**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Bioprospecção de plantas da família Solanaceae com atividade
fungitóxica à *Moniliophthora perniciosa***

Flávio Rocha

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2015**

Flávio Rocha
Biólogo

Bioprospecção de plantas da família Solanaceae com atividade fungitóxica à
Moniliophthora perniciosa

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Rocha, Flávio

Bioprospecção de plantas da família Solanaceae com atividade fungitóxica à *Moniliophthora perniciosa* / Flávio Rocha. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
211 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Produto natural 2. Fitopatógeno 3. Saponina 4. *Brunfelsia uniflora* 5. *Solanum seaforthianum* 6. *Cestrum nocturnum* I. Título

CDD 635.64
R672b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A minha família, especialmente aos meus pais Cícero e Emília por sempre
acreditarem na minha dedicação.

Aos meus sobrinhos Samira, Maria Eduarda e Gabriel que, apesar de pequenos, já
se orgulham de seu tio coruja.

E à minha futura família que será construída ao lado de minha amada, Muriel
Prado.

AGRADECIMENTOS

A Universidade de São Paulo, a CAPES e a FAPESP pela infraestrutura, apoio financeiro e pela bolsa de doutorado (Processo FAPESP 2012/02861-0). Agradeço novamente a FAPESP pelo apoio financeiro por meio de projeto regular (Processo FAPESP 2014/15760-3) e de projeto temático (Processo FAPESP 2013/50228-8).

A minha orientadora Dra. Simone Possedente de Lira pela amizade, confiança, paciência e pela condução deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes e a Dra. Keila Maria Roncato Duarte pela amizade, ajuda e por me guiarem até este momento.

Ao aluno de iniciação científica Jorge Henrique Custodio (FAPESP, processo 2011/11272-6) pelo tempo que participou e colaborou neste trabalho.

Ao Dr. Vinicius Castro Souza e Dr. Gerson Oliveira Romao (Herbário ESA, ESALQ) pela coleta e identificação das plantas.

Ao Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck (QOSBio, IQSC) por disponibilizar laboratório e o equipamento CLAE-UV-ELSD-MS. E as técnicas Dra. Fabiana Tessari Rodrigues e Dra. Karin Fabiana Bandeira de Camargo por toda ajuda e paciência.

Ao Dr. Antonio Gilberto Ferreira e a técnica Ms. Luciana Vizotto (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, UFSCAR) pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao Dr. Edson Rodrigues Filho (LaBioMMi, UFSCAR) e ao Dr. Douglas Ferreira pela recepção, ajuda e obtenção de espectros de HRMS e RMN.

Ao Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira e Ms. Juliana Leles Costa (CENA, USP) pelo auxílio nos ensaios biológicos e por disponibilizar basidiósporos de *M. perniciosa*.

A Dra. Daniela Paula Toledo Thomazella pela recepção e por disponibilizar linhagens de *M. perniciosa*.

A Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner e ao técnico José Antonio da Silva (Zezo) (ESALQ) por fornecer algumas das linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Marcos Yassuo Kamogawa, Dr. Arquimedes Lavorenti, Dr. Marcelo Eduardo Alves e a Dra. Wanessa Melchert Mattos por disponibilizar laboratório e equipamentos.

Aos técnicos Ms. Felipe Gabriel Andrino, Janaina Truffi, Gertrudes C. B. Fornazier, Lenita M. C. P. E. Oliveira e Rita de Cassia L. de Castro pelos vários auxílios.

A secretária Maria Fernanda Almeida Prado, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, por todo auxílio durante este curso.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Luciana Mecatti Elias, Jozé Aparecida Marciano Corrêa, Diana Fortkamp, Gislaine Vicente dos Reis, Richtier Gonçalves da Cruz, José Brites Neto, Ana Claudia Lo Buono Tavares, Isabela Maria Nascimento, Marcos Pinto Monteiro de Oliveira e Natália Alexandrino pelos momentos de diversão, criatividade e auxílio na execução deste trabalho.

Aos meus amigos de departamento Jeane Maria Cunha Machado, Cleiton dos Santos Mattos, Amanda Ribeiro Martins da Silva, Fernanda Souza Krupek e Jeová Correia Miranda pelo companheirismo e pelos bons momentos.

Ao Sergio Birello Sartori e Marcos Canto Machado pela amizade, disposição em ajudar e pelas releituras deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Camila Fortunato da Silva, Natasha Linhares de Lima Braga, Higor Augusto Seraphim Pimpinato, Isabelli Casagrande e Jessica Aparecida Ferrarezi pela amizade e aos bons momentos.

Aos meus amigos do Instituto de Zootecnia e Pontifícia Universidade Católica de Campinas pelas boas lembranças.

A minha namorada Maria Muriel de Cássia Silva Prado pelas releituras, por me acompanhar, tolerar e me compreender durante toda a execução deste trabalho.

EPÍGRAFE

"O homem científico não pretende alcançar um resultado imediato, ele não espera que suas ideias avançadas sejam imediatamente aceitas. Seus trabalhos são como sementes para futuro, seu dever é lançar as bases para aqueles que estão por vir e apontar o caminho."

Nikola Tesla

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo principal.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3.1 Importância econômica e distribuição do cacaueteiro	31
3.2 Principais doenças do cacaueteiro	32
3.3 Origem e impacto econômico da vassoura-de-bruxa	33
3.4 Ciclo da infecção por <i>Moniliophthora perniciosa</i> no cacaueteiro	34
3.5 Métodos de controle da vassoura-de-bruxa	36
3.6 Controle químico da vassoura-de-bruxa.....	38
3.7 Produtos naturais como pesticidas.....	39
3.8 Produtos naturais como fungicidas	41
3.9 Metabólitos vegetais inibidores de fungos fitopatógenos	44
3.10 Metabólitos antifúngicos de solanáceas	45
3.11 Participação das saponinas no mecanismo de defesa vegetal	48
3.12 Mecanismos de resistência aos compostos vegetais.....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Obtenção de plantas pertencentes a família Solanaceae	53
4.1.1 Coleta de plantas solanáceas	53
4.1.2 Cultivo de plantas solanáceas.....	53
4.1.3 Identificação botânica das espécies e depósito em herbário	53
4.2 Obtenção dos extratos aquosos.....	54
4.3 Técnicas cromatográficas para purificação dos compostos	54
4.3.1 Partição líquido-líquido	54
4.3.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada	54
4.3.3 Cromatografia em coluna por permeação em gel	55
4.3.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	55
4.3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	56
4.4 Técnicas utilizadas para Estudo químico dos compostos	56
4.4.1 Espectrometria de Massas e Ultravioleta	56
4.4.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução	58
4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear.....	58
4.5 Reação de hidrólise ácida com as frações SsM5d6a e BuM8i4.....	59

4.6 Protocolos dos bioensaios e fitopatógenos utilizados.....	59
4.6.1 Fungos fitopatógenos utilizados	59
4.6.2 Preservação e armazenamento dos fungos	60
4.6.3 Ensaio biológico por diluição em ágar	61
4.6.4 Ensaio biológico de difusão em disco	62
4.6.5 Ensaio biológico por microdiluição.....	62
4.6.6 Ensaios biológicos com fungicidas	63
4.7 Análise estatística	63
Referências.....	65
5 SELEÇÃO DAS PLANTAS PERTENCENTES À FAMÍLIA SOLANACEAE COM ATIVIDADE INIBITÓRIA A <i>M. perniciosa</i>	73
RESUMO	73
ABSTRACT.....	73
5.1 Introdução.....	74
5.2 Resultados e discussão	74
5.3 Conclusões	81
Referências.....	82
6 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS DE <i>S. seaforthianum</i>	85
RESUMO	85
ABSTRACT.....	85
6.1 Introdução.....	86
6.2 Resultados e Discussão	86
6.3 Estudo químico de SsM5d6a	92
6.3.1 Estudo químico dos esteróides em SsM5d6aH1	104
6.4 Estudo químico de SsM5d6c	115
6.5 Atividade inibitória dos compostos de <i>S. seaforthianum</i> a <i>M. perniciosa</i>	130
6.6 Conclusões	136
Referências.....	137
7 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS DE <i>B. uniflora</i>	141
RESUMO	141
ABSTRACT.....	141
7.1 Introdução.....	142
7.2 Resultados e Discussão	142
7.3 Estudo químico de BuM8i4	147
7.3.1 Estudo químico do esteróide em BuM8i4H1	150
7.4 Estudo químico de BuM8i5	158
7.5 Estudo químico de BuM8i6	167

7.6 Atividade inibitória dos compostos de <i>B. uniflora</i> a <i>M. perniciosa</i>	174
7.7 Conclusões.....	179
Referências	180
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
APÊNDICES.....	185
ANEXOS	189

RESUMO

Bioprospecção de plantas da família Solanaceae com atividade fungitóxica à *Moniliophthora perniciosa*

O fungo *Moniliophthora perniciosa*, fitopatógeno responsável pela doença vassoura-de-bruxa no cacauero, é responsável por reduzir a produtividade de frutos de cacau nas Américas. Visto que os métodos atuais de controle desta doença não são eficientes, faz-se necessário a busca por compostos para seu controle químico. Os produtos naturais têm contribuído na síntese de novos pesticidas e a família Solanaceae é reconhecida como uma fonte promissora de compostos antifúngicos. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo explorar o potencial biológico e químico de metabólitos secundários produzidos por plantas da família Solanaceae com atividade antifúngica à *M. perniciosa*. Para tanto, extratos aquosos de folhas de dez plantas foram avaliados quanto sua atividade inibitória a *M. perniciosa* e, observou-se maior atividade antifúngica pelos extratos de *Cestrum nocturnum*, *Solanum seaforthianum* e *Brunfelsia uniflora*. Destas, as plantas *S. seaforthianum* e *B. uniflora* mostram-se como promissoras e foram selecionadas para isolamento de seus compostos ativos. A partir do extrato aquoso de *S. seaforthianum* obteve-se duas frações constituídas por saponinas furostanas, a mistura (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside, com CI_{50} de $40,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, e a mistura (25R)-timosaponin H_1 / (25R)-uttroside B, com CI_{50} de $22,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ao crescimento micelial. E, a partir do extrato aquoso de *B. uniflora* obteve-se três compostos da classe das saponinas espirostanas, o composto karatavioside A e os compostos parcialmente identificados BuM8i4, com aglicona identificada como (25R)-yucagenina, e BuM8i6, com aglicona identificada como (25R)-diosgenina, todos com $CI_{50} < 15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ ao crescimento micelial de *M. perniciosa*. Todos os compostos caracterizados neste trabalho estão sendo relatados pela primeira vez a partir das plantas estudadas e também para atividade antifúngica.

Palavras-chave: Produto natural; Fitopatógeno; Saponina; *Brunfelsia uniflora*; *Solanum seaforthianum*; *Cestrum nocturnum*

ABSTRACT

Bioprospection of Solanaceae plants with fungitoxic activity against *Moniliophthora perniciosa*

The fungal phytopathogen *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of Witches' Broom disease and the main responsible by limiting cacao production in Americas. The current disease control methods are not efficient and new antifungal compounds are necessary to the chemical management. Natural products has contributed to the development of natural product-based pesticides and the Solanaceae plants are known as a promising source of antifungal compounds. In this context, this work aimed to explore the biological and chemical potential of secondary metabolites produced by Solanaceae plants with antifungal activity against *M. perniciosa*. For this, antifungal activity of water extracts from leaves of ten plants was evaluated against *M. perniciosa* and the best results were observed by using extracts from *Cestrum nocturnum*, *Solanum seaforthianum* e *Brunfelsia uniflora*. Among these plants, *S. seaforthianum* and *B. uniflora* were selected for active compounds isolation due to their promising characteristics. From water extract of *S. seaforthianum* two furostan saponin fractions were obtained, the mixture (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside, with IC_{50} of $40,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the mixture (25R)-timosaponin H₁ / (25R)-uttroside B, with IC_{50} of $22,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ to the mycelial growth. From water extract of *B. uniflora* three spirostan saponin compounds were obtained, the compound karatavioside A and the compounds partially identified BuM8i4, with aglycone identified as (25R)-yucagenina, and BuM8i6, with aglycone identified as (25R)-diosgenina, all these compounds showed $IC_{50} < 15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ to the mycelial growth of *M. perniciosa*. All compounds characterized in this study were obtained for the first time from these plants and also described about their antifungal activity.

Keywords: Natural product; Phytopathogen; Saponin; *Brunfelsia uniflora*; *Solanum seaforthianum*; *Cestrum nocturnum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tendências regionais na produção global de sementes de cacau, adaptado de Ploetz (2007) e ICCO (2015)	32
Figura 2 – Produção de sementes de cacau no Brasil de 1961 à 2013 (FAOSTAT, 2015)	34
Figura 3 – Ciclo da doença vassoura-de-bruxa, como resultado da interação cacaueiro- <i>M. perniciosa</i> . Modificado de (SILVA NETO <i>et al.</i> , 2001)	36
Figura 4 – Impacto dos pesticidas baseados ou inspirados em produtos naturais (PN), em relação aos produtos sintéticos (PS), na venda de pesticidas no mundo em 2012 (esquerda). E, representação percentual da contribuição dos produtos naturais aos mecanismos de ação dos pesticidas comerciais (direita). Adaptado de (GERWICK e SPARKS, 2014)...	39
Figura 5 – Novos ingredientes ativos registrados para pesticidas convencionais e biopesticidas, entre 1997 a 2010 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Classificados como, produtos naturais (PN), produtos sintéticos (PS), produtos sintéticos derivados de produtos naturais (PS derivado de PN) e biológico (CANTRELL, DUKE e DAYAN, 2012)	40
Figura 6 –Fluxograma para seleção das plantas solanáceas, valores entre parênteses representam a quantidade de espécies vegetais	76
Figura 7 – Foto de <i>Solanum seaforthianum</i>	86
Figura 8 – Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica contra <i>M. perniciosa</i> , por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, avaliando (SsA) fração aquosa, (SsM) fração metanólica e (SsH) fração hexânica do extrato <i>S. seaforthianum</i>	87
Figura 9 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica contra <i>M. perniciosa</i> , por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com as 10 frações resultantes da cromatografia em coluna Sep-Pak C ₁₈ da fração SsM	87
Figura 10 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a <i>M. perniciosa</i> , por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com 15 frações resultantes da cromatografia em gel Sephadex® LH-20, da união das frações SsM5 e SsM6	88
Figura 11 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a <i>M. perniciosa</i> , por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com 10 frações resultantes da cromatografia em coluna Sep-Pak C18 da união das frações SsM5d, SsM5e e SsM5f.....	89
Figura 12 – Cromatograma da fração SsM5d6, frações coletados e bioensaio contra <i>M. perniciosa</i> por difusão em disco com 0,1 mg de amostra. Detector UV em 210 nm, eluição em gradiente com água e metanol. Coluna C ₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm), vazão da fase móvel a 1 mL min ⁻¹	89
Figura 13 - Ensaio de atividade antifúngica a <i>M. perniciosa</i> , por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com as frações SsM5d6a, SsM5d6e e controle contendo somente metanol (CM)	90

Figura 14 – Cromatograma para as frações SsM5d6a e SsM5d6e (a) e para as frações SsM5d6c e SsM5d6g (b). Detector em 210 nm. Eluição isocrática com água e metanol (30:70). Coluna C ₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm), vazão da fase móvel a 1 mL min ⁻¹	91
Figura 15 – Cromatograma de CLAE-ELSD (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração SsM5d6a. Coluna C ₁₈ (2,1 x 150 mm - 3,5µm), vazão da fase móvel a 0,5 mL min ⁻¹	92
Figura 16 – Espectro de massas em modo ESI positivo da fração SsM5d6a	93
Figura 17 –Padrão de fragmentação proposto para o composto SsM5d6a, a partir do íon parental m/z 1211 [M + H] ⁺ (a) e do fragmento m/z 619 [M + H] ⁺ (b)	94
Figura 18 – Esquema proposto para composição de SsM5d6a segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a) e (b) não possuem posição definida	95
Figura 19 – Espectro de massas de alta resolução, em modo negativo, da fração SsM5d6a	95
Figura 20 – Estrutura química de (25R)-Karatavioside C (1) e 22-Metil éter (25R)-Karatavioside C (2)	96
Figura 21 – Correlações HSQC e HMBC da aglicona de SsM5d6a com 22-Metil éter (25R)-Karatavioside C e (25R)-Karatavioside C	99
Figura 22 – Região ampliada do espectro de RMN ¹ H (600 MHz) e ¹³ C (150 MHz) de SsM5d6a correspondente aos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- <i>d</i> ₅ , δ em ppm)	101
Figura 23 – Estrutura química de licotetraose (MILNER et al., 2011)	102
Figura 24 – Espectro de massas em modo ESI positivo da fração SsM5d6a, espectro superior refere-se a Karatavioside C e o espectro inferior ao composto com duas unidades de massa superior [M + 2]	103
Figura 25 – Espectro de massas em modo ESI positivo de SsM5d6aH1	104
Figura 26 –Padrão de fragmentação proposto para SsM5d6aH1, a partir do íon parental m/z 431 [M + H] ⁺	105
Figura 27 – Reação de clivagem do anel E espirostano, pelo rearranjo de McLafferty, com formação do fragmento de 144 Da, de acordo com Liang et al.,(2002)	105
Figura 28 – Estrutura química de (25R)-yucagenina	106
Figura 29 – Estrutura básica de saponinas espirostana e furostana (R= molécula de açúcar), mostrando sistema de nomeação dos anéis e numeração dos carbonos para esteroides, de acordo com Challinor e De Voss (2013)	106
Figura 30 – Correlações HSQC, COSY e HMBC de SsM5d6aH1 com gitogenina e yucagenina. Deslocamentos de hidrogênio em vermelho e carbono em azul	111
Figura 31 – Estrutura química de (25R)-Purpureagitoside (1), (25R)-Karatavioside C (2) e a forma metoxilada de ambos (3)	112
Figura 32 – Região ampliada do espectro de RMN ¹ H (600 MHz) de SsM5d6aH1 (em piridina- <i>d</i> ₅ , δ em ppm)	113

Figura 33 – Cromatograma de espalhamento dinâmico de luz (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração SsM5d6c. Coluna C ₁₈ (2,1 x 150 mm - 3,5µm), vazão da fase móvel a 0,5 mL min ⁻¹	115
Figura 34 – Espectro de massas em modo ESI positivo da fração SsM5d6c	116
Figura 35 – Padrão de fragmentação proposto para o composto SsM5d6c, a partir do íon parental m/z 1195 [M + H] ⁺ (a) e do fragmento m/z 619 [M + H] ⁺ (b)	117
Figura 36 – Esquema proposto para composição de SsM5d6c segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a) e (b) não possuem posição definida.....	117
Figura 37 – Espectro de massas de alta resolução, em modo negativo, da fração SsM5d6c	118
Figura 38 – Estrutura química de (25R)-timosaponin H ₁ (1) e 22-Metil éter timosaponin H ₁ (2).....	119
Figura 39 – Correlações HSQC e HMBC de SsM5d6c com 22-Metil éter (25R)-timosaponin H ₁ e (25R)-timosaponin H ₁	121
Figura 40 – Região ampliada do espectro de RMN ¹ H (600 MHz) e ¹³ C (150 MHz) de SsM5d6c correspondente aos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- <i>d</i> ₅ , δ em ppm)	123
Figura 41 – Espectro de massas em modo ESI positivo da fração SsM5d6c, espectro superior refere-se a timosaponin H ₁ e o espectro inferior ao composto com duas unidades de massa superior [M + 2]	124
Figura 42 – Correlações HSQC, COSY e HMBC do esteroide de SsM5d6c com uttroside B e timosaponin H ₁ . Deslocamentos de hidrogênio em vermelho e carbono em azul	127
Figura 43 – Estrutura química de (25R)-uttroside B (1), (25R)-timosaponinH ₁ (2) e a forma metoxilada de ambos (3)	127
Figura 44 – Atividade inibitória do extrato aquoso e saponinas de <i>S. seaforthianum</i> , e de piraclostrobina a germinação de basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> , em seis concentrações (µg mL ⁻¹). Valores em percentual de germinação de basidiósporos em relação ao controle (=100)	130
Figura 45 – Curva de crescimento pela densidade micelial (600 nm) de <i>M. pernicioso</i> . Os valores representam a média de seis replicatas ± desvio padrão	131
Figura 46 – Atividade inibitória do extrato aquoso e saponinas de <i>S. seaforthianum</i> , e de piraclostrobina ao crescimento micelial de <i>M. pernicioso</i> , em seis concentrações (µg mL ⁻¹). Valores expressam a densidade micelial a 600 nm após 7 dias de cultivo	132
Figura 47 – Foto da microplaca com o ensaio de atividade inibitória, pelo método de microdiluição, do extrato aquoso e saponinas de <i>S. seaforthianum</i> , e de piraclostrobina ao crescimento micelial de <i>M. pernicioso</i> , em seis concentrações (µg mL ⁻¹) e após 7 dias de cultivo ...	133
Figura 48 – Foto de <i>Brunfelsia uniflora</i>	142
Figura 49 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a <i>M. pernicioso</i> , por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, avaliando (BuA) fração aquosa, (BuM) fração metanólica e (BuH) fração hexânica do extrato de <i>B. uniflora</i>	143

Figura 50 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a <i>M. pernicioso</i> , por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com as 10 frações resultantes da cromatografia em coluna Sep-Pak C ₁₈ da fração BuM.....	143
Figura 51 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a <i>M. pernicioso</i> , por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com 17 frações resultantes da cromatografia em gel Sephadex® LH-20 da fração BuM8.....	144
Figura 52 – Cromatograma da fração BuM8i, picos coletados, e bioensaio contra <i>M. pernicioso</i> por difusão em disco com 0,1 mg de amostra. Detector UV em 210 nm, eluição em gradiente com água, metanol e acetonitrila. Coluna C ₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm), vazão da fase móvel a 1 mL min ⁻¹	145
Figura 53 – Espectro de massas em modo ESI positivo (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração BuM8i4.....	147
Figura 54 –Padrão de fragmentação proposto para o composto BuM8i4, a partir do íon parental m/z 1181 [M + H] ⁺ (a) e do fragmento m/z 751 [M + H] ⁺ (b).....	148
Figura 55 –Esquema proposto para composição de BuM8i4 segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a) e (b) não possuem posição definida	149
Figura 56 – Espectro de massas de alta resolução, em modo positivo, da fração BuM8i4	149
Figura 57 – Espectro de massas em modo ESI positivo de BuM8i4H1	151
Figura 58 –Padrão de fragmentação proposto para BuM8i4H1, a partir do íon parental m/z 431 [M + H] ⁺	151
Figura 59 – Região ampliada do espectro de RMN ¹ H (600 MHz) de BuM8i4H1 (em piridina- <i>d</i> ₅ , δ em ppm)	154
Figura 60 – Estrutura química de (25R)-agabrittonoside A.....	155
Figura 61 – Região ampliada do espectro de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) de BuM8i4 correspondente aos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- <i>d</i> ₅ , δ em ppm)	156
Figura 62 – Perfil de CCD de BuM8i4H2 (amostra central). Padrões de D-xilose (X), L-arabinose (A), D-glicose (GL), D-galactose (GA). Eluição com clorofórmio : metanol : água (8:5:1 v:v:v). Revelado com o reagente anisaldeído	157
Figura 63 – Espectro de massas em modo ESI positivo (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração BuM8i5.....	158
Figura 64 –Padrão de fragmentação proposto para o composto BuM8i5, a partir do íon parental m/z 1049 [M + H] ⁺ (a) e do fragmento m/z 619 [M + H] ⁺ (b).....	159
Figura 65 –Estrutura proposta para o composto BuM8i5 segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a), (b) e (c) não possuem posição definida.....	160
Figura 66 – Espectro de massas de alta resolução, em modo positivo, da fração BuM8i5	160
Figura 67 – Estrutura química de (25R)-Karatavioside A.....	161

Figura 68 – Região ampliada do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de BuM8i5 correspondente aos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- d_5 , δ em ppm)	165
Figura 69 – Espectro de massas em modo ESI positivo (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração BuM8i6	167
Figura 70 – Padrão de fragmentação proposto para o composto BuM8i6, a partir do íon parental m/z 1165 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (a) e do fragmento m/z 751 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (b)	168
Figura 71 – Esquema proposto para composição de BuM8i6 segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a) e (b) não possuem posição definida.....	169
Figura 72 – Espectro de massas de alta resolução, em modo positivo, da fração BuM8i6	169
Figura 73 – Estrutura química de (25R)-agabrittonoside B	170
Figura 74 – Região ampliada do espectro de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de BuM8i6 correspondente aos carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- d_5 , δ em ppm) ..	173
Figura 75 – Atividade inibitória do extrato aquoso e saponinas de <i>B. uniflora</i> , e de piraclostrobina a germinação de basidiósporos de <i>M. perniciosa</i> , em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Valores em percentual de germinação de basidiósporos em relação ao controle (=100)	174
Figura 76 – Curva de crescimento pela densidade micelial (600 nm) de <i>M. perniciosa</i> . Os valores representam a média de seis replicatas $\pm$ desvio padrão	175
Figura 77 – Atividade inibitória do extrato aquoso e saponinas de <i>B. uniflora</i> , e de piraclostrobina ao crescimento micelial de <i>M. perniciosa</i> , em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Valores expressam a densidade micelial a 600 nm após 7 dias de cultivo.....	175
Figura 78 – Foto da microplaca com ensaio de atividade inibitória, pelo método de microdiluição, do extrato aquoso e saponinas de <i>S. seaforthianum</i> , e de piraclostrobina ao crescimento micelial de <i>M. perniciosa</i> , em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e após 7 dias de cultivo ...	176

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos de solanáceas com atividade antifúngica ou anti-oomiceto	46
Tabela 2 – Gradiente de eluição utilizado nas análises por CLAE-UV-ELSD-MS, coluna C ₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm).....	57
Tabela 3 – Gradiente de eluição utilizado nas análises por CLAE-UV-ELSD-MS, coluna C ₁₈ (2,1 x 150 mm - 3,5µm).....	57
Tabela 4 – Fungos utilizados nos ensaios biológicos <i>in vitro</i>	60
Tabela 5 – Fungicidas utilizados nos ensaios biológicos <i>in vitro</i>	63
Tabela 6 – Plantas solanáceas. Nome científico, nome popular, código da coleção e número de catálogo pelo depósito em herbário.....	75
Tabela 7 – Atividade inibitória do extrato aquoso de plantas solanáceas (2%) ao fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i> CP44, na fase saprofítica	76
Tabela 8 - Atividade inibitória do extrato aquoso de <i>B. uniflora</i> , <i>C. nocturnum</i> e <i>S. seaforthianum</i> (2 %) a biotipos de <i>M. perniciosa</i> e a <i>F. oxysporum</i> , <i>P. sojae</i> e <i>R. pusillus</i>	77
Tabela 9 - Concentração inibitória média (CI ₅₀) a <i>M. perniciosa</i> , biotipo FA553, CP02, APS1 e WMAS, pelo extrato aquoso de <i>B. uniflora</i> , <i>C. nocturnum</i> e <i>S. seaforthianum</i>	78
Tabela 10 – Gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica de SsM5d6 em coluna de fase reversa C ₁₈	90
Tabela 11 – Deslocamentos de RMN ¹ H, ¹³ C e HSQC da aglicona de SsM5d6a e correspondência com os deslocamentos de Karatavioside C (δ em ppm, J in Hz)	98
Tabela 12 – Deslocamentos de RMN ¹ H e ¹³ C da glicona de karatavioside C e correspondência com os deslocamentos de SsM5d6a (δ em ppm, J in Hz)	100
Tabela 13 – Correlações de RMN ¹ H e ¹³ C de yucagenina com os deslocamentos químicos de SsM5d6aH1 (δ em ppm, J in Hz).....	108
Tabela 14 – Correlações de RMN ¹ H e ¹³ C de (25R)-gitogenin com os deslocamentos químicos de SsM5d6aH1 (δ em ppm, J in Hz).....	110
Tabela 15 – Deslocamentos de hidrogênio (δ) de esteroides espirostanos 25R/25S segundo Agrawal (2003) e de SsM5d6aH1, em piridina-d ₅ (δ _H em ppm)	113
Tabela 16 – Deslocamentos de RMN ¹ H e ¹³ C e HSQC da aglicona de (25R)-timosaponin H ₁ e correspondência com os deslocamentos de SsM5d6c (δ em ppm, J in Hz).....	120
Tabela 17 – Deslocamentos de RMN ¹ H e ¹³ C e HSQC de SsM5d6c e correspondência com a glicona de timosaponin H ₁ (δ em ppm, J in Hz)	122
Tabela 18 – Correlações de RMN ¹ H, ¹³ C e HSQC da aglicona de (25R)-uttroside B com os deslocamentos químicos da aglicona de SsM5d6c (δ em ppm, J in Hz)	126
Tabela 19 – Deslocamentos de hidrogênio (δ) de esteroides furostanos 25R/25S segundo Agrawal (2005) e do esteroide de SsM5d6c, em piridina-d ₅ (δ _H em ppm).....	128
Tabela 20 – Concentração inibitória média (CI ₅₀) do extrato aquoso e saponinas de <i>S. seaforthianum</i> , e de piraclostrobina a taxa germinação e crescimento micelial de <i>M. perniciosa</i>	134

Tabela 21 – Gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica de BuM8i em coluna de fase reversa C ₁₈	145
Tabela 22 – Saponinas vegetais de massa $1180,5477 \pm 0,005$ Da, com glicona de 3 hexoses e 2 pentoses e, aglicona de massa 430 Da	150
Tabela 23 – Correlações de RMN ¹ H, ¹³ C e HSQC de BuM8i4H1 com os deslocamentos químicos de yucagenina (δ em ppm, <i>J</i> in Hz)	153
Tabela 24 – Correlações de RMN ¹ H, ¹³ C e HSQC da glicona de BuM8i4 com os deslocamentos químicos dos prótons e carbonos anoméricos de agabrittonoside A (δ em ppm, <i>J</i> in Hz)	155
Tabela 25 – Correlações de RMN ¹ H, ¹³ C e HSQC da aglicona de BuM8i5 com os deslocamentos químicos de karatavioside A (δ em ppm, <i>J</i> in Hz)	162
Tabela 26 – Deslocamentos de RMN ¹ H, ¹³ C e HSQC de BuM8i5 e correspondência com os deslocamentos da glicona de karatavioside A (δ em ppm, <i>J</i> in Hz)	164
Tabela 27 – Correlações de RMN ¹ H, ¹³ C e HSQC de BuM8i6 com os deslocamentos químicos da aglicona de agabrittonoside B (δ em ppm, <i>J</i> in Hz)	171
Tabela 28 – Correlações de RMN ¹ H, ¹³ C e HSQC da glicona de BuM8i6 com os deslocamentos químicos dos prótons e carbonos anoméricos de agabrittonoside B (δ em ppm, <i>J</i> in Hz)	172

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

δ	Deslocamento químico
$[M+H]^+$	Íon quase-molecular protonado
$[M+Na]^+$	Íon quase-molecular aduto de sódio
μ	Micro
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Microgramas em um mililitro
B.O.D.	Biochemical oxygen demand
C_{18}	Sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano
CCD	Cromatografia em camada delgada
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CI_{50}	Concentração inibitória média
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Dubleto
Da	Dalton
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
dq	Duplo quadrupeto
dt	Duplo tripleto
ELSD	Evaporating Light Scattering Detector
ESI	Electrospray ionization
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High-resolution mass spectrometry
j	Constante de acoplamento
m	Multipeto
m/z	Relação massa carga
mg	Miligrama
min.	Minutos
MS	Mass spectrometry
Piridina- d_5	Piridina deuterada
q	Quadrupeto
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto

sl	Singleto largo
t	Tripleto
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

A importância econômica do cacauero origina-se, principalmente, do tratamento dado às suas sementes, matérias primas fundamentais e de grande valor econômico industrial para fabricação de chocolate, consumido no mundo todo; pela manteiga de cacau, muito utilizada pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos; também pela polpa do fruto que vem conquistando mercados, inclusive internacionais; e, por último, pela polpa de suas sementes, de onde se extrai o mel do cacau utilizado na fabricação de vinho, vinagre, licores e geléias (MENEZES E CARMO-NETO, 1993).

Nas Américas, as lavouras de cacau são acometidas pela doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (DIAS, 2001). A chegada da vassoura-de-bruxa no sul da Bahia fez com que a produção brasileira de sementes de cacau caísse de terceira maior do mundo (MEINHARDT et al., 2008) para atualmente a sexta posição, cobrindo apenas 5,1 % da produção mundial (ICCO, 2015).

Desde seu primeiro registro, diferentes estratégias para controle da vassoura-de-bruxa foram desenvolvidas e, dentre estas, quatro são largamente empregadas e estudadas: poda fitossanitária; controle químico; controle biológico e seleção e melhoramento genético de cacaueros visando resistência.

No controle químico, os fungicidas sintéticos e de ação sistêmica são amplamente utilizados para controle de doenças fúngicas, contudo, seu uso indiscriminado tem induzido importantes patógenos a desenvolverem resistência. Para evitar o surgimento de resistência ou diminuir a tolerância de fungos já resistentes, sugere-se o uso combinado, ou alternância, de múltiplas drogas inibidoras (GANGAWANE, 1990; THOMAZELLA et al., 2012).

