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

**Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com
atividade a fungos fitopatogênicos**

Joze Aparecida Marciano Corrêa

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

Piracicaba
2015

Joze Aparecida Marciano Corrêa
Bióloga

**Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com
atividade a fungos fitopatogênicos**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2015

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

Corrêa, Joze Aparecida Marciano

Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos / Joze Aparecida Marciano Corrêa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

164 p. : il.

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

1. Produtos naturais 2. Metabólitos secundários 3. *Moniliophthora perniciosa*
4. *Phytophthora cinnamomi* 5. Cromatografia 6. *Solanum americanum* 7. *Acnistus arborescens* 8. *Physalis peruviana* 9. Compostos bioativos I. Título

CDD 633.898
C824i

Aos meus pais, João e Zelinda.

Pelo infinito amor e apoio nas realizações dos meus sonhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais um sonho concluído e por permitir que novos sonhos comecem.

A Universidade de São Paulo, CNPq (processo 161867/2011-1), FAPESP (processo 2014/15760-03) e Capes pela infraestrutura e o apoio financeiro.

A minha orientadora Profa. Dra. Simone Possedente de Lira, pela orientação, paciência, pela calma nos momentos necessários, pelo apoio na realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade e apoio. Muito obrigada aos professores, alunos e funcionários pelas trocas de conhecimento.

Aos Professores Dr. Valdemar Tornisielo, Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, Dr. Edson Rodrigues Filho e ao Dr. Douglas Ferreira, por disponibilizarem equipamentos e materiais dos seus laboratórios para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Dr. Nelson Sidnei Massola Jr, Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira e a Dra. Liliane de Diana Teixeira por cederem os inóculos dos fitopatógenos avaliados neste trabalho.

Ao Professor Dr. Vinicius Castro Souza e ao mestrando Danilo Gissi, pela colaboração na identificação das espécies de solanáceas.

Aos meus pais, João e Zelinda, pelo amor, pela atenção, por investirem na minha educação e por compreenderem a minha ausência em vários momentos e assim mesmo por estarem sempre perto (obrigada internet), aos meus irmãos João Paulo, Carlos e Francis, e aos queridos sobrinhos Ana Paula, Ana Júlia, Gabriel e Catarina, Amo vocês! E obrigada pelo apoio.

Ao Márcio Andrade (namorado) por estar sempre ao meu lado, pelo apoio, pelo carinho, pela paciência e por trazer cor e sabor a minha vida nos momentos mais difíceis.

A todas as pessoas do Departamento da Química/ESALQ, vocês foram minha família durante esses quatro anos! Especialmente aos professores: Arquimedes, Wanessa, Marcelo, Marcos e Simone; aos técnicos: Rita, Lenita, Janaina, Gertrude, Felipe e Beto; as secretárias: Ana Maria, Helen e Nádia; aos amigos futuros doutores e mestres: Luciana, Jeane, Marcos (Pipoca), Sérgio, Flávio, Diana, Gislaine, Richtier, Cleiton, Marina, Amanda, Isabela e Marquinho; aos futuros agrônomos Fernanda e Igor. Muito Obrigada pela amizade e convivência.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais, os dinos: Luciana, Flávio e Sérgio, as novatas Gislaine e Diana, e os agregados Jeane e Pipoca. Obrigada pela troca de conhecimento, os momentos de risadas, as conversas, que com certeza ajudaram a encarar as dificuldades do dia a dia. Vou sentir muita falta de nós!

As alunas de iniciação científica Camila e Natasha, por me auxiliarem no desenvolvimento do meu trabalho, pela troca de conhecimentos, pelo respeito e acima de tudo pela amizade! Obrigada meninas!

As queridas amigas, com quem tive a oportunidade de conviver, respeitar e admirar Maria Marta, Maria Eugênia, Maria Cecília, Marina, Bruna e Ligia.

Aos amigos Flávio, Pipoca e Gi, pelas diversas contribuições durante os experimentos e análises. Muito obrigada!

Aos amigos Biólogos da Universidade Metodista de Piracicaba.

Enfim a todas as pessoas, que contribuíram de forma direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

"O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes."

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Principal	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 Família Solanaceae A. Juss.	29
3.2 Metabolismo dos Vegetais	29
3.3 Produtos Naturais.....	32
3.4 Metabólitos Secundários Bioativos em Solanáceas	35
3.5 Fitopatógenos.....	35
3.6 Métodos de Controle de Fitopatógenos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Obtenções de plantas pertencentes a família Solanaceae.....	43
4.1.1 Coleta de plantas pertencentes à família Solanaceae	43
4.1.2 Cultivo de espécies de solanáceas	43
4.1.3 Identificação botânica das espécies e depósito em herbário	44
4.2 Descrição geral das técnicas cromatográficas utilizadas para obtenção das frações semipurificadas.....	45
4.2.1 Obtenção dos extratos brutos das solanáceas.....	45
4.2.2 Partição líquido-líquido	46
4.2.3 Cromatografia em coluna pré-empacotada de extração fase sólida	46
4.2.4 Cromatografia em coluna de separação por permeação em gel.....	46
4.2.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	46
4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	47
4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de UV	47
4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com EM/ESI	47
4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE-UV-ELSD-MS	48
4.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência MS/MS	48

4.4 Técnica de Espectrometria de massas por MALDI -TOF.....	49
4.5 Solventes	49
4.6 Protocolos dos bioensaios	50
4.6.1 Fitopatógenos avaliados nos ensaios biológicos <i>in vitro</i>	50
4.6.2 Armazenamento e preservação dos fitopatógenos.....	51
4.6.3 Ensaio biológico <i>in vitro</i> com os extratos brutos das solanáceas	51
4.6.4 Ensaio biológico <i>in vitro</i> com as frações semi-purificadas	52
4.6.5 Ensaio biológico <i>in vitro</i> com fungicidas	53
4.7 Análises	54
4.7.1 Análises do percentual de inibição do crescimento micelial (PIC)	54
4.7.2 Análises estatísticas	55
Referências.....	55
5 SELEÇÃO DAS PLANTAS PERTENCENTES À FAMÍLIA SOLANACEAE COM ATIVIDADE FUNGITÓXICA A FITOPATÓGENOS	63
Resumo	63
Abstract.....	63
5.1 Introdução.....	65
5.2 Material e métodos	66
5.3 Resultados e discussão.....	67
Referência	78
6 POTENCIAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS DA PLANTA <i>Solanum americanum</i> PARA O CONTROLE DE <i>Moniliophthora perniciosa</i>	83
Resumo	83
Abstract.....	83
6.1 Introdução.....	84
6.2 Material e métodos	86
6.3 Resultados e discussões	88
Referência	108
7 POTENCIAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS DA PLANTA <i>Acnistus arborescens</i> PARA O CONTROLE DE <i>Phytophthora cinnamomi</i>	113
Resumo	113
Abstract.....	113
7.1 Introdução.....	114
7.2 Material e Métodos	116
7.3 Resultados e discussões	118

7.4 Referência.....	134
8 POTENCIAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA PLANTA <i>Physalis peruviana</i> PARA O CONTROLE DE <i>Phytophthora cinnamomi</i>	139
Resumo	139
Abstract	139
8. 1 Introdução	140
8. 2 Material e Métodos	143
8. 3 Resultados e discussões.....	145
Referências	159
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	163

RESUMO

Estudo químico de extratos de plantas da família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos

