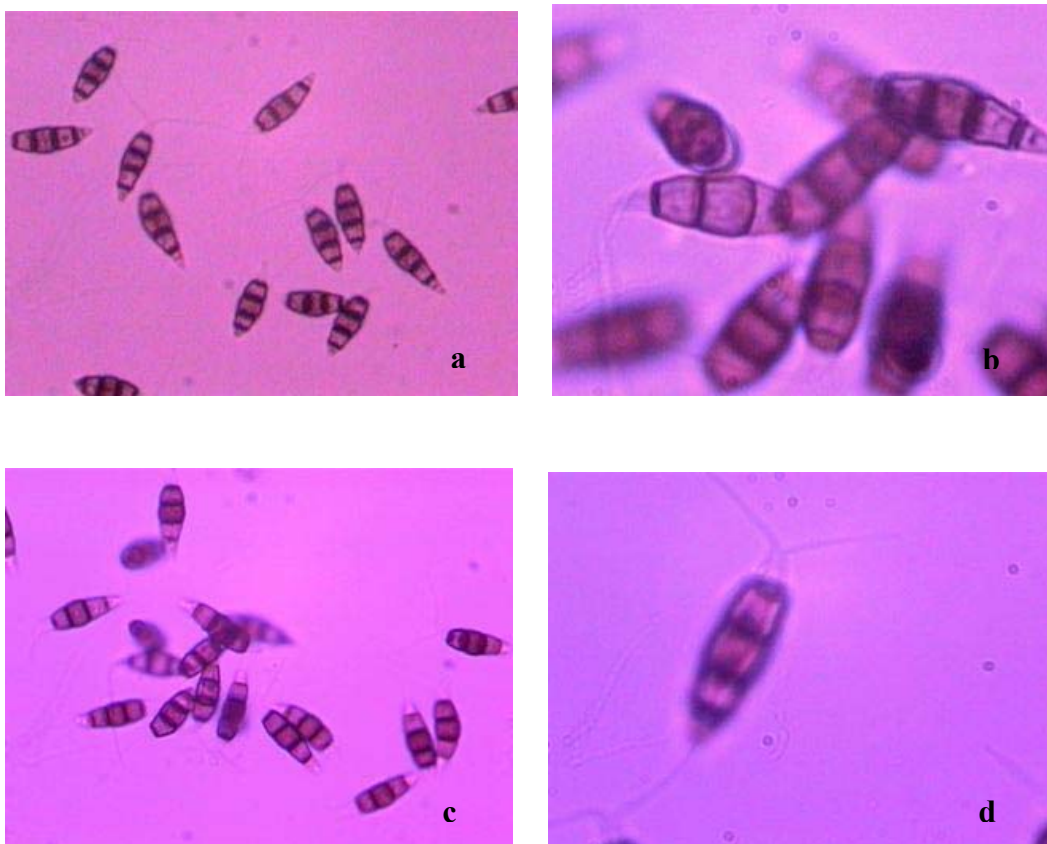


FIGURA 4.3: Microfotografias dos esporos do *Pestalotiopsis sp.*; (a e c) objetiva 40x; (b e d) objetiva 100x.

Identificação do grupo II

Semelhante ao grupo I, foi feita a observação dos indivíduos do grupo II, respeitando apenas um tempo maior por se tratarem de ascomicetos. Estes levaram um tempo maior para a formação de seus ascos. As observações macroscópicas e microscópicas sugerem tratar-se de fungos do gênero *Phomopsis*

(Figura 4.4, p. 54). Apesar de não se ter tirado fotos no microscópico das estruturas conidiais deste fungo para compará-lo com suas características morfológicas encontradas na literatura, mas foi realizado a extração de DNA do mesmo para a identificação exata do microorganismo (ver página 60).

Este gênero é citado na literatura como fitopatígeno de plantas causando necrose no tronco e folhas (SCHULZ *et al.*, 1999; CHAPELA 1989).

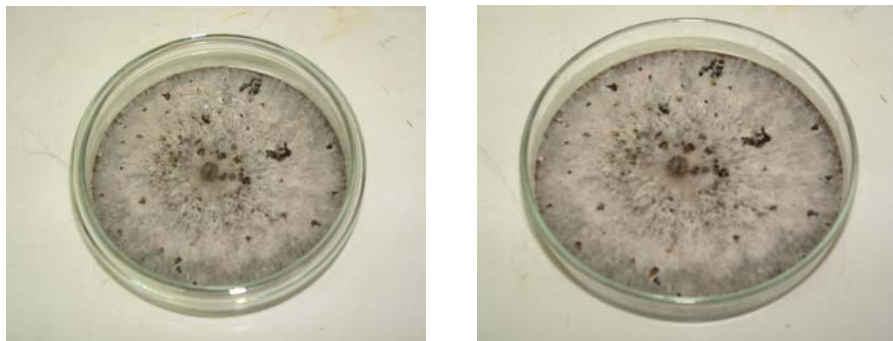


FIGURA 4.4: Microcultivo do fungo *Phomopsis* sp.

Identificação dos grupos III e V.

De todas as identificações feitas para os microorganismos isolados de *Khaya* a deste grupo foi a mais difícil, pois no início das análises observou-se apenas micélios e hifas no microscópio, tanto da linhagem III como da V.

Durante as análises das primeiras lâminas, não foi possível observar nenhum tipo de características que confirmassem os gêneros desses fungos, pois assim como o grupo anterior, estes também não apresentavam esporos. Devido a este fato, as linhagens deste grupo ficaram por mais alguns dias na incubadora (BOD) para verificar-se a esporulação dos mesmos.

Quando os fungos apresentaram esporos, fez-se as lâminas as quais foram observados no microscópio ótico (Figura 4.5, p. 55), a presença dos conídios em formas ovais, as características morfológicas e a consulta de literatura propõe-se que os fungos do grupo III tratavam-se do gênero, *Botryosphaeria* sp.. Esta espécie tem se caracterizado no meio de cultura como colônias marrom-cinzentas em agar com aveia, de micélio negro aéreo denso; conidiomata picinidial agregadas, marrom escuro, unilocular, espesso ou compacto, parede de forma angular marrom escura

de textura compacta; ostiol central, separado, papilado; redução de conidiosporos a celas conidiogenas; celas conidiogenas hialinas, lisa, discreta, determinada ou indeterminada, proliferando com um ou dois anelamentos distintos, formando celas que se enfileiram na parede interna do picnídio; conídio reto, no início hialino e asseptado que se torna marrom escuro e um septado com estriamentos longitudinais irregulares, amplamente arredondados no ápice, truncado na base.

Para confirmar a identificação, foi cedida uma linhagem (Figura 4.6, p. 46) padrão do fungo *Botryodiplodia* sp. pelo Professor Dr. José Odair da UFAM, e através da comparação de suas características macroscópicas e microscópicas chegou-se a conclusão que os fungos do grupo III, tratava-se do fungo *Botryosphaeria* sp.. E no grupo V, observou-se a presença de um ascomiceto que poderia ser a fase assexuada de *Botryosphaeria* chamada de *Lasiodiplodia* sp. As culturas destes fungos foram avaliadas pelo Dr. José Odair e pela Dra. Maria Inez Sarquiz de Moura, curadora da micoteca da FioCruz do Rio de Janeiro, que confirmaram a identificação dos microorganismos.

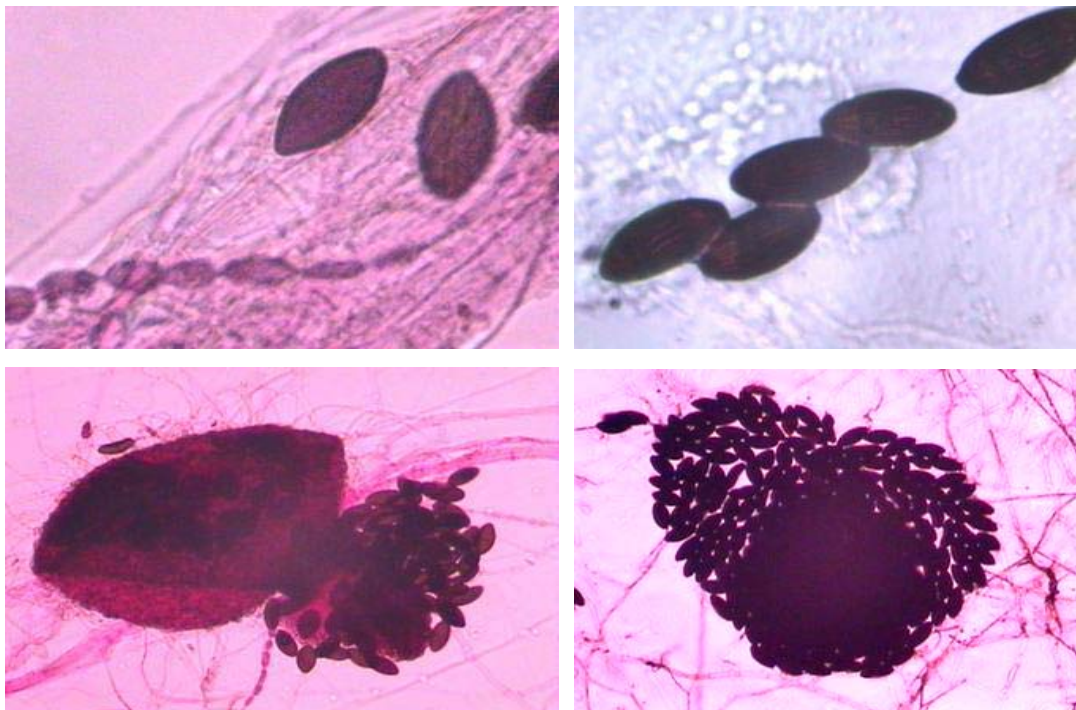


FIGURA 4.5: Microfotografias dos conídios de *Botryosphaeria* sp.

Devida a alta frequência de *Botryosphaeria* sp. nas plantas doentes e nas lesões, foi realizado um novo isolamento das lesões, desta vez com assepsia, para confirmação destes, como possíveis patógenos. De todos os fragmentos

incubados do fungo novo de *K. ivorensis* (Kifn) nasceram *Botryosphaeria* e do fungo denominado velho de *K. ivorensis* (Kifv) o seu anamorfo *Lasiodiplodia sp.*; realizou-se também a extração de DNA destes microorganismos.

De acordo com levantamento bibliográfico realizado, pode-se inferir que o fungo *Botryosphaeria sp.*, era o provável causador da doença observada na espécie *Khaya ivorensis*, causando a perda do crescimento apical da espécie, gerando assim o desenvolvimento de galhos laterais, pois ele é citado na literatura como um fungo patogênico que geralmente afeta as suas plantas hospedeiras penetrando através de feridas e em tecidos em decomposição (SCHULTHESS *et al.*, 1998; JACSON *et al.*, 1996). O fungo aparece freqüentemente nas regiões tropicais e sub-tropicais, onde tem sido identificado como causador de enfermidades em aproximadamente 280 espécies de plantas vasculares, entre as quais se destacam: algodão, cacau, café, cana de açúcar, palma africana, pino, tabaco, mamoneira, etc (PASCHOLATI *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 1999; CARROL *et al.*, 1983).

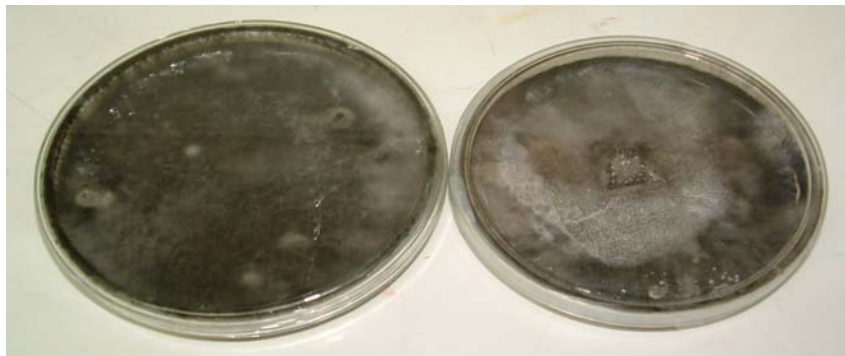


FIGURA 4.6: Microcultivo do fungo *Botryosphaeria sp.*

Identificação do grupo IV

Com a presença de esporos (Figura 4.7, p. 57) deste fungo foram feitas suas lâminas a fresco para observação das estruturas microscópicas vegetativas e reprodutivas em microscópio ótico (Figura 4.8, p. 57). Com isso consultou-se a literatura para verificar qual microorganismo era este, levando a identificação do grupo como sendo o fungo do gênero *Rhizopus*.

Este fungo é considerado como um patógeno humano, e ainda pode causar doenças pós-colheitas em frutos tropicais (HOWARD *et al.*, 1991).

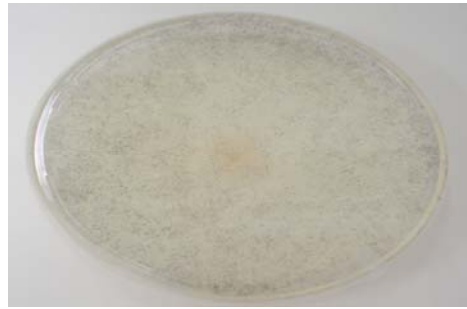


FIGURA 4.7: Microcultivo do fungo *Rhizopus sp.*

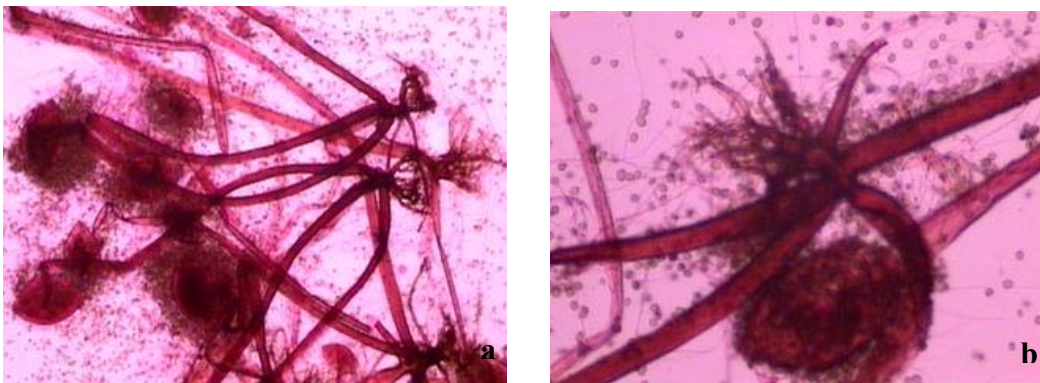


FIGURA 4.8: Microfotografias dos esporos de *Rhizopus sp.* (a) objetiva 40x e (b) objetiva 100x.

Identificação do grupo VI

A esporulação das linhagens do grupo VI foi bem mais rápida (Figura 4.9, p. 58), com isso foram feitas lâminas a fresco para observação das estruturas microscópicas vegetativas e reprodutivas em microscópio ótico (Figura 4. 10, p. 58). As características morfológicas e mais a consulta na literatura, onde é citado que as espécies deste gênero apresentam conidióforo comprido acima do micélio, ramificado próximo do ápice terminando em fiálides formando uma estrutura parecida com uma vassoura, permitiu a identificação do fungo como sendo do gênero *Penicillium*.

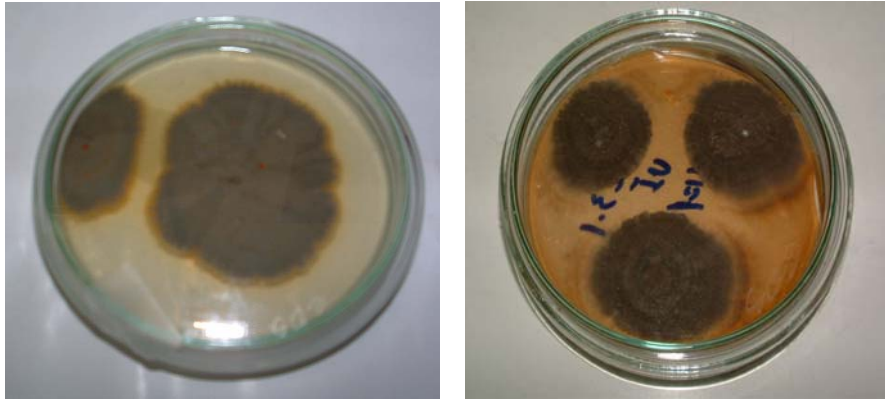


FIGURA 4.9: Microcultivo do fungo *Penicillium sp.*

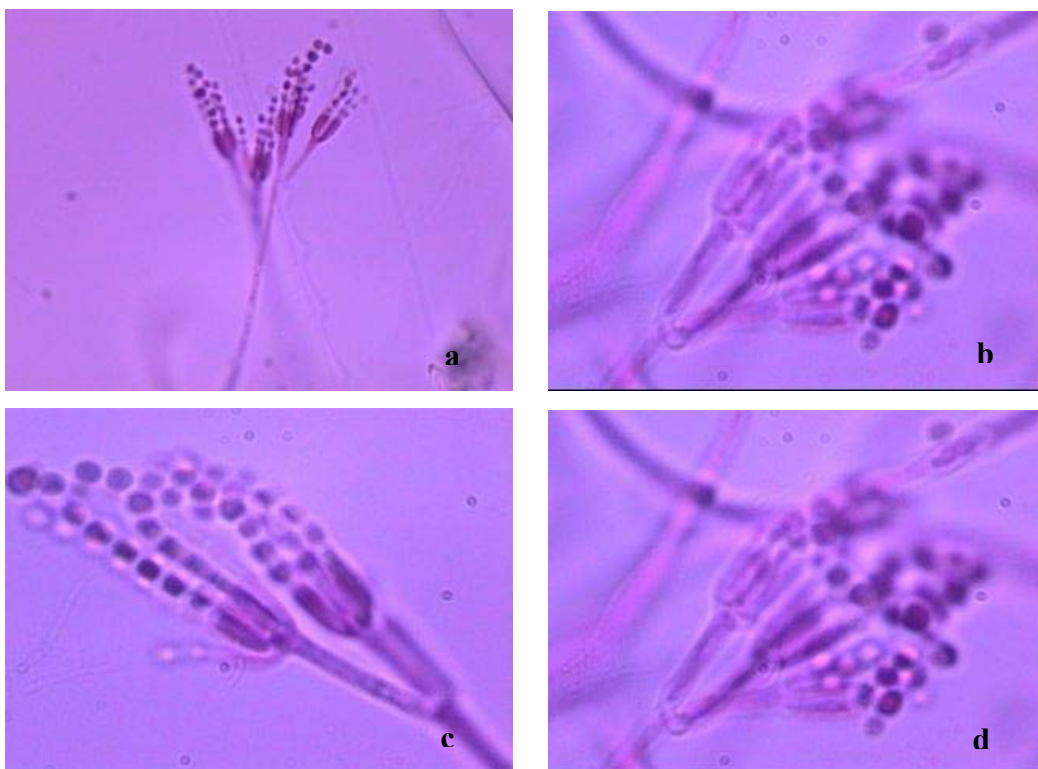


FIGURA 4.10: Microfotografias dos esporos do *Penicillium sp.*(a) lente 40x e (b; c; d) lente 100x.

Esses fungos são economicamente importantes em processos de fermentação, na produção de antibióticos, na decomposição de alimentos e em outros aspectos. Um exemplo é o *Penicillium notatum*, produtor de penicilina (PELCZAR *et al.*, 1981).

Algumas espécies de *Penicillium* tais como *Penicillium decumbens* e *Penicillium citrum*, são capazes de biotransformar esteróides (PINHEIRO *et al.*, 1999), e ainda podem vir a biotransformar outras classes de substâncias. De estudos químicos realizados anteriormente com este fungo, foram isolados alguns

metabólitos tais como: esteroides, xantonas, policetideos, alcalóides, meroterpenos, além de outras classes de substâncias (LI et al., 1998; JARVIS et al., 1996; STIERLE et al., 1995).

De todos os grupos de fungos o único que não foi possível de identificar foi o grupo sete, devido este crescer bem pouco e com isso não esporular.

Porcentagem de fungos isolados dos materiais estudados

O Gráfico 4.3 (p. 59) representa os grupos de fungos encontrados em cada material estudado (Kice, Kice', Kice', KiFn e KiFv). Observou-se que nas amostras de *Khaya ivorensis* Kice, Kice' e Kice' s/a o fungo *Phomopsis sp.* está sempre presente e quanto menor a presença deste, há um aumento da porcentagem do *Botryosphaeria sp.* No material fungo velho (KiFv) e novo (KiFn) observou-se que não há mais incidência do fungo *Phomopsis sp.* e sim do *Rhizophus sp.* e *Botryosphaeria sp.*.

Estas observações levaram a inferir que o provável causador da doença seja o fungo *Botryosphaeria sp.* (Grupo III e V), pois este foi isolado de todas as partes do material inoculado em placas de petri, e que o microorganismo *Phomopsis sp.* (grupo II) poderia estar agindo como um inibidor da proliferação da doença no mogno africano, por um certo tempo de plantio, pois quando se tem somente o material doente o mesmo não está presente.

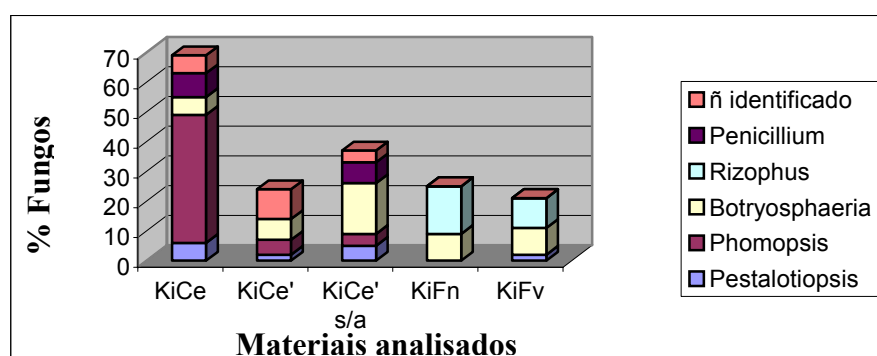


GRÁFICO 4.3: Quantidade de fungos isolados das amostras coletadas.

Extração de DNA

Realizou-se a extração de DNA das linhagens dos fungos *Phomopsis* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Botryosphaeria* sp. e seu anamorfo *Lasiodiplodia* sp., cuja análise foi feita pela Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza, em colaboração com o Dr. José Odair Pereira da UFAM.

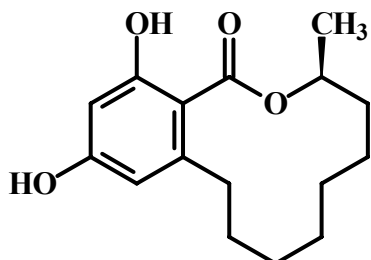
Foi realizada uma análise de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) nas regiões espaciais internas transcritas (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal para as três espécies citadas acima. Estas regiões são altamente conservadas e são utilizadas para auxiliar na taxonomia de organismos de difícil identificação. Após uma PCR específica das regiões citadas, foi feita uma outra com dNTP marcado (bases nitrogenadas), seguido de leitura num seqüenciador de DNA e comparação dos dados obtidos com bancos genômicos no site do *gen Bank* (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EUA).

As linhagens dos fungos foram submetidas à extração de DNA pela técnica do CTAB e do DNA genômico. Foi realizada uma PCR específica para as regiões ITS1 e 2 do rDNA, consideradas marcadoras taxonômicas moleculares. Os gêneros *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Botryosphaeria* e seu anamorfo *Lasiodiplodia* foram selecionados para serem identificados pelas regiões ITS 1 e/ou ITS 2.

O Blast das seqüências das referidas regiões indicam serem: *Phomopsis sojae* com 95% de identidade, *Pestalotiopsis crassiuscula* 96% e *Botryosphaeria rhodina* e seu anamorfo *Lasiodiplodia theobromae* 98% e o blast DNA-DNA das seqüências das regiões ITS de patogenicidade de *Lasiodiplodia theobromae*, isolado das lesões novas, com seu telemorfo *Botryosphaeria rhodina* isolado das lesões velhas apresentaram 100% de identidade. Considerando o potencial de fitopatogenicidade descrita na literatura para os gêneros encontrados.

4. 2 – Resultados do estudo Químico de *B. rhodina*

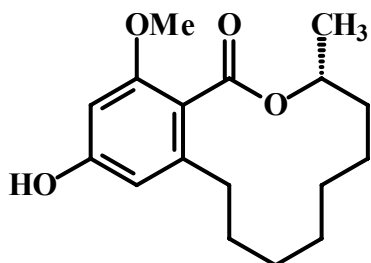
Substâncias Isoladas



(S1) Desmetil-lasiodiplodina

Isolamento: p. 40

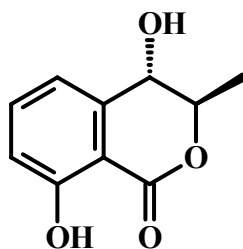
Identificação: p. 65



(S2) Lasiodiplodina

Isolamento: p. 41

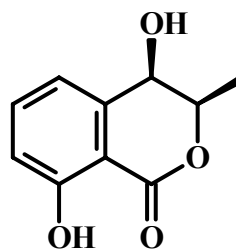
Identificação: p. 65



(S3A) *Trans*-hidromeleina

Isolamento: p. 41

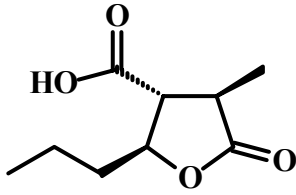
Identificação: p. 85



(S3B) *Cis*-hidroximeleina

Isolamento: p. 41

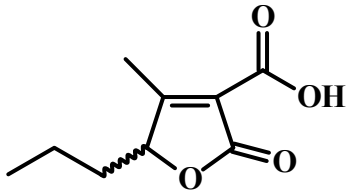
Identificação: p. 85



(S4) 5β-propil-4-carboxi-3-metil-γ-butirolactona

Isolamento: p. 39

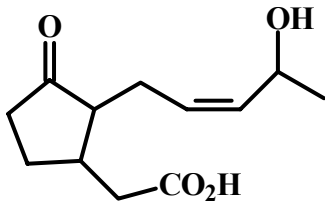
Identificação: p. 93



(S5) 5-propil-4-metil-3-carboxi-γ-but-3-en-lactona

Isolamento: p. 39

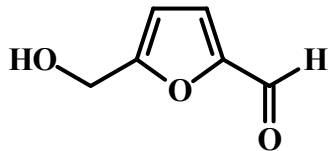
Identificação: p. 93



(S6) Ácido 11-hidroxijasmônico

Isolamento: p. 39

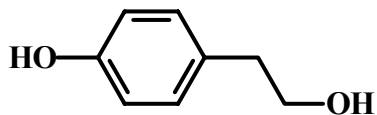
Identificação: p. 106



(S7) 5-hidroximetilfurfural

Isolamento: p. 37

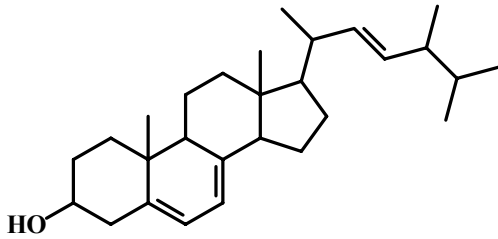
Identificação: p. 114



(S8) Tirosol

Isolamento: p. 38

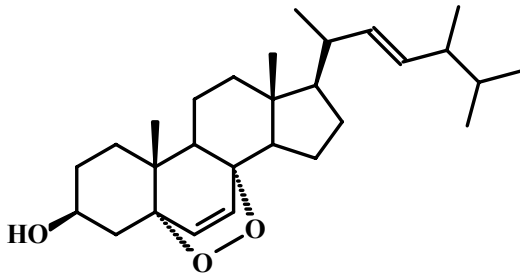
Identificação: p. 119



(S9) Ergosterol

Isolamento: p. 40

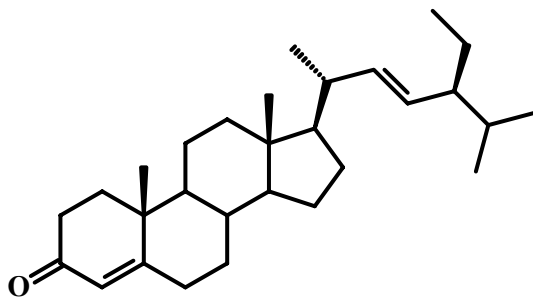
Identificação: p. 123



(S10) Peróxido de ergosterol

Isolamento: p. 38

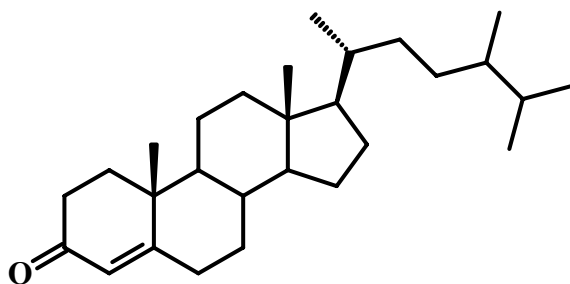
Identificação: p. 123



(S11A) Estigmasterona

Isolamento: p. 38

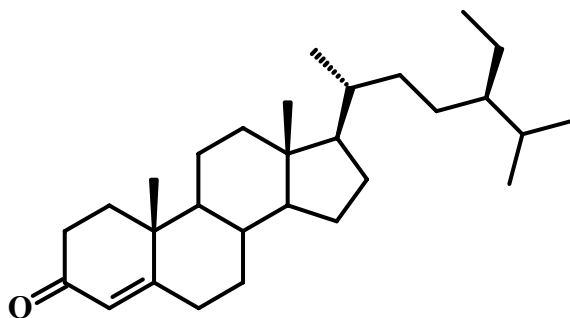
Identificação: p. 129



(11B) Campesterona

Isolamento: p. 38

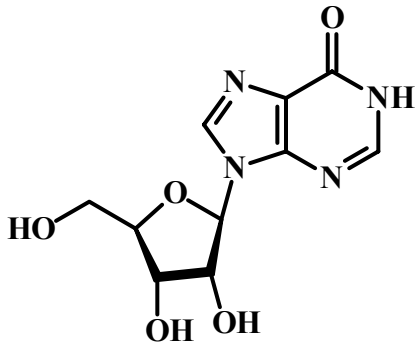
Identificação: p. 129



(11C) Sitosterona

Isolamento: p. 38

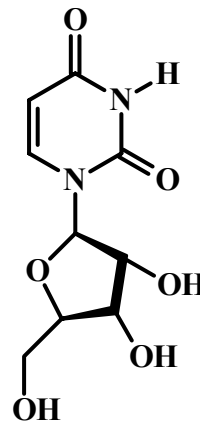
Identificação: p. 129



(S12) 5'-inosil

Isolamento: p. 38

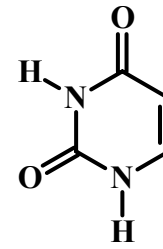
Identificação: p. 132



(S13) Uridina

Isolamento: p. 38

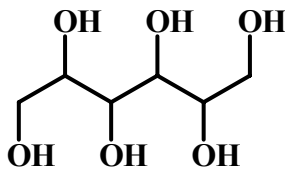
Identificação: p. 136



(S14) Uracila

Isolamento: p. 38

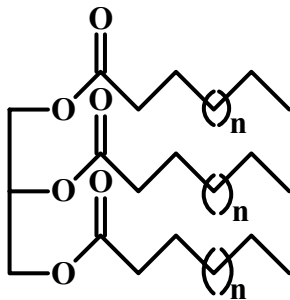
Identificação: p. 136



(S15) Manitol

Isolamento: p. 42

Identificação: p. 140



(S16) Triglicerídeo

Isolamento: p. 38

Identificação: p. 143

4.2.1 – Identificação Estrutural da Desmetil-lasiodiplodina (**S1**) e Lasiodiplodina (**S2**)

Na região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN ^1H **S1** (Figura 4.13, 4.14; p. 78, Tabela 4.1, p. 73), pode-se observar dois dubletos em δ 6,22 ($J = 2,0$ Hz) e δ 6,26 ($J = 2,0$ Hz) e no espectro de RMN ^1H de **S2** (Figura 4.22, 4.23, p.82-83) observa-se também dois dubletos em δ 6,24 ($J = 2,0$ Hz) e δ 6,26 ($J = 2,0$ Hz) sinais estes característicos de acoplamentos de hidrogênios *meta*.

Para o composto **S1**: o sinal de hidrogênio em δ 6,22 apresentou correlação no experimento de HSQC (Figura 4.18, p. 80; Esquema 4.2, p. 71) com o carbono em δ 110,6 e no mapa de contorno de HMBC (Figura 4.19-21, p. 81-82; Esquema 4.1, p. 71) mostrou correlações a J^2 e a J^3 com os carbonos em δ 160,0; δ 101,3 e δ 33,5. O hidrogênio em δ 6,26 mostrou correlação no experimento de HSQC com o carbono em δ 101,3 e no mapa de contorno de HMBC apresentou correlações com os carbonos em δ 110,6; 160,0; 165,4.

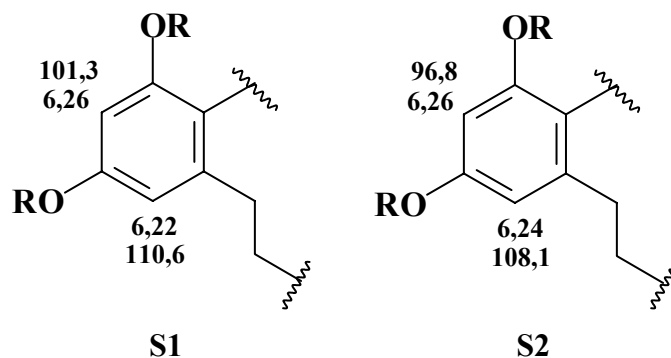
Para o composto **S2**: o sinal hidrogênio em δ 6,24 apresentou correlação nos mapas de contornos de HSQC (Figura 4.27, p. 85) com o carbono em δ 108,1 e no de HMBC mostrou correlações a J^2 e a J^3 com os carbonos em δ 30,3; 96,8 e 117,3. Já o sinal de hidrogênio em δ 6,26 mostrou correlações nos mapas de contorno de HSQC com o carbono em δ 96,8 e no de HMBC (Figura 4.28, p. 85) com os carbonos em δ 117,3; 156,2 e 108,1.

No mapa de contorno de HSQC do composto **S1** foi observado a correlação do sinal do carbono em δ 33,5 com um multipletto referentes aos hidrogênios em δ 2,50 e 3,30, sugerindo assim, que este carbono fosse um $-\text{CH}_2-$ benzílico com hidrogênios não equivalentes. Estes hidrogênios correlacionaram-se no mapa de contorno de HMBC com o sinal de carbono metilênico em δ 31,0.

No espectro de RMN ^1H do composto **S2**, observou-se dois duplos tripletos, um em δ 2,50 ($J = 13,6$ e $8,0$) e outro em δ 2,68 ($J = 13,6$ e $6,8$), cada um integrando para um hidrogênio. Observou-se no espectro de COSY (Figura 4.26, p. 84) que estes sinais correlacionam-se entre si e ambos apresentavam correlação com o sinal de hidrogênio em δ 1,60. No mapa de contorno de HSQC de **S2**, estes hidrogênios correlacionaram-se com o carbono metilênico em δ 30,3. Este sinal de

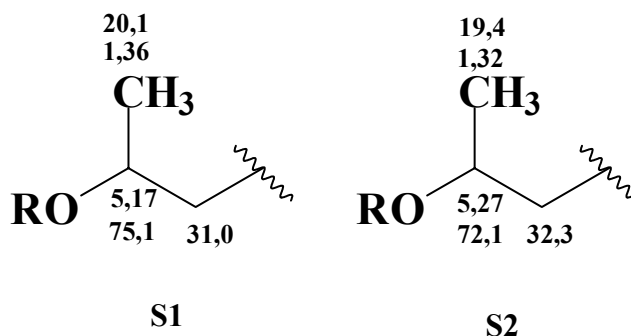
carbono foi confirmado ser um $-\text{CH}_2-$ pelo espectro de PENDANT (Figura 4.25, p. 84). No mapa de contorno de HMBC observou-se a correlação destes hidrogênios com os carbonos em δ 30,0 ($-\text{CH}_2-$); 108,1; 117,3; 144,0 e 25,4 ($-\text{CH}_2-$).

As análises propostas indicaram um composto aromático tetrasubstituído e inferem as seguintes propostas parciais para a substância em questão:



No espectro de RMN ^1H de **S1**, observou-se um sinal de hidrogênio de metila em δ 1,36 ($J = 6,0$ Hz), o qual pelo mapa de contorno de HSQC correlacionou-se com o carbono em δ 20,1 e pelo experimento de HMBC apresentou correlações a J^2 e a J^3 com os carbonos em δ 75,1 e 31,0. Os hidrogênios metílicos mostraram acoplamentos através do experimento de COSY (Figura. 4.17, p. 80) com um multiplete em δ 5,17, correlacionando via HSQC com o carbono em δ 75,1 e via HMBC apresentou uma correlação a J^3 com o carbono em δ 24,7.

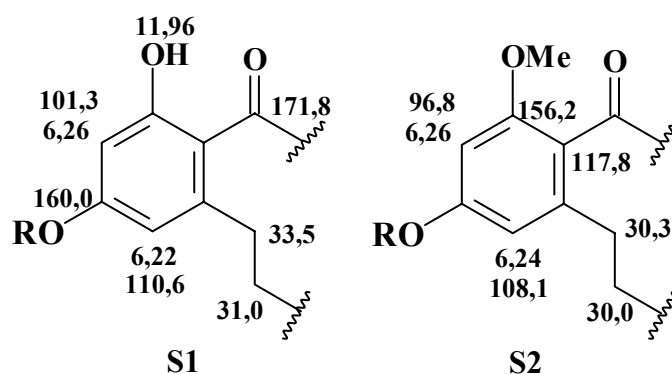
A análise do espectro de RMN ^1H de **S2**, apresentou também um dublete na região de metila em δ 1,32 ($J = 6,4$ Hz). Pelo experimento de HSQC, o sinal em δ 1,32 correlacionou-se com o carbono em δ 19,4 e no mapa de contorno de HMBC apresentou correlações a J^2 e a J^3 com os carbonos em δ 72,1 e 32,3, este último de acordo com o espectro de PENDANT (Figura 4.25, p. 84) é um carbono metilênico. Os hidrogênios metílicos em δ 1,32 mostraram acoplamento com um duplo quadrupeleto em δ 5,27 ($J = 3,2$ e $6,4$ Hz), verificado no espectro de COSY. No mapa de contorno de HSQC observou-se a correlação do hidrogênio em δ 5,27 com o carbono em δ 72,1, sendo este sinal típico de carbono carbinólico.



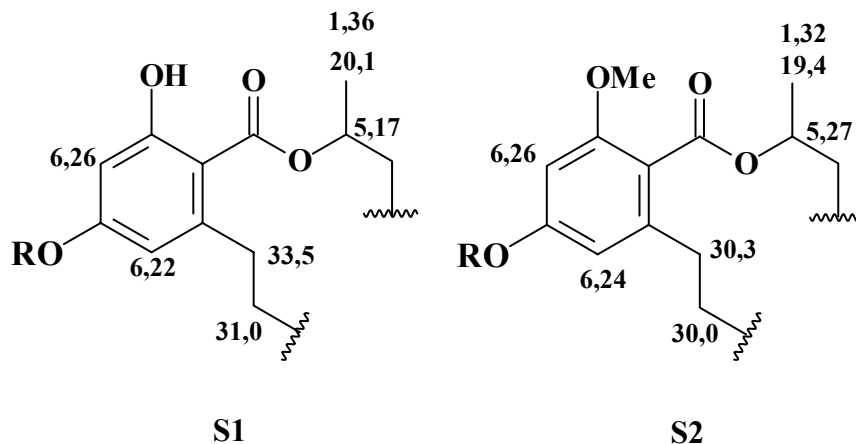
No espectro de RMN ^1H do composto **S1**, foi observado um sinal em δ 11,96, característico de grupo hidroxila quelado, que apresentou correlação no mapa de contorno de HMBC com os carbonos em δ 165,4 e 160,0; uma correlação fraca com o carbono em δ 110,6 típico de J^5 e também com o sinal em δ 101,3, o qual apresentou correlação com o hidrogênio em δ 6,26, conforme citado anteriormente. O hidrogênio em δ 6,26 apresentou correlação a J^4 com o carbono carboxílico em δ 171,8. Esses dados, em conjunto com os que já foram discutidos, sugeriram que o grupo carbonílico estivesse ligado diretamente ao anel aromático.

Observou-se no espectro de RMN ^1H do composto **S2** um sinal em δ 3,77, característico de metoxila ligada a anel aromático, a mesma apresentou correlação nos mapas de contorno de HSQC com o carbono em δ 55,9 e de HMBC a J^3 com o carbono em δ 156,2 e a J^1 com o seu respectivo carbono. Estas análises sugeriram que tanto a metoxila, assim como o hidrogênio aromático em δ 6,26 estariam próximos ao carbono com deslocamento δ 156,2 e o outro hidrogênio aromático em δ 6,24 estaria *orto* ao carbono metilênico benzílico δ 30,3.

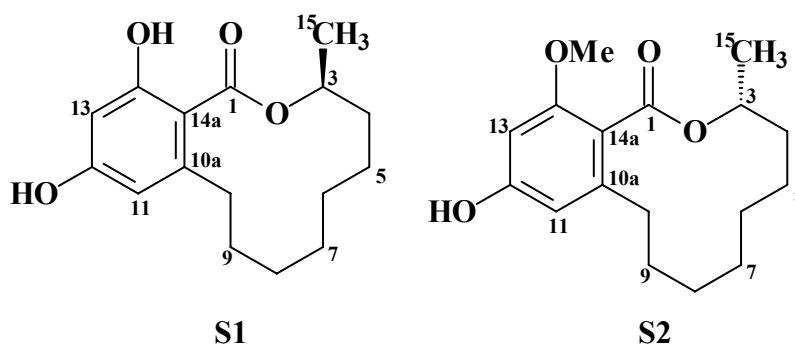
Assim pode-se propor mais um fragmento da molécula.



Não foi observado nenhuma correlação através do mapa de contorno de HMBC entre os sinais de hidrogênios em δ 1,36; 5,17 e δ 1,32; 5,27 com o carbono carboxílico dos compostos **S1** e **S2** respectivamente, indicando que possivelmente um heteroátomo estaria ligando as duas partes das moléculas:



O espectro de RMN ^{13}C de **S1** e **S2** (Figura 4.14, 4.16, p. 79 e Figura 4.24, p. 83) confirmaram a presença de um anel aromático tetrasubstituído, as O-substituições presentes nos carbonos C-12 e C-14 e as C-substituições em C-10a e C-14a. Foram realizadas todas as correlações dos carbonos através das análises dos mapas de contorno de HSQC e HMBC, faltando ainda à atribuição de quatro carbonos metilênicos em δ 27,2; 24,7; 24,1 e 21,4 para o composto **S1** e três carbonos metilênicos em δ 26,4; 24,2 e 21,2 para o composto **S2**, indicando a presença de um sistema polimetilênico para estas substâncias.



O composto **S2** foi isolado em forma de cristal, dessa forma foi realizado o experimento de Raio-X. Os dados obtidos foram comparados com a literatura (LEE *et al.*, 1982), confirmando que a metila encontrava-se na face α .

Foi realizada a medição de rotação específica $[\alpha]_D$ dos compostos **S1** e **S2**. O composto **S2** foi isolado de duas frações, sendo que uma apresentou-se como forma de cristais e a outra como sólido amorfo (**S2'**). O $[\alpha]_D$ foi feito em MeOH e CHCl_3 , para melhor comparação com dados da literatura.

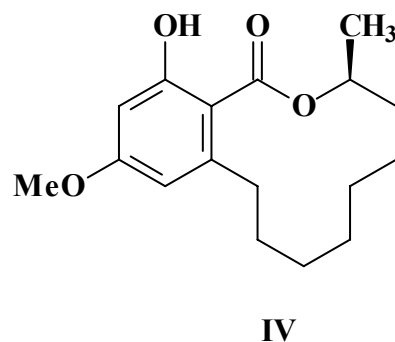
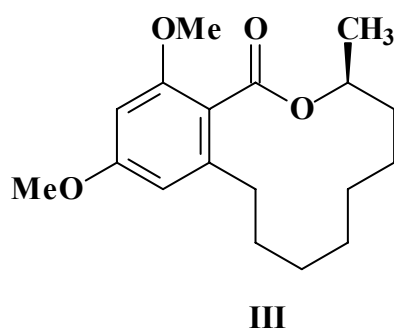
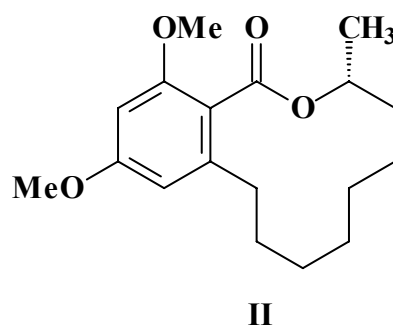
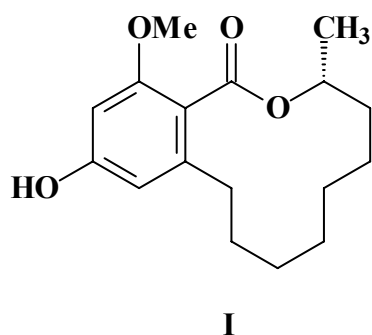
Valores de $[\alpha]_D$ obtidos para os compostos:

- **S2'** $[\alpha]_D$ **0,0⁰** (MeOH; c 3,3) e $[\alpha]_D$ **- 0,9⁰** (CHCl_3 ; c 3,3).
- **S2** $[\alpha]_D$ **+ 15,4⁰** (MeOH; c 5,5) e $[\alpha]_D$ **+ 14,5⁰** (CHCl_3 ; c 5,5).
- **S1** $[\alpha]_D$ **- 15,3⁰** (MeOH; c 1,5) e $[\alpha]_D$ **- 14,6⁰** (CHCl_3 ; c 1,5).

Estes dados foram comparados com aqueles da literatura, para as substâncias de I – IV.

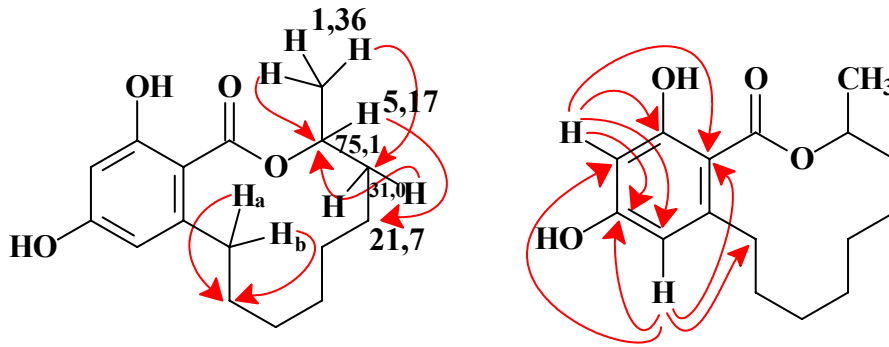
- I $[\alpha]_D$ **+ 4,8⁰** (CHCl_3 ; c 1,2); $[\alpha]_D$ **+ 9,0⁰** (CHCl_3 ; c 1,0) (LEE, *et al.*, 1982)
- II $[\alpha]_D$ **+ 9,0⁰** (CHCl_3 ; c 1,0); $[\alpha]_D$ **+ 7,6⁰** (CHCl_3 ; c 0,6) (GRAHAM, *et al.*, 1997)
- III $[\alpha]_D$ **- 8,5⁰** (MeOH; c 1,0); $[\alpha]_D$ **- 8,7⁰** (CHCl_3 ; c 1,0) (SOLLADIÉ, *et al.*, 1990)
- IV $[\alpha]_D$ **+ 4,0⁰** (CHCl_3 ; c 0,01) (CAMBIE, *et al.*, 1991)

Estes dados sugeriram a presença de mistura racêmica na amostra **S2**.

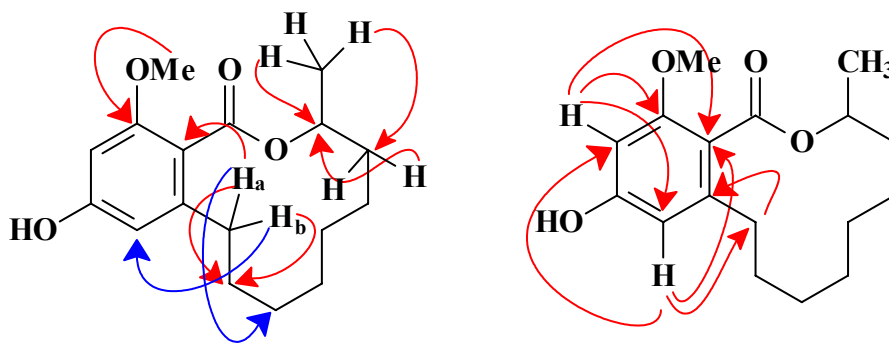


Os espectros de massas dos compostos **S1** e **S2** (Figura 4.11 e 4.12, p. 74), de acordo com os fragmentos propostos (Esquema 4.3, p. 75 e 4.4 p. 76) confirmaram a massa molecular e a proposta estrutural dessas substâncias.

De acordo com dados da literatura e a análise realizada para o composto **S1**, este foi determinado como sendo o desmetil-lasiodiplodina (XIN-SHENG *et al.*, 1983), e o composto **S2** é conhecido como Lasioplodina (LEE *et al.*, 1982). Estes compostos também foram isolados de *Lasiodiplodia theobromae* (ALDRIDGE *et al.*, 1971), *Euphobia fidjiana* (CAMBIE *et al.*, 1991) e de *Euphorbia splendens*, onde o autor relata que alguns derivados destas podem agir como um potente agente antileucêmico (LEE *et al.*, 1982), além de ser alvo de síntese em vários trabalhos relatados na literatura (SOLLADIÉ *et al.*, 1990), ainda é atribuído a eles a função de inibir o crescimento de plantas (GRAHAM *et al.*, 1997).



ESQUEMA 4.1: CORRELAÇÕES VIA HMBC PARA O COMPOSTO **S1**.



ESQUEMA 4.2: CORRELAÇÕES VIA HMBC PARA O COMPOSTO **S2**.

TABELA 4.1: DADOS DE RMN ^{13}C (δ , CDCl_3 , 100 MHz)

Posições	RMN ^{13}C			
	CAMBIE, 1991 (CDCl_3 , 50 MHz)	S1	LEE, 1982 (CDCl_3 , 62,89 MHz)	S2
1	172,0	171,8	167,4	169,2
3	75,1	75,1	72,1	72,1
4	-	30,7	32,4	32,3
5		24,7		24,2
6				
7				
8				25,4
9		31,0		30,0
10	33,5	33,5	30,4	30,3
10a	149,4	149,4	142,9	144,0
11	110,6	110,7	108,3	108,1
12	159,9	160,0	-	-
13	101,3	101,3	96,8	96,8
14		165,4	157,8	156,2
14a			118,9	117,3
15	20,1	20,1	19,5	19,4
OMe	-	-	55,9	55,9

TABELA 4.2: DADOS DE RMN ^1H de **S1** e **S2** δ , CDCl_3 , 400 MHz)

RMN ^1H		
Posições	Composto S1	Composto S2
3	5,17 (<i>quinteto</i> , $J = 6,4$ Hz, 1H)	5,27 (<i>dq</i> , $J = 6,4$ e $3,2$ Hz, 1H)
4	4a/4b 1,79/1,92 (<i>m</i> , 2H)	4a/4b 1,60/1,90 (<i>m</i> , 2H)
10	10a/10b 2,50/3,30 (<i>m</i> , 2H)	H10a, 2,68 (<i>dt</i> , $J = 13,6$ e $8,0$ Hz, 1H) H10b, 2,50 (<i>dt</i> , $J = 13,6$ e $6,8$ Hz, 1H)
11	6,22 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,24 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)
13	6,26 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,26 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)
15	1,36 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz, 3H)	1,32 (<i>d</i> , $J = 6,4$ Hz, 3H)
-OH	11,96	-
- OMe	-	3,77 (<i>s</i> , 3H)

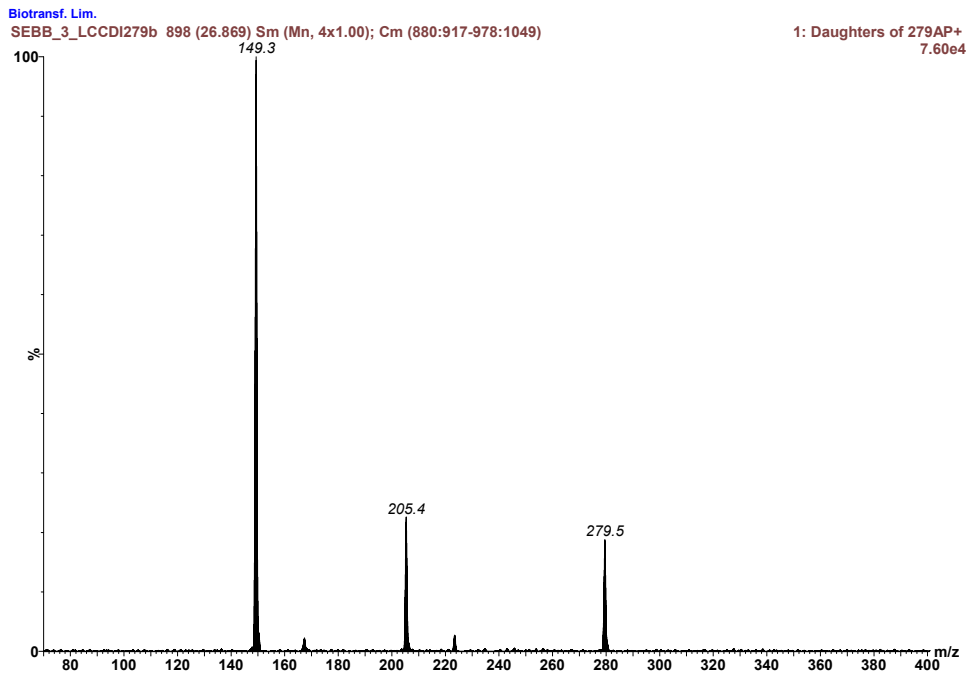


FIGURA 4.11: Espectro de Massas de **S1** (APCI⁺)

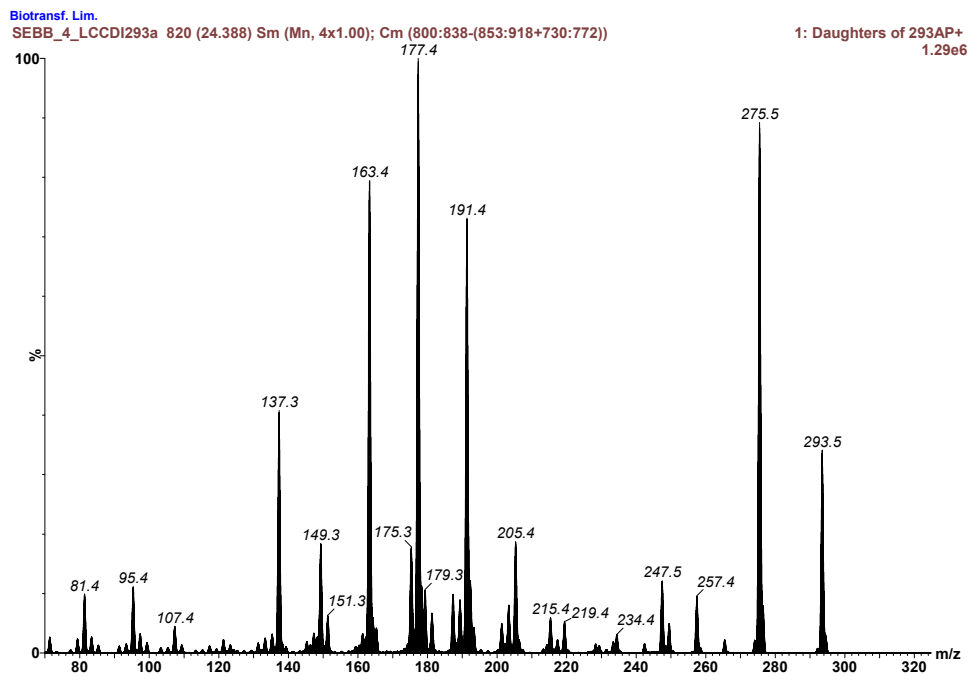
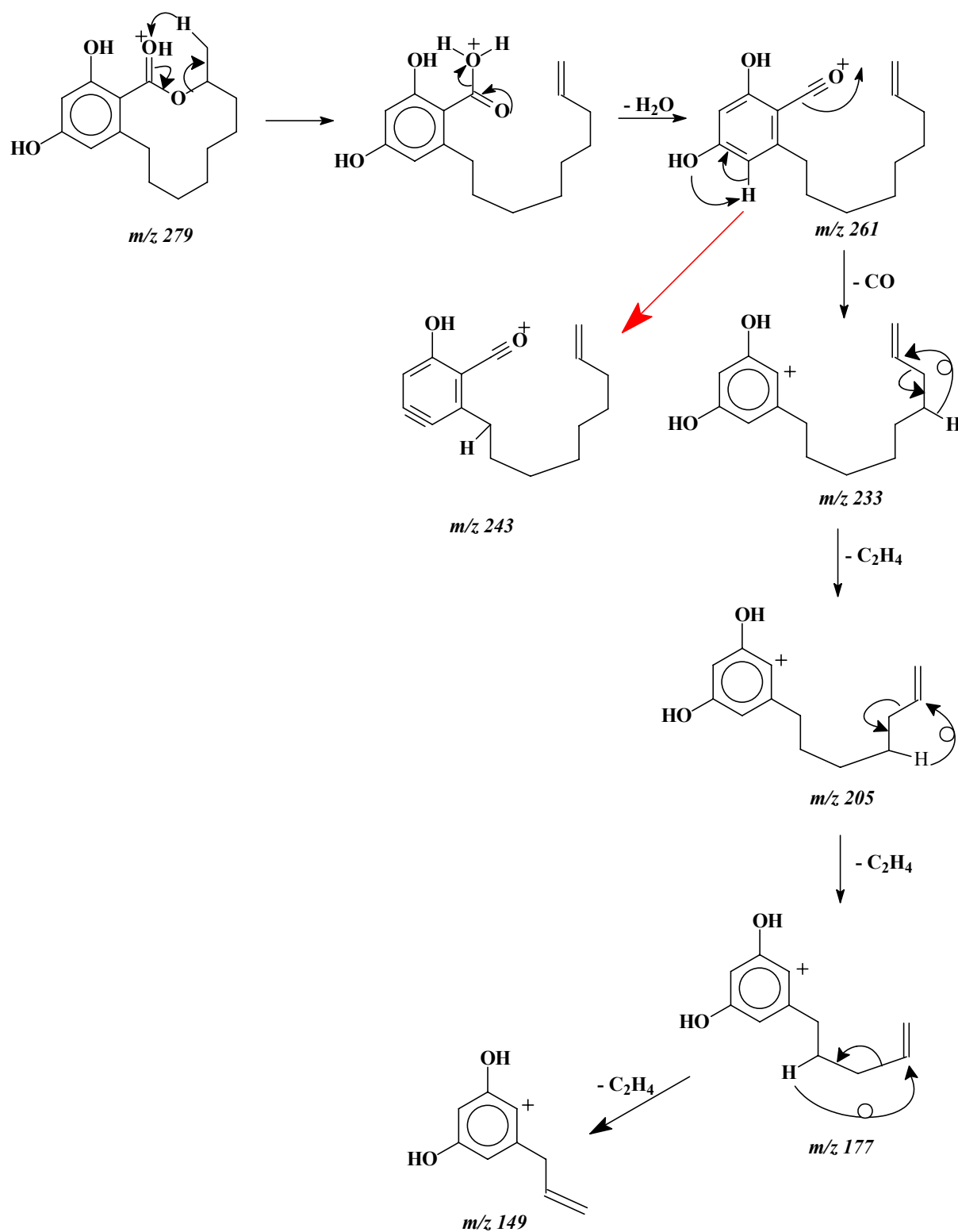
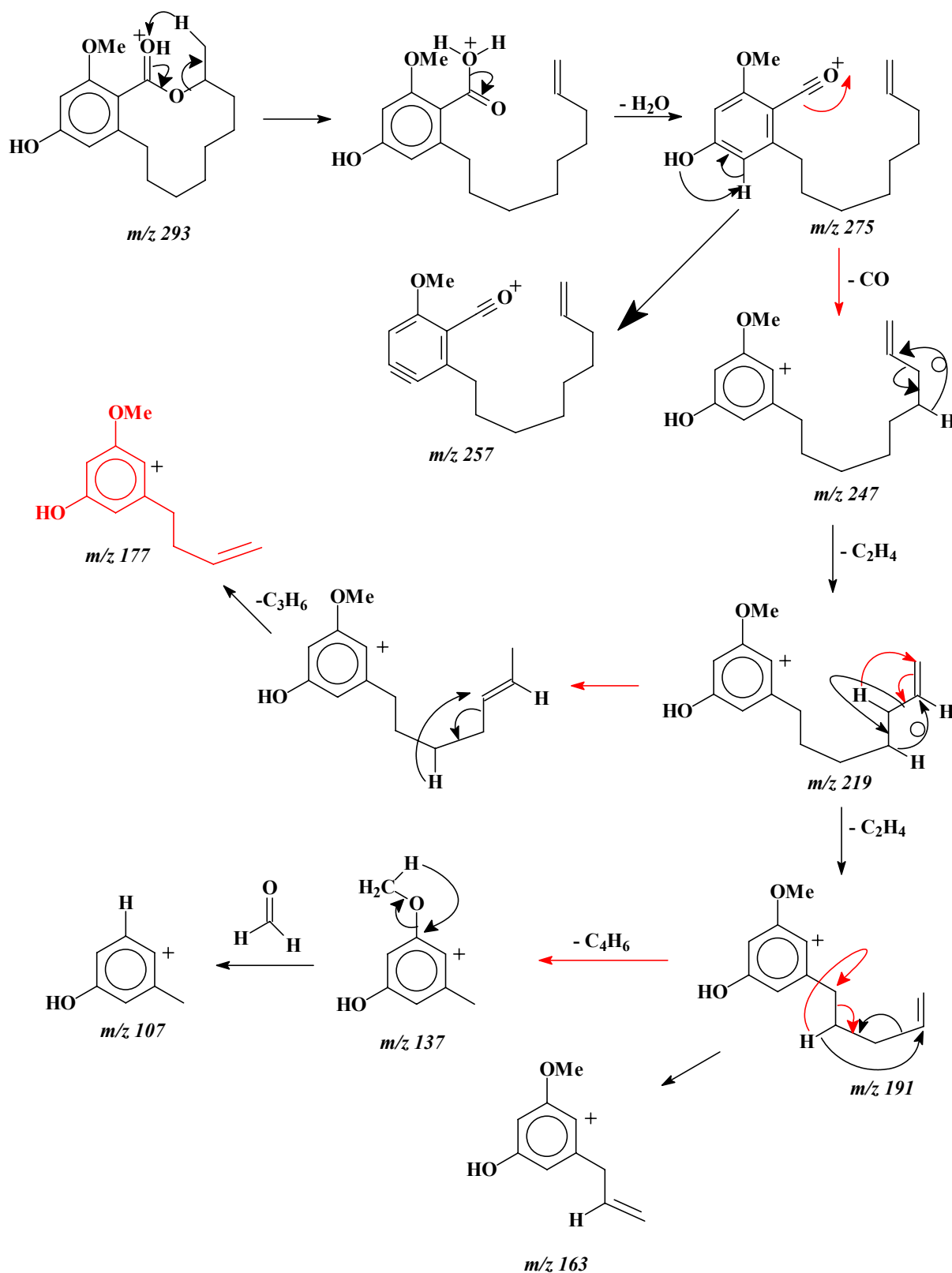


FIGURA 4.12: Espectro de Massas de **S2** (APCI⁺)

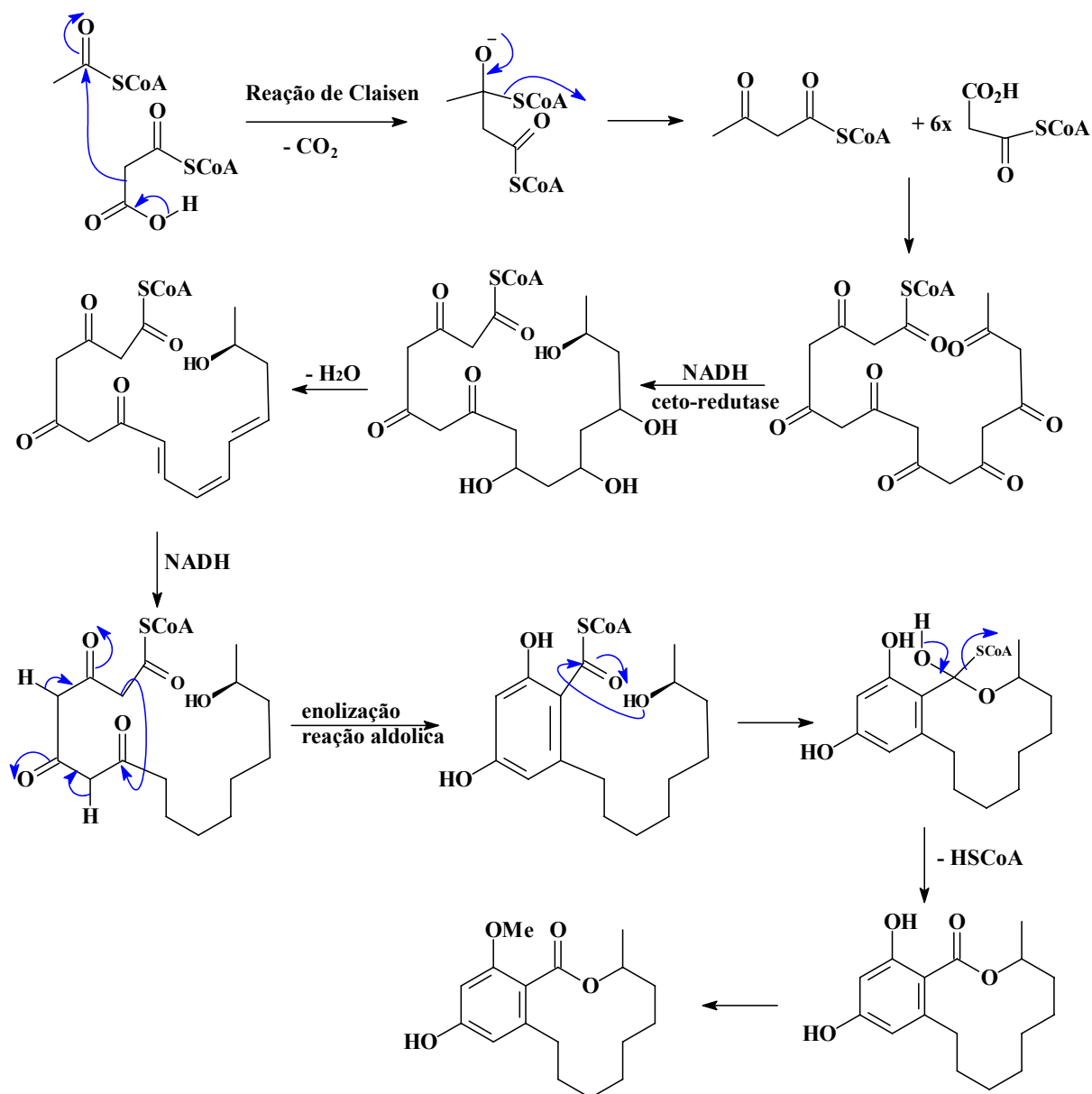


ESQUEMA 4.3: Proposta de fragmentação para de **S1** (APCI⁺)



ESQUEMA 4.4: Proposta de fragmentação para de **S2** (APCI⁺)

A substância **S1** e **S2** de acordo com a literatura consultada (DEWICK, 2004), são derivadas do acetato e mevalonato e podem ser propostas como um produto de ciclização de um poli β -ceto éster, o qual requer uma variedade de processo de ciclização e formação de um anel aromático pela condensação aldólica próxima ao carbono carboxílico terminal.