No controle de pestes os produtos naturais podem ser utilizados diretamente, como modelo ou como inspiração para o desenvolvimento de novos pesticidas sintéticos, de forma a terem sua eficácia e atributos melhorados. Sendo que, uma porção significativa do mercado de pesticidas se deve a influência dos produtos naturais (GERWICK e SPARKS, 2014).

Um grande número de evidências experimentais fortalecem a ideia de que os metabólitos secundários vegetais se diversificaram por seleção natural a fim de

proteger as plantas contra vírus, bactérias, fungos, plantas concorrentes, e principalmente contra herbívoros (WiNK, 2003).

Dentre as inúmeras famílias botânicas, a família Solanaceae, principalmente as plantas do gênero *Solanum*, se destacam pela contribuição no fornecimento de compostos bioativos (WINK, 2003).

Entre os metabólitos antifúngicos da família Solanaceae, muitos estão representados dentro da classe das saponinas (YAZDANI et al., 2011), inclusive o composto α -tomatina de *Lycopersicon esculentum*, conhecido por sua atividade inibitória a *M. pernicioso* (GOMES et al., 2014).

As saponinas são um grande grupo de metabólitos secundários pré-formados caracterizados por sua ação surfactante, devido sua estrutura contendo uma porção apolar, um esteroide ou triterpeno (aglicona), e uma porção polar formada por uma ou mais cadeias de açúcares (glicona) (OSBOURN et al., 1998).

Portanto, este trabalho objetivou estudar plantas solanáceas fungitóxicas a *M. pernicioso* e, também isolar e identificar seus constituintes químicos antifúngicos visando seu potencial para controle de *M. pernicioso*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Explorar o potencial dos metabólitos secundários produzidos por espécies da família Solanaceae como agentes inibidores de crescimento do fungo *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*), agente causal da vassoura-de-bruxa do cacaueiro.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar triagem de espécies solanáceas, por meio da avaliação de extratos aquosos oriundos de folhas de 10 plantas da família Solanaceae, ao crescimento micelial do fungo *M. perniciosa* na fase saprofítica *in vitro*;
- Selecionar as espécies solanáceas de maior atividade inibitória a *M. perniciosa* e, isolar os compostos inibidores do extrato por métodos cromatográficos e elucidá-los estruturalmente por métodos espectrométricos;
- Avaliar a especificidade da atividade inibitória dos extratos aquosos por meio de ensaio *in vitro* contra isolados de *M. perniciosa*, *Phomopsis sojae*, *Rhizomucor pusillus* e *Fusarium oxysporum*;
- Determinar a atividade biológica como fungicida ou fungistática e a concentração inibitória mínima ou média dos extratos aquosos e dos compostos puros por meio de avaliação *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância econômica e distribuição do cacauero

O nome para o cacauero, como *Theobroma cacao* L., espécie pertencente à família Malvaceae, foi primeiramente designado por Carolus Linnaeus, em 1735, que significa: “*alimento dos Deuses*”. Acredita-se que os povos Maias e Astecas viam o cacauero como um presente divino. A palavra cacau deriva de *cacahuatl*, termo Maia para o fruto (DIAS, 2001).

A importância econômica do cacauero deve-se às suas sementes, matérias primas fundamentais e de grande valor econômico para fabricação de chocolate. O seu fruto é utilizado no mundo todo pela manteiga de cacau, muito utilizada pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos; também pela polpa do fruto, de interesse aos mercados internacionais e por último, pela polpa de suas sementes, de onde se extrai o mel do cacau utilizado na fabricação de vinho, vinagre, licores e geléias (MENEZES E CARMO-NETO, 1993).

As principais regiões produtoras de cacau no mundo situam-se nas latitudes entre 15º Norte e 20º Sul, faixa tropical (ALVIM E KOZLOWSKI, 2013). Nas regiões onde concentram-se os maiores plantios, a temperatura média varia entre 22º C a 25º C. A precipitação pluvial é elevada e bem distribuída ao longo do ano (DIAS, 2001).

O continente africano se destaca como maior produtor mundial, com 72,3 % da produção de sementes de cacau, sendo Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões, os principais países produtores deste continente. O continente americano ocupa a segunda posição com 16,7 %, com Brasil e Equador como seus maiores produtores. Ásia e Oceania ocupam a terceira posição, com 11,0 % da produção mundial, destacando-se os países Indonésia e Papua-Nova Guiné (Figura 1) (ICCO, 2015).

Figura 1 - Tendências regionais na produção global de sementes de cacau, adaptado de Ploetz (2007) e ICCO (2015)

3.2 Principais doenças do cacaueiro

Cada região produtora de cacau é afetada por alguma doença de importância econômica, somando-as estima-se um dano de 20 % na produção anual global. Nas Américas as lavouras de cacau são acometidas pela vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) e também pela podridão-parda (*Phytophthora spp.*), apesar de menos danosa que a vassoura-de-bruxa encontra-se disseminada por todas as áreas que produzem cacau no mundo (DIAS, 2001). No oeste da África o fungo *Phytophthora megakarya* é o responsável pela podridão-parda, considerado o agente mais virulento desta doença (PLOETZ, 2007). Outra preocupante doença que ataca os frutos é a monilíase (*Moniliophthora roreri*), o qual ocorre em toda a América do Sul, exceto no Brasil (DIAS, 2001). A doença “vascular-streak dieback” (VSD) ou morte-descendente, causada pelo fungo *Oncobasidium theobromae*, acomete os cacaueiros de Papua-Nova Guiné e é caracterizada como principal doença desta região (GUEST e KEANE, 2007).

Além dessas há outras de menor importância, como o mal-rosado, (*Phanerochaete salmonicolor*), a murcha-de-verticillium (*Verticillium dahliae*), a antracnose (*Glomerella cingulata*), o cancro e a podridão-das-raízes, dentre outras (DIAS, 2001).

3.3 Origem e impacto econômico da vassoura-de-bruxa

A doença vassoura-de-bruxa teve seu primeiro registro científico em 1895, no Suriname, onde causou perdas consideráveis na produção de frutos de cacau. Em 1918, foi constatada no Equador e, posteriormente na Colômbia, Venezuela, Guianas e Ilhas do Caribe, disseminando-se para todos os países produtores de cacau do continente americano (DIAS, 2001; SILVA NETO et al., 2001).

Embora esta doença ocorresse de forma endêmica em cacauzeiros nativos na região Amazônica, seu centro de origem, a vassoura-de-bruxa só foi constatada no sul da Bahia, principal região brasileira produtora de cacau, em 1989. Ao encontrar condições ambientais extremamente favoráveis, a doença disseminou-se em aproximadamente 95% da região, atingindo proporções epidêmicas e causando, em curto espaço de tempo, problemas sociais profundos e um grande dano na economia regional (Figura 2) (SILVA NETO et al., 2001).

A chegada da vassoura-de-bruxa no sul da Bahia fez com que a produção brasileira de sementes de cacau caísse de terceira maior do mundo (MEINHARDT et al., 2008) para atualmente a sexta posição, cobrindo apenas 5,1 % da produção mundial (ICCO, 2015). Com isso, a produção brasileira de cacau deixou de ser capaz de atender a demanda interna pelo produto, tornando-se importador desta matéria prima.

Figura 2 – Produção de sementes de cacau no Brasil de 1961 à 2013 (FAOSTAT, 2015)

Além de atacar o cacaueiro, o fungo causador da vassoura-de-bruxa também é encontrado parasitando outras espécies do gênero *Theobroma*, como o cupuaçuazeiro (*Theobroma grandiflorum*) e espécies do gênero *Herrania* sp., ambas da família Malvaceae (DIAS, 2001). Outras famílias botânicas também podem ser infectadas por este fitopatógeno, como a Solanaceae (BASTOS e EVANS, 1985), Malpighiaceae (GRIFFITH, 2004), Bixaceae (OLIVEIRA e LUZ, 2005) e Bignoniaceae (MEINHARDT et al., 2008). Entretanto, os maiores impactos econômicos são observados nas culturas do cacau (*T. cacao*) e cupuaçu (*T. grandiflorum*), visto seu maior interesse comercial (SILVA NETO et al., 2001).

3.4 Ciclo da infecção por *Moniliophthora perniciosa* no cacaueiro

O fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) (AIME e PHILLIPS-MORA, 2005) (*Crinipellis perniciosa*) é um fungo do filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae, ordem Agaricales e família Marasmiaceae (MEINHARDT et al., 2008).

De acordo com o hospedeiro de que é isolado *M. perniciosa* pode ser classificado em cinco biotipos: biotipo C - que infecta espécies de *Theobroma* sp. e *Herrania* sp.; biotipo S - que infecta espécies de *Solanum* sp.; biotipo H - que infecta

a espécie *Heteropterys acutifolia*; biotipo L - que infecta lianas e restos de plantas de espécies de *Arrabidaea* sp. (MEINHARDT et al., 2008) e biotipo B – que infecta a espécie *Bixa orellana* (BASTOS e ANDEBRHAN, 1986).

A interação entre *M. perniciosa* e o cacauzeiro é classificada como hemibiotrófica, por apresentar duas fases morfológicas distintas: biotrófica e necrotrófica (saprofítica) (EVANS, 1980).

A infecção por *M. perniciosa* ocorre quando os basidiósporos hialinos (esporos) infectam os tecidos meristemáticos jovens através dos estômatos (FRIAS, PURDY e SCHMIDT, 1991) tais como brotos vegetativos, almofadas florais, flores, e frutos imaturos (PURDY e SCHMIDT, 1996).

Os sintomas da vassoura-de-bruxa variam de acordo com o órgão afetado e seu estágio de desenvolvimento, mas os sintomas mais característicos ocorrem na fase biotrófica, de crescimento intercelular, de micélio espesso, monocariótico, e sem grampo de conexão; que acarreta crescimento hiperplásico e hipertrófico dos tecidos meristemáticos (HOLIDAY, 1980), os quais são associados à perda de dominância apical, resultando na formação da “vassoura verde” quando os brotos vegetativos são infectados.

Quando as almofadas florais são infectadas há ocorrência de agrupamento de flores anormais, hipertrofiadas, de pedicelo alongado e inchado, estes dão origem a frutos partenocárpicos e deformados (PURDY e SCHMIDT, 1996). Quando os frutos são infectados ainda jovens através do epicarpo, geralmente têm seu crescimento paralisado com aproximadamente 15 cm de comprimento e perdem o valor comercial devido ao apodrecimento das amêndoas (SILVA NETO et al., 2001). Depois de 2 à 3 meses, o fungo prolifera e coloniza os tecidos mortos e alterna para a fase necrotrófica, de crescimento inter e intracelular, micélio fino, dicariótico e com grampo de conexão (CALLE, COOK e FERNANDO, 1982); com subsequente produção de basidiocarpos e formação de basidiósporos (Figura 3) (PURDY e SCHMIDT, 1996).

Figura 3 – Ciclo da doença vassoura-de-bruxa, como resultado da interação cacaueiro-*M. pernicioso*. Modificado de (SILVA NETO *et al.*, 2001)

Os basidiocarpos são produzidos em todos os tecidos afetados depois de mortos ou “mumificados”. Cada basidiocarpo libera, frequentemente à noite, milhares de basidiósporos que acabam disseminados pelo vento ou pela chuva, e ao infectarem outra planta dão início novamente ao ciclo da doença (SILVA NETO *et al.*, 2001).

3.5 Métodos de controle da vassoura-de-bruxa

Desde seu primeiro registro, no Suriname, diferentes estratégias para controle da vassoura-de-bruxa foram desenvolvidas e, dentre estas, quatro são largamente empregadas e estudadas: poda fitossanitária; controle químico; controle biológico; e seleção e melhoramento genético de cacaueiros visando resistência.

A poda fitossanitária é considerada como um método de controle eficaz em plantações isoladas e com baixa incidência da infecção (ANDEBRHAN, ALMEIDA e NAKAYAMA, 1998). Este método compreende remoção e destruição das partes afetadas pela doença na planta, método que retarda seu avanço. No entanto, onde a incidência é elevada, torna-se uma estratégia onerosa, visto que necessita de pelo menos remoção de 95 % das partes afetadas para reduzir em 50 % as perdas (RUDGARD e BUTLER, 1987). Essa estratégia é comumente realizada em conjunto com a poda normal, uma prática realizada todos os anos e consiste na eliminação de

galhos indesejáveis promovendo o raleamento e rebaixamento de copas compactadas (SILVA NETO et al., 2001).

O controle químico, muito estudado, é utilizado na forma de protetores ou fungicidas sistêmicos, no entanto, não é rotineiramente aplicado na produção de cacau devido seu elevado custo, elevado risco de contaminação das sementes de cacau e também do meio ambiente (MEINHARDT et al., 2008). O controle químico, normalmente, não é uma prática isolada, mas uma prática complementar à poda fitossanitária, porque, além de ajudar no controle da vassoura-de-bruxa, controla também outras doenças do cacauzeiro (SILVA NETO et al., 2001).

O controle biológico baseia-se na utilização de fungos antagonistas, principalmente espécies de *Trichoderma* sp., que quando aplicados sobre a planta provem proteção e controle de *M. perniciosa* por vários mecanismos, como: antibiose, indução de resistência, competição pelo nicho e micoparasitismo. No entanto, sua efetividade é discutível, necessitando de mais informações sobre a relação entre o ambiente de cultivo do cacauzeiro, o estabelecimento e sobrevivência dos agentes empregados no biocontrole (MEINHARDT et al., 2008).

Considerado o método mais efetivo, dentre os apresentados, o melhoramento genético do cacauzeiro visa obtenção de variedades resistentes à vassoura-de-bruxa. Para isso, cacauzeiros silvestres com fenótipos de resistência foram coletados no alto Amazonas e utilizados como genitores de combinações híbridas, o resultado foram plantas implantadas com sucesso em alguns países da América do Sul. No entanto, apesar do resultado satisfatório inicial, as plantas ainda apresentaram um nível de infecção pela vassoura-de-bruxa. No Equador e Colômbia, alguns anos após sua reintrodução, a resistência dessas plantas foi quebrada pelo patógeno. Diante de tais resultados, o melhoramento visando resistência do cacauzeiro é considerado prioritário pelos diversos institutos de pesquisa de cacau do mundo (DIAS, 2001).

Outra estratégia, e a mais recomendada onde a incidência da doença é elevada, é o emprego em conjunto dos quatro métodos anteriormente mencionados, estratégia conhecida como manejo integrado. A proposta do manejo integrado contra a vassoura-de-bruxa propõe: uso da poda fitossanitária para remover as partes infectadas da planta; aplicação do controle químico para proteção dos frutos em desenvolvimento; utilização de cacauzeiros resistentes ao fungo; e aplicação do controle biológico sobre o material removido e deixado no solo (DIAS, 2001).

No Brasil, após o declínio na produção com a chegada da vassoura-de-bruxa, o frequente uso das técnicas citadas à cima têm possibilitado certo crescimento, porém muito lento na produção de frutos de cacau (ICCO, 2012). Apesar dos avanços tecnológicos no controle da doença vassoura-de-bruxa, o patógeno tem mostrado uma excepcional capacidade de adaptação frente a estes, o que dificulta ainda mais seu controle (MIDDLEJ, 2011).

3.6 Controle químico da vassoura-de-bruxa

Os fungicidas sintéticos e de ação sistêmica são amplamente utilizados para controle de doenças fúngicas. Contudo, seu uso indiscriminado tem induzido importantes patógenos a desenvolverem resistência. Para evitar o surgimento de resistência ou diminuir a tolerância de fungos já resistentes, Gangawane (1990) sugere o uso combinado, ou alternância, de múltiplos compostos inibidores.

Os fungicidas atualmente empregados para controle da vassoura-de-bruxa são os cúpricos, os triazóis, as benzanilidas e as estrobilurinas que agem reduzindo a infecção nas almofadas florais e frutos, a esporulação e produção de basidiocarpos; diminuem ou eliminam a produção de frutos deformados, a formação de vassouras em brotos vegetativos e as vassouras verdes (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Dentro do manejo integrado que emprega-se na cacauicultura, a aplicação de fungicida constitui o insumo de maior custo, uma vez que recomenda-se realizar de quatro à cinco pulverizações anuais na época de floração e início da frutificação (SILVA NETO et al., 2001).

Em vista de tal quadro, a queda na produção de frutos de cacau nos países da América do Sul e inefetividade dos métodos empregados no controle da vassoura-de-bruxa, há uma demanda por novos métodos de controle, inclusive de compostos antifúngicos que apresentem maior eficiência e menor impacto ambiental, como alternativa ao controle químico atualmente empregado no controle da doença.

Apesar de ser uma área pouca explorada, o uso de compostos de origem natural para o controle de fitopatógenos na agricultura têm começado a ganhar a atenção da comunidade científica, graças à sua gama de compostos bioativos.

3.7 Produtos naturais como pesticidas

Devido ao crescimento da população global a demanda por alimentos tornou-se igualmente maior, conseqüentemente, também elevou-se a necessidade por medidas para amenizar a ação de insetos, ervas daninha e fungos que reduzem a produtividade das lavouras. Outro problema se deve a crescente resistência das pragas aos agroquímicos atualmente disponíveis, o que eleva a necessidade por novos produtos para controle destes (GERWICK e SPARKS, 2014).

No controle de pragas os produtos naturais podem ser utilizados diretamente, como modelo ou como inspiração para o desenvolvimento de novos pesticidas sintéticos, de forma a terem sua eficácia e atributos melhorados (GERWICK e SPARKS, 2014). Observa-se que, a contribuição destes têm sido significativa, conforme ilustrado na figura 4.

Figura 4 – Impacto dos pesticidas baseados ou inspirados em produtos naturais (PN), em relação aos produtos sintéticos (PS), na venda de pesticidas no mundo em 2012 (esquerda). E, representação percentual da contribuição dos produtos naturais aos mecanismos de ação dos pesticidas comerciais (direita). Adaptado de (GERWICK e SPARKS, 2014)

De acordo com Cantrell, Duke e Dayan (2012), 277 novos ingredientes ativos foram registrados entre 1997 e 2010 como pesticidas pela Agência de Controle Ambiental dos Estados Unidos. Estes autores verificaram que, dentre os pesticidas convencionais e biopesticidas, os produtos naturais contribuíram significativamente na descoberta de novos ingredientes ativos, em número superior aos produtos sintéticos, conforme a figura 5.

Figura 5 – Novos ingredientes ativos registrados para pesticidas convencionais e biopesticidas, entre 1997 a 2010 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Classificados como, produtos naturais (PN), produtos sintéticos (PS), produtos sintéticos derivados de produtos naturais (PS derivado de PN) e biológico (CANTRELL, DUKE e DAYAN, 2012)

Portanto, Cantrell, Duke e Dayan (2012) discutem que ao contrário da comum percepção de que produtos naturais não sejam boas fontes para confecção de novos pesticidas, seus dados comprovam que há cada vez mais contribuição dos produtos naturais para origem destes, por meio de seu uso direto ou como derivado.

Os inseticidas compreendem a classe de pesticidas mais influenciada pelos produtos naturais. No ano de 2012, as vendas de inseticidas arrecadaram \$US 13 bilhões no mercado global e, destes, 47,5 % das classes de inseticidas foram derivadas de produtos naturais, que representaram 65,3 % das vendas (GERWICK e SPARKS, 2014).

Na venda de herbicidas, do total arrecadado no mercado global em 2012, \$US 24.9 bilhões, uma pequena fração (0,1 %) deveu-se a produtos naturais, mas uma significativa fração das vendas (10,2 %) deveu-se a herbicidas derivados de produtos naturais (GERWICK e SPARKS, 2014).

Enquanto que as vendas de fungicidas arrecadaram em 2012 \$US 14.5 bilhões no mercado global, deste valor 31,1 % foram devido a fungicidas derivados de produtos naturais e, entre estes a maioria das vendas foi devido a classe química estrobilurina, que sozinha foi responsável por 29,5 % das vendas (GERWICK e SPARKS, 2014).

3.8 Produtos naturais no manejo de fungos

Os fungicidas foram menos influenciados por produtos naturais em comparação aos outros pesticidas (GODFREY, 1994), visto que a contribuição destes na origem de fungicidas foi de somente 17 % (GERWICK e SPARKS, 2014).

Como produtos naturais diretamente empregados como fungicida, pode-se citar:

Os antibióticos inibidores de síntese de proteína blasticidina-S (1), kasugamicina (2), estreptomicina (3), oxitetraciclina (4), validamicina A (5) e mildiomicina (6), todos produzidos por microorganismos (GERWICK e SPARKS, 2014);

O fungicida inibidor da síntese de quitina, polioxina B (7) de *Streptomyces cacaoi* var *asoensis* (GODFREY, 1994);

Os ramnolipídeos, glicolipídios produzidos comercialmente à partir de *Pseudomonas aeruginosa* (OCHSNER et al., 1995; DUSANE et al., 2010). O fungicida comercial é composto por duas moléculas, um anel de ramnose com uma calda de ácido graxo e outra com dois anéis de ramnose e uma cauda de ácido graxo (RHAMNOLIPIDS, 2015);

A proteína harpina da bactéria *Erwinia amylovora* e o polissacarídeo laminarina da alga *Laminaria digitata*, que agem de forma similar, na qual o manejo de fungos se deve a sua ação como indutor de resistência vegetal (COPPING e DUKE, 2007);

O extrato de folhas da planta *pink plume poppy* (*Macleaya cordata*), vendido como fungicida por conter os alcalóides sanguinarina (8), queleritrina (9), protopina e alocriptopina. Sendo os dois primeiros reconhecidos como potentes fungicidas e bactericidas *in vitro* (LIU et al., 2009; EPA, 2015);

O produto Milsana, que compreende um extrato etanólico da planta *Reynoutria sachalinensis*, recomendado para controle de doenças fúngicas em plantas mantidas em casa de vegetação. Sua eficácia se deve por ação antifúngica direta, mas também por induzir resistência na planta (COPPING, 2009);

As preparações de saponinas oriundas de *Chenopodium quinoa* (STUARDO e MARTIN, 2008), de *Quillaja saponaria* (DIXIT, TEWARI e OBENDORF, 2010) e da mistura de extratos de *Quercus falcata*, *Rhus aromatica*, *Magifera indica* e *Opuntia*

spp. Preparações que foram aprovadas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para uso no controle de nematóides e fungos fitopatógenos (CANTRELL, DUKE e DAYAN, 2012; EPA, 2015).

Como modelo ou inspiração para síntese de fungicidas sintéticos, os produtos naturais foram mais influentes, no qual, pode-se citar:

Os fungicidas da classe estrobilurina, oriundos de *Strobilurus tenacellus*, *Xerula spp.* e *Cyphellopsis anomala* (GODFREY, 1994) que agem como inibidores da cadeia transportadora de elétrons no sítio ubiquinol (Q₀) no complexo III (SAUTER, 2007). As estrobilurinas deram origem a mais de 15 produtos que incluem, azoxistrobina (**10**), piraclostrobina (**11**), trifloxistrobina (**12**) e kresoxim-metil (**13**) (CANTRELL, DUKE e DAYAN, 2012).

Os fungicidas da classe fenilpirrol, baseados em pirrolnitrina (**14**) de espécies de *Pseudomonas* spp., que deu origem aos fungicidas fenpiclonil (**15**) e fludioxonil (**16**) (ACKERMANN e ZEUN, 2007);

O produto sintético acibenzolar-S-metilico (**17**), inspirado no produto natural ácido salicílico (**18**) (KESSMANN et al., 1994; KESSMANN et al., 1996), na qual o

manejo de fungos se deve a sua ação como indutor de resistência vegetal (GERWICK e SPARKS, 2014).

Além do exposto, Gerwick e Sparks (2014) discutem que muitos outros produtos naturais possuem potencial para aplicação como fungicida e, que o estudo de novos produtos naturais para atividade fungicida é uma proposta viável para o desenvolvimento de novos produtos e com novos mecanismos de ação.

O emprego de produtos vegetais no controle de fitopatógenos têm sido uma alternativa aos produtores, principalmente na agricultura orgânica, e sua viabilidade é comprovada como método alternativo de controle (COPPING e DUKE, 2007; GURJAR et al., 2012).

3.9 Metabólitos vegetais inibidores de fungos fitopatógenos

O termo produto natural é um sinônimo de metabólito secundário (HARTMANN, 2007), que designa os compostos não são essenciais à vida, mas que definem a capacidade de sobrevivência de cada espécie no ecossistema em que se encontra inserida (BRATT, 2000).

Um grande número de evidências experimentais fortalece a ideia de que os metabólitos secundários vegetais se diversificaram por seleção natural a fim de proteger as plantas contra vírus, bactérias, fungos, plantas concorrentes e principalmente contra herbívoros. Motivo pela qual estão, geralmente, distribuídos diferentemente entre grupos taxonômicos, nos tecidos e órgãos de uma mesma planta, de acordo com estágio de desenvolvimento e condições do ambiente. Sendo comum que órgãos importantes para sobrevivência e reprodução apresentem os metabólitos secundários com maior bioatividade (WINK, 2003).

De acordo com Yoon, Cha e Kim (2013) o desenvolvimento e utilização de fungicidas botânicos (fungicidas baseados em metabólitos vegetais) poderiam ajudar a diminuir o impacto negativo dos fungicidas sintéticos, tal como resíduos químicos,

resistência de microorganismos e poluição ambiental. Estes consideram que os fungicidas botânicos podem ser efetivos, seletivos e de menor toxicidade ao ambiente.

Além dos extratos e preparações vegetais citados anteriormente, muitos outros compostos de origem vegetal têm sido descobertos como possuindo atividade inibitória a fungos fitopatógenos. Como verificado no trabalho de revisão de Yazdani et al. (2011), que observaram atividade antifúngica de plantas de 62 gêneros vegetais, dentro de 31 famílias e destes, a grande maioria dos trabalhos limitaram-se a trabalhar apenas com o óleo essencial ou com o extrato bruto da planta, não atribuindo a identidade do metabólito responsável pela bioatividade.

Como exemplo de metabólito vegetal utilizado como fungicida pode-se citar o cinamaldeído (**19**), um composto oriundo do óleo essencial da canela (*Cinnamomum spp.*), geralmente aplicado em sua forma sintética, para controle dos fungos fitopatógenos *Verticillium fungicola*, *Sclerotinia homeocarpa* e *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* (COPPING, 2009; EPA, 2005).

O modo de ação de cinamaldeído não é bem entendido, mas possui baixa toxicidade e é rapidamente degradado no ambiente (YOON, CHA e KIM, 2013).

Dentre as inúmeras famílias botânicas, a família Solanaceae, principalmente as plantas do gênero *Solanum*, se destacam pela contribuição no fornecimento de compostos bioativos (WINK, 2003).

3.10 Metabólitos antifúngicos de solanáceas

A família Solanaceae A. Juss., uma das maiores famílias angiospermas, contêm muitos dos vegetais e frutas essenciais à alimentação. É composta por 98 gêneros contendo aproximadamente 2716 espécies (OLMSTEAD e BOHS, 2007), está amplamente distribuída por toda região tropical do planeta e, com menor frequência, em regiões de clima temperado (WINK, 2003).

Esta família é a que se encontra em maior diversidade na América do Sul (DAVENPORT, 2004). No Brasil, a família Solanaceae é composta por 33 gêneros e

470 espécies, sendo 4 gêneros e 221 espécies endêmicas do país (STEHMANN et al., 2015).

Dentre a grande variedade de metabólitos secundários desta família conhecidos por sua bioatividade, aqueles de atividade antifúngica ou anti-oomiceto estão listados na tabela 1.

Tabela 1 – Compostos de solanáceas com atividade antifúngica ou anti-oomiceto

Composto	Planta	Fungo alvo	Autor
AFP-J	<i>Solanum tuberosum</i>	5; 21; 18	(PARK et al., 2005)
Capsidiol (20)	<i>Capsicum frutescens</i>	14	(GORDON, STOESSL e STOTHERS, 1973)
CAY-1 (21)	<i>Capsicum frutescens</i>	3	(DE LUCCA et al., 2002)
Demissidina (22)	<i>Solanum leucocarpum</i>	18	(NINO, CORREA E MOSQUERA, 2009)
Glutinosona (23)	<i>Nicotiana glutinosa</i>	7; 19	(BAILEY, VINCENT E BURDEN, 1976)
Phytuberina (24)	<i>Solanum tuberosum</i>	14; 9; 13; 12; 15; 4; 1	(HARRIS e DENNIS, 1976)
Rishitina (25)	<i>Solanum</i> spp.	14	(KATSUI et al., 1968)
Solafloridina (26)	<i>Solanum</i> spp.	5; 20	(KUSANO et al., 1987)
Solamargina (27)	<i>Solanum marginatum</i>	7; 6	(ROWAN, MACDONALD e SKIPP, 1983)
Solanocapsina (28)	<i>Solanum</i> spp.	5; 20	(KUSANO et al., 1987)
Solanopubamina (29)	<i>Solanum schimperianum</i>	5	(AL-REHAILY et al., 2013)
Solasodenona (30)	<i>Solanum aviculare</i>	7; 6	(ROWAN, MACDONALD e SKIPP, 1983)
Solasodina (31)	<i>Solanum aviculare</i>	7; 6	(ROWAN, MACDONALD e SKIPP, 1983)
Solavetivona (32)	<i>Solanum tuberosum</i>	9; 12; 13	(HARRIS e DENNIS, 1976)
Tomatidina (33)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	5; 20	(KUSANO et al., 1987)
Verazine (34)	<i>Solanum</i> spp	5; 20	(KUSANO et al., 1987)
α -chaconina (35)	<i>Solanum tuberosum</i>	2; 1; 13; 16	(FEWELL e RODDICK, 1993)
α -solanina (36)	<i>Solanum tuberosum</i>	2; 1; 13; 16	(FEWELL e RODDICK, 1993)
α -solasonina (37)	<i>Solanum asperum</i>	10; 20	(PINTO et al., 2011)
α -tomatina (38)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	11	(GOMES et al., 2014)

1-*Alternaria* spp.; 2-*Ascochytium* spp.; 3-*Aspergillus* spp.; 4-*Botrytis* spp.; 5-*Candida* spp.; 6-*Cladosporium* spp.; 7-*Colletotrichum* spp.; 8-*Cryptococcus* spp.; 9-*Fusarium* spp.; 10-*Microsporum* spp.; 11-*Moniliophthora* spp.; 12-*Penicillium* spp.; 13-*Phoma* spp.; 14-*Phytophthora* spp.; 15-*Pythium* spp.; 16-*Rhizoctonia* spp.; 17-*Rhizopus* spp.; 18-*Saccharomyces* spp.; 19-*Septoria* spp.; 20-*Trichophyton* spp.; 21-*Trichosporon* spp.

5)

Entre os metabólitos antifúngicos da família Solanaceae, muitos estão representados dentro da classe das saponinas (YAZDANI et al., 2011), inclusive o composto α -tomatina, conhecido por sua atividade inibitória a *M. perniciosa* (GOMES et al., 2014).

3.11 Participação das saponinas no mecanismo de defesa vegetal

A barreira bioquímica vegetal é constituída de dois mecanismos: O mecanismo pré-formado, constituído de compostos constitutivos chamados de fitoanticipinas, que se encontram em altas concentrações nos tecidos sadios ou são convertidos em substâncias tóxicas com o início da infecção; e o mecanismo pós-formado, constituído por exemplo pelas fitoalexinas que são compostos induzíveis, produzidos como resposta a ação de fitopatógenos (PASCHOLATI et al., 2008).

As saponinas são consideradas como parte do sistema de defesa pré-formado vegetal, mas sua produção também pode ser induzida mediante herbívoros ou ação de patógenos (SZAKIEL, PACZKOWSKI e HENRY, 2011).

As saponinas são um grande grupo de metabólitos secundários caracterizados por sua ação surfactante, devido sua estrutura contendo uma porção apolar, um esteróide, triterpeno ou alcalóide (aglicona), e uma porção polar formada

por uma ou mais cadeias de açúcares (glicona). A ação surfactante das saponinas é conhecida a centenas de anos quando extratos de plantas, tal como *Saponaria officinalis*, eram utilizados como sabão (OSBOURN et al., 1998).

De acordo com a cadeia de açúcares, as saponinas são classificadas em monodesmosídica, com uma única cadeia de açúcares geralmente ligada ao carbono C-3, ou bidesmosídica por conter uma segunda cadeia de açúcares geralmente ligada ao carbono C-28 (em saponinas triterpenóides) ou em C-26 (em saponinas esteroidais) (OSBOURN et al., 1998).

Saponinas bidesmosídicas geralmente possuem menor bioatividade do que as saponinas monodesmosídicas, mas elas podem ser convertidas em ativas pela remoção dos açúcares na posição C-26 ou C-28, por ação enzimática (OSBOURN et al., 1998).

O melhor exemplo desse fenômeno são as saponinas bidesmosídicas avenacosidas A (39) e B (40), que ficam armazenadas em vacúolos na planta *Avena sativa* L, após lesão foliar estas são liberadas na presença da enzima avenacosidase (β -glucosidase), que estava armazenada nos plastídios, convertendo-as por remoção da glicose em C-26, em suas formas monodesmosídicas e de elevada ação fungitóxica (NISIUS, 1988).

O mecanismo de ação primário das saponinas aos fungos se deve pela complexação com esteroides da membrana, formando complexos insolúveis,

resultando na formação de poros e extravasamento do conteúdo celular, mecanismo constatado para as saponinas α -tomatina, α -chaconina e α -solanina (ARNESON e DURBIN, 1968; KEUKENS et al., 1995).