A biodiversidade brasileira é conhecida devido a sua riqueza de espécies, sendo considerada uma fonte promissora de produtos naturais. Dentre as plantas vasculares, a família Solanaceae A. Juss. (Solanaceae) é considerada uma das maiores, apresentando distribuição em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo. A família Solanaceae apresenta alta diversidade de espécies de importância econômica como fonte de alimentos, propriedades medicinais e ornamentais. Plantas desta família são fontes de metabólitos secundários de diversas classes químicas com as mais diversas aplicações. Fungos fitopatogênicos são responsáveis por causar diversas doenças e consideráveis perdas na agricultura. O controle das doenças é realizado através de métodos químicos, físicos e biológicos, porém o uso excessivo e ininterrupto de produtos químicos pode resultar na seleção de micro-organismos resistentes. Além disto, muitos fungicidas apresentam toxicidade alta e a sua utilização indiscriminada pode causar efeitos indesejáveis sobre outros organismos no ambiente. O objetivo deste estudo é explorar o potencial biológico e químico de metabólitos secundários produzidos por plantas da família Solanaceae com potencial fungitóxico a fitopatógenos. Foram selecionadas 15 espécies de plantas da família Solanaceae que tiveram os extratos de suas folhas avaliados em ensaios biológicos *in vitro* sobre o crescimento micelial de 6 fitopatógenos de importância na agricultura. Dentre estas, três foram selecionadas para uma investigação mais aprofundada, as espécies *Solanum americanum*, *Acnistus arborescens* e *Physalis peruviana*. No estudo da planta *S. americanum*, foram identificados compostos bioativos pertencentes à classe dos glicoalcalóides, que inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*. No estudo de *A. arborescens* foi identificado a presença de um composto ativo pertencente à classe dos vitanolidos, provavelmente o 7 β -acetoxivitanolido D, e sua ação antifúngica está sendo relatada pela primeira vez. No estudo da planta *P. peruviana* a fração semipura bioativa indicou a presença de um composto pertencente à classe dos vitanolidos. Esses resultados evidenciaram que os compostos presentes nas plantas, apresentam bioatividade que inibem o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Moniliophthora perniciosa* e *Phytophthora cinnamomi*, podendo ser uma nova opção coadjuvante no controle de fitopatógenos.

Palavras-chave: Produtos naturais; Metabólitos secundários; *Moniliophthora perniciosa*; *Phytophthora cinnamomi*; Cromatografia; *Solanum americanum*; *Acnistus arborescens*; *Physalis peruviana*; Compostos bioativos

ABSTRACT

Chemical study of the Solanaceae plant extracts with activity to pathogenic fungi

The Brazilian biodiversity is known due to its richness of species, and is considered a promising source of natural products. Among the vascular plants, the family Solanaceae A. Juss. (Solanaceae) is considered one of the largest, with distribution in all tropical and temperate regions of the world. The Solanaceae family has a high diversity of species of economic importance as a source of food, medicinal and ornamental properties. Plants of this family are sources of secondary metabolites from different chemical classes with many different applications. Plant fungi are responsible for causing various diseases and considerable losses in agriculture. The disease control is accomplished through chemical, physical and biological methods, but the excessive and continuous use of chemical products, may result in selection of resistant micro-organisms, in addition, many fungicides have a high toxicity and its indiscriminate use can cause undesirable effects on other organisms in the environment. The objective of this study is to explore the biological and chemical potential of secondary metabolites produced by plants of the Solanaceae family with potential fungitoxic the pathogens. We selected 15 species of Solanaceae plants that had the extracts of its leaves evaluated *in vitro* biological assays on the mycelial growth of 6 plant pathogens of importance in agriculture. Among these, three were selected for further investigation, the species *Solanum americanum*, *Physalis peruviana* and *Acnistus arborescens*. In the study of plant *S. americanum*, it was identified bioactive compounds belonging to the class of glycoalkaloids that inhibited the mycelial growth of the pathogen *M. pernicioso*. In the study of *A. arborescens* it was identified the presence of the active compound belonging to the class of withanolides, probably the 7 β -acetoxywithanolide D, and its antifungal activity is being reported for the first time. In the study of plant *P. peruviana* semipure bioactive fraction indicated the presence of the compound belonging to the class of withanolides. These results showed that the compounds present in plants, have bioactivity that inhibit the mycelial growth of pathogenic fungi *M. pernicioso* and *P. cinnamomi* and may be a new option in the adjuvant control pathogens.

Keywords: Natural products; Secondary metabolites; *Moniliophthora pernicioso*; *Phytophthora cinnamomi*; Chromatography; *Solanum americanum*; *Acnistus arborescens*; *Physalis peruviana*; Bioactive compound

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura dos compostos das principais classes de metabólitos secundários: A- terpenóides, B - compostos fenólicos e C – alcalóides. (1) linalol; (2) germacreno D; (3) ent-kaureneo; (4) malato sinapoil; (5) escopoletina; (6) 7,4 –Di-hidroxiflavona; (7) procianidina; (8) delphinidina 3-glucósido; (9) álcool sinapílico; (10) camalexina; (11) morfina e (12) cafeína.	31
Figura 2 -	Estruturas químicas dos primeiros produtos naturais relatados.....	33
Figura 3 -	Estrutura dos metabólitos secundários que apresentam valor econômico e aplicações em diversas áreas.....	34
Figura 5 -	Fluxograma dos processos realizados com as 15 espécies de solanáceas.	67
Figura 4 -	Estrutura química dos compostos: (A) Piraclostrobina, (B) Trifloxtrobina e (C) Protioconazol.....	53
Figura 6 -	Bioensaio <i>in vitro</i> com os extratos brutos das solanáceas (2% m/v) e os fungicidas (1 mg L ⁻¹).....	75
Figura 7 -	Comparação da porcentagem de inibição de fitopatógenos, entre o extrato bruto das solanáceas (0,2 mg L ⁻¹) e os fungicidas (0,1 mg L ⁻¹).	76
Figura 8 -	<i>Solanum americanum</i> , espécie de planta pertencente a família Solanaceae.....	84
Figura 9 -	Fluxograma dos processos realizados com <i>S. americanum</i>	87
Figura 10 -	Espectro de massas CLAE-EM/ESI do extrato bruto das folhas de <i>S. americanum</i>	88
Figura 11 -	Ensaio de atividade antifúngica contra <i>M. pernicioso</i> utilizando 20 mg da fração n-butanólica, pelo método de difusão em disco.	89
Figura 12 -	Espectro de massas CLAE-EM/ESI obtido da fração n-butanólica da <i>S. americanum</i>	89
Figura 13 -	Ensaio de atividade antifúngica contra <i>M. pernicioso</i> com as frações obtidas da cromatografia em permeação em gel de Sephadex LH-20, utilizando 20 mg, pelo método de difusão em disco. M = Controle metanol.	90