ESQUEMA 4.5: Proposta biossintética para a substância S1 e S2

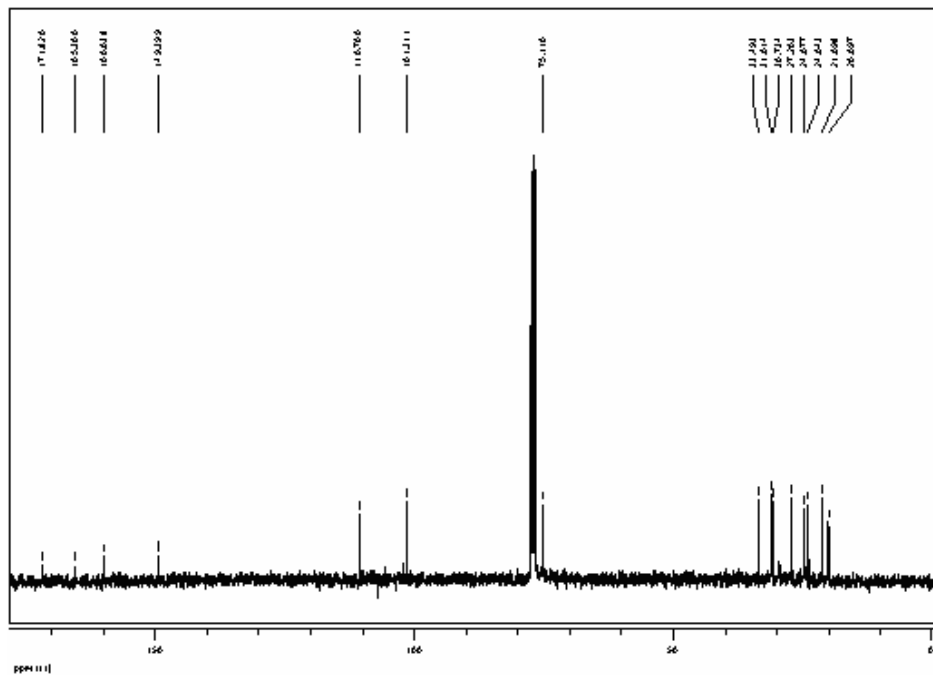


FIGURA 4.15: Espectro de RMN ^{13}C de **S1** (100 MHz, CDCl_3)

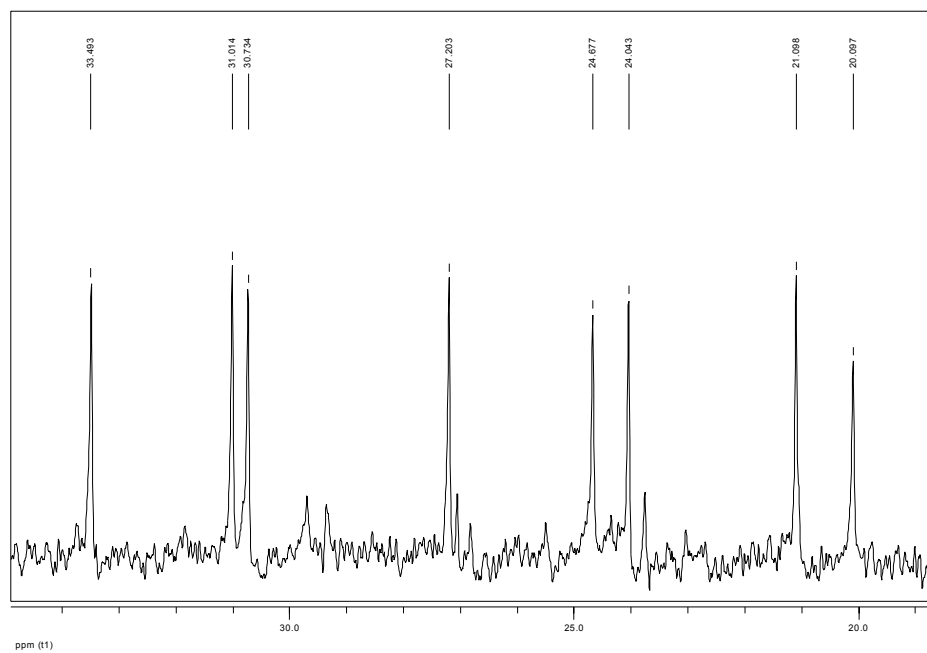


FIGURA 4.16: Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **S1** (100 MHz, CDCl_3)

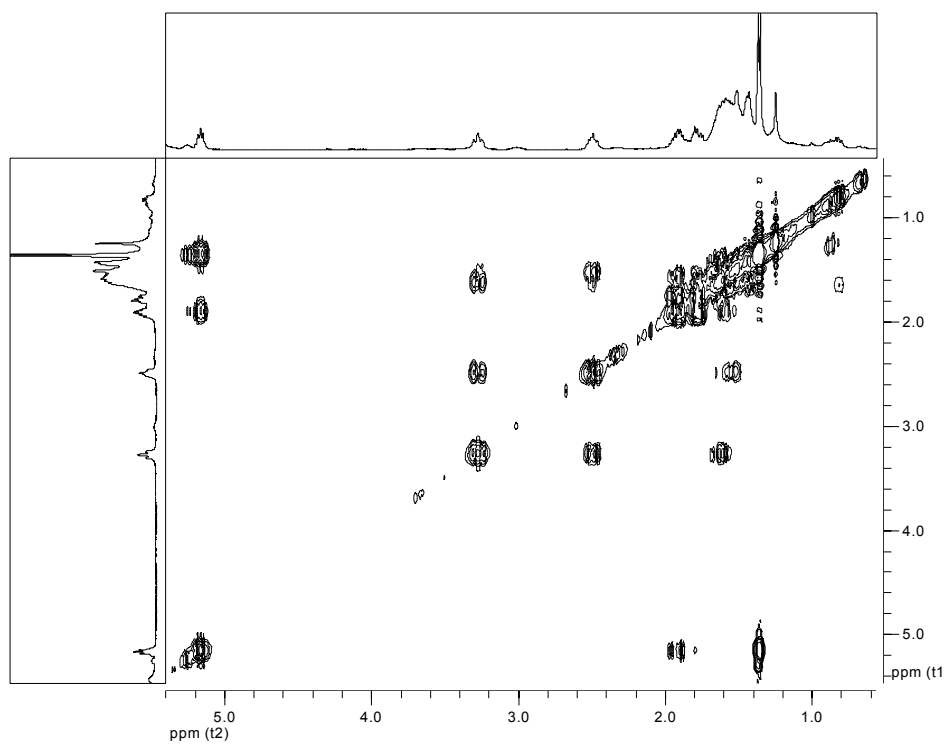


FIGURA 4.17: Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de **S1** (400 MHz, CDCl_3)

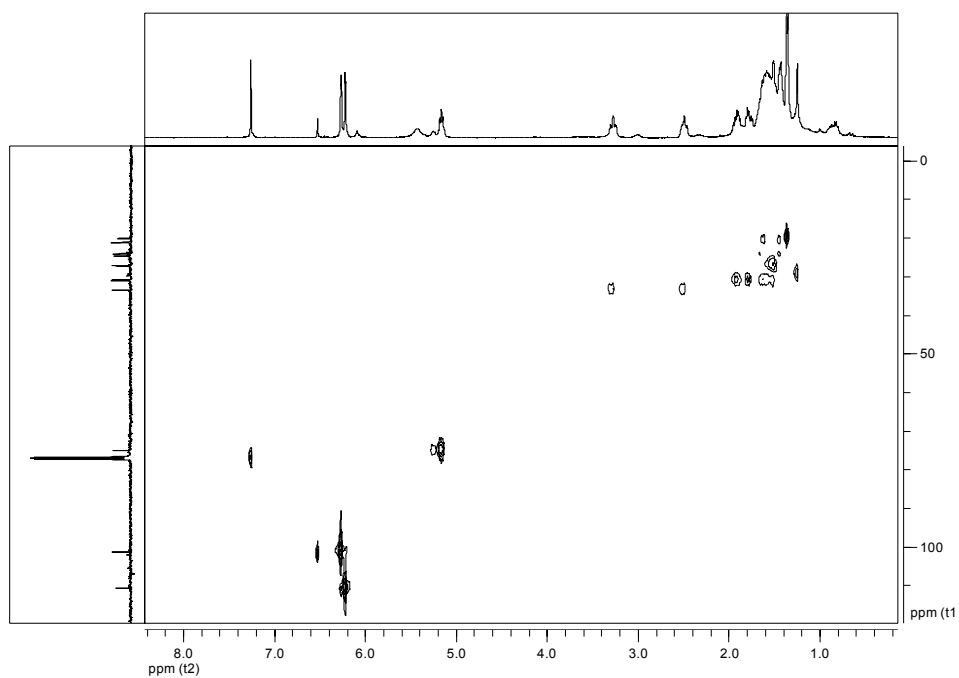


FIGURA 4.18: Mapa de contorno de HSQC de **S1** (400 MHz, CDCl_3)

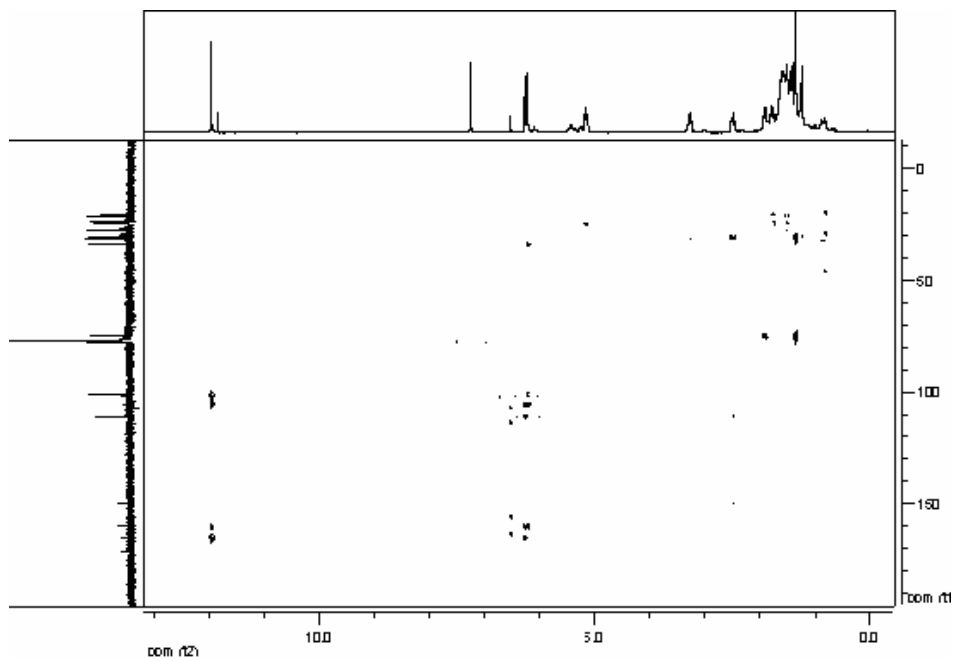


FIGURA 4.19: Mapa de contorno de HMBC de **S1** (400 MHz, CDCl₃)

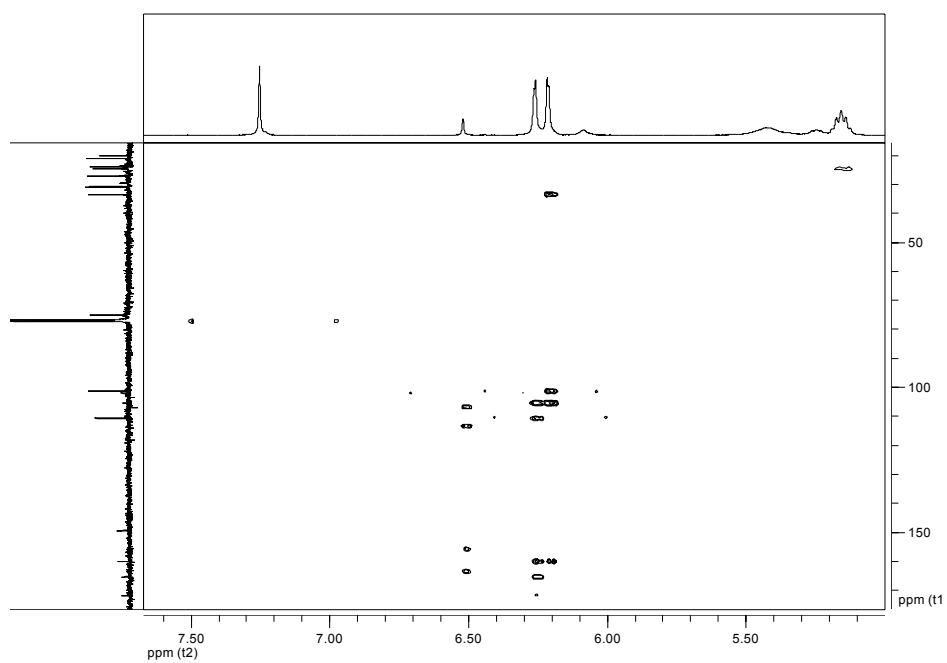


FIGURA 4.20: Expansão do mapa de contorno de HMBC de **S1** (400 MHz, CDCl₃)

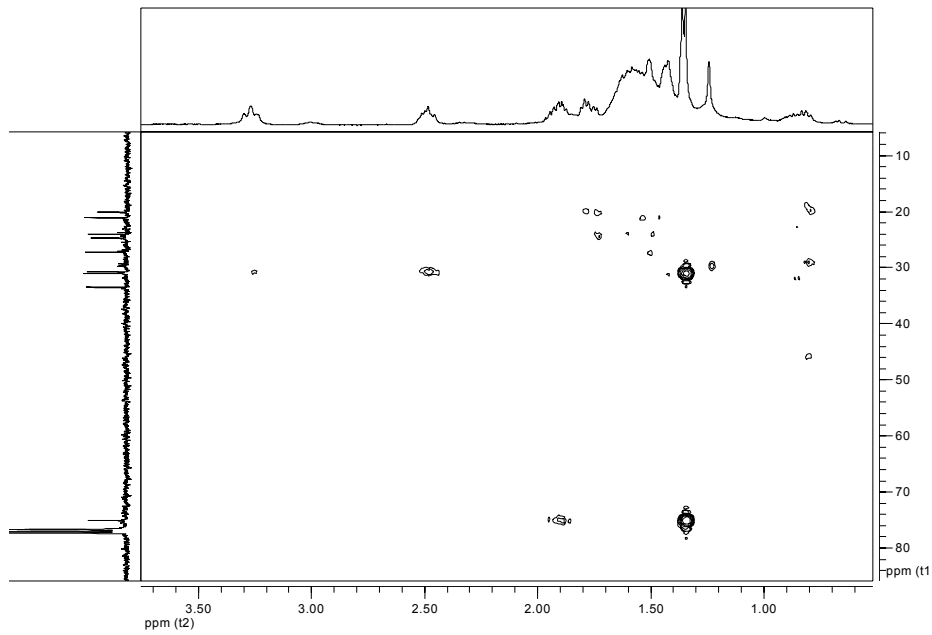


FIGURA 4.21: Expansão do mapa de contorno de HMBC de **S1** (400 MHz, CDCl₃)

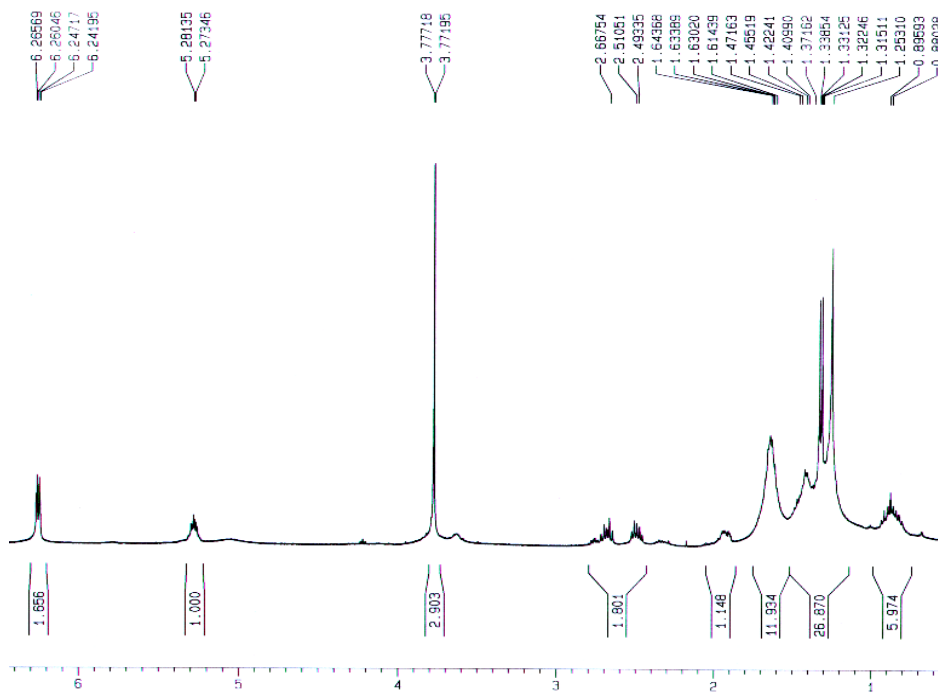


FIGURA 4.22: Espectro de RMN ¹H de **S2** (400 MHz, CDCl₃)

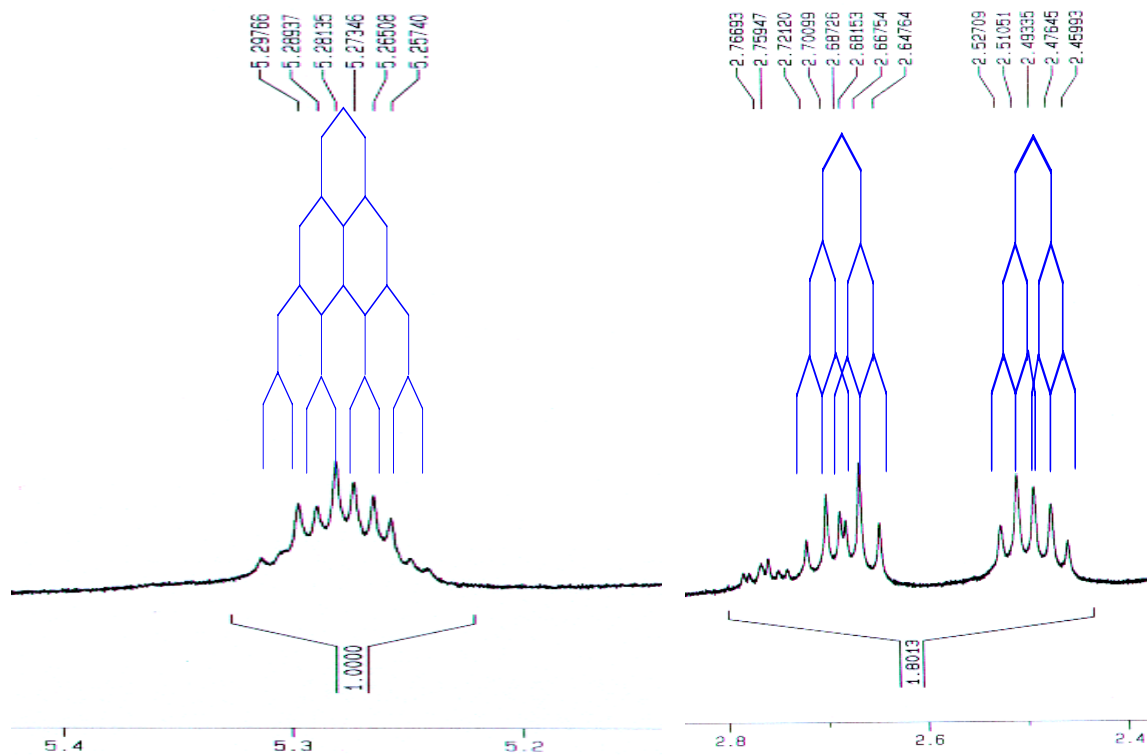


FIGURA 4.23: Expansão do espectro de RMN ^1H de **S2** (400 MHz, CDCl_3)

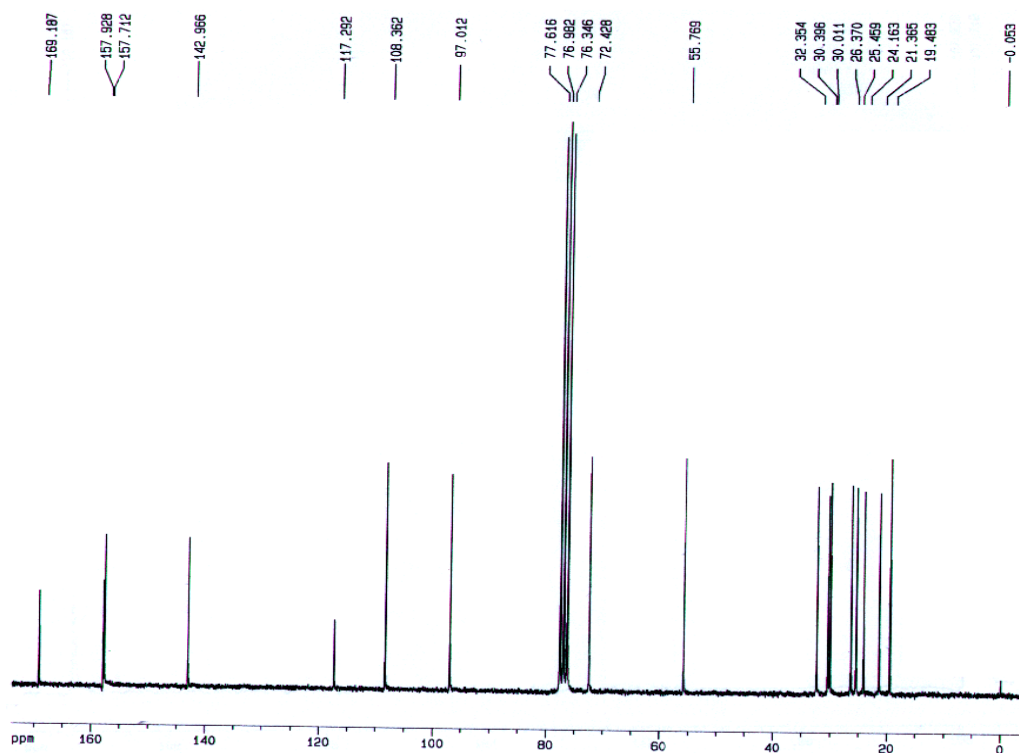


FIGURA 4.24: Espectro de RMN ^{13}C de **S2** (50 MHz, CDCl_3)

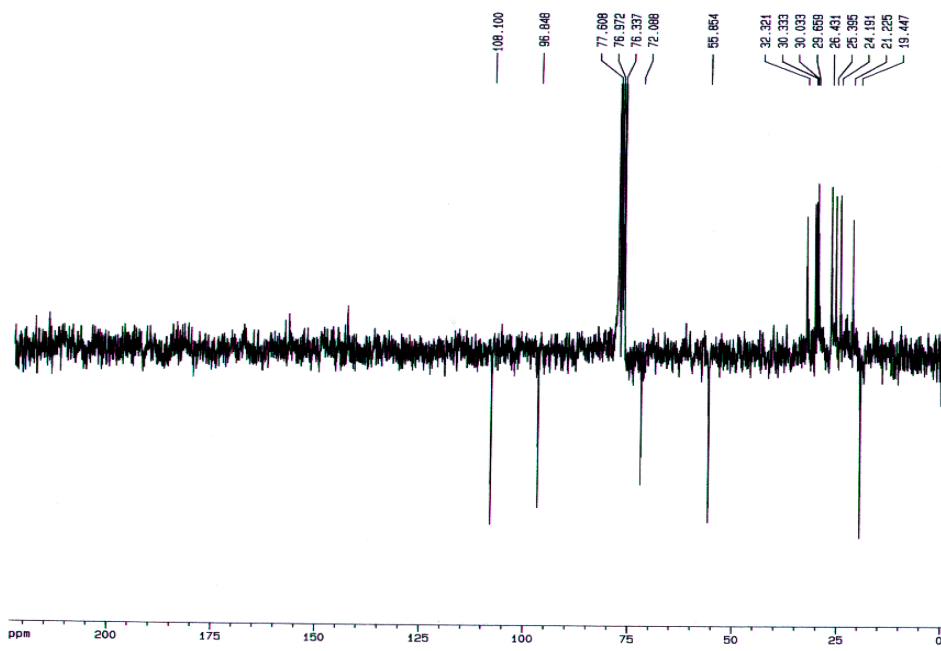


FIGURA 4.25: Espectro de RMN ^{13}C – PENDANT de **S2** (50 MHz, CDCl_3)

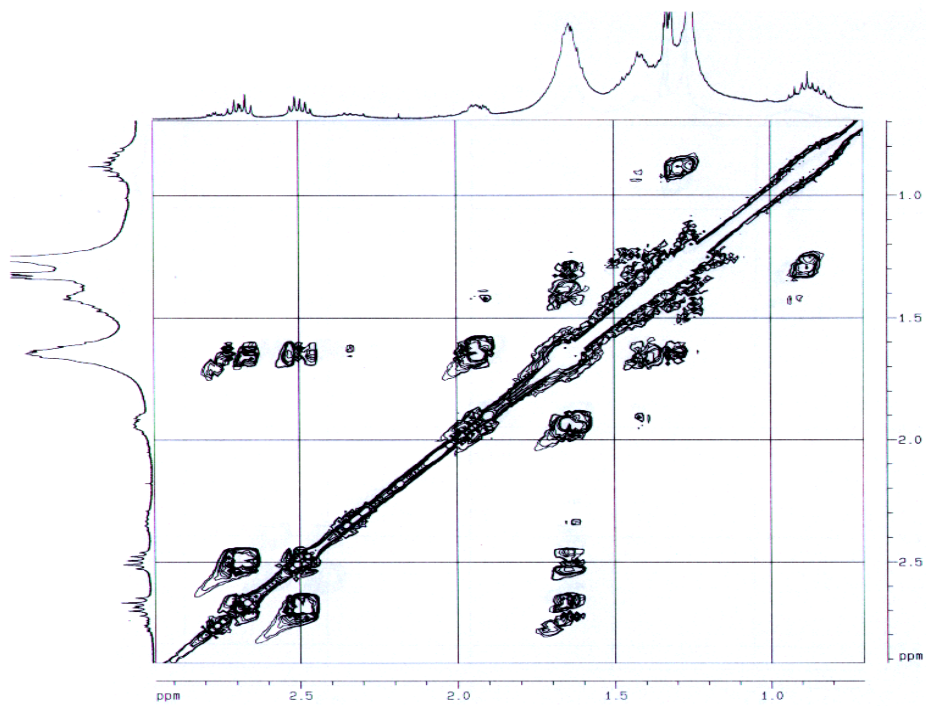


FIGURA 4.26: Espectro de COSY ^1H – ^1H de **S2** (400 MHz, CDCl_3)

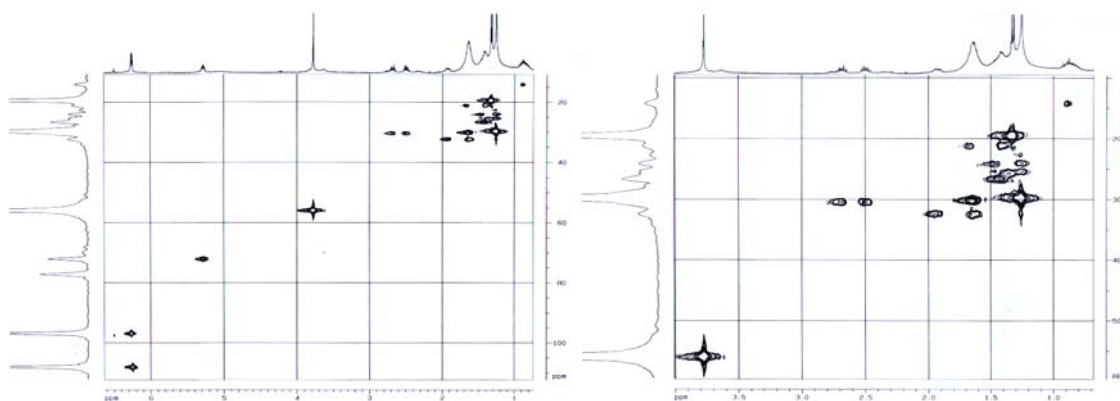


FIGURA 4.27: Mapas de contorno de HSQC de **S2** (400 MHz, CDCl₃)

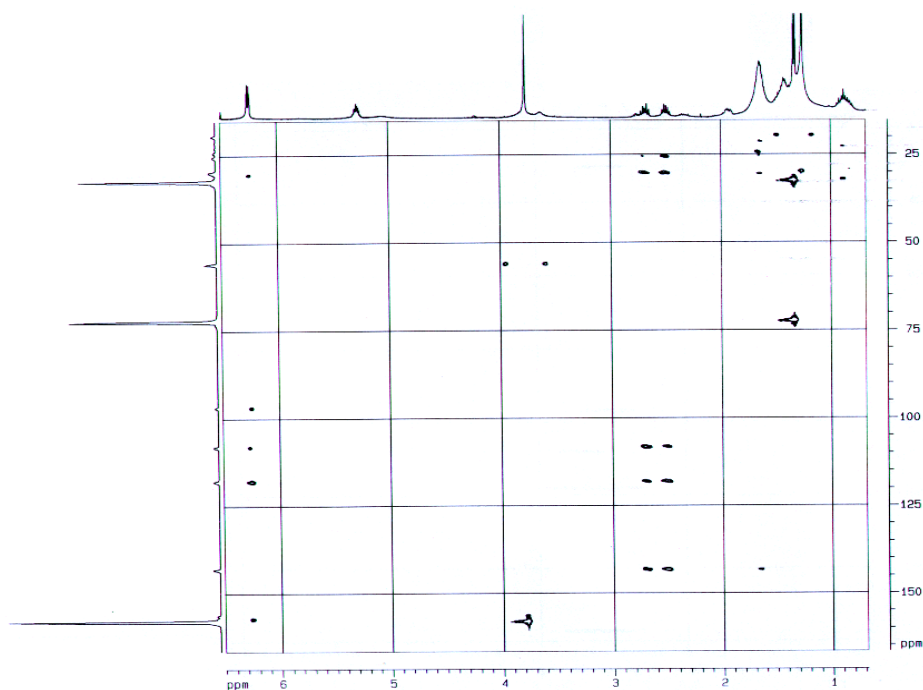


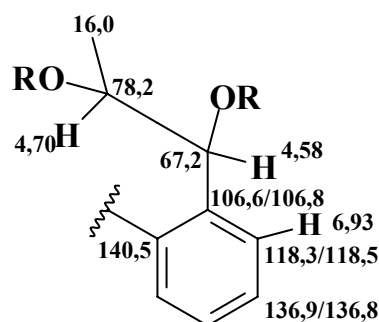
FIGURA 4.28: Mapa de contorno de HMBC de **S2** (400 MHz, CDCl₃)

4. 2.2 – Identificação estrutural da *Trans* (**S3A**) e *Cis*-hidromeleina (**S3B**)

As substâncias **S3A** e **S3B** foram isoladas e identificadas em mistura.

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figura 4.29 e 4.30, p. 91; Tabela 4.3 e 4.4, p.89) foi observado um dubleto em δ 1,59 ($J = 6,8$ Hz), que correlacionava-se, nos mapas de contorno de HSQC (Figura 4.33, p. 93; Esquema 4.7, p. 90), com o carbono em δ 16,0 e pelo HMBC a J^2 e J^3 (Figura 4.34-4.36, p. 93-94; Esquema 4.6, p. 90) com os carbonos em δ 78,2 e 67,2, respectivamente. Um duplo quadruplete em δ 4,70 ($J = 6,8$ e 1,6 Hz) apresentou correlação nos mapas de contorno de HSQC com o carbono em δ 78,2 e no HMBC a J^3 e J^2 com os carbonos em δ 16,0 e 67,2. Um dubleto em δ 4,58 ($J = 1,6$ Hz), correlacionou-se no mapa de contorno de HSQC com o carbono em δ 67,2 e no de HMBC com os carbonos em δ 78,2; 106,8/106,6; 118,3/118,5 e 140,5.

Estas análises levaram a propor uma parte da molécula:



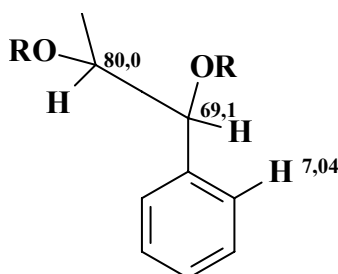
Foi observado ainda no espectro de RMN ^1H , um duplo dubleto em δ 6,93 ($J = 7,3$ e 1,0 Hz), que apresentou correlações no mapa de contorno de HMBC com os carbonos em δ 67,2; 106,6/106,8; 117,8 e correlações fracas com os carbonos em δ 140,5 e 160,9.

O hidrogênio em δ 6,93 mostrou acoplamento no experimento de COSY (Figura 4.32, p. 92; Esquema 4.7, p. 90) com um duplo dubleto em δ 7,53 ($J = 8,4$ e 7,3 Hz), o qual se correlacionava no mapa de contorno de HSQC, com os carbonos em δ 136,9/136,8. Observou-se ainda, um duplo dubleto em δ 7,55 ($J = 8,3$ e 7,6), que também apresentou correlação no mapa de contorno de HSQC com os carbonos em 136,9/136,8. Estes dois sinais de hidrogênios coaleceram na mesma

região no experimento de HMBC, não sendo possível diferenciá-los quanto às suas correlações com os carbonos em δ 160,9 e ou 161,9/162,0 e em δ 140,5; 141,2.

Estes dois sinais de hidrogênio em δ 7,53 e 7,55 apresentaram correlações no espectro de COSY com três duplos dubletos em δ 7,00 ($J = 8,4$ e $1,0$ Hz); 7,03 ($J = 7,6$ e $1,0$ Hz) e em δ 7,04 ($J = 8,4$ e $1,0$ Hz). Estes três hidrogênios apresentaram correlações no mapa de contorno de HSQC com os carbonos em δ 117,8; 116,3; 118,5 e 118,3.

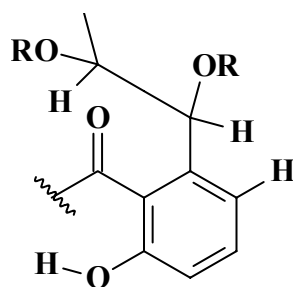
Foi observado no mapa de contorno de HMBC a correlação do sinal de hidrogênio em δ 7,04 com o carbono em δ 69,1, e deste com um sinal de hidrogênios metílicos em δ 1,51, sugerindo uma unidade similar a primeira proposta.



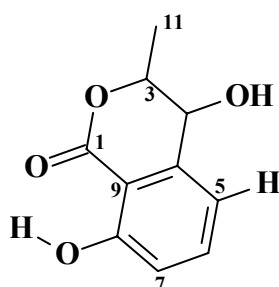
Na região entre δ 4,76 – 4,59 observou-se um sinal similar ao duplo quaduplete em δ ~4,70, que também tinha sido observado na primeira proposta. Observou-se ainda um singlete largo em δ 4,62 como na unidade anterior. Estes dois sinais mostraram correlações no mapa de contorno de HMBC com os carbonos δ 69,1 e 80,0.

Na análise de outra região do espectro de RMN ^1H , foram observados dois sinais típicos de hidroxila quelada em δ 10,98 e 10,99, as quais, mostraram correlações no mapa de contorno de HMBC com os carbonos em δ 106,6/106,8 e 160,9/161,9/162,9 e ainda, considerando as correlações das hidroxilas separadamente, notou-se que a hidroxila em δ 10,98 correlacionava-se com o carbono em δ 117,8 e a hidroxila em δ 10,99 com o carbono em δ 118,3/118,5.

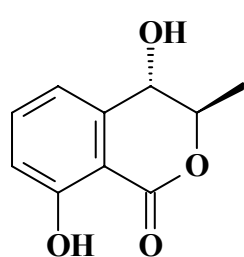
Analisando-se todos os dados, até aqui discutidos, e considerando a primeira unidade, juntamente com o sinal de hidrogênio de uma hidroxila quelada, que também mostrou correlação com os carbonos em δ 106,6/106,8 complementou-se assim a unidade anterior como sendo:



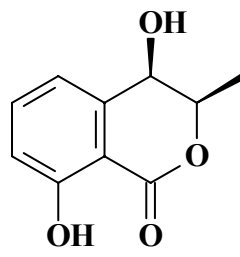
O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.31, p. 92; Tabela 4.3 e 4.4, p. 89) não apresentou sinal de lactona. O sinal de carbono que contém a metila ligada a ele possui um deslocamento típico de carbono carbinólico (δ 78,2), sugerindo que esteja ligado a uma lactona:



A configuração entre os H3 e H4, foi baseado na sua constante de acoplamento de 1,6 Hz, definindo que os hidrogênios estavam em uma configuração *CIS*. Foi observado um emaranhado de sinais em δ 4,61 com constante de acoplamento de $J = 4,5$ Hz, indicando também, a presença do composto com configuração *TRANS*. Estes dados, foram comparados com a literatura. (ASHA *et al.*, 2004) e estão de acordo com as estruturas propostas abaixo.



ISOMERO TRANS



ISOMERO CIS

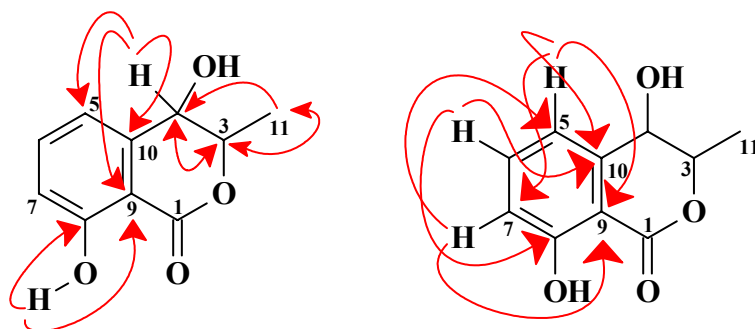
Estes compostos são conhecidos como *trans* e *cis*-3-metil-diidroisocumarina, isolada anteriormente das espécies *Lasiodiplodia theobromae* (ALDRIDGE *et al.*, 1971) *Uvária hamiltonii* (ASHA *et al.*, 2004) e dos gêneros *Coniothyrium* e *Microsphaeropsis* (HÖLLER *et al.* 1999).

TABELA 4.3: DADOS DE RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) e ^{13}C DE **S3A** (δ , CDCl_3 , 100 MHz)

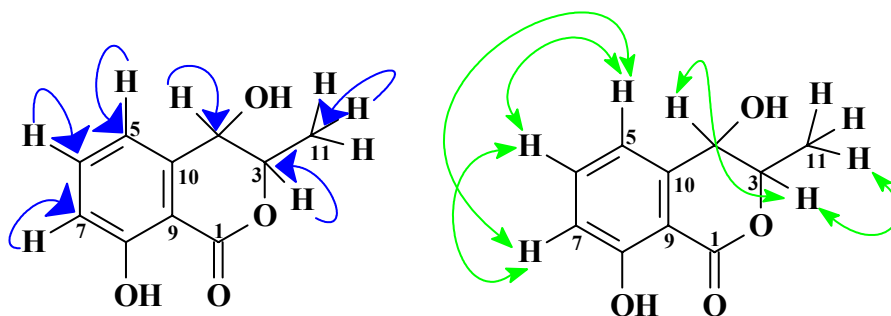
Posição	^1H	^{13}C	ASHA, 2004 (CDCl_3 , 125 MHz)
1		169,2	162,0
3	4,70 (<i>qd</i> , $J = 6,8$ e $1,6$ Hz, 1H)	78,2	79,9
4	4,58 (<i>d</i> , $J = 1,6$ Hz, 1H)	67,2	
5	6,93 (<i>dd</i> , $J = 7,3$ e $1,0$ Hz, 1H)	118,5	118,3
6	7,53 (<i>dd</i> , $J = 8,4$ e $7,3$ Hz, 1H)	136,9	137,8
7	7,00 (<i>dd</i> , $J = 8,4$ e $1,0$ Hz, 1H)	117,8	118,4
8		162,0	162,0
9		106,8	106,9
10		140,5	140,8
11	1,59 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz, 3H)	16,0	15,9
- OH	11,0		11,08

TABELA 4.4: DADOS DE RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) e ^{13}C DE **S3B** (δ , CDCl_3 , 100 MHz)

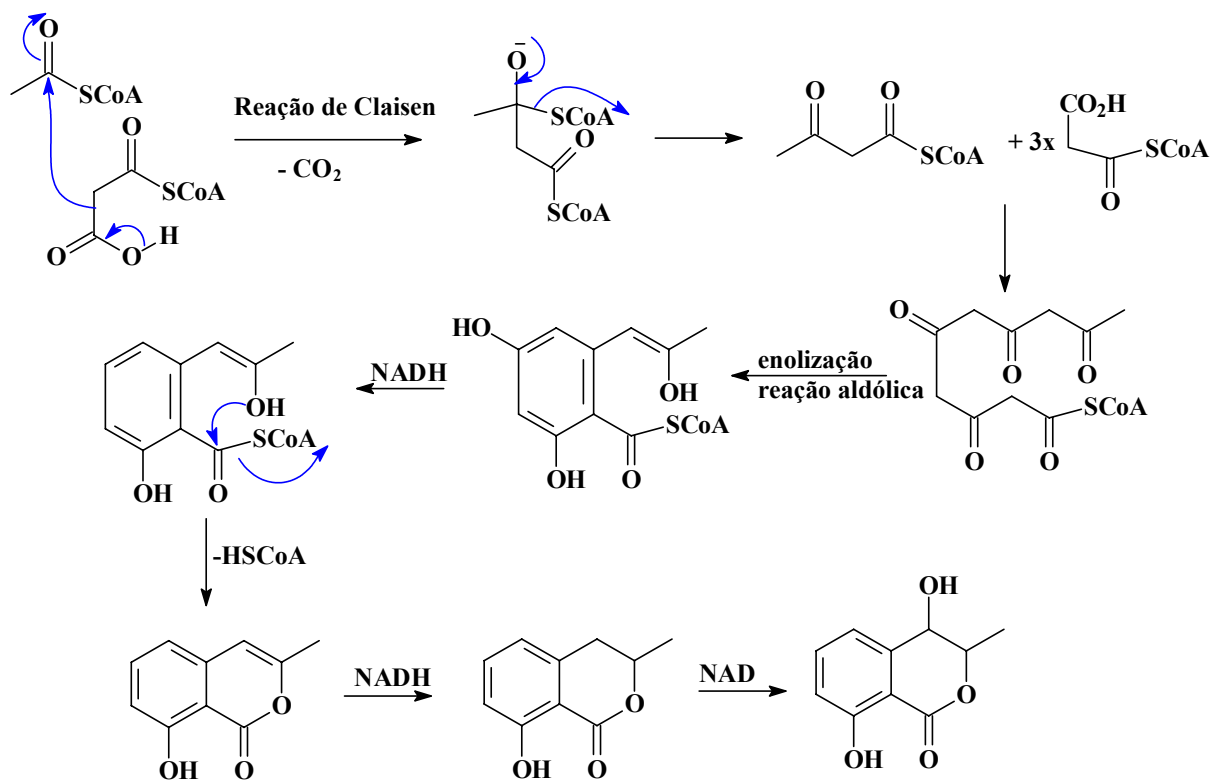
Posições	^1H	^{13}C	ASHA, 2004 (CDCl_3 , 125 MHz)
1		168,5	161,9
3		80,0	79,8
4	4,61 (<i>d</i> , $J = 4,5$ Hz)	69,7	
5	7,04 (<i>dd</i> , $J = 8,4$ e $1,0$ Hz 1H)	116,3	116,1
6	7,55 (<i>dd</i> , $J = 8,4$ e $7,6$ Hz 1H)	136,8	136,7
7	7,03 (<i>dd</i> , $J = 7,6$ e $1,0$ Hz 1H)	116,3	117,8
8		162,1	161,9
9		106,6	106,7
10		141,2	141,0
11	1,51 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz 3H)	17,9	17,8
-OH		11,03	11,00



ESQUEMA 4.6: Correlações via HMBC para **S3A** e **S3B**.



ESQUEMA 4.7: Correlações via HSQC (—→) e via COSY (—→) para **S3A** e **S3B**.



ESQUEMA 4.8: Proposta biossintética para a substância **S3**

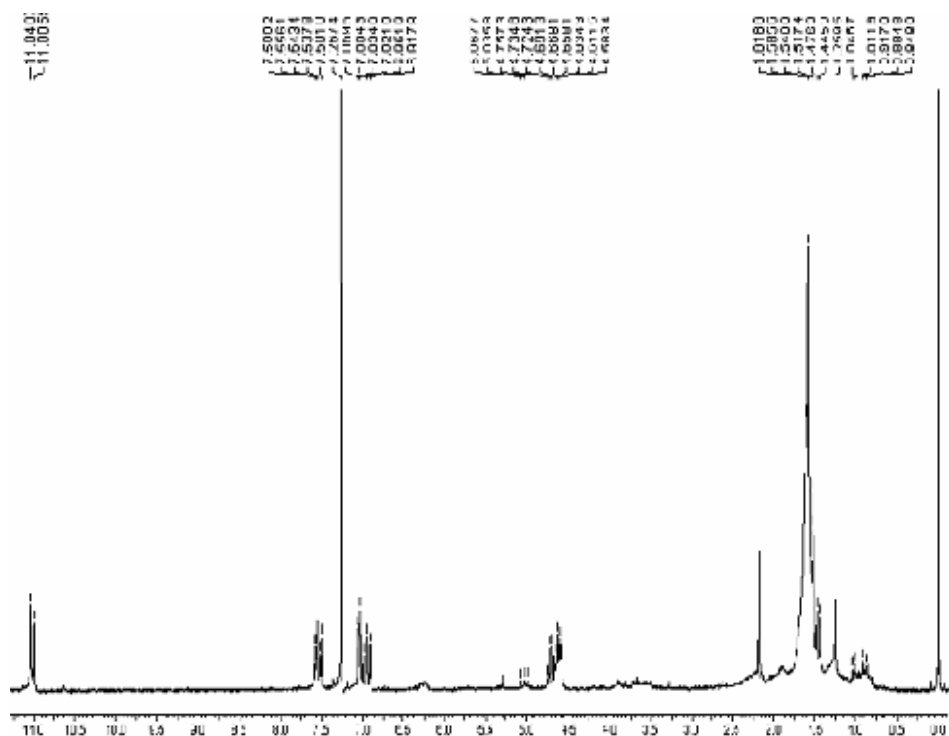


FIGURA 4.29: Espectro de RMN ^1H de **S3a** e **S3b** (200 MHz, CDCl_3)

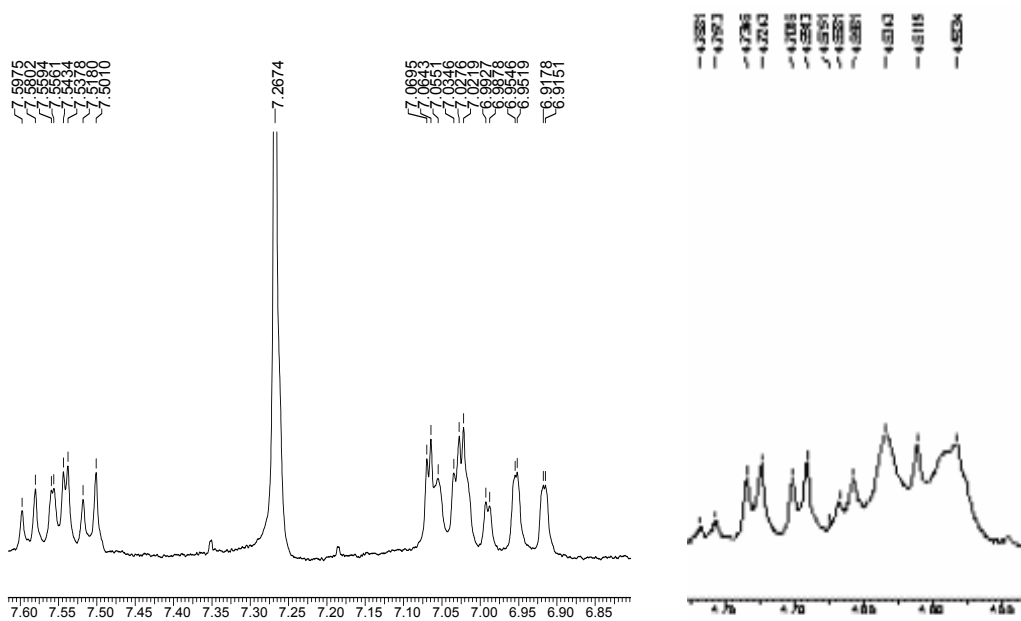


FIGURA 4.30: Expansão do espectro de RMN ^1H de **S3a** e **S3b** (200 MHz, CDCl_3)

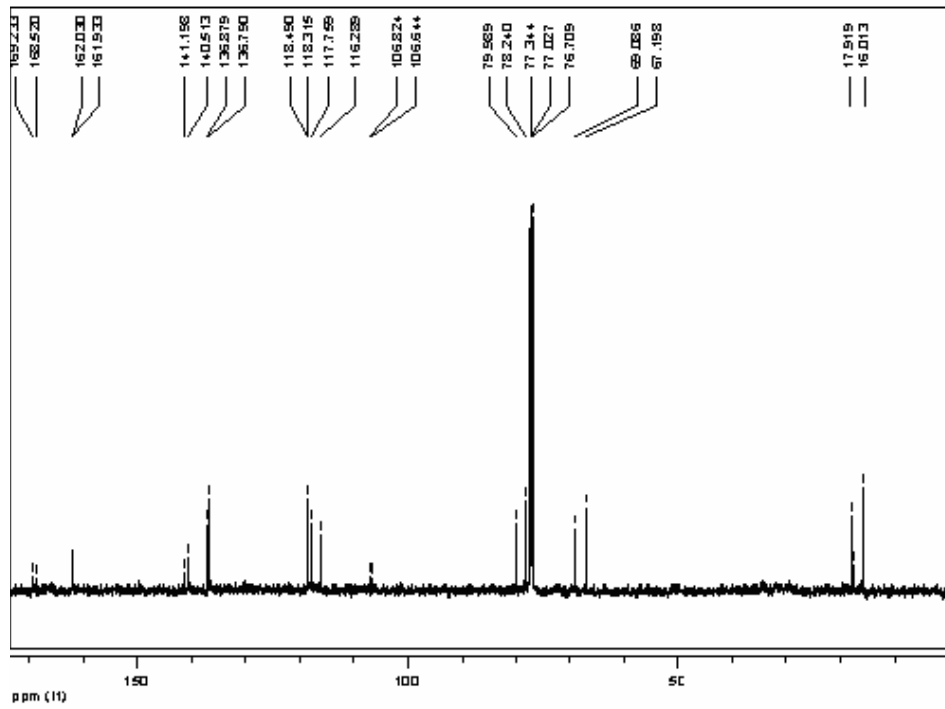


FIGURA 4.31: Espectro de RMN ^{13}C de **S3a** e **S3b** (100 MHz, CDCl_3)

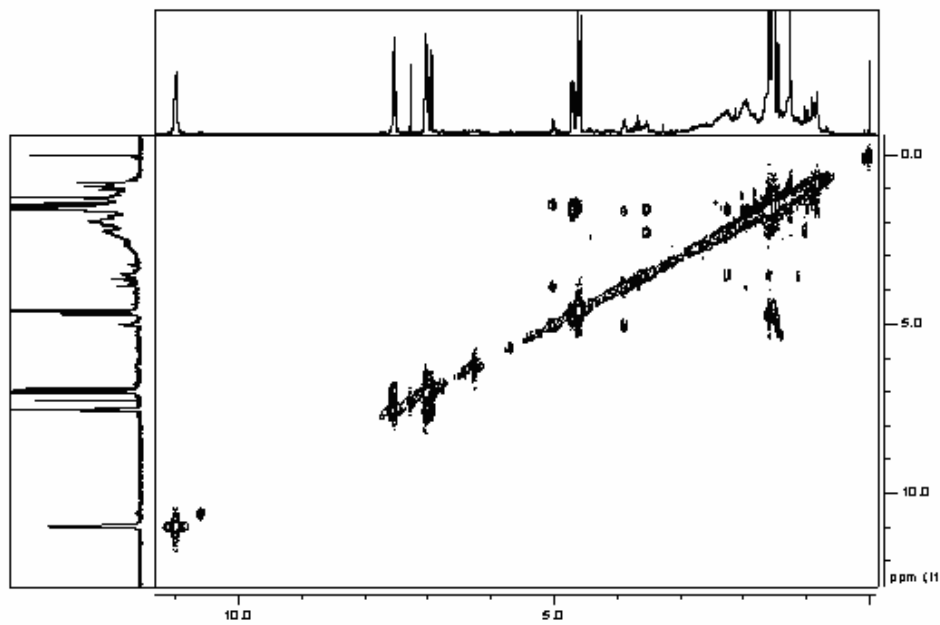


FIGURA 4.32: Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de **S3a** e **S3b** (400 MHz, CDCl_3)

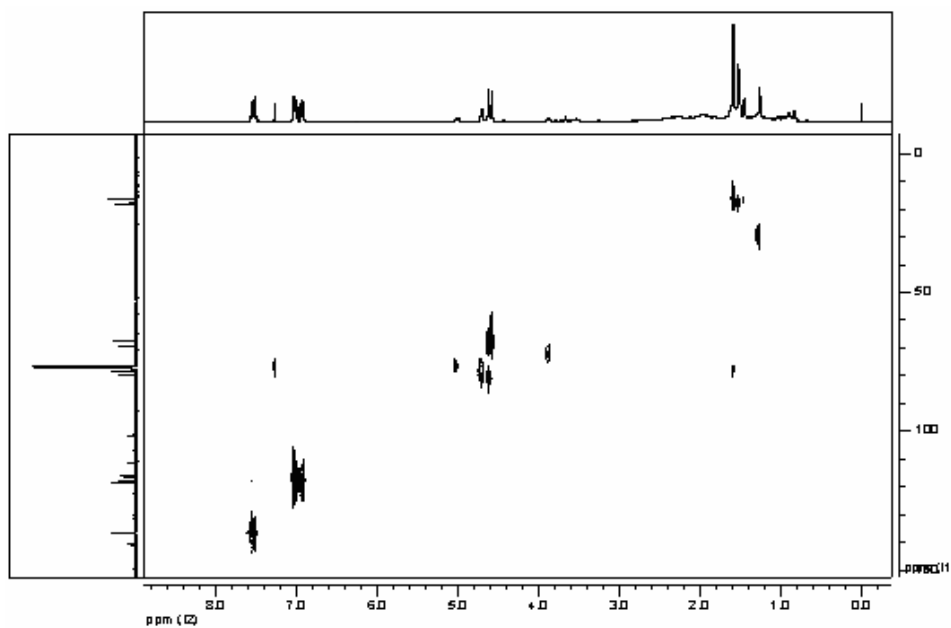


FIGURA 4.33: Mapa de contorno de HSQC de **S3a** e **S3b** (400 MHz, CDCl_3)

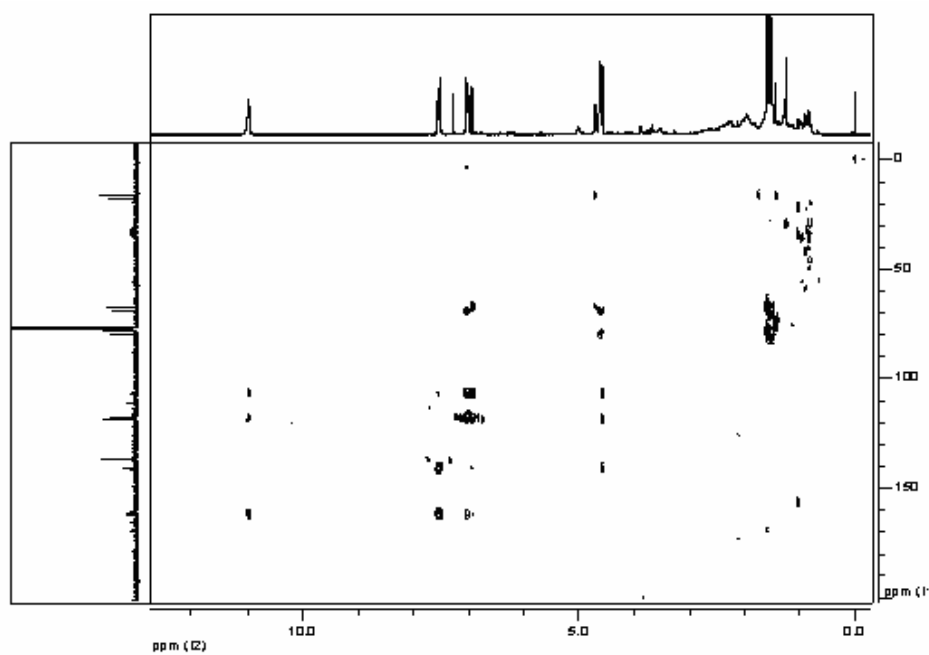


FIGURA 4.34: Mapa de contorno de HMBC de **S3a** e **S3b** (400 MHz, CDCl_3)

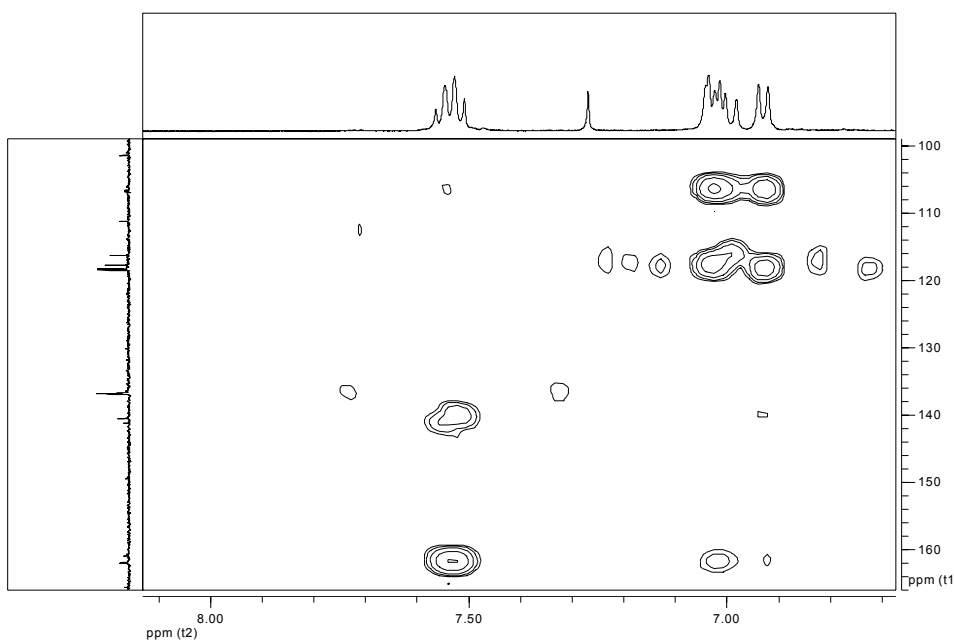


FIGURA 4.35: Expansão do mapa de contorno de HMBC de **S3a** e **S3b** (400 MHz, CDCl_3)

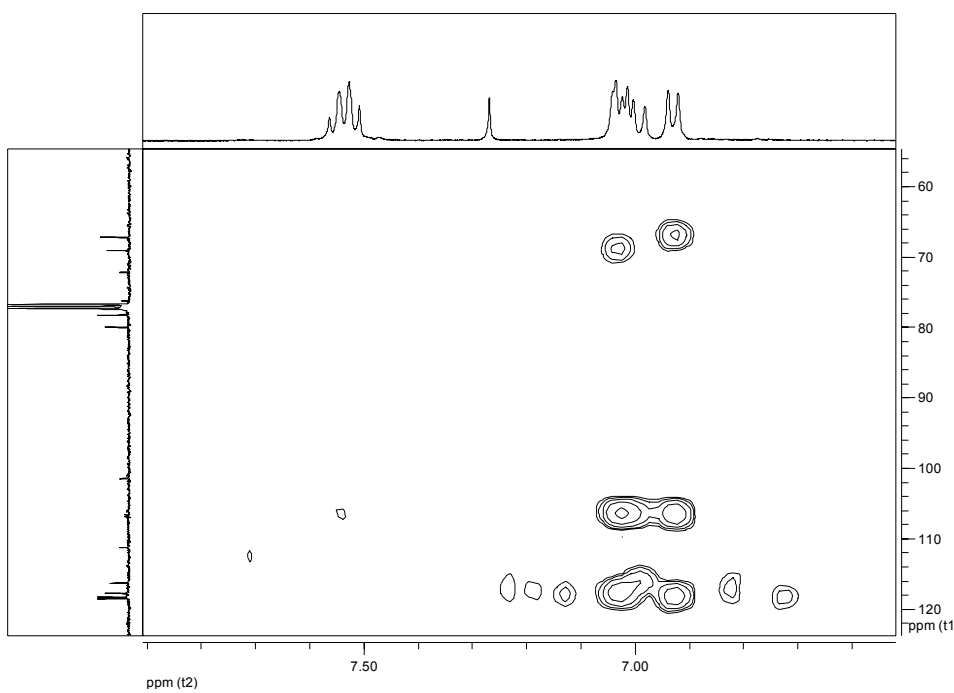


FIGURA 4.36: Expansão do mapa de contorno de HMBC de **S3a** e **S3b** (400 MHz, CDCl_3)

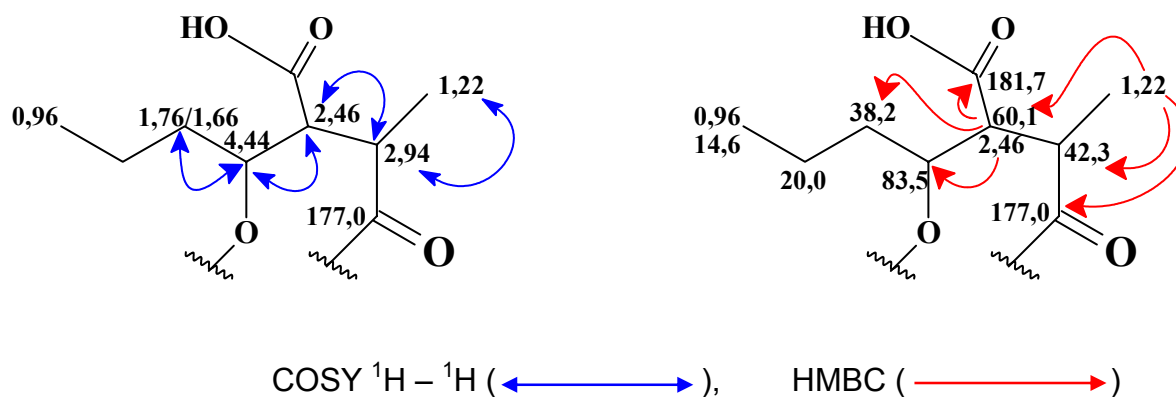
4.2.3 – Identificação estrutural dos derivados γ -butirolactona (S4) e (S5)

Analisando o espectro de RMN ^1H (Figura 4.41, p. 105; Tabela, 4.5, p. 102) de **S4**, observou-se um duplo duplo dubleto integrando para 1H em δ 4,44 ($J = 9,2; 4,4$ e $4,0$ Hz), o qual mostrou correlação no mapa de contorno de HSQC (Figura 4.47, p. 108), com o sinal de carbono carbinólico em δ 83,5. Foi observado um duplo dubleto integrando para 1H em δ 2,46 ($J = 12,0$ e $9,2$ Hz) que correlacionava-se no mapa de contorno de HSQC, com o sinal de carbono em δ 60,11 e correlações com os sinais de carbono em δ 14,6; 38,2; 42,3; 83,5 e $\sim 177,0$ no mapa de contorno de HMBC (Figura 4.49, p. 109)

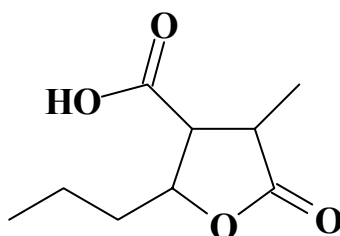
O sinal hidrogênio em δ 2,94, equivalente a um duplo quaduplo ($J = 12,0$ e $6,8$ Hz), correlacionou-se com o sinal de carbono em δ 42,3 no mapa de contorno de HSQC e com os sinais de carbono em δ 14,6; 60,1; 181,7 no HMBC. O hidrogênio em δ 2,94, também apresentou uma correlação fraca com sinal de carbono em δ $\sim 177,0$.

Observou-se ainda no espectro de RMN ^1H , sinais típicos de metilas com deslocamentos químicos diferentes, sendo que uma delas dando um dubleto em δ 1,22 ($J = 6,8$ Hz) que correlacionava-se no mapa de contorno de HSQC com o sinal de carbono em δ 14,6, e ainda no mapa de contorno de HMBC com os carbonos em δ 42,3; 60,1 e 181,7. O outro sinal tripleto em δ 0,96 ($J = 7,4$ Hz) de hidrogênios metílicos apresentou correlação no mapa de contorno de HSQC com o carbono em δ 14,2 e correlações no HMBC com os carbonos em δ 20,0 e 38,2.

No espectro de COSY (Figura 4.45, p. 107) de **S4** foram observados os acoplamento dos sinais de hidrogênios em δ 4,44 com δ 2,46; 1,76 e 1,66 sendo estes dois últimos sinais típicos de hidrogênios diastereotópicos, os quais correlacionavam-se no mapa de contorno de HSQC com o carbono em δ 38,2. No espectro de COSY observou-se acoplamentos do sinal em δ 2,94 com os sinais em δ 2,46 e com o sinal de hidrogênios metílicos em δ 1,22. Estes dados levaram a sugerir uma parte do composto:

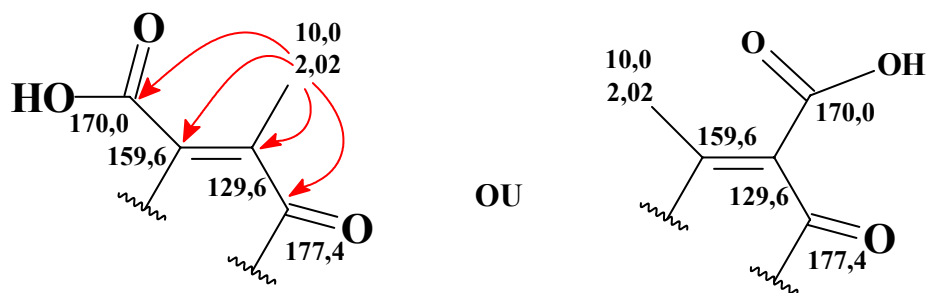


A estrutura do composto **S4** foi totalmente elucidada por comparação com dados similares encontrados na literatura (ANDERSON *et al*, 1985).



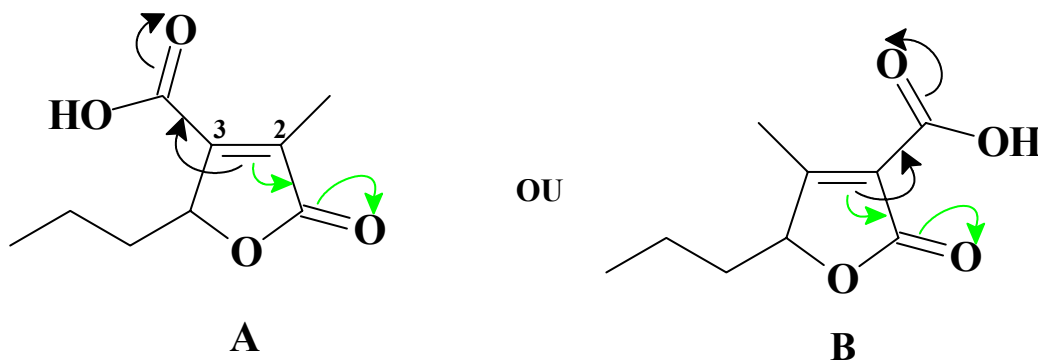
O espectro de RMN ^1H da mistura (Figura 4.42, p. 105) de **S5**, apresentou algumas diferenças quando comparado com o espectro de **S4**.

Observou-se no espectro de RMN ^1H de **S5** um duplete em δ 2,02 ($J = 1,6$ Hz) sendo este sinal típico de metila olefinica; no mapa de contorno de HSQC (Figura 4.48, p. 108; Tabela 4.5, p. 102) esta metila apresentou correlação com o sinal de carbono em δ 10,0 e no HMBC (Figura 4.50, p. 109) correlacionou-se com os carbonos em δ 129,6; 159,6; 170,0 e 177,4. Observou-se ainda, um sinal multipletto desblindado em δ 5,11, o qual pelo HSQC correlacionava-se ao sinal de carbono carbinólico em δ 83,8. O sinal em δ 5,11, não apresentou nenhuma correlação no mapa de contorno de HMBC, sendo que este experimento foi realizado várias vezes com constantes de $J = 4,0$; 7,0 e 10,0 com o intuito de verificar alguma correlação deste sinal de hidrogênio com seus carbonos vizinhos, mas mesmo assim não foi observado acoplamento. Com estas análises, foi proposto uma parte da molécula:



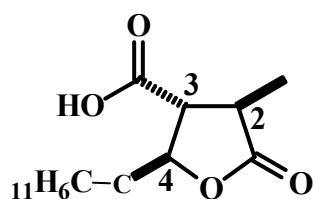
Similar ao composto anterior, foi observado um sinal de carbono em δ 35,7 que se correlacionava através do mapa de contorno de HSQC com os sinais de hidrogênio diastereotópicos em δ 2,02 e 1,44. Estes hidrogênios, correlacionavam-se no mapa de contorno de HMBC com os carbonos em δ 14,9; 20,4; 83,8 e 159,6. No espectro de COSY (Figura 4.46, p.107) os sinais de hidrogênio em δ 2,02 e 1,44 mostraram acoplamento com o sinal em δ 5,11, que acoplava com o sinal da metila em δ 2,02.

Esta estrutura foi elucidada por comparação com dados da literatura, assim como os dados do composto **S4**, levando a propor para **S5** duas possibilidades estruturais:

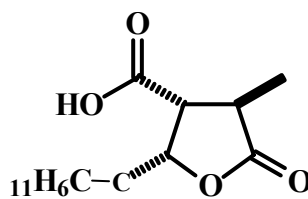


No entanto, quando se comparou estas estruturas com a literatura (HE *et. al.*, 2004; SAKAI *et. al.*, 1981), os deslocamentos químicos dos carbonos C2 e C3 encontrados foram δ 140,0 e 146,6 respectivamente, valores que não coincidiram com os valores encontrados para o composto **S5** (Figura 4.44, p. 106; Tabela 4.6, p. 102). Isto é justificável, devido a conjugação da ligação dupla, ou seja, na estrutura A, a conjugação está dirigida em dois sentidos o que explica os valores de carbonos próximos. Já na estrutura B, a conjugação está dirigida somente em um sentido, deixando assim uma carga parcial positiva no carbono C3, com isso deixando-o mais bem desblindado. Como os valores encontrados para C2 e C3 foram δ 129,6 e 159,6 respectivamente, determinou-se o composto **S5** como sendo a estrutura B.

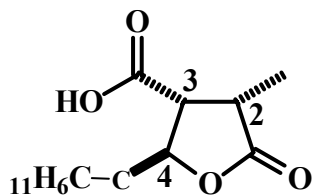
Para determinação da estereoquímica relativa dos centros quirais do composto **S4**, foi feita uma comparação com a literatura (SHIMADA *et. al.*, 1993; JACOBI *et. al.*, 1996) onde os autores mostram que a constante de acoplamento entre os hidrogênios H2-H3 e H3-H4, são de extrema importância para se determinar a estereoquímica relativa dos quatro estereoisômeros possíveis:



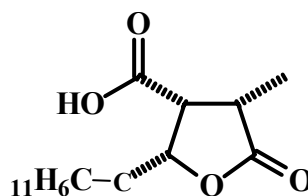
A – TT (H2 α , H3 β , H4 α)



B – TC (H2 α , H3 β , H4 β)



C – CT (H2 β , H3 β , H4 α)



D – CC (H2 β , H3 β , H4 β)

E para se ter estes tipo de sistema *Trans-Trans* (TT), *Trans-Cis* (TC), *Cis-Trans* (CT) e *Cis-Cis* (CC), os valores da constante de acoplamento devem estar próximos dos valores listados abaixo:

TT J_{2-3} e J_{3-4} = 10,7 – 11,6 e 8,2 – 9,5 Hz, respectivamente

TC J_{2-3} e J_{3-4} = 7,0 – 10,0 Hz

CT J_{2-3} e J_{3-4} = 8,9 – 10,2 e 5,9 – 6,7 Hz, respectivamente

CC J_{2-3} e J_{3-4} = 6,4 – 7,6 e 4,6 – 5,8 Hz, respectivamente

Como os valores encontrados para os hidrogênios H2 – H3 e H3 – H4 para **S4** foram J_{2-3} = 12,0 Hz e J_{3-4} = 9,4 Hz, pode-se definir assim a estereoquímica relativa do composto **S4** como *Trans-Trans*. Outro fato importante, discutido pelo autor, é que quando se tem o sistema TT, o deslocamento químico de H2 é mais desblindado em relação ao deslocamento de H3, esta diferença de deslocamento químico também foi observado no espectro de RMN ^1H de **S4**.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, não há relato dos compostos **S4** (4-propil-3-carbonil-2-metil-4-butanolideo) e **S5** (4-propil-2-carbonil-3-metil-4-butenolideo), portanto pode-se dizer que essas substâncias são novas na literatura. Os espectros de massas obtidos para os compostos por *electrospray* modo negativo confirmaram a proposta estrutural, onde foi observado o pico m/z 185,2 para **S4**, no *full scan* (Figura 4.39, p. 100) e no espectro de íons filhos (Figura 4.40, p. 101) de m/z 185,2 os picos m/z 141,2, 113,1 e 69,2. No *full scan* de **S5**, observou-se dois picos m/z 185,2 e 183,1 confirmando que **S5** estava junto com **S4**, e quando pediu-se os íons filhos de m/z 183,1 observou-se os picos com m/z 139,2 e 95,2.

Abaixo encontram-se as estruturas dos compostos **S4** e **S5** e ainda o composto similar encontrado na literatura que serviu como comparação para os dados de RMH de ^1H e ^{13}C .