Outro mecanismo de ação foi verificado no estudo de Ito et al. (2007) que observaram que a α -tomatina também é capaz de induzir morte celular programada em células fúngicas, por estimular vias que elevam o Ca^{2+} mitocondrial e, conseqüentemente a despolarização do potencial transmembrana. Mecanismo que estimula o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e leva à morte celular.

Não é claro como as plantas se protegem do efeito de suas próprias saponinas, sendo que o mecanismo de ação das saponinas poderia agir contra qualquer organismo que possua esteroides na membrana. Portanto, sugeriu-se que o tipo de esteroide de membrana influencia na seletividade das saponinas (NISIUS, 1988).

3.12 Mecanismos de resistência aos compostos vegetais

Ao transcorrer do processo evolutivo, os vegetais desenvolveram vários mecanismos de defesa contra a ação de patógenos. Estes se baseiam na utilização de metabólitos secundários que são sintetizados, acumulados, secretados e por fim, empregados na formação de barreiras de natureza física e química (TAIZ e ZEIGER, 2002). Por outro lado, os fitopatógenos co-evoluíram com seus hospedeiros, fazendo com que alguns superassem essas barreiras (OUCHI, 1983).

Uma vez que muitos dos metabólitos que fazem parte do mecanismo de defesa vegetal possuem características indesejáveis na alimentação humana, sua concentração foi reduzida ou mesmo eliminada no processo de melhoramento e seleção artificial das características de interesse econômico (HARBORNE, 2014). No ambiente natural, na maioria das vezes, os mecanismos de defesa das plantas são mais eficientes do que os mecanismos bioquímicos de ataque dos patógenos (VIDHYASEKARAN, 1988).

No caso das saponinas, devido sua primária interação com esteroides de membrana, reconhece-se que a constituição de esteroides seja um dos mecanismos de resistência dos fungos a ação das saponinas (SZAKIEL, PACZKOWSKI e HENRY, 2011).

Outros mecanismo de resistência se deve a alteração do pH para $\leq 4,5$ ou $\geq 6,0$, faixa de pH na qual α -tomatina não exibe ação fungicida. Este mecanismo é utilizado por fungos de podridão em frutos como *Botrytis cinerae*, *Corticium rolfsii* e *Monilinia fructigena* (PASCHOLATI et al., 2008).

Além destes, alguns fungos são capazes de secretar enzimas que quebram as saponinas em formas menos tóxicas. Como no caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici, fitopatógeno de *Lycopersicon esculentum* L., que secreta a enzima tomatinase capaz de clivar a α -tomatina separando a glicona de sua aglicona (ITO et al., 2004).

No caso da infecção por *M. perniciosa* no cacaueteiro, Thomazella et al. (2012) observaram que o mecanismo de defesa do cacaueteiro baseado na elevação de óxido nítrico (NO), uma substância capaz de bloquear a cadeia respiratória de fungos, pode ser evitado por *M. perniciosa*. O fungo *M. perniciosa* defende-se produzindo a enzima oxidase alternativa, através de um mecanismo alternativo de respiração.

Portanto, Thomazella et al., (2012) apontam que o um controle eficaz de *M. perniciosa* deve ser feito pela combinação de moléculas capazes de inibir as duas vias de respiração, a principal e a alternativa. No entanto, ainda não há compostos capazes de inibir as duas vias respiratórias e que sejam estáveis o suficiente para serem aplicados em campo como controle químico.

Diante do exposto, este trabalho se justifica pela necessidade de compostos de maior eficiência para o controle da doença vassoura-de-bruxa no cacaueteiro e pelo potencial, pouco explorado, dos produtos naturais no desenvolvimento de fungicidas com novos mecanismos de ação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de plantas pertencentes a família Solanaceae

4.1.1 Coleta de plantas solanáceas

As espécies *Solanum granulosoleprosum* (22° 72' S; 47° 64' W), *Solanum cernuum* (22° 72' S; 47° 64' W), *Lycianthes asarifolia* (22° 72' S; 47° 64' W), *Solanum seaforthianum* (22° 775' 879" S; 47° 632' 562" W) e *Brunfelsia uniflora* (22° 709' 791" S; 47° 631' 414" W) foram coletadas na cidade de Piracicaba - SP; *Datura stramonium* (22° 775' 879" S; 47° 411' 876" W) e *Nicotiana tabacum* (22° 775' 740" S; 47° 413' 700" W) foram coletadas na cidade de Santa Bárbara d'Oeste - SP; e *Cestrum nocturnum* (23° 086' 182" S; 46° 946' 235" W) na cidade de Louveira – SP. As coletas foram realizadas entre Setembro de 2011 e Março de 2012.

4.1.2 Cultivo de plantas solanáceas

Sementes de *Capsicum annuum* (TopSeed® Garden, Lote 022060) e *Solanum melongena* (TopSeed® Garden, Lote 006059) foram cultivadas em bandejas plásticas contendo substrato comercial (Plantmax®) e aclimatizadas em casa de vegetação no Departamento de Ciências Exatas, ESALQ/USP . Após o período de germinação (aproximadamente 15 dias) as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 5 Kg de solo e substrato comercial (Plantmax®) (1:1), onde receberam solução nutritiva de Hoagland e Arnon, (1950) semanalmente durante o período de cultivo. As folhas das plantas foram coletadas entre a fase de pós-florescência e pré-frutificação.

4.1.3 Identificação botânica das espécies e depósito em herbário

Para a identificação botânica, foram confeccionadas exsicatas para cada espécie, em uma cartolina de tamanho padrão (45 x 30 cm), onde parte do vegetal seco foi fixado e uma ficha descritiva com dados (nome científico, descrição da planta, data e local da coleta, e nome do coletor) (OLIVEIRA; AKISSE, 1989). As

exsicatas foram registradas pelo grupo sob responsabilidade pelo Prof. Dr. Vinícius C. Souza, e incorporadas ao acervo do Herbário da ESALQ, Piracicaba – SP.

4.2 Obtenção dos extratos aquosos

As folhas das plantas foram coletadas, lavadas em água destilada e secas em estufa com circulação forçada a 60° C, por 72 horas. Após secagem, foram trituradas em liquidificador até obtenção de um pó de textura fina que foi armazenado.

Para o preparo dos extratos aquosos foram utilizados 2% (m/v) de folhas secas em infusão de água ultrapura, previamente aquecida a 100 °C e deixadas sob agitação até o total resfriamento. Posteriormente, o material foi filtrado em peneira comum e o sobrenadante centrifugado a 5000 r.min⁻¹ por 20 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante (extrato aquoso) foi reservado e o pellet descartado.

4.3 Técnicas cromatográficas para purificação dos compostos

4.3.1 Partição líquido-líquido

Foram realizadas partições líquido-líquido entre o extrato aquoso e o solvente orgânico n-butanol (v/v) (PA), a fração n-butanólica foi seca e ressuspensa em metanol. Após, a fração metanólica foi particionada com hexano (v/v). O procedimento de partição foi repetido até que uma das fases não apresenta-se mais coloração, aproximadamente por 4 vezes e com volume de 400 ml cada . As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, pesadas, codificadas e armazenadas sob refrigeração.

4.3.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada

Para separação dos compostos foi realizada cromatografia em coluna pré-empacota do tipo Sep-Pak (2 g, 5 g ou 10 g) (Phenomenex Strata®). A fase estacionária utilizada foi de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈).

A fase móvel utilizada foi um gradiente com solventes metanol (PA), da marca Synth[®] e Dinamica[®], e água ultrapura.

4.3.3 Cromatografia em coluna por permeação em gel

Para separação dos compostos utilizou-se cromatografia por permeação em gel Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia Biotech[®]), contido em coluna de vidro de 1,70 m de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi feita em modo isocrático com metanol (PA).

4.3.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para monitoramento das separações cromatográficas e para análises químicas qualitativas, realizou-se cromatografia em camada delgada (CCD). Para tanto, utilizou-se cromatofolhas de sílica- gel 20 x 20 cm (Macherey- Nagel[®]) sobre poliéster com indicador de fluorescência/UV 254 nm (Polygram[®] Sil G/UV 254 nm, 0,20 mm).

Os extratos e as frações obtidas durante as etapas cromatográficas foram diluídas em solvente apropriado, aplicadas nas cromatofolhas e eluídas em um sistema de solventes otimizados para cada fração. Após a eluição das cromatofolhas, foi realizada sua inspeção sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, e em seguida reveladas com um ou mais reagentes. Os reagentes utilizados foram Dragendorff, ácido fosfomolibdico (PMA) e anisaldeído.

Para o reagente ácido fosfomolibdico (indicador de esteróis, derivados de lipídios e compostos redutores) foram adicionados 5 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de etanol, o qual foi borrifado à placa de CCD e posteriormente aquecido a 100 °C por 5-10 minutos em estufa ou chapa aquecedora.

Para o reagente Dragendorff (que revela compostos da classe dos alcalóides e compostos nitrogenados) foram adicionados 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial (solução A). Separadamente adiciona-se 40 mL de água e 8 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água (solução B). As duas soluções foram misturadas na proporção de 1:1, posteriormente borrifadas à placa de CCD e secas a temperatura ambiente.

O reagente anisaldeído (revelador universal para compostos orgânicos) foi preparado pela mistura de 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. Este foi borrifado à placa de CCD, posteriormente aquecido a 100 °C por 5-10 minutos em estufa ou chapa aquecedora.

4.3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As frações com número reduzido de compostos foram analisadas e purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC). Utilizou-se o equipamento HPLC-UV/VIS (Agilent® HP 1100), com bomba quaternária, acoplado a detector ultravioleta MWD (Multiple Wavelength Detector).

Em todas separações utilizou-se uma coluna com fase estacionária de sílica derivatizada com grupos octodecilsilano (C₁₈) (Agilent® Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 x 250 mm - 5 µm) e vazão da fase móvel a 1 mL min⁻¹.

Como fase móvel utilizou-se os solventes orgânicos metanol e acetonitrila de grau HPLC (J.T.Baker® e PANREAC®), e água ultrapura de sistema Milli-Q®. O gradiente da fase móvel e o comprimento de onda para monitoramento foram definidos de acordo com o perfil químico da amostra.

4.4 Técnicas utilizadas para Estudo químico dos compostos

4.4.1 Espectrometria de Massas e Ultravioleta

Utilizou-se o equipamento CLAE-UV-ELSD-MS, que compreende um cromatógrafo líquido de alta eficiência com bomba quaternária (Separation module Waters® 2695), acoplado aos detectores Photodiode Array Detector (Water Waters® 2996), Evaporative Light Scattering Detector (Waters® 2424) e espectrômetro de massas com analisador hexapolo Micromass ZQ (Waters®).

Os parâmetros para análise por MS foram de voltagem no capilar de 3,00 kV e temperatura da fonte igual a 100° C. A temperatura de dessolvatação foi 350° C e o equipamento foi operado em modo positivo, com ionização electrospray (ESI) e faixa de detecção entre *m/z* (massa sobre carga) 145 à 1500. O fluxo de gás no

cone e a dessolvatação do cone foram de 50 e 350 L/H, respectivamente. Aquisição e processamento de dados foram realizados pelo software Empower 2.0.

No cromatógrafo utilizou-se como fase móvel um gradiente de água, metanol e acetonitrila (HPLC), todos com 0,1% ácido fórmico. As condições de análise foram as descritas abaixo:

A) diluição da amostra em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹ e deste foi injetado 20 µL em coluna com fase estacionária de sílica derivatizada com grupos octodecilsilano (C₁₈) da Waters® XTerra RP₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm), e o seguinte gradiente de eluição (Tabela 2);

Tabela 2 – Gradiente de eluição utilizado nas análises por CLAE-UV-ELSD-MS, coluna C₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm)

Tempo (min.)	Vazão (mL min ⁻¹)	Água (%)	Metanol (%)	Acetonitrila (%)	Curva
0	1	90	5	5	
1	1	90	5	5	6
22	1	0	50	50	6
30	1	0	50	50	1
31	1	90	5	5	1
40	1	90	5	5	1

B) diluição da amostra em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹ e deste foi injetado 10 µL em coluna Waters® XTerra MSC₁₈ (2,1 x 150 mm - 3,5µm), e o seguinte gradiente de eluição (Tabela 3).

Tabela 3 – Gradiente de eluição utilizado nas análises por CLAE-UV-ELSD-MS, coluna C₁₈ (2,1 x 150 mm - 3,5µm)

Tempo (min.)	Vazão (mL min ⁻¹)	Água (%)	Metanol (%)	Acetonitrila (%)	Curva
0	0,5	90	5	5	
1	0,5	90	5	5	6
10	0,5	0	50	50	6
14	0,5	0	50	50	1
15	0,5	90	5	5	1
20	0,5	90	5	5	1

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais, sob responsabilidade pelo Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), São Carlos – SP.

4.4.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Os espectros de massas de alta resolução (HRMS) foram adquiridos em Espectrômetro de Massas Q-TOF Maxis Impact, com ionização ESI, operado pelo software Bruker Compass DataAnalysis 4.2. As análises foram por injeção direta, a energia de ionização no capilar foi de 3000 V, a faixa de detecção foi de m/z 50 a 3000 e a aquisição de dados foi em modo positivo ou negativo.

Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas (LMEM), no Instituto de Química de Araraquara, UNESP – SP.

4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) monodimensionais de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, e bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC foram obtidos nos equipamentos:

Equipamento Bruker DRX (9,4 T), operado a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio e a 100,10 MHz na frequência do carbono;

E equipamento Bruker, modelo ACANCEIII, operado a 600,00 MHz na frequência do hidrogênio e a 150,00 MHz na frequência do carbono.

As amostras foram diluídas no solvente piridina- d_5 (Merck, MagniSolv™ 99,8%).

Os dados foram processados pelo software ACD/NMR Processor Academic Edition, versão 12.01.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, no Departamento de Química da UFSCAR, sob responsabilidade pelo Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira.

4.5 Reação de hidrólise ácida com as frações SsM5d6a e BuM8i4

Para os compostos SsM5d6a e BuM8i4 foram realizadas hidrólises ácidas para separação da porção aglicona da porção glicona (PLOCK et al., 2001; VIANA et al., 2004; MANASE et al., 2012). Cerca de 3 - 4 mg do composto foi diluído em 20 mL de uma solução metanol com 2 mol L⁻¹ de ácido clorídrico. A solução foi mantida sob refluxo por 2h e temperatura de 90 °C – 100 °C.

Posteriormente, o ácido foi removido por evaporação sob pressão reduzida. Ao produto da reação adicionou-se 10 mL de água ultrapura e a aglicona foi separada através de partição líquido-líquido com cloreto de metileno. A fração cloreto de metileno foi concentrada sob pressão reduzida para posterior análise.

A fração aquosa, contendo a glicona, foi purificada em cartucho pré-empacotado com fase estacionária de sílica derivatizada com grupos octodecilsilano (C₁₈) de modo isocrático com água ultrapura, o volume coletado foi congelado e a água foi removida em liofilizador.

A fração glicona foi analisada em CCD por comparação aos padrões de monossacarídeos D(+)-xilose (Puríssima, lote 0603970), L-arabinose (Difco, lote 1529-13), D(+)-galactose (Riedel-de Haen AG, lote 155-22) e D-Glicose PA (Synth, N.C.M: 17.02.30.11).

4.6 Protocolos dos bioensaios e fitopatógenos utilizados

4.6.1 Fungos fitopatógenos utilizados

Para os ensaios biológicos *in vitro* foram utilizadas 8 linhagens de fungos, os quais estão descrito na Tabela 4, a seguir.

Tabela 4 – Fungos utilizados nos ensaios biológicos *in vitro*

Fitopatógeno	Classe	Doença	Hospedeiro
<i>Moniliophthora perniciosa</i> (CP44)	Basidiomycota	Vassoura-de-bruxa	Cacaueiro
<i>Moniliophthora perniciosa</i> (FA553)	Basidiomycota	Vassoura-de-bruxa	Cacaueiro
<i>Moniliophthora perniciosa</i> (CP02)	Basidiomycota	Vassoura-de-bruxa	Cacaueiro
<i>Moniliophthora perniciosa</i> (APS1)	Basidiomycota	Vassoura-de-bruxa	Solanácea
<i>Moniliophthora perniciosa</i> (WMAS)	Basidiomycota	Vassoura-de-bruxa	Solanácea
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ascomycota	Mancha de fusarium	Tomate
<i>Phomopsis sojae</i>	Ascomycota	Podridão seca	Soja
<i>Rhizomucor pusillus</i> (4567)	Zygomycota		Cosmopolita

O fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (CP44) foi cedido pelo Dr. Luiz Humberto Gomes, do Departamento de Ciências Exatas - ESALQ/USP, Piracicaba – SP.

O fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (WMAS) e seus esporos foram cedidos pelo Professor Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira - CENA/USP, Piracicaba – SP.

Os fitopatógenos *Moniliophthora perniciosa* (FA553, CP02 e APS1) foram cedidos pela Dra. Daniela Thomazella, do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas - SP.

Os fungos *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis sojae* e *Rhizomucor pusillus* foram cedidos pela Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, do Departamento de Genética, ESALQ-USP, Piracicaba - SP.

4.6.2 Preservação e armazenamento dos fungos

A preservação dos fitopatógenos foi realizada segundo o método de Castellani (1939). Discos de 0,7 cm contendo micélio do fungo e meio de cultivo MEA (2% de Malte, 0,5% de Extrato de levedura, e 2% de Ágar) (THOMAZELLA et al., 2012) foram retirados da borda da colônia, transferidos para frascos do tipo penicilina contendo 10 mL de água ultrapura esterilizada. Em seguida os frascos foram tampados com rolhas de borrachas, lacrados e foram armazenados a temperatura ambiente.

O inóculo para todos os experimentos biológicos consistiu de um disco de 0,7 cm contendo o fungo, retirado da borda de crescimento da colônia (7 ou 15 dias). As avaliações dos experimentos foram realizadas após o crescimento total dos fitopatógenos em placas de Petri (60 x 15 mm), que ocorria após 15 dias (para *M. pernicioso*) e 07 dias (para os demais fungos) em câmara incubadora do tipo B.O.D. a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas.

4.6.3 Ensaio biológico por diluição em ágar

Para avaliação da bioatividade dos extratos aquosos vegetais, utilizou-se o método de diluição em ágar (CAVALIERI et al., 2005). Para tanto, o extrato aquoso de folhas na concentração de 2% (m/v) foi incorporado ao meio de cultura MEA (2% de Malte, 0,5% de Extrato de levedura, e 2% de Ágar) (THOMAZELLA et al., 2012) e este foi autoclavado a 1 atmosfera e $121 \pm 2^\circ \text{C}$, por 20 minutos.

Deste meio, 10 mL foi vertido por placa de Petri (60 x 15 mm). Após solidificação, sobre o meio foi adicionado um disco de micélio (0,7 cm) do fungo e este foi mantido em câmara incubadora do tipo B.O.D. a $27 \pm 1^\circ \text{C}$. A avaliação foi realizada de forma quantitativa em relação ao controle após completar seu crescimento na área da placa, que variou entre 10 e 15 dias.

Para os extratos de maior atividade foi determinada a concentração inibitória média (CI_{50}) a *M. pernicioso*. Para isto, utilizou-se o mesmo procedimento descrito acima exceto pela concentração do extrato aquoso. Utilizou-se as concentrações de 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05% e 0,025% de folhas secas no preparo do extrato.

A atividade ao crescimento micelial dos fungos foi avaliada de forma quantitativa, através da medição do diâmetro da área de crescimento do micélio fúngico em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas), esta medida foi comparada com o controle, como expressado na seguinte fórmula:

$$PIC = [(DC - DT)/DC] \times 100$$

Onde:

PIC = Percentual de inibição ao crescimento

DC = diâmetro do controle

DT = diâmetro do tratamento

4.6.4 Ensaio biológico de difusão em disco

As frações semipurificadas foram avaliadas segundo o método de difusão em disco (CAVALIERI et al., 2005). Este método consistiu em colocar discos de papel filtro estéril (10 mm de diâmetro), contendo de 0,2 a 0,1 mg de amostra, sobre o meio de cultura MEA, contido em placa de Petri (60 x 15 mm). O papel filtro foi colocado a uma distancia de 20 ± 2 mm do inóculo de *M. perniciosus* (FA553) de 7 mm de diâmetro.

Após o período de incubação em câmara incubadora do tipo B.O.D. a $27 \pm 1^\circ$ C, com fotoperíodo de 12 horas, e crescimento do fungo sobre a placa, o resultado foi avaliado apenas de forma qualitativa, ou seja, se apresentou ou não inibição ao crescimento micelial.

4.6.5 Ensaio biológico por microdiluição

Os compostos puros foram avaliados quanto a sua atividade inibitória a germinação de basidiósporos e crescimento micelial de *M. perniciosus* (WMAS) pelo método de microdiluição (CAVALIERI et al., 2005) e adaptado para saponinas (HAO et al., 2010; LANZOTTI et al., 2012; MOSTAFA et al., 2013).

Em uma microplaca de 96 poços, adicionou-se na primeira fileira o composto diluído em 20 μ L de água ultrapura, deste volume 10 μ L foi retirado do primeiro poço e diluído em série até as concentrações finais (para 100 μ L) de 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,63 μ g mL⁻¹. Permanecendo em cada poço 10 μ L do composto.

Aos poços contendo o composto, foram adicionados 90 μ L de uma suspensão de basidiósporos de *M. perniciosus* (WMAS) diluídos em meio de cultivo ME (2% de malte e 0,5% de extrato de levedura) na concentração final de 10^5 esporos mL⁻¹.

A microplaca foi coberta com filme plástico transparente, mantida em estufa B.O.D, a 26° C. A taxa de germinação de basidiósporos foi avaliada em microscópio invertido após 24h e 48h de tempo de incubação. A avaliação consistiu na contagem de esporos germinados e não germinados em uma área delimitada.

Para avaliar o desenvolvimento micelial, na mesma microplaca e a cada 24h foi quantificada a densidade óptica dos poços, por meio de leitor de absorbância de

microplaca, da marca TECAN, modelo SUNRISE e operado pelo software Magellan v7.1, no comprimento de onda de 600 nm. Desta medição obteve-se a densidade micelial de *M. pernicioso*, as medições foram realizadas até que a densidade micelial se mantivesse constante.

Foram utilizados dois controles, um branco que consistiu em poços contendo somente meio de cultivo; e um controle negativo que consistiu em poços contendo 10 µL de água e 90 µL de meio de cultivo contendo esporos na mesma concentração do ensaio.

4.6.6 Ensaios biológicos com fungicidas

Como parâmetro de controle positivo nos ensaios de diluição em ágar e microdiluição, estes foram realizados na presença de fungicidas comerciais, apresentados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 – Fungicidas utilizados nos ensaios biológicos *in vitro*

Ingrediente ativo	Nome comercial	Grupo químico	Tipo	CIA*
Piraclostrobina	Comet [®]	Estrobilurinas	Sistêmico	250 g L ⁻¹
Trifloxistrobina+	Fox [®]	Estrobilurinas +	Mesostêmico	150 g L ⁻¹
Prothioconazol		Triazolinthione	e Sistêmico	175 g L ⁻¹

*Concentração do Ingrediente Ativo (CIA).

Os fungicidas foram diluídos em água ultrapura para a obtenção de soluções estoques na concentração de 1000 mg L⁻¹ do ingrediente ativo. Uma alíquota deste foi adicionada ao meio de cultivo na temperatura de 45 ±5°C, previamente autoclavado, na concentração final de 1,0 mg L⁻¹ do ingrediente ativo.

Os fungicidas foram cedidos pelo Prof. Dr. José Otávio Machado Menten, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ/USP, Piracicaba – SP.

4.7 Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se análise de variância (ANOVA, $\alpha = 0,05$) e o teste de TUKEY. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração inibitória média (CI₅₀) foram calculados a partir de equação da curva de regressão. Todas as

análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software ASSISTAT 7.7 beta e Microsoft Office EXCEL 2007. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Referências

- ACKERMANN, P.; ZEUN, G. K.-B.R. Chemistry and biology of fludioxonil, fenpiclonil, and quinoxyfen. **Modern Crop Protection Compounds**, Weinheim, v. 2, p. 468-580, 2007.
- AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, n. 5, p. 1012-1022, 2005.
- AL-REHAILY, A.J.; AHMAD, M.S.; MUSTAFA, J.; AL-OQAIL, M.M., HASSAN, W. H.; KHAN, S.I.; KHAN, I.A. Solanopubamine, a rare steroidal alkaloid from *Solanum schimperianum*: Synthesis of some new alkyl and acyl derivatives, their anticancer and antimicrobial evaluation. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riyadh, v. 17, n. 1, p. 67-76, 2013.
- ALVIM, P.D.T.; KOZLOWSKI, T.T. **Ecophysiology of tropical crops**. Vicosal:Elsevier, 2013. 516p.
- ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.D.; NAKAYAMA, L. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicios*a (Stahel) Singer: a experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotrópica**, Belém, v. 10, n. 2, p. 49-60, 1998.
- ARNESON, P.A.; DURBIN, R.D. Studies on Mode of Action of Tomatine as a Fungitoxic Agent. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 43, n. 5, p. 683-685, 1968.
- BAILEY, J.; VINCENT, G.; BURDEN, R. The antifungal activity of glutinosone and capsidiol and their accumulation in virus-infected tobacco species. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 8, n. 1, p. 35-41, 1976.
- BASTOS, C.N.; EVANS, H.C. A New Pathotype of *Crinipellis-Perniciosa* (Witches Broom Disease) On Solanaceous Hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 306-312, 1985.
- BASTOS, C.; ANDEBRHAN, T. URUCU (*Bixa orellana*): Nova espécie hospedeira da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicios*a) do cacaueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 4, p. 963-965, 1986.
- BRATT, K. Secondary plant metabolites as defence against herbivores and oxidative stress: Synthesis, isolation and biological evaluation. **Acta Universitatis Upsaliensis**, Uppsala, 53p., 2000.
- CALLE, H.; COOK, A.; Fernando, S. Histology of witches'-broom caused in cacao by *Crinipellis pernicios*a. **Phytopathology**, Ithaca, v. 72, p. 1479-81, 1982.
- CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O.; DAYAN, F. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 244, p. 1231-1242, 2012.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lisbon, v. 42, n. 225, p. 65-72, 1939.

CAVALIERI, S.J.; HARBECK, R.J.; McCARTER, Y.S.; ORTEZ, J.H.; RANKIN, I.D.; SAUTTER, R.L.; SHARP, S.E.; SPIEGEL, C.A. **Manual of antimicrobial susceptibility testing**. Seattle, American Society for Microbiology, 2005. 236 p.

COPPING, L.G. **The Manual of Biocontrol Agents: a World compendium**. Alton: British Crop Production Council, 2009. 702p.

COPPING, L.G.; DUKE, S.O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 63, n. 6, p. 524-554, 2007.

DAVENPORT, L. Genera Solanacearum: The Genera of Solanaceae Illustrated, Arranged According to a New System by Armando T. Hunziker. **Systematic Botany**, Kent, v. 29, n. 1, p. 221-222, 2004.

DE LUCCA, A.J.; BLAND, J.M.; VIGO, C.B.; CUSHION, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; PETER, J.; WALSH, T.J. CAY-1, A fungicidal saponin from Capsicum sp fruit. **Medical Mycology**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 131-137, 2002.

DIAS, L.D.S. **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa: FUNAPE-UFV, 2001. 578p.

DIXIT, V.; TEWARI, J.; OBENDORF, S.K. Fungal Growth Inhibition of Regenerated Cellulose Nanofibrous Membranes Containing Quillaja Saponin. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 59, n. 3, p. 417-423, 2010.

DUSANE, D.H.; ZINJARDE, S.S.; VENUGOPALAN, V.P.; MCLEAN, R.J.C; WEBER, M.M.; RAHMAN, P.K.S.M. Quorum sensing: implications on Rhamnolipid biosurfactant production. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle Upon Tyne, v. 27, p. 159-184, 2010.

EPA, United States Environmental Protection Agency, **National Service Center for Environmental Publications**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nscep/index.html>>. Acesso em: 08 jun. 2015.

EVANS, H.C. Plesomorphism in *Crinipellis penicillosa*, causal agent of witches broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 74, p. 515-523, 1980.

FAOSTAT, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

FEWELL, A.M.; RODDICK, J.G. Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids Alpha-solanine and Alpha-chaconine. **Phytochemistry**, New York, v. 33, n. 2, p. 323-328, 1993.

FIGUEIREDO, M.B. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. **O Biológico**, São Paulo, v. 63, p. 29-32, 2001.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Infection biology of crinipellis-perniciosa on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, New York, v. 75, n. 6, p. 552-556, 1991.

GANGAWANE, L. Fungicide resistance in plant pathogens in India. **Malaysian Plant Protection Society**, Pahang, v.3, p. 117-121, 1990.

GERWICK, B.C.; SPARKS, T.C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 8, p. 1169-1185, 2014.

GODFREY, C. **Agrochemicals from natural products**. New York: CRC Press, 1994. 424p.

GOMES, L.H.; DUARTE, K.M.R.; ANDRINO, F.G.; LEAL J.R.G.A.; GARCIA, L. M.; FIGUEIRA, A.; DE LIRA, S.P. Alpha-Tocopherol against Witches' Broom Disease. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v.5, p.596-604, 2014.

GORDON, M.; STOESSL, A.; STOTHERS, J. Post-infectious inhibitors from plants. IV. The structure of capsidiol, an antifungal sesquiterpene from sweet peppers. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 51, n. 5, p. 748-752, 1973.

GRIFFITH, G.W. Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production. **Biologist**, London, v. 51, n. 2, p. 71-75, 2004.

GUEST, D.; KEANE, P. Vascular-streak dieback: A new encounter disease of cacao in Papua New Guinea and Southeast Asia caused by the obligate basidiomycete *Oncobasidium theobromae*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 97, n. 12, p. 1654-1657, 2007.

GURJAR, M.S.; ALI, S.; AKHTAR, M.; SINGH, K.S. Efficacy of plant extracts in plant disease management. **Agricultural Sciences**, Shanghai, v. 3, n3, p. 425, 2012.

HAO, W.N.; ZHONG, G.H.; HU, M.Y.; LUO, J.J.; WENG, Q.F.; RIZWAN-UL-HAQ, M. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 39-43, 2010.

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. London: Academic Press, 2014. 384p.

HARRIS, J.E.; DENNIS, C. Antifungal Activity of Post-Infectious Metabolites From Potato-Tubers. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 9, n. 2, p. 155-158, 1976.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 2831-2846, 2007.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. 2nd ed. **Circular. California Agricultural Experiment Station**. Berkeley, v. 347, 1950.

HOLIDAY, P. Fungus Diseases of tropical crops. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 9, n. 4, p. 120-120, 1980.

ICCO, International Cocoa Organization. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, New York, v.41, n.1, 71 p. 2015.

ITO, S.; IHARA, T.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; IKEDA, T.; KAJIHARA, H.; DISSANAYAKE, C.; ABDEL-MOTAAL, F. F.; EL-SAYED, M. A. Alpha-tomatine, the Major Saponin In Tomato, Induces Programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 17, p. 3217-3222, 2007.

ITO, S.; ETO, T.; TANAKA, S.; YAMAUCHI, N.; TAKAHARA, H.; IKEDA, T. Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of alpha-tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 571, n. 1/3, p. 31-34, 2004.

KATSUI, N.; MURAI, A.; TAKASUGI, M.; IMAIZUMI, K.; MASAMUNE, T.; TOMIYAMA, K.. Structure of Rishitin a new antifungal compound from Diseased potatotubers. **Chemical Communications**, Cambridge, n. 1, p. 43-46, 1968.

KESSMANN, H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; GOERLACH, J.; FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RYALS, J.; COUNCIL, B. C. P.; COUNCIL, B. C. P.; BRIT CROP, P.; COUNCIL. CGA 2455704: Mode of action of a new plant activator. **Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases**, Brighton, v.3, p. 961-966, 1996.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-459, 1994.

KEUKENS, E. A. J.; DEVRIJE, T.; VANDENBOOM, C.; DEWAARD, P.; PLASMAN, H. H.; THIEL, F.; CHUPIN, V.; JONGEN, W. M. F.; DEKRUIJFF, B. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, Amsterdam, v. 1240, n. 2, p. 216-228, 1995.

KUSANO, G. A.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, S.; NOZOE. Antifungal properties of solanum alkaloids. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, n. 12, p. 4862-4867, 1987.

LANZOTTI, V.; ROMANO, A.; LANZUISE, S.; BONANOMI, G.; SCALA, F. Antifungal Saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. **Phytochemistry**, New York, v. 74, p. 133-139, 2012.

LIU, H.; WANG, J.; ZHAO, J.; LU, S.; WANG, J.; JIANG, W.; MA, Z.; ZHOU, L. Isoquinoline Alkaloids from *Macleaya cordata* Active Against Plant Microbial Pathogens. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 4, n. 11, p. 1557-1560, 2009.

MANASE, M.J.; MITAINE-OFFER, A.C.; PERTUIT, D.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, O.; DELEMASURE, S.; DUTARTRE, P.; MIRJOLET, J. F.; DUCHAMP, O.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. *Solanum incanum* and *S. heteracanthum* as sources of biologically active steroid glycosides: Confirmation of their synonymy. **Fitoterapia**, Milano, v. 83, n. 6, p. 1115-1119, 2012.

MEINHARDT, L.W.; RINCONES, J.; BAILEY, B.A.; AIME, M.C.; GRIFFITH, G.W.; ZHANG, D.; PEREIRA, G. A. G. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 577-588, 2008.