Figura 14 -	Ensaio de atividade antifúngica contra <i>M. pernicioso</i> com as frações obtidas da cromatografia em coluna Sep-pak C ₁₈ , utilizando 20 mg, pelo método de difusão em disco.....	91
Figura 15 -	Cromatograma da fração Sa2F. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ , 4,6 X 250 mm, 5 um. Fase móvel água:metanol:acetonitrila (10:45:45), monitorada em 242 nm	92
Figura 16 -	Ensaio de atividade antifúngica a <i>M. pernicioso</i> com as frações, utilizando 0,5 mg, pelo método de difusão em disco.....	92
Figura 17 -	Cromatograma da fração SA2F3. Condições: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ 4,6X250mm, 5 um. Fase móvel água:metanol (40:60), e corrida monitorada nos comprimentos de onda 210 e 242 nm.	93
Figura 18 -	Cromatograma da fração Sa2F3. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ 4,6X250mm, 5 um. Fase móvel 30:70 de acetonitrila:tampão de fosfato de amônio monobásico 0,005M com pH 6,5, analisado em 200, 202, 210 e 254nm.....	93
Figura 19 -	Estrutura glicoalcalóide. Adaptado Milner et al., 2011.....	94
Figura 20 -	Estrutura das gliconas: Chacotriose, Solatriose, comertetraose e licotetraose. Adaptado Milner et al., 2011.	95
Figura 21 -	Estrutura das agliconas: (A) espirosolano, (B) 22,26-epiminocolestano, (C) solanidanos, (D) α -epiminociclohemiacetal, (E) aminoespirostanos, (F) leptinas. Adaptado Ghisalberti, 2006; Milner et al., 2011	96
Figura 22 -	Full scan da amostra Sa2F3C, analisada por espectrometria MALDI-TOF-MS.	97
Figura 23 -	Full scan da amostra Sa2F3D, analisada por espectrometria MALDI-TOF-MS.	99
Figura 24 -	Cromatograma obtido pela fração SA2F3D - em LC-MS/MS - Ion Trap (Esquire 3000 plus). Coluna Phenomenex Gemini C-18 4,6 X 250 mm, 5 um. A fase móvel empregada foi gradiente água:metanol (80:20). Monitorada em 210 nm.....	101
Figura 25 -	Espectro de MS/MS obtido da fração SA2F3D - Ion Trap (Esquire 3000 plus).....	101

Figura 26 - Espectro de MS/MS do íon molecular m/z 884,7 [M+H] ⁺ da amostra Sa2F3D - em MS/MS-Ion Trap (Esquire 3000 plus).....	102
Figura 27 - Espectro de MS/MS do íon molecular m/z 868,5 [M+H] ⁺ da amostra Sa2F3D - em MS/MS -Ion Trap (Esquire 3000 plus).....	103
Figura 28 - Espectro de MS/MS da amostra Sa2F3D, com t _R 7,1 minutos.	103
Figura 29 - Perfil de fragmentação da molécula α-Solanina (DISTL; WINK, 2009)	104
Figura 30 - Espectro de MS/MS do íon molecular m/z 414 [M+H] ⁺ da amostra Sa2F3D - em MS/MS - Ion Trap (Esquire 3000 plus).....	105
Figura 31 - Estrutura dos compostos α-Solamargina, β-Solamarina e Leptinina I, e suas diferenças.	106
Figura 32 - <i>Acnistus arborescens</i> , espécie de planta pertencente à família Solanaceae	114
Figura 33 - Estrutura geral da classe dos vitanolidos e estrutura do composto vitaferina A.	115
Figura 34 - Fluxograma dos processos realizados com <i>P. cinnamomi</i>	115
Figura 35 - Ensaio de atividade antifúngica contra <i>P. cinnamomi</i> com as frações obtidas por partição líquido-líquido com os solventes orgânicos, após 7 dias de incubação em B.O.D.....	118
Figura 36 - Ensaio de atividade antifúngica para <i>P. cinnamomi</i> com as frações obtidas da cromatografia de permeação em gel de Sephadex (concentração 1 mg), após 7 dias de incubação em B.O.D.	119
Figura 37 - Ensaio de atividade antifúngica para <i>P. cinnamomi</i> com as frações obtidas da cromatografia em coluna Sep-pak (concentração 1 mg mL ⁻¹), após 7 dias de incubação em B.O.D.....	121
Figura 38 - Ensaio de atividade antifúngica para <i>P. cinnamomi</i> com as frações obtidas da cromatografia em coluna Sep-pak (concentração 0,5 mg mL ⁻¹), após 7 dias de incubação em B.O.D.	121
Figura 39 - Cromatograma da fração AA4A1. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ , 4,6 X 250 mm, 5µm. Fase móvel água:metanol (30:70), monitorada em 254nm.	124
Figura 40 - Espectro de massas CLAE-UV-ELSD-MS da fração AA4A1 (ativa) ..	122

Figura 41 - Cromatograma da fração AA4A1C. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ , 4,6 X 250 mm, 5µm. Fase móvel água:metanol (30:70), monitorada em 210, 230 e 254nm.	125
Figura 42 - Ensaio de atividade antifúngica contra <i>P. cinnamomi</i> avaliando a as frações provenientes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	126
Figura 43 - Cromatograma da fração AA4A1C. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ , 4,6 X 250 mm, 5µm. Fase móvel água:metanol (30:70), monitorada em 210, 230 e 254nm.....	125
Figura 44 - Espectro de massas da fração AA4A1C -	128
Figura 45 - Fragmentação de um vitanolídeo.	128
Figura 46 - Cromatograma da fração AA4A1C.....	128
Figura 47 - Espectro de MS/MS AA4A1C.....	128
Figura 48 - Espectro de MS/MS obtido da fração AA4A1C, <i>m/z</i> 529,2 - Ion Trap (Esquire 3000 plus).	129
Figura 49 - Espectro de MS/MS obtido da fração AA4A1C, <i>m/z</i> 1057,5 - Ion Trap (Esquire 3000 plus).	130
Figura 50 - Estrutura 7β-acetoxivitanolido D (C ₃₀ H ₄₀ O ₈) - CAS Registry Number 30655-47-1- Adaptado Minguzzi et al., 2002.	141
Figura 51 - Estrutura camptotecina.....	144
Figura 52 - <i>Physalis peruviana</i> , espécie pertencente a família Solanaceae..	140
Figura 53 - Compostos bioativos isolados de <i>P. peruviana</i>	141
Figura 54 - Estrutura dos vitaesteroides	141
Figura 55 - Fluxograma dos processos realizados com <i>P. cinnamomi</i>	144
Figura 56 - Ensaio de atividade antifúngica contra <i>P. cinamomi</i> com as frações obtidas por partição líquido-líquido com os solventes: n-butanol, acetato de etila e diclorometano, após 7 dias de incubação em B.O.D. Legenda: Fr. = Fração.	145
Figura 57 - Ensaio de atividade antifúngica contra <i>P. cinamomi</i> com as frações obtidas na cromatografia Sephadex LH-20. Legenda C = controle metanol.....	147
Figura 58 - Ensaio de atividade antifúngica contra <i>P. cinnamomi</i>	147