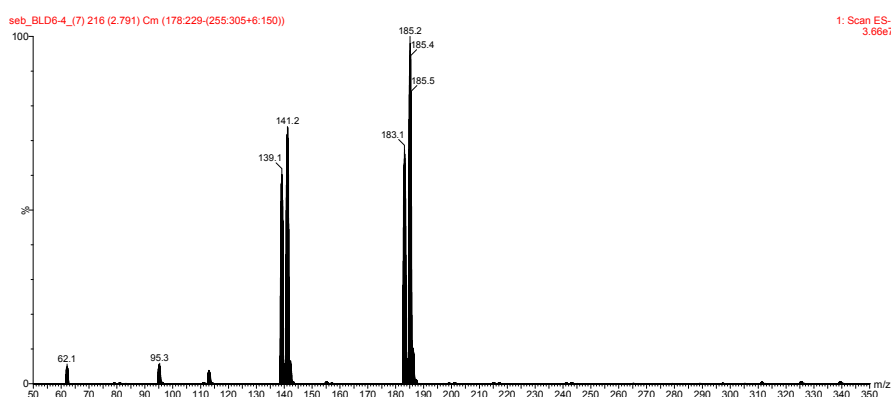
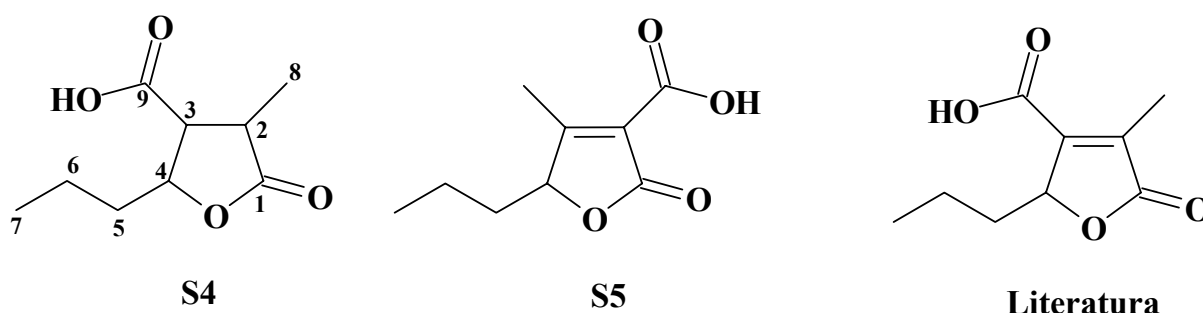


FIGURA 4.37: Espectro de massas da mistura de **S4** e **S5**

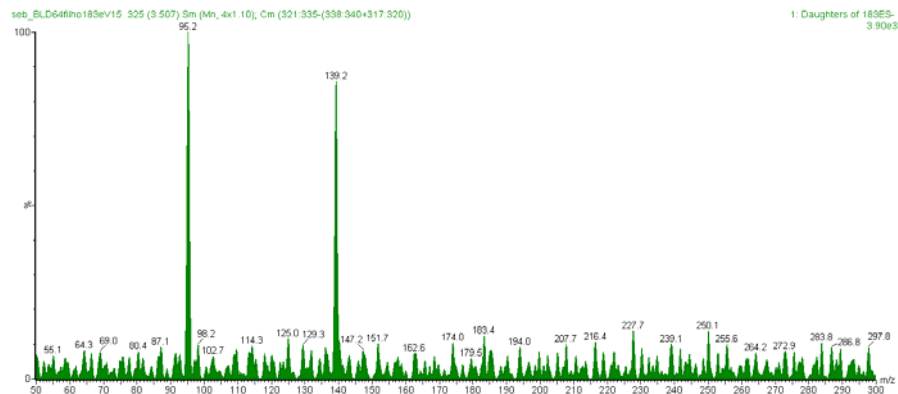
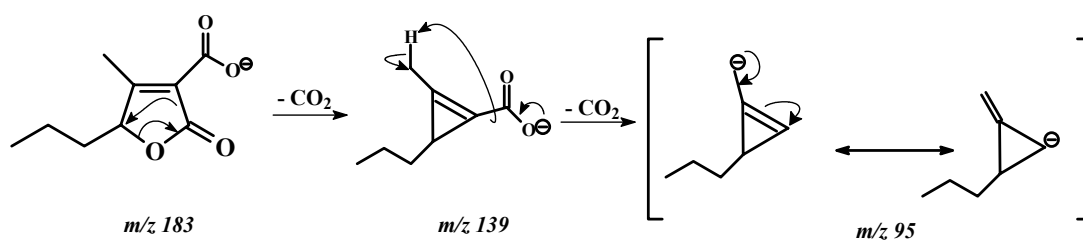


FIGURA 4.38: Espectro de massas íons filhos do m/z 183,1 (ES^-)



ESQUEMA 4.9: Proposta de fragmentação para **S5**

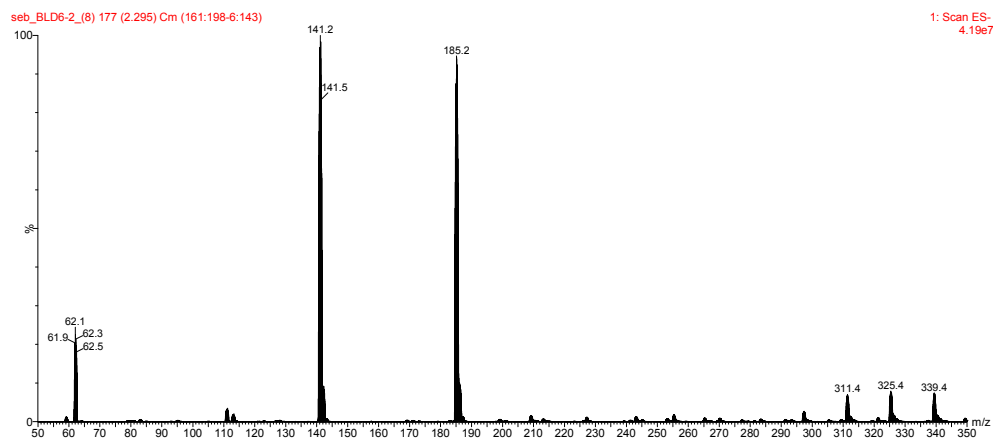


FIGURA 4.39: Espectro de massas de **S4**

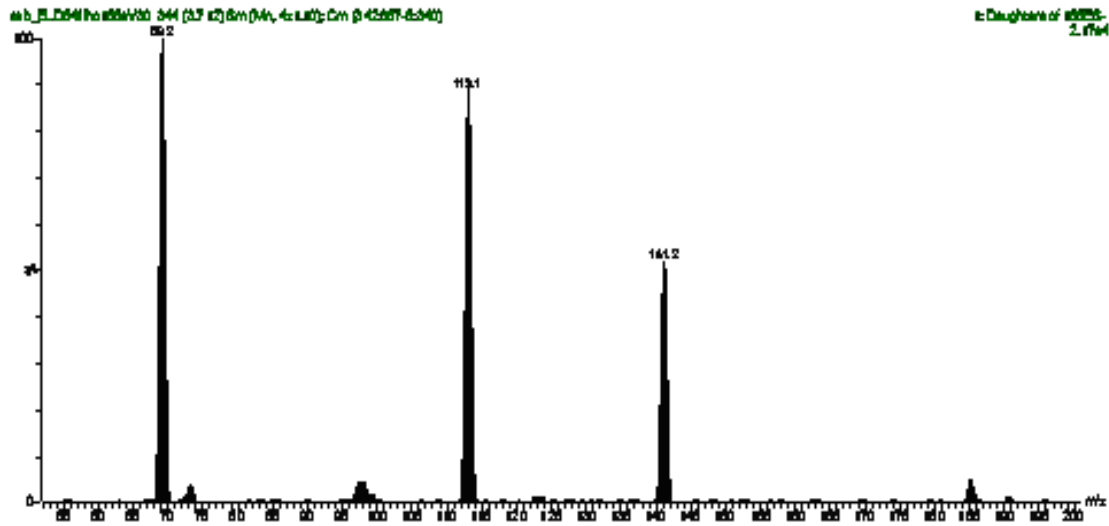
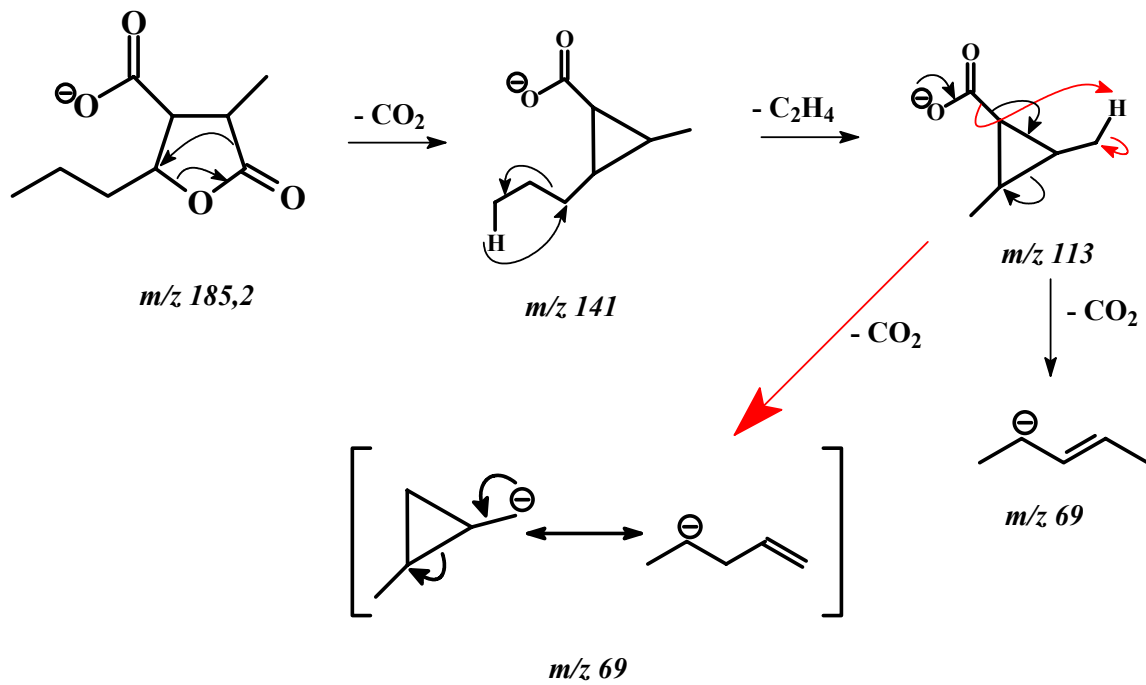


FIGURA 4.40: Espectro de massas Filhos do m/z 185,2 (ES^-)



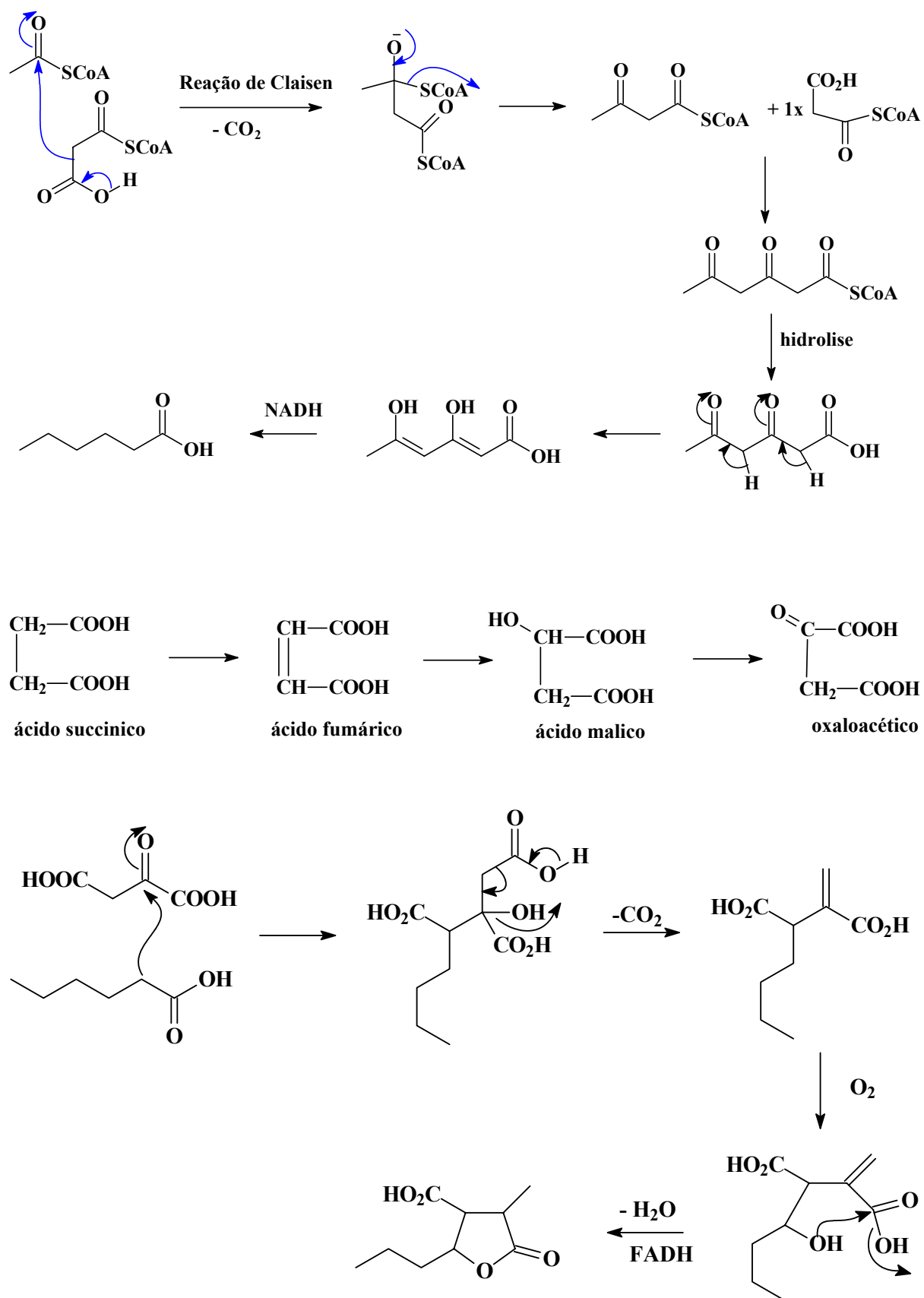
ESQUEMA 4.10: Proposta de fragmentação para **S4**

TABELA 4.5: DADOS DE RMN ^1H (δ , MeOH, 400 MHz) de **S4** e **S5**

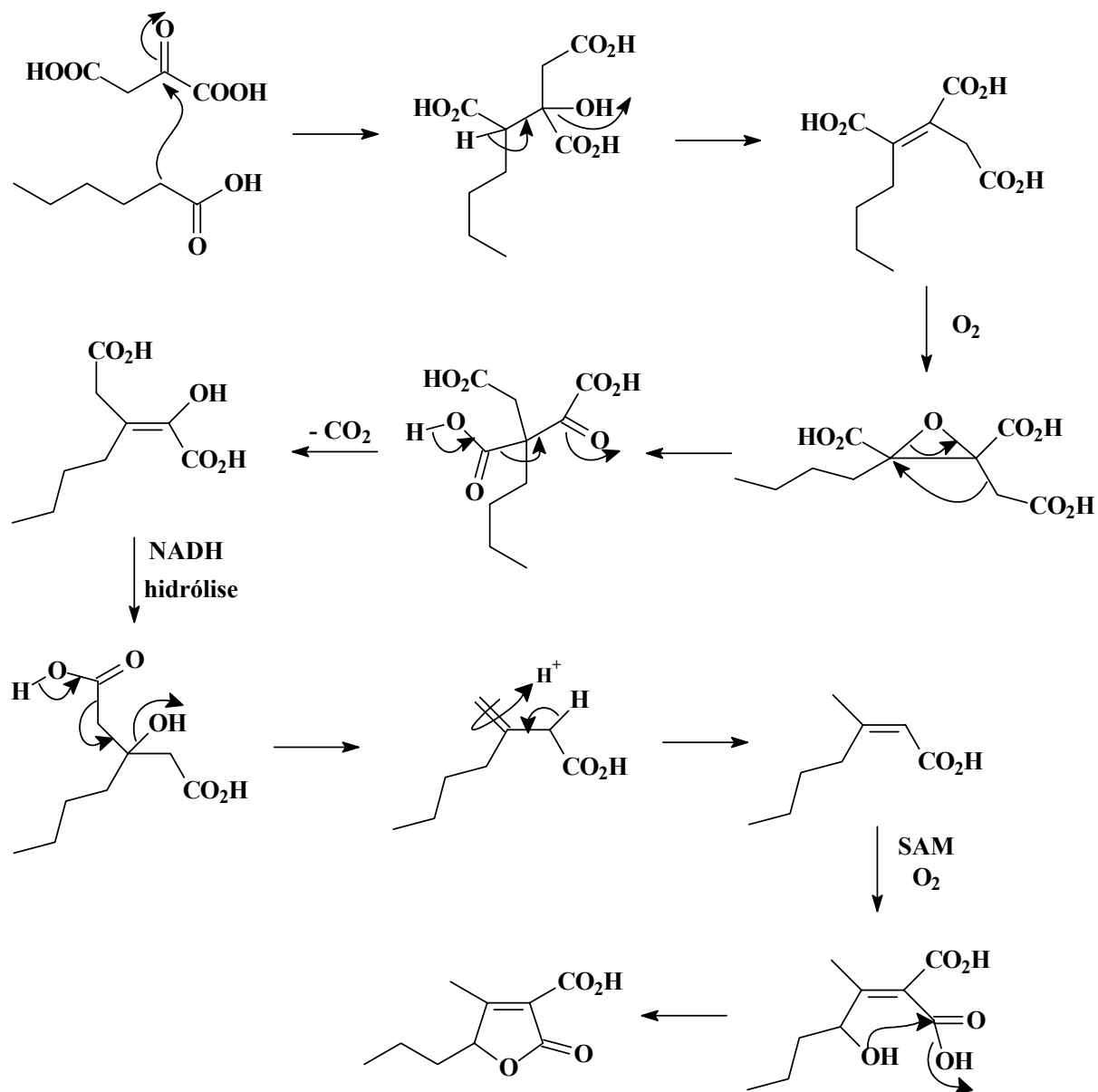
RMN ^1H		
Posições	S4	S5
2	2,94 (<i>dq</i> , $J = 12,0$ e $6,8$ Hz 1H)	-
3	2,46 (<i>dd</i> , $J = 12,0$ e $9,2$ Hz 1H)	-
4	4,44 (<i>ddd</i> , $J = 9,2$, $4,4$ e $4,0$ Hz 1H)	5,11 (<i>m</i> 1H)
5a/5b	1,76 e 1,66 (<i>m</i> 2H)	2,02 e 1,44 (<i>m</i> 2H)
6	1,50 (<i>m</i> 2H)	-
7	0,96 (<i>t</i> , $J = 7,4$ Hz 3H)	0,95 (<i>t</i> , $J = 7,6$ Hz 3H)
8	1,22 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz 3H)	2,02 (<i>d</i> , $J = 1,6$ Hz 3H)

TABELA 4.6: DADOS DE RMN ^{13}C (δ , MeOH, 100 MHz) de **S4** e **S5**

RMN ^{13}C		
Posições	S4	S5
1	177,0	177,4
2	42,3	129,6
3	60,1	159,6
4	83,5	83,8
5a/5b	38,2	35,7
6	20,0	19,6
7	14,2	14,7
8	14,6	10,0
9	181,7	170,0



ESQUEMA 4.11: Proposta biossintética para as substâncias S4 e S5 (TURNER *et al.*, 1983)



ESQUEMA 4.12: Proposta biossintética para a substância **S5** (continuação)

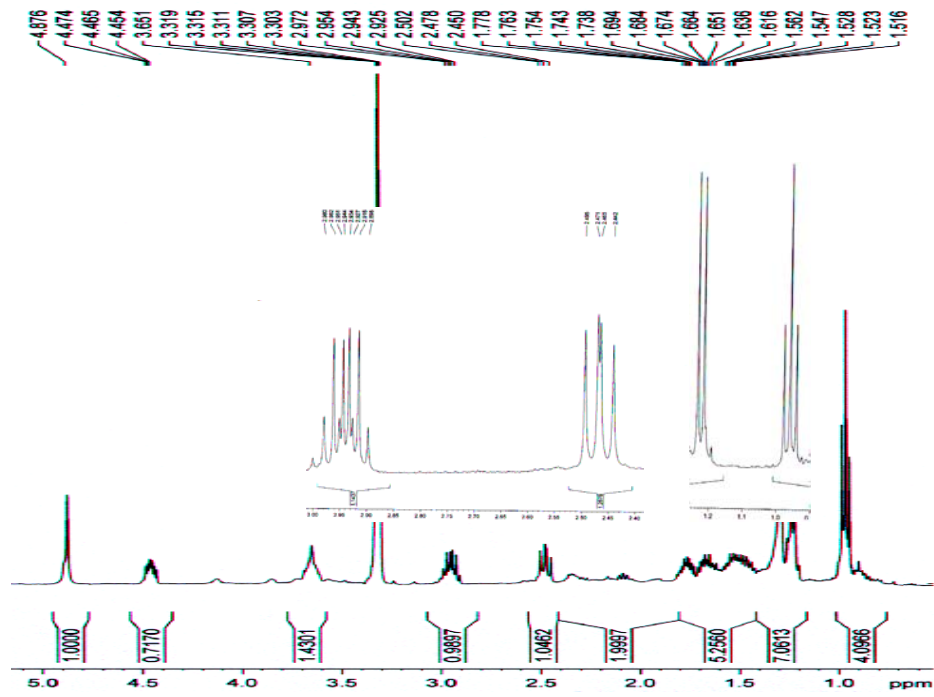


FIGURA 4.41: Espectro de RMN ^1H de **S4** (400 MHz, MeOD)

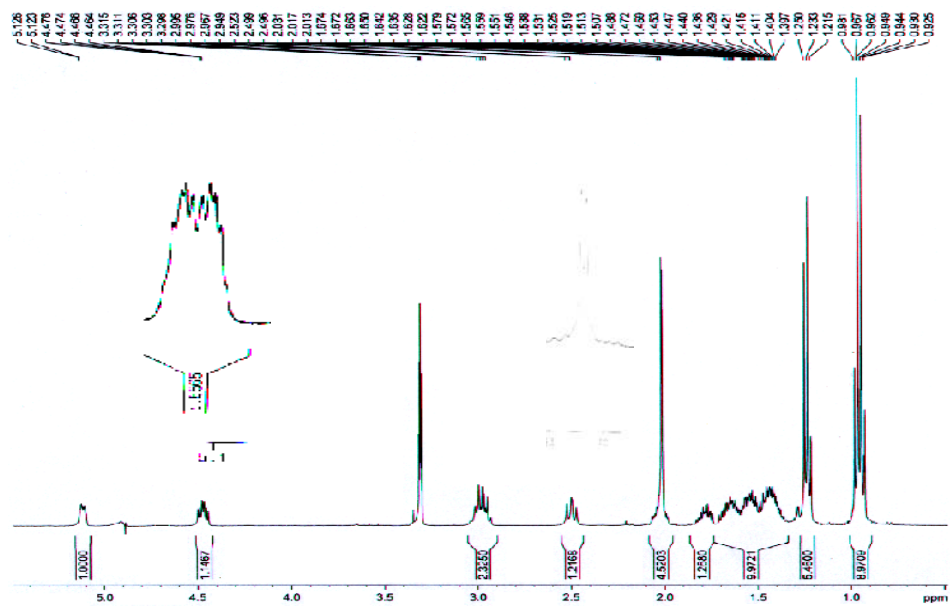


FIGURA 4.42: Espectro de RMN ^1H de **S4-S5** (400 MHz, MeOD)

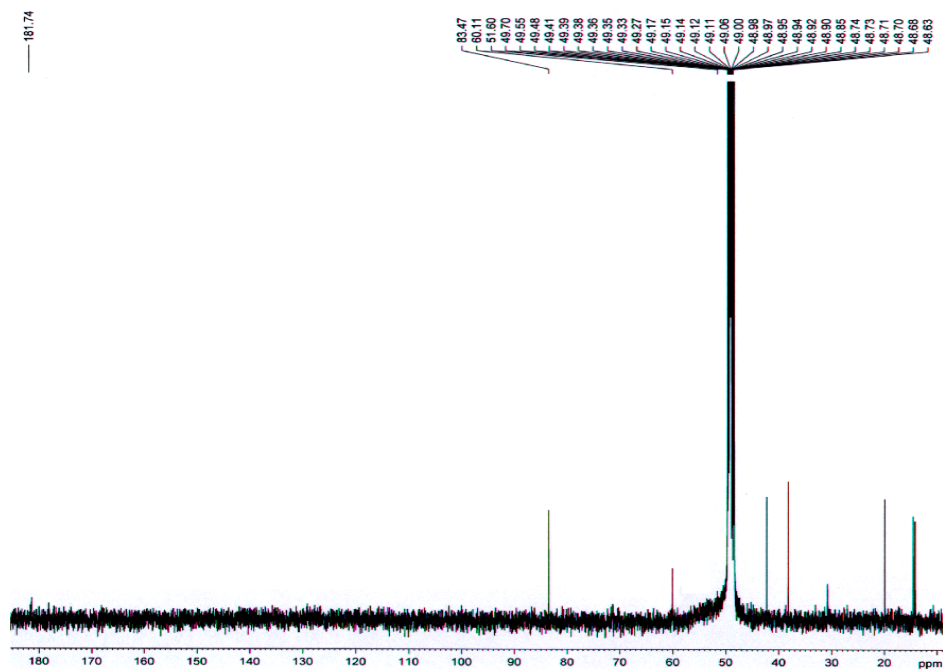


FIGURA 4.43: Espectro de RMN ^{13}C de **S4** (100 MHz, MeOD)

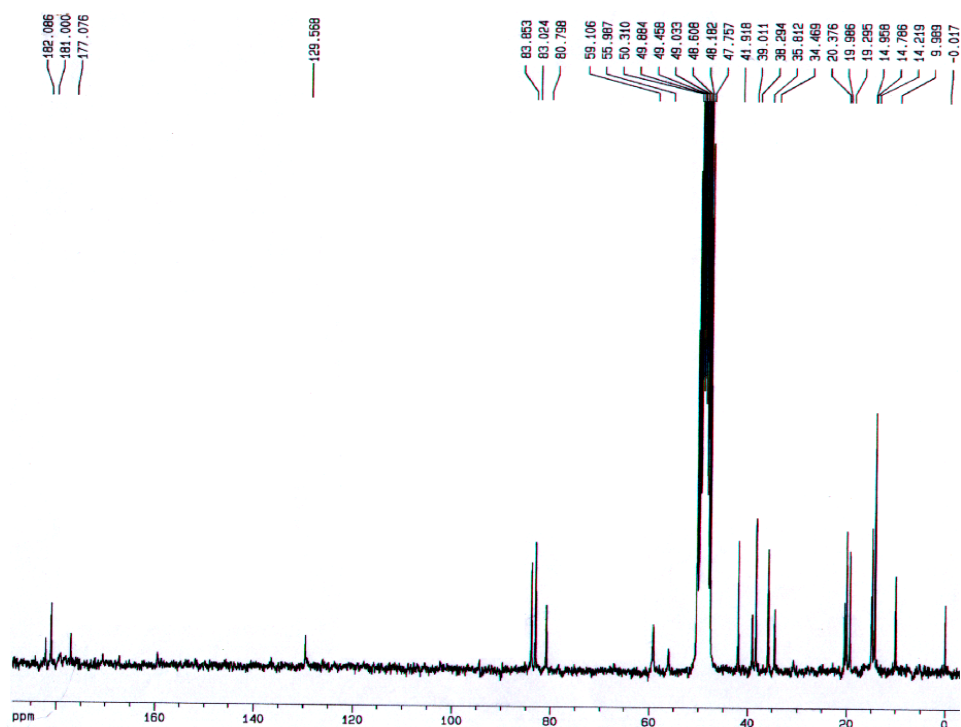


FIGURA 4.44: Espectro de RMN ^{13}C de **S4-S5** (50 MHz, MeOD)

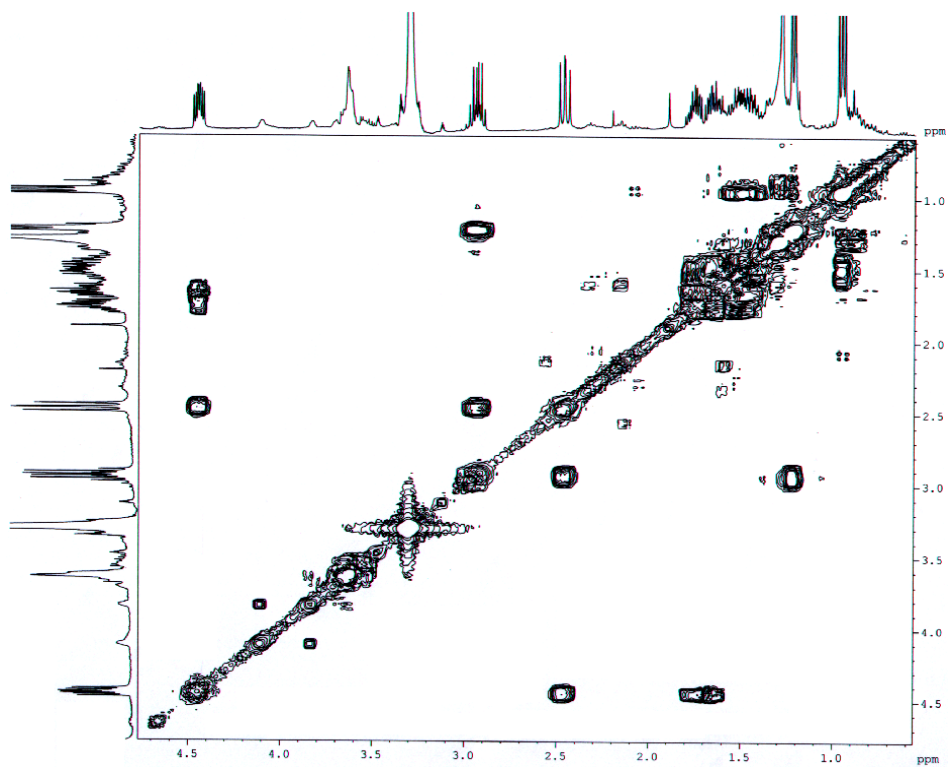


FIGURA 4.45: Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de **S4** (400 MHz, MeOD)

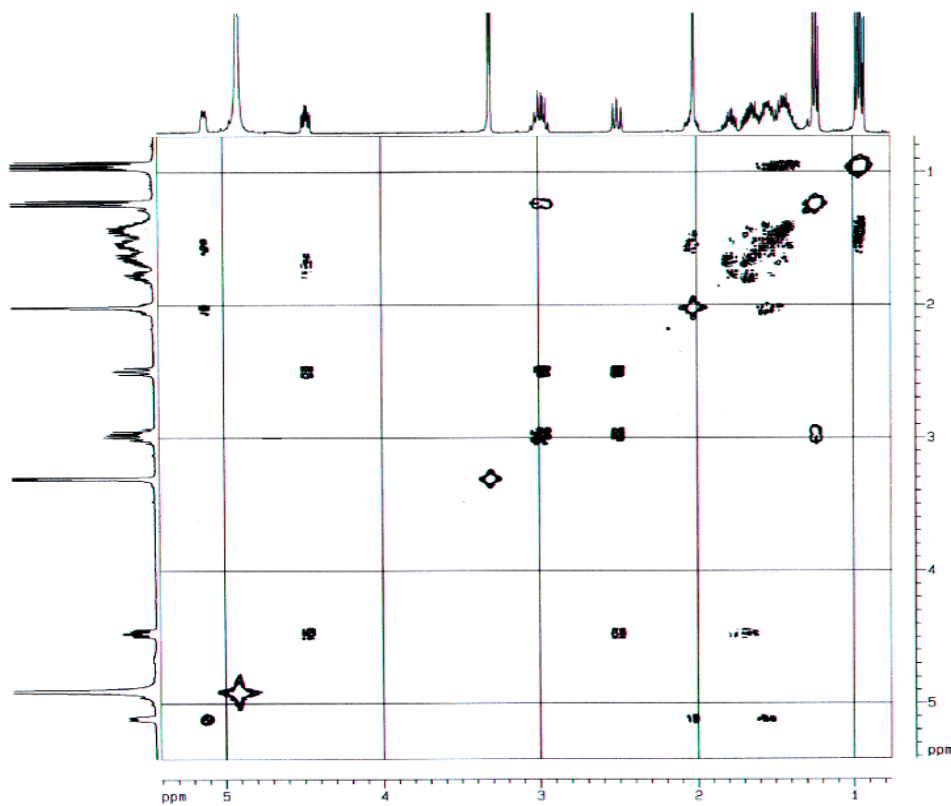


FIGURA 4.46: Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de **S4-S5** (400 MHz, MeOD)

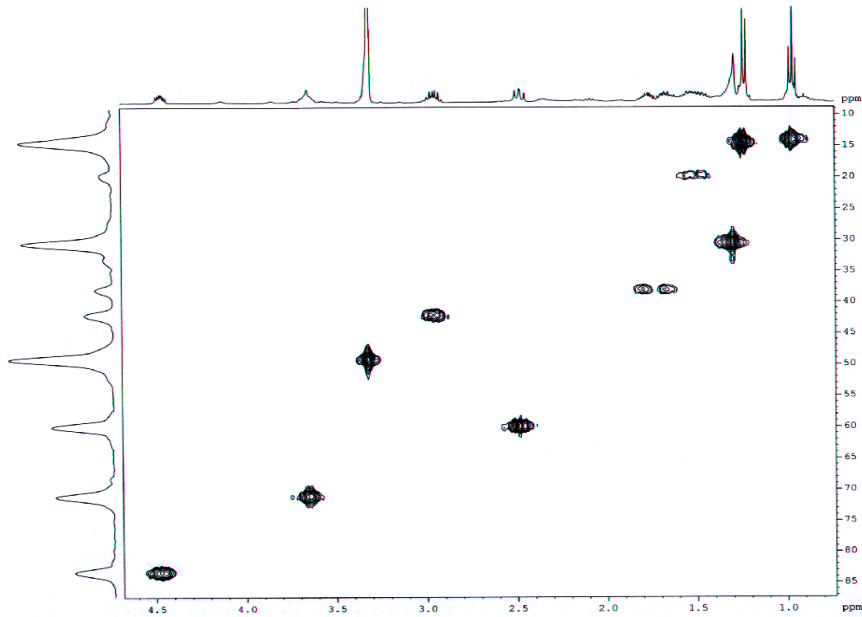


FIGURA 4.47: Mapa de contorno de HSQC de **S4** (400 MHz, MeOD)

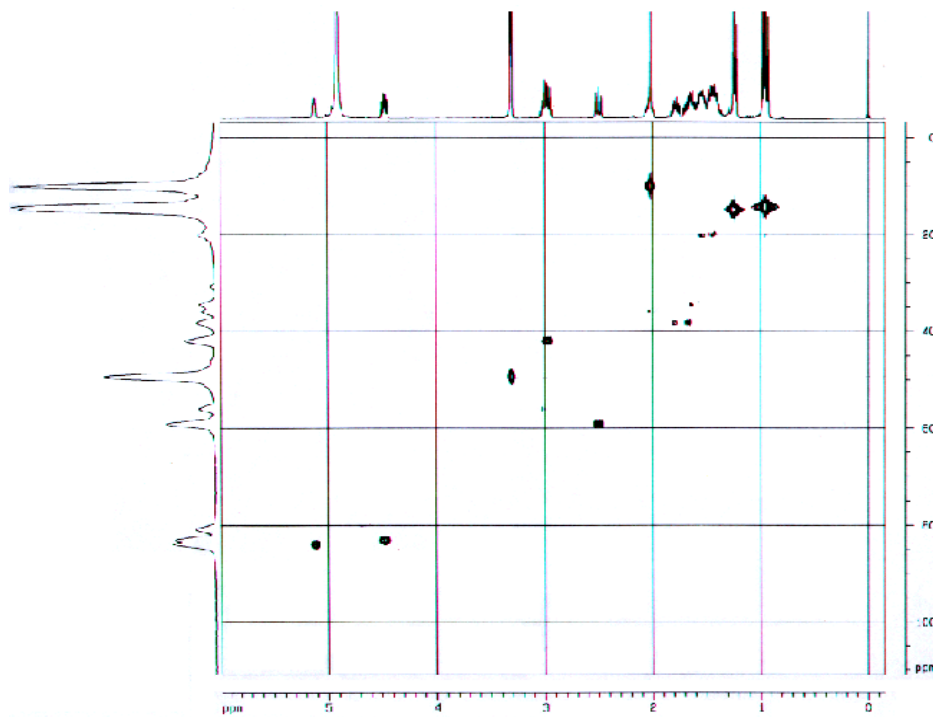


FIGURA 4.48: Mapa de contorno de HSQC de **S4-S5** (400 MHz, MeOD)

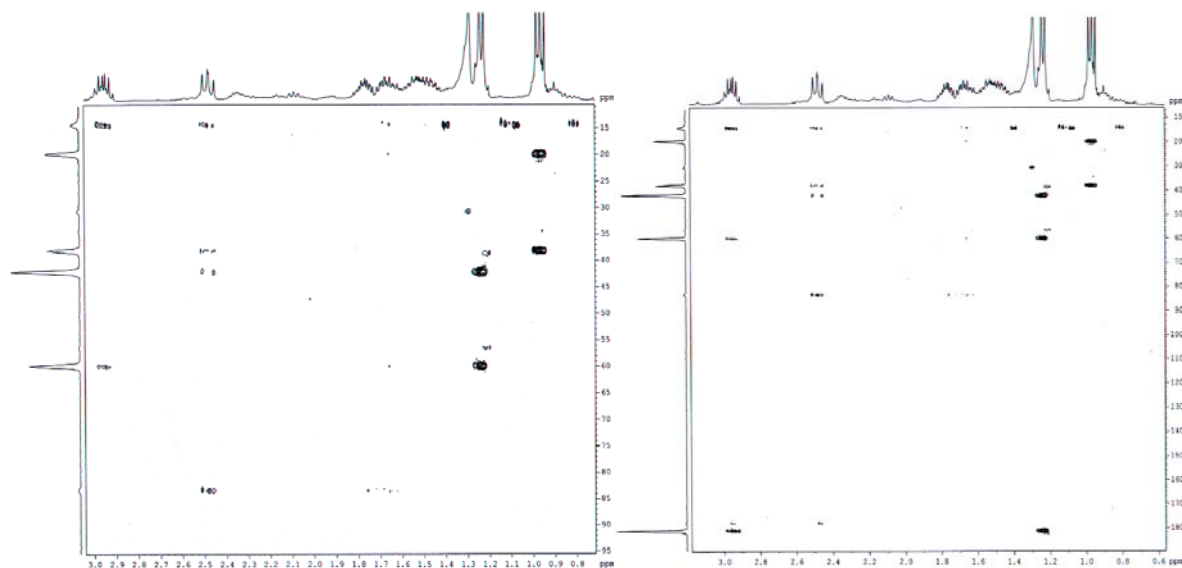


FIGURA 4.49: Mapas de contorno de HMBC de **S4** (400 MHz, MeOD)

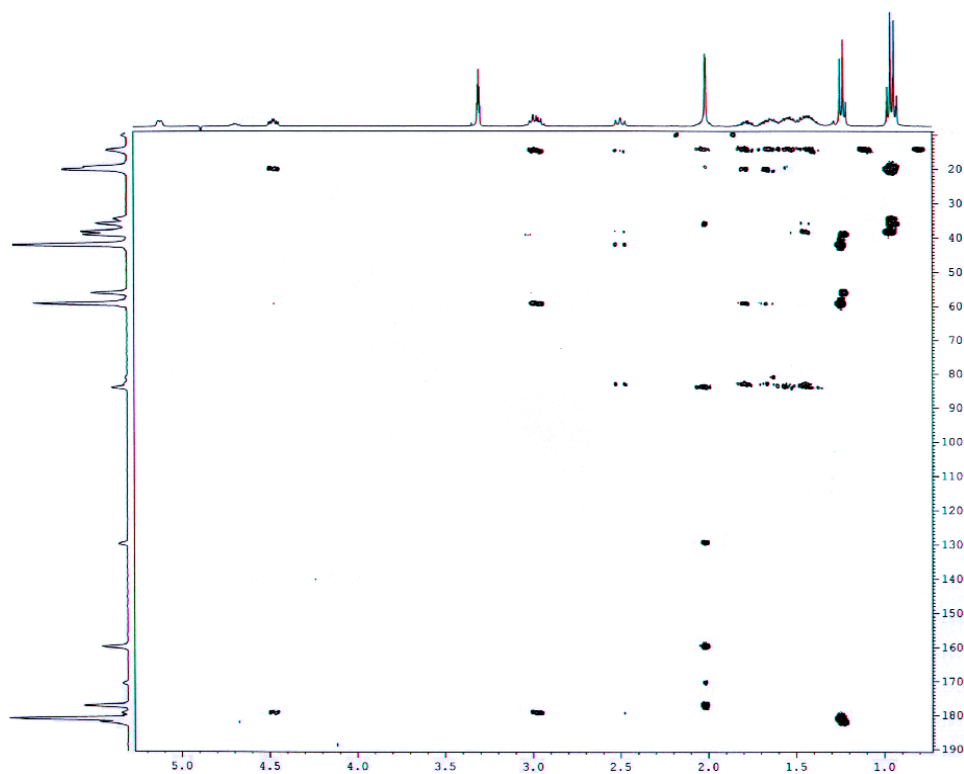
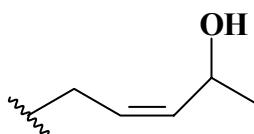


FIGURA 4.50: Mapa de contorno de HMBC de **S4-S5** (400 MHz, MeOD)

4.2.4 – Identificação Estrutural do Ácido 11-hidroxi-jasmônico (S6)

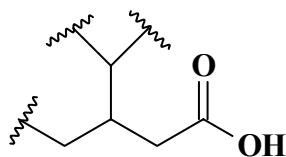
Na análise do espectro de RMN ^1H de **S6** (Figura 4.51-4.53, p. 115-116, Tabela 4.7, p. 112) observou-se um dubleto típico de metila em δ 1,23 ($J = 6,0$ Hz), que, de acordo com o mapa de contorno de HSQC (Figura 4.57, p. 118; Esquema 4.14, p. 112) mostrou correlação com o sinal de carbono em δ 22,7 e apresentou correlações a J^2 e a J^3 no HMBC (Figura 4.58-4.60, p. 118-119; Esquema 4.13, p. 112) com os carbonos em δ 63,4 e 135,7. Um multiplete em δ 4,67 apresentou correlações com os carbonos carbinólicos em δ 63,4 e 63,2 no HSQC e estes apresentam correlações a J^2 e a J^3 no HMBC com os carbonos em δ 22,7 e 127,3. Um outro multiplete em 5,50 integrando para dois hidrogênios, apresentou correlação no mapa de contorno de HSQC com o carbono em δ 135,7 e no HMBC a J^2 e J^3 com os carbonos em δ 63,4 e 26,0. Observou-se também, dois duplo duplo dubletos em δ 5,38 ($J = 10,4; 10,4$ e $5,2$ Hz) e em δ 5,20 ($J = 10,4; 10,4$ e $5,4$ Hz), os quais se correlacionam no HSQC com os carbonos em δ 127,3 e 126,7 respectivamente e correlações a J^2 e a J^3 com os carbonos em δ 26,0; 54,7; 54,3 e 135,7 no mapa de contorno de HMBC.

Através da análise do experimento de COSY (Figura 4.56, p. 117; Esquema 4.14, p. 112) foi observado os acoplamentos dos hidrogênios em δ 1,23 com o hidrogênio em δ 4,67 e deste com o hidrogênio em δ 5,50, e este último com outro em δ 5,38/5,20. Estas análises fizeram propor uma parte da cadeia lateral da substância, a qual não se define ainda a estereoquímica no centro quiral:



Observou-se no mapa de contorno de HMBC que o sinal de carbono em δ 176,6 apresentou correlações a J^2 e a J^3 com os hidrogênios em δ 2,65; 2,54; 2,45 e 2,35. Os sinais de hidrogênio em δ 2,65 e 2,45 apresentaram correlação no mapa de contorno de HSQC com o carbono em 39,2 e no HMBC correlacionou-se

com os carbonos em δ 176,6; 27,5 (CH₂); 38,2 (CH); 54,7/54,3 (CH). Com estas correlações, pode-se propor uma outra parte da substância:

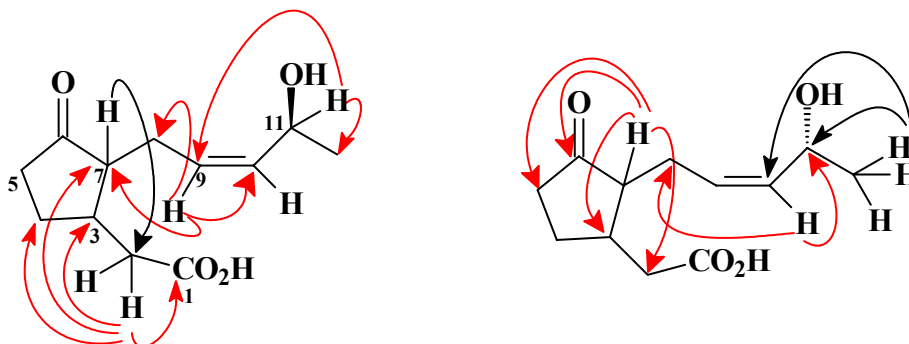


O sinal de carbono em δ 54,7/54,3 correlacionou-se com o sinal de hidrogênio em $\delta \sim 1,19$, observado no mapa de contorno de HSQC. Este hidrogênio, apresentou correlações no HMBC com os carbonos em 219,1; 26,0 (CH₂); 38,2 (CH); 39,2 (CH₂) e 37,9/37,5 (CH₂). Pode-se observar que o sinal de carbono carbonílico em δ 219,1 apresentou várias correlações com os sinais de hidrogênios na região de δ 2.10 – 2,50.

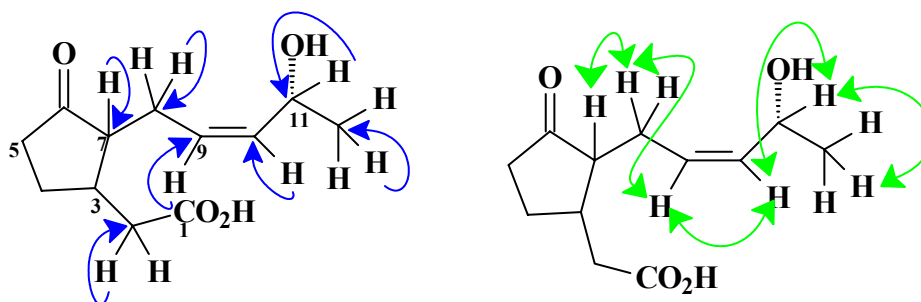
Estes dados sugeriram um anel ciclopentanona, os quais, conferem com o espectro de RMN ¹³C (Figura, 4.54, p. 116; Tabela 4.8, p, 113) juntamente com o espectro de RMN ¹³C-PENDANT (Figura 4.55, p. 117, Tabela 4.8, p. 113). Os espectros de RMN ¹³C-PENDANT foram essenciais para as atribuições dos sinais de carbono, onde os deslocamentos químicos em δ 54,7/54,3 e 38,2 foram atribuídos aos carbonos C-7 e C-3 respectivamente e em δ 39,8; 27,5 e 26,0 foram atribuídos aos carbonos C-2, C-4 e C-8, faltando assim, assinalar um carbono CH₂ em δ 35,5/37,9, o qual foi atribuído ao carbono C-5, fechando-se assim a estrutura, com os sinais de carbono em δ 127,3/126,7; 135,7; 63,4 e 22,7 atribuídos aos carbonos C-9, C-10, C-11 e C-12, respectivamente.

Com a correlação do hidrogênio H7 com o carbono C2, no HMBC pode-se supor que estes estejam na mesma face, no entanto não sendo possível definir a estereoquímica deste centro. A estereoquímica em C3 também não foi definida, uma vez que não foi possível assinalar o deslocamento químico de H3, pois este se encontra em uma região aglomerada de sinais, deste modo não foi possível observar correlações deste hidrogênio com seus carbonos vizinhos.

Estes dados levaram a propor uma mistura epimérica, que de acordo com a literatura são os ácidos (11S) hidroxijasmonico e (11R) hidroxijasmonico isolados anteriormente de *Solanum tuberosum* L. (MATSUURA *et al.*, 2001), *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae* (MIERSCH *et al.*, 1999; 1991) e *Gibberella fujikuroi* (MIERSCH *et al.*, 1991).



ESQUEMA 4.13: CORRELAÇÕES VIA HMBC PARA **S6**.



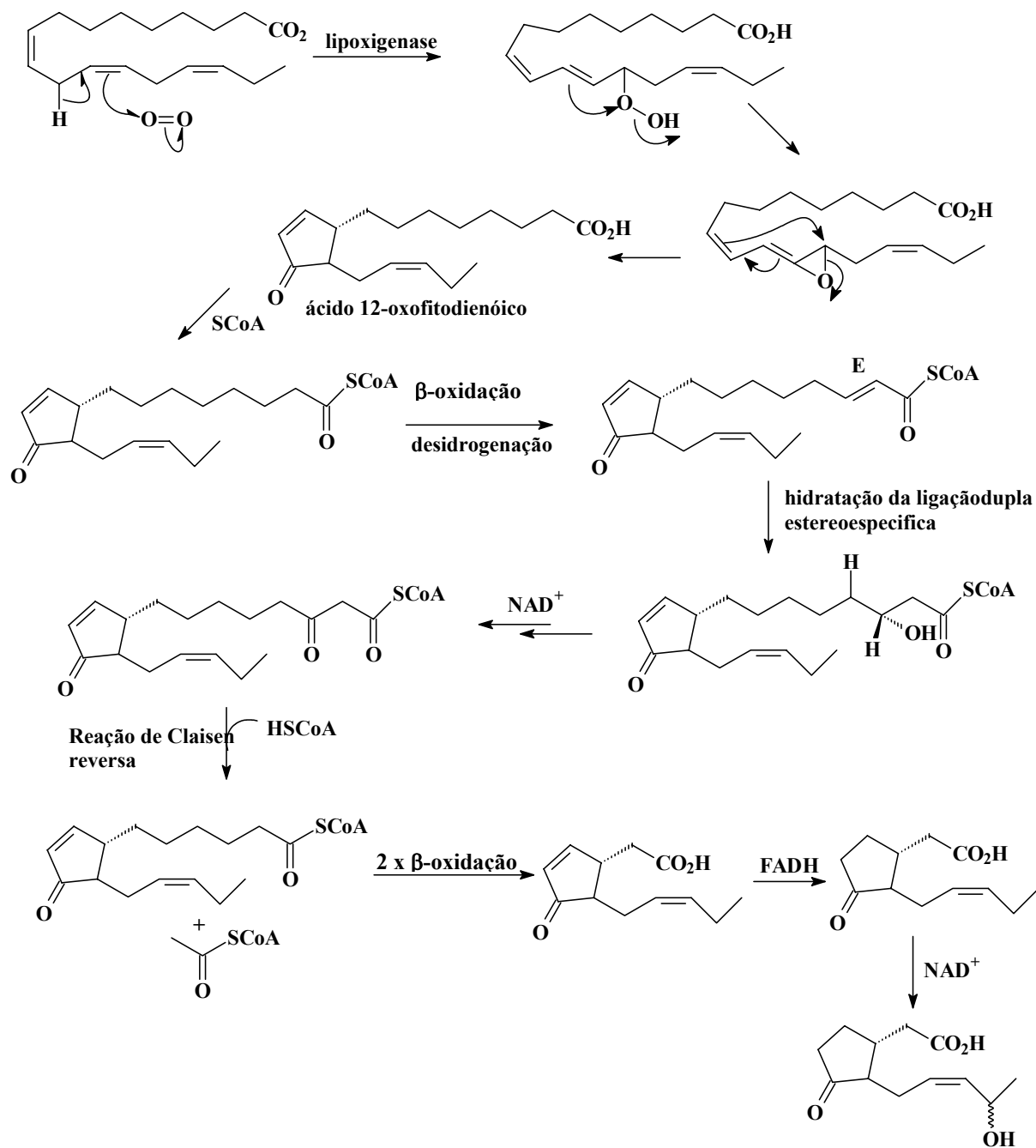
ESQUEMA 4.14: CORRELAÇÕES VIA HSQC (\rightarrow) E VIA COSY (\leftrightarrow) PARA **S6**.

TABELA 4.7: DADOS DE RMN ^1H de **S6** (δ , CDCl_3 , 400 MHz)

Posições	^1H
2a/2b	2,65 (<i>dd</i> , $J = 5,6$ e $15,6$ Hz 1H) 2,44 (<i>m</i> , 1H)
7	1,93 (<i>m</i> , 1H)
8	1,53/2,25 (<i>m</i> , 1H cada)
9	5,38 (<i>ddd</i> , $J = 10,4$; $10,4$ e $5,2$ Hz, 1H) 5,20 (<i>ddd</i> , $J = 10,4$; $10,4$ e $5,4$ Hz, 1H)
10	5,50 (<i>m</i> , 2H)
11	4,67 (<i>m</i> , 2H)
12	1,23 (<i>d</i> , $J = 6,4$ Hz, 3H)

TABELA 4.8: DADOS DE RMN ^{13}C e PENDANT de **S6** (δ , CDCl_3 , 50 MHz)

Posições	^{13}C	PENDANT
1	176,9	C = O
2	39,2	- CH ₂ -
3	38,2	- CH -
4	27,5	- CH ₂ -
5	37,9/37,4	- CH ₂ -
6	219,1	C = O
7	54,7/54,3	- CH -
8	26,0	- CH ₂ -
9	127,3/126,7	- CH -
10	135,7	- CH -
11	63,4/63,2	- CH -
12	22,7	- CH ₃



ESQUEMA 4.15: Proposta biossintética para a substância **S6** (DEWICK 2004; RAKWAL *et al.*, 2002)

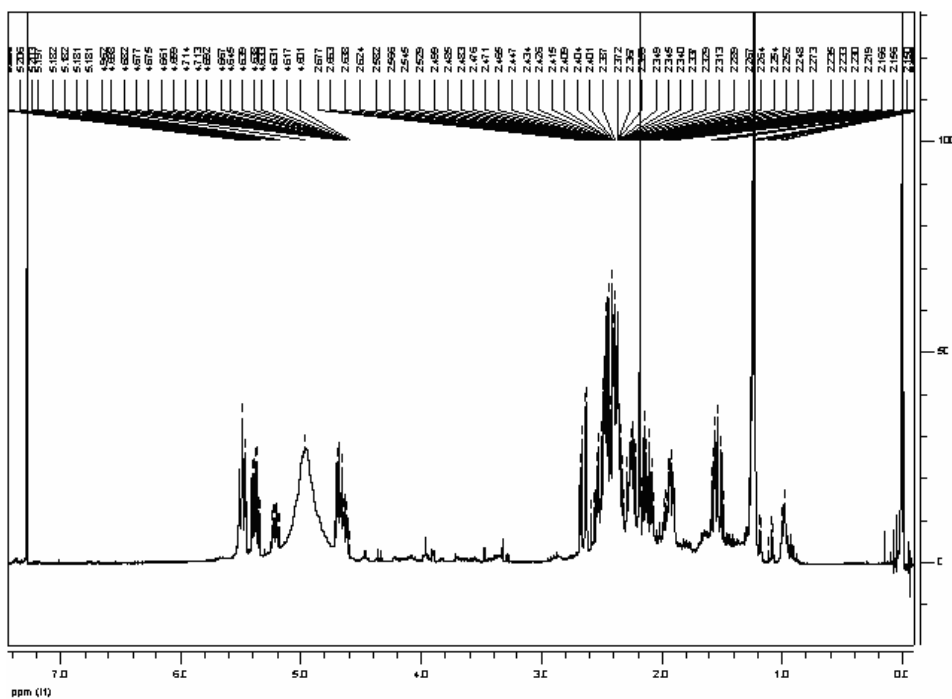


FIGURA 4.51: Espectro de RMN ^1H de **S6** (400 MHz, CDCl_3)

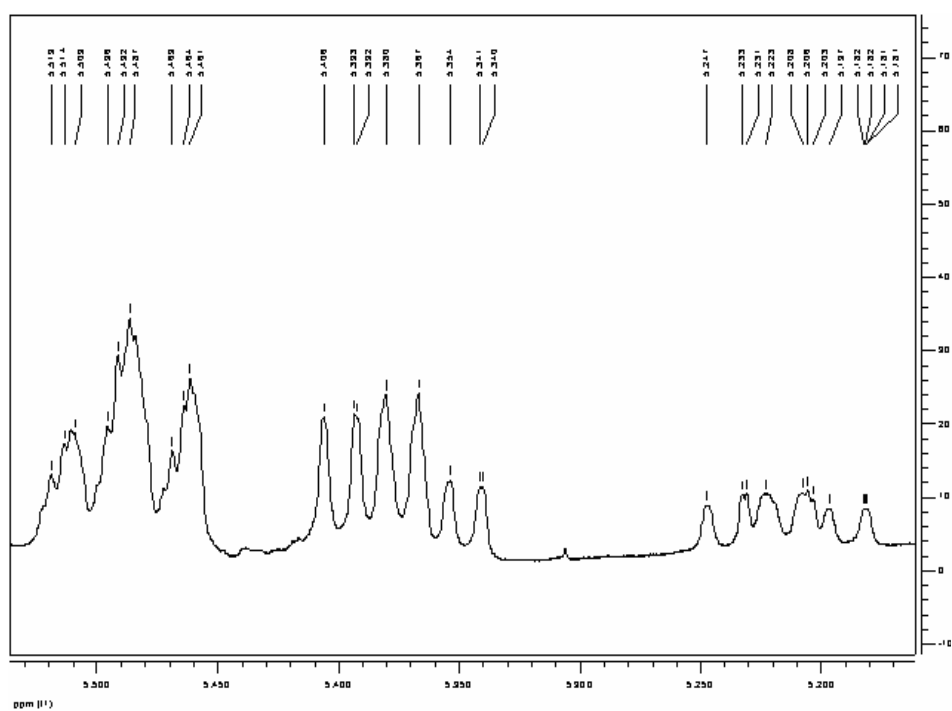


FIGURA 4.52: Expansão do espectro de RMN ^1H de **S6** (400 MHz, CDCl_3)

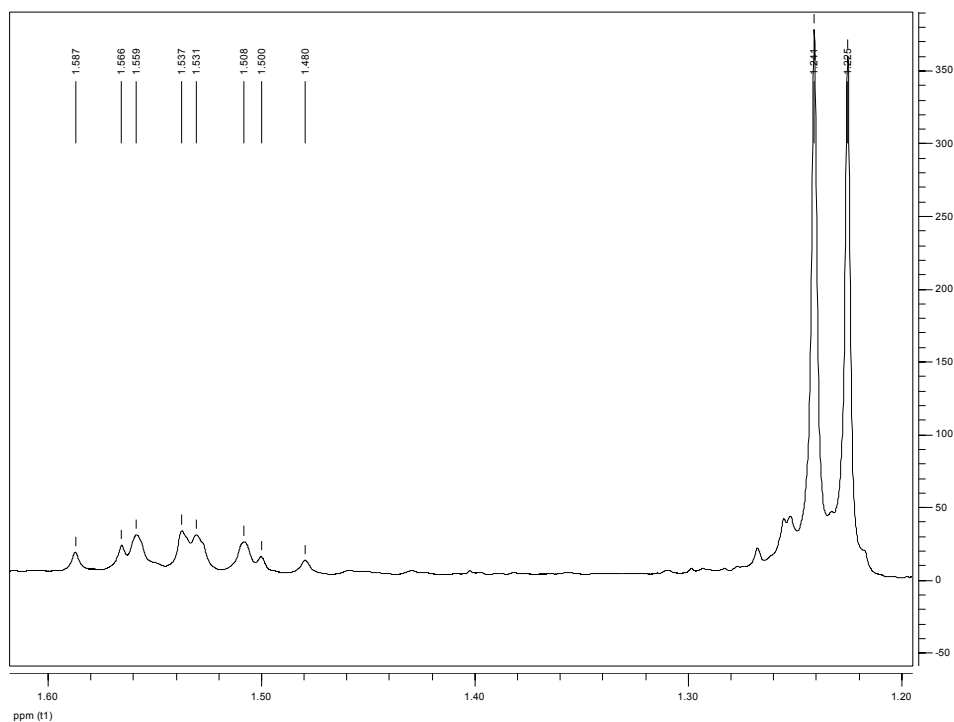


FIGURA 4.53: Expansão do espectro de RMN ^1H de **S6** (400 MHz, CDCl_3)

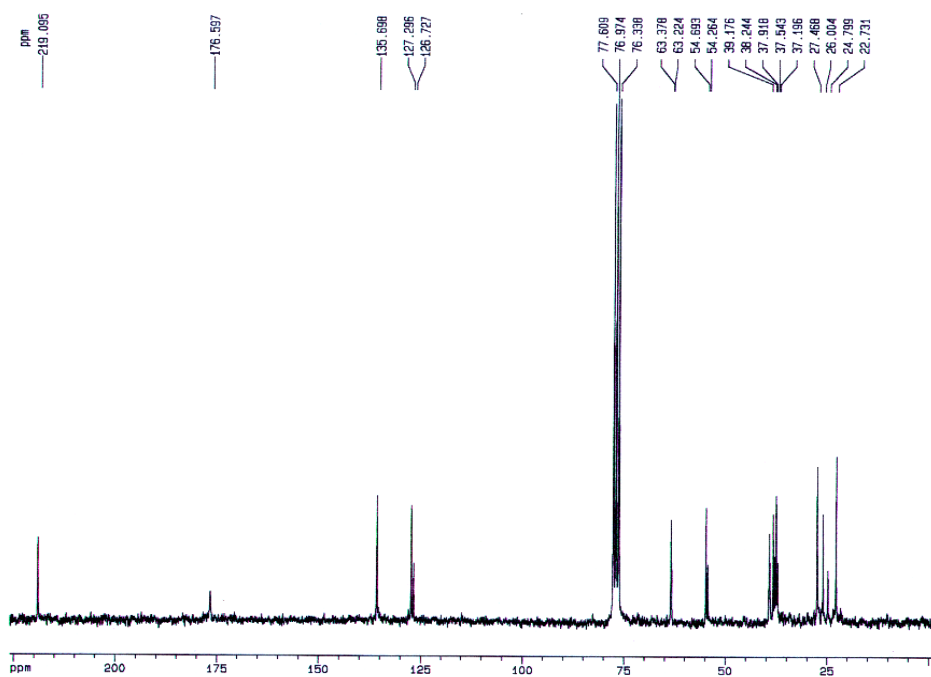


FIGURA 4.54: Espectro de RMN ^{13}C de **S6** (50 MHz, CDCl_3)

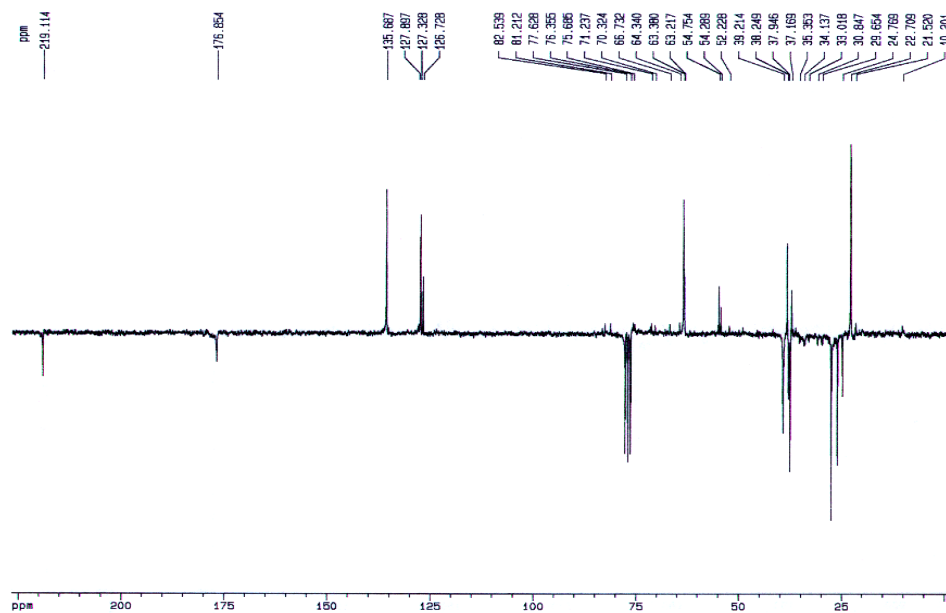


FIGURA 4,55: Espectro de RMN ^{13}C – PENDANT de **S6** (50 MHz, CDCl_3)

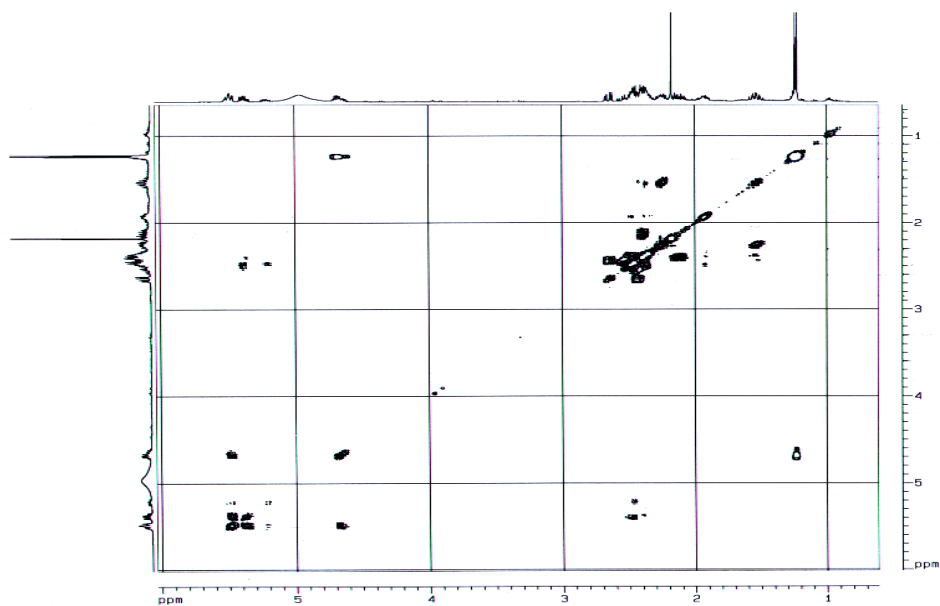


FIGURA 4.56: Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de **S6** (400 MHz, CDCl_3)

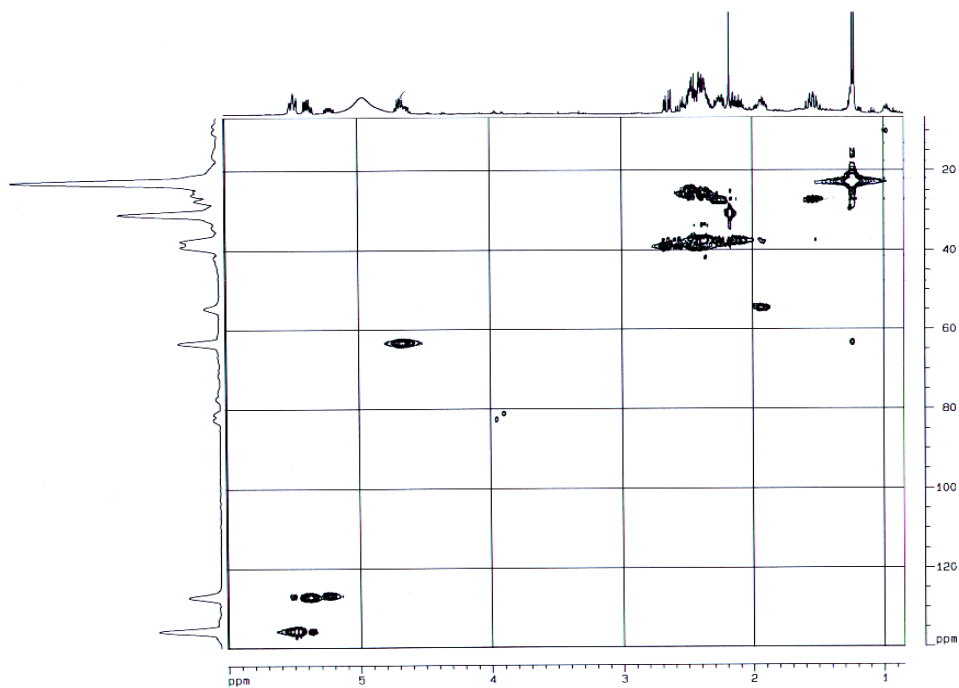


FIGURA 4.57: Mapa de contorno de HSQC de **S6** (400 MHz, CDCl₃)

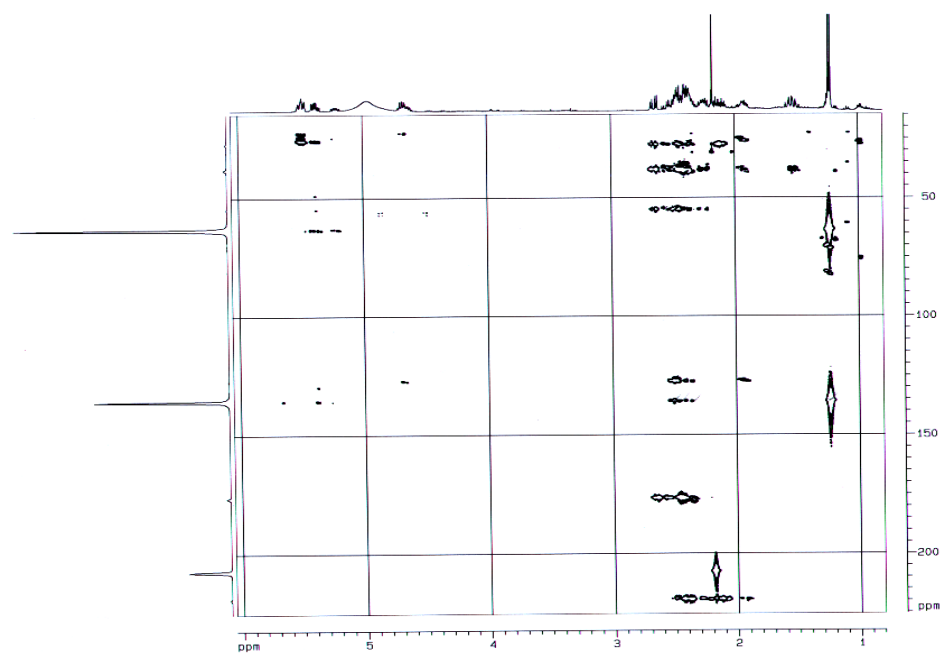


FIGURA 4.58: Mapa de contorno de HMBC de **S6** (400 MHz, CDCl₃)

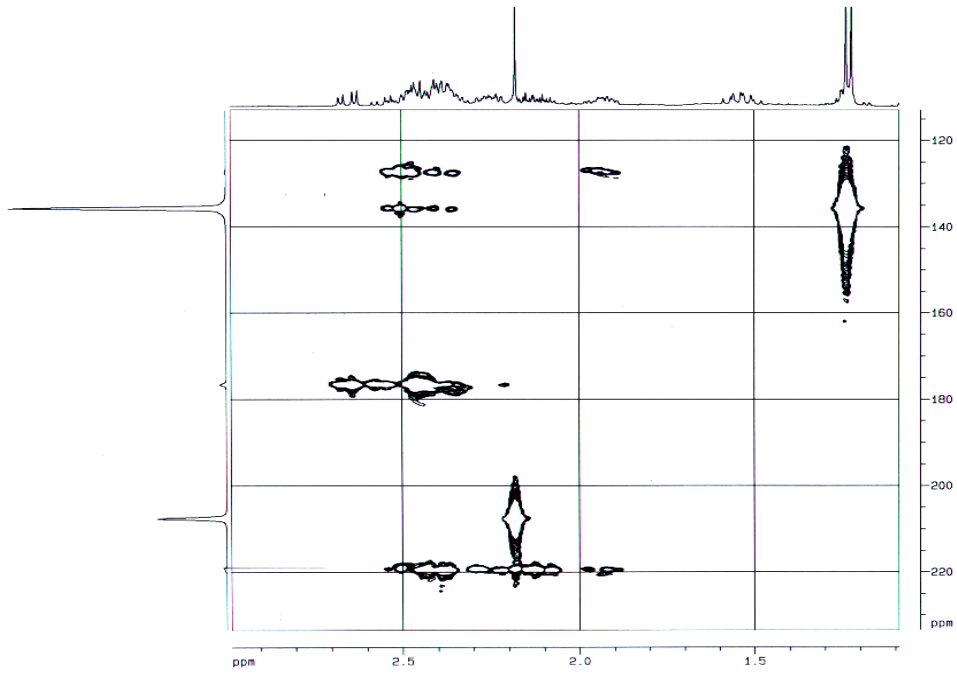


FIGURA 4.59: Expansão do mapa de contorno de HMBC de **S6** (400 MHz, CDCl₃)

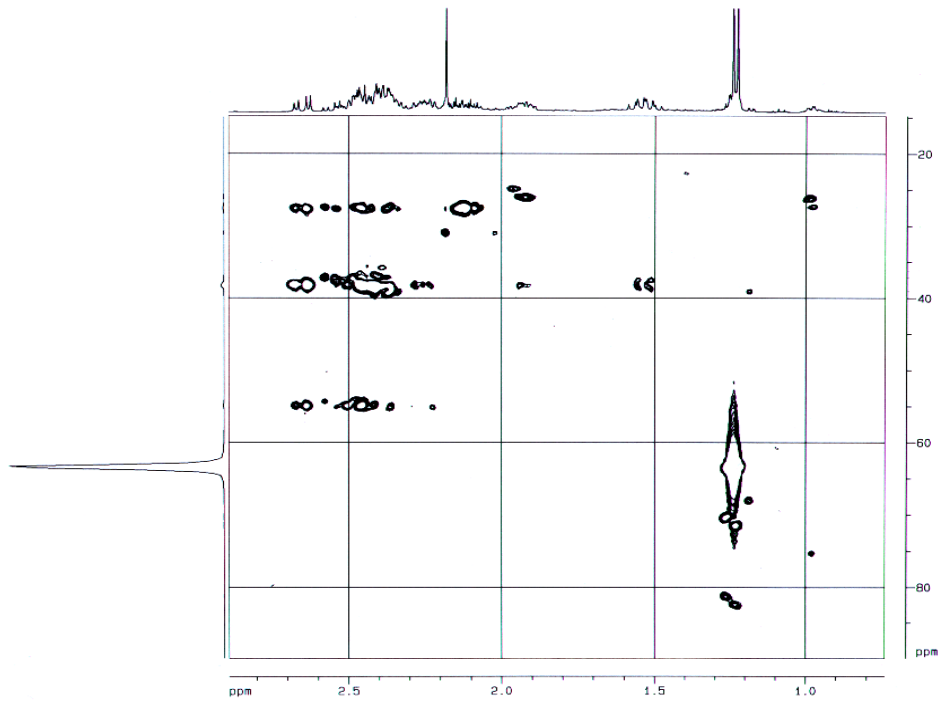


FIGURA 4.60: Expansão do mapa de contorno de HMBC de **S6** (400 MHz, CDCl₃)

4.2.5 – Identificação estrutural do 5-hidroximetilfurfural (**S7**)

No espectro de RMN ^1H (Figura 4.62, p. 124; Tabela 4.9, p. 121), foi observado um sinal em δ 9,61 característico de hidrogênio aldeídico; dois dubletos em δ 7,22 e δ 6,52 acoplado entre si com uma constante de 3,5 Hz, peculiares de H *orto*-acoplados de um penta heterociclo aromático, podendo ser do tipo furano ou pirrol, e ainda um singlete integrando para dois hidrogênios em δ 4,73.