MENEZES, J.D.S.; CARMO-NETO, D. **A modernização do agribusiness cacau**. Wayzata:Fundação Cargill, 1993.233p.

MIDDLEJ, R.R. Mercado mundial do cacau. In: Manejo Integrado para a Modernização da Lavoura Cacaueira. CEPLAC. **Revista Difusão Agropecuária**, Belém, v. 3, p.10-38, 2011.

MOSTAFA, A.; SUDISHA, J.; EL-SAYED, M.; ITO, S.; IKEDA, T.; YAMAUCHI, N.; SHIGYO, M. Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 274-280, 2013.

NINO, J.; CORREA, Y.M.; MOSQUERA, O.M. Biological activities of steroidal alkaloids isolated from *Solanum leucocarpum*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 47, n. 3, p. 255-259, 2009.

NISIUS, A. The Stromacenter in *Avena* plastids - Anaggregation of Beta-glucosidase responsible for the activation of Oat-leaf Saponins. **Planta**, Berlin, v. 173, n. 4, p. 474-481, 1988.

OCHSNER, U.A.; REISER, J.; FIECHTER, A.; WITHOLT, B. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 9, p. 3503-3506, 1995.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu Editora, 48p., 1989. 48p.

OLIVEIRA, M.D.; LUZ, E. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil**. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 132p.

OLMSTEAD, R.G.; BOHS, L. A summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. In: INTERNATIONAL SOLANACEAE CONFERENCE, 6., 2007. Madison. **Proceedings**, Madison, , 2007. n. 745, p. 255-268.

OSBOURN, A.E.; WUBBEN, J.P.; MELTON, R.E.; CARTER, J.P.; DANIELS, M.J. Saponins and plant defense. **Phytochemical Signals and Plant-Microbe Interactions**, New York, v. 32, p. 1-15, 1998.

OUCHI, S. Induction of resistance or susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 21, n. 1, p. 289-315, 1983.

PARK, Y.; CHOI, B.H.; KWAK, J.S.; KANG, C.W.; LIM, H. T.; CHEONG, H.S.; HAHM, K. S. Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 16, p. 6491-6496, 2005.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008., 627p.

PINTO, F.D.C.L.; UCHOA, D.E.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, F.M.; THEODORO, P.N.E.T.; ESPINDOLA, L.S. Antifungal glycoalkaloids, Flavonoids and other chemical constituents of *Solanum asperum* Rich (Solanaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 284-356, 2011.

PLOCK, A.; BEYER, G.; HILLER, K.; GRUNDEMANN, E.; KRAUSE, E.; NIMTZ, M.; WRAY, V. Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. **Phytochemistry**, New York, v. 57, n. 3, p. 489-496, 2001.

PLOETZ, R.C. Cacao diseases: Important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, Ithaca, v. 97, n. 12, p. 1634-1639, 2007.

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

RHAMNOLIPIDS, **Advanced Bio-Technologies**. Disponível em: <<http://www.rhamnolipid.co/index.shtml>>. Acesso em: 8 jun. 2015.

ROWAN, D.D.; MACDONALD, P.E.; SKIPP, R.A. Antifungal stress metabolites from *Solanum aviculare*. **Phytochemistry**, New York, v. 22, n. 9, p. 2102-2104, 1983.

RUDGARD, S.A.; BUTLER, D.R. Witches broom disease on cocoa in Rondonia, Brazil - POD Infection in relation to POD Susceptibility, Wetness, Inoculum, and Phytosanitation. **Plant Pathology**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 515-522, 1987.

SAUTER, H. Strobilurins and other complex III inhibitors. **Modern crop protection compounds**, Weinheim, v. 2, p. 457-495, 2007.

SILVA NETO, P.J.D.; MATOS, P.D.; MARTINS, A.D.S.; SILVA, A.D.P. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia Brasileira**. Belém: CEPLAC, 2001. p.1-82.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILVA, M.; GIACOMIN, L.; RODRIGUES, I.M.C. **Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB225>>. Acesso em: 09 jun. 2015.

STUARDO, M.; MARTIN, R.S. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 296-302, 2008.

SZAKIEL, A.; PACZKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v.10, n. 4, p. 493-502, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3rd ed. New York: Sinauer, 2002. 690p.

THOMAZELLA, D.P.T.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, H.C.; SAVIANI, E.E.; RINCONES, J.; TONI, I.M.; REIS, O.; GARCIA, O.; MEINHARDT, L.W.; SALGADO, I.; PEREIRA, G.A.G. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, Oxford, v. 194, n. 4, p. 1025-1034, 2012

VIDHYASEKARAN, P. **Physiology of disease resistance in plants**. New York: CRC Press, 1988. v. 2., 160p.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, New York, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

YAZDANI, D.; TAN, Y.; ZAINAL ABIDIN, M.; JAGANATH, I. A review on bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 30, p. 6584-6589, 2011.

YOON, M.Y.; CHA, B.; KIM, J.C. Recent Trends In Studies on Botanical Fungicides In Agriculture. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 29, n. 1, p.1-9, 2013.

5 SELEÇÃO DAS PLANTAS PERTENCENTES À FAMÍLIA SOLANACEAE COM ATIVIDADE INIBITÓRIA A *M. pernicioso*

RESUMO

Muitos extratos e óleos vegetais mostram potencial para uso no controle de fitopatógenos. As plantas da família Solanaceae são reconhecidas como fonte de compostos de atividade antifúngica. Dentre estes, há relato de um composto do tomateiro com elevada atividade inibitória ao fitopatógeno do cacau *Moniliophthora pernicioso*. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo estudar o potencial fungitóxico de extratos de plantas solanáceas ao crescimento micelial de *M. pernicioso*. Para tanto, extratos aquosos de folhas de dez plantas foram avaliados quanto sua atividade inibitória a *M. pernicioso*. Foi observado maior atividade antifúngica pelos extratos de *Cestrum nocturnum*, *Solanum seaforthianum* e *Brunfelsia uniflora*, portanto, estes foram selecionados para mais estudos. Verificou-se que os extratos das plantas selecionadas também apresentam atividade inibitória aos fungos *Phomopsis sojao* e *Rhizomucor pusillus*. As linhagens de *M. pernicioso* do biotipo cacau mostraram-se como as mais sensíveis aos extratos em comparação as linhagens do biotipo solanácea. O extrato *C. nocturnum* mostrou-se como o mais efetivo na inibição de todas as linhagens de *M. pernicioso*, com um $CI_{50} < 0,025$ % de folhas secas no preparo do extrato aquoso. A atividade antifúngica de *B. uniflora* e *S. seaforthianum* está sendo relatada pela primeira vez.

Palavras-chave: Fitopatógeno; Extrato; *Brunfelsia uniflora*; *Solanum seaforthianum*; *Cestrum nocturnum*

ABSTRACT

Several vegetable extracts and essential oils have potential for phytopathogen management. The Solanaceae plants are known as a promising source of antifungal compounds. In this vegetable family, was reported a compound from tomato with antifungal activity against cocoa phytopathogen *Moniliophthora pernicioso*. Therefore, this work aimed to explore the fungitoxic potential of Solanaceae plant extracts against the mycelial growth of *M. pernicioso*. For this, antifungal activity of water extracts from leaves of ten plants were evaluated against *M. pernicioso*. The best results were observed by extracts from *Cestrum nocturnum*, *Solanum seaforthianum* e *Brunfelsia uniflora*, therefore, these plants were selected for more studies. It was verified that, the selected extracts also showed a inhibitory activity against the fungus *Phomopsis sojao* and *Rhizomucor pusillus*. The Solanaceae extracts were more effective against cocoa biotypes than solanaceae biotypes of *M. pernicioso*. The extract from *C. nocturnum* was the more effective against *M. pernicioso*, with $IC_{50} < 0,025$ % of dry leaves in the water extract. This study is reporting for the first time the antifungal activity of *B. uniflora* and *S. seaforthianum*.

Keywords: Phytopathogen; Extract; *Brunfelsia uniflora*; *Solanum seaforthianum*; *Cestrum nocturnum*

5.1 Introdução

Dentre as plantas estudadas quanto ao seu potencial metabólico, a família Solanaceae é conhecida pela contribuição no fornecimento de muitos compostos bioativos (WINK, 2003).

Muitos extratos e óleos essenciais de plantas solanáceas são reconhecidos por sua atividade antifúngica e apresentam atividade promissora para controle de fitopatógenos em campo (IRVING et al., 1945; ABDEL-MOTAAL et al., 2009; PINTO et al., 2011).

De acordo com Yoon, Cha e Kim (2013) o desenvolvimento e utilização de fungicidas botânicos poderiam ajudar a diminuir o impacto negativo dos fungicidas sintéticos, tal como resíduos químicos, resistência de microorganismos e poluição ambiental. Estes consideram que os fungicidas botânicos podem ser efetivos, seletivos, biodegradáveis e de menor toxicidade ao ambiente.

Recentemente, verificou-se uma elevada atividade inibitória pelo extrato aquoso de folhas da solanácea *Solanum lycopersicum* (tomateiro) ao fitopatógeno *M. perniciosa*, no qual a atividade inibitória do extrato foi atribuída ao composto α -tomatina (GOMES et al., 2014).

5.2 Resultados e discussão

As espécies de plantas estudadas neste trabalho foram coletadas utilizando-se os critérios de abordagem quimitaxonômica e randômica.

De acordo com Albuquerque & Hanazaki (2006), a seleção de plantas por abordagem randômica ocorre sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; e na quimitaxonômica, a seleção da espécie está correlacionada com a ocorrência de compostos de uma dada classe química frequentemente encontrada em um gênero ou família.

Com isso, a utilização da abordagem quimitaxonômica neste trabalho baseou-se nos relatos de compostos antifúngicos oriundos de plantas da família Solanaceae (ABAD, ANSUATEGUI e BERMEJO, 2007; ARIF et al., 2009; YAZDANI et al., 2011) e ao relato de um composto do tomateiro de ação inibitória a *M. perniciosa* (GOMES et al., 2014).

Levando em consideração estas abordagens, obteve-se folhas de 10 plantas solanáceas, conforme pode ser verificado na Tabela 6.

Tabela 6 – Plantas solanáceas. Nome científico, nome popular, código da coleção e número de catálogo pelo depósito em herbário

Nome científico	Nome popular	Coleção / nº de catálogo
<i>Brunfelsia uniflora</i> (Pohl) D. Don	Manacá	ESA 127276
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pimenta doce italiana	
<i>Cestrum nocturnum</i> L.	Dama-da-noite	ESA 127279
<i>Datura stramonium</i> L.	Trombeteira	ESA 127278
<i>Lycianthes asarifolia</i>	Solano-rasteiro	ESA 116523
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Tabaco	ESA 127277
<i>Solanum cernuum</i> Vell	Panacéia	ESA 116520
<i>Solanum granulosoleprosum</i> Dunal	Fumo bravo	ESA 116521
<i>Solanum melongena</i> L.	Berinjela	
<i>Solanum seaforthianum</i> Andrews	Trepadeira-doce-amarga	ESA 127275

A exsicata da planta pode ser consultada pelo código de coleção e número de catálogo no INCT- Herbário Virtual da Flora e dos Fungos, em: <http://inct.splink.org.br/>

Destas dez plantas, oito foram coletadas em campo: *Solanum granulosoleprosum*, *Solanum cernuum*, *Datura stramonium*, *Solanum seaforthianum*, *Nicotiana tabacum*, *Cestrum nocturnum*, *Lycianthes asarifolia*, *Brunfelsia uniflora*. E outras duas foram cultivadas em casa de vegetação: *Capsicum annuum* e *Solanum melongena*.

A seguir está exposto um fluxograma resumizando os procedimentos realizados para obtenção e seleção das plantas solanáceas (Figura 6).

Figura 6 –Fluxograma para seleção das plantas solanáceas, valores entre parênteses representam a quantidade de espécies vegetais

Destas plantas obtiveram-se extratos aquosos que foram avaliados, por meio de diluição em ágar, para atividade inibitória ao crescimento micelial ao fungo *M. perniciosa* (CP44, biotipo cacau), os resultados são os apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Atividade inibitória do extrato aquoso de plantas solanáceas (2%) ao fungo *Moniliophthora perniciosa* CP44, na fase saprofítica

Planta	Taxa de inibição (%)
<i>Brunfelsia uniflora</i>	100 ^a
<i>Capsicum annuum</i>	3,7 ^e
<i>Cestrum nocturnum</i>	100 ^a
<i>Datura stramonium</i>	14 ^d
<i>Lycianthes asarifolia</i>	0 ^f
<i>Nicotiana tabacum</i>	30,5 ^b
<i>Solanum cernuum</i>	0 ^f
<i>Solanum granulosoleprosum</i>	0 ^f
<i>Solanum melongena</i>	25,9 ^c
<i>Solanum seaforthianum</i>	100 ^a

Dados em média do percentual de inibição de três replicatas.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$)

Neste ensaio foi possível concluir que, três extratos não apresentaram atividade inibitória - *S. granulosoleprosum*, *S. cernuum* e *L. asarifolia*; quatro

exibiram baixa atividade inibitória – *C. annuum* (3,7 %), *D. stramonium* (14 %), *S. melongena* (25,9 %) e *N. tabacum* (30,5 %); e três extratos exibiram elevada atividade inibitória – *S. seaforthianum*, *C. nocturnum* e *B. uniflora*, com 100% de inibição ao fitopatógeno.

Portanto, os três extratos que apresentaram 100% de atividade inibitória foram selecionados e avaliados por ensaio de diluição em ágar contra as linhagens de *M. pernicioso*, FA553 e CP02 (ambos biotipo cacau) e APS1 e WMAS (ambos biotipo solanácea). Adicionalmente, para verificar se há especificidade na atividade inibitória pelos extratos, estes foram avaliados contra os fungos *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis sojae* e *Rhizomucor pusillus*. Os resultados estão contidos na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade inibitória do extrato aquoso de *B. uniflora*, *C. nocturnum* e *S. seaforthianum* (2 %) a biotipos de *M. pernicioso* e a *F. oxysporum*, *P. sojae* e *R. pusillus*

Tratamento	Taxa de inibição (%)						
	<i>M. pernicioso</i>				<i>F. oxysporum</i>	<i>P. sojae</i>	<i>R. pusillus</i>
	FA553	CP02	APS1	WMAS			
<i>B. uniflora</i>	73,6 ^{CB}	79,9 ^{BA}	72,2 ^{DB}	61,1 ^{DC}	3,1 ^{CE}	80,2 ^{CA}	53,1 ^{BD}
<i>C. nocturnum</i>	89,6 ^{BB}	93,4 ^{ABA}	61,1 ^{CU}	74,3 ^{CC}	2,1 ^{CF}	96,9 ^{AA}	53,1 ^{BE}
<i>S. seaforthianum</i>	73,6 ^{CC}	81,9 ^{BB}	70,8 ^{BC}	54,9 ^{EE}	0 ^{CF}	90,6 ^{BA}	61,5 ^{AD}
Piraclostrobina	100 ^{AA}	45,1 ^{CC}	100 ^{AA}	99,3 ^{AA}	36,6 ^{BU}	55,2 ^{DB}	29,2 ^{DE}
Trifloxistrobina + Protiocanazol	77,1 ^{CC}	40,3 ^{CF}	100 ^{AA}	88,9 ^{BB}	57,3 ^{AD}	96,9 ^{AA}	46,9 ^{CE}

Piraclostrobina e Trifloxistrobina +Protiocanazol, concentração de 1 mg L⁻¹.

Dados em média do percentual de inibição de três replicatas.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, letra minúscula entre colunas (p ≤ 0,1) / maiúscula entre linhas (p ≤ 0,1).

Os ensaios demonstram que a ação inibitória dos extratos foi efetiva à todos os biotipos de *M. pernicioso* utilizados e, também aos fungos *P. sojae* e *R. pusillus*. Dentre os fungos avaliados, somente *F. oxysporum* mostrou-se insensível a ação dos extratos aquosos.

A insensibilidade de *F. oxysporum* aos extratos possivelmente se deve a sua capacidade de detoxificar saponinas de ação antifúngica, compostos abundantes em vegetais, pela produção de enzimas extracelulares (tomatinases) que quebram a ligação entre a aglicona e a glicona (ITO et al., 2004).

As maiores taxas inibitórias do extrato de *C. nocturnum* foram verificadas contra os biotipos de *M. pernicioso* FA553, CP02 e o fungo *P. sojae*, enquanto que os extratos de *B. uniflora* e *S. seaforthianum* foram igualmente mais ativos contra a linhagem de *M. pernicioso* CP02 e o fungo *P. sojae*.

Comparando a sensibilidade dos biotipos de *M. pernicioso* aos extratos vegetais, os biotipos de solanácea APS1 e WMAS mostraram-se menos sensíveis ao extrato de *C. nocturnum* e, *M. pernicioso* WMAS foi o biotipo menos sensível aos extratos de *B. uniflora* e *S. seaforthianum*.

Quanto à ação dos fungicidas comerciais, os fungos *M. pernicioso* biótipo CP02, *F. oxysporum* e *R. pusillus* mostraram-se como os mais insensíveis à ação destes.

Para determinar a concentração inibitória média (CI₅₀), os extratos aquosos de *C. nocturnum*, *S. seaforthianum* e *B. uniflora* foram avaliados nas concentrações de 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% e 0,025% por ensaio de diluição em ágar. Deste ensaio gerou-se uma curva de regressão e este foi utilizado para calcular o CI₅₀, como pode ser verificado na tabela 9.

Tabela 9 - Concentração inibitória média (CI₅₀) a *M. pernicioso*, biótipo FA553, CP02, APS1 e WMAS, pelo extrato aquoso de *B. uniflora*, *C. nocturnum* e *S. seaforthianum*

Extrato	Linhagens de <i>M. pernicioso</i>			
	CI ₅₀ (% de folhas secas no extrato aquoso) e R ²			
	FA553	CP02	APS1	WMAS
<i>B. uniflora</i>	0,12 (0,95)	0,03 (0,88)	0,40 (0,94)	0,51 (0,92)
<i>C. nocturnum</i>	< 0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025
<i>S. seaforthianum</i>	0,09 (0,73)	0,08 (0,90)	0,50 (0,94)	0,73(0,96)

Com este resultado, evidenciou-se que o extrato de *C. nocturnum* possui a maior atividade inibitória e a todos os biotipos de *M. pernicioso*, dentre as plantas selecionadas. Na menor concentração avaliada (0,025 %) as inibições se mantiveram em 78 % (FA553), 82 % (CP02), 64 % (APS1) e 55 % (WMAS).

Os extratos de *B. uniflora* e *S. seaforthianum* apresentaram maior atividade respectivamente contra os biotipos CP02 e FA553 (ambos biotipo cacau), sendo que, dentre estas, o extrato de *B. uniflora* mostrou-se como o mais efetivo e contra o biotipo CP02.

Os biotipos solanácea (APS1 e WMAS) foram significativamente menos sensíveis à atividade inibitória de *B. uniflora*, *C. nocturnum* e *S. seaforthianum*.

A menor sensibilidade de *M. pernicioso* do biotipo solanácea aos extratos destas plantas, possivelmente se deve a algum mecanismo de adaptação que

conferiu maior capacidade a estes em infectar esta família vegetal, como a adaptação de *F. oxysporum* em infectar o tomateiro (ITO et al., 2004). Apesar da infecção por *M. perniciosa* ser relatada para algumas espécies solanáceas, não há relatos de infecção por este fungo em *C. nocturnum*, *B. uniflora* e *S. seaforthianum*.

Uma elevada atividade antifúngica a biotipos de *M. perniciosa*, também foi constatada por Gomes et al., (2014) pelo extrato aquoso de folhas do tomateiro (*Solanum lycopersicum*), planta conhecida pela suscetibilidade a infecção por *M. perniciosa*. No entanto, neste trabalho não foi observado diferença de inibição pelo extrato aos biotipos cacau e solanácea. Em seu trabalho, Gomes et al., (2014) atribuíram a atividade antifúngica de *Solanum lycopersicum* a saponina alcalóide α -tomatina e, estes verificaram que dentre os 10 fungos utilizados, a molécula α -tomatina possui ação específica a *M. perniciosa* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (patógeno de feijão).

De acordo com Arneson e Durbin (1968) e Keukens et al. (1995) o mecanismo de ação antifúngico de α -tomatina e outras saponinas, está relacionada à sua capacidade de complexação com esteroides da membrana celular do fungo e, conseqüente aumento da permeabilidade de membrana. Portanto, a constituição de esteroides na membrana é descrito como um dos mecanismos de resistência dos fungos a esta classe de composto.

Portanto, com estes ensaios verificou-se que os extratos aquosos de *C. nocturnum*, *S. seaforthianum* e *B. uniflora* possuem promissora atividade na inibição de *M. perniciosa*.

Para priorizar dentre estas três plantas quais serão submetidas a estudo de constituintes químicos, realizou-se uma investigação na literatura quanto a relatos de atividade antifúngica e compostos conhecidos.

Para *C. nocturnum* localizou-se vários estudos descrevendo a atividade antifúngica do extrato e óleo essencial, como possuindo atividade inibitória *in vitro* aos fungos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* (BARRERA-NECHA e BAUTISTA-BANOS, 2008), *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (AL-REZA et al., 2010), *Fusarium* spp (BANÕS et al., 2008) e aos fungos patógenos *Candida albicans*, *Microsporium canis*, *Candida glabrata* (KHAN et al., 2011).

Dentre estes, vale enfatizar que Al-Reza et al., (2010) ao aplicar o óleo essencial de *C. nocturnum* sobre plantas de pimenta, obtiveram uma considerável supressão da doença causada por *Phytophthora capsici*, ao redor de 82,4-100%.

De acordo com busca na base de dados *Dictionary of Natural Products* para compostos oriundos de *C. nocturnum*, obteve-se aproximadamente 20 e com uma maioria representada pela classe saponina.

Para *S. seaforthianum* encontrou-se um único estudo na dissertação de Meela (2008), na qual este obteve um extrato bruto acetônico que mostrou atividade inibitória à germinação de esporos dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Penicilium expansum* e *Fusarium oxysporum*.

Entre os constituintes de *S. seaforthianum*, somente quatro compostos são descritos até o momento, os alcalóides solanocapsina, solaseaforthina (**41**), isosolaseaforthina (ALI et al., 1978) e solanoforthina (**42**) (ALI et al., 1977). Destes, apenas solanocapsina (**28**) possui conhecida atividade antifúngica.

Sobre *B. uniflora*, nenhum estudo foi localizado que descreva sua constituição química ou sua atividade antifúngica, portanto a atividade antifúngica do extrato aquoso desta planta está sendo relatada pela primeira vez.

Considerando os dados obtidos da literatura, a planta *C. nocturnum* mostrou possuir um número elevado de estudos quanto a sua atividade antifúngica e constituição química. Portanto, somente os extratos aquosos de *S. seaforthianum* e *B. uniflora* foram selecionados para isolamento e identificação de seus compostos bioativos, visto sua elevada atividade antifúngica e pelo fato de que destas há poucas ou nenhuma molécula conhecida.

5.3 Conclusões

Foram avaliados os extratos aquosos de dez plantas da família Solanaceae quanto à atividade inibitória ao crescimento micelial de *M. pernicioso*. Sendo que, nenhuma destas possui conhecida atividade antifúngica a este fitopatógeno.

Neste estudo, três espécies não apresentaram atividade inibitória (*Solanum granuloseprosum*, *Solanum cernuum* e *Lycianthes asarifolia*); quatro exibiram baixa atividade inibitória (*Capsicum annum*, *Datura stramonium*, *Solanum melongena* e *Nicotiana tabacum*); e três extratos exibiram elevada atividade inibitória (*Solanum seaforthianum*, *Cestrum nocturnum* e *Brunfelsia uniflora*) a *M. pernicioso*.

Os extratos de *S. seaforthianum*, *C. nocturnum* e *B. uniflora* apresentaram atividade inibitória as linhagens de *M. pernicioso* do biótipo solanácea e cacau e aos fungos *Phomopsis sojae* e *Rhizomucor pusillus*. Somente *Fusarium oxysporum* mostrou-se como insensível a ação destes extratos.

As linhagens de *M. pernicioso* do biótipo cacau mostraram-se como as mais sensíveis aos extratos aquosos das solanáceas em comparação as linhagens de *M. pernicioso* do biótipo solanácea.

O extrato da solanácea *C. nocturnum* mostrou-se como o mais efetivo na inibição de todas as linhagens de *M. pernicioso*, com um $CI_{50} < 0,025$ % de folhas secas no preparo do extrato aquoso.

A atividade antifúngica de *B. uniflora* e *S. seaforthianum* está sendo relatada pela primeira vez.

Portanto, para estudo dos constituintes químicos selecionou-se as plantas *B. uniflora* e *S. seaforthianum*, por seu caráter promissor. A planta *C. nocturnum* não foi selecionada devido aos inúmeros relatos de atividade antifúngica e compostos isolados.

Referências

ABAD, M.J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc**, Zurich, v.7, p. 116-145, 2007.

AL-REZA, S.M.; RAHMAN, A.; AHMED, Y.; KANG, S. C. Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 96, n. 2, p. 86-92, 2010.

ALBUQUERQUE, U.P.D.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALI, E.; CHAKRAVARTY, A.K.; DHAR, T.K.; PAKRASHI, S.C. Solaseaforthine and isosolaseaforthine, two novel 3-amino-20-pyridyl pregnanes from *solanum seaforthianum*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 19, n. 40, p. 3871-3874, 1978.

ALI, E.; CHAKRAVARTY, A.K.; PAKRASHI, S.C.; BIEMANN, K.; HIGNITEI, C.E. Studies on indian medicinal plants-XLIV: Solanoforthine, a new steroidal alkaloid from *solanum seaforthianum*. a note on the mass spectrum of solanocapsine. **Tetrahedron**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1371-1377, 1977.

ARIF, T.; BHOSALE, J.D.; KUMAR, N.; MANDAL, T.K.; BENDRE, R.S.; LAVEKAR, G. S.; DABUR, R. Natural products - antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, Newar, v. 11, n. 7, p. 621-638, 2009.

ARNESON, P.A.; DURBIN, R.D. Studies on mode of action of tomatine as a fungitoxic agent. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 43, n. 5, p. 683-686, 1968.

BAÑOS, S.B; BARRERA NECHA, L.L.; HERNÁNDEZ LAUZARDO, A.N.; VELÁZQUEZ DEL VALLE, M.G.; ALIA TEJACAL, I.; GUILLÉN SÁNCHEZ, D. Polvos, extractos y fracciones de hojas de *Cestrum nocturnum* L. y su actividad antifúngica en dos aislamientos de *Fusarium* spp. **Revista UDO Agrícola**, Cumaná, v. 8, n.1, p.42-51, 2008.

BARRERA-NECHA, L.L.; BAUTISTA-BANOS, S. Antifungal activity of powders, extracts, and fractions of *Cestrum nocturnum* L. on mycelial growth of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Fr.) Vuill. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Chapingo, v. 26, n. 1, p. 27-31, 2008.

GOMES, L.H.; DUARTE, K.M.R.; ANDRINO, F.G.; LEAL J. R. G. A.; GARCIA, L. M.; FIGUEIRA, A.; DE LIRA, S. P. Alpha-Tomatin against Witches' Broom Disease: **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 05, p. 596-604, 2014.

ITO, S.; ETO, T.; TANAKA, S.; YAMAUCHI, N.; TAKAHARA, H.; IKEDA, T. Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of alpha-tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 571, p. 31-34, 2004.

KEUKENS, E.A.J.; DEVRIJE, T.; VANDENBOOM, C.; DEWAARD, P.; PLASMAN, H.H.; THIEL, F.; CHUPIN, V.; JONGEN, W.M.F.; DEKRUIJFF, B. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, Amsterdam, v. 1240, n. 2, p. 216-228, 1995.

KHAN, M.A.; INAYAT, H.; KHAN, H.; SAEED, M.; KHAN, I.; INAYAT U. R. R. Antimicrobial activities of the whole plant of *Cestrum nocturnum* against pathogenic microorganisms. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 5, n. 6, p. 612-616, 2011.

KLITTICH, C.J.R.; RAY, S.L. Effects of physical properties on the translaminar activity of fungicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, West Sussex, v. 107, n. 3, p. 351-359, 2013.

MEELA, M.M. Evaluation of alien invasive weedy plants for activity against plant pathogenic fungi. Dissertação (Mestrado em Ciência). **University of Pretoria**, Pretoria, 2008. 50p.

THOMAZELLA, D.P.T.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, H.C.; SAVIANI, E.E.; RINCONES, J.; TONI, I.M.; REIS, O.; GARCIA, O.; MEINHARDT, L.W.; SALGADO, I.; PEREIRA, G.A.G. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, Oxford, v. 194, n. 4, p. 1025-1034, 2012.

YAZDANI, D.; TAN, Y.H.; ZAINAL ABIDIN, M.A.; JAGANATH, I. B. A review on bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 30, p. 6584-6589, 2011.

YOON, M.Y.; CHA, B.; KIM, J.C. Recent Trends In Studies On Botanical Fungicides In Agriculture. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 29, n. 1, p. 1-9, 2013.

6 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS DE *S. seaforthianum*

RESUMO

A planta *Solanum seaforthianum* é uma solanácea encontrada em regiões tropicais e subtropicais do planeta, conhecida pelo nome popular de trepadeira doce-amarga, *brazilian nightshade* ou jasmim italiano. Neste trabalho, verificou-se que o extrato de *S. seaforthianum* possui uma elevada atividade inibitória ao crescimento micelial do fitopatógeno *M. perniciosa*. Como esta planta possui poucos estudos quanto aos seus constituintes químicos e nenhum estudo sobre sua atividade antifúngica, este trabalho teve por objetivo explorar o potencial dos metabólitos secundários produzidos pela planta *S. seaforthianum* com atividade antifúngica à *M. perniciosa*. Para tanto, realizou-se um estudo químico e biológico dos compostos antifúngicos presentes no extrato aquoso de folhas de *S. seaforthianum*. A partir do extrato aquoso de *S. seaforthianum* obteve-se duas frações constituídas por saponinas furostanas, a mistura (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside, com CI_{50} de $40,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, e a mistura (25R)-timosaponin H₁ / (25R)-uttroside B, com CI_{50} de $22,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ao crescimento micelial de *M. perniciosa*. Todos os compostos caracterizados neste trabalho estão sendo obtidos pela primeira vez a partir de *S. seaforthianum* e relatados para atividade antifúngica.

Palavras-chave: *Solanum seaforthianum*; Karatavioside; Purpureagitoside; Timosaponin; Uttroside

ABSTRACT

Solanum seaforthianum is a Solanaceae plant from tropical and subtropical regions, it is known by popular name *trepadeira doce-amarga*, *brazilian nightshade* or *jasmim italiano*. In this work, it was verified that *S. seaforthianum* extract exhibited inhibitory activity to mycelial growth of cocoa phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. As there are few chemical studies and no antifungal activity studies about this plant, this work aimed to explore the potential of secondary metabolites produced by *S. seaforthianum* with antifungal activity against *M. perniciosa*. For this, a biological and chemical study was realized with the antifungal compounds from leaves water extract from *S. seaforthianum*. From extract of *S. seaforthianum* two furostan saponin fractions were obtained, the mixture (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside, with IC_{50} of $40,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the mixture (25R)-timosaponin H₁ / (25R)-uttroside B, with IC_{50} of $22,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ to the mycelial growth of *M. perniciosa*. All compounds characterized in this study were obtained for the first time from *S. seaforthianum* and described about their antifungal activity.

Keywords: *Solanum seaforthianum*; Karatavioside; Purpureagitoside; Timosaponin; Uttroside

6.1 Introdução

A planta da espécie *Solanum seaforthianum* Andrews (Figura 7), pertencente à subfamília Solanoidea, tribo Solaneae, e conhecida pelo nome popular trepadeira doce-amarga, *brazilian nightshade*, jasmim italiano. É uma liana perene encontrada alastrando-se sob as árvores, arbustos e cercas, atingindo até 5 metros de altura.

Considerada como erva daninha, encontrada comumente em áreas com solos férteis, principalmente nas margens ou dentro de florestas fechadas. *Solanum seaforthianum* é amplamente cultivada por sua característica ornamental, porém sua ingestão é tóxica aos mamíferos (USDA, 2015). É encontrada em regiões tropicais e subtropicais, nativa da Colômbia, Venezuela e de Trinidad e Tobago, mas está naturalizada em toda América do Sul, América Central, sul do México e na América do Norte (USDA, 2015).

Figura 7 – Foto de *Solanum seaforthianum*.

6.2 Resultados e Discussão

A planta *S. seaforthianum* foi coletada na cidade de Piracicaba-SP, observou-se que o extrato aquoso de suas folhas possui elevada atividade antifúngica a *M. perniciosa*. Como há na literatura poucos estudos sobre seus metabólitos secundários, realizou-se separações cromatográficas biomonitoradas para isolamento dos compostos responsáveis pela atividade inibitória.

Para isso, o extrato aquoso de *S. seaforthianum* foi particionado com n-butanol. Pela fração n-butanólica conter, dentre outros, compostos apolares em análise por CCD, este foi seco, ressuspendido em metanol e particionado com hexano (Figura 8).

Figura 8 – Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica contra *M. perniciosa*, por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, avaliando (SsA) fração aquosa, (SsM) fração metanólica e (SsH) fração hexânica do extrato *S. seaforthianum*

O resultado obtido neste ensaio demonstrou que somente a fração metanólica (SsM) apresenta compostos antifúngicos. Sendo assim, esta fração foi submetida a cromatografia em coluna Sep-Pak C₁₈ (Figura 9).