Figura 59 - Cromatograma da fração PP3A. Condições: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ 4,6 X 250 mm, 5 µm., eluentes metanol e água, comprimento de onda 201, 233, 254, 265 e 280 nm.....	148
Figura 60 - Ensaio de atividade antifúngica contra <i>P. cinnamomi</i> com as frações obtidas após Cromatografia Líquida de Alta eficiência.....	149
Figura 61 - Cromatograma da fração PP3A3 e PP3A8. Condições: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C ₁₈ 4,6 X 250 mm, 5 µm., eluentes metanol e água, comprimento de onda 233 e 265 nm.....	150
Figura 62 - Cromatografia da fração PP3A3.	150
Figura 63 - Espectro de massas em modo positivo da fração PP3A3, com t _R 7,067.	151
Figura 64 - Espectro de massas em modo positivo da fração PP3A3, com t _R 7,766.	152
Figura 65 - Espectro de MS/MS em modo positivo da fração PP3A3. B) Espectro de MS/MS – fragmentação do pico m/z 1005,9 (t _R 11,2). B1) Espectro de MS/MS – fragmentação do pico m/z 520,0 (t _R 11,4).....	153
Figura 66 - Esquema da fragmentação do íon molecular m/z 525,0 [M + Na] ⁺ . Lac = lactona.....	154
Figura 67 - Estrutura vitaperuvina L.	155
Figura 68 - Estrutura isocarpalactona B.	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos mecanismos bioquímicos de ação e o seu grupo químico.....	40
Tabela 2 -	Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função dos efeitos a saúde.	41
Tabela 3 -	Espécies de plantas da família Solanaceae coletadas e cultivadas.....	45
Tabela 4 -	Fitopatógenos avaliados nos ensaios biológicos <i>in vitro</i>	50
Tabela 5 -	Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos avaliados com o extrato bruto de 15 espécies de plantas da família Solanaceae.	68
Tabela 6 -	Porcentagem da inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> de seis fitopatógenos, em meios de cultura incorporados com fungicidas em diferentes concentrações.	72
Tabela 7 -	Estruturas químicas dos glicoalcalóides α -solamarina α -solasonina e leptinina II e demais informações.	98
Tabela 8 -	Estruturas químicas dos glicoalcalóides α -solanina α -solamargina, β -solamarina e leptinina I e demais informações.	100

1 INTRODUÇÃO

A família Solanaceae A. Juss. (Solanaceae) é considerada uma das maiores entre as plantas angiospermas, representada por aproximadamente 2,500 a 3,000 espécies distribuídas em 96 gêneros; a família é amplamente distribuída em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo, com centros de diversidade ocorrendo na América Central e do Sul e Austrália.

Plantas pertencentes à família Solanaceae são fontes abundantes de metabólitos secundários bioativos, como os alcalóides esteroidais, os alcalóides do tipo tropano, alcalóides piridínicos, vitanolídeos, sesquiterpenos, diterpenos, glicoalcalóides, flavonóides entre outros. Muitos destes compostos são utilizados para fins medicinais, pois apresentam propriedades anti-inflamatórias, antihelmínticos, antitumoral, antiasmática, antiulcerogênica, antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, dentre outras.

Desde os primeiros relatos da agricultura (10.000 anos atrás), os produtores buscam alternativas para o controle de organismos nocivos às plantas (insetos, ácaros, roedores, lesmas, pássaros, vírus, bactérias, fungos, oomicetos, nematoides e plantas parasitas). Alguns desses são causadores de diversas doenças e outros são considerados pragas, consequentemente são responsáveis pelas maiores perdas agrícolas em todo o mundo, gerando um impacto negativo na economia. Atualmente, estima-se que as perdas na produtividade das lavouras causadas por pragas, doenças e plantas daninhas sejam entre 30-40% nos países em desenvolvimento, o que gera um impacto negativo na economia mundial.

Os fungos fitopatogênicos são organismos que apresentam potencial para causar perdas catastróficas nas lavouras, devido ao fato de que, a maioria das espécies de fungos produzem grandes quantidades de esporos (estruturas reprodutivas dos fungos, responsáveis pela propagação da espécie) que podem ser disseminados (vento, água, solo) a longas distâncias e infectar outras plantas. Estes esporos em condições favoráveis podem rapidamente germinar e infectar as plantas, ou se estiverem em condições desfavoráveis os esporos podem entrar em período de latência (tempo entre a infecção e a produção de outros propágulos infecciosos) podendo permanecer viáveis por longos períodos. Além disto, diversos fungos podem produzir toxinas e enzimas como as cutinases, pectinases, celulasas, hemicelulasas e ligninases, que desestabilizam o mecanismo de resistência das

plantas, podendo degradar a cutina e os compostos da parede celular da planta, ocasionando a infecção do fungo no vegetal, e conforme o avanço da doença, o desenvolvimento da planta fica comprometido levando-a à morte.

O método de controle mais utilizado para doenças causadas por fungos fitopatogênicos é realizada por aplicações do produto sintético fungicida. No entanto, com intuito de exterminar vários fitopatógenos e prevenir o desenvolvimento de várias doenças nas lavouras, muitos produtores estão fazendo o uso excessivo e ininterrupto de produtos químicos, resultando na seleção de micro-organismos resistentes. Além disto, muitos fungicidas apresentam toxicidade alta e a utilização indiscriminada pode causar efeitos indesejáveis sobre outros organismos e ao meio ambiente; com este fato, torna-se necessário a busca por novos compostos ativos que contribuam com o controle dos fitopatógenos.

Devido à grande diversidade de plantas presentes na flora brasileira e sabendo-se que as espécies da família Solanaceae produzem uma variedade de metabólitos secundários de diferentes classes químicas e com diversas atividades biológicas, é de extrema importância que estudos mais detalhados destes compostos sejam realizados para contribuir no conhecimento para novas opções de controle aos fitopatógenos, em conjunto com as já existentes.

O objetivo deste trabalho foi explorar o potencial dos metabólitos secundários produzidos por plantas pertencentes à família Solanaceae, como agentes inibidores do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.

Neste trabalho, quinze extratos de plantas pertencentes à família Solanaceae foram investigados quimicamente quanto a sua atividade fungitóxica a seis fungos fitopatogênicos de relevância na agricultura. Dentre os extratos ativos, foram selecionadas três espécies de plantas (Solanaceae) com atividade fúngica promissora, baseando-se em ensaios de atividade biológica *in vitro*. Uma investigação química com os extratos bioativos foi realizada, utilizando-se de técnicas cromatográficas para obter frações semipuras ativas aos fungos fitopatogênicos. As frações bioativas foram caracterizadas quimicamente por técnicas espectroscópicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Este trabalho tem por objetivo explorar o potencial dos metabólitos secundários produzidos por plantas pertencentes à família Solanaceae, como agentes inibidores do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar quimicamente os extratos brutos de 15 plantas da família Solanaceae com potencial fungitóxico a 6 fungos fitopatogênicos de relevância na agricultura.

Selecionar 3 espécies de plantas (Solanaceae) com atividade fúngica promissora, baseando-se em ensaios de atividade biológica *in vitro*.

Investigar quimicamente os extratos bioativos, utilizando-se de técnicas cromatográficas para obter frações ativas aos fungos fitopatogênicos.

Caracterizar quimicamente as frações semipuras bioativas, por técnicas espectroscópicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Solanaceae A. Juss.

A flora brasileira é muito conhecida devido a sua riqueza e diversidade de espécies. Atualmente são reconhecidas 40.226 espécies vegetais (samambaias, licófitas, briófitas, gimnospermas, angiospermas, algas) (Lista de Espécies da Flora do Brasil 2014).

Dentre as plantas vasculares, a família Solanaceae A. Juss. (Solanaceae) é considerada uma das maiores, representada por aproximadamente 2.500 a 3.000 espécies distribuídas em 96 gêneros. A família é amplamente distribuída em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo, com centros de diversidade ocorrendo na América Central e do Sul e Austrália (D'ARCY 1991; HUNZIKER, 1979, 2000).