Na análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.63, p. 124, Tabela 4.9, p. 121), observou-se um sinal em δ 178,2 que a princípio poderia ser atribuído a uma carboxila, porém ao consultar-se a tabela de valores de deslocamento químico para carbono (SILVERSTEIN 2000), este sinal também se encaixaria como uma carbonila aldeídica conjugada, pertencente a um anel 2-furano ou 2-pirrolcarboxialdeído, fato mais condizente com o sinal de H observado no espectro de hidrogênio.

Além destes sinais, foram também observados quatro sinais relativos a C sp^2 e um sinal em δ 56,1, que poderia ser referente a um grupo metoxila, porém o sinal se encontrava bastante desblindado e integrava para apenas dois hidrogênios.

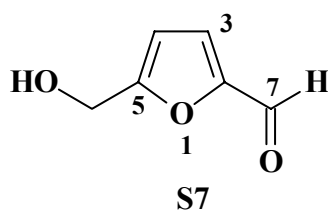
A fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ foi sugerida com base nos dados obtidos pelo espectro de CG/EM (Figura 4.61, p. 124), que apresentou o pico relativo ao respectivo íon molecular em m/z 126 (Esquema 4.18, p. 123). A estrutura da substância **S7** foi confirmada com base nos dados espectrais, a partir da biblioteca de compostos do CG e de dados da literatura (GALLO 2005) como sendo o 5-hidroximetil-furfural ou 5-hidroximetil-2-furfuraldeído.

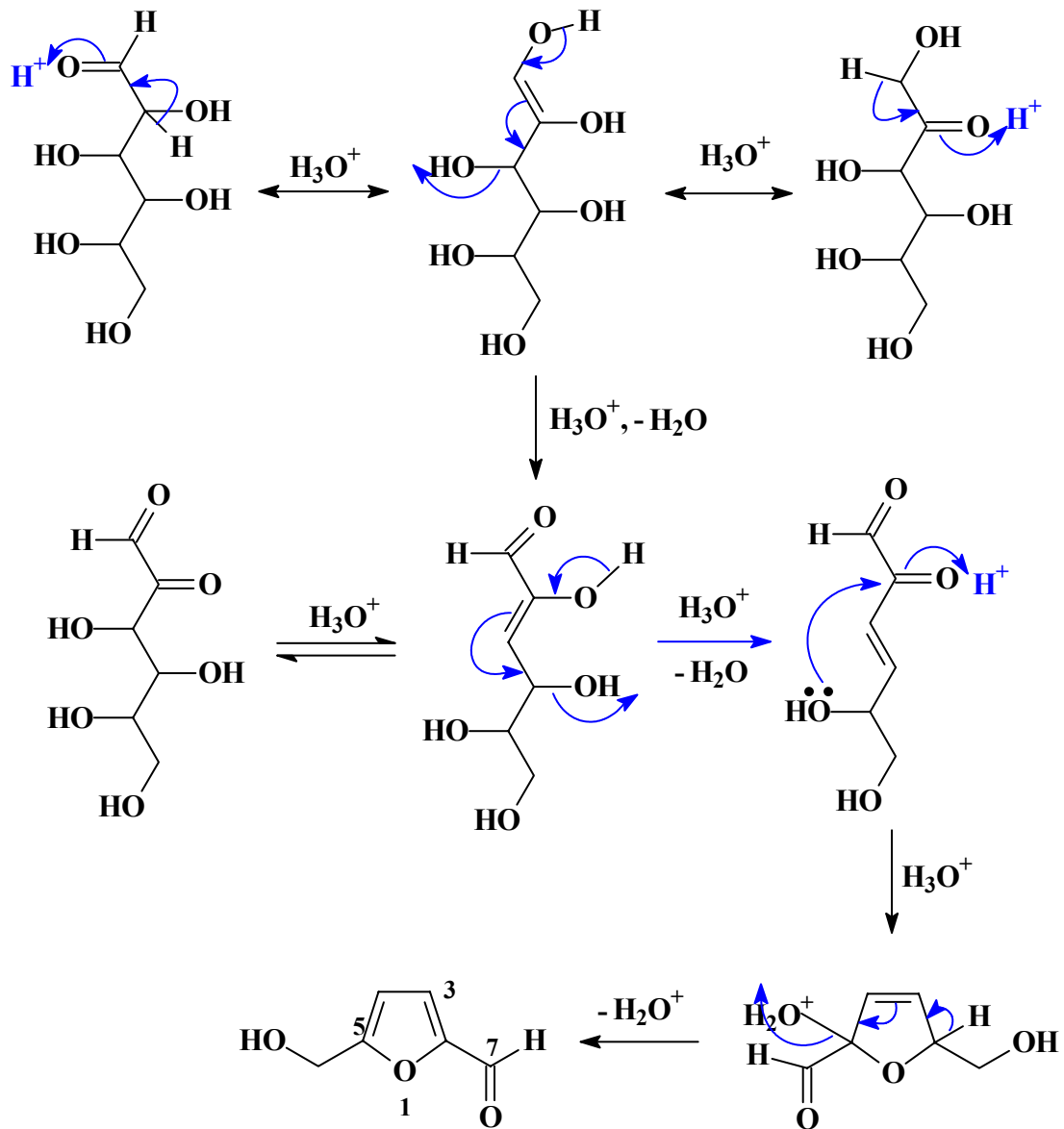
Esta substância já foi isolada anteriormente das raízes de *Cirsium chlorolepis* (Asteraceae) e *Siphoneugena densiflora*, entre outras plantas. Ela é precursora de aminoácidos e proteínas; produto de degradação de glicose em infusão e também pela clivagem da glicose pelo nitrato cérico amoniacalem DMF (Esquemas 4.16 e 4.17, p. 122 e 123) (CARUSO *et al.*, 2006).

Este é o primeiro relato deste composto isolado do fungo em estudo.

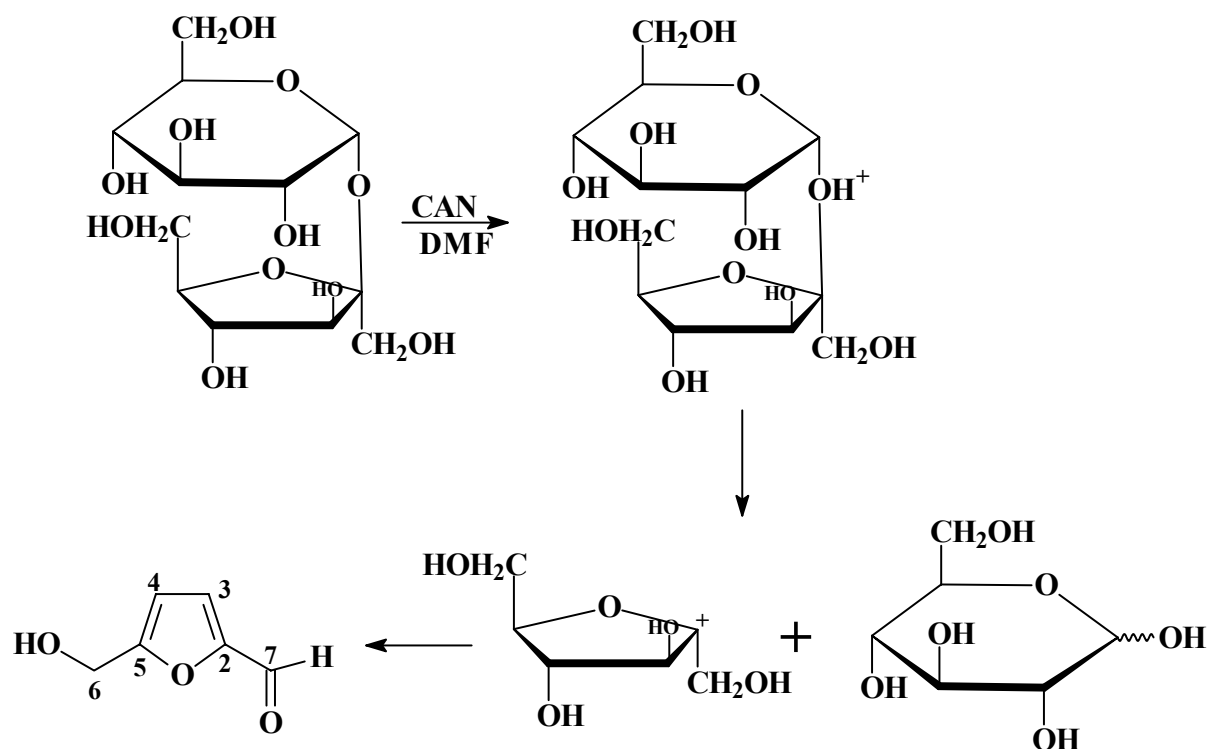
TABELA 4.9: DADOS DE RMN ^1H E ^{13}C DE **S7** (CDCl_3 , 400 MHz)

Posições	^{13}C	^1H	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$
1	-	-	-	-
2	-	-	153,4	-
3	123,7	7,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,5 Hz 1H)	123,7	7,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,5 Hz)
4	109,6	6,52 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,5 Hz 1H)	110,2	6,58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,5 Hz)
5	-	-	162,9	-
6	56,1	4,73 (<i>s</i> 2H)	57,5	4,63 (<i>s</i>)
7	178,2	9,60 (<i>s</i> 1H)	178,1	9,59 (<i>s</i>)

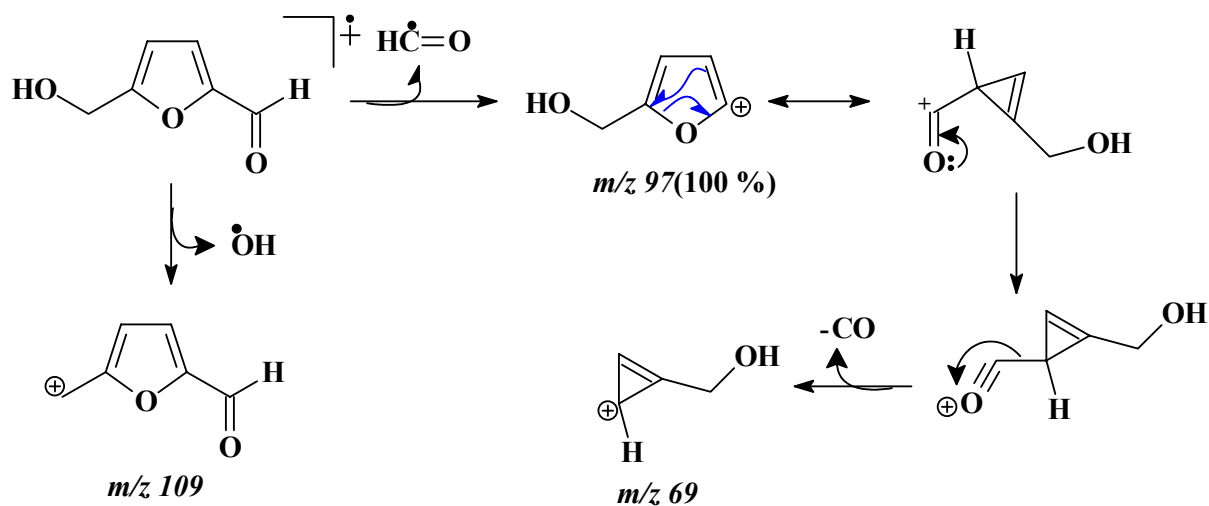




ESQUEMA 4.16: Reações químicas sofridas pela glicose para a produção do 5-hidroximetil-furfural.



ESQUEMA 4.17: Mecanismo de clivagem da sacarose pelo CAN em DMF para a formação do 5-hidroximetilfurfural (CARUSO *et al.*, 2006).



ESQUEMA 4.18: Proposta de fragmentação do 5-hidroximetilfurfural.

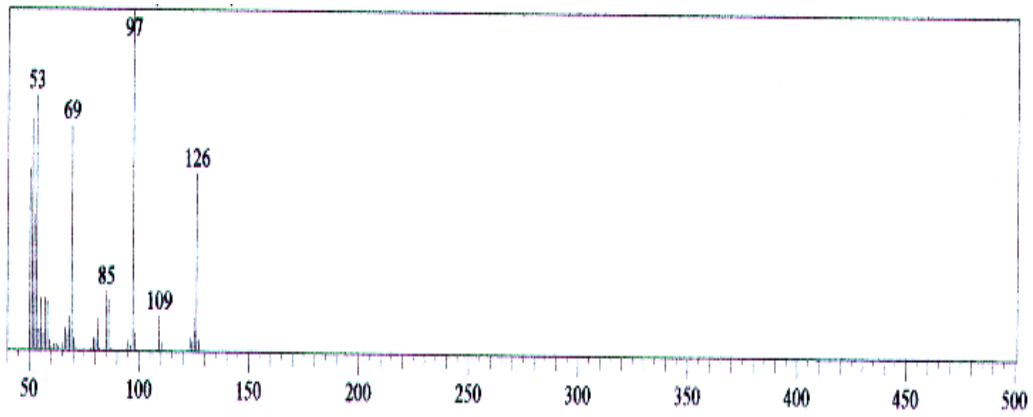


FIGURA 4.61: Espectro de CG/MS de **S7**

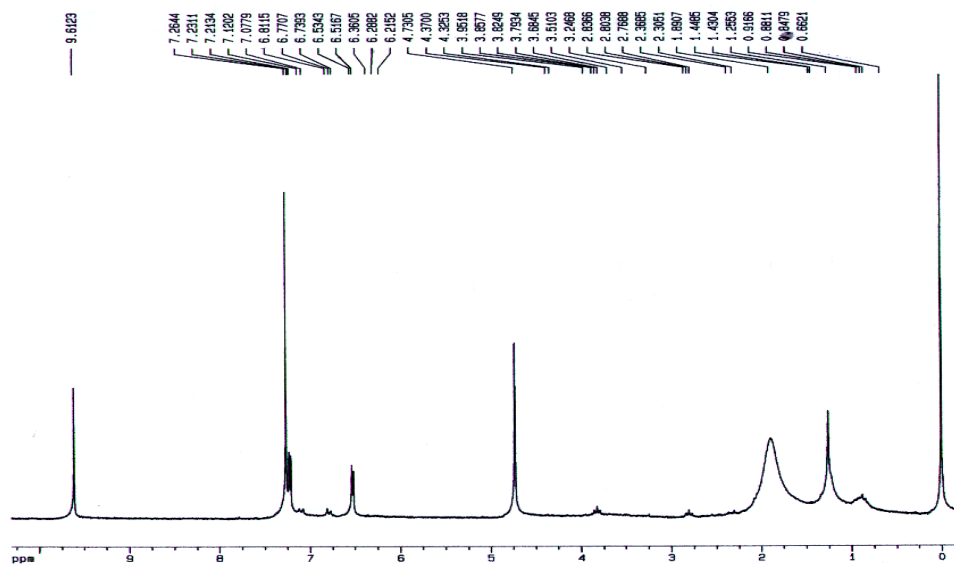


FIGURA 4.62: Espectro de RMN ^1H de **S7** (200 MHz, CDCl_3)

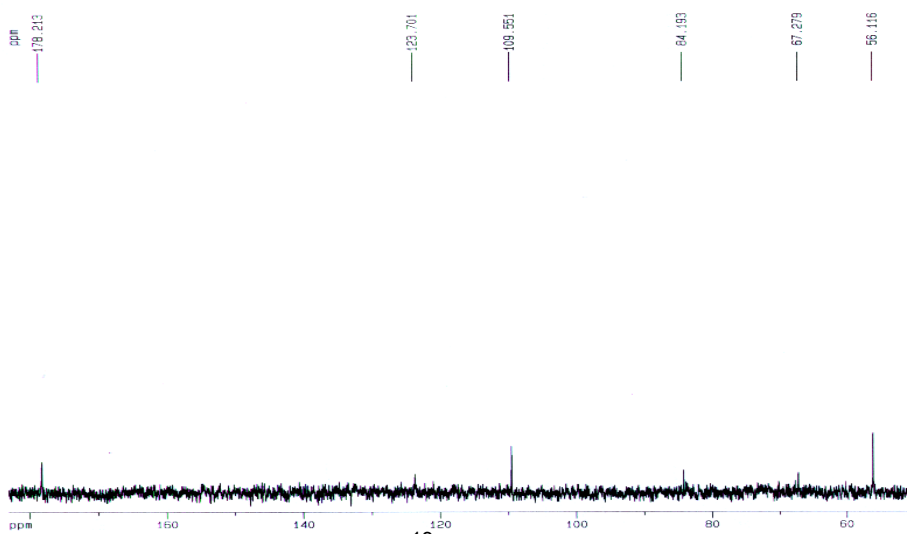


FIGURA 4.63: Espectro de RMN ^{13}C de **S7** (200 MHz, CDCl_3)

4.2.6 – Identificação estrutural do Tirosol (**S8**)

Analisando o espectro de RMN ^1H de **S8** (Figura 4.64, p. 127, Tabela 4.10, p. 126), observou-se dois tripletos em δ 3,67 e 2,71 ($J = 7,2$), integrando para dois hidrogênios cada e na região de hidrogênios aromáticos dois duplos tripleto integrando para dois hidrogênios cada. Estes sinais indicaram a presença de um anel aromático *para* substituído, sendo H-a e H-a', quimicamente equivalente, mas não são magneticamente equivalentes. Eles interagem entre si dando um acoplamento finito $J_{aa'}$. Sendo que H-a não interage igualmente com H-b (*orto* com H-a) e com H-b' (*para* com H-a), $J_{ab} \neq J_{ab'}$ como H-b e H-b' têm acoplamentos diferentes com H-a, eles também não são magneticamente equivalentes, não sendo assim aplicado a regra de primeira ordem para estes hidrogênios (PAVIA *et al.*, 2001).

Estas análises em **S8**, os quatro hidrogênios aromáticos magneticamente não equivalentes, se os hidrogênios fossem magneticamente equivalentes o padrão de sinais que se veria seriam dois dubletos e isso não acontece com o espectro de RMN ^1H de **S8**. Sabendo disso, faltaria definir que tipo de designação iria ser adotada, se é **AA'XX'** ou **AA'BB'**. Para definir de que tipo de sistema se tem no composto foi utilizado a relação $\Delta\nu/J$, onde:

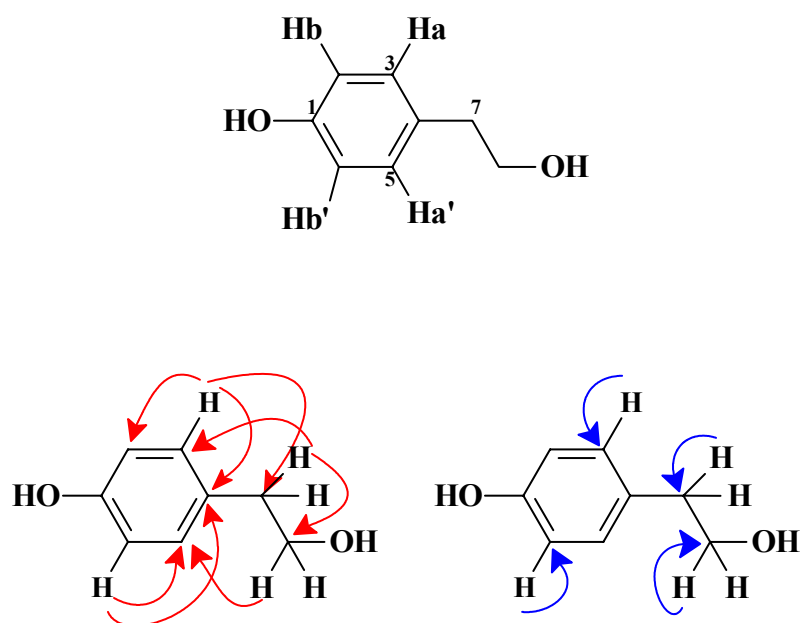
Se $\Delta\nu/J < \sim 8$ teria-se o sistema **AA'BB'**, caso contrário seria o sistema **AA'XX'**.

Assim pode-se calcular o valor de $\Delta\nu = ((1-4) \times (2-3))^{1/2}$ (Hz), onde os números 1-4 corresponderam aos sinais mais intensos contando da esquerda para a direita. O valor encontrado foi de $\Delta\nu = 15,21$ indicando que o sistema é **AA'XX'** (SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

Os dados de RMN ^{13}C (Tabela 4.10, p. 126) para a substância foram assinalados de acordo com as projeções obtidas nos mapas de contorno de HSQC (Figura 4.66, p. 128; Esquema 4.19, p. 126) e HMBC (Figura 4.67, p. 128; Esquema 4.19, p. 126). Observando-se assim no HSQC a correlação do sinal de hidrogênio em δ 7,03 com o carbono em δ 131,0, e no experimento de HMBC observou-se que este hidrogênio apresentou correlação a J^2 com os carbonos em δ 116,3; 156,9 e a J^3 com um dos carbonos metilênicos em δ 39,6, estas correlações levaram a atribuir o sinal em δ 131,0 aos carbonos C-3/C-5 e o sinal em δ 116,3 aos carbonos C-2/C-6

os quais são equivalentes. O sinal de hidrogênio em δ 2,71 correlacionou-se com o carbono em δ 39,6 no mapa de contorno de HSQC e no HMBC este sinal correlacionou-se com os carbonos em δ 64,5 e 131,0; com estas correlações pode-se atribuir os sinais em 2,71 ao H-7 e o sinal em δ 3,67 ao H-8, o qual mostrou uma correlação no HMBC a J^2 com o carbono em δ 39,6 e a J^4 com o carbono em δ 131,0.

Estes dados permitiram identificar o composto **S8** como o tirosol (DUARTE, 2005).



ESQUEMA 4.19: CORRELAÇÕES VIA HMBC (→) E VIA HSQC (→).

TABELA 4.10: DADOS DE RMN ^1H e ^{13}C DE **S8** (δ , MeOH)

Posição	^1H (200 MHz)	^{13}C (100 MHz)
2/6	6,70 (<i>dt</i> , $J = 2,8$ e $8,6$ Hz, 2H)	116,3
3/5	7,03 (<i>dt</i> , $J = 2,8$ e $8,6$ Hz, 2H)	131,0
1	-	156,9
7	2,70 (<i>t</i> , $J = 7,2$ Hz, 2H)	39,6
8	3,67 (<i>t</i> , $J = 7,2$ Hz, 2H)	64,5

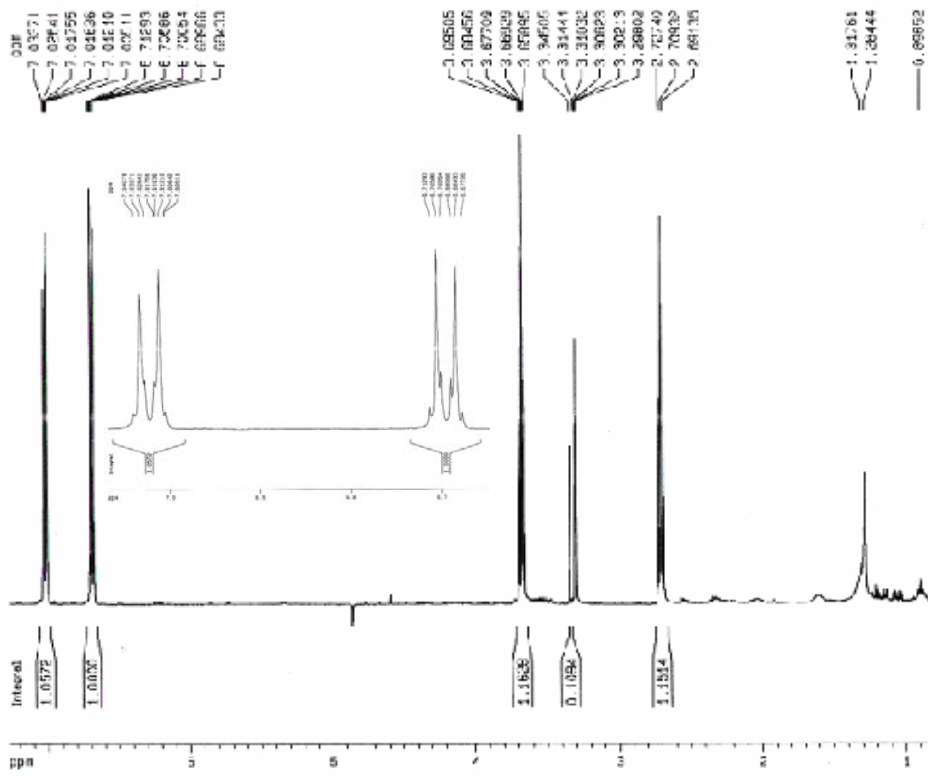


FIGURA 4.64: Espectro de RMN ^1H de **S8** (400 MHz, CDCl_3)

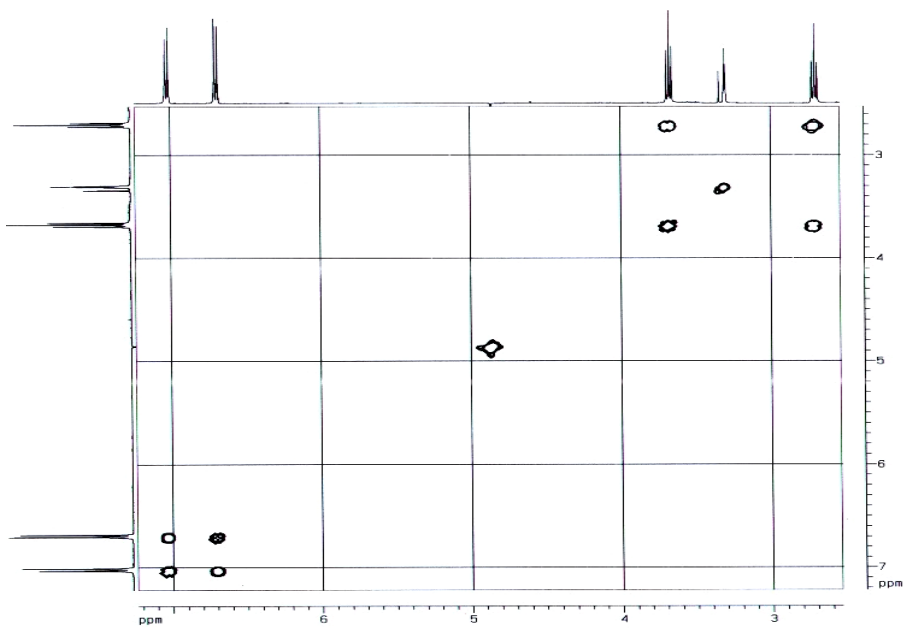


FIGURA 4.65: Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de **S8** (400 MHz, CDCl_3)

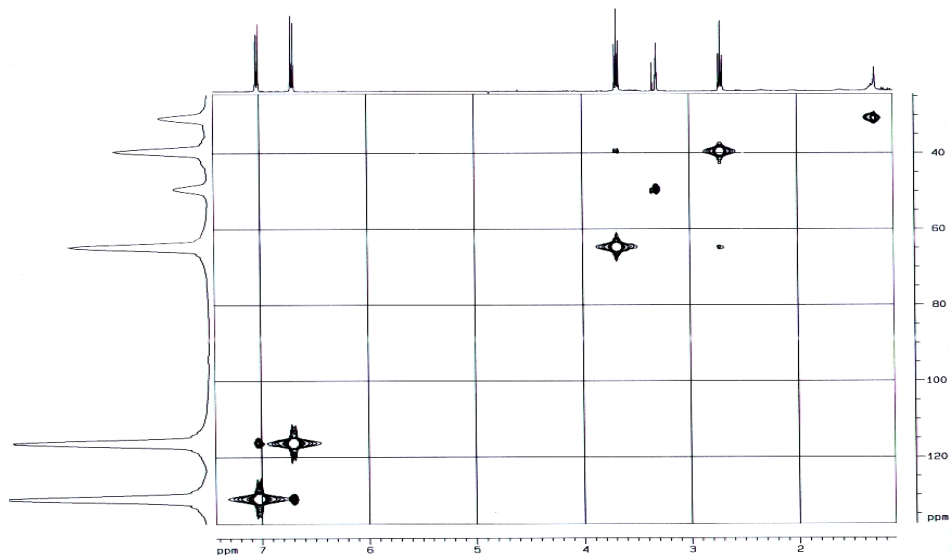


FIGURA 4.66: Mapa de contorno de HSQC de **S8** (400 MHz, CDCl₃)

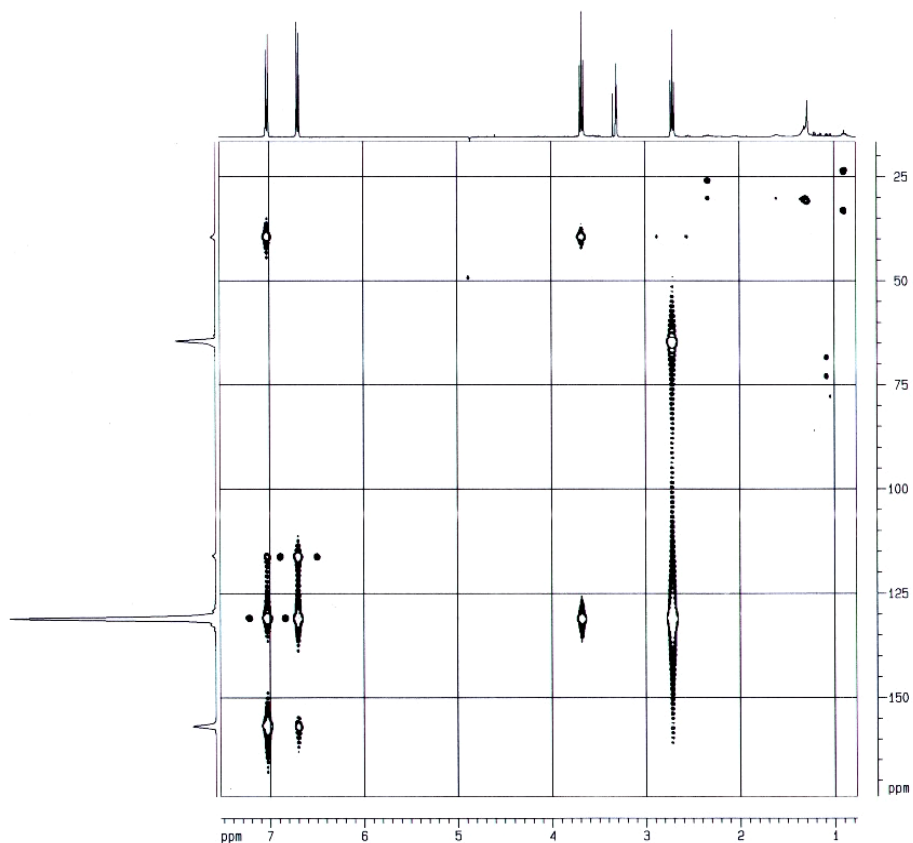


FIGURA 4.67: Mapa de contorno de HMBC de **S8** (400 MHz, CDCl₃)

4.2.7 – Identificação Estrutural do ergosterol e peróxido de ergosterol (**S9** e **S10**)

Observou-se no espectro de RMN ^1H de **S9** (Figura 4.68, p. 136, Tabela 4.11, p. 131) dois duplos dubletos na região de hidrogênios olefinicos em δ 5,38 ($J = 5,4$ e $2,5$ Hz) e δ 5,56 ($J = 5,4$ e $2,2$ Hz) e no espectro de RMN ^1H de **S10** (Figura 4.69, p. 136, Tabela 4.11, p. 131) dois dubletos também característicos de hidrogênios olefínicos em δ 6,49 ($J = 8,4$ Hz)/ δ 6,25 ($J = 8,4$ Hz). Ainda foi possível observar nos espectros um multiplete em δ 5,20 para o composto **S9** e δ 5,18 para **S10** típicos de hidrogênio ligado a carbono carbinílico, ambos integrando para um hidrogênio.

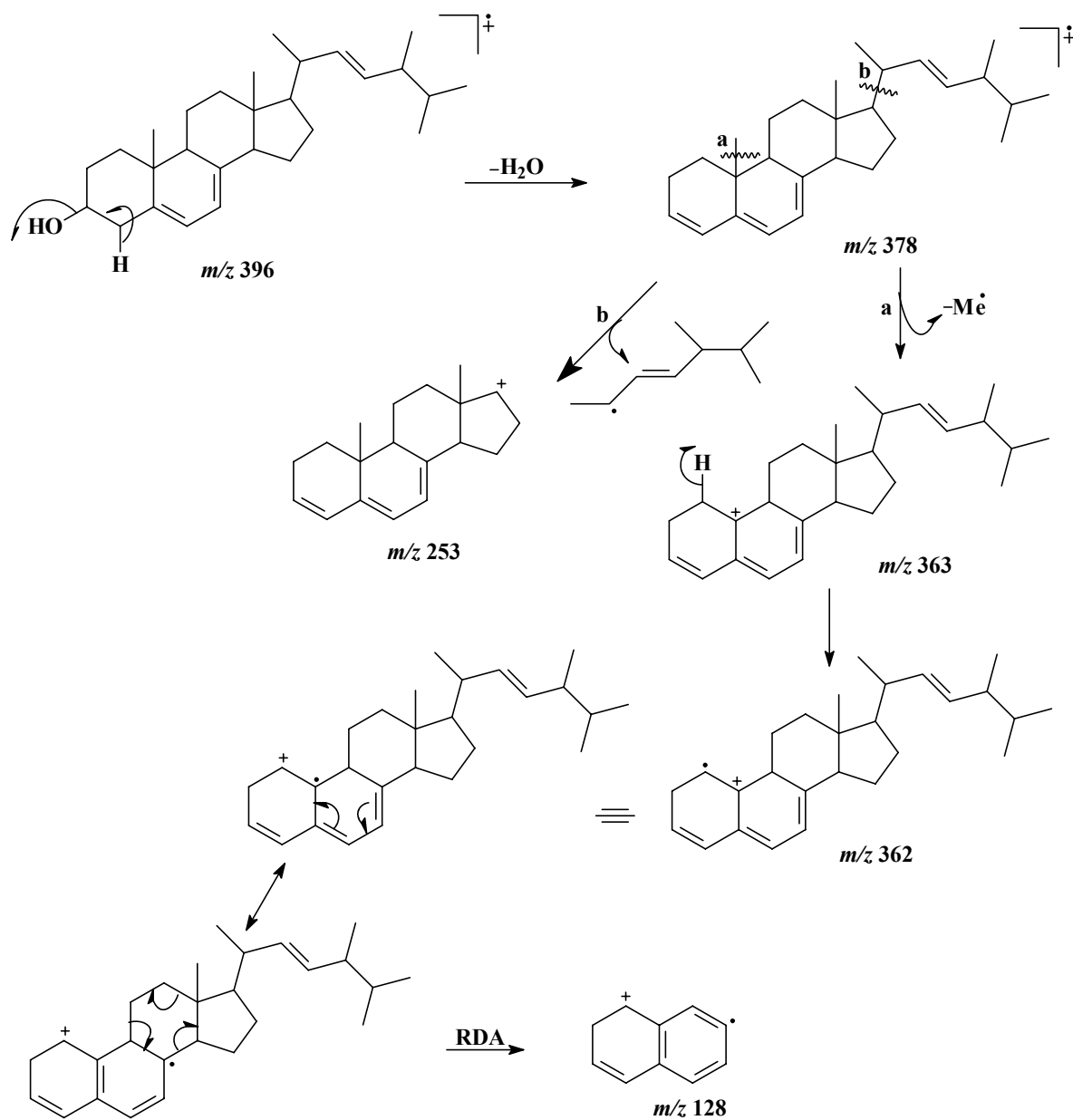
Os sinais de hidrogênios em δ 0,81 ($d, J = 6,7$); 0,84 ($d, J = 6,8$); 1,00 ($d, J = 6,6$ Hz); 0,95 (s); 0,93 (s); 0,63 (s) e δ 0,80 ($d, J = 6,4$); 0,82 ($d, J = 6,7$); 0,95 ($d, J = 6,5$ Hz); 1,25 (s); 0,91 (s); 0,87 (s) observados nos espectros de RMN de ^1H de **S9** e **S10** respectivamente caracterizam substâncias com esqueleto esteroidal.

Os espectros de RMN ^{13}C (Figura 4.70 e 4.71, p. 137, Tabela 4.12, p. 132) apresentaram 28 sinais de carbonos, sendo seis destes atribuídos a carbonos metílicos e ainda observou-se seis sinais referentes a Csp^2 sendo eles em δ 141,3; 139,8; 135,6; 132,0; 119,6 e 116,3 para o composto **S9** e quatro Csp^2 em δ 135,4; 135,2; 132,3; e 130,6 referentes ao composto **S10**.

No espectro de RMN ^{13}C de **S9** observou-se ainda um sinal em δ 70,4 típico de carbono carbinólico, enquanto para o composto **S10** foram observados três sinais no espectro de RMN ^{13}C em δ 82,1; 79,4 e 66,4 sendo dois destes carbonos quaternários. Os demais valores de carbono foram confirmados por comparação os da literatura.

A massa obtida no espectro de CG/EM (IE) (Figura 4.72, p. 137) de **S9** (m/z 396) confirma a formula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ da substância, a proposta de fragmentação é mostrada no esquema 4.20.

Através de comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , obtido para **S9** e **S10** com dados encontrados na literatura (MARINHO 2005/BARROS 2002), constatou-se total coincidência dos valores de deslocamento químicos obtidos possibilitando a identificação dos compostos como sendo o ergosterol e o peróxido de ergosterol.



ESQUEMA 4.20: PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA S9

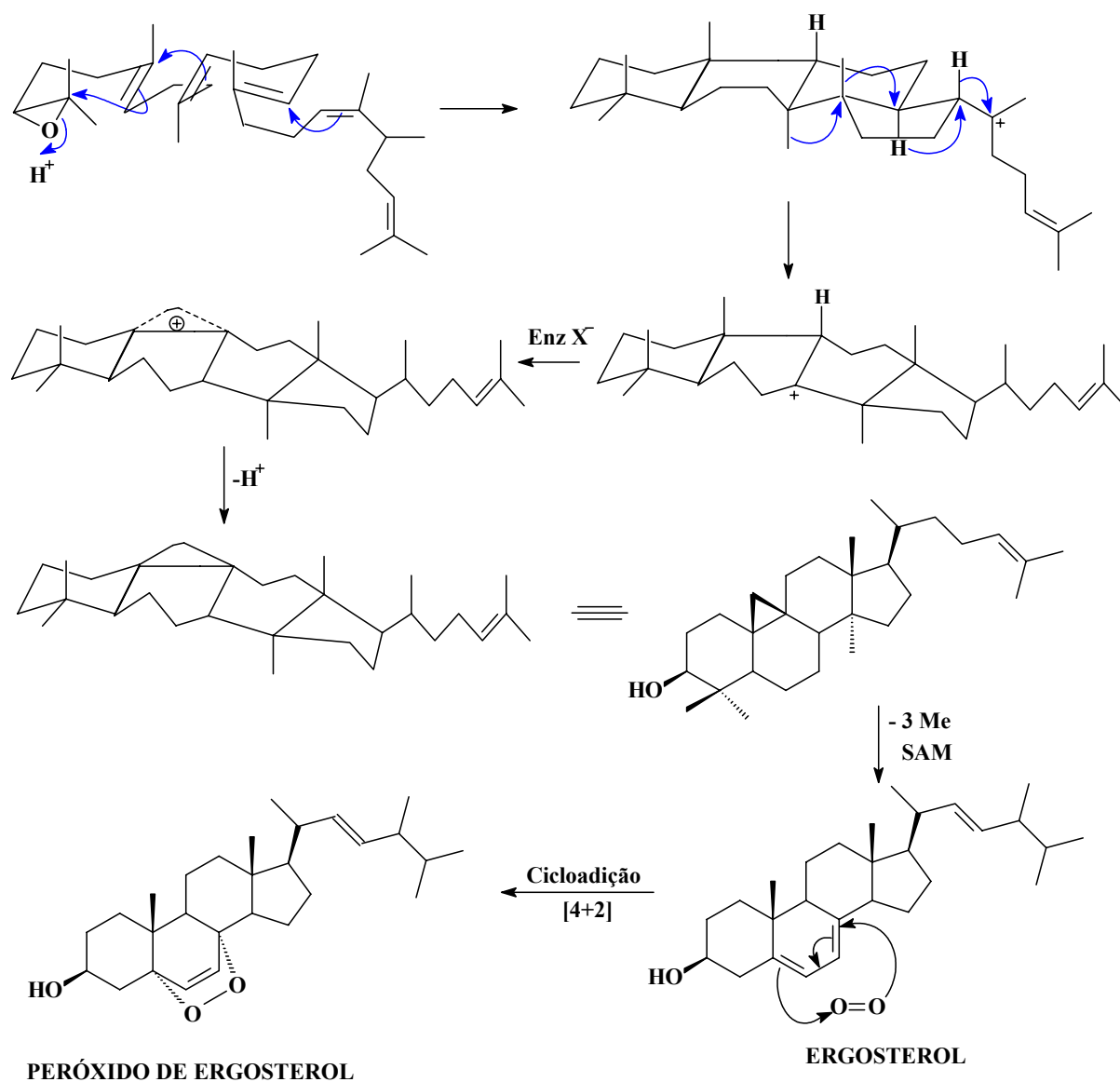
TABELA 4.11: DADOS DE RMN ^1H DE **S9** e **S10** (δ , CDCl_3 , 200 MHz)

Posição	S9	S10
3	3,61 (<i>m</i> , 1H)	3,95 (<i>m</i> , 1H)
6	5,56 (<i>dd</i> , $J = 5,4$ e $2,2$ Hz, 1H)	6,25 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)
7	5,38 (<i>dd</i> , $J = 5,4$ e $2,5$ Hz, 1H)	6,49 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)
18	0,95 (<i>s</i> , 3H)	1,25 (<i>s</i> , 3H)
19	0,63 (<i>s</i> , 3H)	0,87 (<i>s</i> , 3H)
21	1,00 (<i>d</i> , $J = 6,6$ Hz, 3H)	0,91 (<i>s</i> , 3H)
22	5,20 (<i>m</i> , 1H)	5,18 (<i>m</i> , 2H)
23	5,20 (<i>m</i> , 1H)	5,18 (<i>m</i> , 2H)
26	0,84/0,82 (<i>d</i> , $J = 6,7/6,8$ Hz, 3H)	0,82 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz, 3H)
27	-	0,80 (<i>d</i> , $J = 6,4$ Hz, 3H)
28	0,93 (<i>s</i> , 3H)	0,95 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)

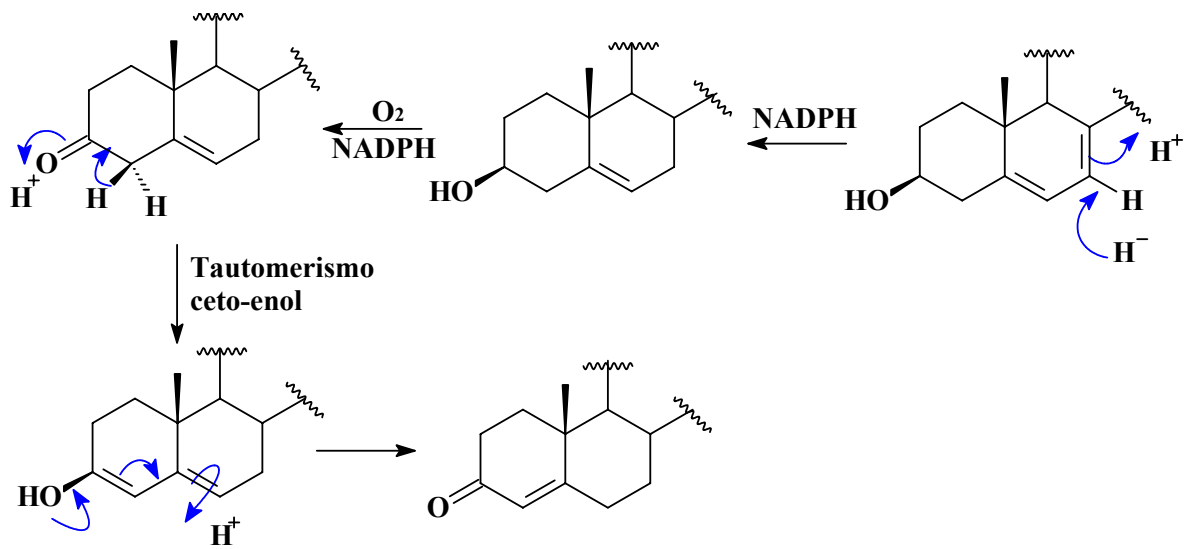
TABELA 4.12: DADOS DE RMN ^{13}C DE **S9** e **S10** (δ , CDCl_3 , 50 MHz)

Posição	Dados de ^{13}C			
	S9	BARROS, 2002 (CDCl_3 , 50 MHz)	S10	MARINHO, 2005 (CDCl_3 , 50 MHz)
1	38,4	38,3	30,0	30,1
2	32,0	32,0	34,7	34,7
3	70,4	70,5	66,4	66,5
4	40,4	40,4	39,3	39,3
5	141,3	141,3	82,1	82,1
6	119,6	119,6	135,2	135,2
7	116,3	116,3	130,7	130,7
8	139,8	139,8	79,4	79,4
9	46,3	46,3	51,1	51,1
10	37,0	37,0	37,0	37,0
11	21,1	21,1	20,6	20,6
12	28,3	28,2	37,0	37,0
13	43,0	42,8	44,5	44,6
14	54,6	54,6	51,7	51,7
15	23,0	23,0	23,4	23,4
16	39,1	39,1	28,6	28,6
17	55,8	55,7	56,2	56,2
18	12,0	12,0	12,8	12,9
19	16,3	16,2	18,1	18,2
20	40,4	40,3	39,6	39,7
21	19,6	19,6	20,6	20,9
22	132,0	131,9	135,4	135,4
23	135,6	135,5	132,3	132,3
24	43,0	42,9	42,7	42,8
25	20,0	19,9	33,0	33,1
26	33,1	33,0	19,6	19,6
27	21,1	21,0	19,9	19,9
28	17,6	17,6	17,5	17,5

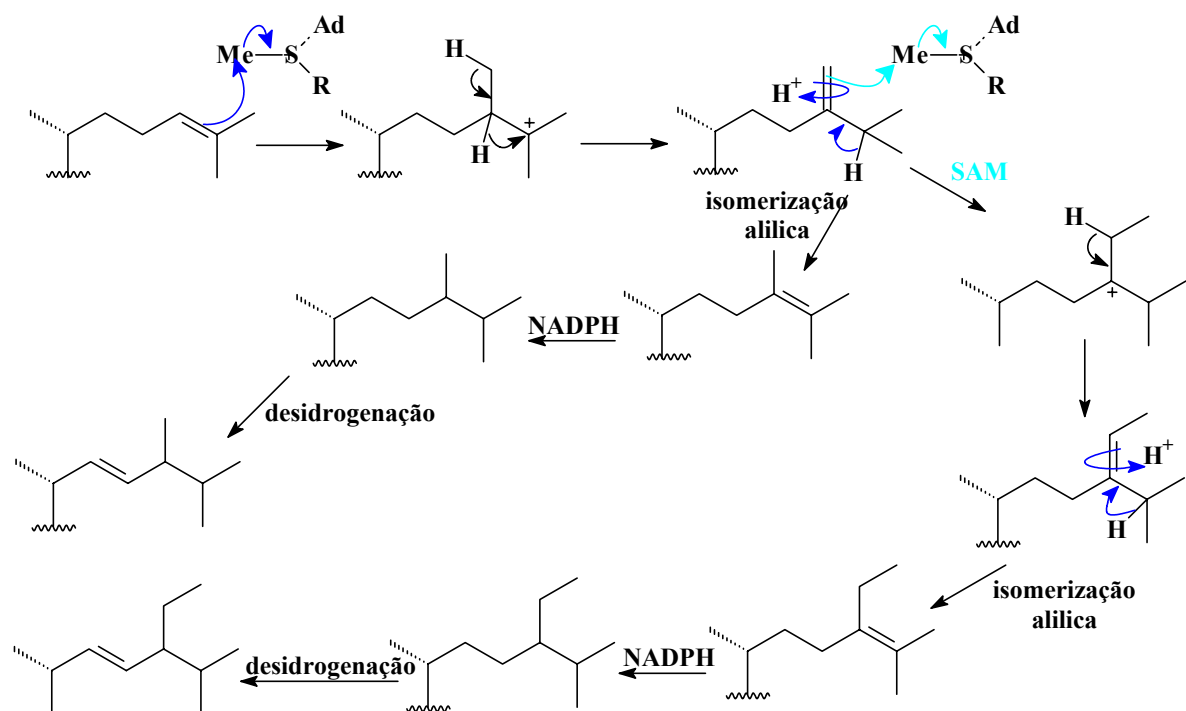
Os esteróides possuem um esqueleto carbônico tetracíclico e derivam do mesmo precursor dos triterpenos (esqualeno), que após ciclização e rearranjos catalisados por enzimas, fornece o cicloartenol, o qual por sua vez, após perda enzimática de três metilas e metilação em C-24 na sua cadeia lateral leva a formação do ergosterol (Esquema 4.21, p. 133). A proposta para a formação da carbonila α,β insaturada é mostrada no esquema 4.22 (p. 134).



ESQUEMA 4.21: Biossíntese do ergosterol e do peróxido de ergosterol a partir do esqualeno (DEWICK 2004)

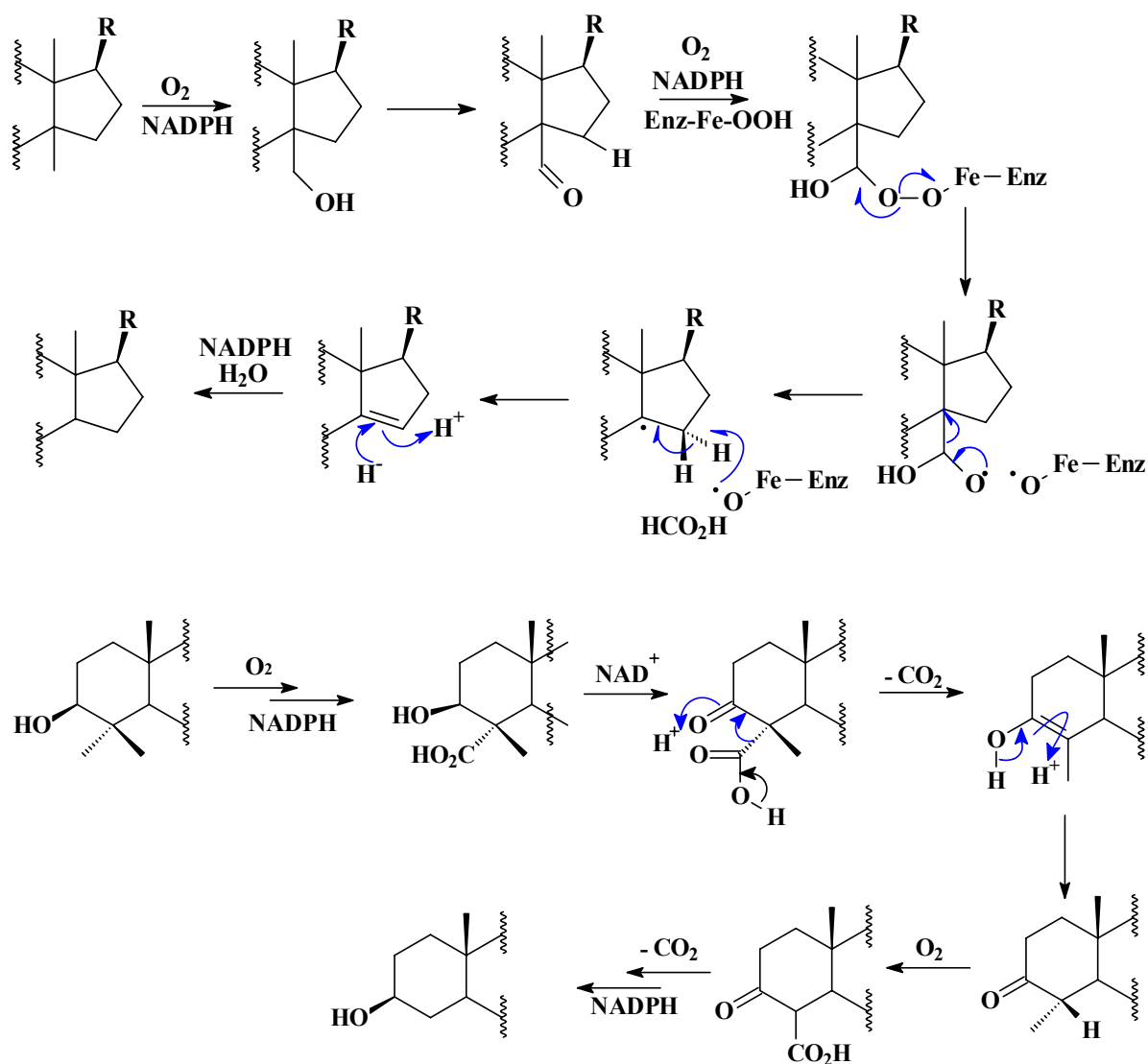


ESQUEMA 4.22: Proposta para formação da carbonila α,β insaturada (DEWICK 2004)



ESQUEMA 4.23: Metilação em esteróides mediado por SAM (DEWICK 2004)

A metila em C-14 é a primeira a sair, sendo esta removida como ácido fórmico. A reação é catalisada pelo citocromo monoxigenase P-450, o qual ativa duas reações de oxidação dando o derivado 14 α -formila, a saída deste grupo se dá após a clivagem hemolítica de um aduto de peróxido e a redução da ligação dupla em seguida por NADPH (Figura 4.24, p. 135). A perda da metila em C-4 se dá em seguida por uma clivagem via um mecanismo de descarboxilação. Isto é facilitado pela oxidação da hidroxila 3-OH para cetona, assim produzindo intermediários β -ceto ácidos. Nesta seqüência, o enolato é restaurado para uma cetona, em que a permanência do grupo C-4 metil é favorecido pela orientação equatorial (Esquema 4.24, p. 135).



ESQUEMA 4.24: Perda de três grupos metílicos em esteróides (DEWICK 2004)

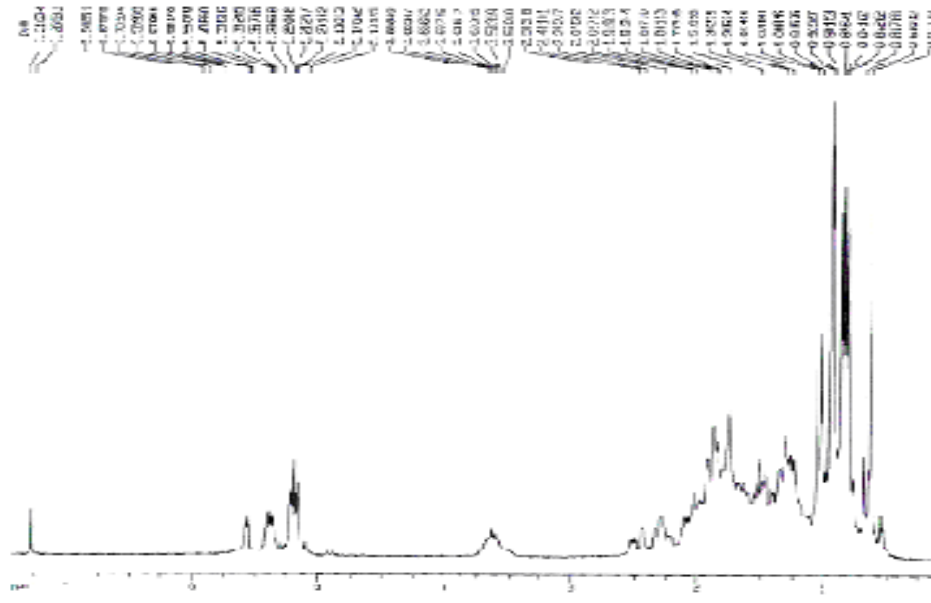


FIGURA 4.68: Espectro de RMN ^1H de **S9** (400 MHz, CDCl_3)

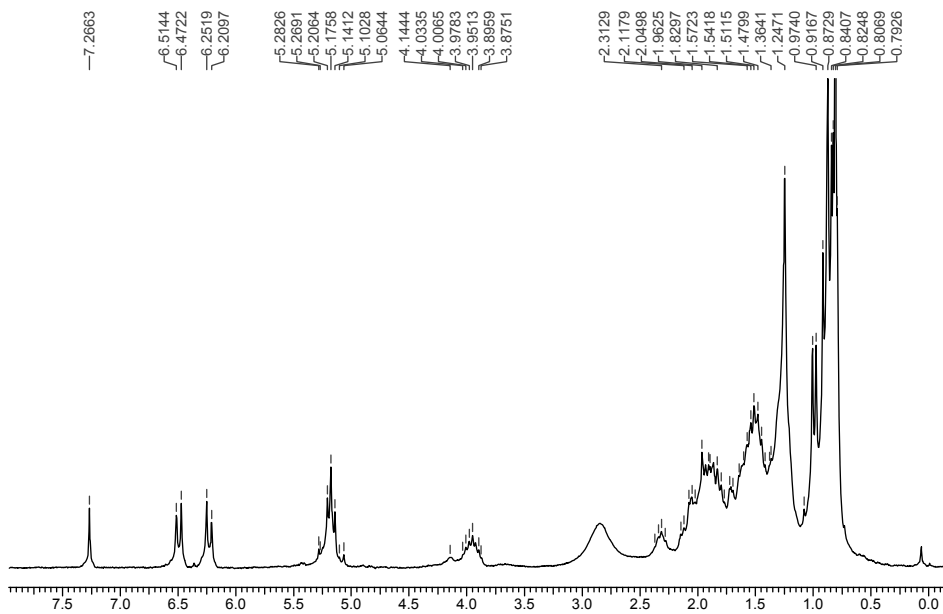


FIGURA 4.69: Espectro de RMN ^1H de **S10** (200 MHz, CDCl_3)

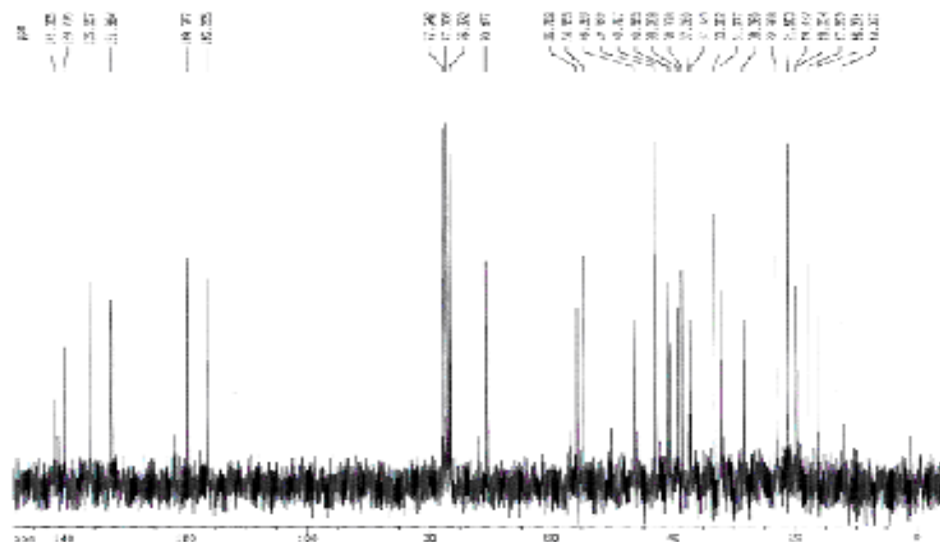


FIGURA 4.70: Espectro de RMN ^{13}C de **S9** (100 MHz, CDCl_3)

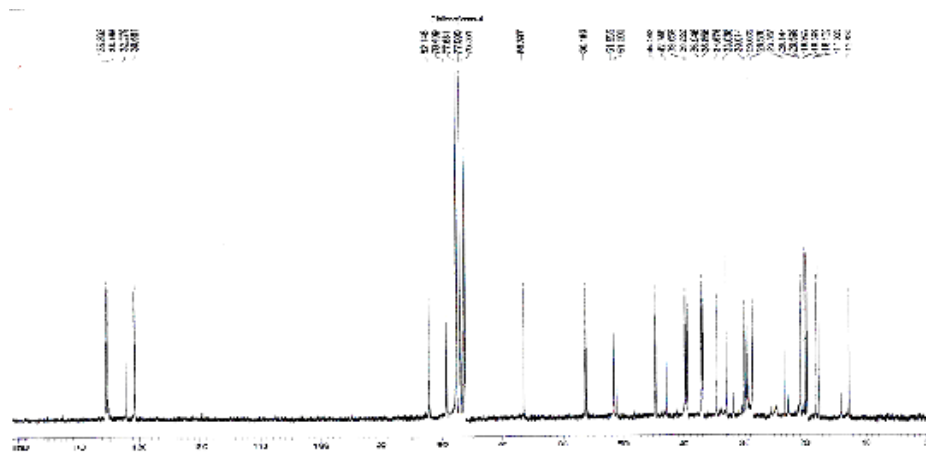


FIGURA 4.71: Espectro de RMN ^{13}C de **S10** (50 MHz, CDCl_3)

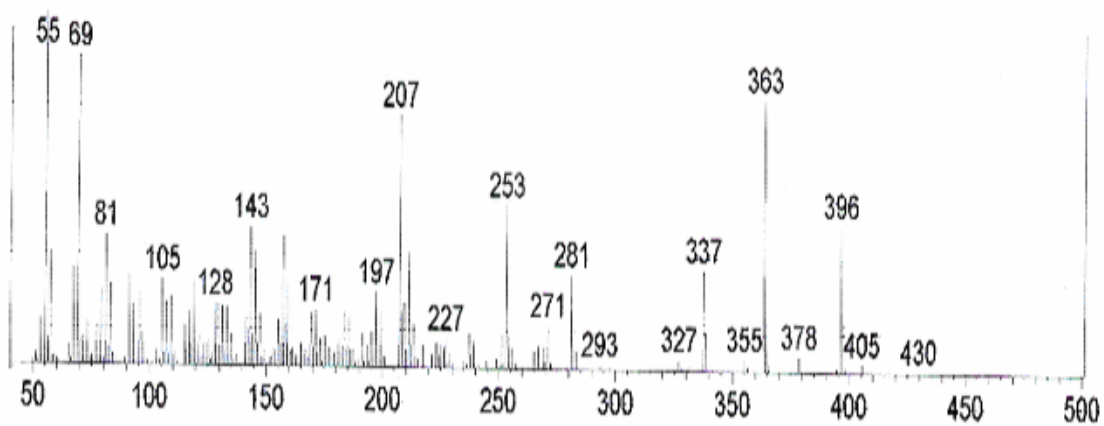


FIGURA 4.72: Espectro de CG/MS de **S9**

4.2.8 – Identificação Estrutural dos esteróides (**S11A**, **S11B** e **S11C**)

No espectro de RMN ^1H (Figura 4.73, p. 140) da mistura de esteróides observou-se dois duplo dubletos referentes a hidrogênios olefinicos em δ 5,17 ($J = 15,1$ e $8,4$ Hz) e 5,05 ($J = 15,1$ e $8,8$ Hz), estes dois sinais são característicos dos hidrogênios H-22 e H-23 da cadeia lateral dos esteróides. Observou-se um singletto em δ 5,70 referente a H-4, corresponderia a ligação dupla entre C-4 e C5, fazendo parte de um sistema enônico. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.74, p. 140, Tabela 4.13, p. 139) da mistura observou-se sinais para C-3, C-4 e C-5 com deslocamentos químicos em δ 202,4; 124,1 e 175,4 respectivamente, além dos sinais em δ 139,7 e 130,7 atribuídos aos carbonos C-22 e C-23.

Além dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , os quais permitiram uma atribuição dos sinais de cada esteróide, com bastante coerência junto aos dados encontrados na literatura (VIEIRA, 1995), foi feita a análise por CG, a qual confirmou a presença de derivados oxidados no C-3. Confirmando assim as propostas estruturais apresentadas: estigmastenona (**S11A**) m/z 410, campestenona (**S11B**) m/z 398 e sitostenona (**S11C**) m/z 412.

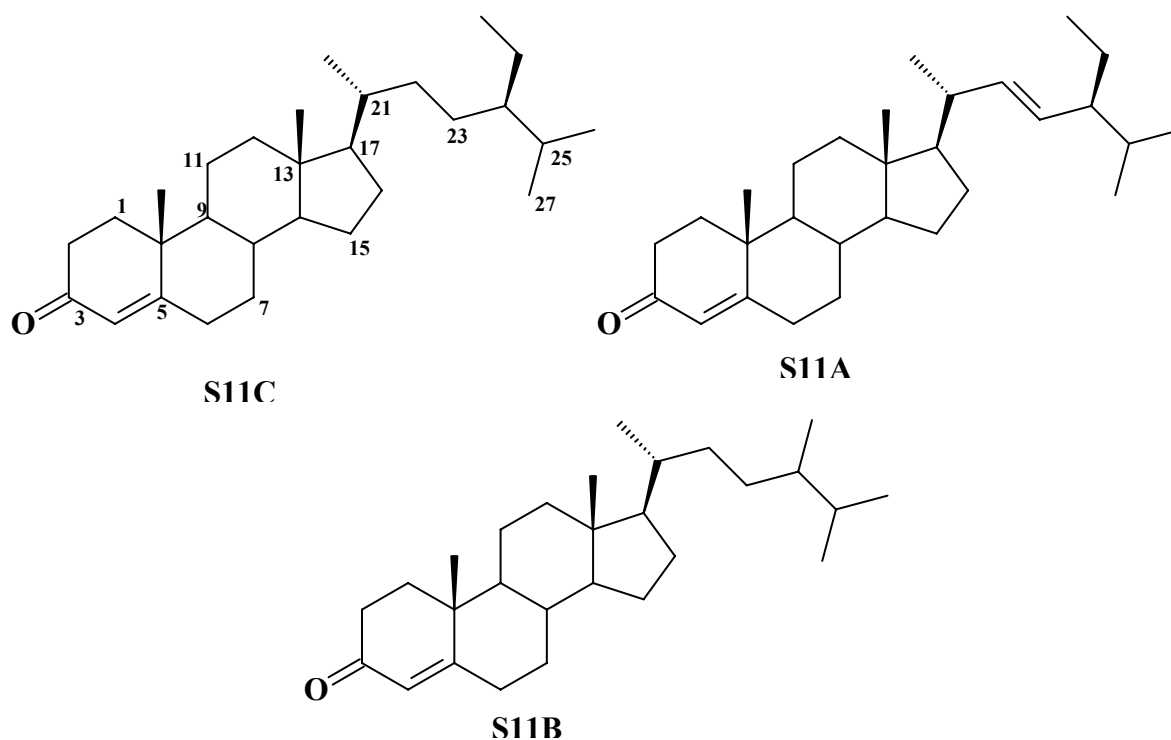


TABELA 4.13: DADOS DE RMN ^{13}C DOS ESTERÓIDES (δ , MeOH, 50 MHz)

Posições	Lit. (VIEIRA 1995, CDCl_3)			11A	11B	11C
1	38,8	38,8	38,8	41,0	41,0	41,0
2	34,1	34,1	34,1	34,7	34,7	34,7
3	200,1	200,1	200,1	202,4	202,4	202,4
4	123,8	123,8	123,8	124,1	124,1	124,1
5	172,5	172,5	172,5	175,4	175,4	175,4
6	32,1	32,1	32,1	32,7	32,7	32,7
7	32,0	32,0	32,0	31,7	31,7	31,7
8	35,8	35,8	35,8	35,1	35,1	35,1
9	54,0	54,0	54,0	55,4	55,4	55,4
10	36,1	36,1	36,1	36,8	36,8	36,8
11	21,2	21,2	21,2	21,7	21,7	21,7
12	39,8	39,8	39,8	40,0	40,0	40,0
13	42,7	42,7	42,7	43,6	43,6	43,6
14	55,9	55,9	55,9	57,3	57,3	57,3
15	24,3	24,3	24,3	24,2	24,2	24,2
16	29,3	29,3	29,3	29,4	29,4	29,4
17	56,1	56,1	56,1	57,5	57,5	57,5
18	12,2	12,3	12,2	12,4	12,3	12,4
19	17,5	17,5	17,5	18,0	18,0	18,0
20	40,7	38,8	36,3	41,9	41,0	36,9
21	21,3	15,8	18,9	21,6	16,0	19,3
22	138,4	33,2	34,0	139,7	33,4	34,0
23	129,6	29,9	26,2	130,7	30,4	27,2
24	51,4	39,8	45,9	52,8	40,0	47,3
25	31,9	29,9	29,3	30,8	30,4	29,4
26	20,4	20,4	19,2	20,2	20,2	19,5
27	18,6	18,9	18,6	18,4	19,3	18,4
28	25,6	17,6	23,3	25,2	17,7	22,2
29	12,2		12,2	12,2		12,2

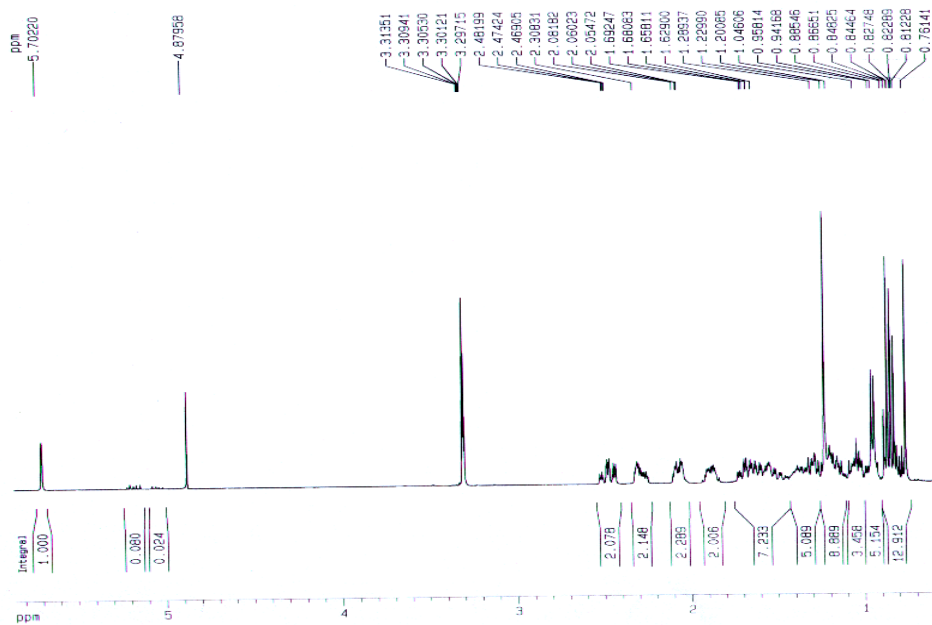


FIGURA 4.73: Espectro de RMN ^1H de **S11A**, **S11b** e **S11C** (200 MHz, MeOH)

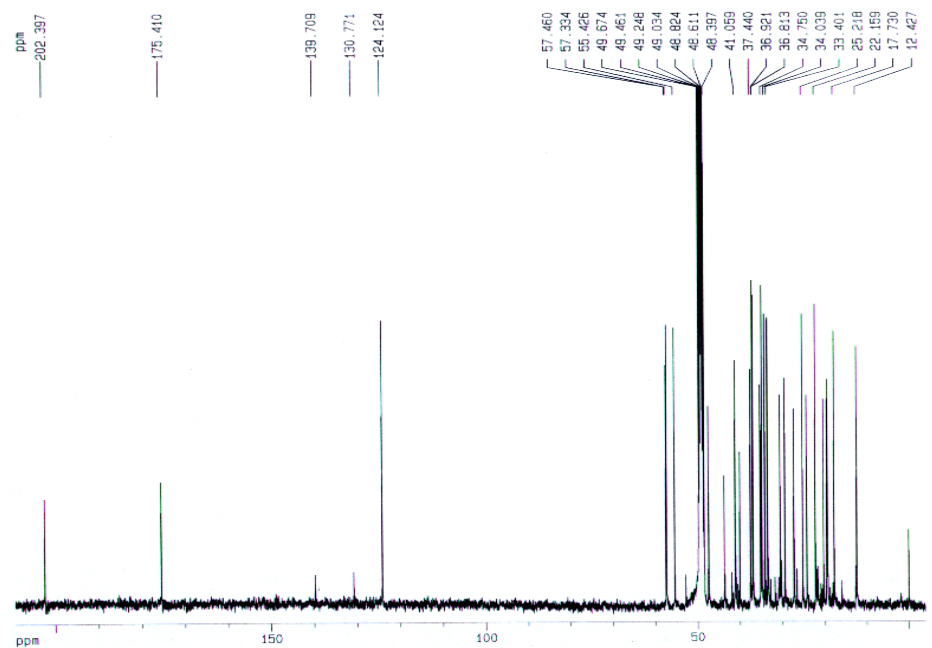


FIGURA 4.74: Espectro de RMN ^{13}C de **S11A**, **S11B** e **S11C** (50 MHz, MeOH)

4.2.9 – Identificação estrutural do 5'-inosil (**S12**)

Analisando o espectro de RMN ^1H (Figura 4.75-4.78, p. 142-144) da substância **S12** observou-se dois singletos integrando para um hidrogênio cada em δ 8,40 e δ 8,27, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefinicos H-2 e H-8 respectivamente. Ainda foi observado um dubleto em δ 6,05 ($J = 6,4$ Hz) referente ao hidrogênio H-2', e um quadupletos em δ 4,40, o qual pôde ser atribuído aos hidrogênios H-3' e H-4', coalecidos, sendo que esta multiplicidade é observada quando o espectro foi feito no equipamento de 200 MHz (Figura 4.75, p. 133), mas quando feito no equipamento de 400 MHz (Figura 4.77 e 4.78, p. 143-144), o que se observou foram dois tripletos um em δ 4,59 ($J = 5,5$ Hz) e δ 4,12 ($J = 4,4$ Hz).