Figura 9 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica contra *M. perniciosa*, por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com as 10 frações resultantes da cromatografia em coluna Sep-Pak C₁₈ da fração SsM

A avaliação das 10 frações obtidas mostrou que somente as frações SsM5 e SsM6 apresentaram atividade inibitória à *M. perniciosus*. Estas duas frações foram reunidas e submetidas a cromatografia em gel Sephadex® LH-20 (Figura 10).

Figura 10 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a *M. perniciosus*, por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com 15 frações resultantes da cromatografia em gel Sephadex® LH-20, da união das frações SsM5 e SsM6

Desta separação obteve-se 15 frações. O resultado do ensaio para bioatividade mostrou que as frações SsM5d, SsM5e e SsM5f possuem atividade inibitória, por apresentarem um número elevado de compostos na análise em CCD, estas foram reunidas e novamente submetidas a cromatografia em coluna Sep-Pak C₁₈ (Figura 11).

Figura 11 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a *M. perniciosus*, por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com 10 frações resultantes da cromatografia em coluna Sep-Pak C18 da união das frações SsM5d, SsM5e e SsM5f

Nesta separação obteve-se 10 frações. Destas, 4 frações apresentaram atividade inibitória, SsM5d5, SsM5d6, SsM5d7 e SsM5d8.

Devido bioatividade e maior quantidade de massa, a fração SsM5d6 foi submetida a separação em CLAE (Figura 12).

Figura 12 – Cromatograma da fração SsM5d6, frações coletados e bioensaio contra *M. perniciosus* por difusão em disco com 0,1 mg de amostra. Detector UV em 210 nm, eluição em gradiente com água e metanol. Coluna C₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm), vazão da fase móvel a 1 mL min⁻¹

Para separação dos compostos da fração SsM5d6, realizou-se uma otimização dos parâmetros do gradiente de eluição e do comprimento de onda no

UV. Os compostos desta fração apresentaram melhor absorção no comprimento de onda de 210 nm e separação pelo seguinte gradiente de eluição (Tabela 10).

Tabela 10 – Gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica de SsM5d6 em coluna de fase reversa C₁₈

Tempo (min.)	Vazão (mL min ⁻¹)	Água (%)	Metanol (%)
0	1	40	60
5	1	40	60
15	1	20	80
16	1	0	100
24	1	0	100

As frações foram coletadas conforme indicado na Figura 12, o que resultou em 8 frações. Destas, as frações SsM5d6b, SsM5d6c, SsM5d6d, SsM5d6g, SsM5d6h exibiram atividade inibitória. As frações SsM5d6a e SsM5d6e, apesar de majoritárias, não apresentaram bioatividade na concentração avaliada. Portanto, estas foram re-avaliadas na concentração de 0,2 mg de amostra por disco (Figura 13).

Figura 13 - Ensaio de atividade antifúngica a *M. perniciosa*, por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com as frações SsM5d6a, SsM5d6e e controle contendo somente metanol (CM)

Neste ensaio constatou-se que as frações SsM5d6a e SsM5d6e apresentam atividade inibitória na concentração de 0,2 mg por disco.

As frações que mostraram picos definidos e bioativos foram SsM5d6a, SsM5d6c, SsM5d6e e SsM5d6g. Estas últimas frações, mesmo após sucessivas purificações por CLAE, exibiram dois picos no cromatograma e com tempos de retenção distintos (Figura 14).

Figura 14 – Cromatograma para as frações SsM5d6a e SsM5d6e (a) e para as frações SsM5d6c e SsM5d6g (b). Detector em 210 nm. Eluição isocrática com água e metanol (30:70). Coluna C₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm), vazão da fase móvel a 1 mL min⁻¹

Diante deste fato, suspeitou-se da possibilidade de estar ocorrendo interconversão entre as formas moleculares destes compostos, neste caso entre SsM5d6a ↔ SsM5d6e e, entre SsM5d6c ↔ SsM5d6g. Fato semelhante é descrito por Kite, Porter e Simmonds (2007) para compostos vegetais da classe furostana, esta classe mostra-se como passiva de sofrer interconversão quando na presença de metanol.

Desta forma, cada par de compostos foi reunido e tratado somente como SsM5d6a (SsM5d6a ↔ SsM5d6e) e SsM5d6c (SsM5d6c ↔ SsM5d6g) para as análises de identificação estrutural.

6.3 Estudo químico de SsM5d6a

A fração SsM5d6a foi submetida a análise por CLAE acoplado a detectores de UV, espalhamento dinâmico de luz e espectrometria de massas (CLAE-UV-ELSD-MS).

Os dados dos detectores ELS e UV estão expostos na Figura 15.

Figura 15 – Cromatograma de CLAE-ELSD (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração SsM5d6a. Coluna C_{18} (2,1 x 150 mm - 3,5 μ m), vazão da fase móvel a 0,5 mL min⁻¹

No cromatograma de CLAE-UV-ELSD não visualizou-se os dois picos observados anteriormente, exibindo somente um pico largo e uma única banda de absorção na região do ultravioleta λ_{max} de 201,3 nm, o que indica ausência de cromóforos na molécula.

A presença de um pico largo possivelmente ocorreu devido a fase móvel acidificada. Um comportamento semelhante foi descrito por Kite, Porter e Simmonds (2007) para saponinas furostanas, uma classe de compostos que são passíveis de interconversão, mas exibem somente um pico largo quando submetidas a eluição acidificada.

O espectrômetro de massas de baixa resolução gerou o seguinte espectro na figura 16:

Figura 16 – Espectro de massas em modo ESI positivo da fração SsM5d6a

Pelo estudo deste espectro de massas observaram-se fragmentações consecutivas de 162 Da e 132 Da, a partir do íon m/z 1211,8 e até alcançar o m/z 431,2.

Outra fragmentação foi observada a partir do íon m/z 619,2, na qual, considerando-a como protonada $[M + H]^+$, demonstrou-se ser inteiramente constituída por três fragmentos de 162 Da e um de 132 Da.

Os íons m/z 431,2 e 619,2 mostram-se como fragmentos do íon m/z 1211,8, na qual a soma de suas massas não protonadas resulta na massa molecular de 1048 ($1049 [M + H]^+$) que, acrescido de 162 Da resulta na massa molecular de 1210 Da.

Com isso, acredita-se que o m/z 1211,8 refira-se a massa molecular protonada $[M + H]^+$ do composto presente na fração SsM5d6a, portanto de massa molecular 1210 Da.

O estudo do espectro de massas do composto em SsM5d6a permitiu aferir o seguinte padrão de fragmentação (Figura 17):

Figura 17 –Padrão de fragmentação proposto para o composto SsM5d6a, a partir do íon parental m/z 1211 $[M + H]^+$ (a) e do fragmento m/z 619 $[M + H]^+$ (b)

De acordo com Plock et al. (2001) perdas durante a fragmentação de 162 Da, correspondem aos açúcares de 6 carbonos (hexose) glucose ou galactose, e de 132 Da aos açúcares de 5 carbonos (pentose) arabinose ou xilose.

Portanto, considerando os dados anteriores, concluí-se que o composto SsM5d6a provavelmente pertence a classe das saponinas, possivelmente furostana, na qual os açúcares são correspondentes a glicona e a massa molecular de 430 Da é correspondente a aglicona.

Dessa forma, observou-se que o composto SsM5d6a possui massa molecular de 1210 Da, sendo composto de duas cadeias de açúcares (bidesmosídica) compreendendo 4 hexoses e 1 pentose e, um esteróide de massa molecular 430 Da (Figura 18).

Figura 18 – Esquema proposto para composição de SsM5d6a segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a) e (b) não possuem posição definida

Com realização de busca na literatura e base de dados, observou-se correspondência da fragmentação com a saponina furostana karatavioside C ($C_{56}H_{92}O_{29}$, CAS 75084-54-7). Porém, o composto karatavioside C possui massa molecular de 1228,57243 Da, com íon correspondente observável somente em modo negativo. Segundo Kang et al., (2012) o íon m/z em 1211 refere-se a perda de uma hidroxila (OH) a partir do íon parental.

Portanto, para confirmar a massa molecular de SsM5d6a realizou-se análise de HRMS em modo negativo (Figura 19):

Figura 19 – Espectro de massas de alta resolução, em modo negativo, da fração SsM5d6a

Pelo espectro de massas em modo negativo observou-se o íon m/z 1227,5621 [$M - H$]⁻ de correspondência ao composto karatavioside C e, também um outro íon de m/z 1241,5775 [$M - H$]⁻, para este último observou-se cátion

correspondente no espectro de massas de baixa resolução com m/z de 1243,8 $[M + H]^+$ (Figura 16), portanto de massa molecular 1242 Da.

De acordo com Kite, Porter e Simmonds (2007) saponinas da classe furostana, da qual karatavioside C pertence, possuem uma hidroxila (OH) ou metoxila (OCH₃) ligada ao carbono 22. Estes grupos mostram-se como passivos de sofrer interconversão, podendo ocorrer, na presença de metanol, substituição da hidroxila por metoxila formando um derivado 22-Metil éter; ou, na presença de água, substituição de metoxila por hidroxila. Reação que normalmente acarreta a formação de um segundo composto na separação cromatográfica, quando há metanol no sistema de eluição.

Portanto, na fração SsM5d6a o íon m/z 1241, 5775 $[M - H]^-$ é correspondente a forma metoxilada de karatavioside C (C₅₇H₉₄O₂₉) com massa molecular de 1242,58808 Da, o que justifica o segundo pico observado durante o isolamento deste composto neste trabalho (Figura 20).

Figura 20 – Estrutura química de (25R)-Karatavioside C (1) e 22-Metil éter (25R)-Karatavioside C (2)

A interconversão de karatavioside C para 22-Metil éter também foi observada por Vollerner et al., (1980), que consideraram este último como artefato do processo de isolamento. No entanto, Kite, Porter e Simmonds, (2007) relatam que não há como afirmar que saponinas furostanas metoxiladas em C-22 também não compreendam uma forma nativa da molécula.

Para atribuir de forma inequívoca a identidade de SsM5d6a como karatavioside C, realizou-se análises de RMN uni e bidimensionais e os deslocamentos obtidos foram comparados com a literatura (Tabela 11).

Tabela 11 – Deslocamentos de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC da aglicona de SsM5d6a e correspondência com os deslocamentos de Karatavioside C (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Macias et al., 2010) (25R)-Karatavioside C		Isolado SsM5d6a	
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
1ax	1,28 dd (12,6, 12,3)	45,7	1,30	45,5
1ec	2,29 dd (12,6, 4,5)		2,29 dd (12,5, 5,2)	
2	4,02	70,0	4,04	69,8
3	3,81	84,6	3,81	84,3
4ax	2,53 dd (14,0, 11,8)	37,6	2,53	37,4
4ec	2,68 dd (14,0, 5,1)		2,68 dd (14,1, 5,4)	
5		140,0		139,8
6	5,27 brs	121,9	5,28	121,7
7	1,79 l (13,4)	32,2	1,79	32,2
	1,40		1,42	
8	1,46	31,0	1,45	30,8
9	0,92	50,2	0,92	50,0
10		37,9		37,5
11	1,45	21,2	1,45	20,9
	1,39		1,40	
12	1,07	39,8	1,07	39,6
	1,68		1,70	
13		40,7		40,5
14	0,90	56,4	0,90	56,2
15	1,97	32,4	1,97	32,2
	1,46		1,46	
16	4,91	81,1	4,91	81,0
17	1,90 m	63,8	1,90	63,5
18	0,85 s	16,4	0,85 s	16,3
19	0,92 s	20,4	0,92 s	20,2
20	2,20 dq (6,9, 6,9)	40,7	2,20 dq (6,6, 6,6)	40,5
21	1,30 d (6,9)	16,4	1,30 d (6,8)	16,5
22		110,6		110,4
23	2,01	37,2	2,01	37,4
	1,97		1,97	
24	2,01	28,4	2,01	28,1
	1,65		1,66	
25	1,90	34,3	1,90	34,3
26 Ha	3,59 dd (9,5, 5,9)	75,2	3,62	75,2
26 Hb	3,92		3,97	
27	0,96 d (6,7)	17,4	0,98 d (6,8 Hz)	17,2

Macias et al., (2010): RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

SsM5d6a: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

Pelo espectro de RMN observou-se correlação da fração SsM5d6a com karatavioside C pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios de metilas em δ 0,85 (s, CH₃-18), δ 0,92 (s, CH₃-19), δ 0,96 (d, J = 6,6 Hz, 27-CH₃) e δ 1,30 (d, J = 6,8 Hz, 21-CH₃); pelos deslocamentos de carbono da dupla ligação em δ 139,8 (5-C) e δ 121,7 (6-C); e carbonos ligados a hidroxilas em δ 69,8 (2-OH) e δ 110,4 (22-OH).

A presença de 22-Metil éter karatavioside C pôde ser confirmada pelo deslocamento de hidrogênio com singlete intenso em δ 3,24 (OCH₃) e deslocamento de carbono em δ 112,4 (22-OCH₃) (Figura 21).

→ HMBC

Figura 21 – Correlações HSQC e HMBC da aglicona de SsM5d6a com 22-Metil éter (25R)-Karatavioside C e (25R)-Karatavioside C

A estrutura e composição da glicona de SsM5d6a foram confirmadas por comparação com os deslocamentos de RMN da glicona de karatavioside C (Tabela 12).

Tabela 12 – Deslocamentos de RMN ^1H e ^{13}C da glicona de karatavioside C e correspondência com os deslocamentos de SsM5d6a (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Macias et al., 2010) Glicona		Isolado SsM5d6a	
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
3-O-Gal				
1	4,95 d (7,7)	102,8	4,92 d (7,8)	103,0
2	4,52 m	72,2	4,52	72,4
3	4,14 m	75,2	4,13	75,3
4	4,55 m	79,1	4,55	79,1
5	4,01 m	75,2	4,03	75,5
6	4,18 m	60,2	4,20	60,3
	4,59 m		4,58	
Gli				
1	5,19 d (8,1)	104,3	5,20 d (7,8)	104,4
2	4,32 dd (8,1, 8,8)	81,0	4,34	81,0
3	4,13 m	86,9	4,13	86,7
4	3,76 dd (9,6, 9,6)	70,1	3,82	70,5
5	3,84 ddd (9,6, 7,2, 2,3)	77,2	3,84	77,4
6a	4,04 m	62,7	4,04	62,7
6b	4,48 m		4,50	
Gli				
1	5,52 d (8,0)	104,5	5,57 d (8,0)	104,5
2	4,03 m	75,9	4,04	75,9
3	4,10 m	77,0	4,13	77,4
4	4,05 m	71,0	4,08	71,1
5	3,89 ddd (8,0, 5,8, 2,3)	77,2	3,90	77,4
6a	4,38 m	62,6	4,39	62,7
6b	4,51 m		4,55	
Xil				
1	5,22 d (8,0)	104,6	5,24 (8,0)	104,6
2	3,90 m	74,9	3,94	74,9
3	4,09 m	78,2	4,04	78,5
4	4,07 m	70,2	4,08	70,2
5ax	3,64 dd (10,8, 10,0)	67,1	3,64	67,0
5ec	4,18 dd (4,8, 10,8)		4,20	
26-O-Gli				
1	4,83 d (7,8)	105,0	4,80 d (7,8)	104,8
2	4,01 dd (7,8, 8,7)	75,2	4,03	75,3
3	4,12 m	78,4	4,23	78,3
4	4,23 m	71,8	4,21	71,5
5	3,87 m	78,6	3,94	78,3
6a	4,20 m	63,0	4,39	62,7
6b	4,42 m		4,55	

Macias et al., (2010): RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .
SsM5d6a: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

A estrutura e composição da glicona, como correspondente a karatavioside C, foi confirmada pelos deslocamentos dos prótons e carbonos anoméricos (que fazem parte da ligação glicosídica) dos açúcares em δ_H 4,92 (d, $J = 7,8$ Hz) com δ_C 103,0 (3-O-D-galactose), δ_H 5,20 (d, $J = 7,8$ Hz) com δ_C 104,4 (D-glicose), δ_H 5,57 (d, $J = 8,0$ Hz) com δ_C 104,5 (D-glicose), δ_H 5,24 (d, $J = 8,0$ Hz) com δ_C 104,6 (D-xilose) e δ_H 4,80 (d, $J = 7,8$ Hz) com δ_C 104,8 (26-O-D-glicose) (Figura 22).

Figura 22 – Região ampliada do espectro de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de SsM5d6a correspondente aos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- d_5 , δ em ppm)

Uma das cadeias da aglicona foi, portanto, confirmada para licotetraose (Figura 23).

Figura 23 – Estrutura química de licotetraose (MILNER et al., 2011).

Os espectros de RMN uni e bidimensionais confirmaram a identidade de SsM5d6a como karatavioside C e 22-Metil éter karatavioside C.

Além de karatavioside C, os espectros das análises de MS e RMN de SSM5d6a mostram a presença de um outro composto nesta fração.

No espectro de massas de alta resolução observou-se os íons m/z com duas unidades de massa superior $[M + 2]$ a massa molecular de Karatavioside C e sua forma metoxilada, respectivamente m/z 1229,5747 $[M - H]^-$ e m/z 1243,5898 $[M - H]^-$ (Figura 19).

Na análise por CLAE-ELSD-MS de SsM5d6a, observou-se que os espectros de massas obtidos de cada extremidade do pico largo formado (Figura 15) possuem íons que diferenciam em duas unidades de massa e, que estes possuem similar padrão de fragmentação (Figura 24).

Figura 24 – Espectro de massas em modo ESI positivo da fração SsM5d6a, espectro superior refere-se a Karatavioside C e o espectro inferior ao composto com duas unidades de massa superior $[M + 2]$

Pela interpretação do espectro de massas de baixa resolução observou-se que a similaridade no padrão de fragmentação do composto $[M + 2]$ à karatavioside C se mantém até o fragmento correspondente ao esteroide $[\text{aglicona} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$, portanto, os íons m/z 431 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ e m/z 433 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + 2 + \text{H}]^+$.

A diferença de duas unidades de massa não é observada nos fragmentos referentes aos açúcares da molécula: m/z 325 $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 295 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e m/z 163 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Devido a isso, sugere-se que a diferença estrutural, entre Karatavioside C e o composto $[M + 2]$ se encontra na aglicona e, possivelmente, se deve a ausência da dupla ligação compreendida entre os carbonos 5 e 6.

A presença de um composto saturado em SsM5d6a, é reforçada pela presença nos espectros de RMN do sinal de carbono em δ 13,18 (CH_3 -19) e hidrogênio em δ 0,68 (s, CH_3 -19), na qual são indicativos da presença de um segundo composto saturado entre os carbonos 5 e 6, conforme observado por Maisashvili et al., (2012).

Para comprovar a presença de um segundo composto $[M + 2]$, a fração SsM5d6a foi hidrolisada para remoção dos açúcares e o esteroide resultante, nomeado como SsM5d6aH1, foi analisado por métodos espectrométricos.

6.3.1 Estudo químico dos esteróides em SsM5d6aH1

A fração SsM5d6aH1 foi submetida a análise por CLAE-MS, o espectro de massas obtido está exposto na Figura 25.

Figura 25 – Espectro de massas em modo ESI positivo de SsM5d6aH1

Neste espectro observou-se o íon m/z 431,4, que é comum aos fragmentos de karatavioside C, mas não observou-se o íon m/z 433,4, comum aos fragmentos do composto $[M + 2]$.

Pelo estudo do espectro de massas de SsM5d6aH1 observaram-se fragmentações consecutivas de 18 Da e 144 Da, iniciando a partir do íon m/z 431,4 e até alcançar o m/z 251,4.

Esta interpretação permitiu aferir o seguinte padrão de fragmentação (Figura 26):

Figura 26 – Padrão de fragmentação proposto para SsM5d6aH1, a partir do íon parental m/z 431 $[M + H]^+$

De acordo com LI et al., (2006) as duas fragmentações de 18 Da referem-se a perda de água em moléculas que possuem hidroxilas como substituintes. E a fragmentação com perda de 144 Da é descrita por Liang et al., (2002) como clivagem do anel E em esteroides espirostanos devido ao rearranjo de McLafferty (Figura 27).

Figura 27 – Reação de clivagem do anel E espiroстано, pelo rearranjo de McLafferty, com formação do fragmento de 144 Da, de acordo com Liang et al., (2002)

Resultado similar foi obtido por Vollerner et al., (1980) ao hidrolisar a molécula Karatavioside C, na qual obteve como aglicona o esteroide espiroстано yucagenina ($C_{27}H_{42}O_4$, CAS 511-97-7) (Figura 28), de massa molecular 430,30831 Da, massa que é correspondente ao íon 431,4 $[M + H]^+$.

Figura 28 – Estrutura química de (25R)-yucagenina

De acordo com Challinor e De Voss, (2013) a formação de um esteroide espirostando após hidrólise de uma saponina furostana, se deve ao fato de que saponinas furostanas possuem uma molécula de açúcar ligada ao oxigênio na posição C-26 que impede sua ciclização, consequentemente a formação do anel F. Portanto, após remoção dos açúcares ligados a cadeia esteroidal de saponinas furostanas o esteroide resultante, devido ciclização do anel F, transforma-se num esteroide espirostando (Figura 29).

Figura 29 – Estrutura básica de saponinas espirostanda e furostana (R= molécula de açúcar), mostrando sistema de nomeação dos anéis e numeração dos carbonos para esteroides, de acordo com Challinor e De Voss (2013)

Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C também foi possível correlacionar a estrutura de SsM5d6aH1 com yucagenina devido os deslocamentos de hidrogênios de metilas em δ 0,80 (s, CH_3 -18), δ 1,04 (s, CH_3 -19), δ 0,68 (d, $J = 5,6$ Hz, 27- CH_3) e δ 1,13 (d, $J = 7,0$ Hz, 21- CH_3); pelos deslocamentos de carbono da dupla ligação em

δ 141,0 (5-C) e δ 121,0 (6-C); e de hidroxilas em δ 72,8 (2-OH) e δ 76,5 (3-OH) (AHMAD et al., 1991) (Tabela 13).

Tabela 13 – Correlações de RMN ^1H e ^{13}C de yucagenina com os deslocamentos químicos de SsM5d6aH1 (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Ahmadet al., 1991) (Kuroda et al., 2015)		Esteróide	
	(25R)-Yucagenina		SsM5d6aH1	
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
1ax	1,3 m	46,7	1,4	46,4
1ec	2,3		2,35	
2	4,05 m	72,7	4,05	72,8
3	3,08 m	76,8	3,80	76,5
4ax	2,7	40,9	2,7	40,7
4ec				
5		141,3		141,0
6	5,3 dis t	121,3	5,37	121,0
7	1,85	32,3	1,8	32,0
8	1,5 t	31,2	1,65	31,6
9		50,4		50,2
10		38,6		38,3
11		21,3		21,2
12		39,9		39,9
13		40,5		40,7
14	1,4	56,6	1,45	56,4
15	1,4	32,2	1,45	32,0
	1,35		1,33	
16	4,5	81,1	4,5	80,9
17	1,81	62,9	1,8	62,6
18	0,79 s	16,4	0,80 s	16,4
19	0,93 s	20,7	1,04 s	20,5
20	1,95	42,0	1,92	41,7
21	1,12 d (6,9)	15,0	1,12 d (7,0)	14,8
22		109,3		109,0
23	1,67	31,8	1,67	31,6
24	1,52 m	29,3	1,56	29,0
25	1,6 m	30,6	1,65	30,4
26 Ha	3,51 m	66,9	3,48	66,6
26Hb	3,6 m		3,57	
27	0,67 d (5,5)	17,3	0,68 d (5,6)	17,1

Ahmad et al., (1991): RMN ^1H 400 MHz; Piridina- d_5 .Kuroda et al., (2015): RMN ^{13}C 100 MHz; Piridina- d_5 .SsM5d6aH1: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

Com os dados de RMN ^1H e ^{13}C confirmou-se a existência de uma segunda molécula que diferencia pela ausência de insaturação entre os carbonos 5 e 6, no qual é evidenciado principalmente pelo sinal de hidrogênio com singleto em δ 0,81 (CH_3 -19) e carbono em δ 13,5 (CH_3 -19).

Através de pesquisa nas bases de dados a aglicona gitogenina ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$, CAS 511-96-6) foi identificada como possuindo estrutura similar a yucagenina, porém saturada e com deslocamento de RMN que condizem ao observado (MAISASHVILI et al., 2012) (Tabela 14).

Tabela 14 – Correlações de RMN ^1H e ^{13}C de (25R)-gitogenin com os deslocamentos químicos de SsM5d6aH1 (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Maisashvili et al., 2012)		Esteróide	
	(25R) Gitogenina		SsM5d6aH1	
	δ_{H} (multi, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J Hz)	δ_{C}
1ax		45,0	1,22	45,0
1ec				
2		73,0	4,05	72,8
3		76,4	3,80	76,5
4ax		35,6		34,4
4ec				
5		44,8	1,07	45,0
6		27,8	1,07	28,1
7		31,8	1,94	32,0
8		34,4		34,4
9		54,3	0,59	54,3
10		37,6		37,0
11		21,2		21,2
12		39,9		39,9
13		40,6		40,7
14		56,1		56,4
15		31,4		31,6
16	4,36 m	80,8	4,5	80,9
17		62,1		62,6
18	0,76 s	16,5	0,80 s	16,4
19	0,85 s	13,6	0,81 s	13,5
20		41,5		41,7
21	0,95 d (6,6)	14,5	1,12 d (7,0)	14,8
22		109,2		109,0
23		32,0		32,0
24		28,8		29,0
25		30,3		30,4
26 Ha	3,32 m	66,8	3,48	66,6
26Hb	3,62 m		3,57	
27	0,78 d (6,4)	17,1	0,68 d (5,6)	17,1

Maisashvili et al., (2012): RMN ^1H 615 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; CDCl_3 .
 SsM5d6aH1: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

A presença de uma segunda molécula ausente de insaturação pôde ser confirmada pelos dados de RMN bidimensionais, principalmente devido a correlação direta H-C (HSQC) de δ_H 0,81 (s, CH₃-19) com δ_C de 13,5 (CH₃-19), direta H-H (COSY) 1,48 (H₂-4) com 1,07 (H-5) e 1,07 (H₂-6) com 1,94 (H₂-7) e longa distância H-C (HMBC) de H3-19 com δ_C 45,0 (CH₂-1), 37,0 (C-10), 54,3 (CH-9) e 45,0 (CH-5) (Figura 30).

Figura 30 – Correlações HSQC, COSY e HMBC de SsM5d6aH1 com gitogenina e yucagenina. Deslocamentos de hidrogênio em vermelho e carbono em azul

A presença de gitogenina entre os esteroides em SsM5d6aH1 foi confirmada pelos dados de espectrometria de massas e RMN. Considerando os íons no espectro de massas alta resolução de SsM5d6a, de m/z 1229,5747 [M – H][–] e m/z 1243,5898 [M – H][–], confirma que a fração SsM5d6a também possui a saponina furostana purpureagitossídeo (C₅₆H₉₄O₂₉, CAS 54191-26-3) (Figura 31).

Figura 31 – Estrutura química de (25R)-Purpureagitoside (1), (25R)-Karatavioside C (2) e a forma metoxilada de ambos (3)

A presença de purpureagitoside é reforçada pelo trabalho de Tschesche, Javellana e Wulff, (1974) e Maisashvili et al., (2012), que também obtiveram o esteroide gitogenina após a hidrólise de purpureagitoside.

Para determinar a estereoquímica do carbono 25 dos esteróides em SsM5d6aH1, foi utilizado o método descrito por Agrawal, (2003). Este método considera principalmente os deslocamentos químicos dos hidrogênios geminais a metila na posição 27, através dos sinais de 26Ha e 26Hb e a diferença entre estes (Tabela 15).

Tabela 15 – Deslocamentos de hidrogênio (δ) de esteroides espirostanos 25R/25S segundo Agrawal (2003) e de SsM5d6aH1, em piridina- d_5 (δ_H em ppm)

Esteroides espirostanos (AGRAWAL, 2003)				
	26Ha	26Hb	27H₃	$\delta_{Ha} - \delta_{Hb}$
25R	3,38-3,59	3,26-3,50	0,57-0,83	$\leq 0,20$ ppm
25S	3,88-4,11	3,18-3,42	0,95-1,14	$\geq 0,35$ ppm

SsM5d6aH1 (esteroide)				
	3,48	3,57	0,68	0,10 ppm

A estereoquímica do carbono 25 dos esteroides em SsM5d6aH1 foi determinada como 25R devido aos deslocamentos observados de 26Ha (δ 3,48) e 26Hb (δ 3,58) (Figura 32). A diferença entre estes de somente 0,10 ppm e o deslocamento de metila na posição 27 que foi confirmado pelo dubleto no espectro de hidrogênio em δ 0,68 com constante de acoplamento (J) de 5,6 Hz.

Figura 32 – Região ampliada do espectro de RMN 1H (600 MHz) de SsM5d6aH1 (em piridina- d_5 , δ em ppm)

Estes dados confirmam a estereoquímica de SsM5d6aH1 para 25R, com isso a identidade dos esteroides de SsM5d6aH1 foram estabelecidas como (25R)-yucagenina e (25R)-gitogenina.

Portanto, a fração SsM5d6a mostrou-se como uma mistura constituída pelos compostos (25R)-karatavioside C e (25R)-purpureagitoside.

A presença de purpureagitoside e karatavioside C na mesma planta também foi relatada por Kang et al., (2012) ao isolarem pela primeira vez (25S)-karatavioside

C e o já conhecido (25R)-purpureagitoside, de rizomas de *Anemarrhena asphodeloides*; e por Zhao et al., (2013) ao analisarem o perfil de saponinas esteroidais do extrato também de *Anemarrhena asphodeloides* por UPLC-QTOF, onde observaram, além de outros, (25R)-karatavioside C, (25S)-karatavioside C, (25R)-purpureagitoside e (25S)-purpureagitoside.

O isolamento de karatavioside C foi primeiramente realizado a partir das inflorescências de *Allium Karataviense* (Liliaceae) por Vollerner et al., (1980), atualmente seu isolamento é relatado para duas famílias botânicas: Liliaceae e Asparagaceae; sendo três espécies *Allium karataviense*, *Agave brittoniana* (MACIAS et al., 2010) e *Anemarrhena asphodeloides* (KANG et al., 2012; ZHAO et al., 2013).

Purpureagitoside foi isolado pela primeira vez por Tschesche, Javellana e Wulff, (1974) de folhas de *Digitalis purpurea* L. (Scrophulariaceae), atualmente seu isolamento é relatado para três famílias botânicas: Liliaceae, Zygophyllaceae e Scrophulariaceae; e 5 espécies: *Digitalis purpurea*, *Tribulus terrestris* (KANG et al., 2014), *Digitalis lanata* (KIRMIZIBEKMEZ et al., 2009), *Allium rotundum* (MAISASHVILI et al., 2012) e *Anemarrhena asphodeloides* (LIU et al., 2012; KANG et al., 2012; ZHAO et al., 2013).

De acordo com a classificação linear filogenética das angiospermas feita por Haston et al., (2009), a família Solanaceae (posição 358), da qual *Solanum seaforthianum* pertence, está agrupada de forma próxima da família Scrophulariaceae (posição 369), ambas dicotiledôneas, que se encontram bastante distantes das famílias Liliacea (posição 61), Asparagaceae (posição 75), ambas monocotiledôneas, e a família Zygophyllaceae (posição 142), dicotiledônea, se encontra numa posição intermediária entre estes dois agrupamentos.

Os dados anteriores mostram que existe uma distribuição mais restrita para karatavioside C e somente entre monocotiledôneas, enquanto que purpureagitoside está distribuída de forma ampla entre monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Este trabalho mostra o primeiro relato de isolamento de karatavioside C a partir de uma dicotiledônea e, de karatavioside C e purpureagitoside a partir de uma planta da família Solanaceae.

6.4 Estudo químico de SsM5d6c

A fração SsM5d6c foi submetida a análise por CLAE acoplado a detectores de UV, espalhamento dinâmico de luz e espectrometria de massas (CLAE-UV-ELSD-MS).

Os dados dos detectores ELS e UV estão expostos na Figura 33.

Figura 33 – Cromatograma de espalhamento dinâmico de luz (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração SsM5d6c. Coluna C₁₈ (2,1 x 150 mm - 3,5µm), vazão da fase móvel a 0,5 mL min⁻¹

Nesta análise observou-se que SsM5d6c possui comportamento semelhante a fração anteriormente analisada SsM5d6a. Na qual, a eluição ácida em CLAE resultou na formação um pico largo e o composto apresentou uma única banda de absorção na região do ultravioleta λ_{max} de 201,3 nm, o que indica ausência de cromóforos na molécula.

O espectrômetro de massas de baixa resolução gerou o seguinte espectro na figura 34:

Figura 34 – Espectro de massas em modo ESI positivo da fração SsM5d6c

Pelo estudo deste espectro de massas observaram-se fragmentações consecutivas de 162 Da e 132 Da, a partir do íon m/z 1195,9 e até alcançar o m/z 415,3.

Outra fragmentação foi observada a partir do íon m/z 619,2, na qual, considerando-a como protonada $[M + H]^+$, demonstrou-se ser inteiramente constituída por três fragmentos de 162 Da e um de 132 Da.