Atualmente no Brasil a família Solanaceae é representada por 34 gêneros e 470 espécies de plantas distribuídas entre os biomas brasileiros (STEHMANN et al., 2014). A família Solanaceae é muito conhecida devido a sua alta diversidade de espécies com grande importância econômica como fonte de alimentos (batatas, tomates, berinjelas, pimentas e outras), com propriedades medicinais (tabaco, beladona, mandrágora etc.) e plantas ornamentais (petúnias e jasmims, entre outras) (FILGUEIRA, 2003; KNAPP et al., 2004; PINTO et al., 2011; SILVA et al., 2003).

3.2 Metabolismos dos Vegetais

As plantas apresentam dois tipos de metabolismo: o metabolismo primário e o metabolismo secundário. O metabolismo primário envolve compostos como os carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e são responsáveis por processos metabólicos que desempenham uma função essencial (crescimento, desenvolvimento, manutenção das células, respiração, reprodução, fotossíntese). Esses compostos apresentam distribuição universal, são uniformes e conservativos. O metabolismo secundário produz substâncias de natureza química diversa, as quais não estão relacionadas com a execução de funções celulares vitais, apresentando diversas outras funções e aplicações; muitos destes compostos não apresentam uma distribuição universal entre os vegetais, e alguns são específicos a determinadas espécies (Di STASI, 1995; TAIZ; ZEIGER, 1998; MARZZOCO; TORRES, 2007; ZHAO et al., 2013).

Os metabólitos secundários de plantas são geralmente classificados de acordo com as suas vias biossintéticas, sendo divididos em três grupos principais: os terpenóides, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenóides derivam do ácido malônico (citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto); os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina) os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina); e os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido malônico (CROTEAU; KUTCHAN, LEWIS, 2000).

Os metabólitos secundários apresentam diversas funções e aplicações, as quais podemos citar, como exemplo os pertencentes a classe dos terpenos: linalol; germacreno D, e ent-caureno (Figura 1A); os da classe dos fenóis: malato sinapoil, escopoletina, 7,4 –Di-hidroxiflavona, procianidina, delphinidina 3-glucósido, álcool sinapílico (Figura 1B); e os pertencentes aos alcalóides: camalexina; morfina e cafeína (Figura 1C) (ZHAO et al., 2013).

Figura 1 - Estrutura dos compostos das principais classes de metabólitos secundários: A-terpenóides, B - compostos fenólicos e C - alcalóides. (1) linalol; (2) germacreno D; (3) ent-kaureneo; (4) malato sinapóil; (5) escopoletina; (6) 7,4'-Di-hidroxiflavona; (7) procianidina; (8) delphinidina 3-glucósido; (9) álcool sinapílico; (10) camalexina; (11) morfina e (12) cafeína. Adaptado Zhao et al., 2003.

Os compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas desempenham um papel importante na interação com o meio ambiente, possuindo uma ação protetora em relação aos estresses abióticos (deficiência de nutrientes minerais, temperatura, disponibilidade de água etc.) e bióticos (ataque de patógenos, herbívoros, competição entre plantas, atração de polinizadores etc.); além disso, muitos desses compostos apresentam efeitos biológicos, com grande importância ecológica e taxonômica (Di STASI, 1995; TALIZ; ZEIGER, 1998; ZHAO et al., 2013).

3.3 Produtos Naturais

Ao longo de toda história do desenvolvimento das civilizações, o homem utiliza compostos naturais obtidos das plantas, para a cura de diversas enfermidades e este conhecimento vem sendo transmitido de geração em geração (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO 2006). A utilização de plantas para fins medicinais, para as mais diversas enfermidades e para o controle de pragas na agricultura, continua presente em diversos países em desenvolvimento (ODY, 1993; CALIXTO, 2000; 2005; DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009).

O crescente interesse e a busca pelo conhecimento científico sobre os compostos químicos das plantas, fungos, bactérias e invertebrados, uniu diversas áreas científicas como a farmácia, a química, a biologia, a antropologia, a medicina entre outras, para avaliar o potencial de atuação das moléculas bioativas, a melhor forma de como usá-las, além de realizar a síntese desses compostos para aplicação comercial (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO 2006; PUPO, GALLO, VIEIRA, 2007). Na área da agronomia, também são realizadas pesquisas para utilizar determinadas substâncias químicas presente nas plantas para o combate de diversas pragas e doenças causadas por diversos micro-organismos (DUKE et al., 2003; TRIPATHI; DUBEY, 2004; MACHADO, 2009; DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009).

O isolamento das primeiras substâncias no Reino Vegetal foi realizado durante os séculos XVIII e XIX, resultando no isolamento da morfina (Figura 2 (1)), quinina (Figura 2 (2)) e estriquinina (Figura 2 (3)), que apresentam grande importância química, terapêutica e econômica até os dias atuais (GRABLEY, THIERICKE, 1999; PINTO et al., 2002).

No Brasil, a comercialização de produtos naturais, começou com a chegada dos portugueses, que utilizaram a árvore pau-brasil (*Cesalpinia echinata*), como principal moeda de troca de mercadorias. Desta, era extraída a brazilina (Figura 2 (4)), um derivado catecólico que facilmente oxidava a brazileína (Figura 2 (5)), um fenoldienônico, sendo utilizado para tingimento de roupas e tinta para escrever (PINTO, 1995; PINTO et al., 2002; VIEGAS, JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Figura 2 – Estruturas químicas dos primeiros produtos naturais relatados

De uma forma geral, a maioria das substâncias orgânicas conhecidas são encontradas na natureza, sendo o Reino Vegetal o contribuidor mais significativo, devido a alta diversidade de metabólitos secundários produzidos (ZHAO et al., 2013). Diversos metabólitos secundários apresentam grande valor econômico e variadas aplicações, como a produção de alimentos (aromas, corantes), cosméticos (antioxidantes), farmacológicos (medicamentos), industriais (corantes), agroquímicos (inseticidas e herbicidas) (Figura 3); Além do mais, muitas dessas substâncias servem de modelo para o desenvolvimento de novos produtos químicos sintéticos (BALANDRINI et al., 1985; BATTESTIN, MATSUD, MACEDO, 2004; BRUSSOTTI et al., 2014; GYAWALI, IBRAHIM, 2014; DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009).

3.4 Metabólitos Secundários Bioativos em Solanáceas

A literatura tem demonstrado que as plantas pertencentes à família Solanaceae são fontes abundantes de metabólitos secundários bioativos, como os alcalóides esteroidais (HARBORNE; BAXTER, 1993), os alcalóides do tipo tropano (GRIFFIN; LIN, 2000), alcalóides piridínicos (HEGNAUER, 1973), vitanolídeos, sesquiterpenos e diterpenos (HARBONER; BAXTER, 1993), glicoalcalóides (BAUP, 1826), flavonóides (SHILLING, 1984) entre outros. Muitos destes compostos bioativos são utilizados para fins medicinais, pois apresentam propriedades anti-inflamatórias e anti-helmínticas (HERRERA-SALGADO et al., 2005; EDWIN et al., 2008), antitumoral (FRIEDMAN et al., 2005; CHAM, 2007), antiasmática (VADNERE et al., 2008), antiulcerogênica (MALIKA et al., 2006), antimicrobiana (BHATTACHARJEE et al., 2005), antifúngica (FENNER et al., 2006), citotóxica (IKEDA et al., 2003) entre outros. Além das propriedades medicinais encontradas nas solanáceas, ocorre a presença de compostos que são utilizados como indicadores taxonômicos de família. Ou ainda, outros compostos que são responsáveis pela resistência natural das espécies em seu ecossistema, podendo desenvolver interações com outros animais e micro-organismos. Estes compostos são de grande interesse para os estudos na área de ecologia, e para o desenvolvimento de produtos na área química (BALADRIN et al., 1985; BLANKEMEYER et al., 1998; DI STASI, 1995; FRIEDMAN, 2006; FRIEDMAN; McDONALD, 1997; FUKUHARA, 2004; WINK, 2003).