Continuando a análise do espectro de RMN ^1H da substância em questão ainda observou-se três duplos dubletos em δ 3,83 ($J = 3,0$ e 12,5 Hz), δ 3,98 ($J = 3,0$ e 12,5 Hz) e δ 4,26 ($J = 2,5$ e 5,1 Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios diasterotópicos H-6a', H-6b' e H-5' respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.79, p. 144; Tabela 4.14, p. 142) observou-se um sinal de carbono característicos de lactama em δ 156,2 o qual foi atribuído ao carbono C-4; sinais de carbonos olefínicos referentes ao carbonos C-2 e C-8 em δ 149,1 e δ 140,0 respectivamente, sinais de carbonos olefínicos totalmente substituídos em δ 119,4 e δ 152,4 atribuídos aos carbonos C-5 e C-6 respectivamente, cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos (87,9; 73,5; 70,5 e 86,0) e um metilénico em δ 61,7, indicando uma unidade de ribose ligada a estrutura.

Estes dados levaram a propor para o composto **S12** o nucleosídeo 5'-inosil ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_5$).

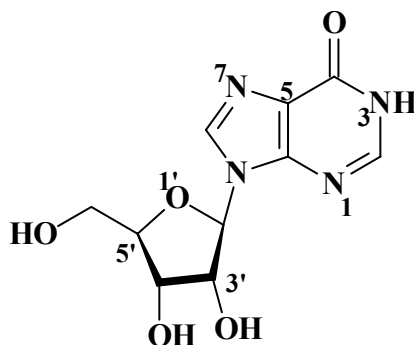


TABELA 4.14: DADOS DE RMN ¹H E ¹³C DE S12 (DMSO, 400 MHz)

Posições	¹³ C	¹ H (400 MHz, DMSO)	¹ H (200 MHz, MeOD)
2	149,1	8,34 (s, 1H)	8,40 (s, 1H)
4	156,2		
5	119,4		
6	152,4		
8	140,0	8,13 (s, 1H)	8,27 (s, 1H)
1'	-		
2'	87,9	5,86 (d, J = 6,4 Hz, 1H)	6,05 (d, J = 6,4 Hz, 1H)
3'	73,5	4,59 (t, J = 5,5 Hz, 1H)	4,40 (m, 1H)
4'	70,7	4,12 (t, J = 4,4 Hz, 1H)	4,40 (m, 1H)
5'	86,0	3,95 (dd, J = 3,2 e 6,4 Hz, 1H)	4,26 (dd, J = 2,5 e 5,1 Hz, 1H)
6'	61,7	6a 3,65 (d, J = 12,1 Hz, 1H) 6b 3,53 (dd, J = 12,1 e 4,0 Hz, 1H)	6a 3,98 (dd, J = 12,5 e 3,0 Hz, 1H) 6b 3,83 (dd, J = 12,5 e 3,0 Hz, 1H)

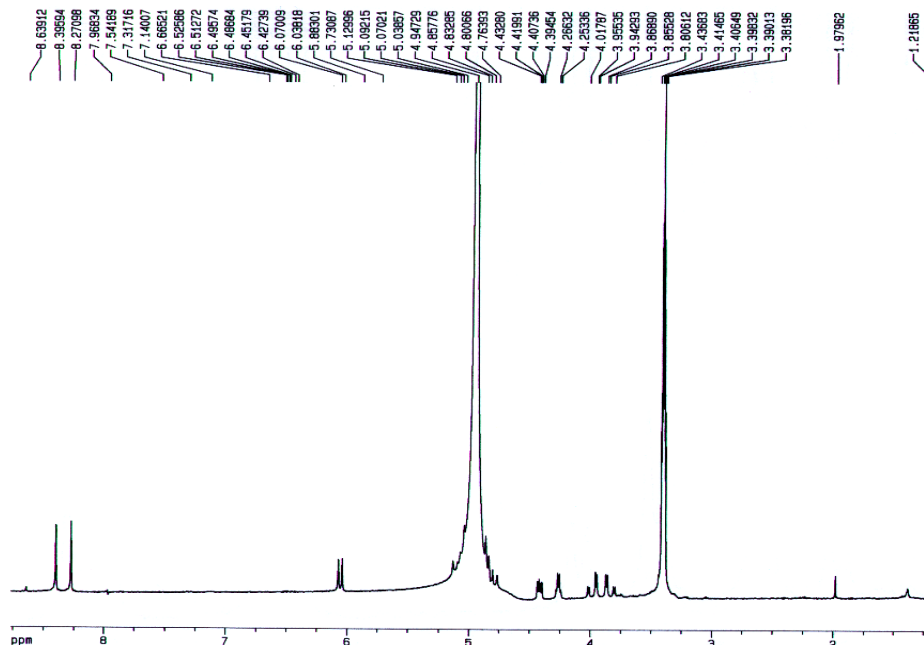


FIGURA 4.75: Espectro de RMN ¹H de S12 (200 MHz, MeOD)

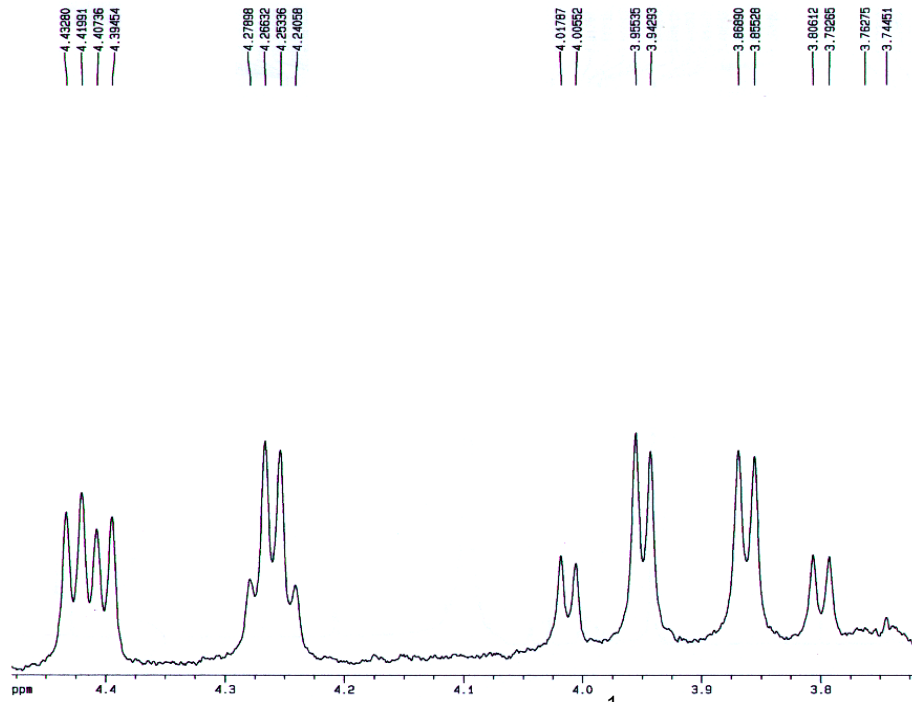


FIGURA 4.76: Expansão do espectro de RMN ^1H de **S12** (200 MHz, MeOD)

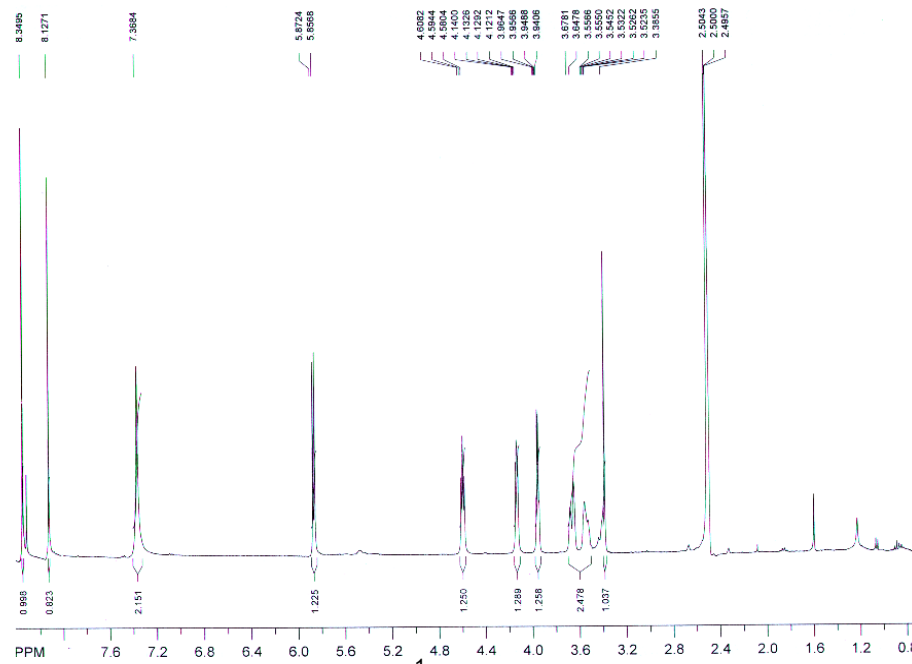


FIGURA 4.77: Espectro de RMN ^1H de **S12** (400 MHz, MeOD)

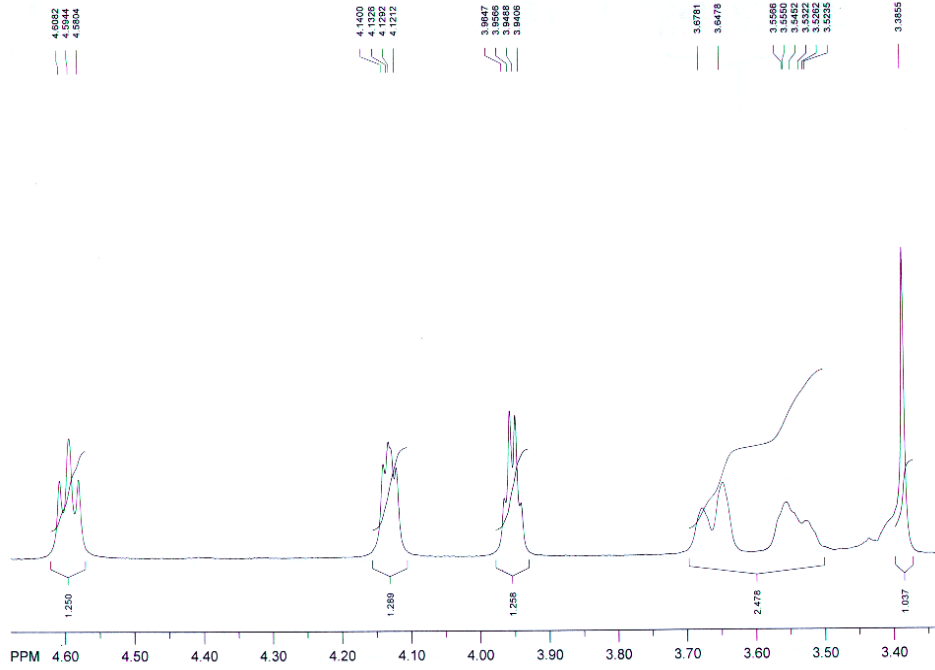


FIGURA 4.78: Expansão do espectro de RMN ^1H de **S12** (400 MHz, MeOD)

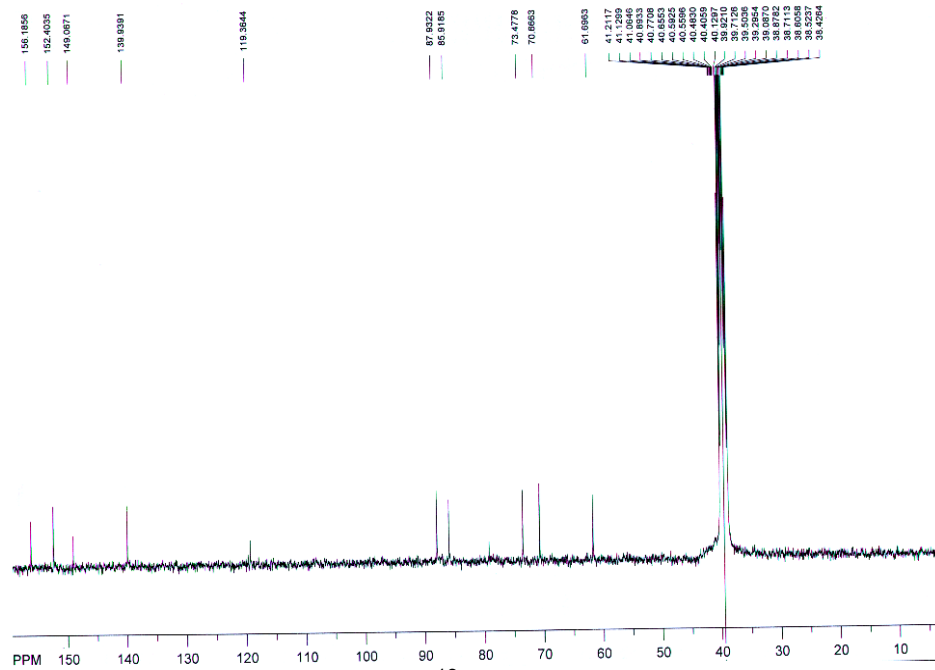


FIGURA 4.79: Espectro de RMN ^{13}C de **S12** (100 MHz, MeOD)

4.2.10 – Identificação estrutural da Uridina (**S13**) e Uracila (**S14**)

No espectro de RMN ^1H (Figura 4.80 e 4.81, p. 147; Tabela 4.15, p. 146) de **S13** observou-se dois dubletos acoplando entre si em δ 5,62 e δ 7,87 com constante de acoplamento de 8,0 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefinicos H-5 e H-6, respectivamente. Ainda foi observado um outro dubleto em δ 5,77 ($J = 5,4$ Hz), o qual foi atribuído ao hidrogênio H-2', dois tripletos em δ 4,01 ($J = 5,2$ Hz) e δ 3,96 ($J = 5,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H3' e H-4' respectivamente.

Continuando a análise do espectro de RMN ^1H da substância em questão observou-se ainda três duplos dubletos em δ 3,82 ($J = 3,3$ e 7,0 Hz), δ 3,60 ($J = 3,3$ e 12,0 Hz) e δ 3,54 ($J = 3,3$ e 12,0 Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-5' e aos dois hidrogênios diasterotópicos H-6a' e H-6b' respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.82, p. 148; Tabela 4.15, p. 146) observou-se dois sinais de carbonos característicos de carbamidas em δ 151,0 e 163,5 os quais foram atribuídos aos carbonos C-2 e C-4 respectivamente, além destes observou-se ainda os sinais de carbonos olefinicos C-5 em δ 101,7 e C-6 em δ 140,6, cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos (87,7; 73,5; 69,8 e 84,8) e um metilénico em δ 60,8, indicando uma unidade de ribose.

Já para a substância **S14** observou-se no espectro de RMN ^1H (Figura 4.83, p. 148) dois dubletos integrando para 1H na região de hidrogênios olefinicos em δ 5,65 ($J = 7,6$ Hz) e em δ 7,50 ($J = 7,6$ Hz), e um singleto em δ 8,41; além destes não se observou nenhum outro sinal típico da unidade ribose.

Os dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C mais a comparação dos dados encontrados na literatura (SANTOS 2004) levaram a inferir que as duas substâncias discutidas acima são dois nucleosídeos sendo a **S13** denominada de uridina, o qual é um nucleosídeo constituído da base nitrogenada pirimidica uracila ligada ao açúcar ribose através de uma ligação β , e a **S14** denominada de uracila.

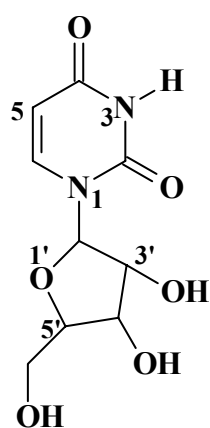
É importante lembrar que quando um grupo fosfato é adicionado ao açúcar, os nucleosídeos passam a ser denominados de nucleotídeos, os quais constituem os ácidos nucléicos (RNA), que são macromoléculas de extrema

importância biológica em todos os organismos vivos responsáveis pela transmissão da informação genética na célula.

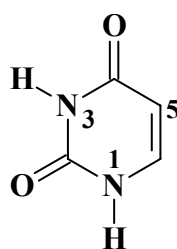
TABELA 4.15: DADOS DE RMN ^1H E ^{13}C DE **S13** e (DMSO, 400 MHz)

Posições	^{13}C	^1H	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$
1				
2	151,0		150,8	
3				
4	163,5		163,2	
5	101,7	5,62 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	101,8	5,63 (<i>dd</i> , $J = 2,0$ e 8,0 Hz)
6	140,6	7,87 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	140,8	7,87 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
1'				
2'	87,7	5,77 (<i>d</i> , $J = 5,4$ Hz)	87,7	5,77 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)
3'	73,5	4,01 (<i>t</i> , $J = 5,2$ Hz)	73,6	4,00 (<i>m</i>)
4'	69,8	3,96 (<i>t</i> , $J = 5,0$ Hz)	69,9	5,37 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz)
5'	84,8	3,82 (<i>dd</i> , $J = 3,3$ e 7,0 Hz)	84,9	5,09 (<i>t</i> , $J = 8,0$ Hz)
6'	60,8	a 3,60 (<i>dd</i> , $J = 3,3$ e 12,0 Hz) b 3,54 (<i>dd</i> , $J = 3,3$ e 12,0 Hz)	60,9	a 3,95 (<i>m</i>) b 3,58 (<i>m</i>)

* Dados da literatura (Solvente D_2O)



URIDINA (S13)



URACILA (S14)

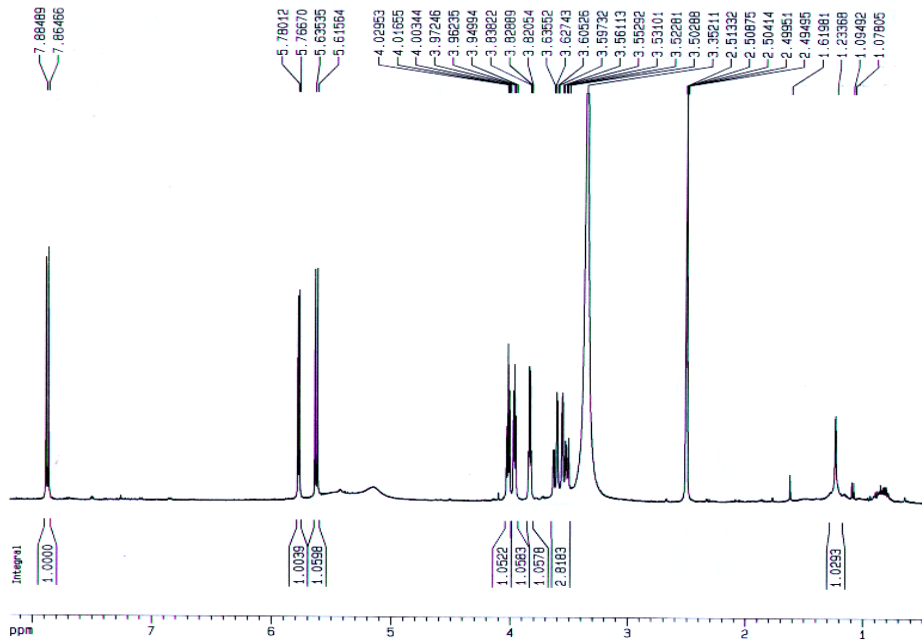


FIGURA 4.80: Espectro de RMN ^1H de **S13** (400 MHz, DMSO)

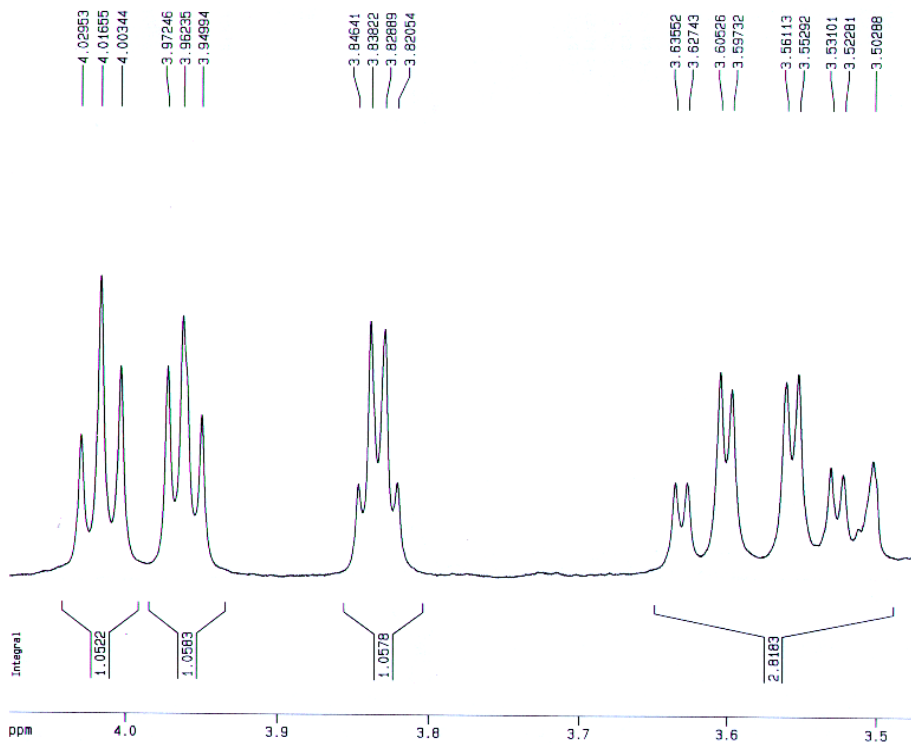


FIGURA 4.81: Expansão do espectro de RMN ^1H de **S13** (400 MHz, DMSO)

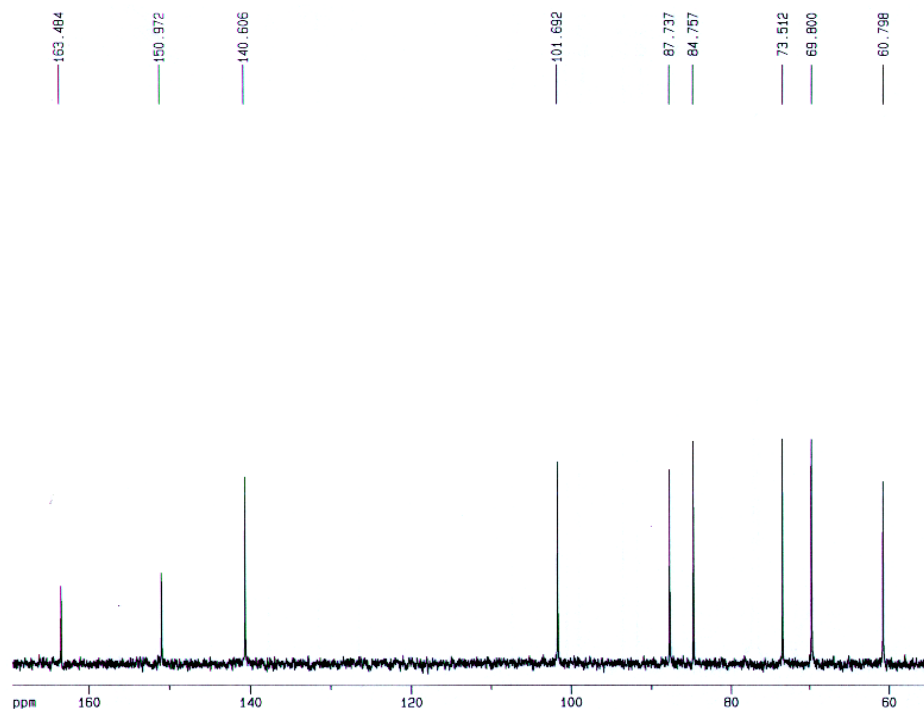


FIGURA 4.82: Espectro de RMN ^{13}C de **S13** (100 MHz, DMSO)

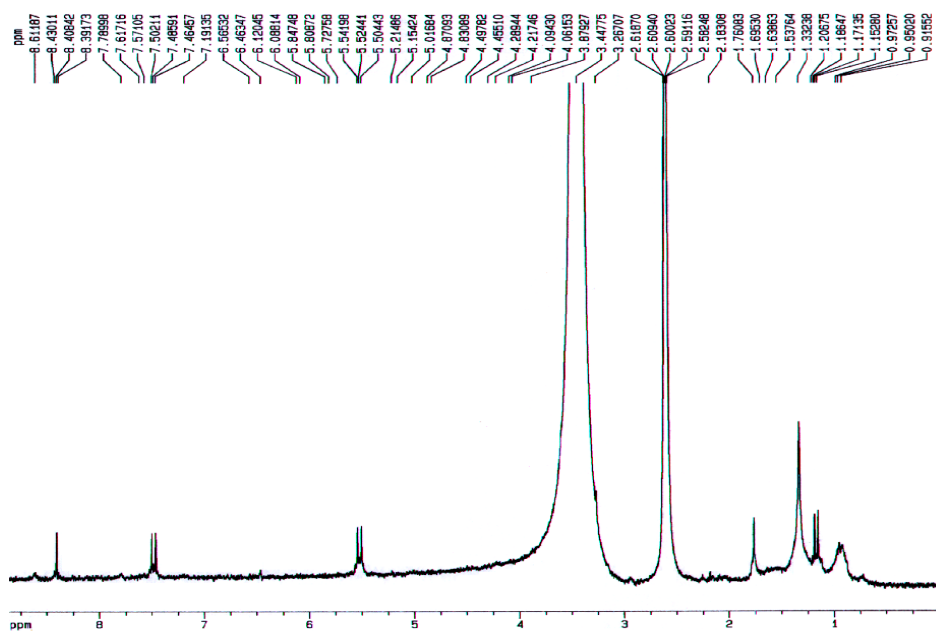
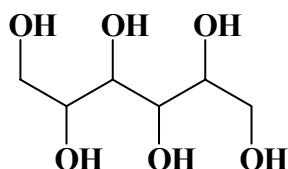


FIGURA 4.83: Espectro de RMN ^1H de **S14** (200 MHz, DMSO)

4.2.11 – Identificação Estrutural do Manitol (**S15**)

O espectro de RMN ^1H (Figura 4.84, p. 150) do composto **S15**, mostrou sinais referentes a hidrogênios carbinólicos na região entre δ 3,00 – 5,00 característicos de açúcar e devido a ausência do sinal referente ao hidrogênio anomérico em δ ~5,10, indicou tratar-se de um poliol de cadeia aberta. A análise desses dados junto com aqueles fornecidos pelo espectro de Pendant (Figura 4.86, p. 151), no qual foi observado apenas três sinais de carbonos, forneceu subsídios para sugerir que esse composto seja um poliol simétrico.



A análise do espectro de RMN ^1H de **S15** acetilado (Figura 4.85, p. 150) permitiu a atribuição de deslocamento químico dos sinais de hidrogênio, sendo dois duplo dubleto em δ 4,07 ($J = 12,5$ e $5,1$ Hz) e δ 4,23 ($J = 12,5$ e $2,8$ Hz), atribuídos aos hidrogênio H-1a e H-1b respectivamente, um multipletto em δ 5,07 atribuído ao hidrogênio H-2, um dubleto em δ 5,45 ($J = 8,7$ Hz) atribuído a H-3 e ainda três singletos em δ 2,10; 2,07 e 2,04 referentes aos três grupos acetilas, isto se deu devido a equivalência confirmando assim a presença de seis hidroxila em **S15**.

A análise desses dados junto com dados da literatura (SANTOS, 2004), confirmaram que esse metabolito corresponde ao poliol manitol.

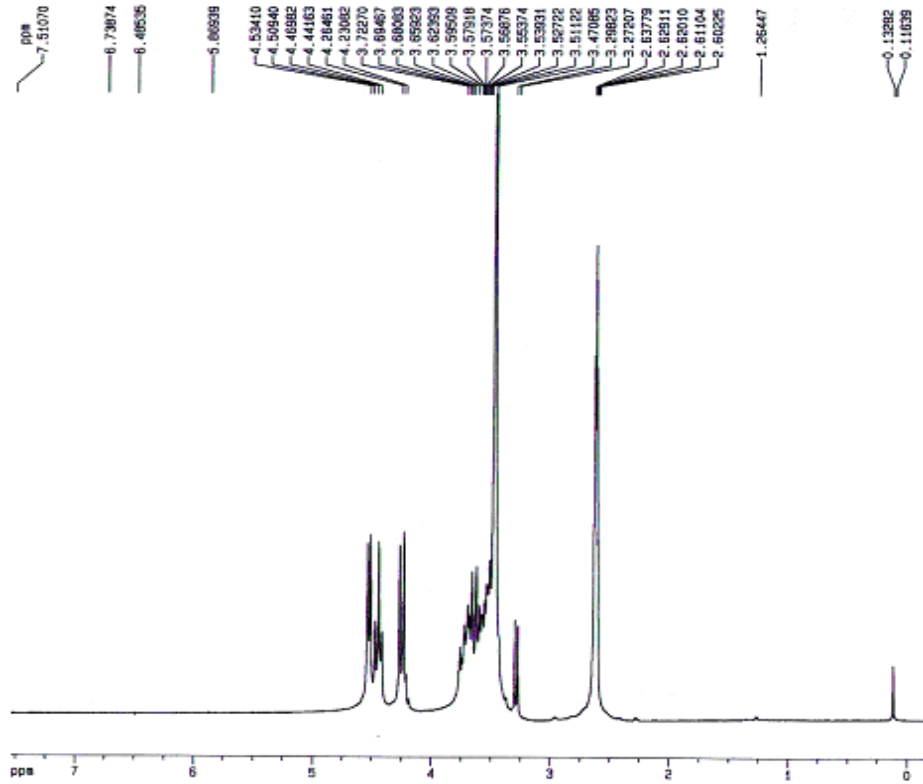


FIGURA 4.84: Espectro de RMN ^1H de **S15** (200 MHz, DMSO)

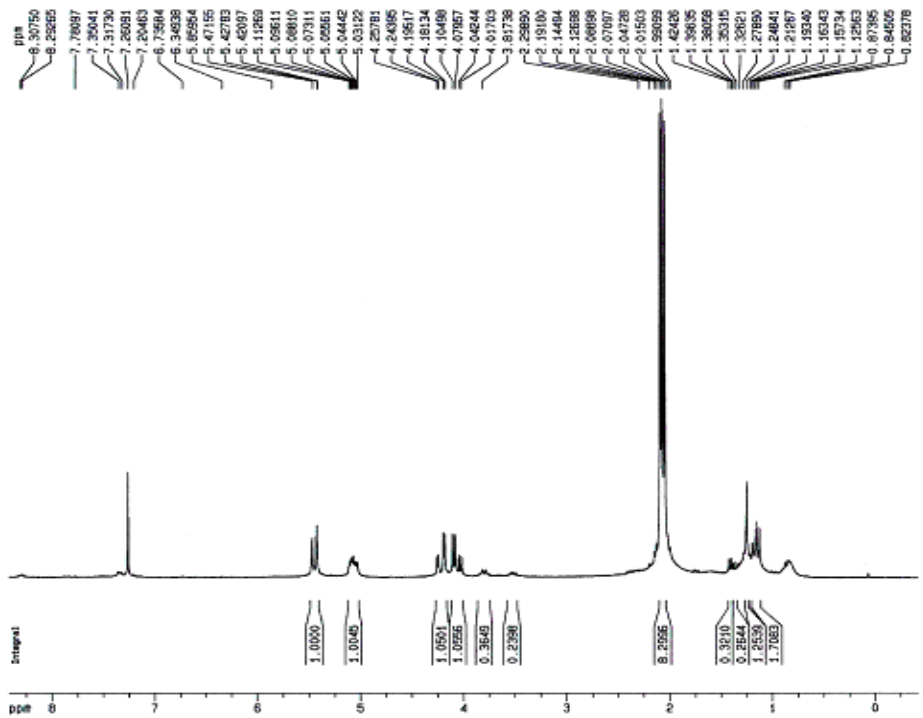


FIGURA 4.85: Espectro de RMN ^1H de **S15** acetilado (200 MHz, DMSO)

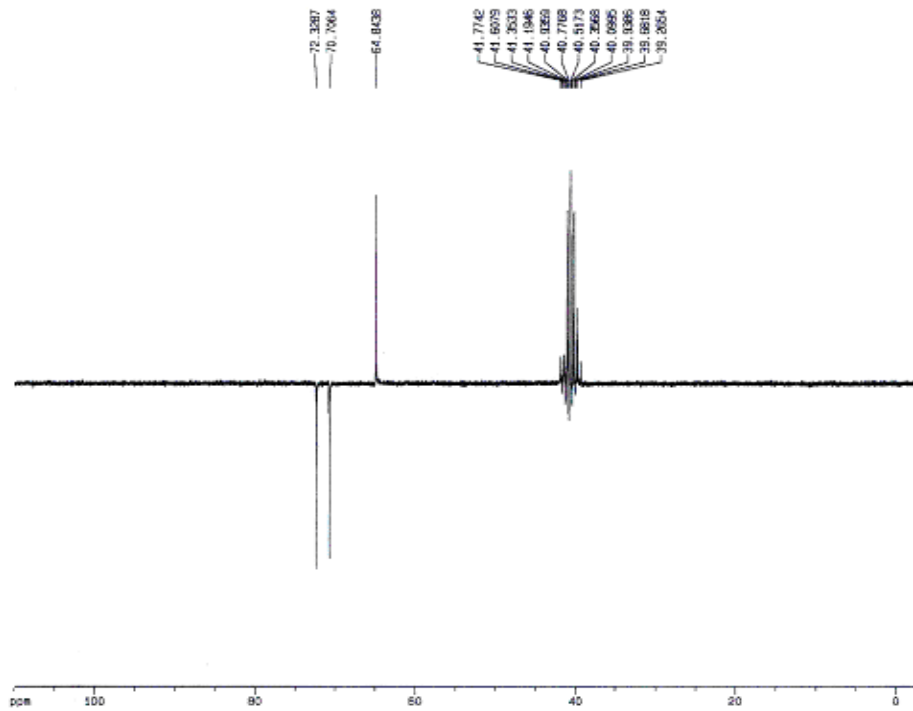


FIGURA 4.86: Espectro de RMN ^{13}C - PENDANT de **S15** (200 MHz, DMSO)

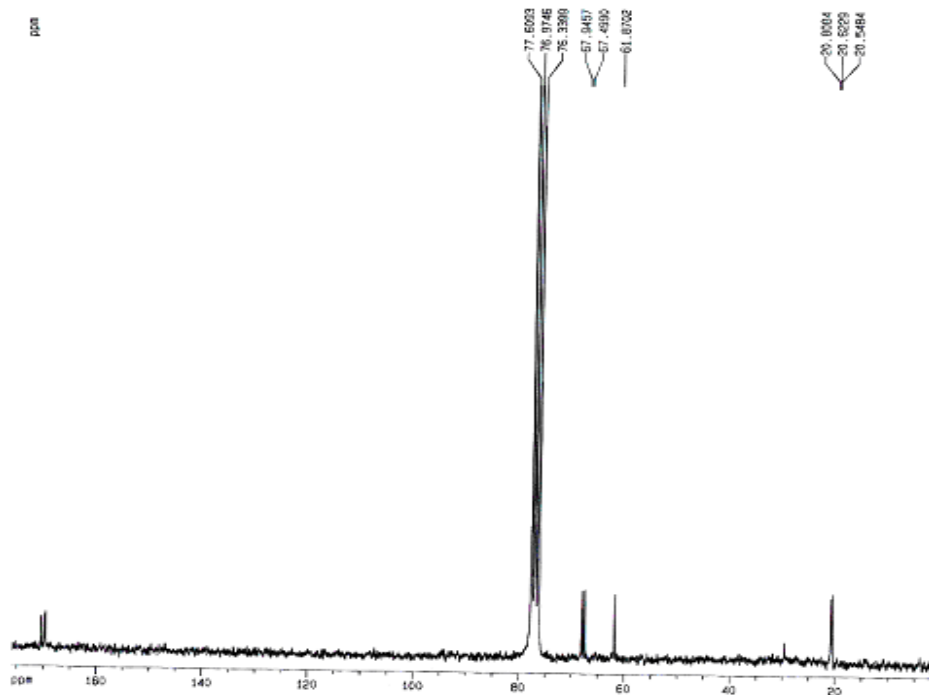


FIGURA 4.87: Espectro de RMN ^{13}C de **S15** acetilado (200 MHz, DMSO)

4.2.12 – Identificação Estrutural do Triglicerídeo (**S16**)

Observou-se no espectro de RMN ^1H de **S16** (Figura 4.88, p. 152) um tripleto em δ 0,88 típico de metila terminal; um sinal intenso em δ 1,26 de metilenos de cadeia acila, um sinal em δ 1,61 referente aos metilenos β a carbonila, um multiplete em δ 2,03 de metilenos vizinhos a ligação dupla na cadeia acila, um tripleto em δ 2,31 do metileno α a carbonila, um sinal centrado em δ 4,22 relativo a metilenos acilcarbinólicos e um multiplete em δ 5,33 do metino acilcarbinólico. Estes dados quando comparados com a literatura levaram a identificação de triglicerídeo (**S16**) (AMBROZIN 2000).

Para se determinar a parte ácida do triglicerídeo fez-se a reação de transesterificação, conforme o item 3.6 página 46, foram identificados por análise em CG/EM como sendo: ácido hexadecanóico (38,25 %), ácido actadecenóico (52,51 %) e ácido octadecanóico (9,24 %).

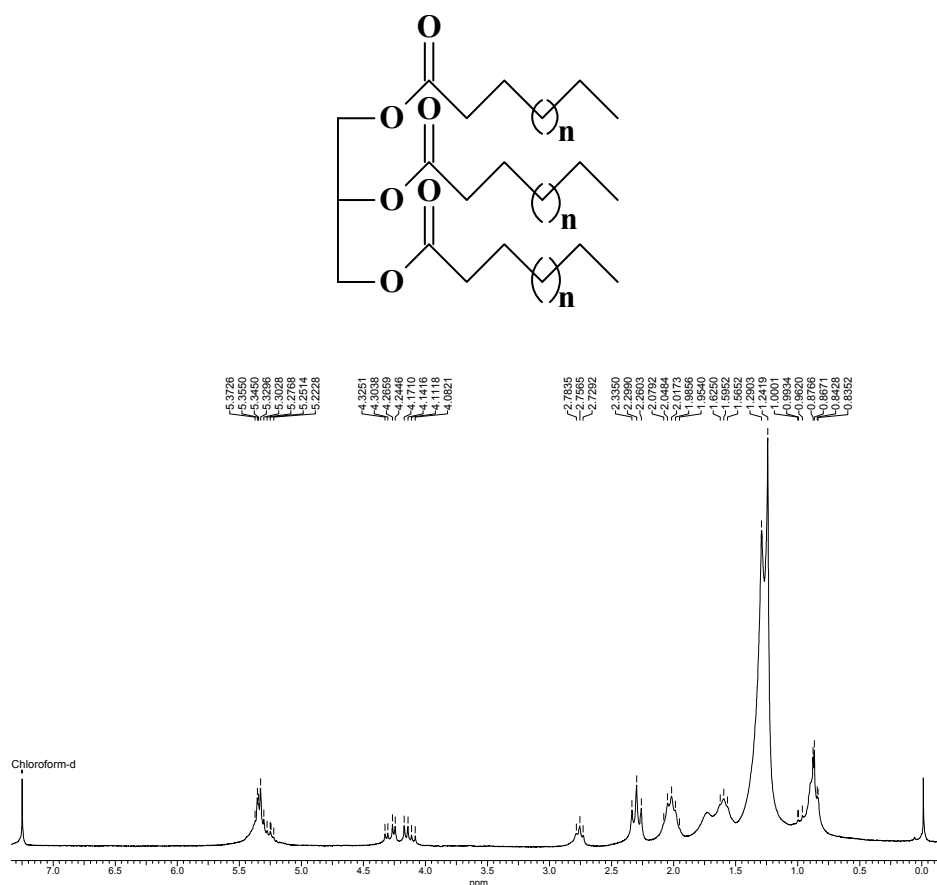


FIGURA 4.88: Espectro de RMN ^1H de **S16** (200 MHz, CDCl_3)

4.3 – Ensaio Biológicos com substâncias isoladas de *B. rhodina*

AS PLANTAS DANINHAS

O controle de plantas daninhas é essencial para garantir a qualidade e produtividade das culturas. Desde o início da atividade agrícola a produtividade de plantas cultivadas tem sido reduzida por pragas, doenças e principalmente pela competição com aquelas daninhas, que existem desde que o homem começou a produzir alimentos para sua subsistência há cerca de 10000 anos (BARBOSA *et al.*).

O Brasil possui extensas áreas ocupadas por agricultura intensiva e com boas condições climáticas, favorecendo a proliferação de pragas que causam danos consideráveis e prejudicam boa parte da colheita (ROBBS *et al.*, 1999). Desse modo, a agricultura brasileira representa um dos grandes mercados mundiais para pesticidas químicos. Estes são muitas vezes antieconômicos e pouco biodegradáveis e tóxicos, trazendo problemas para agricultores e consumidores de produtos agrícolas e ao meio ambiente. Tais problemas vêm reforçar a necessidade de incentivos a um manejo mais racional dos agroecossistemas, com o emprego de práticas integradas, incluindo a resistência varietal de cultivares, o uso de elementos sadios de propagação vegetal e, destacadamente, o controle biológico, seja ele natural ou aplicado. Estas são alternativas que poderiam contribuir para a diminuição dos impactos causados pelo uso indiscriminado de pesticidas químicos.

Desta forma, as plantas daninhas sempre foram conhecidas como um dos mais sérios limitantes à produção agrícola. Sendo que o controle destas espécies é geralmente realizado através de métodos mecânicos ou químicos, muitas vezes com conseqüências deletérias para o meio ambiente, à saúde humana e animal (ROBBS *et al.*, 1999).

A indústria de herbicidas produziu com sucesso diversos produtos e as pesquisas para o controle de plantas daninhas nos últimos 50 anos foram enfocadas quase que exclusivamente em herbicidas sintéticos (VYVYAN *et al.*, 2002). O desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas expandiu o emprego destes produtos, e a sua utilização contínua resultou no aparecimento de espécies resistentes a estes compostos. Com isso, a preocupação pública sobre o impacto dos herbicidas sintéticos sobre a saúde humana e no meio ambiente está em

crescimento. Tais preocupações chamam a atenção para o desenvolvimento de tecnologias alternativas para o controle de plantas daninhas baseadas em produtos naturais, que tenham: seletividade a estas plantas, ação rápida e principalmente efetividade a doses reduzidas.

Substâncias ensaiadas como herbicidas

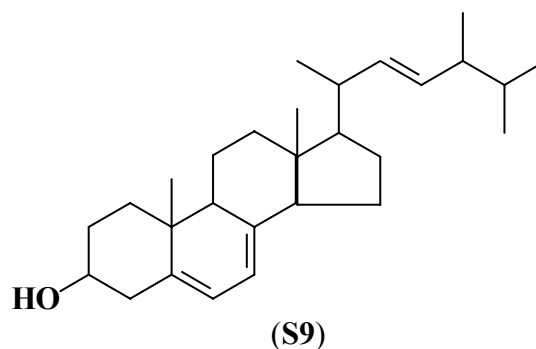
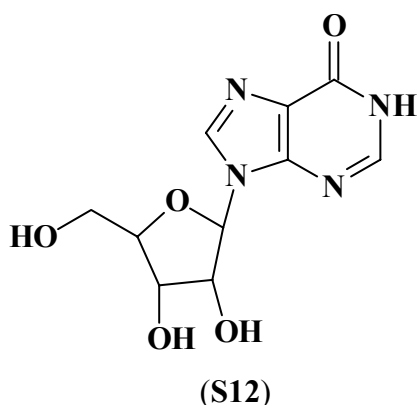
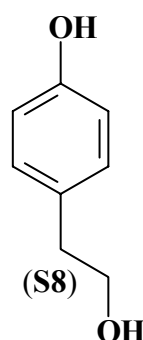
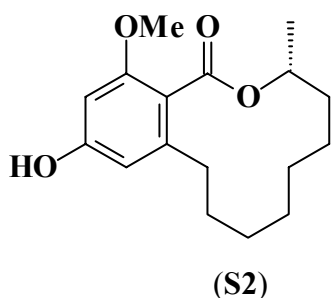
Produtos naturais em geral têm se mostrado como uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas (Kimura *et al.*, 1997 e 1998; Pillmoor 1998 e Greaves 1996). Embora alguns herbicidas de origem natural tenham sido desenvolvidos (Duke *et al.*, 2000), de acordo com as estatísticas, para se colocar um novo produto no mercado, aproximadamente 20.000 compostos são produzidos. A necessidade de novos produtos, com diferentes mecanismos de ação, possuindo espectro mais amplo para controle de plantas daninhas com menor impacto ambiental é um fato real. Isto porque a cada dia, novas espécies de plantas daninhas tolerantes ou resistentes aos herbicidas atuais surgem em nossos campos (Duke *et al.*, 2000).

O uso de produtos naturais como herbicidas ou como protótipos para conduzir programas de descoberta de outros novos é uma alternativa que não tem sido explorada de modo completo como foi para inseticidas e fungicidas. Produtos naturais fitotóxicos são em geral estruturalmente mais complexos que herbicidas sintéticos e não são obtidos por metodologias sintéticas tradicionais. Por este motivo a diversidade encontrada em produtos naturais para gerar novas classes de compostos em programas sintéticos tradicionais está sendo explorada lentamente (Duke *et al.*, 2000), talvez pela pequena quantidade de pesquisadores envolvidos na área.

Dentro deste contexto o Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, buscando por metabólitos secundários com atividade herbicida, surgiu a oportunidade de ensaiarmos alguns compostos, através de estágio realizado por um aluno de nosso grupo, o qual é orientado pela Prof. Dra. Maria Fátima das G. F. da Silva. Este doutorando quando participou do programa PDEE-CAPES, na *Universidad Nacional Autónoma de México (Facultad de Química/Departamento de Bioquímica)* submeteu uma série de substâncias a ensaios *in vitro* sobre a fotossíntese em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. Estes testes eram

representados por diversas reações que simulam as várias etapas envolvidas no processo fotossintético. Algumas destas reações são as inibições da síntese de ATP (Reação de Hill), da velocidade do transporte de elétrons (basal, fosforilante e desacoplado), reações dos fotossistemas II e I (FSII e FSI), incluindo suas reações parciais, inibição da atividade do complexo ATP-sintase e estudos de fluorescência da clorofila a (Chl *a*). Estas reações auxiliam no esclarecimento do mecanismo de ação *in vitro* dos produtos naturais sobre a fotossíntese. Os compostos isolados em maior quantidade a partir do patógeno *Botryosphaeria rhodina* foram submetidos a tais ensaios bioquímicos, no entanto apenas o composto **S2** apresentou atividade no ensaio preliminar, contudo a quantidade isolada deste composto não foi suficiente para a realização de todas as etapas dos ensaios, fez-se necessário o reisolamento deste.

Os compostos ensaiados foram:



Avaliação dos compostos puros sobre a síntese de ATP em cloroplastos isolados das folhas de espinafre

Os compostos **S8**, **S9** e **S12** não inibiram a síntese de ATP num controle de 2741 mMol ATP mg⁻¹.Chl⁻¹.h⁻¹. Já o composto **S2**, foi ativo frente à

inibição da síntese de ATP, apresentando $I_{50} < 100 \mu\text{M}$. A síntese de ATP foi medida a uma faixa de pH compreendida entre 8,00 e 8,05. Como acceptor de elétrons utilizou-se MV (metilviologênio). Os resultados são expressos em função do I_{50} (Concentração mínima necessária para redução de 50% da atividade). Deve-se ressaltar que os testes foram feitos em triplicata.

Efeito do composto **S2** sobre a síntese de ATP

A figura 16 representa o efeito deste composto sobre a produção de ATP durante a fase luminosa da fotossíntese. O aumento da concentração deste composto provoca uma diminuição da síntese de ATP com um I_{50} de $35,6 \mu\text{M}$ (concentração necessária para reduzir em 50 % a atividade).

Elucidação do mecanismo de ação do composto **S2**

Com base no resultado do ensaio de inibição da síntese de ATP, decidiu-se analisar o mecanismo de ação do composto para determinar seu efeito, mediu-se as razões de transporte de elétrons em diferentes condições (basal, fosforilante e desacoplado). Na ausência ou presença de ADP, Pi, ou NH_4Cl e tendo MV como acceptor de elétrons artificial, o composto inibiu a captura de oxigênio em cloroplastos iluminados (Gráfico 4.4, p. 157). Todas as condições do fluxo de elétrons foram inibidas pelo composto. Sendo assim, este é um composto que também pode ser classificado como inibidor da reação de Hill. Uma vez que o transporte de elétrons desacoplado foi o mais inibido (100% a $300 \mu\text{M}$). Entretanto, comparando-se com a inibição da síntese de ATP (100 % at $150 \mu\text{M}$), ou seja, uma quantidade duas vezes maior de lasiodiplodina é requerida para inibir o fluxo de elétrons desacoplado e o transporte basal foi o menos afetado. Portanto, este composto possui mais de um mecanismo de ação, o que talvez iniba o complexo H^+ -ATPase.

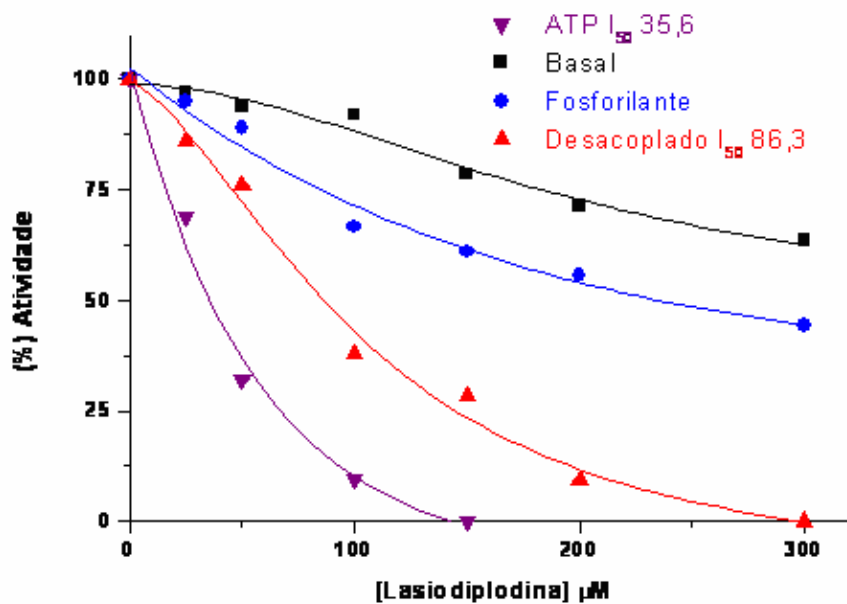


GRÁFICO 4.4: Efeito do composto 1 sobre a síntese de ATP (▼), transporte de elétrons basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) de H₂O a MV em cloroplastos de espinafre. A razão para o controle da síntese de ATP foi 1276 µMol ATP·h⁻¹·mg Chl⁻¹. E para o transporte de elétrons basal, fosforilante e desacoplado foram 933, 1200 e 1400 µequiv·e⁻·h⁻¹·mg Chl⁻¹, respectivamente.

Localização do composto no sítio de interação do FSII e reações parciais

O sítio de inibição do composto sobre a cadeia de transporte de elétrons de tilacóides foi determinado usando os inibidores, doadores e aceptores artificiais apropriados (King-Díaz *et al.*, 2006). Este composto inibiu o fluxo de elétrons do FSII de H₂O a DCPIP (Tabela 10), de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP (Tabela 4.16, p. 158). O composto inibiu 100 % todas as atividades da razão do transporte de elétrons do FSII e suas reações parciais a 400 µM. A medida polarográfica indica que a cadeia de transporte de elétrons possui dois sítios de inibição para o dado composto. Um deles pode ser a enzima de divisão de água ou ainda o caminho de transferência eletrônica entre P₆₈₀ a Q_A.

TABELA 4.16: Efeito do composto sobre o transporte de elétrons do FSII desacoplado H₂O a DCPIP, e reações parciais do FSII, de H₂O a SiMo e de DPC a DCPIP.

Conc. (μM)	FSII		FSII		FSII	
	H ₂ O a DCPIP		H ₂ O a SiMo		DPC a DCPIP	
	a	b	A	b	C	b
0	433	100	400	100	449	100
50	–	–	–	–	–	–
100	266	62	320	80	389	87
200	200	46	280	70	336	75
300	133	31	160	40	120	27
400	0	0	0	0	–	–

a = valores em μequiv e⁻ mg⁻¹ Chl⁻¹.

b = valores em porcentagem

c = valores em μM DCPIP_{red} mg⁻¹ Ch h⁻¹.

Efeito do composto sobre as atividades dependentes das membranas ligadas de H⁺ -, Mg²⁺- e Ca²⁺- ATPases

Para determinar se o composto interage com a unidade catalítica do complexo H⁺-ATPase quando este inibiu a fotofosforilação, seus efeitos sobre H⁺-, Mg²⁺- e Ca²⁺- ATPases foram investigados. A tabela 4.17 (p. 159) mostra que com o aumento da concentração do composto, as três atividades foram parcialmente inibidas, sendo que Mg²⁺-ATPase de CF1 isolado foi a mais inibida (51 % a 150 μM). Este último resultado indica que a **lasiodiplodina** tem um outro sítio de interação e inibição com CF1, quando atua como inibidor da transferência de energia.

TABELA 4.17: Efeito do composto sobre a membrana ligada a tilacóide (H^+ -ATPase), sobre a membrana ligada de luz ativada (Mg^{2+} -ATPase) e sobre a atividade aquecida (Ca^{2+} -ATPase) do fator de acoplamento purificado 1 (CF1) de cloroplastos.

Composto	H^+ -ATPase (%)	Ca^{2+} - ATPase (%)	Mg^{2+} - ATPase (%)
Lasiodiplodina (μM)			
0	100	100	100
25	-	95.6	62.3
50	95.0	87.5	54.5
150	98.5	84.1	49.4
200	97.7	-	-

Controle para Mg^{2+} - e Ca^{2+} - ATPases foram 47,3 μ moles Pi crescente/mg Chl.h. e 55,4 mmol Pi/mg de proteína, respectivamente. E para H^+ -ATPase foi de 48,0 μ moles Pi crescente/mg Chl.h.

De acordo com os ensaios realizados, como considerações finais podemos sugerir que a Lasiodiplodina (**S₂**) apresenta três diferentes mecanismos de ação. Esta substância atua como inibidora da reação de Hill, pois atua sobre a Síntese de ATP e ainda sobre as três etapas da cadeia transportadora de elétrons (basal, fosforilante e desacoplada). O segundo ambiente de ação localiza-se sobre o FSII, visto que este composto apresentou atividade sobre as três reações que compõem este fotossistema (como ser visto na tabela 4.16). Observou-se ainda através da redução da atividade enzimática do complexo ATPase (Tabela 4.17) e também através do estudo da fluorescência da Chl *a* que **S₂** interage com o complexo de evolução de oxigênio (OEC), causando dano a enzima que provoca a fotólise da molécula, atuando principalmente sobre o lado doador de elétrons do FSII (VEIGA *et al.*, 2007).

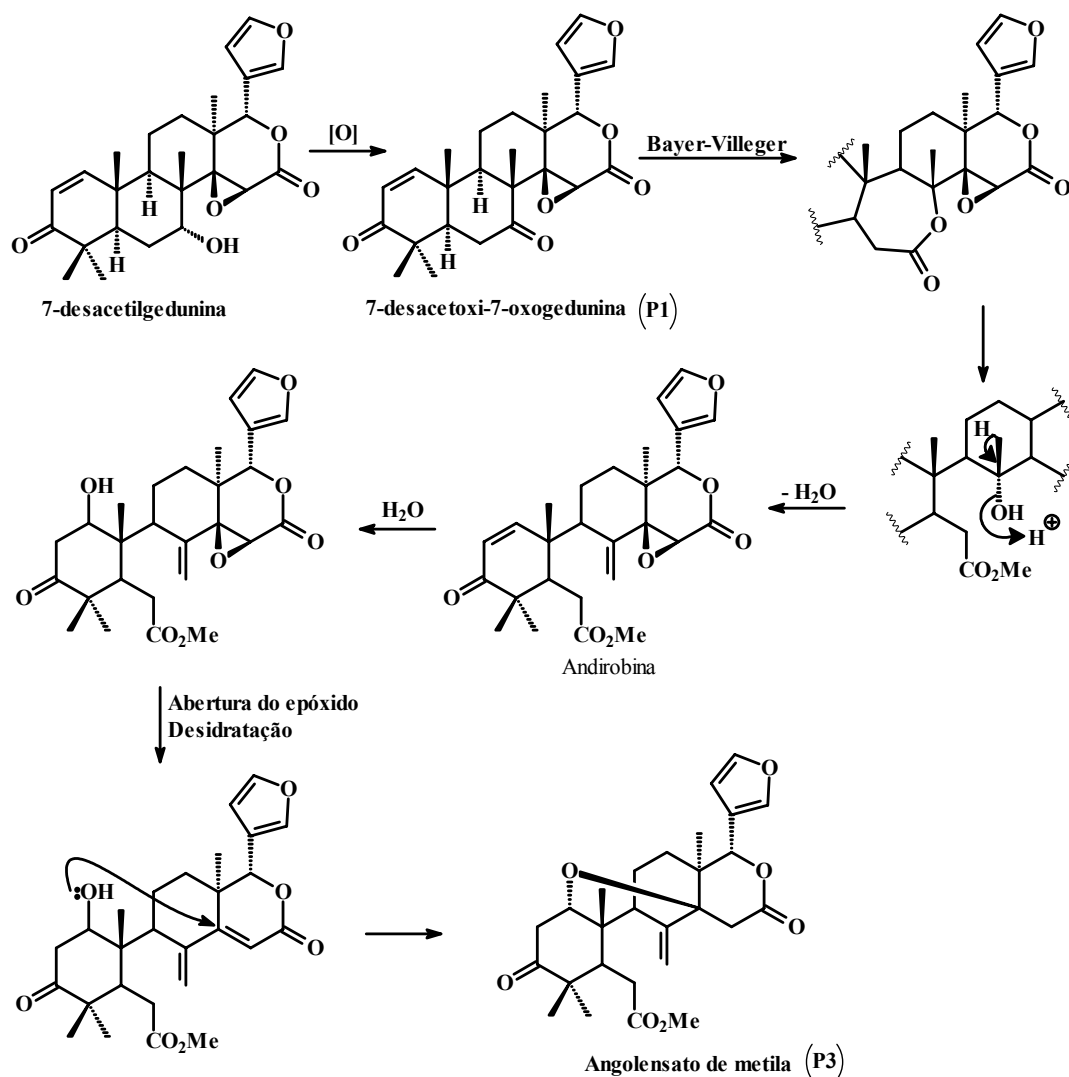
4.5 – Experimento de Biotransformação

Biotransformações são reações de compostos orgânicos realizadas pelas enzimas que se encontram na forma isolada ou no interior dos microrganismos. Estes compostos podem ser modificados através de transformações funcionais, acompanhadas ou não de degradação do esqueleto carbônico (BASTOS 2005).

As biotransformações podem empregar enzimas isoladas ou microrganismos – células integras (bactérias, fungos e leveduras). A escolha da metodologia a ser utilizada leva em conta a estabilidade do substrato, o pH do meio e a viabilidade do sistema enzimático microbiano. Sabe-se que os microrganismos são particularmente vantajosos, pois apresentam uma taxa de crescimento rápida em um sistema multienzimático de fácil formação (BASTOS 2005).

Os estudos com esteróides podem ser referidos como marco histórico nesta área, uma vez que em 1937 Mamoli e Vercellone prepararam a testosterona a partir da deidroepiandrosterona utilizando microrganismo (STOUDT 1960).

Neste trabalho, relata-se o início do estudo de biotransformação com linhagens de fungos isolados da espécie *Khaya ivorensis*, na tentativa de verificar se um deles faz alguma modificação estrutural no substrato natural dado a eles. Os substratos naturais foram isolados da espécie *Khaya ivorensis* (angolensato de metila) e da espécie *Carapa guianensis* (7-desacetoxi-7-oxogedunina). O angolensato de metila é o alvo do estudo, pois ele aparece em *Khaya ivorensis* com cancro em grande quantidade e em diferentes órgãos, enquanto na *K. ivorensis* sadia este limonóide é isolado quase como traços. Portanto, este poderia ser uma fitoalexina de resposta de *K. ivorensis* na presença do fungo. Assim, decidiu-se usar nos experimentos de biotransformação a 7-desacetoxi-7-oxo-gedunina devido ser precursor biossintético de angolensato de metila (Esquema 4.25). Isto permitiria verificar se o aumento de concentração de angolensato de metila seria uma modificação feita pelo fungo ou realmente uma fitoalexina. 7-Desacetoxi-7-oxogedunina foi isolado de *Khaya ivorensis* em pequena quantidade, porém este precipitava em extratos de *Carapa guianensis*, permitindo com que os experimentos de biotransformação fossem feitos com o limonóide desta última origem.



ESQUEMA 4.25: Proposta biossintética para a formação do angolensato de metila

4.3.1 – Biblioteca de espectros de massas de limonóides isolados de *K. ivorensis* sintomática

Antes de iniciar as análises por LC-MS, do experimento de Biotransformação achou-se necessário montar uma biblioteca dos espectros de massas dos limonóides isolados de *K. ivorensis* sintomática ao fungo *Botryosphaeria rhodina*, utilizando o espectrômetro de massas Quatro-LC da Micromass, com o objetivo de facilitar a comparação com os meios reacionais do experimento de biotransformação. A biblioteca serviu também para o estudo de fragmentação dos limonóides.

Todos os espectros de massas dos padrões foram feitos em *APCI* no modo positivo, assim como os filhos dos respectivos compostos.

Os limonóides utilizados como padrões neste trabalho foram isolados de *K. ivorensis* sintomática pela aluna de doutorado Karine Valadares Guimarães, os quais estão relatados na Tabela 4.18 (p. 162). Os espectros de massas dos limonóides, assim como as proposta de fragmentação são mostrados nas Figuras 4.90 – 4.131.