Os íons m/z 415,3 e 619,2 mostram-se como fragmentos do íon m/z 1195,9, na qual a soma de suas massas não ionizadas (considerando uma ionização com H^+) resulta na massa molecular de 1032 ($1033 [M + H]^+$) que, acrescido de 162 Da resulta massa molecular de 1194 Da.

Com isso, acredita-se que o m/z 1195,9 refira-se a massa molecular protonada $[M + H]^+$ do compostos presente na fração SsM5d6a, portanto de massa molecular 1194 Da.

O estudo do espectro de massas do composto em SsM5d6c permitiu aferir o seguinte padrão de fragmentação (Figura 35):

Figura 35 –Padrão de fragmentação proposto para o composto SsM5d6c, a partir do íon parental m/z 1195 $[M + H]^+$ (a) e do fragmento m/z 619 $[M + H]^+$ (b)

O padrão de fragmentação de SsM5d6c mostrou-se muito semelhante ao exibido por SsM5d6a, com perdas consecutivas de 162 Da (hexose) e 132 Da (pentose), até alcançar a massa de 415 $[M + H]^+$.

Dessa forma, concluí-se que o composto SsM5d6c provavelmente possui massa molecular de 1194 Da, duas cadeias de açúcares (bidesmosidica) compostas de 4 hexoses e 1 pentose e uma aglicona de 414 Da (Figura 36).

Figura 36 –Esquema proposto para composição de SsM5d6c segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a) e (b) não possuem posição definida

Os dados anteriores sugerem que SsM5d6c é uma saponina esteroidal furostana que difere de SsM5d6a somente pela massa da aglicona, possivelmente pela ausência de uma hidroxila.

Com realização de busca na literatura e base de dados, observou-se correspondência da fragmentação com a saponina furostana timosaponin H₁ (C₅₆H₉₂O₂₈, CAS 267244-16-6), no entanto, o composto timosaponin H₁ possui massa molecular de 1212,57752 Da, com íon correspondente observável somente em modo negativo (MENG et al., 1999). Segundo Zhao et al., (2013) o íon m/z em 1195 refere-se a perda de uma hidroxila (OH) a partir do íon parental.

Portanto, para confirmar a massa molecular de timosaponin H₁ realizou-se análise de HRMS em modo negativo (Figura 37):

Figura 37 – Espectro de massas de alta resolução, em modo negativo, da fração SsM5d6c

Pelo espectro de massas em modo negativo observou-se o íon m/z 1211,5684 $[M - H]^-$ correspondente ao composto timosaponin H₁ e, também um outro íon de m/z 1225,5822 $[M - H]^-$, para este último observou-se cátion correspondente no espectro de massas de baixa resolução com m/z de 1227,09 $[M + H]^+$ (Figura 34), portanto de massa molecular 1226 Da.

Portanto, conclui-se que o íon m/z 1225,5822 $[M - H]^-$ é correspondente a metoxilação de timosaponin H₁ (C₅₇H₉₄O₂₈) com massa molecular de 1226,5901 Da, o que justifica o segundo pico observado durante o isolamento deste composto neste trabalho (Figura 38).

Figura 38 – Estrutura química de (25R)-timosaponin H₁ (1) e 22-Metil éter timosaponin H₁ (2)

Para atribuir de forma inequívoca a identidade de SsM5d6c como timosaponin H₁, realizou-se análises de RMN uni e bidimensionais e os deslocamentos obtidos foram comparados com a literatura (Tabela 16).

Tabela 16 – Deslocamentos de RMN ^1H e ^{13}C e HSQC da aglicona de (25R)-timosaponin H_1 e correspondência com os deslocamentos de SsM5d6c (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Meng et al., 1999) (25S)-Timosaponin H_1		Isolado SsM5d6c	
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
1ax		37,4	1,74	37,22
1ec				
2		30,1	2,10	30,16
3		78,7	4,25	78,72
4ax		39,2	2,67	39,29
4ec				
5		141,0		140,79
6		121,7	5,31	121,36
7		32,4	1,95	32,18
8		31,6	2,02	31,63
9		50,3	0,88	50,30
10		37,1		37,22
11		21,1	1,37	21,06
12		40,0	1,69	39,75
13		40,8		40,54
14		56,6	1,02	56,38
15		32,5	1,34	32,42
16		81,4	4,54	81,41
17		63,8	1,78	64,22
18	0,69 s	16,5	0,81 s	16,36
19	0,82 s	19,4	0,88 s	19,40
20		40,8	2,22	40,54
21		16,5	1,21 d (6,8)	16,54
22		110,7		110,40
23		37,0	1,72	37,22
24		28,3	1,34	28,24
25		34,5	1,95	34,26
26 Ha		75,1	3,62	75,12
26 Hb			3,97	
27	1,23 d	17,5	1,01 d (6,6)	17,17

Meng et al., (1999): RMN ^1H 300 MHz; RMN ^{13}C 75 MHz; Piridina- d_5 .SsM5d6c: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

Pelo espectro de RMN observou-se correlação da fração SsM5d6c com timosaponin H₁ pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios de metilas em δ 0,81 (s, CH₃-18), δ 0,88 (s, CH₃-19), δ 1,01 (d, J = 6,6 Hz, 27-CH₃) e δ 1,21 (d, J = 6,8 Hz, 21-CH₃); pelos deslocamentos de carbono da dupla ligação em δ 140,79 (5-C) e δ 121,36 (6-C); e do único carbono ligado a hidroxila em δ 110,40 (22-OH) (MENG et al., 1999).

A presença de 22-Metil éter timosaponin H₁ pôde ser confirmada pelo singlete intenso em δ 3,27 (OCH₃) e deslocamento de carbono em δ 112,41 (22-OCH₃) (Figura 39) (AGRAWAL, 2005).

Figura 39 – Correlações HSQC e HMBC de SsM5d6c com 22-Metil éter (25R)-timosaponin H₁ e (25R)-timosaponin H₁

A estrutura e composição da glicona de SsM5d6c foram confirmadas por comparação com os deslocamentos de RMN da glicona de timosaponin H₁ (Tabela 17).

Tabela 17 – Deslocamentos de RMN ^1H e ^{13}C e HSQC de SsM5d6c e correspondência com a glicona de timosaponin H_1 (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Meng et al., 1999) Timosaponin H_1		Isolado SsM5d6c	
	Glicona			
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
3-O-Gal				
1	4,88 d (7,5)	102,8	4,87 d (7,7)	102,78
2		73,2		73,24
3		75,3		75,37
4		79,9		79,92
5		76,3		76,30
6		60,6		60,57
Gli				
1	5,18 d (7,9)	104,8	5,20 d (7,9)	104,92
2		81,1		81,34
3		86,7		86,75
4		70,8		70,78
5		77,7		77,68
6a		62,5		62,53
6b				
Gli				
1	5,56 d (7-8)	104,9	5,59 d (7,6)	105,0
2		75,4		75,37
3		78,6		78,59
4		71,7		71,81
5		78,2		78,21
6a		63,03		63,03
6b				
Xil				
1	5,23 d (7,6)	105,2	5,25 (7,8)	105,25
2		75,6		75,61
3		78,6		78,72
4		71,0		71,05
5ax5		67,4		67,40
5ec				
26-O-Gli				
1	4,79 d (7,7)	104,9	4,83 d (7,8)	105,06
2		75,4		75,37
3		78,6		78,83
4		71,7		71,81
5		78,2		78,21
6a		63,0		62,95
6b				

Meng et al., (1999): RMN ^1H 300 MHz; RMN ^{13}C 75 MHz; Piridina- d_5 .
 SsM5d6c: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

A estrutura e composição da glicona, como correspondente a timosaponin H₁, foi confirmada pelos deslocamentos dos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares em δ_H 4.87 (d, $J = 7,7$ Hz) com δ_C 102,8 (3-O-D-galactose), δ_H 5,20 (d, $J = 7,9$ Hz) com δ_C 104,9 (D-glicose), δ_H 5,59 (d, $J = 7,6$ Hz) com δ_C 105,0 (D-glicose), δ_H 5,25 (d, $J = 7,8$ Hz) com δ_C 105,2 (D-xilose) e δ_H 4,83 (d, $J = 7,8$ Hz) com δ_C 105,1 (26-O-D-glicose) (Figura 40).

Figura 40 – Região ampliada do espectro de RMN 1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de SsM5d6c correspondente aos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- d_5 , δ em ppm)

Uma das cadeias da aglicona de SsM5d6c foi, portanto, confirmada para licotetraose.

Os espectros de RMN uni e bidimensionais confirmaram a identidade de SsM5d6a como timosaponin H₁ e 22-Metil éter timosaponin H₁.

Além de timosaponin H₁, os espectros das análises de MS e RMN de SSM5d6c mostram a presença de um outro composto nesta fração.

No espectro de massas de alta resolução observou-se os íons m/z com duas unidades de massa superior $[M + 2]$ a massa molecular de timosaponin H_1 e sua forma metoxilada, respectivamente m/z 1213,5811 $[M - H]^-$ e m/z 1227,5948 $[M - H]^-$.

Na análise por CLAE-ELSD-MS de SsM5d6c, observou-se que os espectros de massas obtidos de cada extremidade do pico largo formado (Figura 33) possuem íons que diferenciam em duas unidades de massa e, que estes possuem similar padrão de fragmentação (Figura 41).

Figura 41 – Espectro de massas em modo ESI positivo da fração SsM5d6c, espectro superior refere-se a timosaponin H_1 e o espectro inferior ao composto com duas unidades de massa superior $[M + 2]$

Pela interpretação do espectro de massas de baixa resolução observou-se que a similaridade no padrão de fragmentação do composto $[M + 2]$ à timosaponin H_1 se mantém até o fragmento correspondente ao esteroide $[aglicona - H_2O + H]^+$, portanto os íons m/z 415 $[M - H_2O + H]^+$ e m/z 417 $[M - H_2O + 2 + H]^+$.

A diferença de duas unidades de massa não é observada nos fragmentos referentes aos açúcares da molécula: m/z 325 $[M + H]^+$, m/z 295 $[M + H]^+$ e m/z 163 $[M + H]^+$. Devido a isso, sugere-se que a diferença estrutural entre timosaponin H_1 e o composto $[M + 2]$ se encontra na aglicona e, possivelmente, se deve a ausência da dupla ligação compreendida entre os carbonos 5 e 6, como observado para o composto $[M + 2]$ em SsM5d6a.

A presença de um composto saturado entre os carbonos 5 e 6, em SsM5d6c, é reforçada pela presença nos espectros de RMN do sinal de hidrogênio com singleto em δ 0,64 (s, CH₃-19) e carbono em δ 12,33 (CH₃-19).

Através de pesquisa nas bases de dados, a saponina uttroside B (C₅₆H₉₄O₂₈, CAS 88048-09-3), de massa molecular 1214,59317 Da foi identificada como possuindo estrutura similar a timosaponin H₁, porém saturada (Tabela 18).

Tabela 18 – Correlações de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC da aglicona de (25R)-uttroside B com os deslocamentos químicos da aglicona de SsM5d6c (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(LIU et al., 2014) (25R)-uttroside B		Aglicona SsM5d6c	
	δ_{H} (multi, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J Hz)	δ_{C}
1ax	0,76	37,2	0,77	37,2
1ec	1,48		1,50	
2	1,72	30,0	1,74	29,9
	2,02		2,01	
3	3,82 m	77,0	3,83	77,4
4ax	1,65 m	34,6	1,67	34,8
4ec	1,86 m		1,83	
5	1,19 m	44,8	1,17	44,7
6	1,22 m	29,1	1,27	28,7
7	1,74 m	32,2	1,74	32,1
	1,98 m		1,96	
8	1,34 m	35,0	1,35	34,9
9	0,66 m	54,6	0,50	54,4
10		36,1		35,6
11	1,18 m	21,4	1,17	21,2
	1,39 m		1,39	
12	1,03 m	40,2	1,06	40,0
	1,65 m		1,67	
13		42,3		40,54
14	1,00 m	56,5	1,02	56,38
15	1,33 m	32,6	1,34	32,42
	1,94 m		1,95	
16	4,96q (6,5)	81,3	4,54	81,41
17	1,76 m	64,1	1,78	64,22
18	0,86 s	16,8	0,88 s	16,36
19	0,75 s	12,6	0,64 s	12,33
20	2,15 m	40,8	2,22	40,54
21	1,28 d (7,0)	16,5	1,21 d (6,8)	16,54
22		110,8		110,40
23	1,78 m	36,1	1,78	37,22
	1,54 m		1,50	
24	1,33 m	28,6	1,34	28,24
	1,79 m		1,78	
25	1,93 m	34,3	1,95	34,26
26 Ha	3,37dd (6,5; 9,2)	75,4	3,62	75,12
26Hb	3,79 m		3,97	
27	0,96 d (6,5)	17,7	1,01 d (6,6)	17,17

Liu et al., (2014): RMN ^1H 500 MHz; RMN ^{13}C 125 MHz; Piridina- d_5 .

SsM5d6c: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

A presença de um segundo composto ausente de insaturação pôde ser confirmado pelos dados de RMN bidimensionais, principalmente devido a correlação direta H-C (HSQC) de δ_H 0,64 (s, CH₃-19) com δ_C de 12,3 (CH₃-19), direta H-H (COSY) 1,67 (H₂-4) com 1,17 (H-5) e 1,27 (H₂-6) com 1,74 (H₂-7) e longa distância H-C (HMBC) de H3-19 com δ_C 37,2 (CH₂-1), 35,6 (C-10), 54,4 (CH-9) e 44,7 (CH-5) (Figura 42).

Figura 42 – Correlações HSQC, COSY e HMBC do esteroide de SsM5d6c com uttroside B e timosaponin H₁. Deslocamentos de hidrogênio em vermelho e carbono em azul

A presença de uttroside B entre as saponinas de SsM5d6c foi confirmada pelos dados de espectrometria de massas e RMN. Portanto, a fração SsM5d6c mostrou-se como uma mistura constituída pelos compostos timosaponin H₁ e uttroside B (Figura 43).

Figura 43 – Estrutura química de (25R)-uttroside B (1), (25R)-timosaponinH₁ (2) e a forma metoxilada de ambos (3)

Para determinar a estereoquímica do carbono 25 da aglicona de SsM5d6c, foi utilizado o método descrito por Agrawal (2005) para saponinas furostanas (Tabela 19). Devido a sobreposição dos sinais no espectro de RMN ^1H de SsM5d6c, os deslocamentos de 26Ha e 26Hb foram obtidos a partir dos sinais de HSQC.

Tabela 19 – Deslocamentos de hidrogênio (δ) de esteroides furostanos 25R/25S segundo Agrawal (2005) e do esteroide de SsM5d6c, em piridina- d_5 (δ_{H} em ppm)

Esteroides furostanos (AGRAWAL, 2005)				
	26Ha	26Hb	27H₃	$\delta_{\text{Ha}} - \delta_{\text{Hb}}$
25R	3,52-3,63	3,92-3,98	0,98-1,03	$\leq 0,48$ ppm
25S	3,42-3,52	4,02-4,10	1,01-1,05	$\geq 0,57$ ppm
Esteróide de SsM5d6c (isolado)				
	3,62	3,97	1,01	0,35 ppm

A estereoquímica do carbono 25 da aglicona de SsM5d6c foi determinada como 25R devido aos deslocamentos observados de 26Ha (δ 3,62) e 26Hb (δ 3,97), a diferença entre estes de somente 0,35 ppm e o deslocamento de metila na posição 27 que foi confirmado pelo dubleto no espectro de hidrogênio em δ 1,01 com constante de acoplamento (J) de 6,6 Hz.

Os dados anteriores confirmam a estereoquímica dos compostos em SsM5d6c para 25R, portanto a fração SsM5d6c mostrou-se como uma mistura constituída pelas moléculas (25R)-timosaponin H₁ e (25R)-uttroside B.

A presença de timosaponin H₁ e uttroside B na mesma planta também foi relatada por (ZHAO *et al.*, 2013) ao analisarem o perfil de saponinas esteroidais do extrato de *Anemarrhena asphodeloides* por UPLC-QTOF.

O composto (25S)-timosaponin H₁ foi isolado pela primeira vez por (MENG *et al.*, 1999) a partir de *Anemarrhena asphodeloides* (Liliaceae). Atualmente possui relatos de isolamento a partir de bulbos de *Fritillaria pallidiflora* (Liliaceae) (SHEN *et al.*, 2012), de rizomas de *Aspidistra typica* (Asparagaceae) (CUI *et al.*, 2013), e de (25R)-timosaponin H₁ a partir de frutos imaturos de *Solanum nigrum* (Solanaceae) (IKEDA *et al.*, 2000).

O isolamento de (25R)-uttroside B foi primeiramente realizado a partir do extrato de caule e raiz de *Solanum nigrum* (SHARMA et al., 1983). Atualmente possui relatos de isolamento a partir de tubérculos de *Polianthes tuberosa* (Asparagaceae) (JIN, ZHANG e YANG, 2004), de folhas de *Yucca Gloriosa* (Asparagaceae) (KEMERTELIDZE, BENIDZE e SKHIRTADZE, 2011) e de *Tribulus terrestris* (Zygophyllaceae) (KANG et al., 2014).

De acordo com a classificação linear filogenética das angiospermas feita por Haston et al., (2009), a família Solanaceae (posição 358), da qual *Solanum seaforthianum* pertence, é uma dicotiledônea e esta agrupada de forma bastante distante das famílias Liliaceae (posição 61) e Asparagaceae (posição 75), ambas monocotiledôneas, e a família Zygophyllaceae (posição 142), dicotiledônea, se encontra numa posição intermediária entre estes dois agrupamentos.

Os dados anteriores mostram que timosaponin H₁ e uttroside B podem ser isolados de monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Tanto o isolamento de (25R)-timosaponin H₁ quanto de (25R)-uttroside B a partir de *S. seaforthianum* caracterizam-se como o segundo relato de isolamento entre plantas da família Solanaceae e dentro do gênero *Solanum* sp.

Considerando todas as moléculas isoladas de *S. seaforthianum* neste trabalho, a presença conjunta de (25R)-karatavioside C, (25R)-purpureagitoside, (25R)-timosaponin H₁ e (25R)-uttroside B foi somente relatado por Zhao et al., (2013) ao analisar o perfil de saponinas esteroidais no extrato de *Anemarrhena asphodeloides* por UPLC-QTOF. Entretanto, é a primeira vez que estes compostos são isolados de *S. seaforthianum*, visto que até o momento somente os alcalóides solanocapsina, solaseaforthina, isosolaseaforthina (ALI et al., 1978) e solanoforthina (ALI et al., 1977) são descritos para essa planta.

6.5 Atividade inibitória dos compostos de *S. seaforthianum* a *M. pernicioso*

O extrato aquoso e as misturas de saponinas, karatavioside C / purpureagitoside e timosaponin H₁ / uttroside B, isoladas de *S. seaforthianum* foram avaliadas para atividade antifúngica a *M. pernicioso*, através de inibição da germinação de basidiósporos e crescimento micelial pelo método de microdiluição (Figura 44).

Neste ensaio, utilizou-se somente basidiósporos de *M. pernicioso* do biotipo solanácea WMAS. Devido a fase biotrófica (basidiósporos) de *M. pernicioso*, do biotipo cacau, ter manuseio proibido no estado de São Paulo por estar classificada como praga quarentenária A2, como descrito pela Instrução Normativa SDA/MAPA nº 38, de 14 de Outubro de 1999, artigo 3º.

Os valores representam a média de três replicatas $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas dentro do tratamento e maiúsculas entre tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 44 – Atividade inibitória do extrato aquoso e saponinas de *S. seaforthianum*, e de piraclostrobina a germinação de basidiósporos de *M. pernicioso*, em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Valores em percentual de germinação de basidiósporos em relação ao controle (=100)

Pelos resultados obtidos no ensaio, verifica-se que o extrato aquoso de *S. seaforthianum* mostrou-se mais efetivo que suas saponinas na inibição de germinação de basidiósporos de *M. pernicioso* com uma concentração inibitória mínima (CIM) de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Em nenhuma das concentrações avaliadas obteve-se inibição total de germinação pelas saponinas. Enquanto que o fungicida comercial piraclostrobina causou inibição total de germinação em todas as concentrações avaliadas.

Somente para as misturas de saponinas observou-se concentrações sem nenhuma atividade inibitória a germinação de basidiósporos, como a concentração de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para karatavioside C / purpureagitoside, com $102,4 \pm 10,3 \%$ de germinação, e a concentração de $15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ para timosaponin H₁ / uttroside B, com $112,3 \pm 9,4 \%$ de germinação.

No mesmo ensaio, após alguns dias de cultivo, avaliou-se a densidade micelial gerada por *M. perniciosa*. Para tanto, gerou-se uma curva de crescimento de *M. perniciosa* não tratado, ou seja, o controle negativo (Figura 45).

Figura 45 – Curva de crescimento pela densidade micelial (600 nm) de *M. perniciosa*. Os valores representam a média de seis replicatas $\pm$ desvio padrão

Pela curva de crescimento de *M. perniciosa* observou-se crescimento exponencial a partir do 4º dia e este alcançou sua densidade micelial máxima no 9º dia de cultivo, portanto para comparação dos tratamentos utilizou-se o 7º dia de cultivo (Figura 46).

Os valores representam a média de três replicatas $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas dentro do tratamento e maiúsculas entre tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 46 – Atividade inibitória do extrato aquoso e saponinas de *S. seaforthianum*, e de piraclostrobina ao crescimento micelial de *M. perniciosus*, em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Valores expressam a densidade micelial a 600 nm após 7 dias de cultivo

Neste último ensaio, diferente do ensaio de germinação, observou-se maior inibição pelas misturas de saponinas em comparação ao extrato aquoso, onde apresentaram uma CIM de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para karatavioside C / purpureagitoside, e de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para timosaponin H₁ / uttroside B, enquanto o extrato aquoso de *S. seaforthianum* apresentou uma CIM de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como o fungicida comercial piraclostrobina causou inibição total no ensaio de germinação, também houve inibição total da densidade micelial em todas as concentrações avaliadas, como pode ser observado na Figura 47.

$\mu\text{g mL}^{-1}$	Tratamento			
	Extrato "Ss"	karatavioside C Purpureagitoside	Timosaponin H ₁ Uttroside B	Piraclostrobina
500
250				
125				
62,5				
31,25				
15,63				

Figura 47 – Foto da microplaca com o ensaio de atividade inibitória, pelo método de microdiluição, do extrato aquoso e saponinas de *S. seafortianum*, e de piraclostrobina ao crescimento micelial de *M. pernicioso*, em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e após 7 dias de cultivo

No ensaio de avaliação de germinação (Figura 44) observou-se uma linearidade entre a concentração dos tratamentos e a resposta na germinação de basidiósporos. Contudo, no ensaio de avaliação do crescimento micelial (Figura 46) não observou-se a mesma linearidade, mas sim, uma inibição total na concentração inibitória mínima e que se manteve mesmo após o período de avaliação. Portanto, a atividade inibitória dos tratamentos foi determinada como fungicida.

Para uma comparação mais precisa foi calculado, através de curva de regressão, a concentração inibitória média (CI_{50}) de cada tratamento (Tabela 20).

Tabela 20 – Concentração inibitória média (CI_{50}) do extrato aquoso e saponinas de *S. seaforthianum*, e de piraclostrobina a taxa germinação e crescimento micelial de *M. perniciosa*

Tratamento	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para inibição de:			
	Germinação	R^2	Micélio	R^2
Extrato “Ss”	41,0	0,85	74,9	0,98
karatavioside C	249,4	0,92	40,9	0,99
Purpureagitoside				
Timosaponin H_1	86,1	0,98	22,3	0,99
Uttroside B				
Piraclostrobina	< 15,63	--	< 15,63	--

Nesta tabela verifica-se que o fungicida comercial piraclostrobina apresentou CI_{50} inferior a $15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como fungicida do grupo das estrobilurinas, a elevada atividade de piraclostrobina se deve a sua ação como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos e, assim inibindo a formação de ATP.

Entre os tratamentos, os melhores resultados obtidos foram para o extrato aquoso de *S. seaforthianum*, com CI_{50} de $41 \mu\text{g mL}^{-1}$ para germinação de basidiósporos, e para a mistura timosaponin H_1 / uttroside B, com CI_{50} de $22,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o crescimento micelial.

A maior atividade inibitória do extrato aquoso de *S. seaforthianum* na germinação de basidiósporos pode ser justificada por uma ação sinérgica de seus constituintes. Este fato foi observado por Lanzotti et al., (2012) que obtiveram resultado similar ao comparar a atividade inibitória das saponinas furostanas ceposide A, ceposide B e ceposide C, de *Allium cepa*, de forma isolada e de forma combinada ao crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e *Trichoderma atroviride*.

A atividade antifúngica dos compostos de *S. seaforthianum* encontram-se dentro do esperado, visto a variação de atividade que há para essa classe de compostos, como verificado no trabalho de Barile et al., (2007) que estudaram a atividade inibitória pelas saponinas furostanas minutoside A e minutoside C ao crescimento micelial de fungos fitopatógenos em microplaca, no qual minutoside A, na concentração $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou seu melhor resultado a *Botrytis cinerea*

(69 %) e, minutoside C, na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ causou total inibição de *Trichoderma harzianum*.

De acordo com Lanzotti et al., (2012) a diferença na taxa de inibição entre saponinas furostanas pode estar relacionada a estrutura da glicona. Estes discutem, que no caso cecosides a maior atividade antifúngica de cecoside B está relacionada a presença de glicose ligada em C-26, no lugar de pentose observada nas demais.

Apesar de karatavioside C e purpureagitoside já terem sido avaliadas para atividade de antiagregação plaquetária, nenhuma atividade foi constatada (KANG et al., 2012; KANG et al., 2014). Com isso, a atividade antifúngica observada para a mistura karatavioside C / purpureagitoside se mostra como seu primeiro relato de atividade biológica.

Os únicos relatos de atividade biológica de timosaponin H1 são de atividade inibitória de (25R)-timosaponin H1 ao vírus da herpes (HSV-1) (IKEDA et al., 2000), de (25S)-timosaponin H₁ à células humanas de glioma cerebral (C6) e a células de câncer de colo uterino (Hela) (SHEN et al., 2012).

Já (25R)-uttroside B possui relato de atividade citotóxica a células de câncer de pulmão (PC-12) e colo uterino (HCT116) (IKEDA et al., 2003), à células de câncer de colo uterino (Hela) (JIN, ZHANG e YANG, 2004) e indução de agregação plaquetária (KANG et al., 2014).

Portanto, a atividade antifúngica para as misturas (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside e (25R)-timosaponin H₁ / (25R)-uttroside B está sendo relatada pela primeira vez neste trabalho.

6.6 Conclusões

Realizou-se isolamento biomonitorado e identificação dos constituintes químicos de *S. seaforthianum*, que apresentam atividade inibitória a *M. pernicioso*.

Foram isoladas duas frações (SsM5d6a e SsM5d6c) que, por estudos químicos, mostraram-se constituídas por compostos da classe das saponinas furostanas.

A fração SsM5d6a foi identificada como uma mistura constituída por (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside. E a fração SsM5d6c foi identificada como uma mistura constituída por (25R)-timosaponin H₁ / (25R)-uttroside B.

Estes compostos estão sendo pela obtidos primeira vez de *S. seaforthianum* e relatados para atividade antifúngica.

O composto (25R)-karatavioside C é pela primeira vez obtido de uma planta da família Solanaceae e também de uma planta dicotiledônea.

O extrato aquoso de *S. seaforthianum* foi mais efetivo que as misturas de saponinas na inibição de germinação de basidiósporos de *M. pernicioso*, apresentando um Cl₅₀ de 41 µg mL⁻¹.

A mistura (25R)-timosaponin H₁ / (25R)-uttroside B foi a mais efetiva na inibição do crescimento micelial de *M. pernicioso*, com Cl₅₀ de 22,3 µg mL⁻¹, enquanto que a mistura (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside apresentou um Cl₅₀ de 40,9 µg mL⁻¹.

Nos ensaios verificou-se que, tanto o extrato aquoso quanto as misturas de saponinas isoladas de *S. seaforthianum* possuem atividade fungicida a *M. pernicioso*.

Referências

- AGRAWAL, P.K. 25R/25S stereochemistry of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring-F. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Lucknow, v. 41, n. 11, p. 965-968, 2003.
- AGRAWAL, P.K. Dependence of ¹H NMR chemical shifts of geminal protons of glycosyloxy methylene (H2-26) on the orientation of the 27-methyl group of furostane-type steroidal saponins. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Lucknow, v. 42, p. 990-993, 2004.
- AGRAWAL, P.K. Assigning stereodiversity of the 27-Me group of furostane-type steroidal saponins via NMR chemical shifts. **Steroids**, San Francisco, v. 70, n. 10, p. 715-724, 2005.
- AHMAD, V.U.; BAQAI, F.T.; FATIMA, I.; AHMAD, R. A spirostanol glycoside from *cestrum-nocturnum*. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 9, p. 3057-3061, 1991.
- ALI, E.; CHAKRAVARTY, A.K.; PAKRASHI, S.C.; BIEMANN, K.; HIGNITE, C.E. Solaseaforthine and isosolaseaforthine, two novel 3-amino-20-pyridyl pregnanes from *solanum seaforthianum*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 19, n. 40, p. 3871-3874, 1978.
- ALI, E.; CHAKRAVARTY, A.K.; DHAR, T.K.; PAKRASHI, S.C. Studies on indian medicinal plants-XLIV: Solanoforthine, a new steroidal alkaloid from *solanum seaforthianum*. a note on the mass spectrum of solanocapsine. **Tetrahedron**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1371-1377, 1977.
- BARILE, E.; BONANOMI, G.; ANTIGNANI, V.; ZOLFAGHARI, B.; SAJJADI, S. E.; SCALA, F.; LANZOTTI, V. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. **Phytochemistry**, New York, v. 68, n. 5, p. 596-603, 2007.
- CHALLINOR, V.L.; DE VOSS, J.J. Open-chain steroidal glycosides, a diverse class of plant saponins. **Natural Product Reports**, London, v. 30, n. 3, p. 429-454, 2013.
- CUI, J.M.; KANG, L.P.; YU, H.S.; ZHAO, Y.; XIONG, C.Q.; LIU, C.; MA, B. P. Two new furostanol saponins from *Aspidistra typica*. **Journal of Asian Natural Products Research**, Newar, v. 15, n. 5, p. 525-531, 2013.
- HASTON, E.; RICHARDSON, J. E.; STEVENS, P. F.; CHASE, M. W.; HARRIS, D. J. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, n. 2, p. 128-131, 2009.
- IKEDA, T.; ANDO, J.; MIYAZONO, A.; ZHU, X. H.; TSUMAGARI, H.; NOHARA, T.; YOKOMIZO, K.; UYEDA, M. Anti-herpes virus activity of *Solanum* steroidal glycosides. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 23, n. 3, p. 363-364, 2000.

IKEDA, T.; TSUMAGARI, H.; HONBU, T.; NOHARA, T. Cytotoxic activity of steroidal glycosides from solanum plants. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 8, p. 1198-1201, 2003.

JIN, J.M.; ZHANG, Y.J.; YANG, C.R. Spirostanol and furostanol glycosides from the fresh tubers of *Polianthes tuberosa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, n. 1, p. 5-9, 2004.

KANG, L.P.; ZHANG, J.; CONG, Y.; LI, B.; XIONG, C.Q.; ZHAO, Y.; TAN, D.W.; YU, H. S.; YU, Z. Y.; CONG, Y. W.; LIU, C.; MA, B. P.. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, New York, v. 107, p. 182-189, 2014.

KANG, L.P.; WU, K.L.; YU, H.S.; PANG, X.; LIU, J.; HAN, L.F.; ZHANG, J.; ZHAO, Y.; XIONG, C. Q.; SONG, X.B.; LIU, C.; CONG, Y.W.; MA, B.P. Steroidal Glycosides from the Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* and Their Antiplatelet Aggregation Activity. **PlantaMedica**, Stuttgart, v. 78, n. 6, p. 611-616, 2012.

KEMERTELIDZE, E.; BENIDZE, M.; SKHIRTADZE, A. Steroidal Glycosides from the Leaves of *Yucca Gloriosa*L. **Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences**, Georgia, v. 5, n. 1, p.158-163, 2011.

KIRMIZIBEKMEZ, H.; CELEP, E.; MASULLO, M.; BASSARELLO, C.; YESILADA, E.; PIACENTE, S. Phenylethyl Glycosides from *Digitalis lanata*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 92, n. 9, p. 1845-1852, 2009.

KITE, G.C.; PORTER, E.A.; SIMMONDS, M. S. J. Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1148, n. 2, p. 177-183, 2007.

KURODA, M.; ORI, K.; TAKAYAMA, H.; SAKAGAMI, H.; MIMAKI, Y. Karataviosides G-K, five new bisdesmosidic steroidal glycosides from the bulbs of *Allium karataviense*. **Steroids**, San Francisco, v. 93, p. 96-104, 2015.

LANZOTTI, V.; ROMANO, A.; LANZUISE, S.; BONANOMI, G.; SCALA, F. Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. **Phytochemistry**, New York, v. 74, p. 133-139, 2012.

LI, R.; ZHOU, Y.; WU, Z. J.; DING, L. S. ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 41, n. 1, p. 1-22, 2006.

LIANG, F.; LI, L. J.; ABLIZ, Z.; YANG, Y. C.; SHI, J. G. Structural characterization of steroidal saponins by electrospray ionization and fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 16, n. 12, p. 1168-1173, 2002.