3.5 Fitopatógenos

Desde os primeiros relatos sobre a agricultura (10.000 anos atrás), os produtores buscam alternativas para o controle de organismos nocivos às plantas (insetos, ácaros, roedores, lesmas, pássaros, vírus, bactérias, fungos, oomicetos, nematoides e plantas parasitas). Alguns desses são causadores de diversas doenças e outros são considerados pragas, conseqüentemente são responsáveis pelas maiores perdas agrícolas em todo o mundo, gerando um impacto negativo na economia (OERKE, 2006; PEREIRA, 2013). Estima-se que as perdas na produtividade das lavouras causadas por pragas, doenças e plantas daninhas sejam entre 30-40% nos países em desenvolvimento (FLOOD, 2010; FEARS et al., 2014).

Segundo Strange e Scott (2005), os fungos fitopatogênicos são organismos que apresentam potencial para causar perdas catastróficas nas lavouras, devido ao fato de que, a maioria das espécies de fungos produzem grandes quantidades de esporos (estruturas reprodutivas dos fungos, responsáveis pela propagação da espécie) que podem ser disseminados (vento, água, solo) a longas distâncias e infectar outras plantas. Estes esporos em condições favoráveis podem rapidamente germinar e infectar as plantas, ou se estiverem em condições desfavoráveis os esporos podem entrar em período de latência (tempo entre a infecção e a produção de outros propágulos infecciosos) podendo permanecer viáveis por longos períodos. Além disto, diversos fungos podem produzir toxinas e enzimas como as cutinases, pectinases, celulasas, hemicelulasas e ligninases, que desestabilizam o mecanismo de resistência das plantas, podendo degradar a cutina e os compostos da parede celular da planta, ocasionando a infecção do fungo no vegetal, e conforme o avanço da doença, o desenvolvimento da planta fica comprometido levando-a à morte.

Recentemente foi publicada uma pesquisa realizada com diversos pesquisadores da área de fitopatologia para listar os dez fungos fitopatogênicos da atualidade, que apresentam importância mundial na área científica e econômica, e os selecionados foram: *Magnaporthe oryzae* (agente causal da brusone no arroz); *Botrytis cinerea* (agente causal do mofo cinzento em diversas espécies de vegetais); *Puccinia* spp. (agente causal da ferrugem); *Fusarium graminearum* (agente causal da fusariose em diversos cereais); *Fusarium oxysporum* (responsável por causar a murcha vascular em diversas variedades de plantas); *Blumeria graminis* (agente causal do oídio ou cinza do trigo); *Mycosphaerella graminicola* (agente causal da mancha salpicada das folhas em trigo); *Colletotrichum* spp. (agente causal da antracnose em diversas espécies de plantas), *Ustilago maydis* (agente causal do carvão no milho) e *Melampsora lini* (agente causal da ferrugem no linho) (DEAN et al., 2012).

No Brasil, devido aos fatores regionais e os desafios para controlar o desenvolvimento e resistência dos fungos fitopatogênicos, pode-se citar alguns fitopatógenos responsáveis por causar grandes perdas na produção agrícola, tais como: *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacaueteiro; *Colletotrichum* spp., responsáveis por causarem doenças em uma ampla variedade de culturas perenes, hortaliças, cereais, leguminosas e diversas plantas frutíferas; *Sporisorium scitamineum* causador da doença carvão na cana-de-açúcar;

Phytophthora spp., um dos fitopatógenos mais destrutivos, apresentando um alto número de hospedeiros susceptíveis; *Rhizoctonia* spp., causadora da podridão-de-raiz e coroa, em mudas de hortaliças e plantas ornamentais; a ferrugem da soja que é causada por duas espécies de fungo do gênero *Phakopsora*; as doenças (ferrugem e cercosporiose) do café causada pelos fitopatógenos *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola* respectivamente, entre outras (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2012).

3.6 Métodos de Controle de Fitopatógenos

A agricultura é praticada pela humanidade há mais de dez mil anos, e as pragas e doenças que atacam as plantações sempre foram um problema para o homem, pois quando ocorre a disseminação de doença podem ocorrer grandes perdas na produção de alimentos. Um exemplo foi o ocorrido na Irlanda (1845-1846), onde milhares de pessoas morreram de fome devido à requeima da batata, doença causada pelo fitopatógeno *Phytophthora infestans*. Este fitopatógeno continua causando sérias perdas na cultura da batata e de tomate até os dias de hoje, o que demonstra a necessidade de desenvolvimento de métodos para controle de pragas e doenças (ZAMBOLIM et al., 2008; PEREIRA et al., 2013; ITO, 2009).

Atualmente o Brasil é considerado um dos principais países produtores e fornecedores mundiais de alimentos e fibras. Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Meio Ambiente (MAPA, 2014), essa posição foi ocupada devido à combinação de fatores, como o clima propício, investimento em tecnologia, extensão territorial cultivável e qualidade de produtos. Peres et al. (2005), relatam que o crescimento da produtividade no Brasil está relacionado com o uso de agrotóxicos no campo, pois estes produtos são a alternativa mais acessível para o aumento da produtividade agrícola.

A utilização intensiva de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças das lavouras ocorreu após o fim das guerras mundiais, pois foi o momento que as indústrias químicas encontraram na agricultura um novo mercado promissor para os seus produtos. O consumo de agrotóxicos vem crescendo a cada ano mundialmente. Entre os anos de 2001 e 2008 a venda de agrotóxicos no Brasil saltou de pouco mais de US\$ 2 bilhões para US\$ 7 bilhões, tendo sido aplicada 986,5 mil toneladas de defensivos agrícolas, conferindo ao país a posição de maior

consumidor mundial de agentes químicos na agricultura (SINDIVEG, 2009; ANDEF, 2009). O Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para Defesa Vegetal (SINDIVEG) estimou que para o ano de 2014 este valor chegaria a US\$ 13 bilhões (SINDIVEG, 2013).

Agrotóxicos, pesticidas, produtos fitossanitários, defensivos agrícolas são termos designados a um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas (FUNDACENTRO, 1998). De acordo com a Lei Federal nº 7.802, de 11/7/1989: Agrotóxicos e afins são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também em ambientes urbano, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989). Estes produtos são classificados de acordo com os organismos-alvos: acaricidas (controle de ácaros), desfolhantes (controle de folhas indesejadas), fumigantes (controle de bactérias do solo), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (controle de plantas invasoras), inseticidas (controle de insetos), nematicidas (controle de nematoides) e rodenticidas ou raticidas (controle de roedores/ ratos) (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Segundo Pereira (2013), o controle de pragas e de doenças que acometem as plantações pode ser realizado por vários métodos: o método químico, o qual é responsável por realizar o tratamento químico de plantas; o controle biológico que consiste na utilização de organismos que atuam como inimigos naturais (predador, parasitoide ou patógeno) daqueles considerados pragas das lavouras; o melhoramento genético de plantas, desenvolvimento de vegetal geneticamente modificado ou transgênico, resistente a uma determinada praga ou doença; os métodos mecânicos, físicos ou culturais, que utilizam os tratamentos térmicos (calor ou frio), irradiações de sementes, capina de ervas daninhas, podas fitossanitárias, consorciação ou intercalação de cultivos, barreiras vegetais, sistemas agroflorestais ou agrossilvipastoris, rotação de culturas e a incineração dos resíduos após a colheita; e o manejo Integrado de pragas e doenças que visa à integração de vários métodos em conjunto, sendo considerado como uma estratégia que visa à otimização econômica do controle de doenças por meio de uso compatível de

diversas táticas, de modo a manter a redução da produção abaixo do limiar de dano econômico, sem prejudicar os seres vivos e o ambiente.