TABELA 4.18: Padrões Isolados de *Khaya ivorensis* Sintomática

Substância	Fórmula molecular	Massa molar
7-desacetoxi-7-oxogedunina (P1)	C ₂₆ H ₃₀ O ₆	438
7-desacetil gedunina (P2)	C ₂₆ H ₃₂ O ₆	440
angolensato de metila (P3)	C ₂₇ H ₃₄ O ₇	470
mexicanolídeo (P4)	C ₂₆ H ₃₂ O ₆	468
1 α ,6,8 α ,14 β ,30 β -pentahidroxi-3-oxo-[3.3.1 ^{10,2} .1 ^{1,4}]-triciclomeliac-7-oato de metila (P5)	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	534
8 β -hidroxicarapina (P6)	C ₂₇ H ₃₂ O ₈	484
2,14-epoxi-1 α ,6,8 α -triidroxi-3-oxo-[4.2.1 ^{10,30} .1 ^{1,4}]-triciclomeliac-7-oato de metila (P7)	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₀	516
1 α ,2 β ,3 α ,6,8 α ,14 β -hexahidroxi-[4.2.1 ^{10,30} .1 ^{1,4}]-triciclo-meliac-7-oato de metila (P7B)	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	536
6-hidroxiangolensato de metila (P8)	C ₂₇ H ₃₄ O ₈	486
acetato de sapelina E (P9)	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	528
23-hidroxi-20(22)-en-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (P11)	C ₂₇ H ₃₄ O ₉	502
grandifoliolenona (P12)	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	528
3-desacetilkhivorina (P13)	C ₃₀ H ₄₀ O ₉	544
21-hidroxi-20(22)-en-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (P15)	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	502

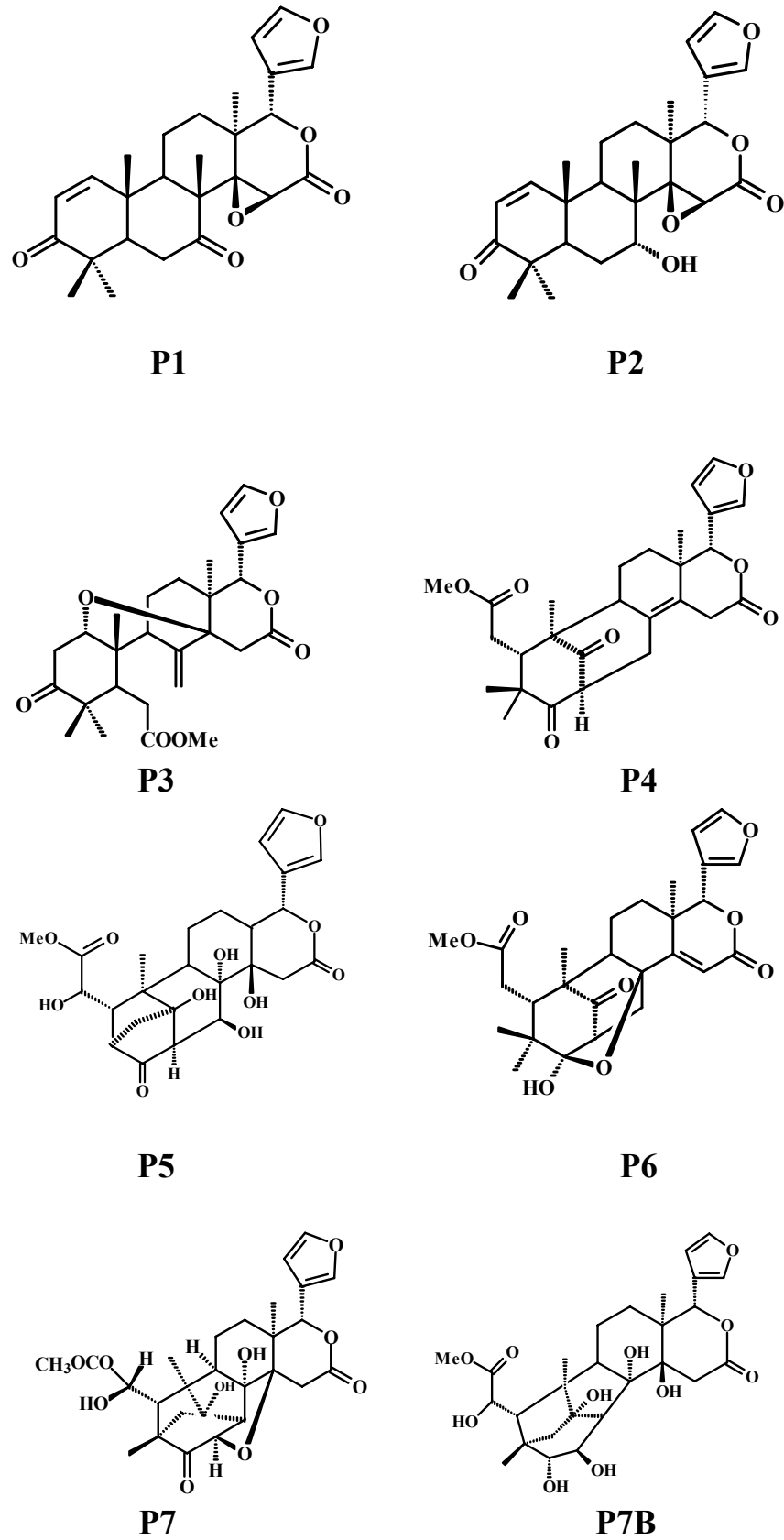


FIGURA 4.89: Limonóides utilizados como padrões para análise de seus espectros de massas

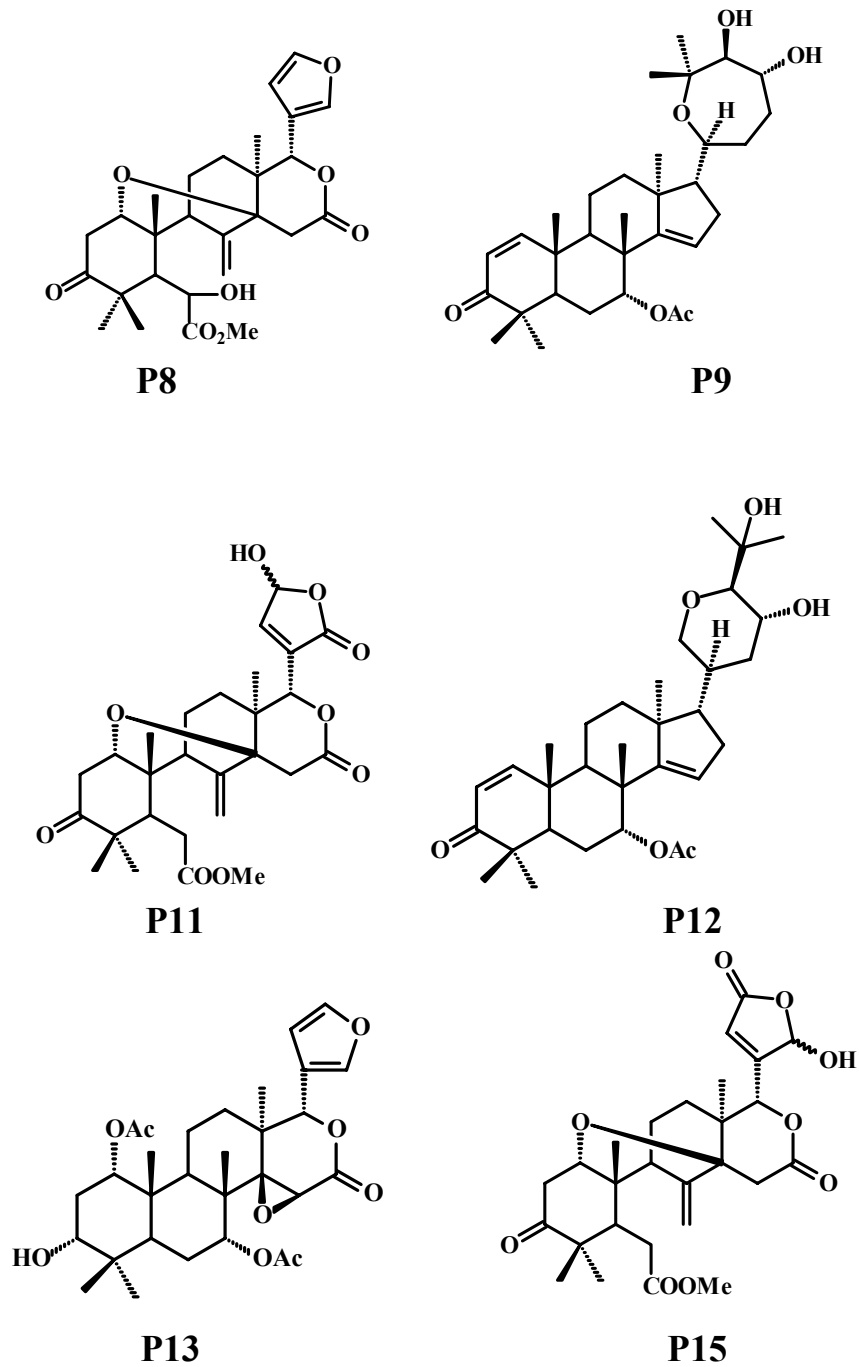


FIGURA 4.89: Limonóides utilizados como padrões para análise de seus espectros de massas (continuação)

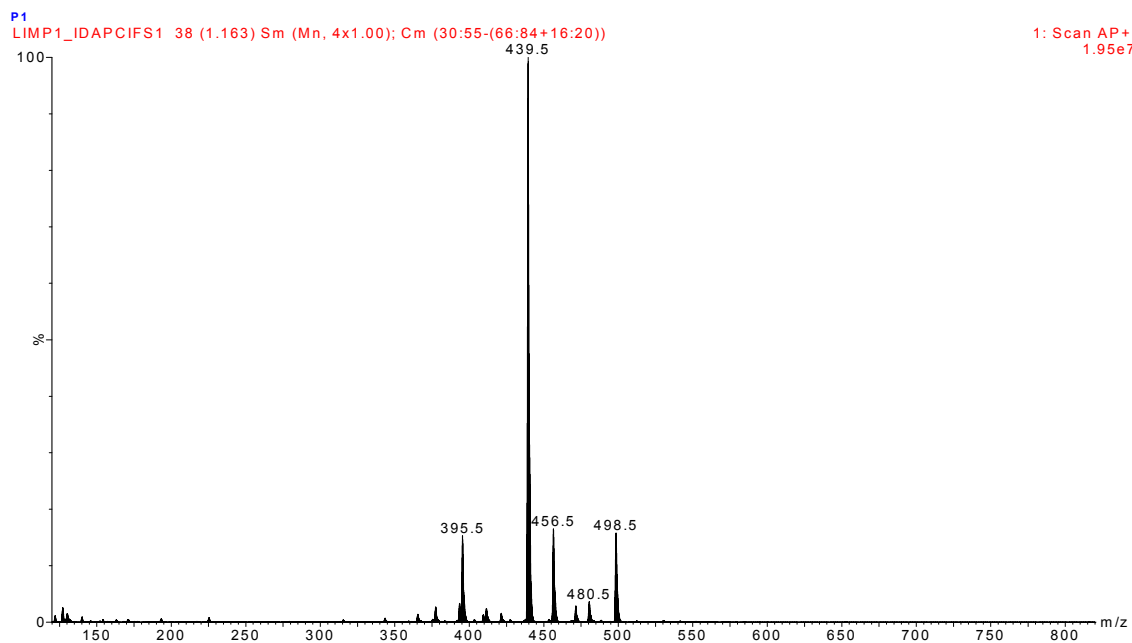


FIGURA 4.90: Espectro de massas ($APCI^+$) do 7-desacetoxi-7-oxogedunina (P1)

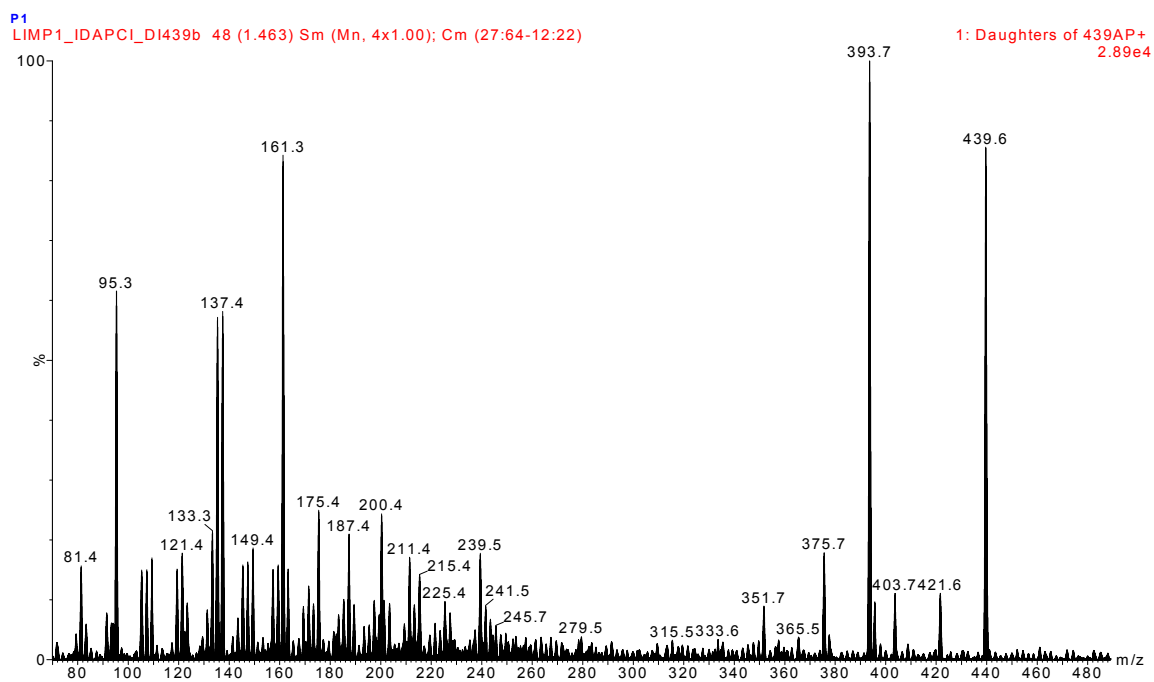


FIGURA 4.91: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filho de m/z 439 do 7-desacetoxi-7-oxogedunina (P1)

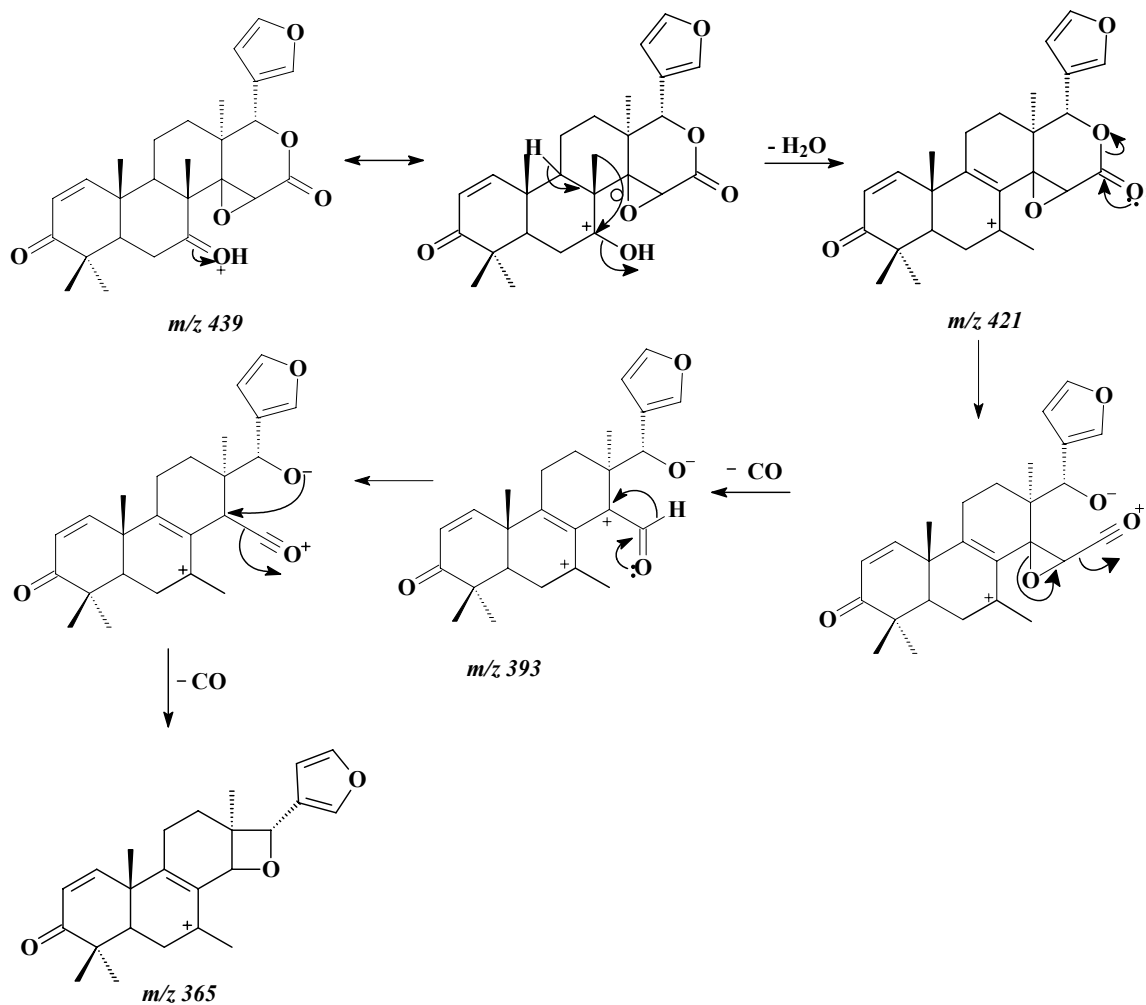


FIGURA 4.92: Proposta de fragmentação para o 7-desacetoxi-7-oxogedunina (P1)

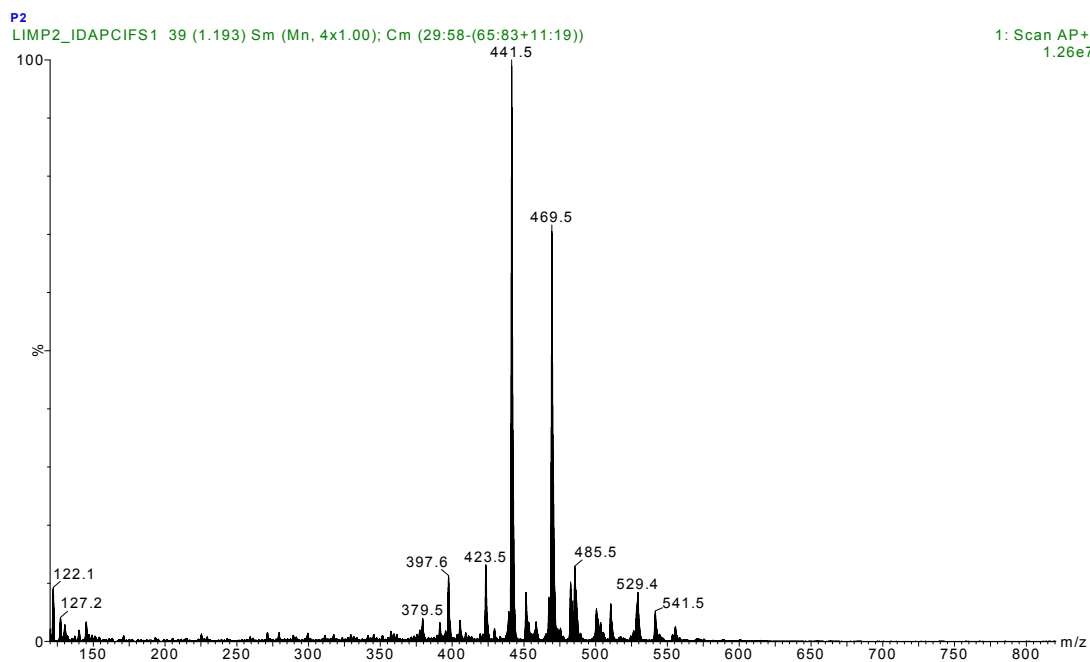


FIGURA 4.93: Espectro de massas ($APCI^+$) do 7-desacetil gedunina (P2)

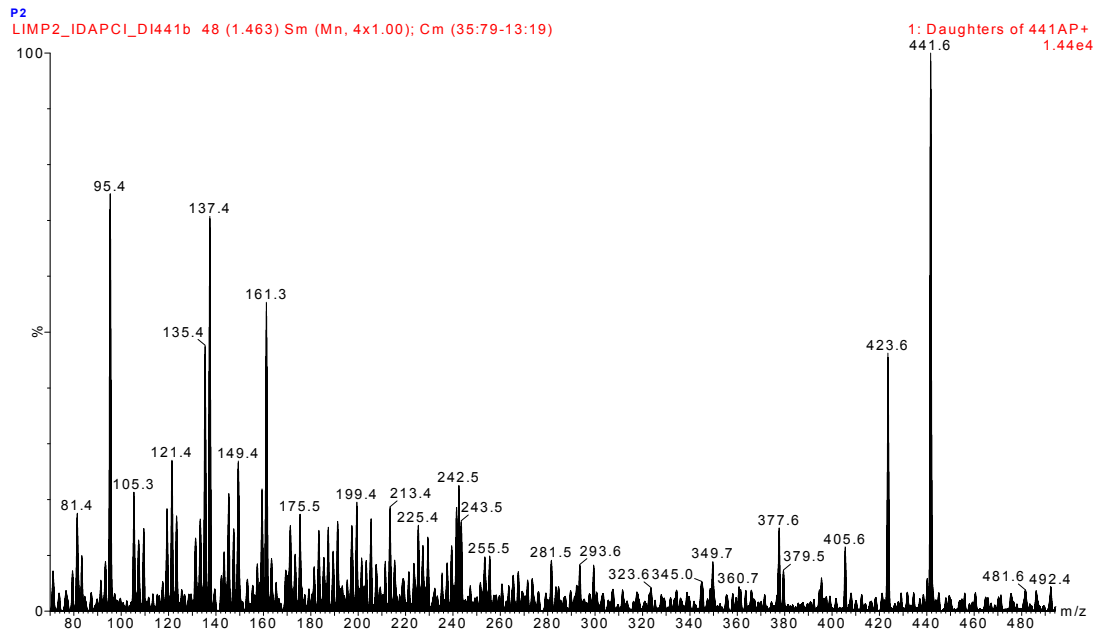


FIGURA 4.94: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 441 do 7-desacetil gedunina (P2)

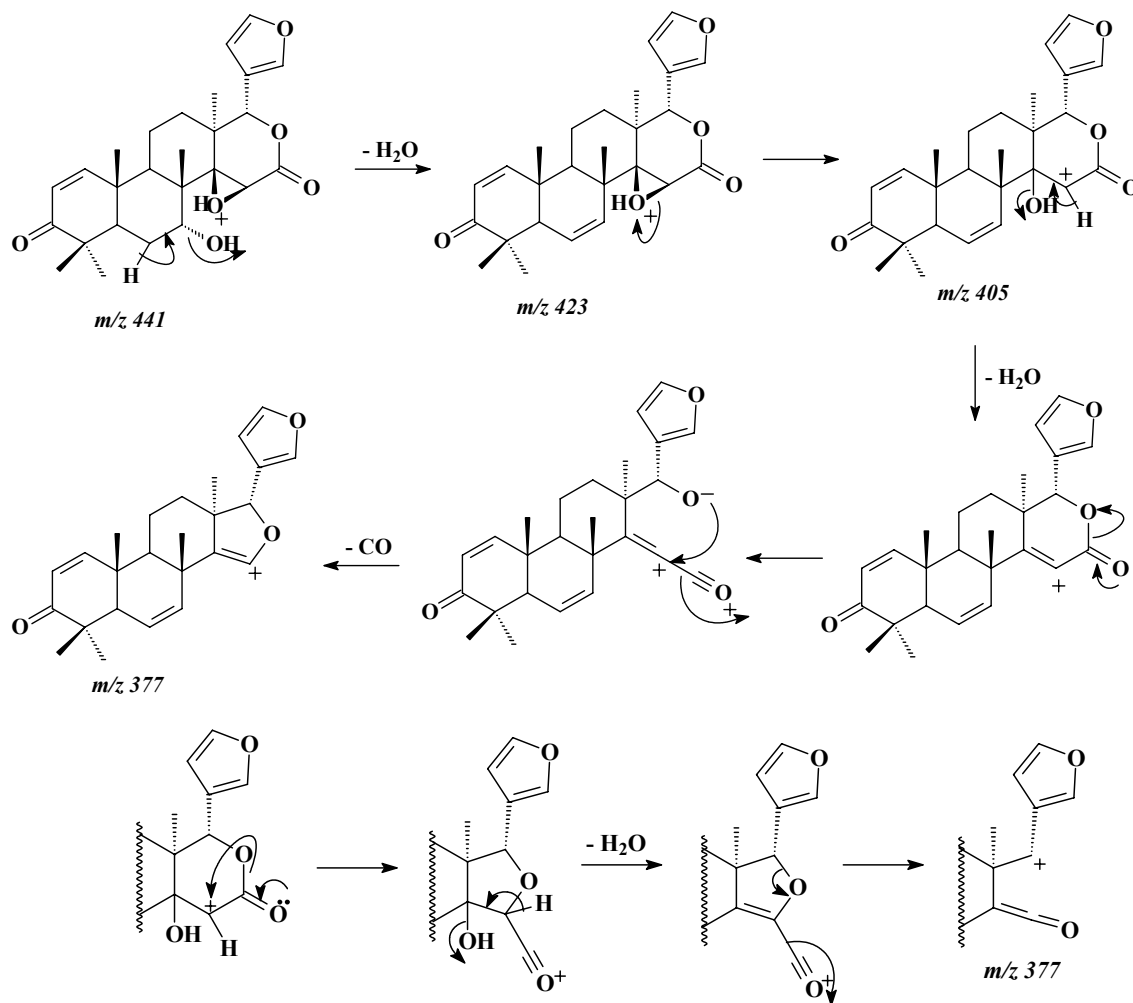


FIGURA 4.95: Proposta de fragmentação para o 7-desacetil gedunina (P2)

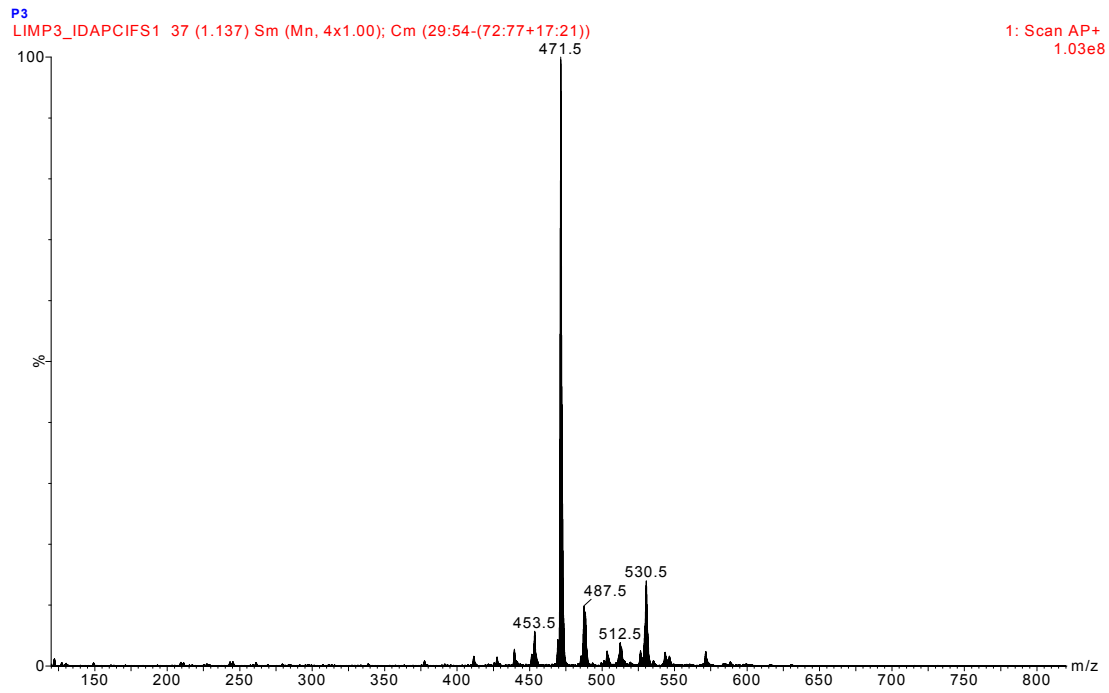


FIGURA 4.96: Espectro de massas ($APCI^+$) do angolensato de metila (**P3**)

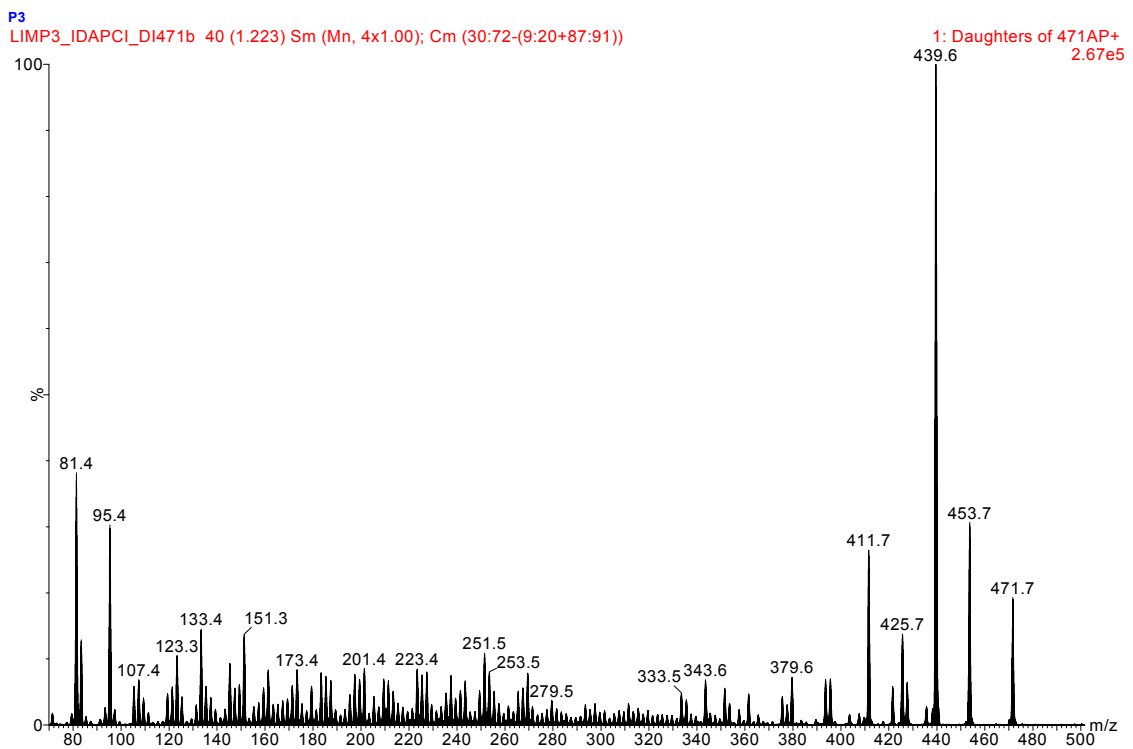


FIGURA 4.97: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 471 do angolensato de metila (**P3**)

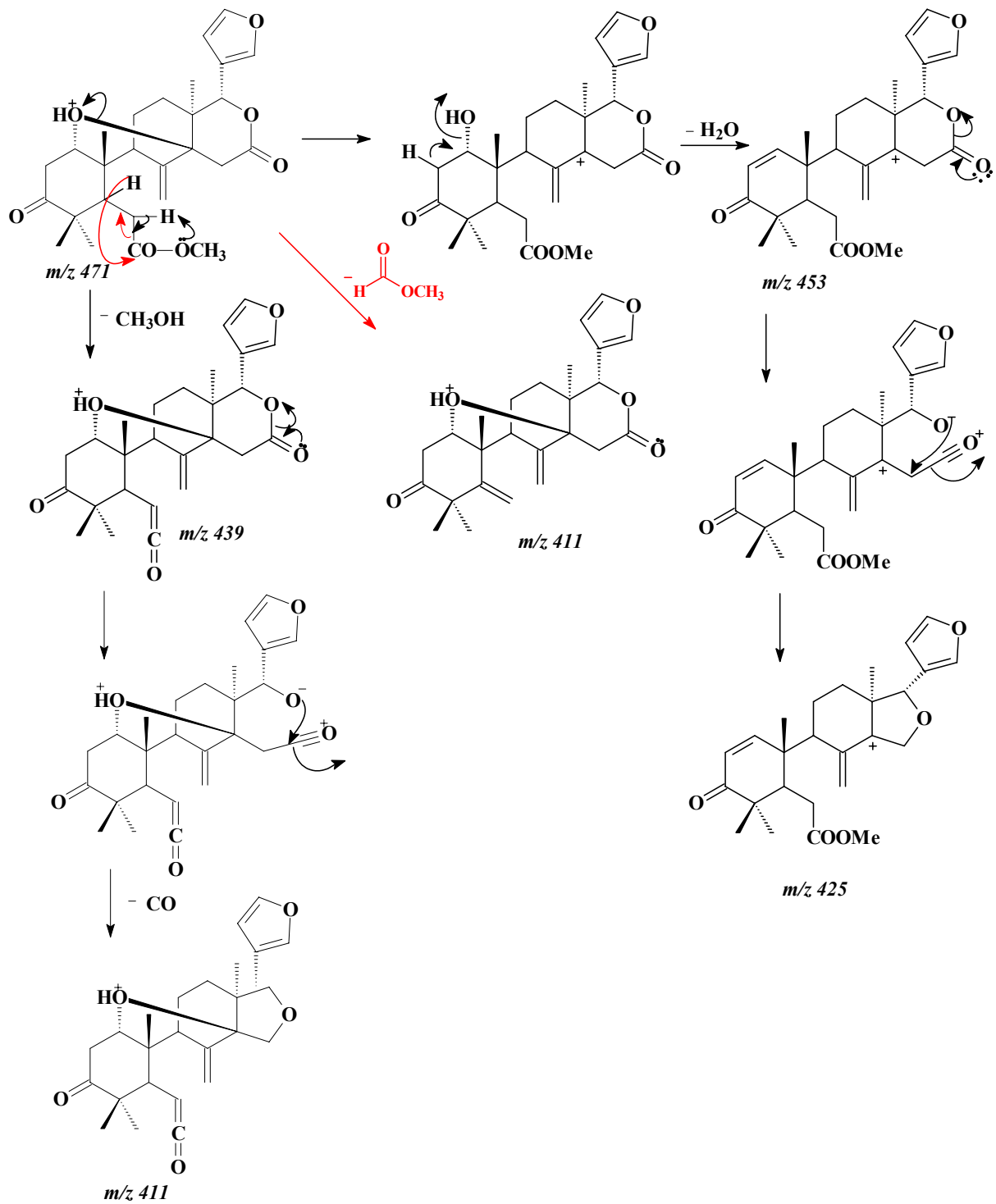


FIGURA 4.98: Proposta de fragmentação para o angolensato de metila (P3)

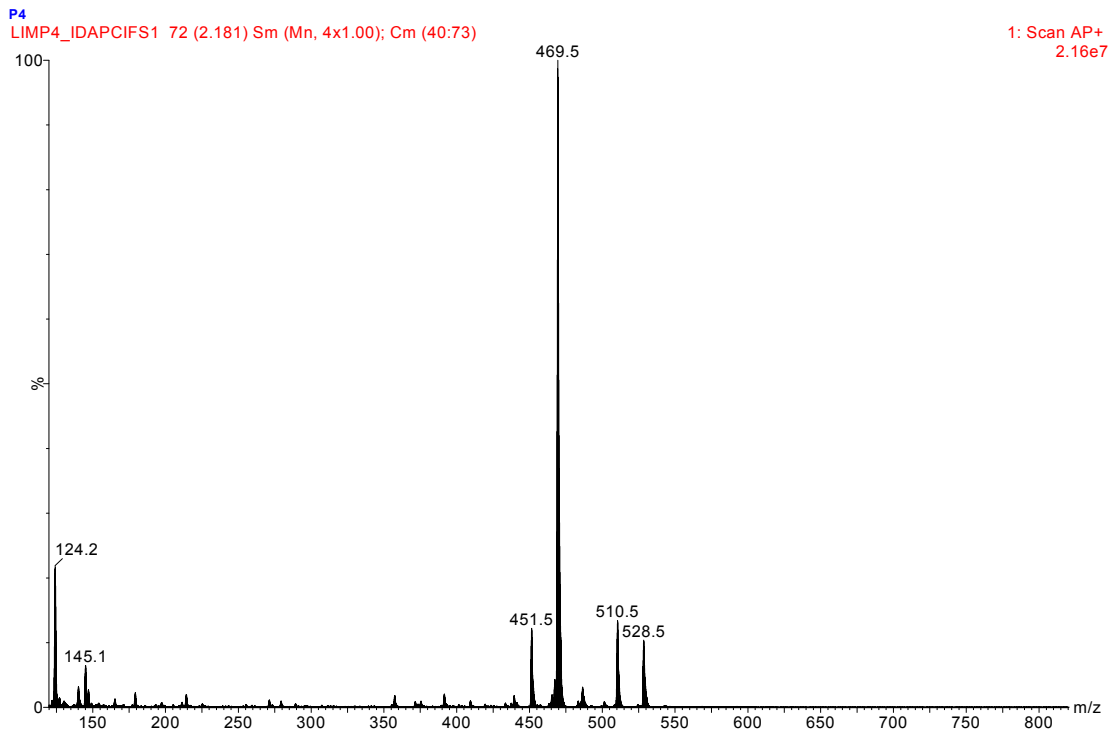


FIGURA 4.99: Espectro de massas ($APCI^+$) do mexicanolídeo (P4)

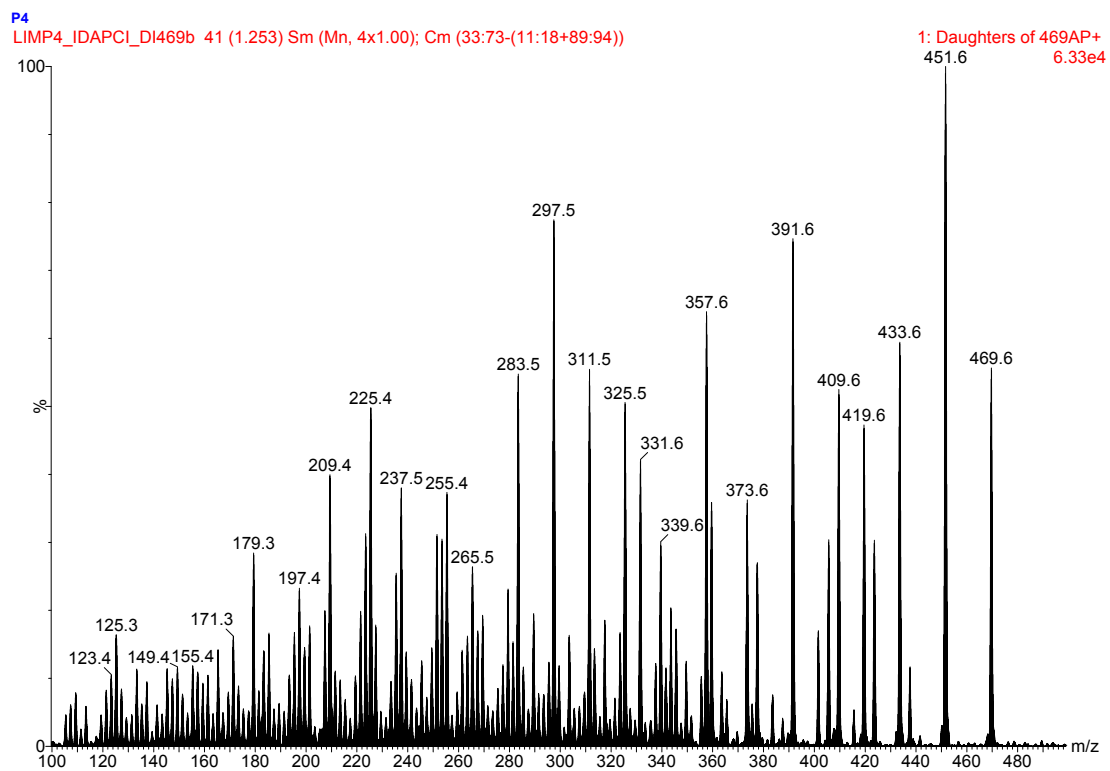


FIGURA 4.100: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 469 do mexicanolídeo (P4)

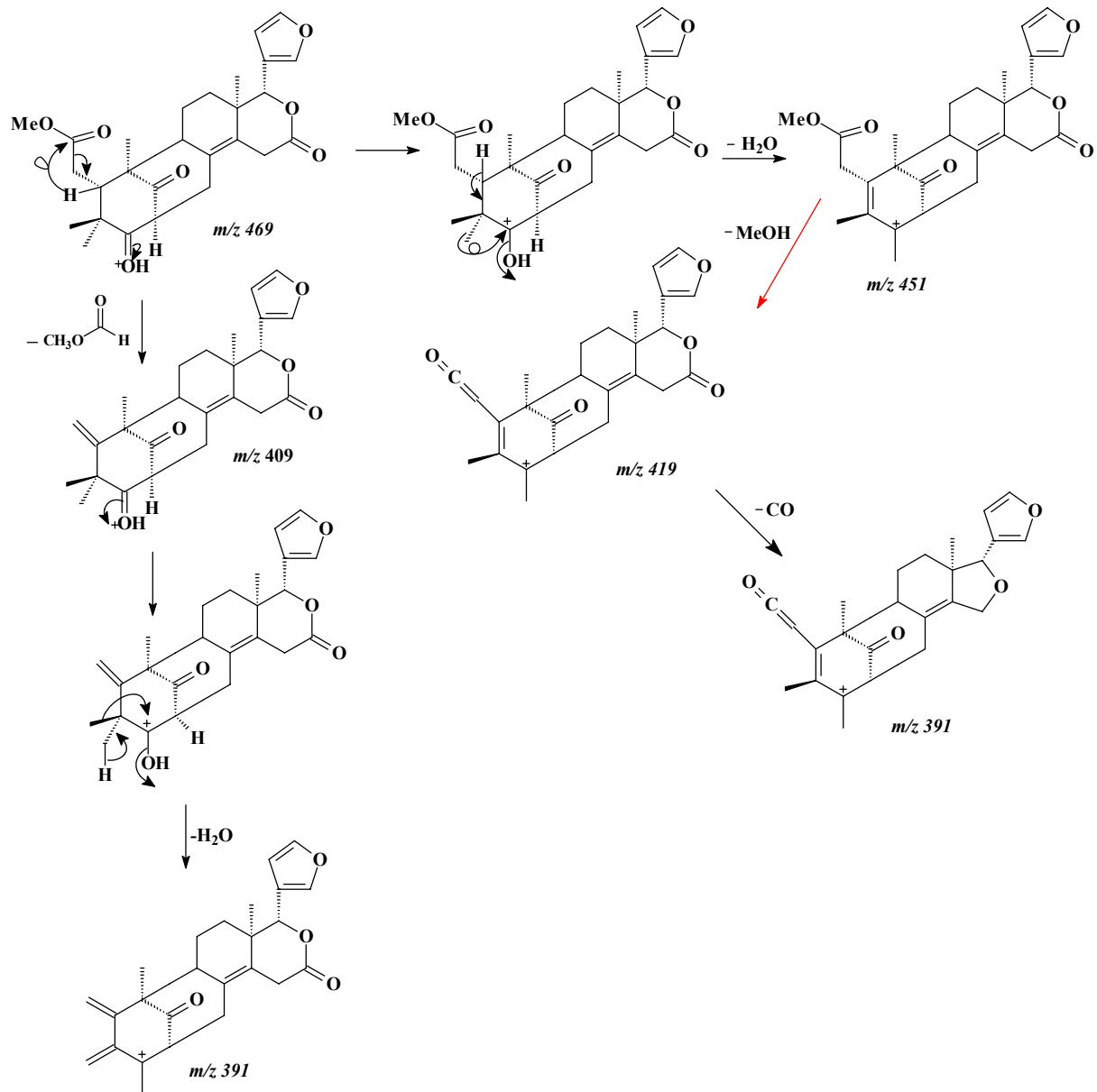


FIGURA 4.101: Proposta de fragmentação para o mexicanólídeo (P4)

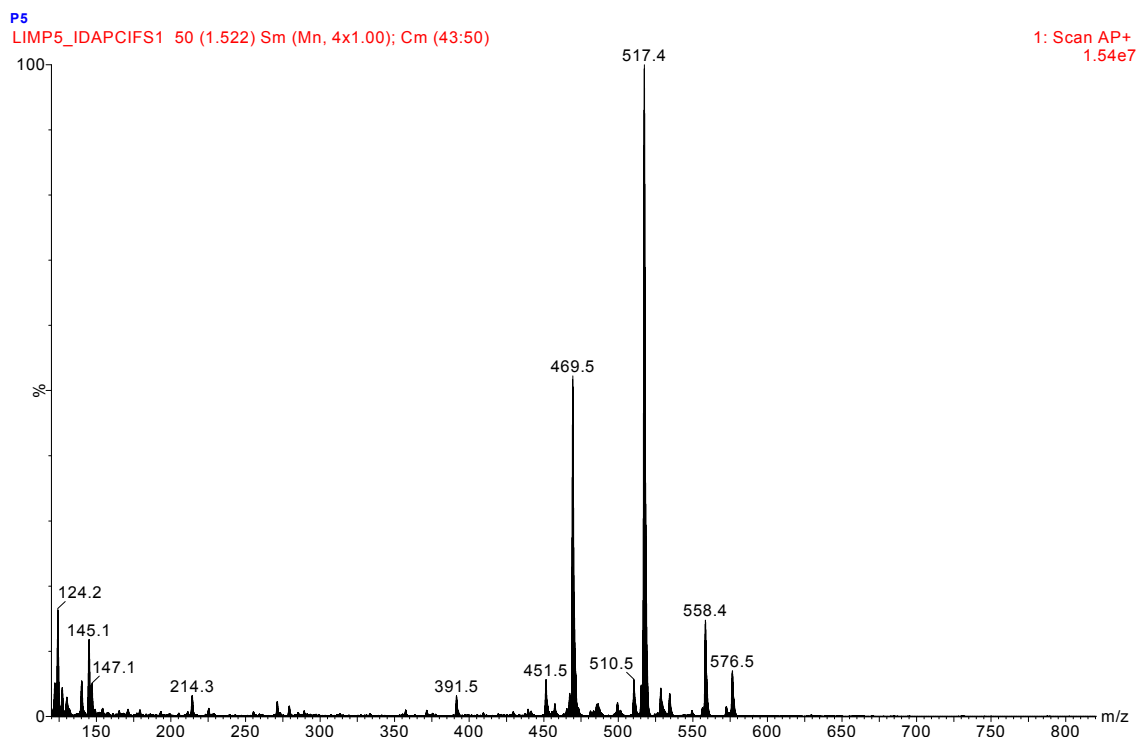


FIGURA 4.102: Espectro de massas ($APCI^+$) do 1 α ,6,8 α ,14 β ,30 β -pentahidroxi-3-oxo-[3.3.1^{10,2}.1^{1,4}]-triciclomeliac-7-oato de metila (**P5**)

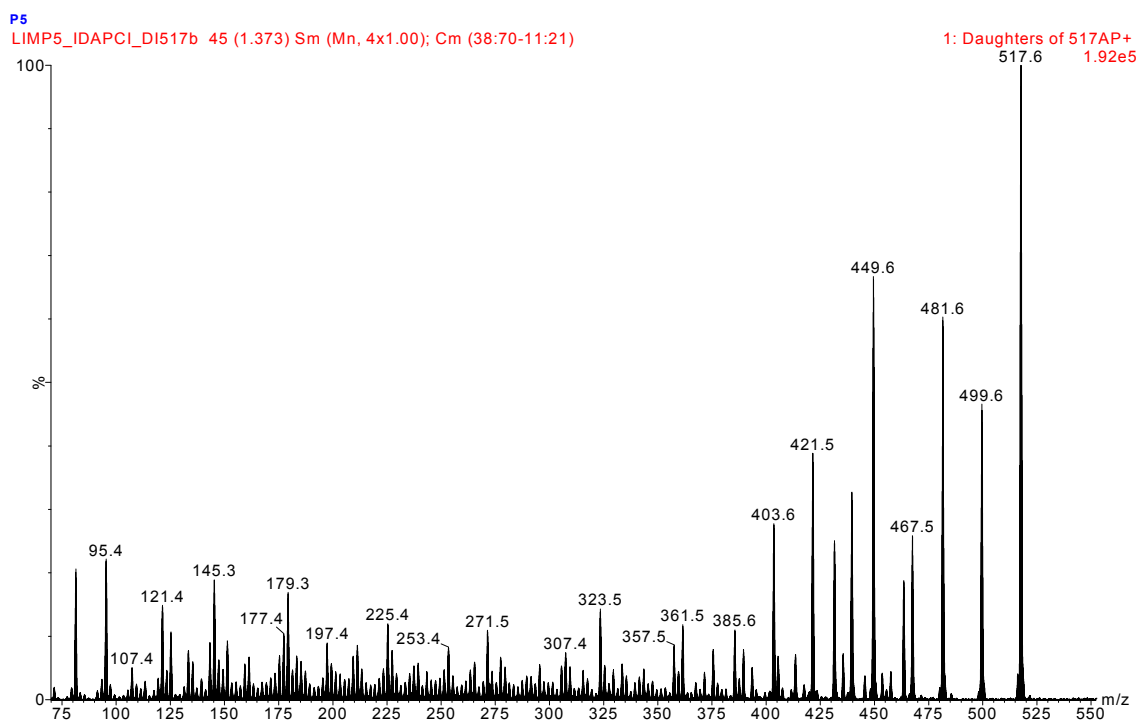


FIGURA 4.103: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 517 [$M-H_2O$] do 1 α ,6,8 α ,14 β ,30 β -pentahidroxi-3-oxo-[3.3.1^{10,2}.1^{1,4}]-triciclomeliac-7-oato de metila (**P5**)

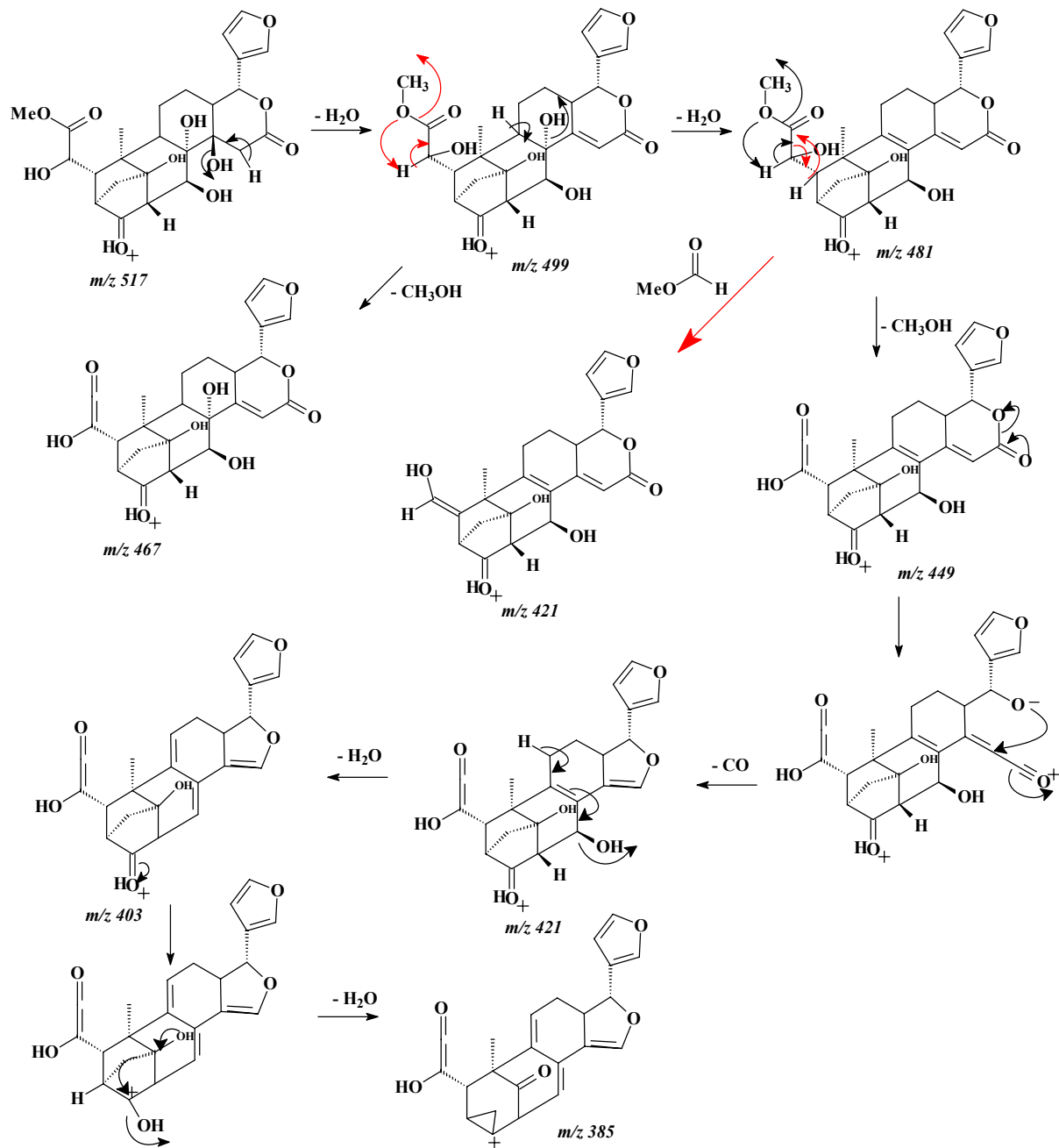


FIGURA 4.104: Proposta de fragmentação para o 1 α ,6,8 α ,14 β ,30 β -pentahidroxi-3-oxo-[3.3.1^{10,2}.1^{1,4}]-tricyclomeliac-7-oato de metila (P5)

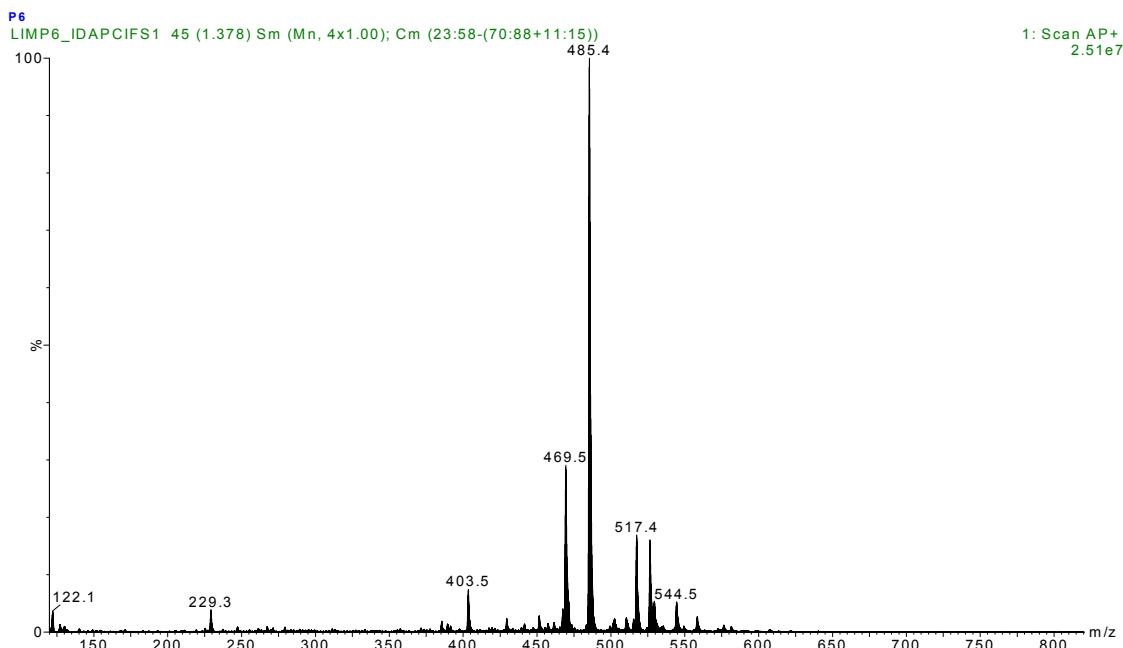


FIGURA 4.105: Espectro de massas (APCI⁺) do 8β-hidroxicarapina 3,8-hemiacetal (P6)

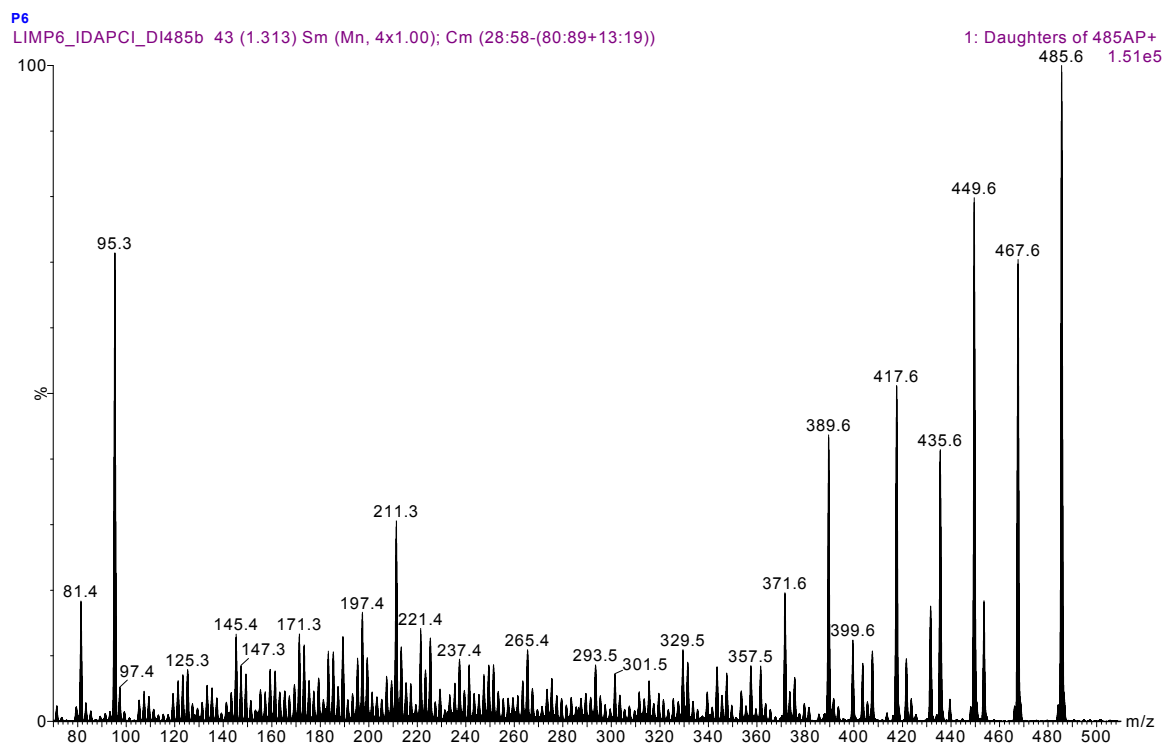


FIGURA 4.106: Espectro de massas (APCI⁺), íons filhos de m/z 485 do 8β-hidroxicarapina 3,8-hemiacetal (P6)

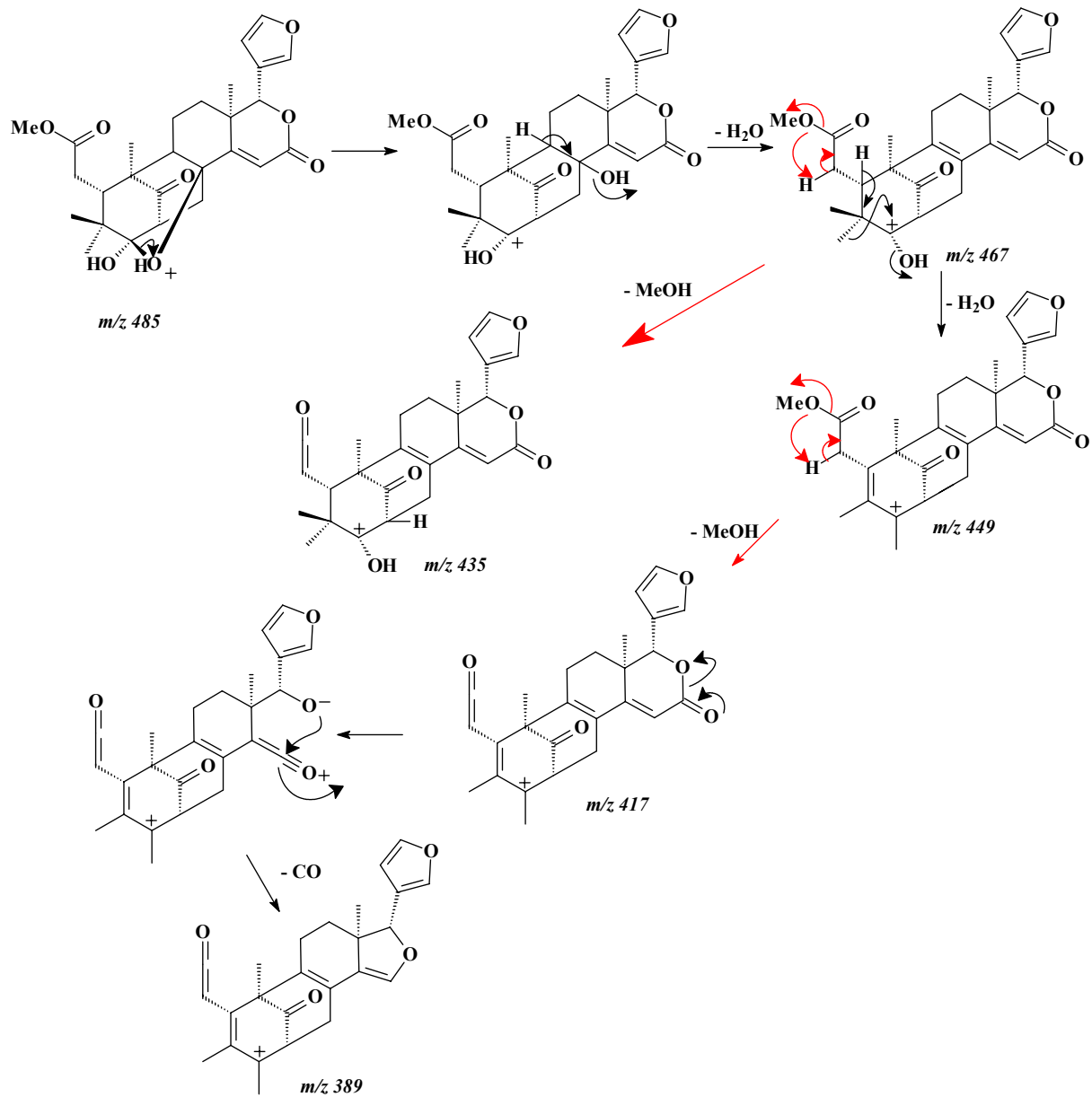


FIGURA 4.107: Proposta de fragmentação para o 8β-hidroxycarapina 3,8-hemiacetal (P6)

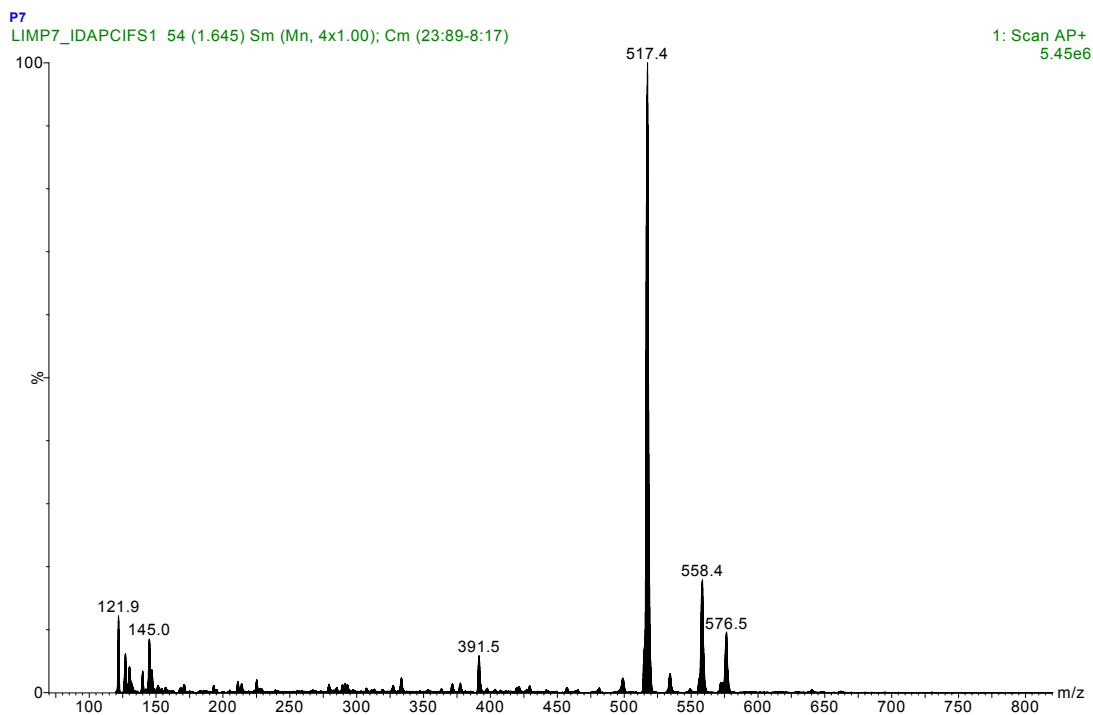


FIGURA 4.108: Espectro de massas ($APCI^+$) do 2,14-epoxi-1 α ,6,8 α -triidroxi-3-oxo-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-triciclomeliac-7-oato de metila (P7)

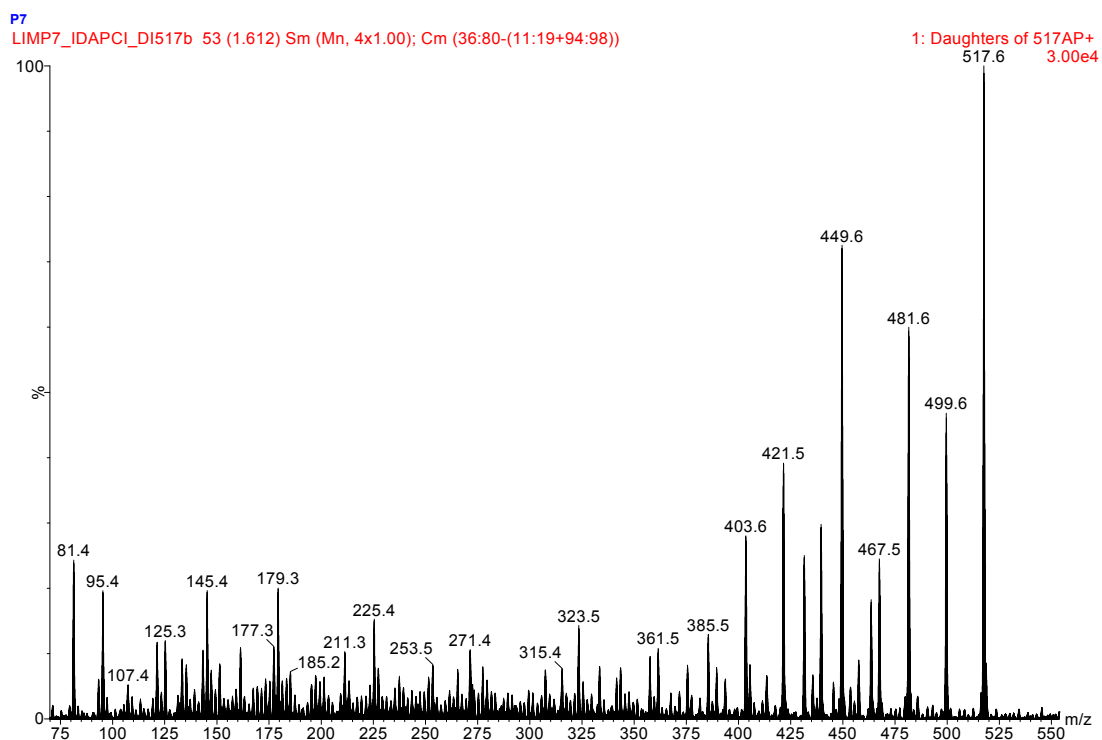


FIGURA 4.109: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 517 do 2,14-epoxi-1 α ,6,8 α -triidroxi-3-oxo-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-triciclomeliac-7-oato de metila (P7)

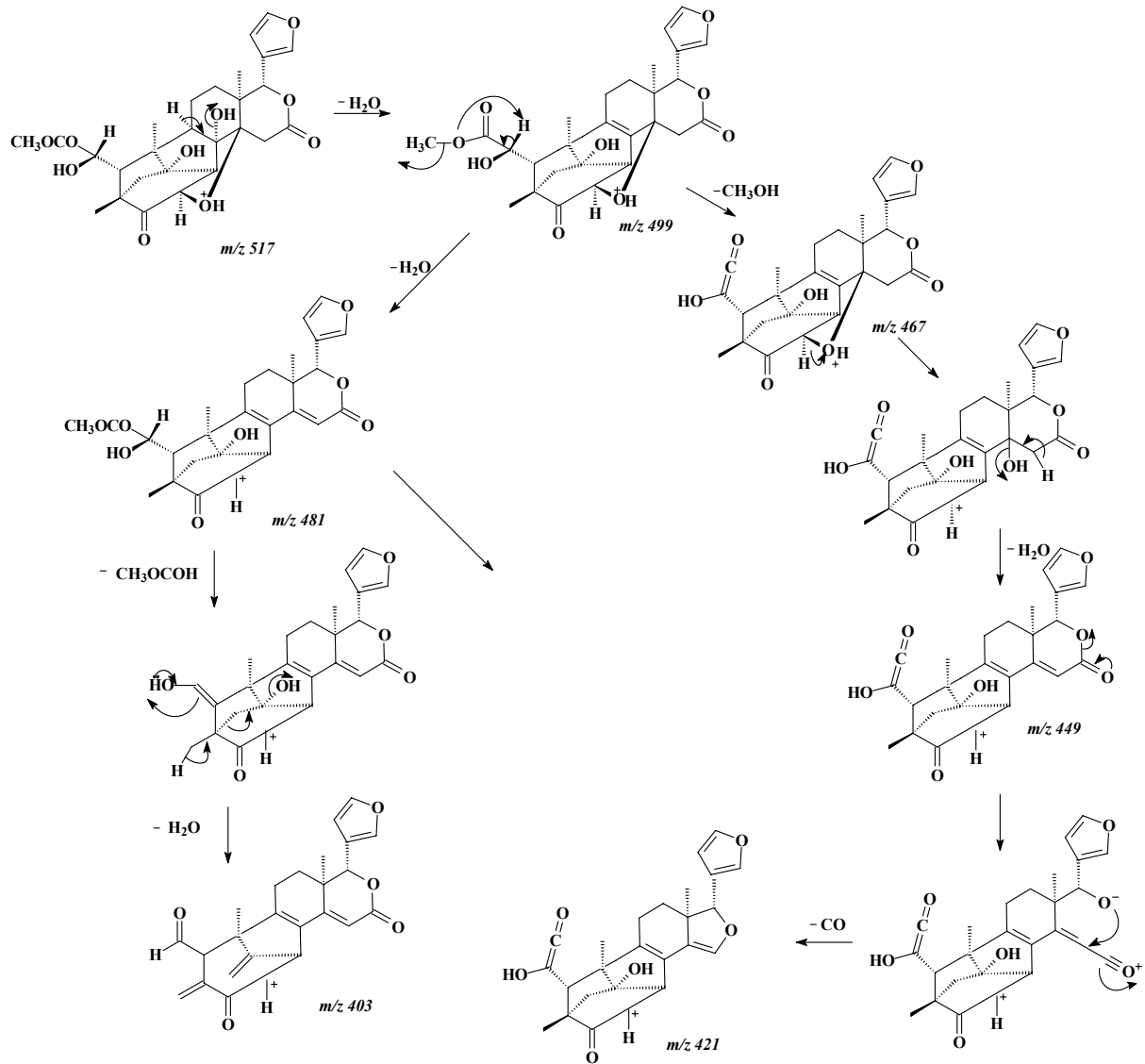


FIGURA 4.110: Proposta de fragmentação para o 2,14-epoxi-1 α ,6,8 α -trihidroxi-3-oxo-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-tricyclomeliac-7-oato de metila (P7)

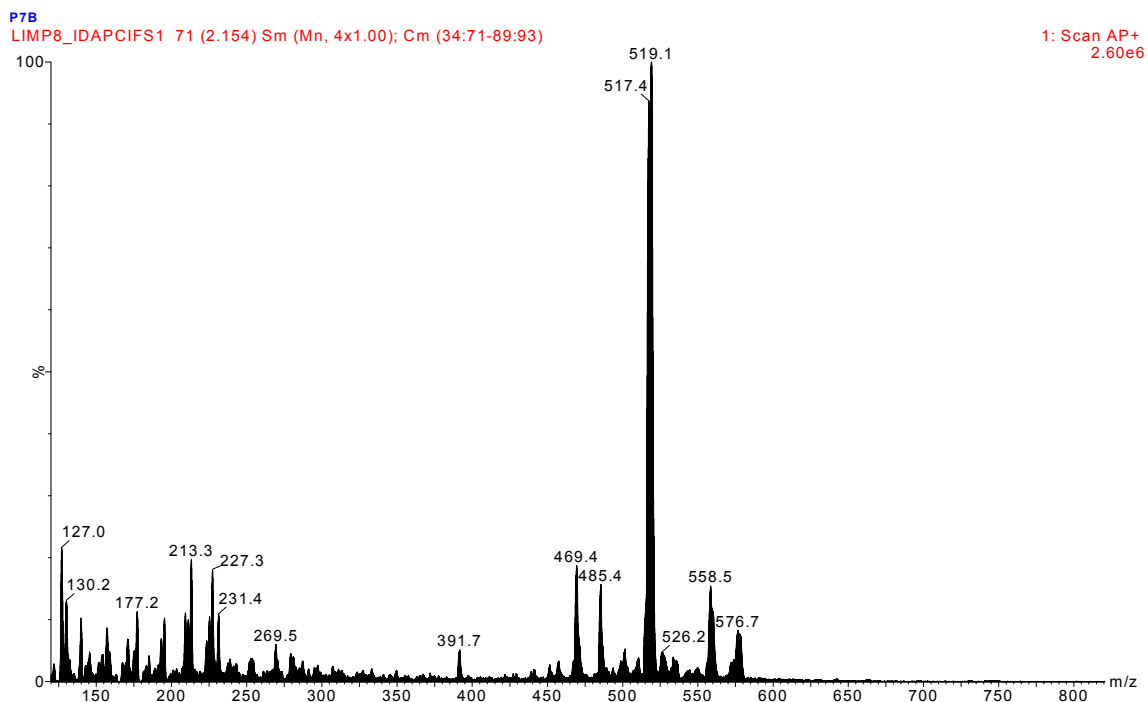


FIGURA 4.111: Espectro de massas ($APCI^+$) do $1\alpha,2\beta,3\alpha,6,8\alpha,14\beta$ -hexahidroxi-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-tríciclo-meliac-7-oato de metila (P7B)

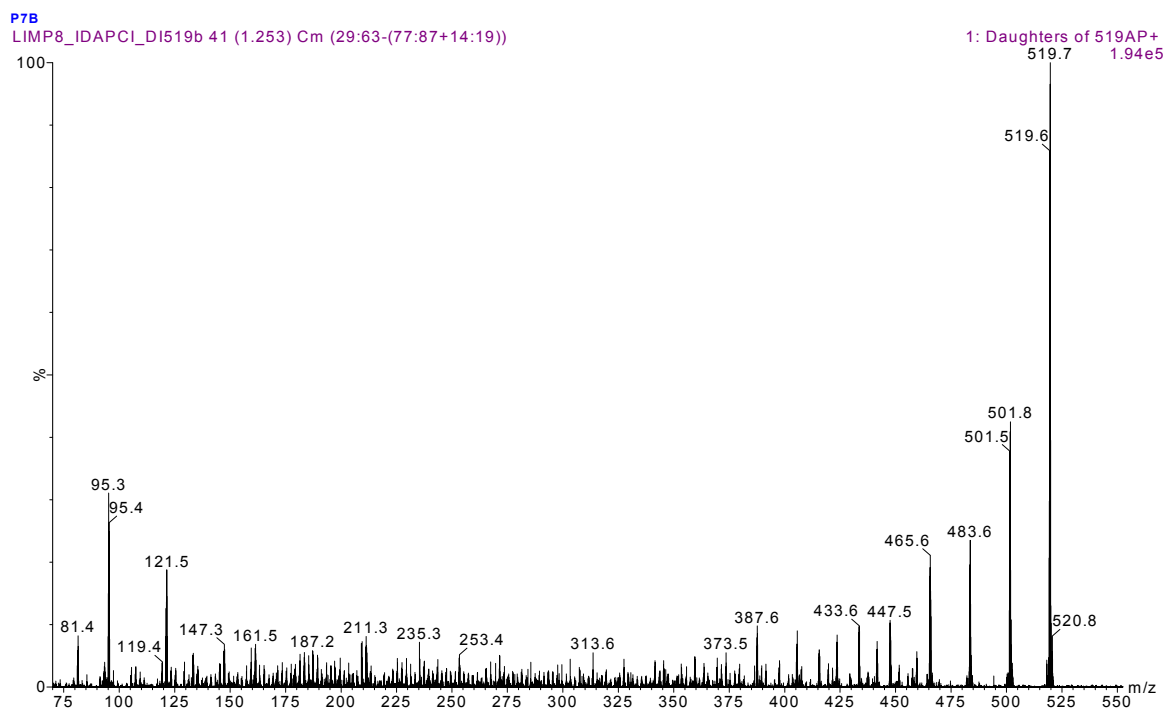


FIGURA 4.112: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 519 [$M-H_2O$] do $1\alpha,2\beta,3\alpha,6,8\alpha,14\beta$ -hexahidroxi-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-tríciclo-meliac-7-oato de metila (P7B)