LIU, Y.; WANG, Y. M.; SUN, L. K.; ZHANG, M. Q.; XIE, S. X.; XU, D. M.; XU, Y. J. Steroidal Glycosides from the Fruits of *Tribulus terrestris*. **Chemistry of Natural Compounds**, Basel, v. 50, n. 3, p. 483-488, 2014.

LIU, Z. R.; ZHU, D. L.; QI, Y. P.; CHEN, X. F.; ZHU, Z. Y.; CHAI, Y. F. Elucidation of steroid glycosides in *Anemarrhena asphodeloides* extract by means of comprehensive two-dimensional reversed-phase/polyamine chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 35, n. 17, p. 2210-2218, 2012.

MACIAS, F.A.; GUERRA, J.O.; SIMONET, A.M.; PEREZ, A.J.; NOGUEIRAS, C. Characterization of three saponins from a fraction using 1D DOSY as a solvent signal suppression tool. Agabrittonosides E-F. Furostane Saponins from *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Lucknow, v. 48, n. 5, p. 350-355, 2010.

MAISASHVILI, M.R.; KUCHUKHIDZE, D.K.; KIKOLADZE, V.S.; GVAZAVA, L.N. STEROIDAL GLYCOSIDES OF GITOGENIN FROM *Allium rotundum*. **Chemistry of Natural Compounds**, Basel, v. 48, n. 1, p. 86-90, 2012.

MENG, Z.; XU, S.; LI, W.; SHA, Y. Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi. **Chinese Journal of Medicinal Chemistry**, Shanghai, v. 9, p.294, 1999.

MILNER, S.E.; BRUNTON, N.P.; JONES, P.W.; O'BRIEN, N.M.; COLLINS, S.G.; MAGUIRE, A. R. Bioactivities of Glycoalkaloids and Their Aglycones from *Solanum* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 8, p. 3454-3484, 2011.

PLOCK, A.; BEYER, G.; HILLER, K.; GRUNDEMANN, E.; KRAUSE, E.; NIMTZ, M.; WRAY, V. Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. **Phytochemistry**, New York, v. 57, n. 3, p. 489-496, 2001.

SHARMA, S.C.; CHAND, R.; SATI, O.P.; SHARMA, A.K. OLIGOFUROSTANOSIDES FROM *SOLANUM-NIGRUM*. **Phytochemistry**, New York, v. 22, n. 5, p. 1241-1244, 1983.

SHEN, S.; LI, G. Y.; HUANG, J.; CHEN, C.J.; REN, B.; LU, G.; TAN, Y.; ZHANG, J. X.; LI, X.; WANG, J.H. Steroidal saponins from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. **Fitoterapia**, Milano, v. 83, n. 4, p. 785-794, 2012.

TSCHESCHE, R.; JAVELLANA, A. M.; WULFF, G. Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette, IX. Purpureagitosid, ein bisdesmosidisches 22-Hydroxyfurostanol-Glycosid aus den Blättern von *Digitalis purpurea* L. **Chemische Berichte**, Weinheim, v. 107, n. 9, p. 2828-2834, 1974.

USDA, **ARS, National Genetic Resources Program: Germplasm Resources Information Network** - (GRIN). Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?101454>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

VOLLERNER, J.S.; GOROVITS, M.B.; GOROVITS, T.T.; Abubakirov, N.K. Steroidal Saponines and Sapogenines Of *Allium* .17. Structure of Karatavioside-C. **Khimiya Prirodnkh Soedinenii**, Tashkent, n. 3, p. 355-359, 1980.

ZHAO, Y.; KANG, L.; YU, H.; ZHANG, J.; XIONG, C.; PANG, X.; GAO, Y.; LIU, C.; MA, B. Structure characterization and identification of steroidal saponins from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* by ultra performance liquid chromatography and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 341, p. 7-17, 2013.

7 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS DE *B. uniflora*

RESUMO

A planta *Brunfelsia uniflora* é uma solanácea nativa da América do Sul, conhecida pelo nome popular de manacá, manacá-açu ou manacá-de-cheiro. Neste trabalho, verificou-se que o extrato de *B. uniflora* possui uma elevada atividade inibitória ao crescimento micelial do fitopatógeno *M. pernicioso*. Como esta planta não possui estudos quanto aos seus constituintes químicos e sobre sua atividade antifúngica, este trabalho teve por objetivo explorar o potencial de metabólitos secundários produzidos pela planta *B. uniflora* com atividade inibitória à *M. pernicioso*. Para tanto, realizou-se um estudo químico e biológico dos compostos antifúngicos presentes no extrato aquoso de folhas de *B. uniflora*. A partir do extrato de *B. uniflora* obteve-se três compostos da classe das saponinas espirostanas, o composto karatavioside A e os compostos parcialmente identificados BuM8i4 e BuM8i6. Até o momento, verificou-se que BuM8i4 possui como aglicona (25R)-yucagenina e BuM8i6 possui como aglicona (25R)-diosgenina. Também verificou-se que BuM8i4 e BuM8i6 possuem a mesma glicona, mas que ainda não foi identificada. Os três compostos isolados neste trabalho apresentaram $CI_{50} < 15,63 \mu g mL^{-1}$ a germinação de basidiósporos e ao crescimento micelial de *M. pernicioso*. O composto karatavioside A está sendo relatado pela primeira vez a partir de *B. uniflora* e relatado para atividade antifúngica.

Palavras-chave: *Brunfelsia uniflora*; Karatavioside; Yucagenina; Diosgenina; Saponina

ABSTRACT

Brunfelsia uniflora is a Solanaceae plant native from South America, it is known by popular name *manacá*, *manacá-açu* or *manacá-de-cheiro*. In this work, it was verified that *B. uniflora* extract has inhibitory activity to mycelial growth of cocoa phytopathogen *Moniliophthora pernicioso*. As there are not chemical and antifungal activity studies about this plant, this work aimed to explore the potential of secondary metabolites produced by *B. uniflora* with antifungal activity against *M. pernicioso*. For this, a biological and chemical study was realized with the antifungal compounds from leaves water extract from *B. uniflora*. From extract of *B. uniflora* three spirostan saponin compounds were obtained, the compound karatavioside A and the compounds partially identified BuM8i4 and BuM8i6. Until moment, it was verified that BuM8i4 has (25R)-yucagenina and BuM8i6 has (25R)-diosgenina as aglycone and, both compounds have the same unidentified glycone. These three compounds showed $IC_{50} < 15,63 \mu g mL^{-1}$ to the basidiospore germination and mycelial growth of *M. pernicioso*. The compound karatavioside A was obtained for the first time from *B. uniflora* and described about its antifungal activity.

Keywords: *Brunfelsia uniflora*; Karatavioside; Yuccagenin; Diosgenin; Saponin

7.1 Introdução

A planta *Brunfelsia uniflora* (Pohl) D. Don. (Figura 48), planta nativa da América do Sul, pertencente a subfamília Cestroideae, tribo Francisceae, é conhecida pelo nome manacá, manacá-açu, manacá-de-cheiro. É um arbusto

Figura 48 – Foto de *Brunfelsia uniflora*.

perene de até 4 m de altura e que cresce em ambientes distintos. Esta planta é cultivada por sua característica ornamental, mas também é utilizada na medicina popular para tratamento de diversas enfermidades (de Carvalho Soares e Mentz, 2007).

7.2 Resultados e Discussão

A planta *B. uniflora* foi coletada na cidade de Piracicaba-SP, observou-se que o extrato aquoso de suas folhas possui elevada atividade antifúngica a *M. pernicioso*. Como não há na literatura estudos sobre seus metabólitos secundários, realizou-se separações cromatográficas biomonitoradas para isolamento dos compostos responsáveis pela atividade inibitória.

Para isso, o extrato aquoso de *B. uniflora* foi particionado com n-butanol. Pela fração n-butanólica conter, dentre outros, compostos apolares em análise por CCD, este foi seco, ressuspendido em metanol e particionado com hexano (Figura 49).

Figura 49 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a *M. perniciosus*, por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, avaliando (BuA) fracão aquosa, (BuM) fracão metanólica e (BuH) fracão hexânica do extrato de *B. uniflora*

O resultado obtido neste ensaio demonstrou que somente a fracão metanólica (BuM) apresenta compostos antifúngicos. Sendo assim, esta fracão foi submetida a cromatografia em coluna Sep-Pak C₁₈ (Figura 50).

Figura 50 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a *M. perniciosus*, por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com as 10 fracões resultantes da cromatografia em coluna Sep-Pak C₁₈ da fracão BuM

A avaliação das 10 frações obtidas mostrou que somente as frações BuM7 e BuM8 apresentaram atividade inibitória à *M. perniciosus*. Em vista da bioatividade, a fração BuM8 foi submetida a cromatografia em gel Sephadex® LH-20 (Figura 51).

Figura 51 - Fluxograma e ensaio de atividade antifúngica a *M. perniciosus*, por difusão em disco com 0,2 mg de amostra, com 17 frações resultantes da cromatografia em gel Sephadex® LH-20 da fração BuM8

Desta separação obteve-se 17 frações. O resultado do ensaio para bioatividade mostrou que as frações BuM8g, BuM8h, BuM8i, BuM8j, BuM8k e BuM8l possuem atividade inibitória a *M. perniciosus*.

Devido bioatividade e maior quantidade de massa, a fração BuM8i foi submetida a separação em CLAE (Figura 52).

Figura 52 – Cromatograma da fração BuM8i, picos coletados, e bioensaio contra *M. perniciosus* por difusão em disco com 0,1 mg de amostra. Detector UV em 210 nm, eluição em gradiente com água, metanol e acetonitrila. Coluna C₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm), vazão da fase móvel a 1 mL min⁻¹

Para separação dos compostos da fração BuM8i, realizou-se uma otimização dos parâmetros do gradiente de eluição e do comprimento de onda no UV. Os compostos desta fração apresentaram melhor absorção no comprimento de onda de 210 nm e separação pelo seguinte gradiente de eluição (Tabela 21):

Tabela 21 – Gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica de BuM8i em coluna de fase reversa C₁₈

Tempo (min.)	Vazão (mL min ⁻¹)	Água (%)	Metanol (%)	Acetonitrila (%)
0	1	30	35	35
15	1	0	50	50
16	1	0	100	0
21	1	0	100	0

As frações foram coletadas conforme indicado na Figura 52, o que resultou em 8 frações. Destas, as frações BuM8i2, BuM8i3, BuM8i4, BuM8i5 e BuM8i6 exibiram atividade inibitória; as frações BuM8i2, BuM8i4, BuM8i5 e BuM8i6 exibiram compostos definidos e a fração BuM8i4 mostrou-se como majoritária.

Devido a presença de picos definidos e maior quantidade de massa, as frações BuM8i4, BuM8i5 e BuM8i6 foram submetidas as análises de identificação estrutural.

7.3 Estudo químico de BuM8i4

A fração BuM8i4 foi submetida a análise por CLAE acoplado aos detectores de UV e espectrometria de massas (CLAE-UV-MS).

Os dados dos detectores de UV e espectrometria de massas estão expostos na Figura 53.

Figura 53 – Espectro de massas em modo ESI positivo (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração BuM8i4

A análise por CLAE-UV mostrou que BuMi4 possui uma única banda de absorção na região do ultravioleta λ_{max} de 202,5 nm, o que indica ausência de cromóforos na molécula.

Pelo estudo do espectro de massas observaram-se fragmentações consecutivas de 162 Da e 132 Da, a partir do íon m/z 1181,8 e até alcançar o m/z 431,3.

Outra fragmentação foi observada a partir do íon m/z 751,4, na qual, considerando-a como protonada $[M + H]^+$, demonstrou-se ser inteiramente constituída por três fragmentos de 162 Da e dois de 132 Da.

Os íons m/z 431,3 e 751,4 mostram-se como fragmentos do íon m/z 1181,8, na qual a soma de suas massas não protonadas resulta na massa molecular de 1180 Da. Dado que é confirmado pela presença da massa molecular ionizada com hidrogênio, 1181,8 $[M + H]^+$, e pelo mesmo ionizado com sódio, 1203,9 $[M + Na]^+$.

Com isso, acredita-se que o m/z 1181,8 refira-se a massa molecular protonada $[M + H]^+$ do composto presente na fração BuMi4, portanto de massa molecular 1180 Da.

O estudo do espectro de massas do composto em BuMi4 permitiu aferir o seguinte padrão de fragmentação (Figura 54):

Figura 54 –Padrão de fragmentação proposto para o composto BuM8i4, a partir do íon parental m/z 1181 $[M + H]^+$ (a) e do fragmento m/z 751 $[M + H]^+$ (b)

Dessa forma observou-se que o composto BuM8i4 muito provavelmente é uma saponina de massa molecular de 1180 Da, com uma única cadeia de açúcares (monodesmosídica) contendo 3 hexoses, 2 pentoses e uma aglicona de 430 Da (Figura 55).

Figura 55 –Esquema proposto para composição de BuM8i4 segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a) e (b) não possuem posição definida

Para confirmar a massa molecular exata de BuM8i4 e, assim, auxiliar na identificação do composto presente, realizou-se análise de HRMS (Figura 56):

Figura 56 – Espectro de massas de alta resolução, em modo positivo, da fração BuM8i4

Com os dados de HRMS, a massa molecular de BuM8i4 foi determinada para 1180,5477 Da. Portanto, os dados obtidos foram considerados para busca nas bases de dados e literatura (Tabela 22).

Tabela 22 –Saponinas vegetais de massa $1180,5477 \pm 0,005$ Da, com glicona de 3 hexoses e 2 pentoses e, aglicona de massa 430 Da

Composto	Planta	Nº CAS	Glicona	Aglicona
Cantalasaponin 4	<i>Agave cantala</i>	103893-12-5	Xil; Xil; Gli; Gli; Gal	Hocogenina
-----	<i>Polianthes tuberosa</i>	310883-02-4	Xil; Xil; Gli; Gli; Gal	Hocogenina
-----	<i>Polianthes tuberosa</i>	474122-65-1	Ara; Gli; Xil; Gli;Gal	Hocogenina
-----	<i>Agave decipiens</i>	256635-26-4	Gli; Xil; Xil; Gli; Gal	Hocogenina
Agabrittonoside A	<i>Agave brittoniana</i>	946512-64-7	Xil; Gli; Xil; Gli; Gal	Yucagenina

Xil = xilose; Ara = arabinose; Gli = glicose; Gal = galactose

Entre os compostos localizados de características correspondentes a BuM8i4, nenhum possui relato de isolamento em plantas da família Solanaceae e, entre estes, nenhum possui o padrão de fragmentação proposto para BuM8i4.

Para auxiliar na identificação da aglicona de BuM8i4, este foi submetido a hidrólise ácida para remoção dos açúcares e o esteroide resultante, nomeado como BuM8i4H1, foi analisado por métodos espectrométricos.

7.3.1 Estudo químico do esteróide em BuM8i4H1

A fração BuM8i4H1 foi submetida a análise por CLAE-MS, o espectro de massas obtido está exposto na Figura 57.

Figura 57 – Espectro de massas em modo ESI positivo de BuM8i4H1

Pela análise por CLAE-MS de BuM8i4H1, observou-se que a aglicona resultante possui igual tempo de retenção aos esteroides em SsM5d6aH1 (de *Solanum seaforthianum*) e, dentre estes, massas ionizadas igual a yucagenina.

Pelo estudo do espectro de massas de BuM8i4H1 observaram-se fragmentações consecutivas de 18 Da e 144 Da, iniciando a partir do íon m/z 431,4 e até alcançar o m/z 251,4.

Esta interpretação permitiu gerar o seguinte padrão de fragmentação (Figura 58):

Figura 58 –Padrão de fragmentação proposto para BuM8i4H1, a partir do íon parental m/z 431 $[M + H]^+$

Portanto, observa-se que BuM8i4H1 possui duas hidroxilas, devido as duas perdas de água (18 Da) e, a fragmentação com perda de 144 Da é descrita por

Liang et al., (2002) como clivagem do anel E em esteroides espirostanos devido ao rearranjo de Mclafferty.

Para atribuir de forma inequívoca a identidade de BuM8i4H1 e, correlação com o esteroide yucagenina, realizou-se análises de RMN uni e bidimensionais e os deslocamentos obtidos foram comparados com a literatura (Tabela 23).

Tabela 23 – Correlações de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC de BuM8i4H1 com os deslocamentos químicos de yucagenina (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Ahmadet al., 1991) (Kuroda <i>et al.</i> , 2015) (25R)-yucagenina		Esteróide BuM8i4H1	
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
1ax	1,3 m	46,7	1,33 m	46,4
1ec	2,3		2,37 dd (12,7, 4,5)	
2	4,05 m	72,7	4,10 m	72,40
3	3,08 m	76,8	3,82 m	76,56
4ax	2,7	40,9	2,64 d (5,4)	40,7
4ec				
5		141,3		141,0
6	5,3 tl	121,3	5,40 m	121,0
7	1,85	32,3	1,87	32,02
8	1,5 t	31,2	1,54 m	31,56
9		50,4	1,00	50,38
10		38,6		38,30
11		21,3	1,40 m	21,04
12		39,9	1,63 m	39,62
13		40,5		40,23
14	1,4	56,6	1,02	56,38
15	1,4	32,2	1,63 m	32,02
	1,35			
16	4,5	81,1	4,51 m	80,87
17	1,81	62,9	1,78 m	62,62
18	0,79 s	16,4	0,82 s	16,14
19	0,93 s	20,7	1,07 s	20,48
20	1,95	42,0	1,93 m	41,72
21	1,12 d (6,9)	15,0	1,12 d (7,0)	14,79
22		109,3		109,02
23	1,67	31,8	1,87 m	31,56
24	1,52 m	29,3	1,53 m	29,02
25	1,6 m	30,6	1,53 m	30,36
26Ha	3,51 m	66,9	3,47 m	66,60
26Hb	3,6 m		3,56 m	
27	0,67 d (5,5)	17,3	0,66 d (5,9)	17,08

Ahamad et al., (1991): RMN ^1H 400 MHz; Piridina- d_5 .
Kuroda et al., (2015): RMN ^{13}C 100 MHz; Piridina- d_5 .
BuM8i4H1: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

Pelas análises de RMN confirmou-se a estrutura da aglicona de BuM8i4 como yucagenina devido aos deslocamentos de hidrogênios de metilas em δ 0,80 (s, CH₃-18), δ 1,04 (s, CH₃-19), δ 0,68 (d, J = 5,6 Hz, 27-CH₃) e δ 1,13 (d, J = 7,0 Hz, 21-CH₃); pelos deslocamentos de carbono da dupla ligação em δ 141,0 (5-C) e δ 121,0 (6-C); e de carbonos ligados a hidroxilas em δ 72,8 (2-OH) e δ 76,5 (3-OH).

Para determinar a estereoquímica de BuM8i4H1, foi utilizado o método descrito por Agrawal (2003). Por este, a estereoquímica do carbono 25 foi determinada como 25R devido aos deslocamentos de prótons de 26Ha (δ 3,47) e 26Hb (δ 3,56) (Figura 59), a diferença entre estes de somente 0,09 ppm e o deslocamento de metila na posição 27 que foi confirmado pelo dubleto em δ 0,66 com constante de acoplamento (J) de 5,9 Hz, correspondente ao descrito para (25R)-yucagenina (AHMAD et al., 1991).

Figura 59 – Região ampliada do espectro de RMN ¹H (600 MHz) de BuM8i4H1 (em piridina-*d*₅, δ em ppm)

Dentre os compostos apresentados anteriormente de massa molecular igual a BuM8i4 (Tabela 22), somente o composto agabrittonoside A (C₅₅H₈₈O₂₇, CAS 946512-64-7) (Figura 60), possui como aglicona o esteroide (25R)-yucagenina.

Figura 60 – Estrutura química de (25R)-agabrittonoside A

Para correlacionar a identidade de BuM8i4 com agabrittonoside A, realizou-se análises de RMN uni e bidimensionais da fração não hidrolisada.

Observou-se claramente que BuM8i4 não corresponde a agabrittonoside A devido aos deslocamentos químicos de prótons e carbonos anoméricos da glicona, quando comparados ao obtido por Macias et al., (2007) (Tabela 24).

Tabela 24 – Correlações de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC da glicona de BuM8i4 com os deslocamentos químicos dos prótons e carbonos anoméricos de agabrittonoside A (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Macias et al., 2007) Agabrittonoside A		Glicona BuM8i4	
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
3-O-Gal	4,90 d (7,7)	103,3	4,92 d (7,8)	103,6
Gli	5,19 d (8,1)	104,4	5,17 d (7,8)	104,9
Gli	5,59 d (7,5)	103,9	5,56 d (7,8)	104,7
Xil	5,15 d (7,9)	104,8		
Xil	5,06 d (7,3)	106,1		
			5,24 d (7,8)	105,3
			4,78 d (7,6)	105,9

Macias et al., (2007): RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .
BuM8i4: RMN ^1H 400 MHz; RMN ^{13}C 100 MHz; Piridina- d_5 .

Os deslocamentos químicos de prótons e carbonos anoméricos obtidos de BuM8i4 foram: δ_{H} 4,78 (d, J = 7,6 Hz) com δ_{C} 105,9; δ_{H} 4,92 (d, J = 7,8 Hz) com δ_{C} 103,6; δ_{H} 5,17 (d, J = 7,8 Hz) com δ_{C} 104,9; δ_{H} 5,24 (d, J = 7,8 Hz) com δ_{C} 105,3; e δ_{H} 5,56 (d, J = 7,8 Hz) com δ_{C} 104,7 (Figura 61).

Figura 61 – Região ampliada do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de BuM8i4 correspondente aos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- d_5 , δ em ppm)

Para determinar os constituintes da glicona de BuM8i4, os monossacarídeos resultantes de sua hidrólise (BuM8i4H2) foram analisados por CCD e comparados a padrões de monossacarídeos (Figura 62).

Figura 62 – Perfil de CCD de BuM8i4H2 (amostra central). Padrões de D-xilose (X), L-arabinose (A), D-glicose (GL), D-galactose (GA). Eluição com clorofórmio : metanol : água (8:5:1 v:v:v). Revelado com o reagente anisaldeído

Os açúcares de BuM8i4H2 mostraram correlação com glicose e galactose, porém não houve correlação com nenhuma das pentoses.

Diante dos resultados, observou-se que BuM8i4 trata-se de um composto inédito no qual, até o momento, só foi possível determinar a sua aglicona como (25R)-yucagenina. Portanto, análises químicas adicionais são necessárias para elucidar a estrutura e composição de sua glicona e, assim, atribuir a identidade do composto na fração BuM8i4.

7.4 Estudo químico de BuM8i5

A fração BuM8i5 foi submetida a análise por CLAE acoplado aos detectores de UV e espectrometria de massas (CLAE-UV-MS).

Os dados dos detectores de UV e espectrometria de massas estão expostos na Figura 63.

Figura 63 – Espectro de massas em modo ESI positivo (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração BuM8i5

A análise por CLAE-UV-MS mostrou que BuMi5 possui uma única banda de absorção na região do ultravioleta λ_{max} de 202,5 nm, o que indica ausência de cromóforos na molécula.

Pelo estudo deste espectro de massas observaram-se fragmentações consecutivas de 162 Da e 132 Da, a partir do íon m/z 1049,8 e até alcançar o m/z 431,3.

Outra fragmentação foi observada a partir do íon m/z 619,4, na qual, considerando-a como protonada $[M + H]^+$, demonstrou-se ser inteiramente constituída por três fragmentos de 162 Da e um de 132 Da.

Os íons m/z 431,3 e 619,4 mostram-se como fragmentos do íon m/z 1049,8, na qual a soma de suas massas não protonadas resulta na massa molecular de 1048 Da. Dado que é confirmado pela presença da massa molecular ionizada com hidrogênio, 1149,8 $[M + H]^+$, e pelo mesmo ionizado com sódio, 1071,8 $[M + Na]^+$.

O estudo do espectro de massas do composto em BuMi5 permitiu aferir o seguinte padrão de fragmentação (Figura 64):

Figura 64 –Padrão de fragmentação proposto para o composto BuM8i5, a partir do íon parental m/z 1049 $[M + H]^+$ (a) e do fragmento m/z 619 $[M + H]^+$ (b)

Dessa forma, observou-se que o composto BuM8i5 muito provavelmente é uma saponina de massa molecular de 1048 Da, com uma única cadeia de açúcares (monodesmosidica) contendo 3 hexoses, 1 pentose e uma aglicona de 430 Da (Figura 65).

Figura 65 –Estrutura proposta para o composto BuM8i5 segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a), (b) e (c) não possuem posição definida

Para confirmar a massa molecular exata de BuM8i5 e, assim, auxiliar na identificação do composto presente, realizou-se análise de HRMS (Figura 66):

Figura 66 – Espectro de massas de alta resolução, em modo positivo, da fração BuM8i5

Com os dados de HRMS, a massa molecular de BuM8i5 foi determinada para 1048,5094 Da. Portanto, os dados obtidos foram considerados para busca nas bases de dados e literatura.

Entre os compostos localizados, o composto karatavioside A ($C_{50}H_{80}O_{23}$, CAS 70880-60-3) (Figura 67) apresentou correspondência com a massa molecular e o padrão de fragmentação observado para BuM8i5.

Figura 67 – Estrutura química de (25R)-Karatavioside A

Para atribuir de forma inequívoca a identidade de BuM8i5 como karatavioside A, realizou-se análises de RMN uni e bidimensionais e os deslocamentos obtidos foram comparados com a literatura

Inicialmente os deslocamentos de BuM8i5 foram comparados aos deslocamentos da aglicona, yucagenina, de karatavioside A (Tabela 25).

Tabela 25 – Correlações de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC da aglicona de BuM8i5 com os deslocamentos químicos de karatavioside A (δ em ppm, J in Hz)

Macias et al., 2007 Karatavioside A			Isolado BuM8i5	
Nº C	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
1ax	1,28 dd (13,0, 12,3)	45,7	1,26	46,12
1eq	2,29 dd (13,0, 4,6)		2,30 dd (13,0, 4,5)	
2	4,06	70,0	4,05	70,53
3	3,80 dd (11,5, 8,8, 5,4)	84,5	3,80	84,82
4ax	2,53 ddd (13,6, 11,5, 1,9)	37,7	2,49	38,03
4eq	2,68 dd (13,6, 5,4)			
5		140,1		140,48
6	5,27sl (5,4)	121,9	5,35	122,43
7	1,78	32,1	1,78	32,64
	1,44		1,44	
8	1,45	31,1	1,46	31,53
9	0,93	50,1	0,94	50,60
10		37,9		38,37
11	1,44	21,2	1,44	21,62
	1,36		1,36	
12	1,03 ddd (12,7, 12,7, 3,8)	39,7	1,02	40,21
	1,62		1,62	
13		40,4		40,90
14	1,00	56,4	1,02	56,94
15	1,97 ddd (7,3, 5,4, 1,4)	32,1	1,96	32,64
	1,38		1,36	
16	4,50	81,1	4,50	81,59
17	1,76 dd (8,4, 6,5)	62,8	1,78	63,26
18	0,78 s	16,3	0,80 s	16,81
19	0,91 s	20,4	0,91 s	20,88
20	1,90 dq (6,9, 6,5)	41,9	1,93	42,44
21	1,10 d (6,9)	15,0	1,12 d (7,0)	15,49
22		109,2		109,82
23	1,66	31,8	1,65	32,25
	1,61		1,62	
24	1,54	29,2	1,56	29,71
25	1,55	30,6	1,54	31,04
26Ha	3,47 dd (10,7, 10,7)	66,8	3,48	67,34
26Hb	3,56 dd (10,7, 3,1)		3,57	
27	0,67 d (5,8)	17,3	0,68 d (6,0)	17,79

Macias et al., (2007): RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .BuM8i5: RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

Pelo espectro de RMN observou-se correlação da fração BuM8i5 com a aglicona de karatavioside A pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios de metilas em δ 0,80 (s, CH₃-18), δ 0,91 (s, CH₃-19), δ 0,68 (d, J = 6,0 Hz, 27-CH₃) e δ 1,12 (d, J = 7,0 Hz, 21-CH₃); pelos deslocamentos de carbono da dupla ligação em δ 140,1 (5-C) e δ 121,9 (6-C); e carbonos ligados a hidroxilas em δ 70,53 (2-OH) e δ 109,2 (22-OH). Portanto, a aglicona de BuM8i5 foi confirmada como sendo yucagenina.

Para determinar a estereoquímica do carbono 25 da aglicona de BuM8i5 utilizou-se o método descrito por Agrawal (2003) para saponinas espirostanas. Devido a sobreposição dos sinais no espectro de RMN ¹H, os deslocamentos de 26Ha e 26Hb foram obtidos a partir dos sinais de HSQC.

Portanto, a estereoquímica do carbono 25 da aglicona de BuM8i5 foi determinada como 25R devido aos deslocamentos de hidrogênio em 26Ha (δ 3,48) e 26Hb (δ 3,57), a diferença entre estes de somente 0,09 ppm e o deslocamento de metila na posição 27 que foi confirmado pelo dubleto em δ 0,68 com constante de acoplamento (J) de 6,0 Hz, correspondente ao descrito para (25R)-karatavioside A (MACIAS et al., 2007).

A estrutura e composição da glicona de BuM8i5 foram confirmadas por comparação com os deslocamentos de RMN da glicona de karatavioside A (Tabela 26).

Tabela 26 – Deslocamentos de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC de BuM8i5 e correspondência com os deslocamentos da glicona de karatavioside A (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(MACIAS et al., 2007)		Isolado	
	Karatavioside A		BuM8i5	
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
3-O-Gal				
1	4,93 d (7,7)	103,3	4,92 d (7,7)	103,7
2	4,52 dd (9,2; 7,7)	72,7	4,50	73,15
3	4,11	75,5	4,11	75,93
4	4,58 sl (8,4)	79,3	4,58	79,75
5	4,00 dd (8,4; 5,7)	75,7	4,03	76,16
6	4,16	60,5	4,17	61,18
	4,58			
Gli				
1	5,21 d (8,1)	104,7	5,19 d (7,9)	105,0
2	4,34 dd (8,8; 8,1)	81,5	4,32	81,59
3	4,13 dd (8,8; 8,8)	86,9	4,13	87,46
4	3,82 dd (8,8; 8,0)	70,4	3,83	70,77
5	3,86	77,6	3,87	78,00
6a	4,04	62,9	4,05	63,24
6b	4,50			
Gli				
1	5,56 d (7,7)	104,8	5,58 d (7,9)	105,1
2	4,03	76,1	4,03	76,49
3	4,12 dd (8,8; 8,4)	78,1	4,13	78,57
4	4,08 dd (8,8; 8,4)	71,3	4,09	71,82
5	3,89 ddd (8,8; 5,4; 2,3)	78,4	3,83	78,87
6	4,39 sl (11,4)	62,7	4,40	63,32
	4,55 sl (11,4)		4,54	
Xil				
1	5,24 d (7,7)	104,9	5,23 d (7,9)	105,3
2	3,94 dd (7,7; 9,2)	75,1	3,95	75,58
3	4,07 dd (9,2; 8,8)	78,7	4,05	79,09
4	4,08	70,7	4,09	71,25
5	3,64 dd (11,1; 10,0)	67,3	3,63	67,73
	4,20 dd (11,1; 5,0)		4,21	

Macias et al., (2007): RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .
 BuM8i5: RMN ^1H 400 MHz; RMN ^{13}C 100 MHz; Piridina- d_5 .

A estrutura e composição da glicona, como correspondente a karatavioside A, foi confirmada pelos deslocamentos dos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares em δ_{H} 4,92(d, $J = 7,7$ Hz, 3-O-D-galactose) com δ_{C} 103,7; δ 5,19 (d, $J = 7,9$ Hz, D-glicose) com δ_{C} 105,0; δ 5,58 (d, $J = 7,9$ Hz, D-glicose) com δ_{C} 105,1 e δ 5,23 (d, $J = 7,9$ Hz, D-xilose) com δ_{C} 105,3 (Figura 68).

Figura 68 – Região ampliada do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de BuM8i5 correspondente aos prótons e carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- d_5 , δ em ppm)

A glicona de BuM8i5 foi, portanto, confirmada como licotetraose, confirmando a identidade desta fração como (25R)-karatavioside A.

A glicona licotetraose é a mesma glicona observada para os compostos em SsM5d6a e em SsM5d6c, ambas de *S. seaforthianum*.

O isolamento de (25R)-karatavioside A foi primeiramente realizado a partir das inflorescências de *Allium Karataviense* (Liliaceae) por Vollerner et al., (1978). Posteriormente, também foi isolado a partir de *Allium suvorovii* e *Allium stipitatum* (Liliaceae) (KRAVETS, 1994), de bulbos de *Allium ampeloprasum* (Liliaceae) (UCHIDA et al., 2009), de flores de *Agave offoyana* (Asparagaceae) (PEREZ et al., 2013), do extrato de *Agave brittoniana* (Asparagaceae) (MACIAS et al., 2007), e de folhas de *Cestrum nocturnum* (Solanaceae) (MIMAKI, WATANABE, et al., 2001).

Os relatos na literatura mostram que o isolamento de karatavioside A já foi realizado a partir de três famílias botânicas. De acordo com a classificação linear filogenética das angiospermas feita por HASTON et al., (2009), a família Solanaceae

(posição 358), da qual *Brunfelsia uniflora* pertence, é de dicotiledôneas e esta agrupada de forma bastante distantes das famílias Liliaceae (posição 61) e Asparagaceae (posição 75), ambas monocotiledôneas. Estes dados mostram que karatavioside A pode ser isolado de monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Sendo assim, a fração BuM8i5 foi identificada como sendo (25R)-karatavioside A, está sendo obtido pela primeira vez a partir de *B. uniflora* e caracteriza-se como o segundo relato de isolamento entre plantas da família Solanaceae.