Um dos métodos de controle utilizado na proteção das plantas contra o ataque fúngico na agricultura ocorre através da aplicação de fungicidas, o qual é um produto acessível e apresenta largo espectro de ação no controle de diversas doenças causada por fitopatógenos. Atualmente o termo fungicida apresenta um sentido amplo de utilização, pois abrange todos os compostos químicos empregados no controle de doenças causadas por fungos. Alguns fungicidas não eliminam por completo o fungo, mas interferem em processos específicos da infecção do fungo e são classificados como fungistáticos; os fungicidas que apresentam capacidade de inibição ou previnem a produção de esporos são conhecidos como antiesporulantes (GHINI; KIMATI, 2000; ZAMBOLIM et al., 2008).

Os fungicidas podem ser classificados conforme o modo de ação e mecanismo bioquímico de ação, e também pelo potencial de periculosidade ambiental e toxicológica em função dos efeitos à saúde (GHINI; KIMATI, 2000; ZAMBOLIM et al., 2008; GHINI, 2011).

Classificados de acordo com o seu modo de ação: protetores (ação residual), contatos (ação erradicante), sistêmicos (ação sistêmica e erradicante), penetrantes (ação de profundidade), mesostêmicos (ação de superfície e translaminar) e indutores sistêmicos de resistência.

A classificação dos mecanismos bioquímicos de ação está relacionada ao grupo químico do princípio ativo do produto, conforme demonstra a Tabela 1 (FONTE TABELA)

Tabela 1 - Classificação dos mecanismos bioquímicos de ação e o seu grupo químico

Mecanismos Bioquímicos de Ação	Grupo Químico
Interferência generalizada das funções celulares	Enxofre, Cobre, Ftalimida, Nitrila, Guanidina, Sulfamidas e Quinona
Interrupção das funções da membrana celular: inibição da biossíntese de esteróis	Piperazina, Piridinas, Pirimidinas, Imidazole, Triazol e Morfolina
Síntese de lipídios e membrana celular	Dicarboximida, fosforotioato de arila, Cloroaromático, Carbamato
Síntese de ácidos nucleicos	Fenilamidas, Acetamida
Glucanas e síntese de parede celular	Ácido cinâmico, Amidacarbamato de aminoácido
Inibição da mitose e divisão celular	Benzimidazol, Tiofanato, Benzamida e Fenilureia
Efeitos sobre as funções da parede celular	Quinolinona, Amida-Ciclopropano-carboxamida
Inibição da síntese de proteínas e aminoácidos	Anilinopirimidina, antibióticos.
Inibição da respiração na mitocôndria	Anilida, Carboxanilida, Estrobilurinas, Oxazolidinadiona, Imidazolina, Cianoimidazole, Dinitrofenol, Fenilpiridinilamina, Organoestênicos.
Sinais de transdução	Quinolinas, Fenilpirrol.
Mecanismo de ação indefinido	Fosfonato
Fungicidas inibidores da biossíntese de melanina	IBM
Ativador químico de resistência de planta	Benzotiadiazol
Antibióticos antifúngicos – Síntese de proteína no ribossoma	Antibiótico antifúngico

A classificação do potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico é realizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e é baseada em estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos; sendo classificadas em: Classe I - produtos altamente perigosos ao meio ambiente; Classe II - produtos muito perigosos ao meio ambiente; Classe III - produtos perigosos ao meio ambiente e Classe IV - produtos pouco perigosos ao meio ambiente.

Para a classificação toxicológica dos agrotóxicos em função dos efeitos à saúde, decorrentes da exposição humana a esses agentes, são realizados testes pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e sua classificação está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função dos efeitos a saúde

Classe toxicológica	Toxicidade	DL50	Faixa colorida**
Classe toxicológica I	Extremamente tóxico	≤ 5 mg/kg	Vermelha
Classe toxicológica II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg/kg	Amarela
Classe toxicológica III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 mg/kg	Azul
Classe toxicológica IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000 mg/kg	Verde
Classe toxicológica (-)	Muito pouco tóxico	Acima de 5000 mg/kg	-

*Essa classificação obedece a testes realizados em laboratório que tentam estabelecer a dosagem letal (DL) do agrotóxico em 50% dos animais utilizados naquela concentração. ** Cor na embalagem do produto.

Durante anos, diversos resultados satisfatórios foram obtidos com as utilizações de produtos sintéticos, principalmente quando as aplicações eram realizadas de maneira racional. Porém, com intuito de exterminar vários fitopatógenos e prevenir o desenvolvimento de várias doenças nas lavouras, muitos produtores estão fazendo o uso excessivo e ininterrupto de produtos químicos, resultando na seletividade de micro-organismos resistentes. Além disto, muitos fungicidas apresentam toxicidade alta e o seu uso indiscriminado pode causar efeitos indesejáveis sobre outros organismos no ambiente (GHINI; KIMATI, 2000; TALAMINI; STADNIK, 2004; LONDRES, 2011).

O desenvolvimento de resistência de fungos fitopatogênicos a fungicidas sintéticos é de grande preocupação mundial; Além disso, já se sabe que os fungicidas sintéticos são produtos não-biodegradáveis, e, portanto, pode ocorrer o acúmulo de substâncias nocivas no solo, plantas, água e, conseqüentemente, nos seres humanos através da cadeia alimentar (ABRITTON; WATSON, 1992; LONDRES, 2011).

Apesar de várias técnicas de controle aos fitopatógenos já serem utilizadas, ainda não são satisfatórias. Além disso, atualmente busca-se reduzir o uso de produtos químicos, evitar a resistência de micro-organismos patógenos e reduzir o impacto ambiental que os agrotóxicos causam ao meio ambiente e aos seres vivos. Neste sentido, diversas pesquisas estão sendo realizadas na busca de alternativas para o controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos.

A literatura tem demonstrado que as plantas são fontes promissoras de compostos bioativos que podem atuar contra fitopatógenos; e diversas pesquisas com óleos essenciais, extratos brutos, metanólicos e outras frações dos vegetais estão sendo realizadas (SATISH et al., 2007; MDEE et al., 2009; CHEN; COGO et al., 2011; CANTRELL et al., 2005; RENAULT et al., 2003).

Devido à grande diversidade de plantas presentes na flora brasileira e sabendo-se que as espécies da família Solanaceae apresentam compostos com propriedades fungitóxica, é de extrema importância de que estudos mais detalhados sobre metabólitos secundários sejam realizados para contribuir como novas opções, em conjunto com as já existentes para o controle de fungos fitopatógenos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O Brasil apresenta uma imensa biodiversidade, e é considerado como uma fonte de produtos naturais, o que se fez necessário à utilização de métodos de seleção, visando uma determinada abordagem de estudo.