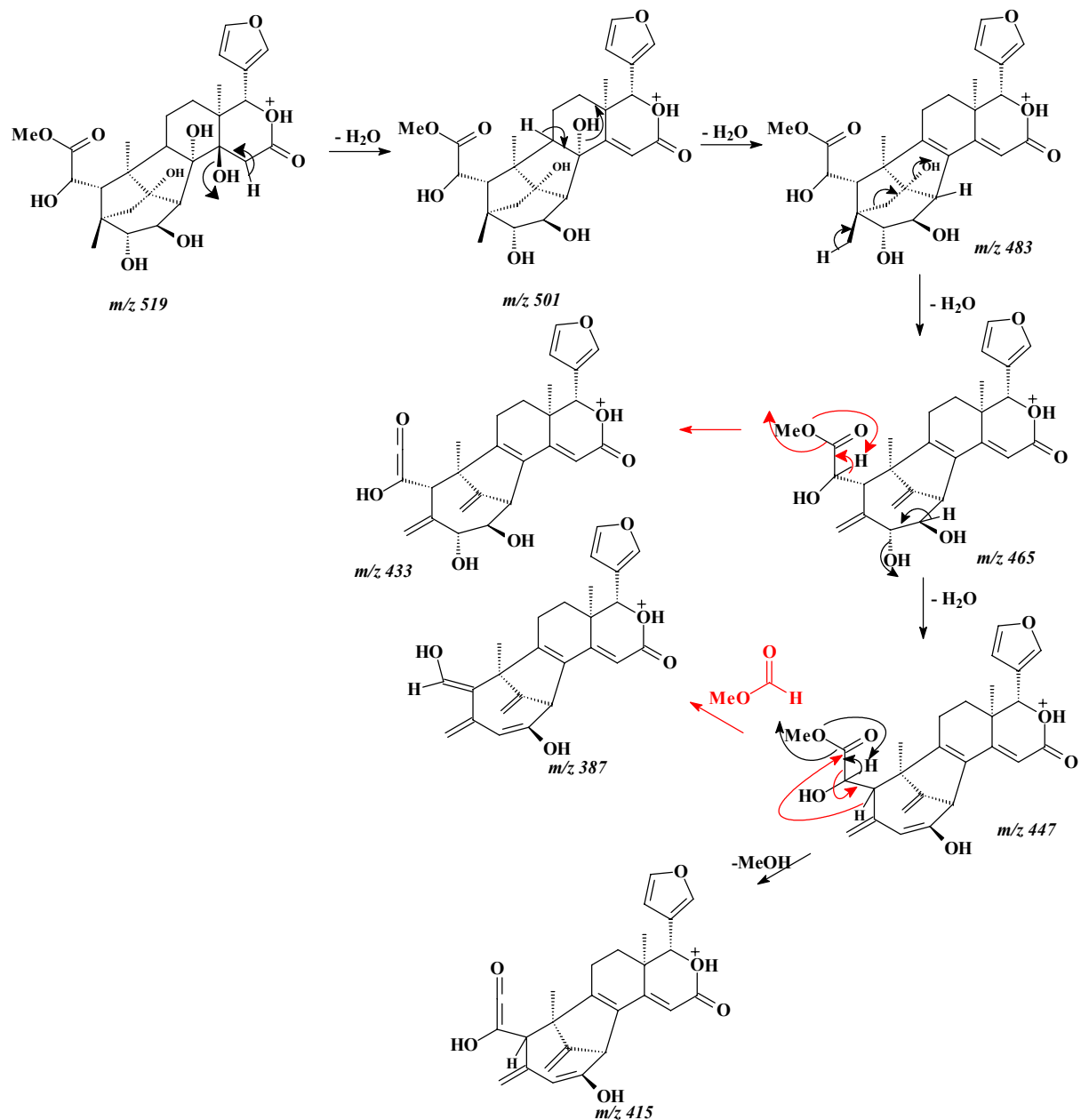


FIGURA 4.113: Proposta de fragmentação para o $1\alpha,2\beta,3\alpha,6,8\alpha,14\beta$ -hexahidroxi-[4.2.1^{10,30}.1^{1,4}]-tríciclo-meliac-7-oato de metila (P7B)

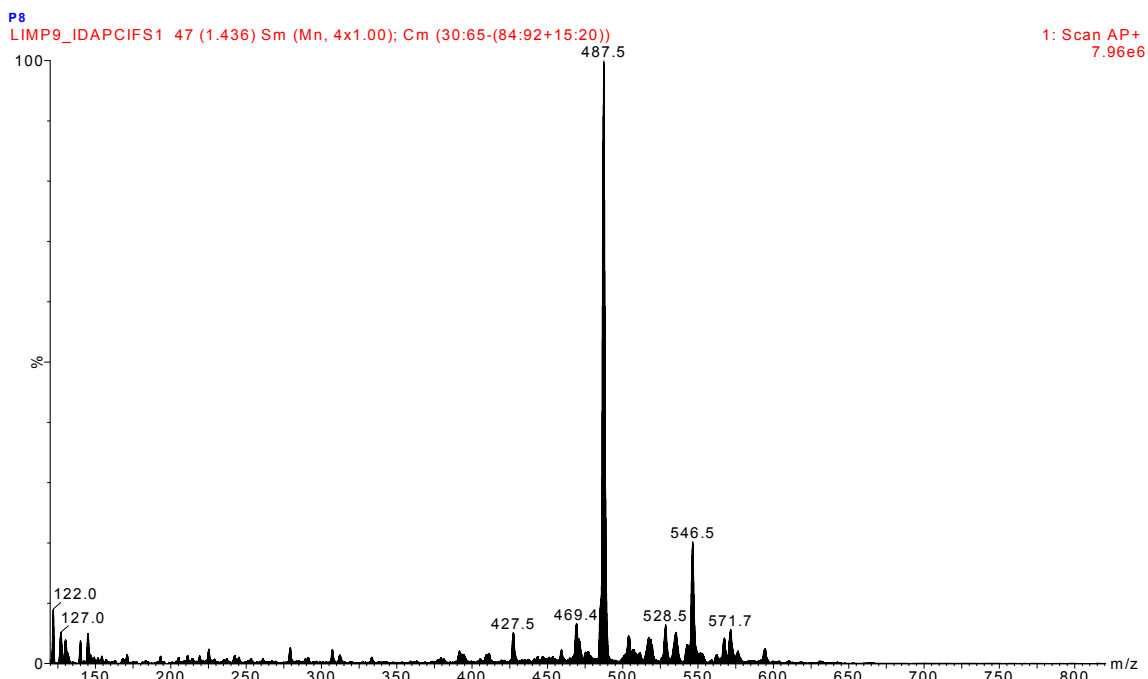


FIGURA 4.114: Espectro de massas ($APCI^+$) do 6-hidroxiangolensato de metila (P8)

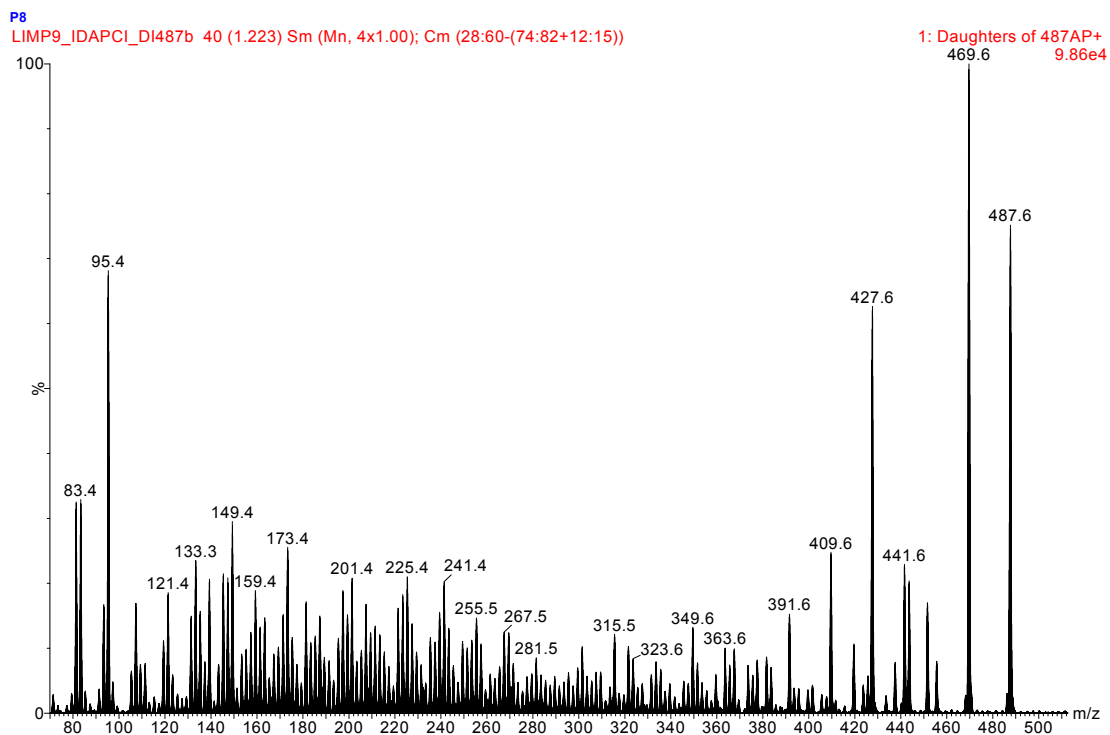


FIGURA 4.115: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 487 do 6-hidroxiangolensato de metila (P8)

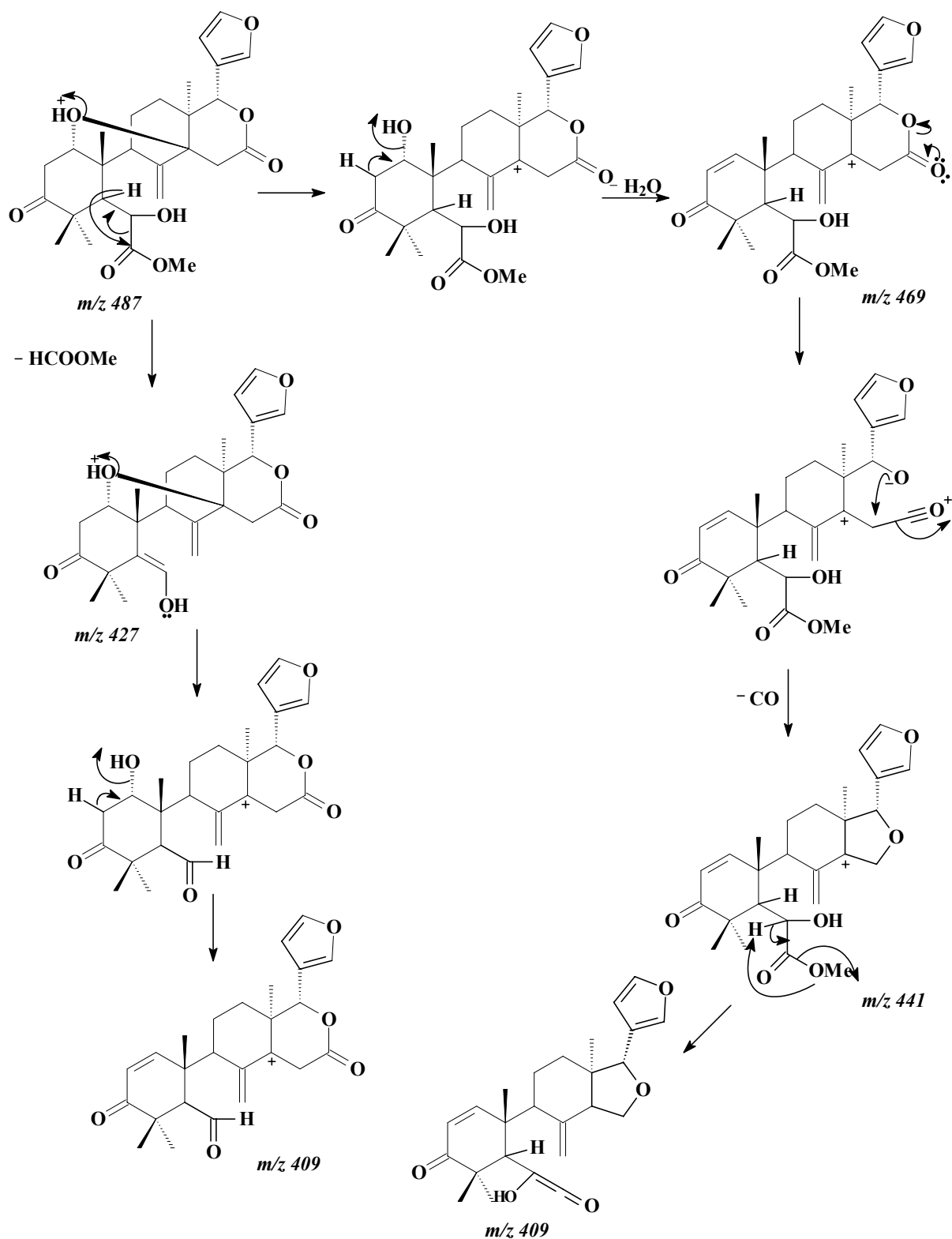


FIGURA 4.116: Proposta de fragmentação para o 6-hidroxiangolensato de metila (P8)

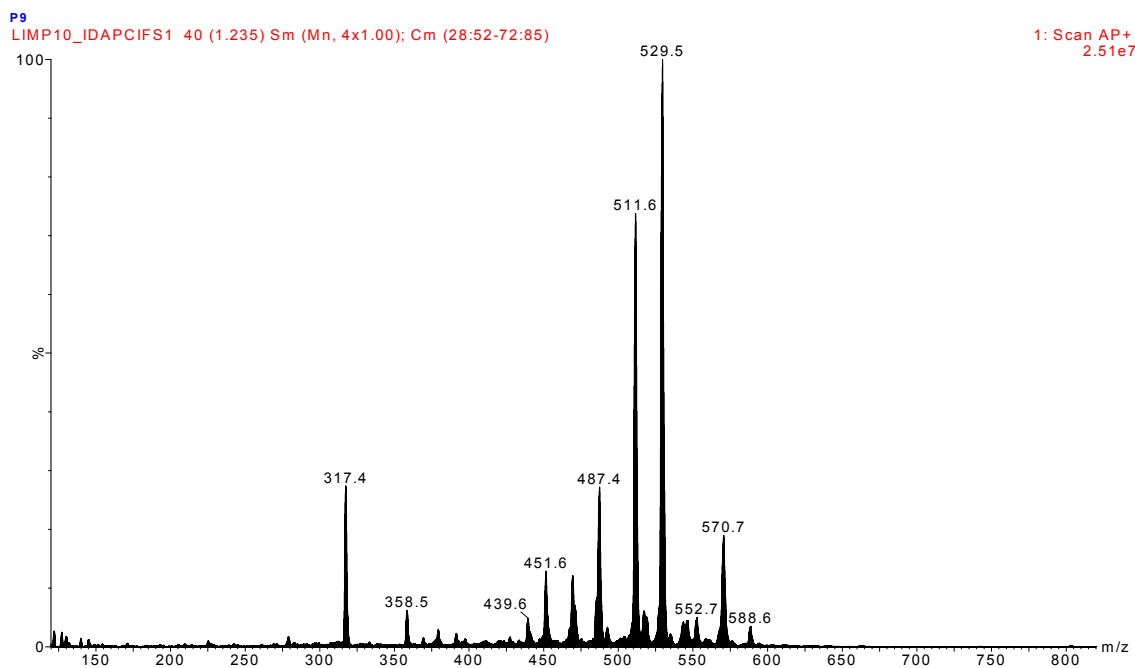


FIGURA 4.117: Espectro de massas ($APCI^+$) do acetato de sapelina E (P9)

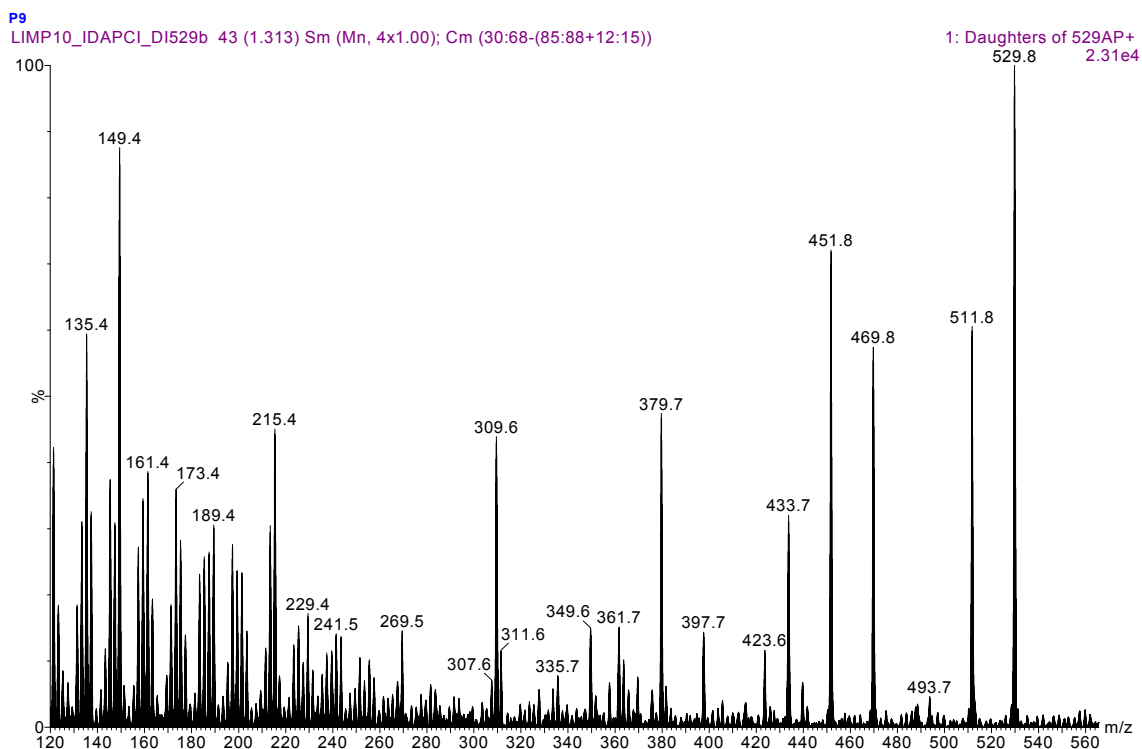


FIGURA 4.118: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 529 do acetato de sapelina E (P9)

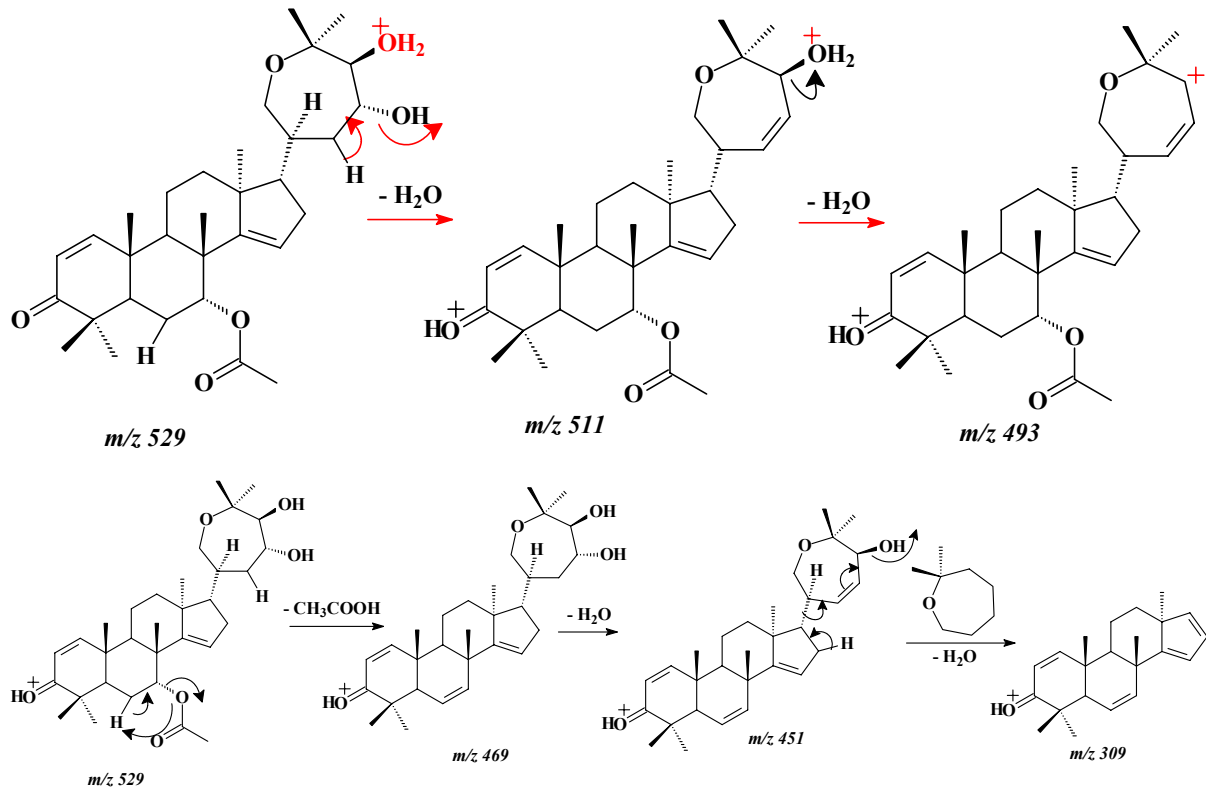


FIGURA 4.119: Proposta de fragmentação para o acetato de sapelina E (P9)

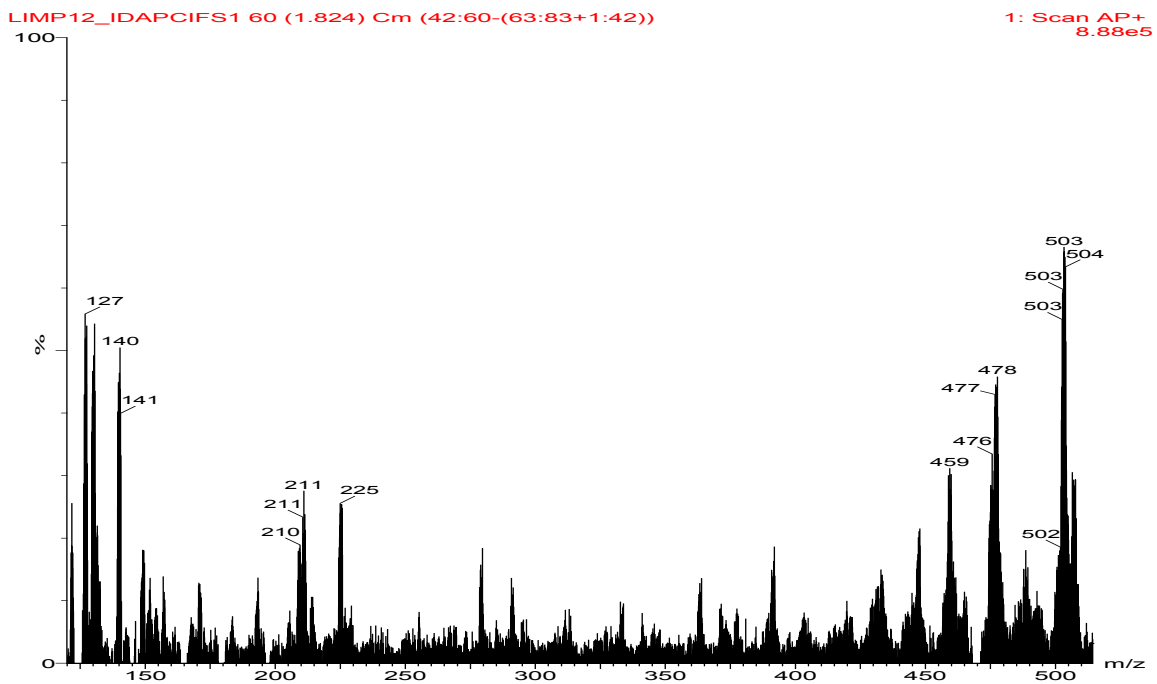


FIGURA 4.120: Espectro de massas (APCI⁺) 23-hidroxi-20(22)-em-21,23-γ-lactona-angolensato de metila (P11)

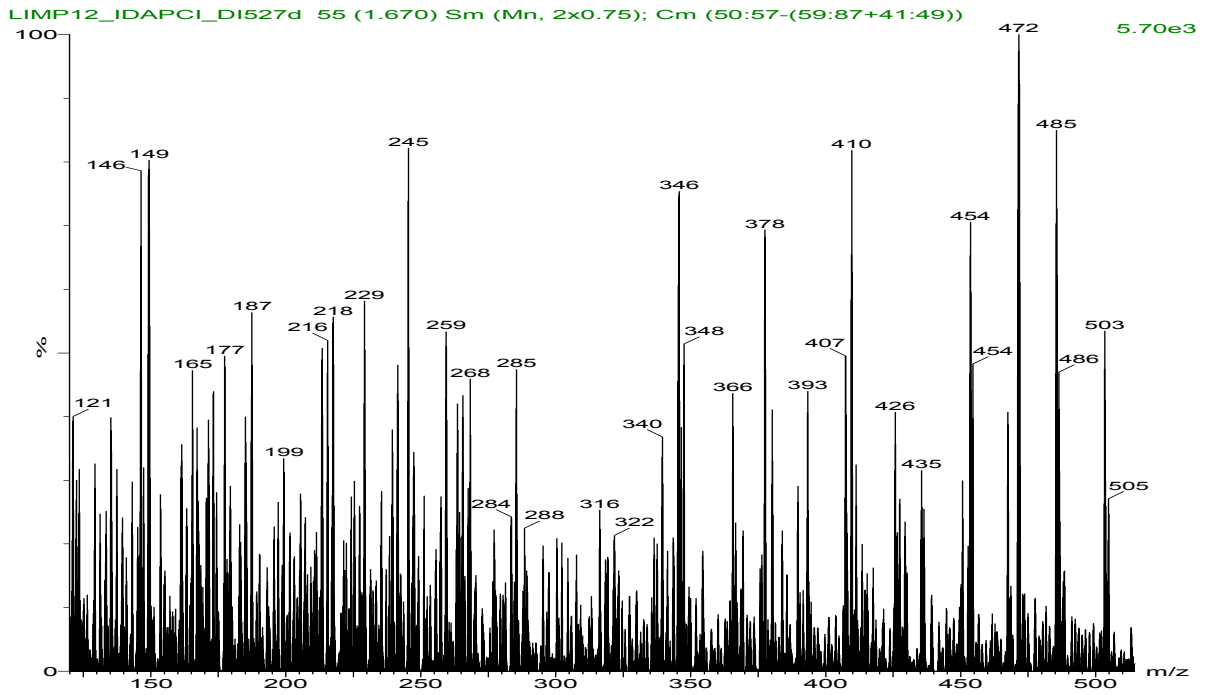


FIGURA 4.121: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 503 do 23-hidroxi-20(22)-em-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (**P11**)

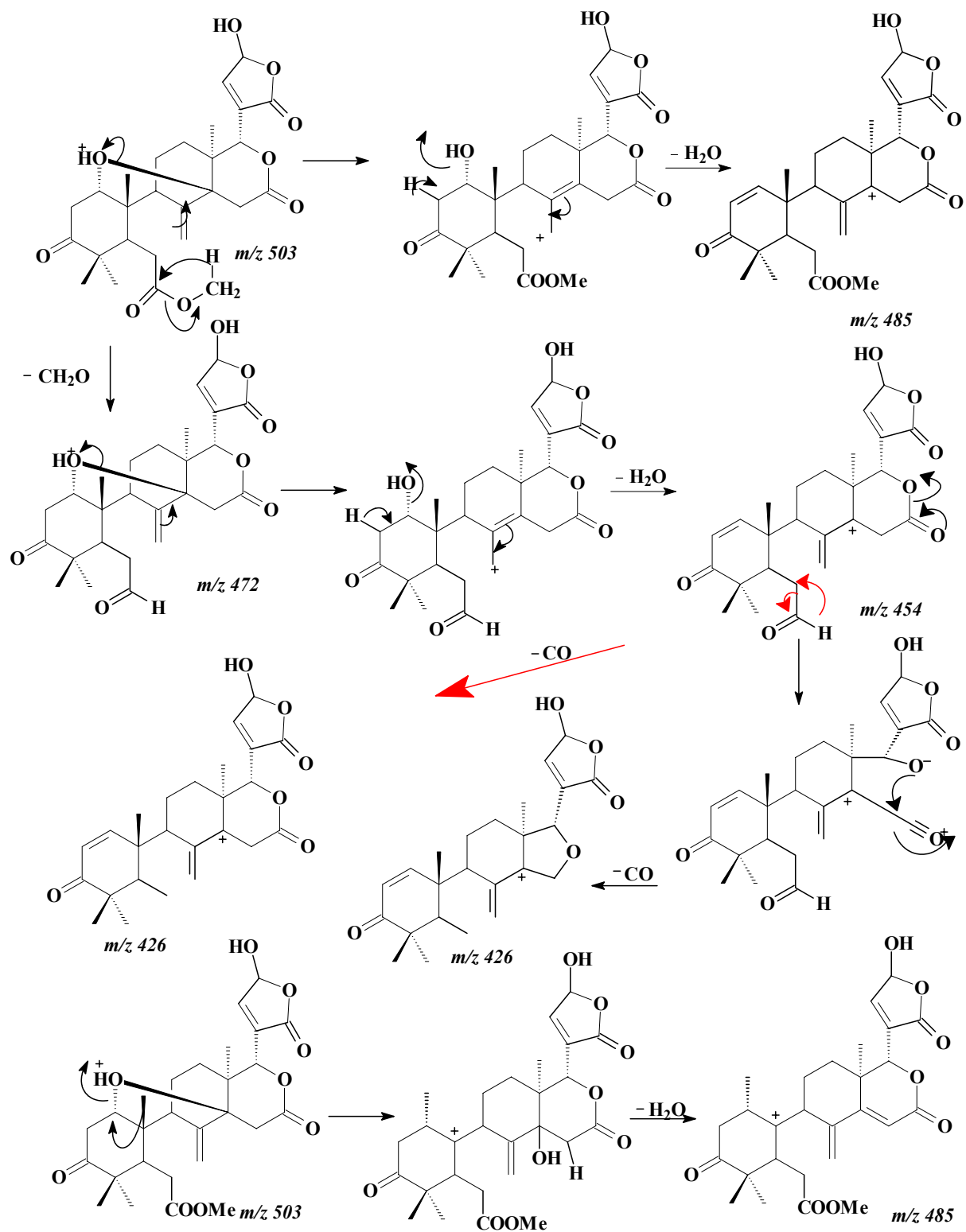


FIGURA 4.122: Proposta de fragmentação para o 23-hidroxi-20(22)-em-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (P11)

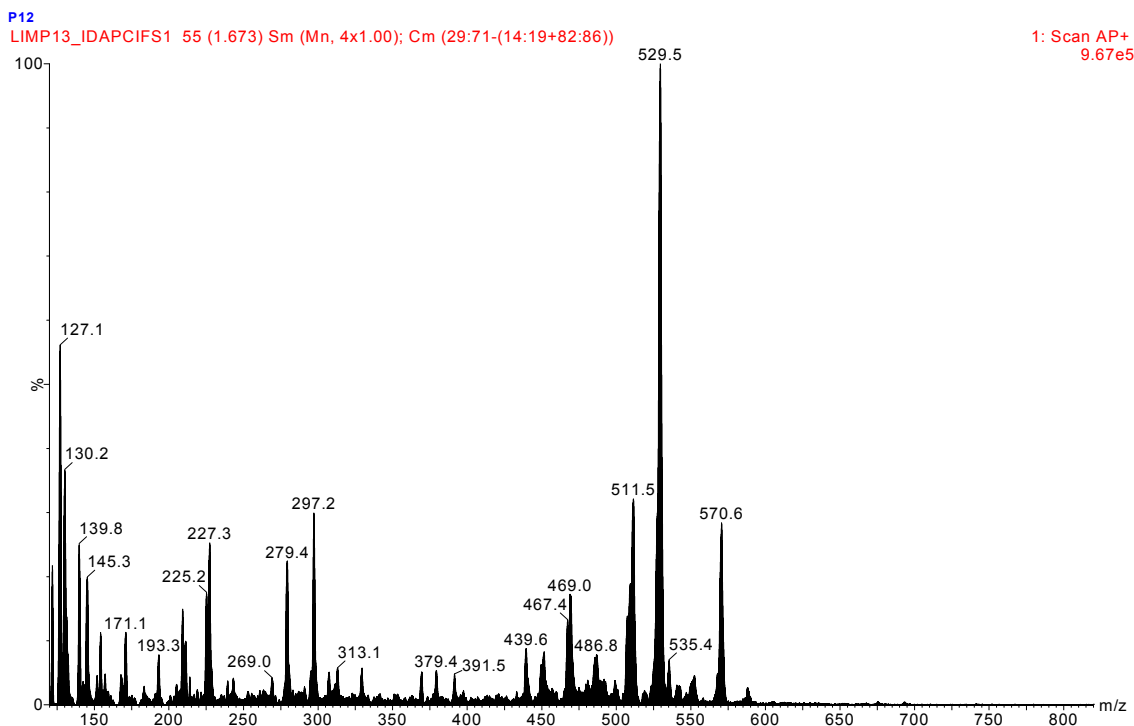


FIGURA 4.123: Espectro de massas ($APCI^+$) do Grandifoliolenona (P12)

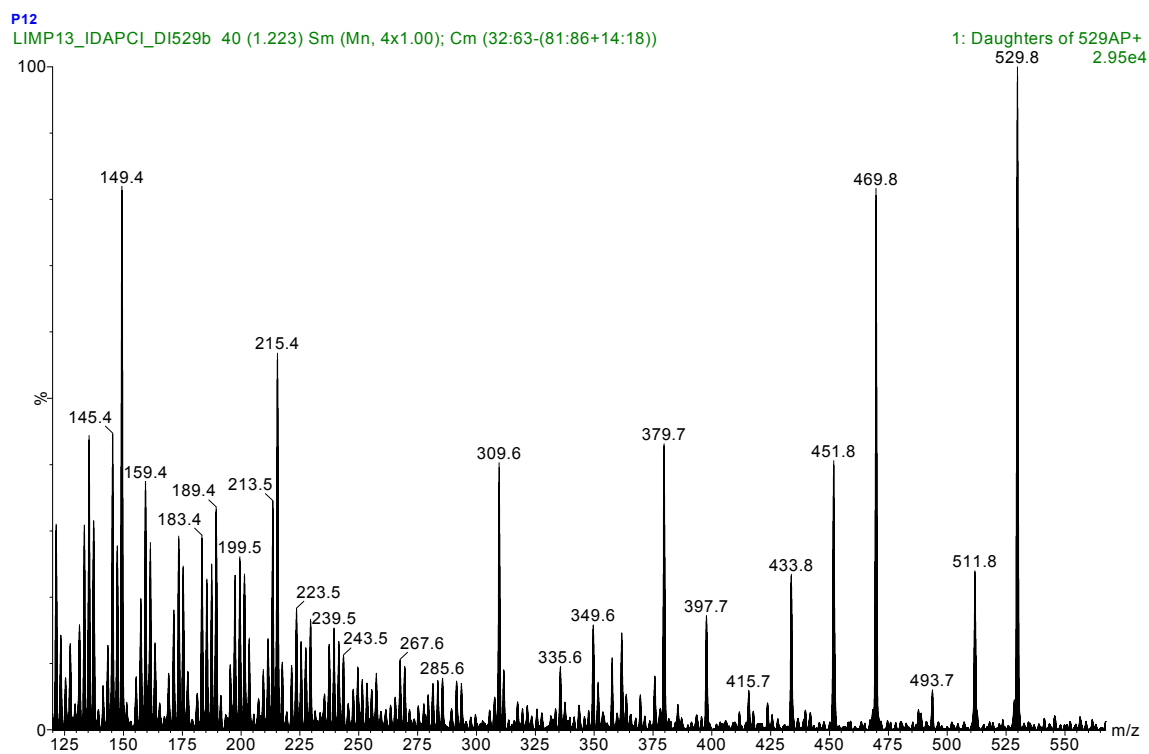


FIGURA 4.124: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 529 do Grandifoliolenona (P12)

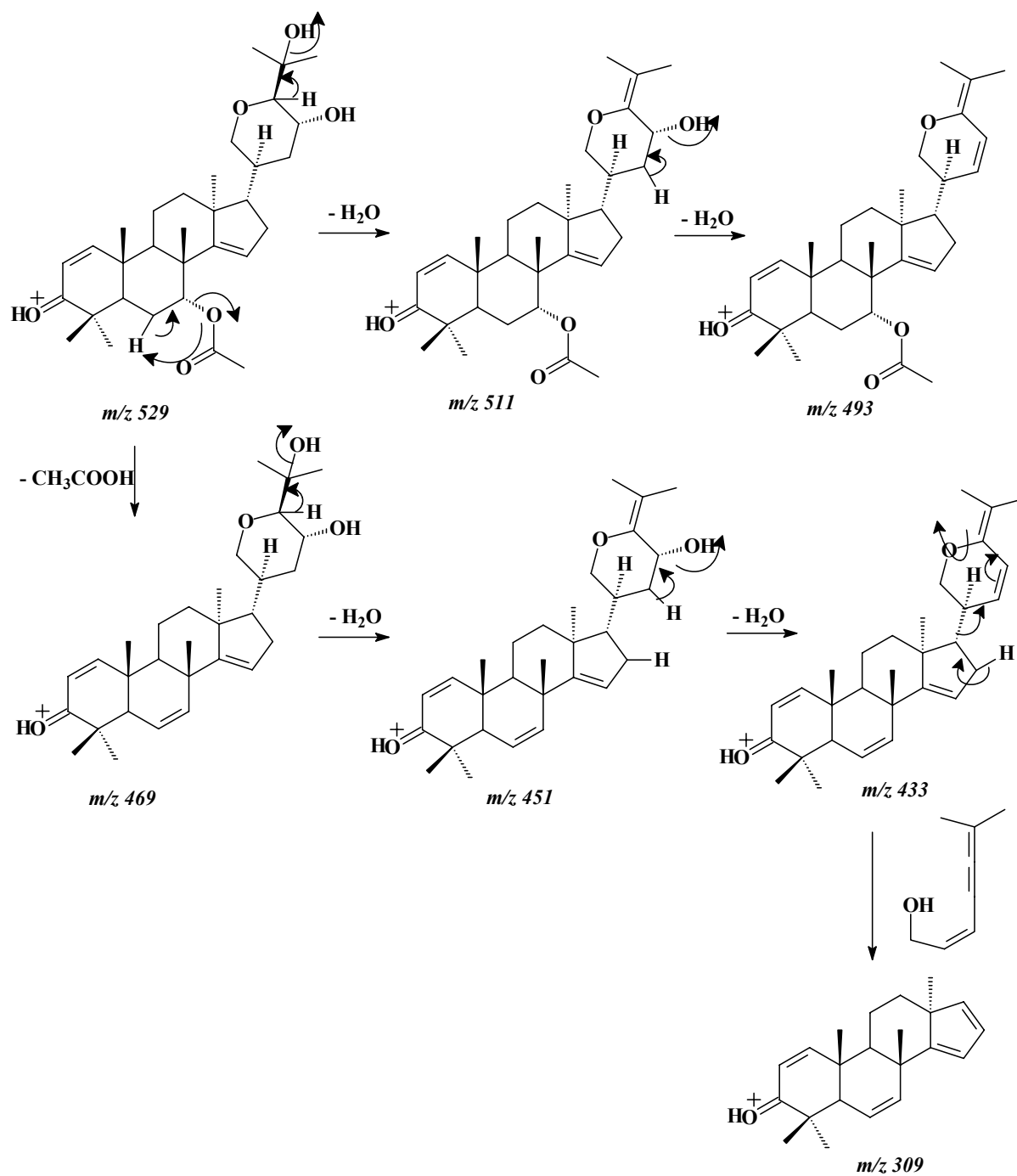


FIGURA 4.125: Proposta de fragmentação para o Grandifoliolenona (P12)

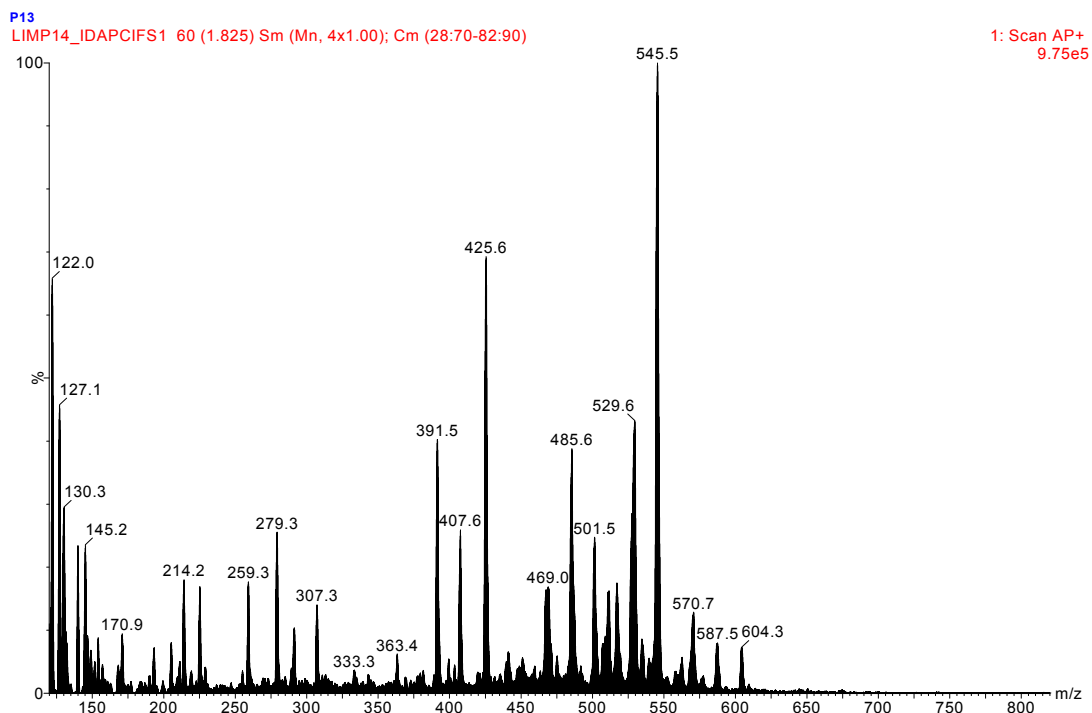


FIGURA 4.126: Espectro de massas ($APCI^+$) do 3-desacetilkhivorina (P13)

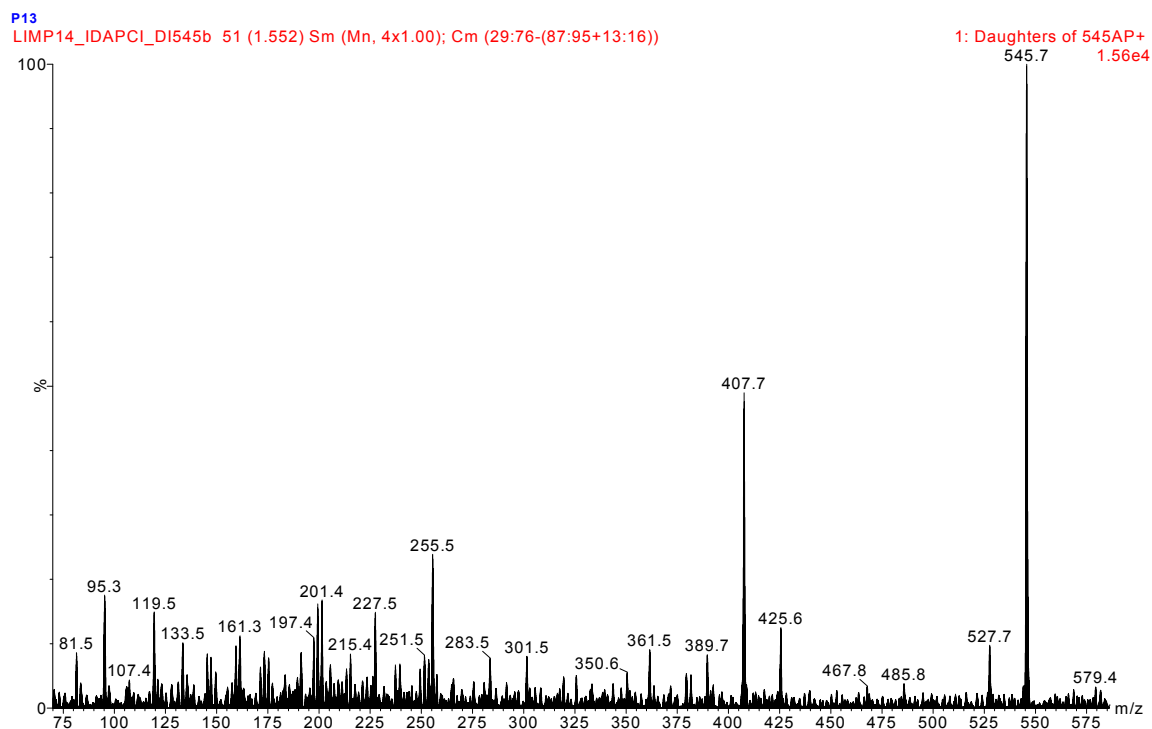


FIGURA 4.127: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 545 3-desacetilkhivorina (P13)

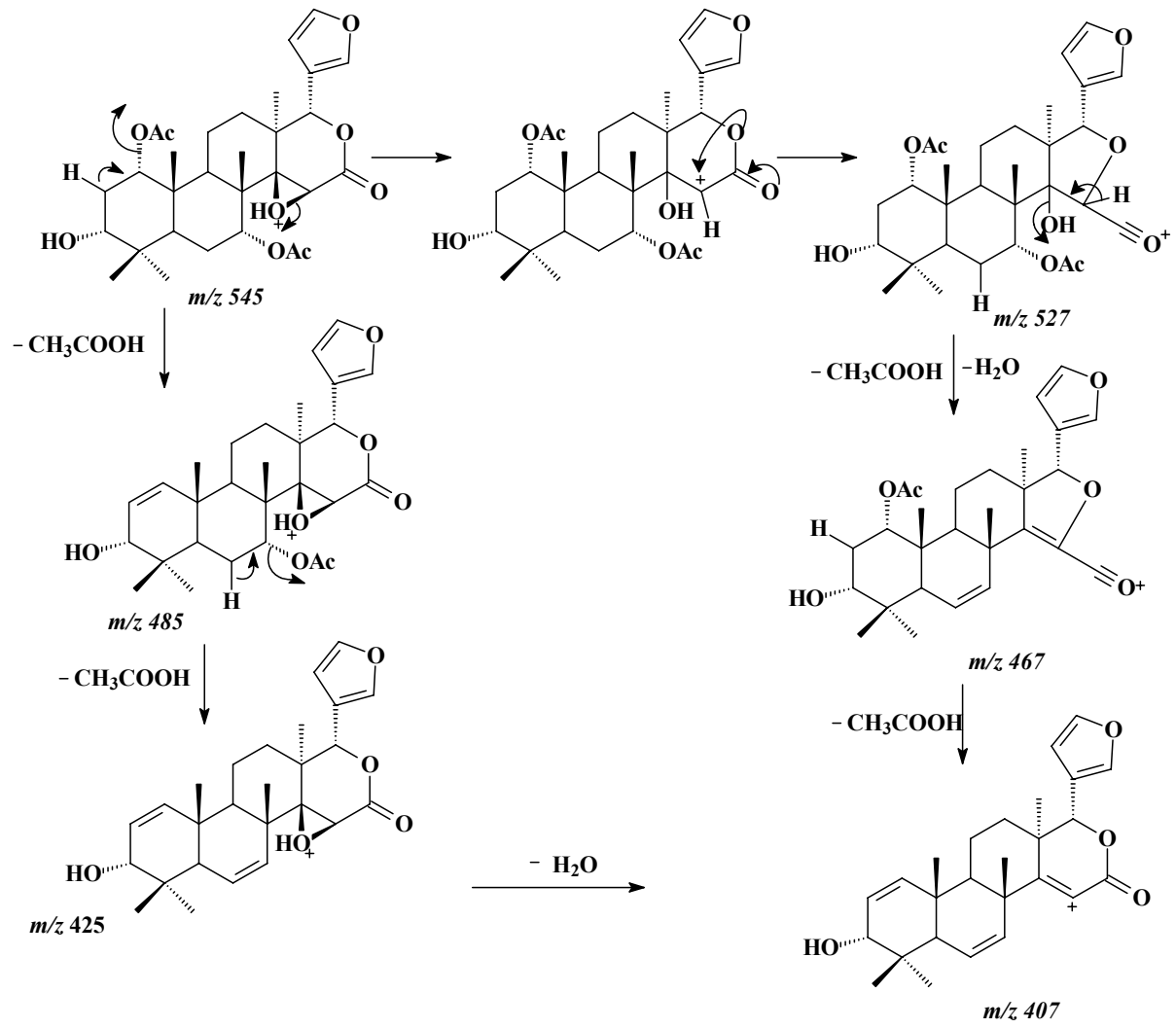


FIGURA 4.128: Proposta de fragmentação para o 3-desacetilkhivorina (P13)

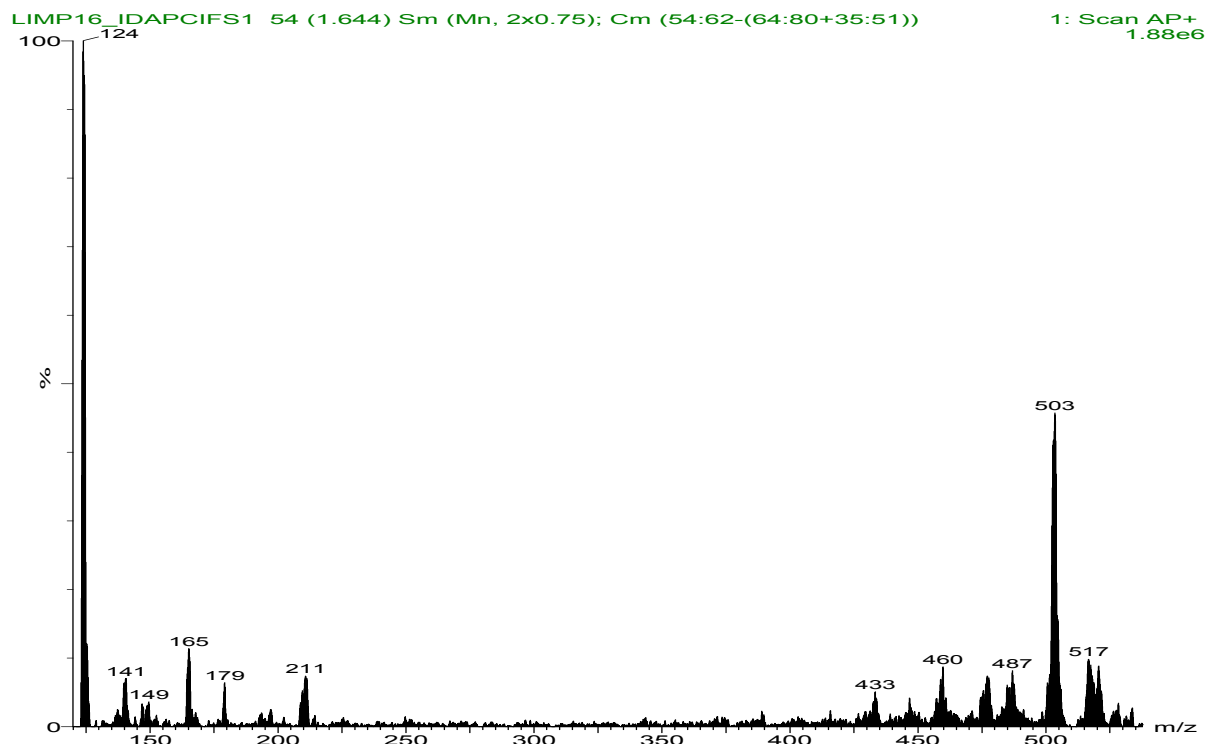


FIGURA 4.129: Espectro de massas ($APCI^+$) do 21-hidroxi-20(22)-em-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (**P15**)

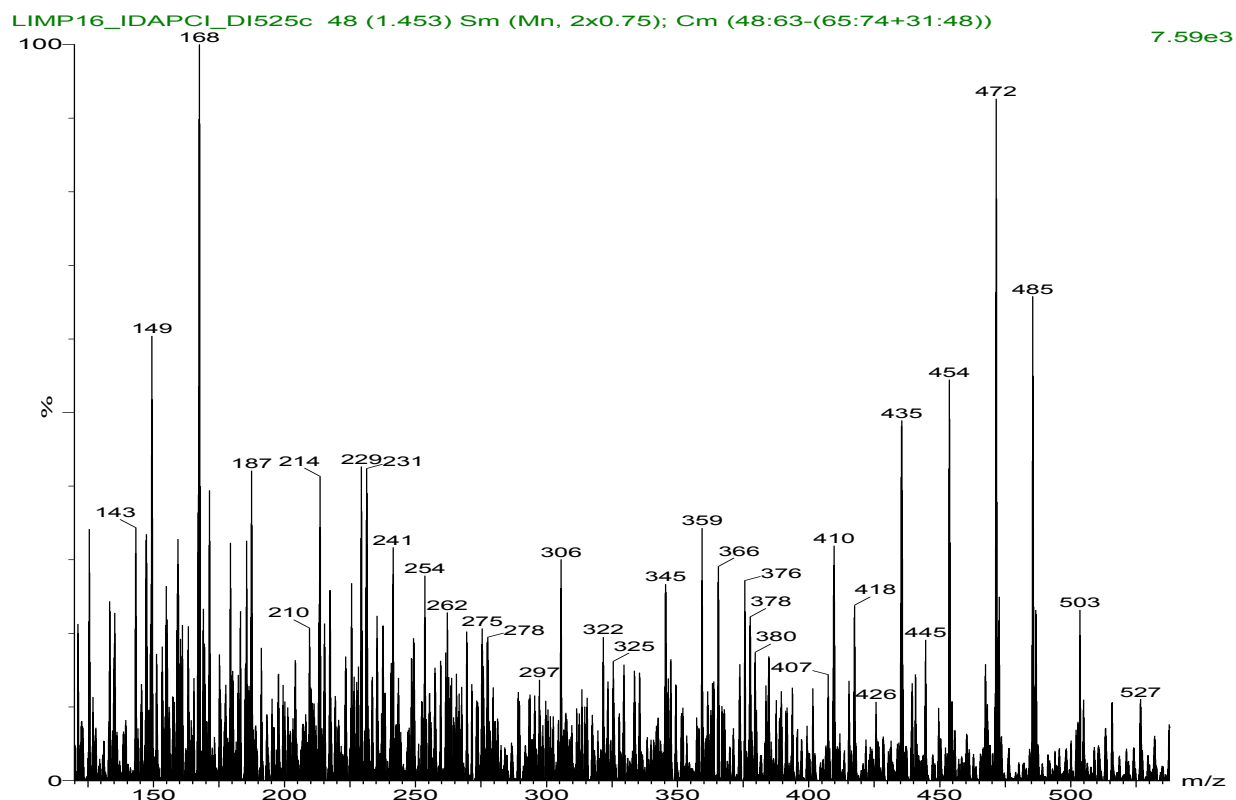


FIGURA 4.130: Espectro de massas ($APCI^+$), íons filhos de m/z 503 21-hidroxi-20(22)-em-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (**P15**)

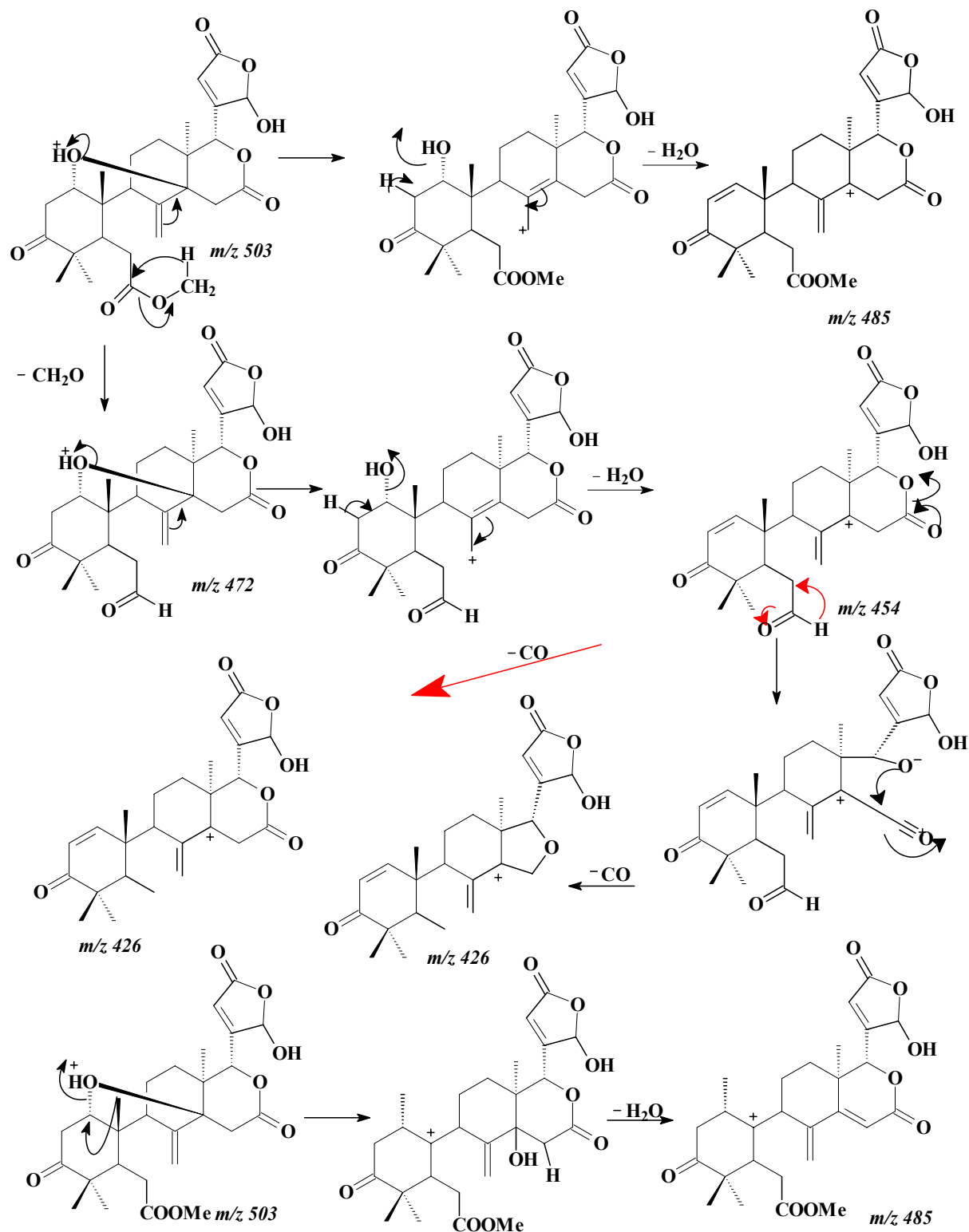


FIGURA 4.131: Proposta de fragmentação para o 21-hidroxi-20(22)-en-21,23- γ -lactona-angolensato de metila (P15)

Observou-se nas propostas de fragmentação dos limonóides que sempre há perda de CO (m/z 28), quando se tem um anel lactônico no anel D, e que esta perda de CO ocorre após uma ou duas perda de moléculas de H₂O.

Alguns compostos apresentaram um padrão de fragmentação similar, como por exemplo, os isômeros P11/P15 e P9/P12, onde se observou que os fragmentos eram os mesmos. No entanto os outros compostos apresentaram diferentes fragmentações, mas sempre ocorrendo a perda de H₂O, CO, MeOH, MeOCOH, e ainda a perda de formaldeído.

4.5.2 – Análises das Amostras de Biotransformação por LC-MS

As amostras obtidas do experimento de biotransformação foram analisadas via *screening* por LC/MS, utilizando a técnica de *Electrospray* no modo negativo. Os dados foram analisados, comparando-se tanto a amostra com o limonóide oriundo de *K. ivorensis* sintomática ao fungo *Botryosphaeria rhodina*, assim como o branco (FUNGO + MEIO), verificando-se se houve modificação ou não na estrutura do composto ensaiado.

A Figura 4.132 (p. 193) apresenta os cromatogramas dos padrões angolensato de metila e do 7-desacetil-7-oxogedunina, experimento feito por *Electrospray* no modo negativo, observando os compostos no tempo de retenção de 21,25 minutos (7-desacetoxi-7-oxogedunina) e 22,32 minutos (angolensato de metila) e na Figura 4.133 (p. 193), observa-se os seus espectros de massa, com suas respectivas massas m/z 437 e 469.

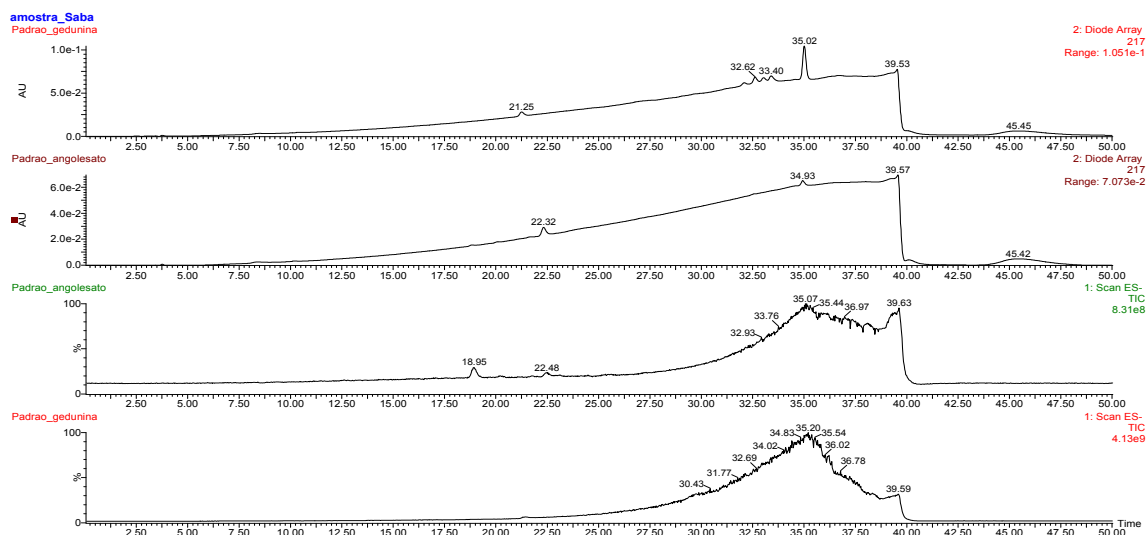


FIGURA 4.132: Cromatogramas (Electrospray⁻) dos padrões angolesato de metila e 7-desacetoxi-7-oxogedunina [Condições da análise no LC-UV-MS Fase móvel: H₂O:MeOH (gradiente) iniciando com 10% de metanol. Coluna C18 Phenomenex[®] Luna(II) (150x4,6 mm, 10 μm); Vazão 1,0 mL/min com divisor de fluxo passando 0,3 mL/min para o espectrometro; alça de injeção de 45 μL].

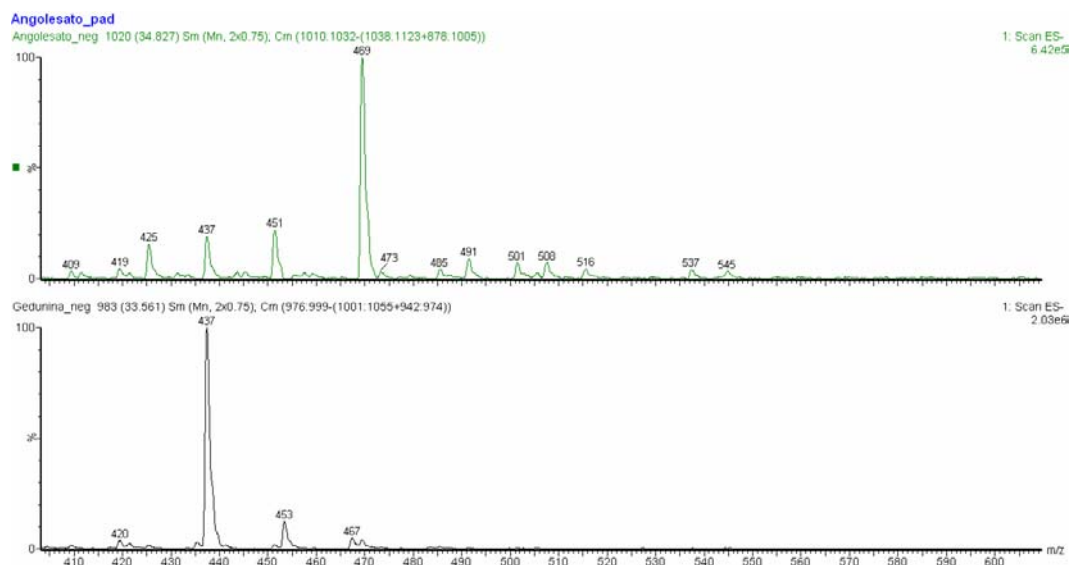


FIGURA 4.133: Espectro de massas (ES⁻) dos padrões angolesato de metila (m/z 469) e 7-desacetoxi-7-oxogedunina (m/z 437)

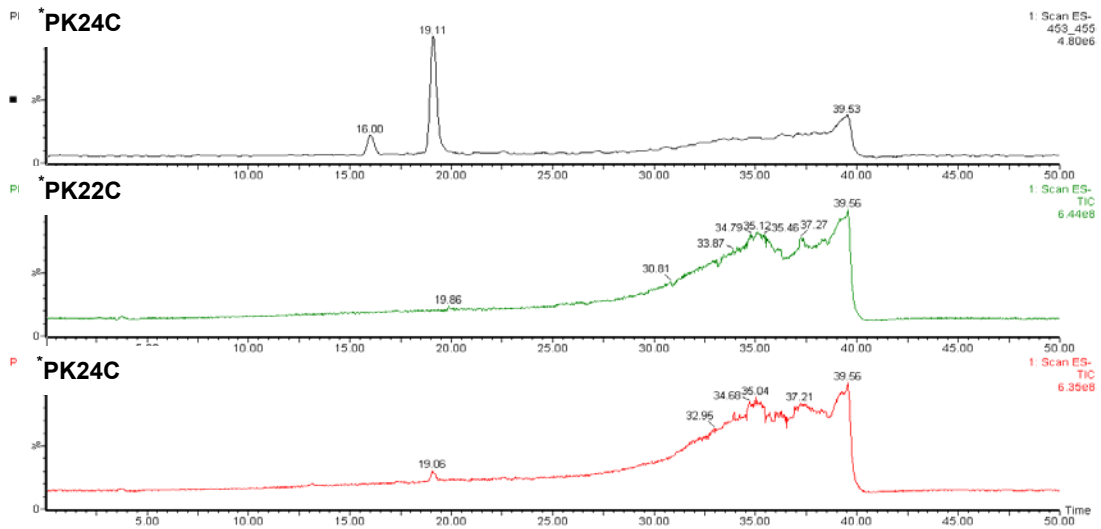
4.5.2.1 – Experimento realizado com o fungo *Penicillium ssp.*

FIGURA 4.134: Cromatogramas (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + angolesato de metila (PK24C) e Meio + Fungo (PK22C) [Condições da análise no LC-UV-MS Fase móvel: H₂O:MeOH (gradiente) iniciando com 10% de metanol. Coluna C18 Phenomenex[®] Luna(II) (150x4,6 mm, 10 µm);. Vazão 1,0 mL/min com divisor de fluxo passando 0,3 mL/min para o espectrometro; alça de injeção de 45 µL]

*PK24C = Experimento feito em 10 dias com o fungo *Penicillium ssp.* e angolesato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

*PK22C = Experimento feito em 10 dias com o fungo *Penicillium ssp.* sem adição de substrato, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

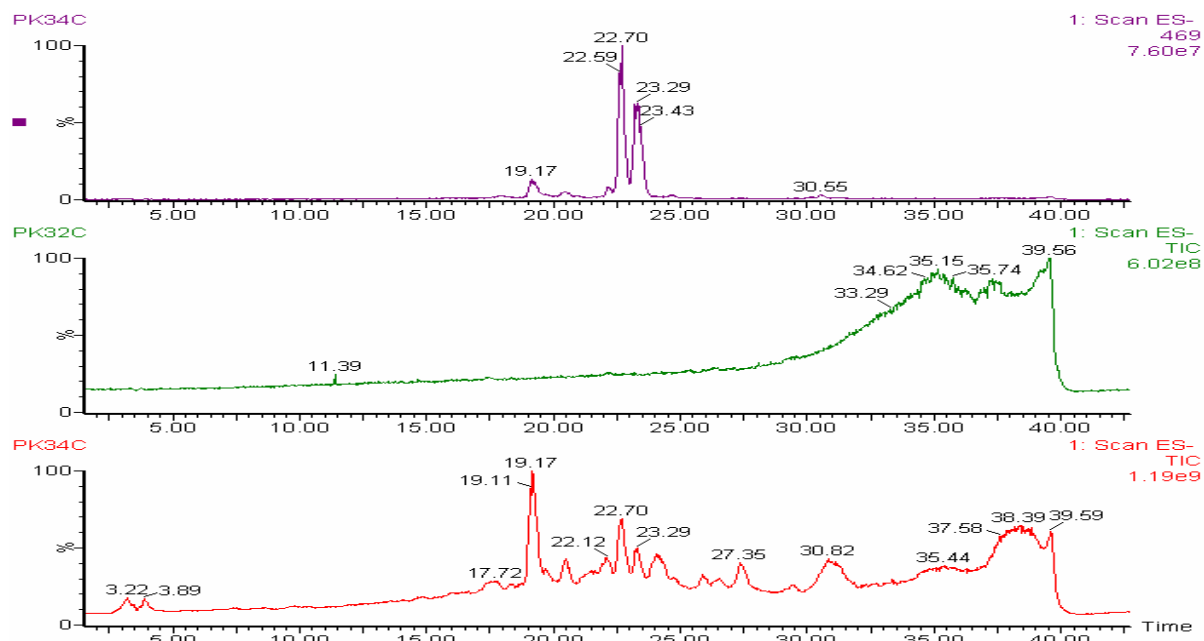


FIGURA 4.135: Cromatogramas (ES^-) Meio + *Penicillium ssp.* + angolesato de metila (P34C) e Meio + Fungo (P32C) [Condições da análise no LC/UV/MS Fase móvel: $H_2O:MeOH$ (gradiente) iniciando com 10% de metanol. Coluna C18 Phenomenex® Luna(II) (150x4,6 mm, 10 μm);. Vazão 1,0 mL/min com divisor de fluxo passando 0,3 mL/min para o espectrômetro; alça de injeção de 45 μL]

*PK34C = Experimento feito em 15 dias com o fungo *Penicillium ssp.* e angolesato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

*PK32C = Experimento feito em 15 dias com o fungo *Penicillium ssp.* sem adição de substrato, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

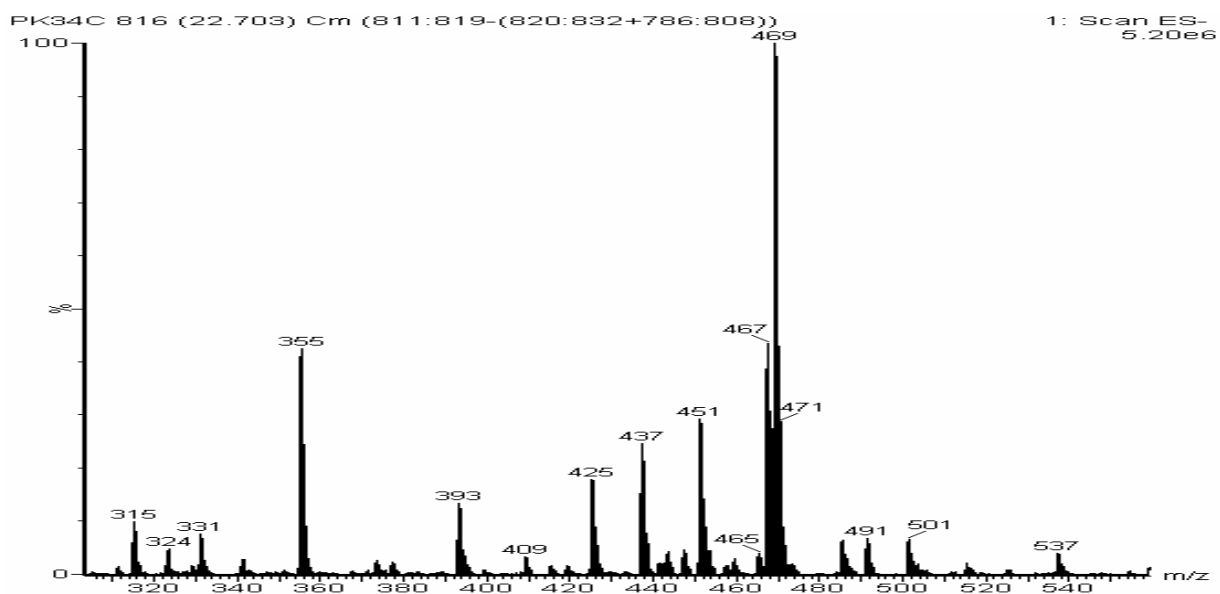


FIGURA 4.136: Espectro de massas (ES^-) Meio + *Penicillium ssp.* + angolesato de metila (P34C), contendo o substrato de partida (m/z 469, intacto)

As frações mostradas nas Figuras 4.134 (p. 194) e 4.135 (p. 195), apresentavam-se em misturas complexas, com isso decidiu-se fazer um tratamento destas, injetado-as no HPLC preparativo com coluna C18 (Phenomenex® luna) de 10 μm e 250x21,2 mm, usando um gradiente linear de H₂O/MeOH iniciando em 10% de metanol.