7.5 Estudo químico de BuM8i6

A fração BuM8i4 foi submetida a análise por CLAE acoplado aos detectores de UV e espectrometria de massas (CLAE-UV-MS).

Os dados dos detectores de UV e espectrometria de massas estão expostos na Figura 69.

Figura 69 – Espectro de massas em modo ESI positivo (superior) e perfil de absorção no ultravioleta (inferior), da fração BuM8i6

A análise por CLAE-UV-MS mostrou que BuMi6 possui uma única banda de absorção na região do ultravioleta λ_{max} de 202,5 nm, o que indica ausência de cromóforos na molécula.

Pelo estudo deste espectro de massas observaram-se fragmentações consecutivas de 162 Da e 132 Da, a partir do íon m/z 1165,8 e até alcançar o m/z 415,3.

Outra fragmentação foi observada a partir do íon m/z 751,4, na qual, considerando-a como protonada $[M + H]^+$, demonstrou-se ser inteiramente constituída por três fragmentos de 162 Da e dois de 132 Da.

Os íons m/z 415,3 e 751,4 mostram-se como fragmentos do íon m/z 1165,8, na qual a soma de suas massas não ionizadas (considerando uma ionização com H^+) resulta na massa molecular de 1164 Da. Dado que é confirmado pela presença da massa molecular ionizada com hidrogênio, 1165,8 $[M + H]^+$, e pelo mesmo ionizado com sódio, 1187,9 $[M + Na]^+$.

O estudo do espectro de massas do composto em BuMi6 permitiu aferir o seguinte padrão de fragmentação (Figura 70):

Figura 70 –Padrão de fragmentação proposto para o composto BuM8i6, a partir do íon parental m/z 1165 $[M + H]^+$ (a) e do fragmento m/z 751 $[M + H]^+$ (b)

Dessa forma observou-se que o composto BuM8i6 muito provavelmente é uma saponina de massa molecular de 1164 Da, com uma única cadeia de açúcares (monodesmosídica) contendo 3 hexoses, 2 pentoses e uma aglicona de 415 Da (Figura 71).

Figura 71 – Esquema proposto para composição de BuM8i6 segundo o padrão de fragmentação, pentágonos e hexágonos correspondem aos açúcares de 5 e 6 carbonos, respectivamente. Açúcares (a) e (b) não possuem posição definida

A estrutura de BuM8i6 mostrou-se similar a BuM8i4, na qual a única diferença está na massa da aglicona, BuM8i6 com 414 Da e BuM8i4 com 430 Da.

Para confirmar a massa molecular exata de BuM8i6 e assim auxiliar na sua identificação, realizou-se análise de HRMS (Figura 72):

Figura 72 – Espectro de massas de alta resolução, em modo positivo, da fração BuM8i6

Com os dados de HRMS, a massa molecular de BuM8i6 foi determinada para 1164,5576 Da. Através de busca na literatura e base de dados, os dados obtidos apresentaram correspondência somente com a saponina espirostana agabrittonoside B ($C_{55}H_{88}O_{26}$, CAS 946512-65-8) (Figura 73), sem relato de isolamento entre plantas da família Solanaceae.

Figura 73 – Estrutura química de (25R)-agabrittonoside B

Para atribuir de forma inequívoca a identidade BuM8i6 como agabrittonoside B, realizou-se análise de RMN uni e bidimensionais.

Os deslocamentos de RMN de BuM8i6 foram inicialmente comparados aos deslocamentos da aglicona, diosgenina, de agabrittonoside B (Tabela 27).

Tabela 27 – Correlações de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC de BuM8i6 com os deslocamentos químicos da aglicona de agabrittonoside B (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(MACIAS et al., 2007) Agabrittonoside B		Isolado BuM8i6	
	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}	δ_{H} (multi, J hz)	δ_{C}
1ax	0,93 ddd (14,0, 9,7, 4,7)	37,4	0,94	37,92
1eq	1,65		1,66	
2	2,09 m	30,1	2,09	30,62
	1,68		1,66	
3	3,87	78,2	3,87	78,81
4ax	2,40 m	39,2	2,43	39,70
4eq	2,64 sl (11,9)		2,67	
5		141,0		141,45
6	5,27 m	121,6	5,32	122,15
7	1,81 sl (15,2)	32,2	1,81	32,64
	1,44		1,44	
8	1,48	31,6	1,46	32,10
9	0,85	50,2	0,83	50,72
10		37,0		37,49
11	1,44	21,0	1,44	21,56
	1,35		1,37	
12	1,05 ddd (12,3, 12,3, 4,1)	39,8	1,05	40,32
	1,66		1,65	
13		40,4		40,92
14	1,01	56,6	1,02	57,08
15	1,99 ddd (11,3, 6,2, 1,8)	32,1	1,94	32,64
	1,40		1,36	
16	4,52	81,1	4,52	81,62
17	1,77 ddd (8,6, 6,4, 1,6)	62,8	1,79	63,30
18	0,80 s	16,3	0,81 s	16,84
19	0,85 s / 0,87 s	19,4	0,86 s	19,86
20	1,93 dq (7,0, 6,8)	41,9	1,93	42,44
21	1,12 d (7,0)	15,0	1,13 d (7,0)	15,50
22		109,2		109,83
23	1,68	31,8	1,66	32,27
	1,64		1,66	
24	1,54	29,2	1,57	29,71
25	1,54	30,6	1,57	31,05
26 Ha	3,48 dd (10,7, 10,7)	66,8	3,49	67,36
26Hb	3,55		3,58	
27	0,67 d (5,8)	17,3	0,68 d (5,9)	17,79

Macias et al., (2007): RMN ^1H 600 MHz; RMN ^{13}C 150 MHz; Piridina- d_5 .

BuM8i6: RMN ^1H 400 MHz; RMN ^{13}C 100 MHz; Piridina- d_5 .

Pelo espectro de RMN observou-se correlação da fração BuM8i6 com a aglicona de agabrittonoside B pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios de metilas em δ 0,81 (s, CH₃-18), δ 0,86 (s, CH₃-19), δ 0,68 (d, J = 5,9 Hz, 27-CH₃) e δ 1,13 (d, J = 7,0 Hz, 21-CH₃); pelos deslocamentos de carbono da dupla ligação em δ 141,45 (5-C) e δ 122,15 (6-C); e o único carbono ligado a hidroxila em δ 109,83 (22-OH). Portanto, a aglicona de BuM8i6 foi confirmada como sendo diosgenina.

Para determinar a estereoquímica do carbono 25 do esteroide de BuM8i6 utilizou-se o método descrito por Agrawal (2003) para saponinas espirostanas. Devido a sobreposição dos sinais no espectro de RMN ¹H, os deslocamentos de 26Ha e 26Hb foram obtidos a partir dos sinais de HSQC.

Portanto, a estereoquímica do carbono 25 da aglicona de BuM8i6 foi determinada como 25R devido aos deslocamentos observados de 26Ha (δ 3,49) e 26Hb (δ 3,58), a diferença entre estes de somente 0,09 ppm e o deslocamento de metila na posição 27 que foi confirmado pelo dubleto no espectro de hidrogênio em δ 0,68 com constante de acoplamento (J) de 5,9 Hz, correspondente ao descrito para (25R)-agabrittonoside B (MACIAS et al., 2007).

Ao comparar os deslocamento da glicona, observou-se claramente que BuM8i6 não corresponde a agabrittonoside B devido aos deslocamentos químicos de prótons e carbonos anoméricos da glicona, quando comparados ao obtido por Macias et al., (2007) (Tabela 28).

Tabela 28 – Correlações de RMN ¹H, ¹³C e HSQC da glicona de BuM8i6 com os deslocamentos químicos dos prótons e carbonos anoméricos de agabrittonoside B (δ em ppm, J in Hz)

Nº C	(Macias et al., 2007)		Glicona	
	Agabrittonoside B		BuM8i6	
	δ_H (multi, J hz)	δ_C	δ_H (multi, J hz)	δ_C
3-O-Gal	4,87 d (7,4)	102,7	4,90 d (7,6)	102,8
Gli	5,16 d (7,8)	104,7	5,19 d (7,9)	105,0
Gli	5,56 d (7,6)	103,9	5,57 d (7,8)	104,4
Xil	5,14 d (7,6)	104,9		
Xil	5,08 d (7,4)	106,2		
			4,80 d (7,6)	105,5
			5,27 d (7,8)	105,0

Macias et al., (2007): RMN ¹H 600 MHz; RMN ¹³C 150 MHz; Piridina-*d*₅.
 BuM8i6: RMN ¹H 600 MHz; RMN ¹³C 150 MHz; Piridina-*d*₅.

Os deslocamentos químicos de prótons e carbonos anoméricos obtidos de BuM8i6 foram: δ_H 4,80 (d, J = 7,6 Hz) com δ_C 105,5; δ_H 4,90 (d, J = 7,6 Hz) com δ_C

102,8; δ_{H} 5,19 (d, $J = 7,9$ Hz) com δ_{C} 105,0; δ_{H} 5,27 (d, $J = 7,8$ Hz) com δ_{C} 105,0 e δ_{H} 5,57 (d, $J = 7,8$ Hz) com δ_{C} 104,4 (Figura 74).

Figura 74 – Região ampliada do espectro de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) de BuM8i6 correspondente aos carbonos anoméricos dos açúcares (em piridina- d_5 , δ em ppm)

Os deslocamentos químicos da glicona de BuM8i6 mostraram-se idênticos com os de BuM8i4. Portanto, BuM8i4 e BuM8i6 diferem apenas quanto ao tipo de aglicona, respectivamente yucagenina e diosgenina, na qual yucagenina difere de diosgenina somente quanto a presença de uma hidroxila adicional.

Diante dos resultados, observou-se que BuM8i6 trata-se de um composto inédito no qual, até o momento, só foi possível determinar a sua aglicona como (25R)-diosgenina. Portanto, análises químicas adicionais são necessárias para elucidar a estrutura e composição de sua glicona e, assim, atribuir a identidade do composto na fração BuM8i6.

7.6 Atividade inibitória dos compostos de *B. uniflora* a *M. perniciosa*

O extrato aquoso, as saponinas BuM8i4, karatavioside A (BuM8i5) e BuM8i6, isolados de *B. uniflora* foram avaliados para atividade antifúngica a *M. perniciosa* (WMAS), através de inibição da germinação de basidiósporos e crescimento micelial pelo método de microdiluição (Figura 75).

Os valores representam a média de três replicatas $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas dentro do tratamento e maiúsculas entre tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 75 – Atividade inibitória do extrato aquoso e saponinas de *B. uniflora*, e de piraclostrobina a germinação de basidiósporos de *M. perniciosa*, em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Valores em percentual de germinação de basidiósporos em relação ao controle (=100)

Pelos resultados obtidos no ensaio, verifica-se que as saponinas de *B. uniflora* foram efetivas na inibição da germinação de basidiósporos de *M. perniciosa*, todas com uma concentração inibitória mínima (CIM) inferior a $15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O extrato aquoso de *B. uniflora* mostrou uma CIM de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Enquanto que o fungicida comercial piraclostrobina causou inibição total de germinação em todas as concentrações avaliadas.

No mesmo ensaio, após alguns dias de cultivo, avaliou-se a densidade micelial gerada por *M. perniciosa*. Para tanto, gerou-se uma curva de crescimento de *M. perniciosa*, ou seja, o controle negativo (Figura 76).

Figura 76 – Curva de crescimento pela densidade micelial (600 nm) de *M. pernicioso*. Os valores representam a média de seis replicatas $\pm$ desvio padrão

Pela curva de crescimento de *M. pernicioso* observou-se crescimento exponencial a partir do 4º dia e este alcançou sua densidade micelial máxima no 9º dia de cultivo, portanto para comparação dos tratamentos utilizou-se o 7º dia de cultivo (Figura 77).

Os valores representam a média de três replicatas $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas dentro do tratamento e maiúsculas entre tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 77 – Atividade inibitória do extrato aquoso e saponinas de *B. uniflora*, e de piraclostrobina ao crescimento micelial de *M. pernicioso*, em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Valores expressam a densidade micelial a 600 nm após 7 dias de cultivo

Este último ensaio apresentou correlação com o ensaio de germinação, todas as saponinas apresentaram CIM de $<15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o extrato aquoso de *B. uniflora* repetiu a CIM de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 78).

Como o fungicida comercial piraclostrobina causou inibição total no ensaio de germinação, também houve inibição total da densidade micelial em todas as concentrações avaliadas, como pode ser observado na Figura 78.

	Tratamento				
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Extrato "Bu"	BuMi4	Karatavioside A	BuMi6	Piraclostrobina
500
250
125
62,5
31,25
15,63

Figura 78 – Foto da microplaca com ensaio de atividade inibitória, pelo método de microdiluição, do extrato aquoso e saponinas de *S. seaforthianum*, e de piraclostrobina ao crescimento micelial de *M. pernicioso*, em seis concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e após 7 dias de cultivo

Mesmo após 10 dias de cultivo, não observou-se crescimento micelial de *M. pernicioso* nos tratamentos com as saponinas. Portanto, as saponinas de *B. uniflora* apresentaram atividade fungicida a germinação de *M. pernicioso*.

A concentração inibitória média (CI_{50}) para o extrato aquoso de *B. uniflora*, calculado através de curva de regressão, foi de $90,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $96,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente para inibição de germinação de basidiósporos e crescimento micelial de *M. pernicioso*, valor superior ao CI_{50} observado para o extrato aquoso de *S. seaforthianum*, respectivamente $41 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $74,9 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O CI_{50} das saponinas e piraclostrobina mostrou-se como $< 15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$, tanto para inibição de germinação de basidiósporos quanto ao crescimento micelial de *M. pernicioso*.

O fungicida comercial piraclostrobina, como fungicida do grupo das estrobilurinas, possui elevada atividade inibitória devido a sua ação como inibidor do

transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos e, assim inibindo a formação de ATP.

A elevada atividade antifúngica dos compostos de *B. uniflora* encontra-se dentro do esperado para saponinas espirostanas em comparação com a literatura.

Como no trabalho de Barile et al., (2007) que verificaram inibição ao crescimento micelial em microplaca pela saponina espiroстана minutoside B, o qual causou total inibição do fitopatógeno *Trichoderma harzianum* na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

E no trabalho de Mostafa et al., (2013) que verificaram que a saponina espiroстана aginoside, de *Allium nigrum*, possui atividade inibitória a germinação de esporos, em microplaca, do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (40%) e a *Botrytis cinerea* (50%), ambos na menor concentração avaliada de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os mesmos obtiveram uma considerável redução da infecção por estes fitopatógenos em plantas tratadas com aginoside.

Os relatos de atividade biológica para (25R)-karatavioside A são como possuindo: fitotoxicidade e inibição ao crescimento radicular de *Lactuca sativa* (PEREZ et al., 2013); a células de leucemia promielocítica humana (HL-60) (MIMAKI, YOKOSUKA, et al., 2001); toxicidade a células de carcinoma oral escamoso humano (HSC-2) e fibroblastos gengivais humanos (HGF) (MIMAKI, WATANABE, et al., 2001); e toxicidade as células malignas HSC-2, HSC-3, HSC-4 e HL-60 (KURODA et al., 2015).

Diante do levantado, a atividade antifúngica da saponina (25R)-Karatavioside A está sendo relatada pela vez.

Em comparação, as saponinas espirostanas de *B. uniflora* foram consideravelmente mais efetivas na inibição de *M. pernicioso* do que as saponinas furostanas de *S. seaforthianum*. Este resultado é esperado, visto que de acordo com Osbourn et al., (1998) as saponinas bidesmosídicas geralmente possuem uma menor bioatividade do que as saponinas monodesmosídicas, por compreenderem uma forma inativa de armazenamento das saponinas, mas que podem ser convertidas em ativas pela remoção dos açúcares na posição C-26 por ação enzimática.

Os compostos de *B. uniflora* e *S. seaforthianum*, que foram identificados neste trabalho, apresentaram como glicona a estrutura licotetraose (MILNER et al., 2011), a mesma glicona que faz parte de α -tomatina, um composto conhecido por

sua ação inibitória a *M. pernicioso* (GOMES et al., 2014). Portanto, relaciona-se que atividade inibitória destas saponinas a *M. pernicioso* é fortemente influenciada pela estrutura da glicona.

De acordo com o trabalho de Gomes et al. (2014), a saponina alcalóide α -tomatina possui um CI_{50} ao crescimento micelial de *M. pernicioso* entre 10-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em avaliação por diluição em agar. Portanto, mais efetiva que as misturas furostanas de *S. seaforthianum*, (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside e (25R)-timosaponin H₁/ (25R)-uttroside B, com respectivos CI_{50} de 40,9 e 22,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e menos efetiva que os compostos espirostanos de *B. uniflora*, karatavioside A, BuMi4 e BuMi6, todos com $CI_{50} < 15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$.

De acordo com Barile et al. (2007), a diferença de inibição entre classes de saponinas se deve principalmente a estrutura da aglicona, o que justificaram ao estudar a atividade antifúngica das saponinas furostanas minutoside A e C, e a espirostanos minutoside B, todas de *Allium minutiflorum*. Estes autores relacionaram a maior atividade antifúngica devido a aglicona espirostanos minutoside B.

Esta observação é compartilhada por Sadeghi et al., (2013) que, ao estudarem a atividade antifúngica das saponinas espirostanos persicoside A e B, as misturas de saponinas furostanos persicoside C1/C2 e D1/D2, ceposide A1/A2 e C1/C2, tropeoside A1/A2 e B1/B2, ascalonicoside A1/A2, e a saponina colestana persicoside E, oriundas de sementes de *Allium ampeloprasum*. Estes verificaram que as maiores atividades antifúngicas foram obtidas pelas saponinas espirostanos.

Portanto, concluí-se que os três compostos isolados de *B. uniflora* possuem elevada atividade inibitória a *M. pernicioso*, uma atividade inibitória muito superior ao observado para o extrato aquoso de *B. uniflora*. Estes compostos mostraram atividade inibitória igual ao apresentado pelo fungicida comercial piraclostrobina, nas concentrações avaliadas. Porém, estudos adicionais são necessários para determinar a concentração inibitória mínima e o perfil de atividade sobre *M. pernicioso*.

7.7 Conclusões

Realizou-se isolamento biomonitorado e identificação dos constituintes químicos de *B. uniflora*, que apresentaram atividade inibitória a *M. perniciosa*.

Foram isolados três frações (BuM8i4, BuM8i5 e BuM8i6) que, por estudos químicos, mostraram-se constituídas por compostos da classe das saponinas espirostanas.

A fração BuM8i5 foi identificada como karatavioside A e está sendo obtido pela primeira vez de *B. uniflora* e relatado para atividade antifúngica.

Até o momento, não foi possível concluir a elucidação estrutural de BuM8i4 e BuM8i6. Contudo, verificou-se que BuM8i4 possui como aglicona (25R)-yucagenina e BuM8i6 possui como aglicona (25R)-diosgenina. Também verificou-se que estas frações demonstram possuir a mesma glicona, mas que ainda não foi identificada.

Os três compostos isolados de *B. uniflora* apresentaram $CI_{50} < 15,63 \mu g mL^{-1}$ tanto a germinação de basidiósporos quanto ao crescimento micelial de *M. perniciosa*, uma atividade inibitória muito superior ao observado para o extrato aquoso de *B. uniflora*. Estes compostos mostraram atividade inibitória igual ao apresentado pelo fungicida comercial piraclostrobina, nas concentrações avaliadas. Porém, estudos adicionais são necessários para determinar a concentração inibitória mínima e o perfil de atividade sobre *M. perniciosa*.

Nos ensaios verificou-se que, tanto o extrato aquoso quanto os compostos isolados de *B. uniflora* possuem atividade fungicida a *M. perniciosa*.

Referências

- AGRAWAL, P.K. 25R/25S stereochemistry of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring-F. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Lucknow, v. 41, n. 11, p. 965-968, 2003.
- AHMAD, V.U.; BAQAI, F.T.; FATIMA, I.; AHMAD, R. A Spirostanol Glycoside From *Cestrum-Nocturnum*. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 9, p. 3057-3061, 1991.
- BARILE, E.; BONANOMI, G.; ANTIGNANI, V.; ZOLFAGHARI, B.; SAJJADI, S. E.; SCALA, F.; LANZOTTI, V. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. **Phytochemistry**, New York, v. 68, n. 5, p. 596-603, 2007.
- DE CARVALHO SOARES, E.L.; MENTZ, L.A. The *Brunfelsia* L. (Solanaceae) genus in Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisas Botânicas**, São Leopoldo, n. 58, p. 245-262, 2007.
- HASTON, E.; RICHARDSON, J.E.; STEVENS, P.F.; CHASE, M.W.; HARRIS, D.J. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, n. 2, p. 128-131, 2009.
- KRAVETS, S.D. Steroids of the spirostan and furostan series from plants of the genus *Allium*. XXVIII. Allogenone, anzuogenin D, and karataviosides A and B from *Allium suvorovii* and *A. stipitatum*. **Chemistry of Natural Compounds**, Basel, v. 30, n. 3, p. 408-409, 1994.
- KURODA, M.; ORI, K.; TAKAYAMA, H.; SAKAGAMI, H.; MIMAKI, Y. Karataviosides G-K, five new bisdesmosidic steroidal glycosides from the bulbs of *Allium karataviense*. **Steroids**, San Francisco, v. 93, p. 96-104, 2015.
- LI, R.; ZHOU, Y.; WU, Z. J.; DING, L. S. ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 41, n. 1, p. 1-22, 2006.
- LIANG, F.; LI, L. J.; ABLIZ, Z.; YANG, Y. C.; SHI, J. G. Structural characterization of steroidal saponins by electrospray ionization and fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 16, n. 12, p. 1168-1173, 2002.
- MACIAS, F. A.; GUERRA, J. O.; SIMONET, A. M.; NOGUEIRAS, C. M. Characterization of the fraction components using 1D TOCSY and 1D ROESY experiments. Four new spirostane saponins from *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Lucknow, v. 45, n. 7, p. 615-620, 2007.

MILNER, S.E.; BRUNTON, N.P.; JONES, P.W.; O'BRIEN, N.M.; COLLINS, S.G.; MAGUIRE, A.R. Bioactivities of Glycoalkaloids and Their Aglycones from Solanum Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 8, p. 3454-3484, 2011.

MIMAKI, Y.; WATANABE, K.; ANDO, Y.; SAKUMA, C.; SASHIDA, Y.; FURUYA, S.; SAKAGAMI, H. Flavonol glycosides and steroidal saponins from the leaves of *Cestrum nocturnum* and their cytotoxicity. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 64, n. 1, p. 17-22, 2001.

MIMAKI, Y.; YOKOSUKA, A.; KURODA, M.; SASHIDA, Y. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 24, n. 11, p. 1286-1289, 2001.

MOSTAFA, A.; SUDISHA, J.; EL-SAYED, M.; ITO, S.; IKEDA, T.; YAMAUCHI, N.; SHIGYO, M. Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 274-280, 2013.

PEREZ, A.J.; CALLE, J.M.; SIMONET, A.M.; GUERRA, J.O.; STOCHMAL, A.; MACIAS, F. A. Bioactive steroidal saponins from *Agave atrovirens* flowers. **Phytochemistry**, New York, v. 95, p. 298-307, 2013.

PLOCK, A.; BEYER, G.; HILLER, K.; GRUNDEMANN, E.; KRAUSE, E.; NIMTZ, M.; WRAY, V. Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. **Phytochemistry**, New York, v. 57, n. 3, p. 489-496, 2001.

SADEGHI, M.; ZOLFAGHARI, B.; SENATORE, M.; LANZOTTI, V. Spirostane, furostane and cholestane saponins from Persian leek with antifungal activity. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, n. 2, p. 1512-1521, 2013.

UCHIDA, A.; TAO, K.; OGIHARA, J.; AKAO, M.; KUMAGAI, H.; MATSUFUJI, H.; TAKENAGA, F.; SAKURAI, H. Antihepatopathic Activity of Foam Components Produced from the Bulb of Jumbo Leek and Isolation of Its Active Saponin. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, Ibaraki-ken, v. 56, n. 12, p. 639-646, 2009.

VOLLERNER, Y.S.; GOROVITS, M. B.; GOROVITS, T. T.; ABUBAKIROV, N. K. Steroidal Saponins and Sapogenins of *Allium*. 14. Structure of Karatavioside-A. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii**, Tashkent, n. 6, p. 740-746, 1978.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Realizou-se um estudo quanto ao potencial dos metabólitos secundários produzidos por espécies da família Solanaceae como agentes inibidores de crescimento do fungo *M. perniciosa*.

Foram avaliados os extratos aquosos de dez plantas da família Solanaceae e, verificou-se que o extrato aquoso de *Solanum seaforthianum*, *Brunfelsia uniflora* e *Cestrum nocturnum* possuem elevada atividade inibitória a *M. perniciosa*.

As linhagens de *M. perniciosa* do biotipo cacau mostraram-se como as mais sensíveis aos extratos aquosos das solanáceas em comparação as linhagens de *M. perniciosa* do biotipo solanácea.

Por mostrarem-se como promissores, os extratos aquosos de *S. seaforthianum* e *B. uniflora* foram selecionados para isolamento de seus constituintes bioativos.

A partir do extrato de *S. seaforthianum* isolou-se duas frações (SsM5d6a e SsM5d6c) que, por estudos químicos, mostraram-se constituídas por compostos da classe das saponinas furostanas.

A fração SsM5d6a foi identificada como uma mistura constituída por (25R)-karatavioside C / (25R)-purpureagitoside. E, a fração SsM5d6c foi identificada como uma mistura constituída por (25R)-timosaponin H₁ / (25R)-uttroside B.

Estes compostos estão sendo pela obtidos primeira vez de *S. seaforthianum* e relatados para atividade antifúngica.

A partir do extrato de *Brunfelsia uniflora* isolou-se três frações (BuM8i4, BuM8i5 e BuM8i6) que, por estudos químicos, mostraram-se constituídas por compostos da classe das saponinas espirostanas.

A fração BuM8i5 foi identificada como karatavioside A e está sendo obtido pela primeira vez de *B. uniflora* e relatado para atividade antifúngica.

Até o momento, não foi possível concluir a elucidação estrutural de BuM8i4 e BuM8i6. Contudo, verificou-se que BuM8i4 possui como aglicona (25R)-yucagenina e BuM8i6 possui como aglicona (25R)-diosgenina. Também verificou-se que estas frações possuem a mesma glicona, mas que ainda não foi identificada.

Comparando os ensaios biológicos, verificou-se que o extrato aquoso de *S. seaforthianum* foi mais efetivo que o extrato aquoso de *B. uniflora* na inibição de *M. perniciosa*. No entanto, as saponinas espirostanas isoladas de *B. uniflora* foram

consideravelmente mais ativas do que as misturas de saponinas furostanas obtidas de *S. seaforthianum*, na inibição de *M. perniciosa*.

As saponinas espirostanas isoladas de *B. uniflora* demonstram potencial para utilização no controle de *M. perniciosa*, visto que, apresentaram $CI_{50} < 15,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ tanto a germinação de basidiósporos quanto ao crescimento micelial de *M. perniciosa*. Porém, estudos adicionais são necessários para determinar a concentração inibitória mínima e o perfil de atividade sobre *M. perniciosa*.

Nos ensaios verificou-se que, tanto o extrato aquoso quanto os compostos isolados das plantas estudadas possuem atividade fungicida a *M. perniciosa*.

Ao relacionar as estruturas dos compostos obtidos neste trabalho, verifica-se que tanto karatavioside A quanto as saponinas de *S. seaforthianum* possuem como glicona a cadeia de açúcares licotetraose, a mesma glicona de α -tomatina, um composto conhecido por sua ação inibitória a *M. perniciosa*. Como estas moléculas diferem apenas quanto ao tipo de aglicona (furostana, espirostana, alcalóide), relaciona-se que atividade inibitória destas saponinas a *M. perniciosa* é fortemente influenciada pela estrutura da glicona.

Concluí-se que os dados obtidos neste trabalho oferecem mais informações sobre a constituição química de *S. seaforthianum* e representa o primeiro estudo sobre os metabólitos secundários de *B. uniflora*.

O estudo da estrutura e atividade antifúngica dos compostos isolados neste trabalho, podem auxiliar no desenvolvimento de novos fungicidas ou preparações mais efetivas para o controle de *M. perniciosa* e, talvez, de menor impacto ambiental em relação aos fungicidas convencionais.

APÊNDICES

Apêndice A: Compostos isolados de *S. seaforthianum* (Ss) e *B. uniflora* (Bu) e atividade inibitória a *M. pernicioso*

Fração	Composto e Estrutura química	$\lambda_{\max}$ UV	m/z	Massa obtida	Bioensaio (CI_{50})
SsM5d6a SsM5d6e	<p>(25R)-Purpureagitoside (1) e (25R)-Karatavioside C (2)</p> <p>1 R=H, (25R)-Purpureagitoside 2 R=H e 5(6)-ene, (25R)-Karatavioside C 3 R=CH₃</p>	201,3 nm	1213 [M+H] ⁺ (1) 1229 [M-H] ⁻ (1) 1211 [M+H] ⁺ (2) 1227 [M-H] ⁻ (2)	85,2 mg	Germinação 249,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Micélio 40,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$
SsM5d6c SsM5d6g	<p>(25R)-Uttroside B (1) e (25R)-Timosaponin H₁ (2)</p> <p>1 R=H, (25R)-Uttroside B 2 R=H e 5(6)-ene, (25R)-Timosaponin H₁ 3 R=CH₃</p>	201,3 nm	1197 [M+H] ⁺ (1) 1213 [M-H] ⁻ (1) 1195 [M+H] ⁺ (2) 1211 [M-H] ⁻ (2)	31,7 mg	Germinação 86,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Micélio 22,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$
BuM8i5	<p>(25R)-Karatavioside A</p> <p>1 R=H, (25R)-Karatavioside A 2 R=H e 5(6)-ene, (25R)-Karatavioside A 3 R=CH₃</p>	202,5 nm	1049 [M+H] ⁺ 1071 [M+Na] ⁺	4,8 mg	Germinação < 15,63 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Micélio < 15,63 $\mu\text{g ml}^{-1}$

BuM8i4	Não identificado Aglicona identificada como (25R)-yucagenina	202,5 nm	1181 [M+H] ⁺ 1203 [M+Na] ⁺	23,0 mg	Germinação < 15,63µg ml ⁻¹ Micélio < 15,63µg ml ⁻¹
BuM8i6	Não identificado Aglicona identificada como (25R)-diosgenina	202,5 nm	1165 [M+H] ⁺ 1187 [M+Na] ⁺	2,5 mg	Germinação < 15,63µg ml ⁻¹ Micélio < 15,63µg ml ⁻¹

ANEXOS

Anexo A: Espectro RMN ^1H da fração SsM5d6a, em piridina- d_5 (600 MHz).

Anexo B: Espectro RMN ^{13}C da fração SsM5d6a, em piridina- d_5 (600 MHz).

Anexo C: Espectro RMN ^1H do esteroide da fração SsM5d6a (SsM5d6aH1), em piridina- d_5 (600 MHz).

Anexo D: Espectro RMN ^{13}C do esteroide da fração SsM5d6a (SsM5d6aH1), em piridina- d_5 (150 MHz).

Anexo E: Espectro RMN ^1H da fração SsM5d6c, em piridina- d_5 (600 MHz).

Anexo F: Espectro RMN DEPT135 da fração SsM5d6c, em piridina- d_5 (150 MHz).

Anexo G: Espectro RMN ^1H da fração BuM8i4, em piridina- d_5 (400MHz).

Anexo H: Espectro RMN ^{13}C da fração BuM8i4, em piridina- d_5 (100 MHz).

Anexo I: Espectro RMN DEPT135 da fração BuM8i4, em piridina- d_5 (100 MHz).

Anexo J: Espectro RMN COSY da fração BuM8i4, em piridina- d_5 (600 MHz).

Anexo K: Espectro RMN HSQC da fração BuM8i4, em piridina- d_5 (600 e 150 MHz).

Anexo L: Espectro RMN HMBC da fração BuM8i4, em piridina- d_5 (600 e 150 MHz).

Anexo M: Espectro RMN ^1H do esteroide da fração BuM8i4 (BuM8i4H1), em piridina- d_5 (600 MHz).

Anexo N: Espectro RMN ^{13}C do esteroide da fração BuM8i4 (BuM8i4H1), em piridina- d_5 (150 MHz).

Anexo O: Espectro RMN ^1H da fração BuM8i5, em piridina- d_5 (600MHz).

Anexo P: Espectro RMN ^{13}C da fração BuM8i5, em piridina- d_5 (150 MHz).

Anexo Q: Espectro RMN ^1H da fração BuM8i6, em piridina- d_5 (600 MHz).

Anexo R: Espectro RMN ^{13}C da fração BuM8i6, em piridina- d_5 (150 MHz).

Anexo S: Espectro RMN DEPT135 da fração BuM8i6, em piridina- d_5 (150 MHz).

Anexo T: Espectro RMN COSY da fração BuM8i6, em piridina- d_5 (600 MHz).

Anexo U: Espectro RMN HSQC da fração BuM8i6, em piridina- d_5 (600 e150 MHz).

Anexo V: Espectro RMN HMBC da fração BuM8i6, em piridina- d_5 (600 e 150 MHz).