Como não se obteve uma boa ionização dos padrões de limonóides utilizando-se o modo de ionização por *Electrospray*, tanto no modo positivo, assim como no negativo, mesmo variando-se alguns parâmetros do espectrômetro, decidiu-se por trocar o probe de ionização. Com isso as amostras obtidas por HPLC foram analisadas em LC-MS, utilizando-se o processo de ionização por *APCI* no modo positivo.

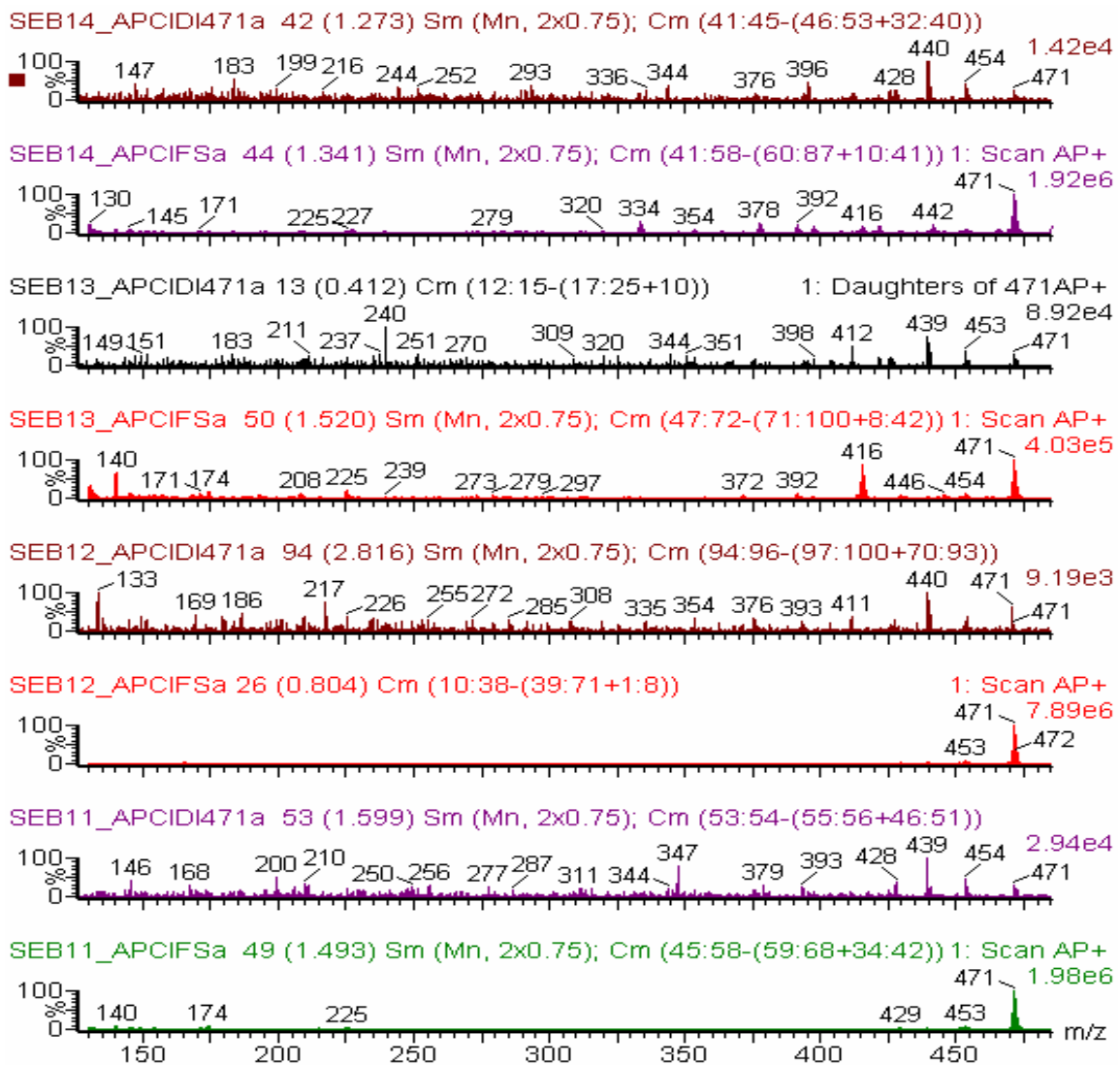


FIGURA 4.137: Espectro de massas (*APCI*⁺) dos filhos de *m/z* 471 Meio + *Penicillium* ssp. + angolensato de metila PK24C (frações 11 a 14)

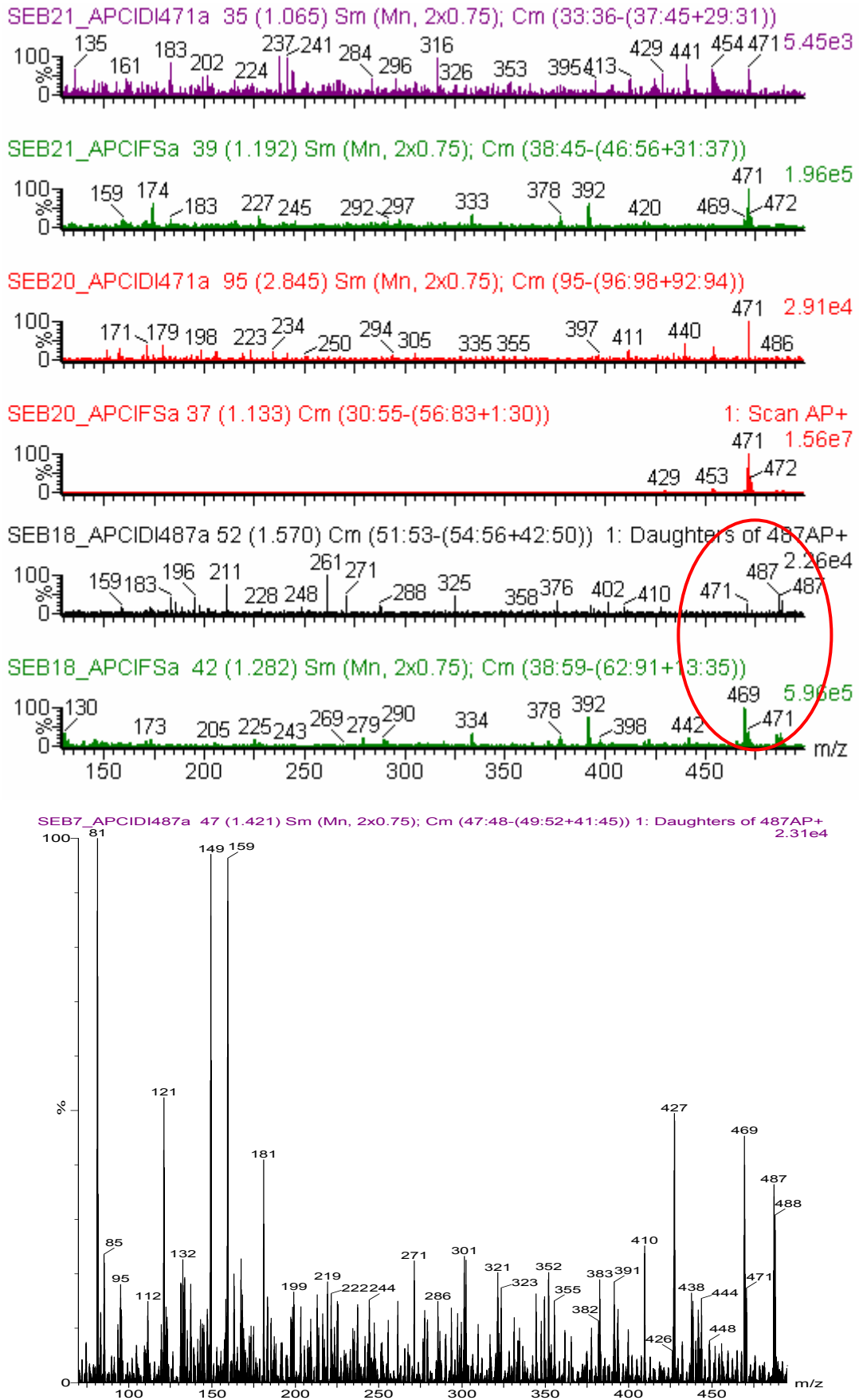


FIGURA 4.138: Espectro de massas ($APCI^+$) dos filhos de m/z 471 Meio + *Penicillium* ssp. + angolensato de metila PK34C (frações 18 a 23)

Como pode-se observar nos espectros de massas da figura 4.137 (p. 196) e 4.138 (p. 197), não houve nenhuma modificação no angolensato de metila dado ao fungo *Penicillium ssp.*, sendo que este está presente em quase todas as frações obtidas por HPLC (m/z 471). Exceto em um dos espectros (Figura 4.138, frações 18 e 19) circulado em vermelho. Observou-se um aumento de massa de 16Da (m/z 487), sugerindo que o fungo possa ter adicionado um oxigênio no angolensato de metila, e possivelmente levado a formação do limonóide P8 (6-hidroxiangolesato de metila), este que pode ser confirmado no espectro de íons filhos do m/z 487. No entanto, apenas supõem-se que esta oxidação tenha ocorrido e levado a formação de P8.

Além da fração PK24C e PK34C, também foi injetada no HPLC a fração PT34C, nas mesmas condições descritas anteriormente para a fração PK24C, no entanto como pode-se observar nos espectros de massas da figura 4.139 (p. 199), o pico do íon molecular correspondente ao limonóide 7-desacetoxi-7-oxogedunina dado ao fungo *Penicillium ssp.* não se encontra presente nos espectros, isto sugere que o fungo possa ter degradado o composto dado a ele.

Observou-se também nos espectros de massas alguns picos (m/z 445, 461, além de outros) que não foram possíveis ser identificados, pode ser que estes picos sejam metabólitos do próprio fungo. Portanto, para identificar estes metabólitos seria necessário fazer uma análise mais apurada destas frações.

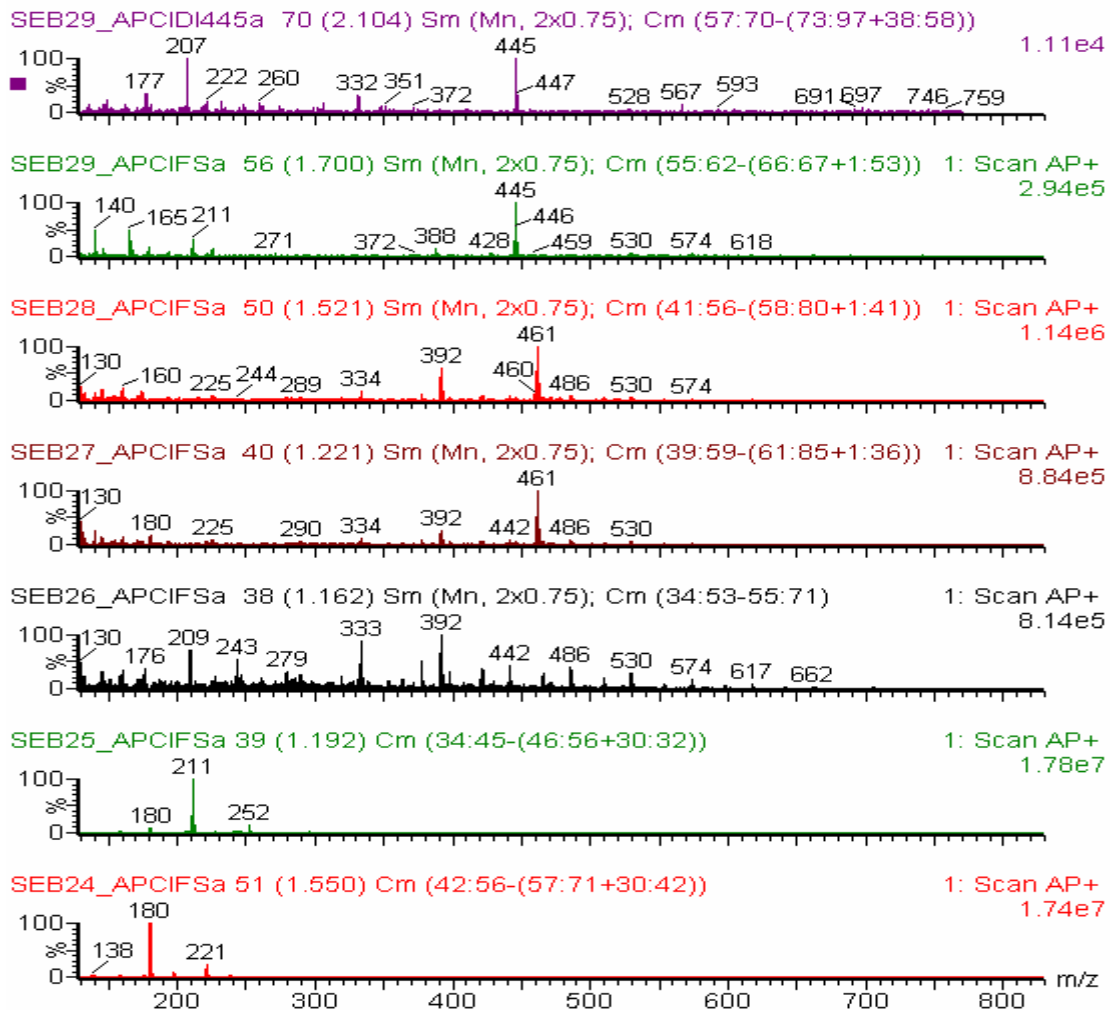


FIGURA 4.139: Espectro de massas ($APCI^+$) Meio + *Pestalotiopsis crassiuscula* + 7-desacetoxi-7-oxogedunina PT34C (frações 24 a 29)

[†]PT34C = Experimento feito em 15 dias com o fungo *Penicillium ssp.* e 7-desacetoxi-7-oxogedunina, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

Analisando os espectros de massas da figura 4.140 (p. 200) e 4.141 (p. 201), pode-se observar que o angolensato de metila está presente em algumas frações, mas em outras pode-se observar uma diferença de massa, no entanto essas amostras não foram injetadas no HPLC devido não se ter conseguido uma boa quantidade de massa das frações obtidas. Com isto, quando estas frações foram analisadas por *Electrospray* no modo negativo, observou-se um aumento de massa de 16 e 32Da com um m/z 485 e 501 respectivamente, supondo-se que o fungo possa ter modificado ou não o limonóide dado a ele, e estas massas observadas seriam metabólitos do fungo.

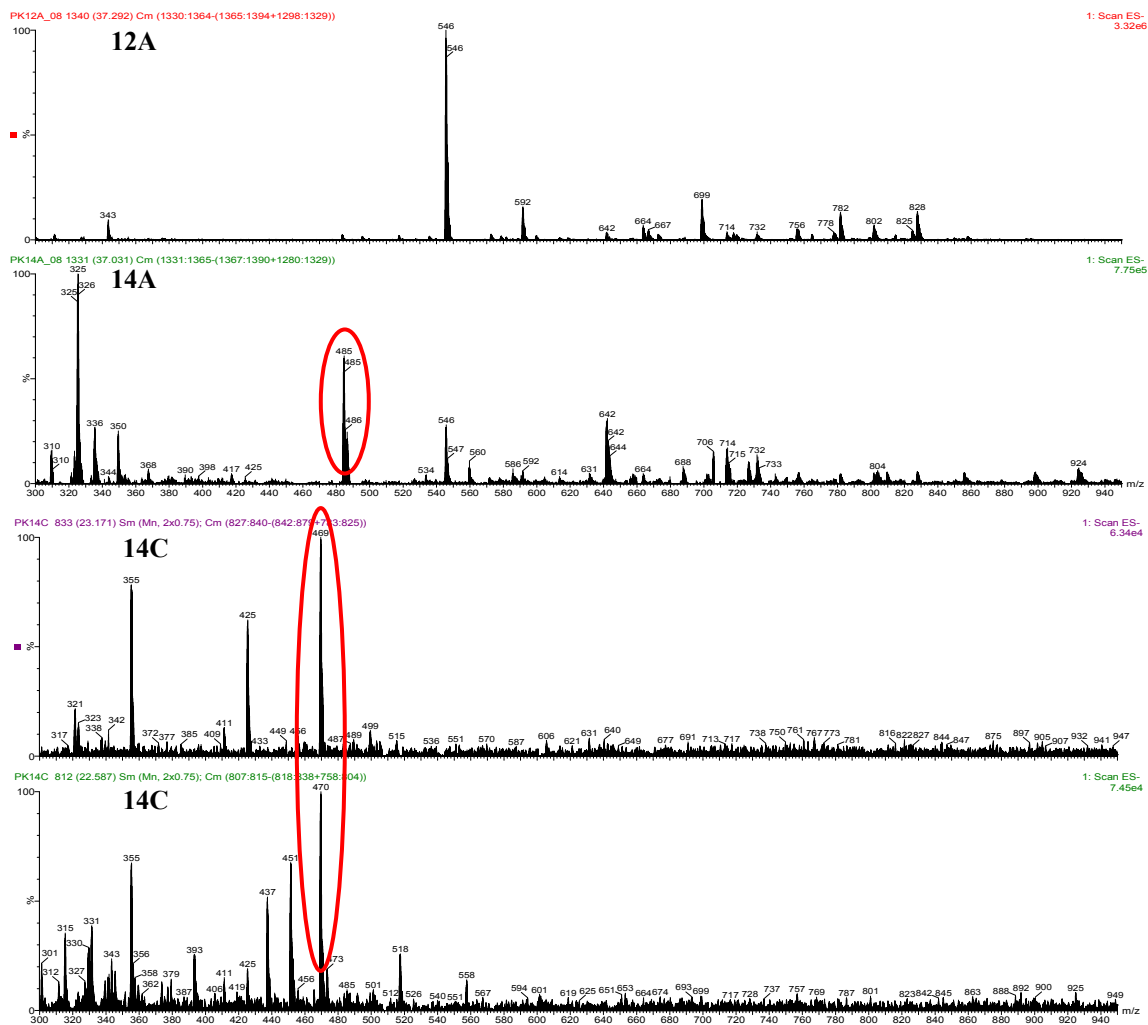


FIGURA 4.140: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Penicillium* ssp. + Angolesato de metila (P14A, PK14C)

*PK14A = Experimento feito em 5 dias com o fungo *Penicillium* ssp. e angolesato de metila, extraído com hexano/diclorometano (7:3)

*PK14C = Experimento feito em 5 dias com o fungo *Penicillium* ssp. e angolesato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

*PK12A = Experimento feito em 5 dias com o fungo *Penicillium* ssp. sem angolesato de metila, extraído com hexano/diclorometano (7:3)

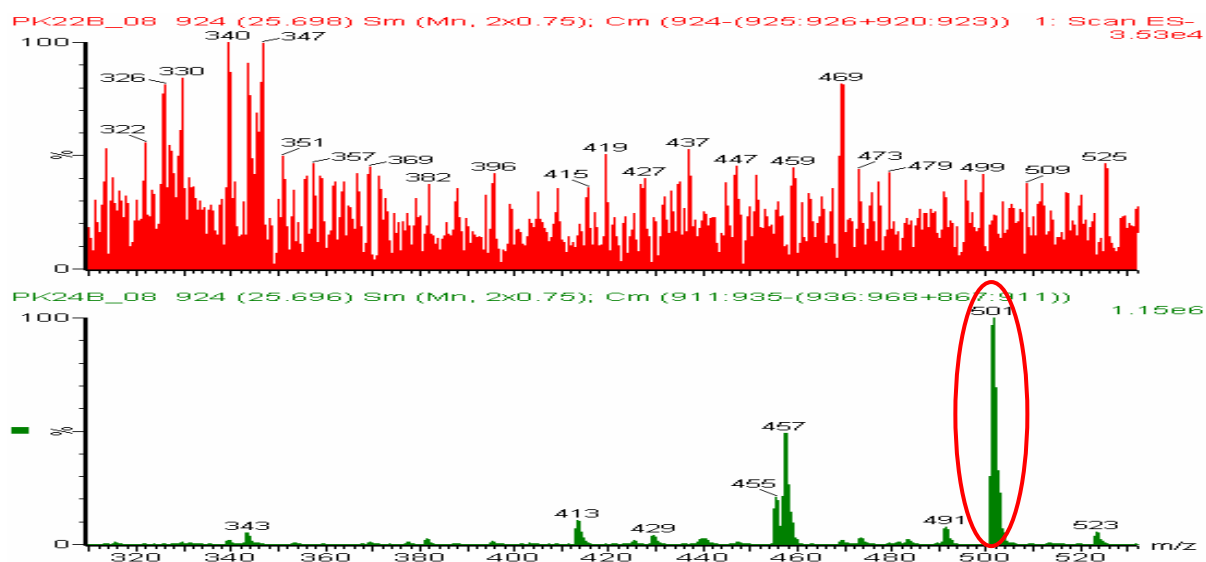


FIGURA 4.141: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + Angolesato de metila (P22B e PK 24B)

*PK22B = Experimento feito em 10 dias com o fungo *Penicillium ssp.* sem angolesato de metila, extraído com hexano/diclorometano (3:7)

*PK24B = Experimento feito em 10 dias com o fungo *Penicillium ssp.* e angolesato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

Na Figura 4.142 (p.200), tem-se o cromatograma das frações PT22B e PT24B, nos quais observa-se que se tem somente o substrato dado ao fungo (7-desacetoxi-7-oxogedunina). E na figura 4.143 (p. 202), tem-se o espectro de massa confirmando a presença somente do limonóide com pico de m/z 437, concluindo-se que o fungo *Penicillium ssp.* não modificou a estrutura do substrato.

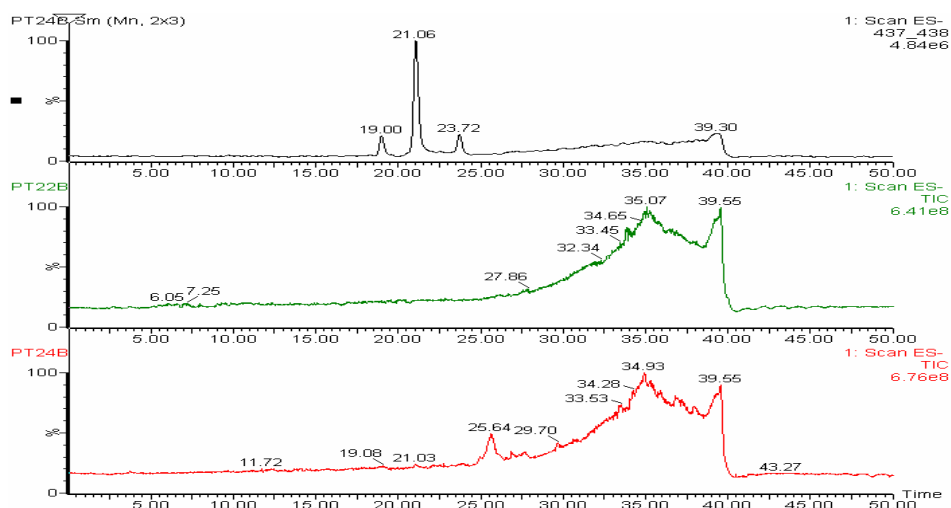


FIGURA 4.142: Cromatograma (ES⁻) Meio + *Penicillium ssp.* + 7-desacetoxi-7-oxogedunina (P24B) [Condições da análise no LC/UV/MS Fase móvel: H₂O:MeOH (gradiente) iniciando com 5% de metanol. Coluna C18 Phenomenex[®] Luna(II) (150x4,6 mm, 10 μm); Vazão 0,8 mL/min; alça de injeção de 20 μL].

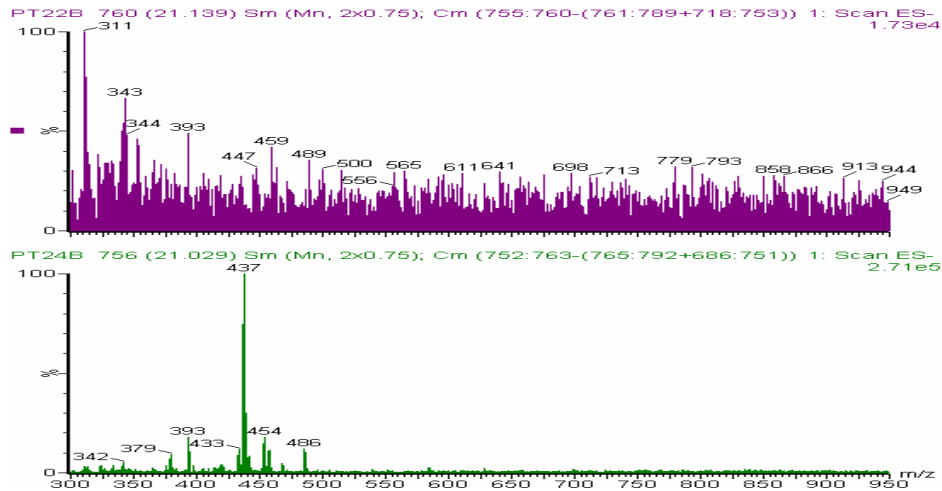


FIGURA 4.143: Espectro de massas (ES^-) Meio + *Penicillium ssp.* + 7-desacetoxi-7-oxogedunina (P24B)

[†]PT24B = Experimento feito em 10 dias com o fungo *Penicillium ssp.* e 7-desaceto-7-oxogedunina, extraído com hexano/diclorometano (3:7)

[†]PT22B = Experimento feito em 10 dias com o fungo *Penicillium ssp.*, extraído com hexano/diclorometano (3:7)

4.3.2.2 – Experimento realizado com o fungo *Phomopsis sojae*

Observa-se nos espectros de massas feito por *Electrospray* no modo negativo da figura 4.144 (p. 203), do experimento feito com a espécie *Phomopsis sojae*, que o angolensato de metila sempre está presente em todas as frações, no entanto observou-se também um aumento de massa de 16 e 32Da no íon molecular com m/z 469, ou seja, da massa do substrato, formando assim os íons com m/z 485 e 501, respectivamente (Figura 4.145, p. 204). Foram realizadas as análises por LC/MS das amostras com o substrato 7-desaceto-7-oxogedunina, porém estas não apresentaram nenhuma diferença quando comparadas com o branco (MEIO + FUNGO).

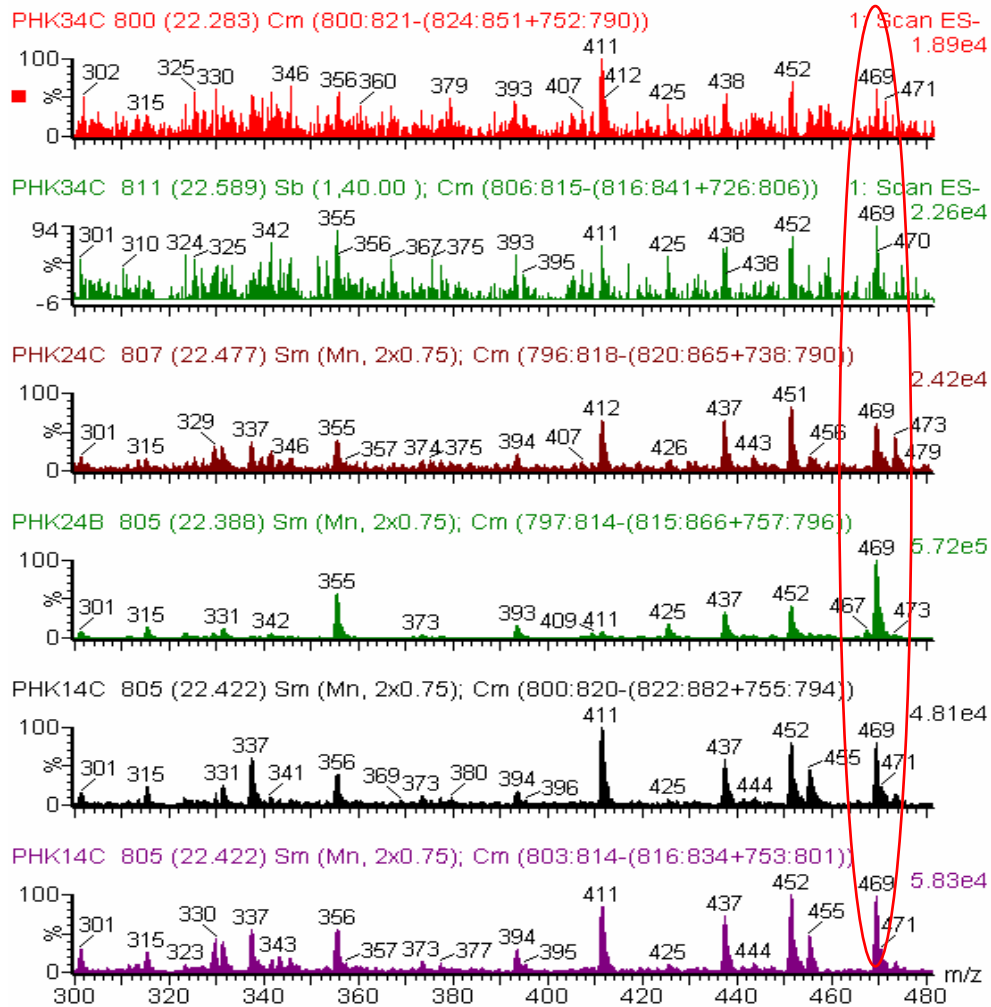


FIGURA 4.144: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Phomopsis sojae* + angolensato de metila, presença do substrato com m/z 469 (PHK14C, PHK24B, PHK24C e PHK34C).

*PHK14C = Experimento feito em 5 dias com o fungo *Phomopsis sojae* e angolensato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

*PHK24B = Experimento feito em 10 dias com o fungo *Phomopsis sojae* e angolensato de metila extraído com hexano/diclorometano (3:7)

*PHK24C = Experimento feito em 10 dias com o fungo *Phomopsis sojae* e angolensato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

*PHK34C = Experimento feito em 15 dias com o fungo *Phomopsis sojae* e angolensato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

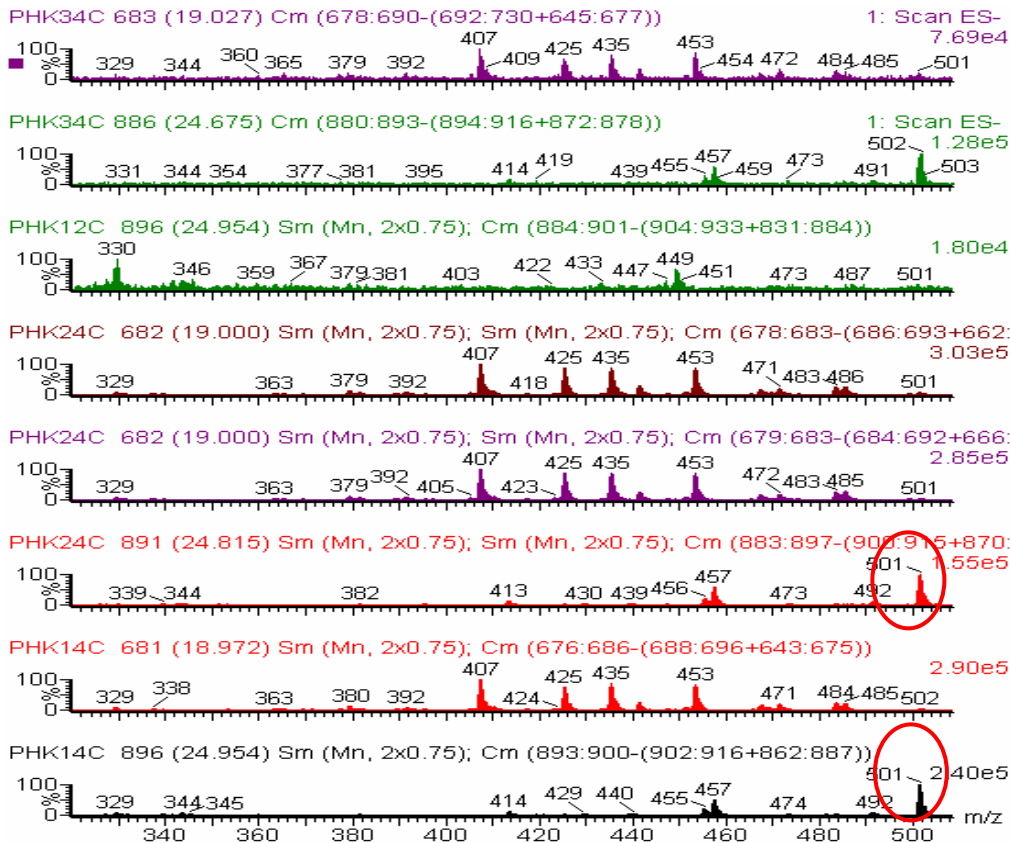


FIGURA 4.145: Espectro de massas (ES^-) Meio + *Phomopsis sojae* + angolensato de metila, onde observou-se os picos m/z 501 (PHK14C, PHK24B, PHK24C e PHK34C).

4.3.2.3 – Experimento realizado com o fungo *Botryosphaeria rhodina*

Os experimentos de biotransformação realizados com o fungo patogênico *Botryosphaeria rhodina*, apresentaram alguns resultados interessantes somente com o substrato angolensato de metila. Porém quando foi feito com o 7-desacetoxi-7-oxogedunina, obteve-se o substrato intacto sendo totalmente visível quando as frações foram eluídas em cromatografia de camada delgada comparativa, portanto as amostras obtidas do experimento com o 7-desacetoxi-7-oxogedunina não foram analisadas por LC-MS.

Nos espectros de massas das frações obtidas no experimento por ES^- realizado com angolensato de metila (m/z 469), observou-se um aumento de massa de 32Da, 31Da, 16Da e ainda a perda de 16Da, observando-se a formação dos

picos com m/z 501 (Figura 4.149, p. 207), m/z 500 (Figura 4.148, p. 206), m/z 485 (Figura 4.147, p. 206) e m/z 453 (Figura 4.146, p. 205) respectivamente. As análises desses dados, sugerem que possivelmente o patógeno tenha adicionado estas unidades de massas no angolesato de metila. No entanto fica difícil saber em que posição teria ocorrido esta modificação no substrato. E pode-se inferir ainda que não tenha havido modificação e as massas observadas seriam metabólitos do próprio fungo, no entanto quando os espectros de massas das frações com fungo sem o angolesato de metila (MEIO + FUNGO) foram comparados com as frações do meio reacional no mesmo tempo de retenção, não observou-se a presença dos picos com m/z 500, 453, 501 e 485, concluindo-se que o fungo teria modificado o substrato de partida.

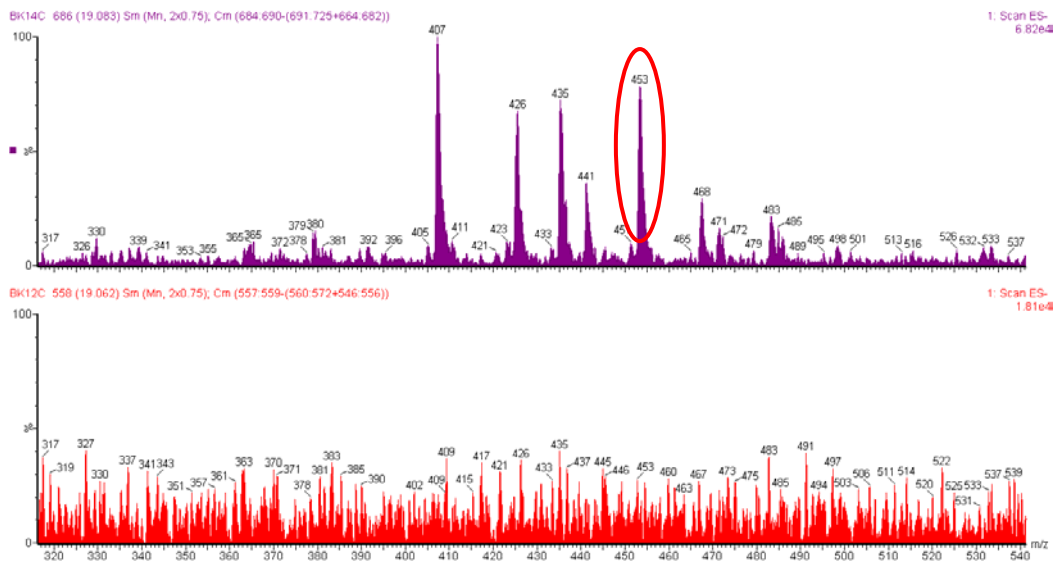


FIGURA 4.146: Espectro de massas (ES^-) Meio + *Botryosphaeria rhodina* + angolesato de metila (BK14C) e Meio + *Botryosphaeria rhodina* (BK12C)

†BK14C = Experimento feito em 5 dias com o fungo *Botryosphaeria rhodina* e angolesato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

†BK12C = Experimento feito em 5 dias com o fungo *Botryosphaeria rhodina* e angolesato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

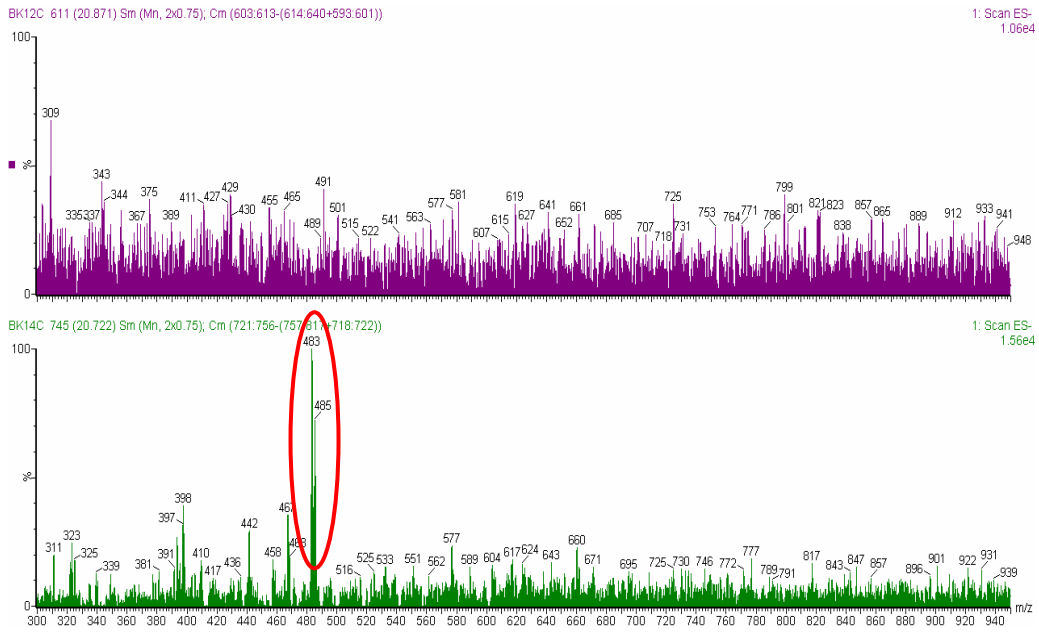


FIGURA 4.147: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria rhodina* + angolesato de metila (BK14C) e Meio + *Botryosphaeria rhodina* (BK12C)

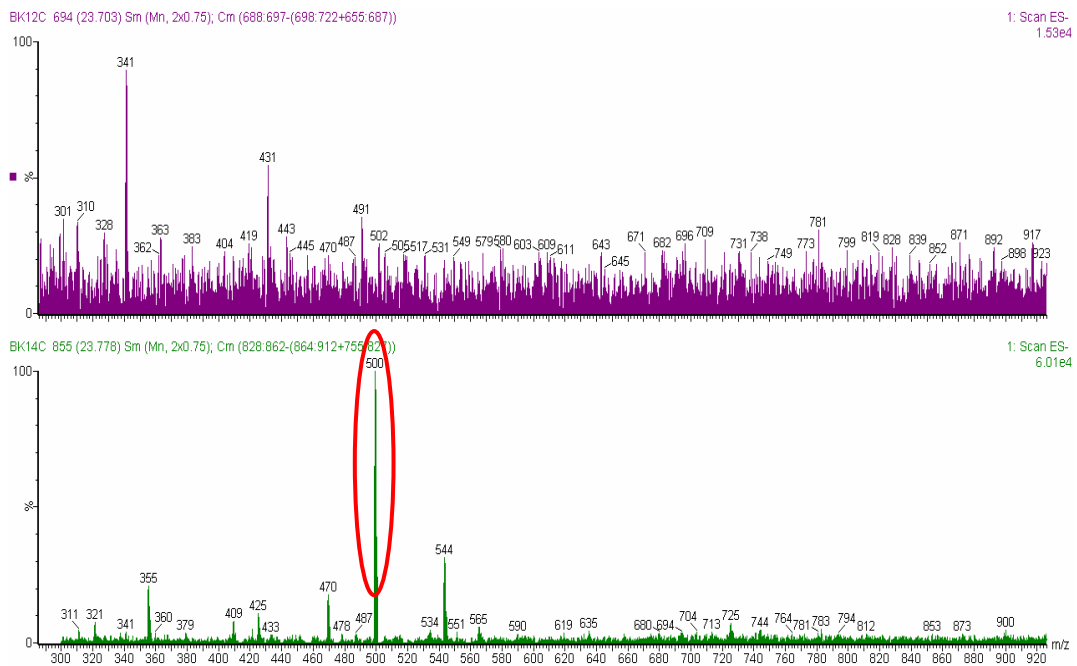


FIGURA 4.148: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria rhodina* + angolesato de metila (BK14C) e Meio + *Botryosphaeria rhodina* (BK12C)

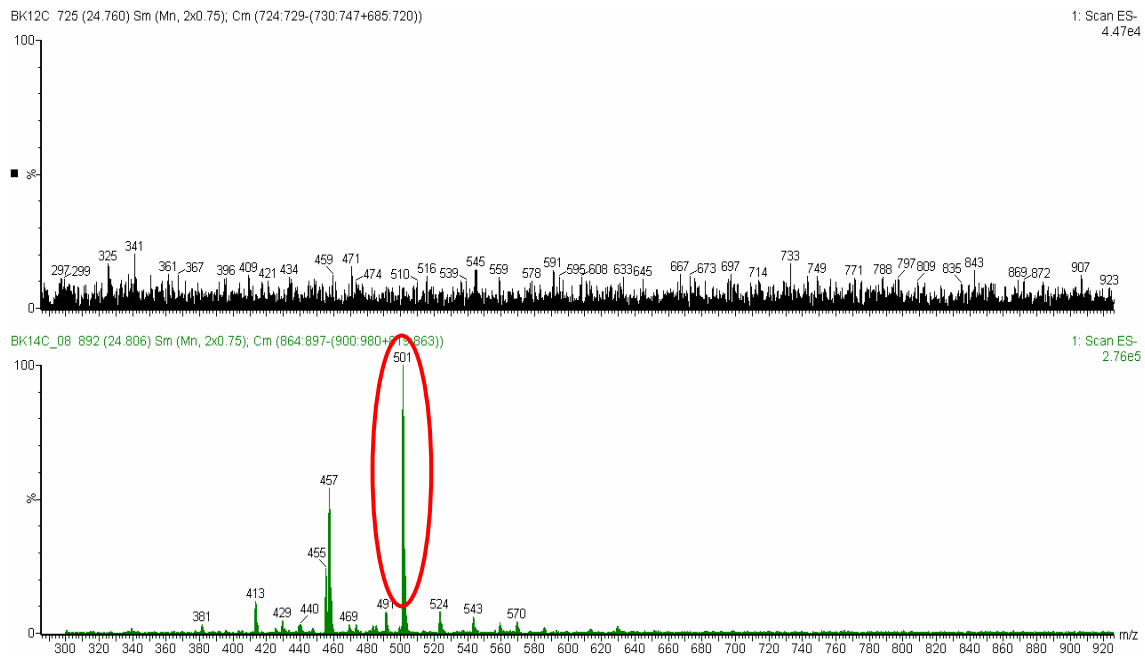


FIGURA 4.149: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria rhodina* + angolesato de metila (BK14C) e Meio + *Botryosphaeria rhodina* (BK12C)

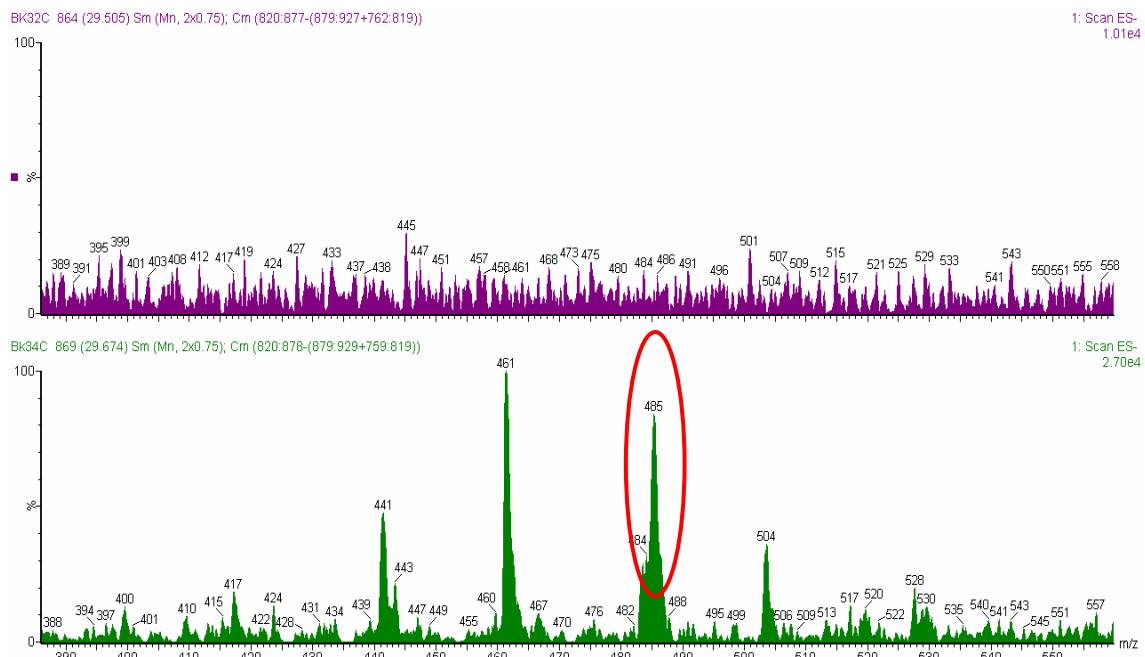


FIGURA 4.150: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria rhodina* + angolesato de metila (BK34C) e Meio + *Botryosphaeria rhodina* (BK32C)

†BK34C = Experimento feito em 15 dias com o fungo *Botryosphaeria rhodina* e angolesato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

†BK32C = Experimento feito em 15 dias com o fungo *Botryosphaeria rhodina* e angolesato de metila, extraído com diclorometano/metanol (7:3)

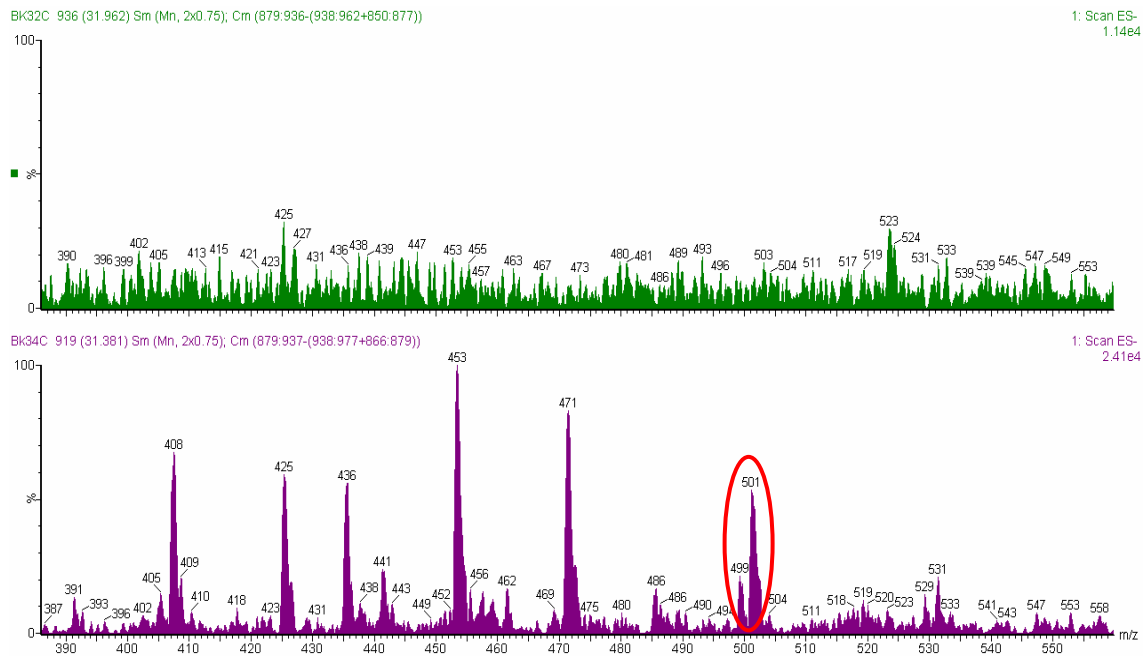


FIGURA 4.151: Espectro de massas (ES⁻) Meio + *Botryosphaeria rhodina* + angolesato de metila (BK34C) e Meio + *Botryosphaeria rhodina* (BK32C)

5 – Conclusões

Do estudo realizado com o caule de *K. ivorensis* sintomática e não sintomática, isolou-se sete linhagens de fungos, no entanto foram identificados apenas seis, sendo eles: *Penicillium ssp.*, *Rhizopus ssp.*, *Pestalotiopsis crassiuscula*, *Phomopsis sojae*, *Botryosphaeria rhodina* e seu anamorfo *Lasiodiplodia theobromae*. Estas quatro últimas espécies foram identificadas através das análises filogenéticas das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA, além de suas características macromorfológicas.

E de acordo com relatos na literatura (CEDEÑO *et al*, 1992; CROUS *et al*, 2000; PUNITHALINGAM *et al*, 1976), mais os resultados relatados neste trabalho, pode-se dizer que o causador da doença em *K. ivorensis* é o *Botryosphaeria rhodina*. Assim que for feito o depósito das seqüências de nucleotídeos no Gen Bank, estes resultados serão divulgados em uma revista específica da área de fitopatologia, já que este é o primeiro estudo de microorganismos associados ao mogno africano.

O estudo químico do patógeno *B. rhodina* levou ao isolamento de 16 compostos. Quatro deles (des-O-metillasioplodina, lasiodiplodina, ácido hidroxijasmônico e a isocumarina) isolados de *B. rhodina*, foi também do seu anamorfo (*Lasiodiplodia theobromae*). Os dois derivados γ -butirolactonas (5 β -propil-4-carboxi-3-metil- γ -butirolactona e 5-propil-4-metil-3-carboxi- γ -but-3-en-lactona), possivelmente são novos na literatura. Este estudo, permitiu conhecer ainda mais o perfil químico deste fungo.

Em relação aos ensaios feitos com as substâncias isoladas de *Botryosphaeria rhodina* como potenciais herbicidas, pode-se dizer que os resultados foram muito promissores em relação à lasiodiplodina, sendo que esta apresentou uma alta reação de inibição em comparação com outros compostos naturais, tais como o ácido trachyloban-19-oic (HERNÁNDEZ-TERRONES *et al*, 2003), xanthorrhizol (GONZÁLEZ-BERNARDO *et al*, 2003), tricolorin A (ACHNINE *et al*, 1999) e 6-(3,3-dimethylallyloxy)-4-methoxy-5-methylphthalide (DEMUNER *et al*, 2006). Medidas polarográficas e fluorescência da clorofila A, indicam que a lasiodiplodina inibi parcialmente a separação da enzima da água.

Nas análises realizadas por LC-MS não foi observado a biotransformação de 7-desacetoxi-7-oxo-gedunina em angolensato de metila. Foi

observado apenas pequenas modificações estruturais causadas pelos fungos. Dessa forma, pode-se inferir que o angolensato de metila encontrado em grande quantidade em *Khaya ivorensis* com cancro seria uma fitoalexina.

Como este é o primeiro estudo de microorganismos de *K. ivorensis*, seria interessante a continuação deste estudo para melhor se conhecer a interação entre o patógeno (*B. rhodina*) e a planta hospedeira (*K. ivorensis*).

6 – Referências Bibliográficas

- ALDRIDGE, D. C.; GALT, S.; GILES, D. & TURNER, W. B. “Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*”. *Journal of the Chemical Society C*: 1623, 1971.
- AMBROZIN, A. R. P.; Química e Atividade Inseticida do Óleo de *Carapa guianensis* e das Folhas de *Canavalia ensiformis*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2001, Dissertação de Mestrado.
- DUARTE, A. L. DE S.; Perfis Químicos e Metabólitos de fungos Endofíticos dos Gêneros *Eutypa*, *Trichoderma* e *Pestalotiopsis*, Isolados da Planta *Murraya paniculata*, *Strychnos congens*, *Pinus taeda* e *Gustavia cf. elliptica*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCAR, 2005, Tese de Doutorado.
- ASHA, K. N.; CHOWDHURY, R.; HASAN, C. M. and RASHID, M. A. “Steroids and Polyketides from *Uvaria hamiltonii* stem bark”. *Acta Pharmaceutical*. **54**: 57-63, 2004.
- ANDERSON, J. R. & EDWARDS, R. L. “Metabolites of the Higher Fungi. Part 22. 2-butyl-3-methylsuccinic acid and 2-Hexylidene Acid from Xylariaceous fungi”. *Journal Chemical Society Perkin Trans. I*:1481-1485, 1985.
- BARBIERI, R. L. & CARVALHO, I. F. “Coevolução de plantas e fungos patogênicos” *Revista Brasileira de Agrociência* **7** (2): 79-83, 2001.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; FILOMENO, C. A. “Síntese de novos herbicidas derivados do 1,2 α , 4 α , 5-tetrametil-8-oxabicyclo[3, 2, 1]oct-6-en-3-ona” *Química Nova*. **27**(2): 241-246, 2004.
- BARROS, F. A. B.; Metabólitos Secundários de *Eupenicillium sp.* Um Fungo Endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2002, Dissertação de Mestrado.
- BASTOS, D. Z. L.; Biotransformação por fungos Endofíticos do Ácido Betulínico e derivados. Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Química, 2005, Tese de Doutorado.
- BURGESS, T. I., BARBER, P. A., MOHALI, S., PEGG, G., BEER, W. & WINGFIELD, M. J. “Three new *Lasiodiplodina spp.* From the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology”. *Mycologia* **98** (3): 423-435, 2006.
- CAMBIE, R. C.; LAL, A. R.; RUTLEDGE, P. S. & WOODGATE, P. D. “Ent-14[S], 16 β , 17-trihydroxyatisan-3-one and Further Constituents from *Euphobia fidjiana*”. *Phytochemistry* **30** (1): 287-292, 1991.

- CARROL, G. "Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont". *Ecology* **69** (1): 2-9, 1988.
- CARROL, G. C. & PETRINI, O. "Patterns of Substrate Utilization by Some Endophytes from Coniferous Foliage". *Mycologia* **75**: 53-63, 1983.
- CARUSO, T.; BEDINI, E.; CASTRO, C. DE & PARRILLI, M. "Bronsted acidity of ceric ammonium nitrate in anhydrous DMF. The role of salt solvent in sucrose cleavage". *Tetrahedron* **62**: 2350-2356, 2006.
- CASTILLO-PANDO, M.; SOMERS, A.; GREEN, C. D.; PRIEST, M. & SRISKANTHADES, M. "Fungi associated with dieback of *Semillon* grapevines in the Hunter Valley of New South Wales". *Australian Plant Pathology* **30**: 59 – 63, 2001.
- CEDEÑO, L. & PALACIOS-PRÜ, E. "Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causa de lesiones y gomosis en cítricos" *Fitopatología Venezolana* **5**(1): 10-13, 1992.
- CHAPELA, I. H. "Fungi in Healthy Stems and Branches of American Beech and Aspen: a Comparative Study". *New Phytologist* **113**: 65-75, 1989.
- CLAY, K. "Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi". *Ecology* **69**(1): 10-16, 1988.
- CROUS, P. W.; PHILLIPS, A. J. L & BAXTER, A.P. "Phytopathogenic fungi from South Africa". University of Stellenbosch, Department of Plant Pathology Press, University of Stellenbosch Printers 2000.
- CURSINO-SANTOS, J. R.; DEFINA, T. P. A. & MARTINEZ-ROSSI, N. M. "Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular" – Ribeirão Preto, 2003, 45p.
- DENMAN, S.; CROUS, P. W.; EWALD, J. Z.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B. D. & WINGFIELD, M. J. "Circumscription of *Botryosphaeria* Associated with Proteaceae based on Morphology and DNA sequence data". *Mycologia* **95**(2): 294-307, 2003.
- DEWICK, P. M.; Medicinal Natural Products, 2^a ed., 2004.
- DOS SANTOS, A. F.; AUER, C. G. & GRIGOLETT JR., A. "Doenças de *Eucalipto* no Sul do Brasil Identificação e Controle" Circular Técnica **45**, EMBRAPA, 2001.
- DOS SANTOS, F. E. M.; SOBROSA, R. C.; COSTA, I. F. D. & CORDER, M. P. M. "Detecção de fungos patogênicos em sementes de *Acácia-negra* (*Acácia mearnsii* De Wild)" *Ciência Florestal* **11** (1): 13-20, 1999.

- DUKE, S. O.; ROMAGNIOMAGNI, J. G. & DAYAN, F. E. "Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action". *Crop Protection*, **19**: 583-589, 2000.
- GALLO, M. B. C.; Busca de produtos naturais bioativos em plantas das famílias Myrtaceae (*Siphonneugena densiflora* Berg) e Verbanaceae (*Vitex polygama* Cham.) São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005, Tese de Doutorado.
- GASPAROTTO, L.; HANADA, R. E.; ALBUQUERQUE, F. C. & DUARTE, M. L. R. "Mancha areolada causada por *Thanatephorus cucumeris* em mogno africano". *Fitopatologia Brasileira* **26** (3): 660-661, 2001.
- GRAHAM, B. J.; HUBER, R. S. & CHAPMAN, B. J. "Catalytic enantioselective synthesis of macrolides via asymmetric alkylation". *Tetrahedron: Asymmetry* **8** (11): 1797-1809, 1997.
- GREAVES, M. P. Microbial herbicides: Factors in development, In: COPPING, L. G. *Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues*, Cambridge, RCS, **501**: 444 – 467, 1996.
- GRIJPMAN, P., *Turrialba*, **20** (1): 85-93, 1970.
- HE, G.; MATSUURA, H. & YOSHIHARA, T. "Isolation of an α -methylene- γ -butyrolactone derivative, a toxin from the plant pathogen *Lasiodiplodia theobromae*" *Phytochemistry* **65**: 2803-2807, 2004.
- HEWITT, W. B. "*Diplodia* cane dieback and bunch rot. In: Compendium of Grape Diseases". APS Press, 1994.
- HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M. and Wright, A. D. "Three New Metabolites from Marine-Derived Fungi of the Genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*". *Journal Natural Products* **62**: 114-118, 1999.
- HOLT III, B. F.; MACKEY, D. & DANGL, J. L. "Recognition of pathogens by plants" *Curr. Biol.* **10** (1): R5-R7, 2000.
- HOWARD, R. J., FERRARI, M. A., ROACH, D. H. & MONEY, N. P. "Penetration of Hard Substrates by a fungus Employing Enormous Turgor Pressures". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88** (24): 11281-11284, 1991.
- JACOBI, P. A. & HERRADURA, P. "Enantioselective syntheses of (+)- and (-)-phaseolinic acid" *Tetrahedron Letters* **37**(44): 8297-8300, 1996.

- JACSON, A. O. & TAYLOR, C. B. "Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface". *The Plant Cell* **8**: 1651-1668, 1996.
- JARVIS, B. B. & MILLER, J. D. "Natural Products, Complexity and Evolution" In: *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. Romeo et al. New York, Plenum Press: 265-293, 1996.
- KIMURA, Y.; MISUNO, T. & SHIMADA, A. "Penidione and penihidrone, new plant growth regulators produced by the fungus *Penicillium sp.*". *Tetrahedron* **13**(38): 469-472, 1997.
- KIMURA, Y.; MISUNO, T.; SHIMADA, A. & KAWANO, T.; "Penidienone, a plant growth regulator produced by fungus, *Penicillium sp.*". *Phytochemistry* **21**(47): 323-325, 1998.
- KING-DIAZ, B., MACIAS-RUVALCABA, N., AGUILAR-MARTINEZ, M., CALAMINICI, P. & LOTINA-HENSSEN, B. "2-[(R-phenyl)amine]-1,4-naphthalendiones as photosystem I electron acceptor. Structure-activity relationship of m- and p-PAN compounds with QSAR analysis". *Journal of Photochemistry Photobiology*, **83**: 105-113, 2006.
- LARIGNON, P. & DUBOS, B. "The villainy of Black Dead Arm". *Wines and Vines* **82**(3): 86 – 89, 2001.
- LEE, K. H.; HAYASHI, N.; AKANO, M.; HALL, I. H.; WU, R. Y. & MCPHAIL, A. T. "Lasiodiplodin a Potent Antileukemic Macrolide from *Euphobia splendens*". *Phytochemistry* **21** (5): 1119-1121, 1982.
- LEHOCZKY, J. "Black Dead Arm. In: Compendium of Grape Diseases". APS Press, 1994.
- LEHOCZKY, J. "Black Dead-arm Disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection". *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **9**: 319 – 327, 1974.
- LI, J. Y.; SIDHU, R. S.; FORD, E. J.; LONG, D. M. & STROBEL, G. A. "The induction of taxol production in the endophytic fungus – *Periconio sp.* From *Torreya grandifolia*", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **20**: 259-264, 1998.
- LI, P.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H. AND YOSHIHARA, T. "Novel Potato Micro-Tuber-Inducing Compound, (3R,6S)-6-Hydroxylasiodiplodin, from a Strain of *Lasiodiplodia theobromae*", *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **69** (8): 1610-1612, 2005.

- LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. & DE AZEVEDO, D. M. P. "Podridão-do-caule e podridão-dos-ramos da mamoneira causada por *Botryodiplodia theobromae* pat." EMBRAPA, notas científicas, 1996.
- MARTINS, S. T. & MELO, B. "Spondas (Cajá e outras)" www.fruticultura.icivag.ufu.br/caja/html
- MATSUMOTO, M. & NAGO, H. "(R)-2-Octeno- δ -lactone and Other Volatiles Produced by *Lasiodiplodia theobromae*". *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **58**(7): 1262-1266, 1994.
- MATSUURA, H.; NAKAMORI, K.; OMER, E. A.; HATAKEYAMA, C.; YOSHIHARA, T. & CHIHARA, A. "Three Lasiodiplodins from *Lasiodiplodia theobromae* INFO 31059". *Phytochemistry* **49**(2): 579-584, 1998.
- MATSUURA, H.; OBARA, N.; CHISAKA, N.; ICHIHARA, A. & YOSHIHARA, T. "Novel Cyclohexene Compound from *Lasiodiplodia theobromae*". *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **62**(12): 2460-2462, 1998.
- MARINHO, A. M.; *Metabolismo Secundário de fungos Endofíticos do Gênero Penicillium Associados às Plantas Murraya Paniculata (RUTACEAE) e Melia azedarach (MELIACEAE)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação de Química – UFSCAR, 2005, Tese de Doutorado.
- MATSUURA, H.; AHKUBO, Y. and YOSHIHARA, T. "Occurrence of 11-hydroxyjasmonic acid glucoside in Leaflets of Potato Plants (*Solanum tuberosum* L.)". *Bioscience. Biotechnology Biochemistry* **65**(2): 378-382, 2001.
- MIERSCH, O., PREISS, A., SEMBDNER, G. & SCHREIBER, K. "(+)-7-Iso -jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*" *Phytochemistry*, **26** (4): 1037-1039, 1987.
- MIERSCH, O.; SCHMIDT, J.; SEMBDNER, G. & SCHREIBER, K. "Jasmonic Acid-Like Substances from the Culture Filtrate of *Botryodiplodia theobromae*". *Phytochemistry* **28** (5): 1303-1305, 1989.
- MIERSCH, O.; SCHNEIDER, G. & SEMBDNER, G. "Hydroxylated Jasmonic Acid and Relateds Compunds from *Botryodiplodia theobromae*". *Phytochemistry* **30**(2): 4049-4051, 1991.
- MILHOLLAND, R. D. "Muscadine Grapes: Some important diseases and their control". *Plant Disease* **75**: 113 – 117, 1991.
- MÜLLER, M. W.; BEZERRA, J. L.; SILVA, S. D. M. & ALMEIDA, O. C. "Ocorrência de cancro no mogno africano na Bahia" *Agrotropica* **14** (2): 81-84, 2002.

- NAGO, H. & MATSUMOTO, M. "An Ecological Role of Volatiles Produced by *Lasiodiplodia theobromae*". *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **58**(7): 1267-1232, 1994.
- NEL, A.; KRAUSE, M.; RAMAUTAR, N. & VAN ZYL, K. "A guide for the control of plant diseases" National Department of Agriculture, Republic of South Africa, 1999.
- NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. C.; LIMA, L. C. O. & RESENDE, M. L. V. "Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*" *Ciência Agrotecnica* **25** (3): 519-524, 2001.
- PASCHOLATI, S. F., STANGARLIN, J. R., LEITE, B. & SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. "Mecanismos de Patogenicidade em Fungos". *Revisão Anual de Patologia de Plantas* **6**: 1-47, 1998.
- PASCOE, I. Grapevine trunk diseases in Australia: Diagnostics and taxonomy. Proceedings of the 1998 Seminar and Workshop on Black Goo: Symptoms & occurrence of grape declines. pp.56 – 77, 1998a.
- PASCOE, I. Trunk diseases of grapevines - perspectives from a tour of California. *Australian Grapegrower and Winemaker* **417**: 68 – 71, 1998b.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M. and KRIZ, G. S.; Introduction to Spectroscopy, 3^a ed., Washington, 2001. ISBN 0-03-031961-7.
- PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E. C. S. *Microbiologia*, Vol. 1 e 2, São Paulo, Mc Graw-hill, 1981.
- PERRREIRA, J. L. A. "Fungos causadores de podridões em colmos e espigas diplodia maydis e D. macrospora" <http://orbita.starmedia.com/~fitopatologia/diplodia.htm>
- PHILLIPS, A. J. L, CORREIA, A. & LUQUE, J. "Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothirella* anamorphs". *Mycologia* **97**: 513-529, 2006.
- PHILLIPS, A. J. L. "*Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal". *Journal of Phytopathology* **146**: 327 – 332, 1998.
- PHILLIPS, A. J. L. "*Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal". *Phytopathologia Mediteranea* **41**: 3 – 18, 2002.

- PHILLIPS, A. J. L. “Excoriose, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens”. *Phytopathologia Mediteranea* **39**: 341 – 356, 2000.
- PILLMOOR, J. B. “Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature”. *Pesticide Science*, **52**: 75-80, 1998.
- PINHEIRO, M. M., SANDRONI, M., LUMMERZHEIM, M. & OLIVEIRA, D. E. “A Defesa das Plantas Contra as Doenças”. *Ciências Hoje* **25** (147): 25-31, 1999.
- POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; TRINDADE, D. R.; DUARTE, M. L. R.; CARVALHO, E. U. & MULLER C. H. “Detecção de *Phamerochaete salmonicolor* em mogno africano no estado do Pará” , 2002.
- PUNITHALINGAM, E. “Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacterias – *Botryodiplodia theobromae*, CDI”, n^o 519, 1976.
- RAKWAL, R.; TAMOKAMI, S.; AGRAWAL, G. & IWAHASHI, H. “Octadenoid Signaling Component “burst” in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedling leaves upon Wounding by Cut and Treat Ment with Fungal Elicitor Chitosan”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**: 1041-1045, 2002.
- RIZZINI, C. T. “Árvores e madeiras úteis do Brasil” Manual de Dendrologia Brasileira, Ed. Edgard Bhucher Ltda, 1971.
- ROBBS, C.F. & BITTENCOURT, A. M. “Controle Biológico de Insetos. Embrapa/ctaa” – biotecnologia ciência & desenvolvimento, 1999.
- SAKAI, T.; KATAYAMA, T, & TAKEDA, A. “Malonate anion induced Favorskii-type rearrangement. 2. reaction of acyclic α -halo ketones with carbanions leading to cyclopropanols” *Journal Organic Chemistry* **46**: 2924-2931, 1981.
- SANTOS, R. M^a. G. dos; Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium sp* e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004, Tese de Doutorado.
- SCHULTHESS, F. M. & FAETH, S. H. “Distribution, Abundances, and Associations of the Endophytic Fungal Community of Arizona Fescue (*Festuca arizonica*)”. *Mycologia* **90**(4): 569-578, 1998.
- SCHULZ, B., ROMMERT, A. K., DAMMANN, U., AUST, H. J. & STRACK, D. “The Endophytic-Host Interaction: A Balanced antagonism” *Mycological Research* **103**:1275-1283, 1999.

- SHIMADA, S.; HASHIMOTO, Y. & SAIGO, K. "Ring-opening Aldol-type reaction of 2,2-dialkoxycyclopropanecarboxylic esters with carbonyl compounds. 3. the diastereoselective synthesis of 2,3,4-trisubstituted γ -lactones" *Journal Organic Chemistry* **58**: 5226-5234, 1993.
- SICLAIR, J. B. & CERKAUSKAS, R. F. "Latent Infection vs. Endophytic Colonization by Fungi". *Endophytic Fungi in Grasses and woody Plants*, 2^a ed. Minnesota, APS Press Chapter 1: 3-30, 1996.
- SILVEIRA, R. L. V.A.; GONÇALVES, A. N. & KRÜGNER, T. L. "Estado nutricional de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivado sob diferentes doses de boro e sua relação com a agressividade de *Botryosphaeria ribis*" *Scientia Florestalis* **53**: 57-70, 1998.
- SILVERSTEIN, R. M. and WEBSTER, F. X.; Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6^a ed., Rio de Janeiro, LTC, 2000.
- SIMOM, N.; MENEGUZZO, A. & CALGANO, A. "Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste" EMBRAPA, 2005.
- SOLLADIÉ, G.; RUBIO, A.; CARREÑO, M. C. AND RUANO, J. L. G. "Asymmetric síntesis of Orsellinic Acid Type Macrolides: The Example of Lasiodiplodin". *Tetrahedron: Asymmetry* **1** (3): 187-198, 1990.
- STAHL, E. A. & BISHOP, J. P. "Plant-pathogen arms races at the molecular level" *Curr. Opin. Plant Biologic* **3**: 229-304, 2000.
- STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D. GROTHAUS, P. & BIGNAMI, G. "The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*", *Journal of Natural Products* **20**: 1315-1324, 1995.
- TURNER, W. B. & ALDRIDGE, D. C. Fungal Metabolites II. London, Academic Press, 1983, 631p.
- VAN, N. J. M., CROUS P. W., GROENEWALD, J. Z. & FOURIE G. "DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines". *Mycologia* **96**: 781-798, 2004.
- VAN, N. J.; CROUS, P.; FOURIE, P.; GROENEWALD, E. & HALLEEN, F." *Botryosphaeria* canker and dieback of grapevines", 2000.
- VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. & VIDAL, J. C "Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste", *Comunicado Técnico* **86**, 2003.

- VIEIRA, I. J. C.; Uma Contribuição à Química da Família Simaroubaceae. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1995, Tese de Doutorado.
- VEIGA, T. A. M.; SILVA, S. C.; ARCHUNDIA-CAMACHO, F.; FILHO, E. R.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MÜLLER, M. W. & LOTINA-HESSER, B. “Inhibition of Photophosphorylation and Electron Transport Chain in Thylakoids by Lasiodiplodin, a Natural Products from *Botryosphaeria rhodina*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 4217-4221, 2007.
- VYVYAN, J. R. “Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals”, *Tetrahedron* **58**: 1631-1646, 2002.
- www.dag.uem.br/trigo/doencas
- www.naturlink.pt/canais/artigos.asp
- XYN-SHENG, Y.; EBIZUKA, Y.; NUGUCHI, H.; KIUCHI, F.; LITAKA, Y. and SANKAWA U. “Structure of Arnebinol, a New Ansa-Type Monoterpenylbenzene with Inhibitory Effect to Prostaglandin Biosynthesis”. *Tetrahedron Letters* **24**(23): 2407-2410, 1983.
- YANG, Q.; ASAI, M.; MATSUURA, H. & YOSHIHARA, T. “Potato Micro-Tuber Inducing Hydroxylasiodiplodins from *Lasiodiplodia theobromae*”. *Phytochemistry* **54**: 489-494, 2000.

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](#)