As abordagens mais utilizadas podem ser classificadas em randômica, quimiotaxonômica e etnofarmacológica. Na abordagem randômica, a escolha da planta é realizada sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta no momento da coleta; na abordagem quimiotaxonômica, a seleção da espécie está correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família; já na abordagem etnofarmacológica, a seleção da espécie é realizada de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico, (MACIEL et al., 2002; ALBURQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Em nosso estudo optou-se por realizar a abordagem quimiotaxonômica na escolha da família Solanaceae, por produzir compostos da classe dos glicoalcalóides. Já a escolha das 15 espécies a serem estudadas foi pela abordagem randômica.

4.1 Obtenções de plantas pertencentes à família Solanaceae

4.1.1 Coleta de plantas pertencentes à família Solanaceae

As 12 espécies de plantas da família Solanaceae (*Acnistus arborescens*, *Lycianthes rantonnei*, *Nicandra physaloides*, *Solanum aculeatissimum*, *Solanum americanum*, *Solanum argenteum*, *Solanum cernuum*, *Solanum lycocarpum*, *Solanum paniculatum*, *Solanum pseudocapsicum* e *Physalis peruviana*) foram coletadas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba – SP, e *Cestrum intermedium* no Instituto de Zootecnia (IZ), Nova Odessa - SP.

4.1.2 Cultivo de espécies de solanáceas

As espécies de solanáceas *Capsicum cumari*, *Solanum melongena* e *Solanum gilo* foram cultivadas em casa de vegetação sob condições controladas. A

germinação foi realizada em sementeiras com substrato comercial. As plântulas foram transplantadas para vasos contendo 5 Kg da mistura 1:1 de solo e substrato. Todas as plantas receberam uma solução nutritiva completa segundo Hoagland; Arnon (1950). A coleta de suas folhas foi realizada entre a pós-florescência e pré-frutificação de cada planta específica (cerca de 60 dias aproximadamente). As sementes utilizadas foram as disponíveis comercialmente da marca Feltrin[®].

4.1.3 Identificação botânica das espécies e depósito em herbário

Para a identificação botânica do material, foi confeccionada uma exsicata para cada espécie. A exsicata foi confeccionada em uma cartolina de tamanho padrão (45 x 30 cm), onde parte do vegetal seco foi fixada e uma ficha descritiva com dados (nome científico, descrição da planta, data da coleta e do local, nome do coletor) foi adicionada (OLIVEIRA; AKISSE, 1989). As exsicatas foram registradas pelo grupo do Prof. Dr. Vinícius C. Souza, e incorporadas ao acervo do Herbário da ESALQ, Piracicaba – SP (Tabela 3).

Tabela 3 - Espécies de plantas da família Solanaceae coletadas e cultivadas

Espécie	Gênero	Nome popular	N° voucher
<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schlttdl	<i>Acnistus</i> Schott.	Fruta-do-sabiá	D. S. Gissi 46
<i>Capsicum havana cumari</i>	<i>Capsicum</i> L.	Pimenta-cumari	Feltrin Ref0953
<i>Cestrum intermedium</i> Sendtn.	<i>Cestrum</i> L.	Mata-boi	-*
<i>Lycianthes rantonnei</i>	<i>Lycianthes</i> (Dunal) Hassl.	-	-*
<i>Nicandra physaloides</i> (L.) Gaertn.	<i>Nicandra</i> Adans.	Joá-de-capote	D.S. Gissi 36
<i>Physalis peruviana</i> L.	<i>Physalis</i> L.	Uchuva	-*
<i>Solanum aculeatissimum</i>	<i>Solanum</i> L.	Arrebenta-cavalo	D. S. Gissi 40
<i>Solanum americanum</i>	<i>Solanum</i> L.	Maria-pretinha	-*
<i>Solanum argenteum</i>	<i>Solanum</i> L.	Solanum-prata	V. C. Souza 34001
<i>Solanum cernuum</i> Vell.	<i>Solanum</i> L.	Panacéia	D. S. Gissi 38
<i>Solanum gilo</i>	<i>Solanum</i> L.	Jiló	Feltrin Ref. 0761
<i>Solanum lycocarpum</i>	<i>Solanum</i> L.	Lobeira	-*
<i>Solanum melongena</i>	<i>Solanum</i> L.	Berinjela	Feltrin Ref. 0030
<i>Solanum paniculatum</i>	<i>Solanum</i> L.	Jurubeba	D. S. Gissi 35
<i>Solanum pseudocapsicum</i> L..	<i>Solanum</i> L.	Laranjinha-do-Mato	-*

Plantas identificadas – aguardando liberação do n° voucher.

4.2 Descrição geral das técnicas cromatográficas utilizadas para obtenção das frações semipurificadas

4.2.1 Obtenção dos extratos brutos das folhas

As folhas das plantas foram destacadas, lavadas em água destilada e secas em estufa com circulação forçada a 40°C por 72 horas. Após secagem, as folhas foram trituradas em liquidificador até obtenção de um pó de textura fina, que foi devidamente armazenado. Para a obtenção dos extratos brutos foram utilizados o pó

das plantas (2% m/v) em infusão com água Milli-Q[®] previamente aquecida (100°C). Após o resfriamento o precipitado foi descartado e a solução filtrada, denominada de extrato aquoso, foi submetida diretamente a bioensaios *in vitro* e a partições líquido-líquido.

4.2.2 Partição líquido-líquido

Para a extração dos compostos de interesse, foram realizadas partições líquido-líquido com os extratos aquosos e os solventes orgânicos: n-butanol, acetato de etila e diclorometano (aproximadamente 500 mL, sendo repetido por 3 vezes) para obtenção de 2 frações: a aquosa e a orgânica. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, pesadas, identificadas e armazenadas sob refrigeração.

4.2.3 Cromatografia em coluna pré-empacotada de extração fase sólida (tipo Sep-Pak)

A separação dos compostos bioativos foi realizada por cromatografia em coluna pré-empacota do tipo Sep-Pak (2g, 5g ou 10g) da marca Phenomenex Strata[®]. A fase estacionária foi selecionada dependendo das características das amostras, podendo ser de sílica-gel ou sílica-gel derivatizada com o grupo octadecilsilano. A fase móvel utilizada foi um gradiente com solvente de grau analítico e água ultrapura Milli-Q[®].

4.2.4 Cromatografia em coluna de separação por permeação em gel

Nesta cromatografia foi utilizada uma coluna de vidro com as dimensões 1,70 m de comprimento por 1,50 cm de diâmetro interno, como fase estacionária foi utilizada o gel Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech[®]). A eluição foi feita de modo isocrático com metanol grau PA.

4.2.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para monitoramento das separações cromatográficas e análises químicas qualitativas, foi realizada a Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Foram

utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 (20 x 20 cm), sobre poliéster com indicador ultravioleta (Macherey- Nagel®).

As frações obtidas durante as etapas cromatográficas foram aplicadas nas cromatofolhas, e eluídas em um sistema de solventes (específico e otimizado 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 foram reveladas borrifando-se os reagentes Dragendorff e ácido fosfomolibdico (PMA).

Para o reagente ácido fosfomolibdico (indicador de esteróis e derivados de lipídios) foram adicionados 5 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de etanol, o qual foi borrifado à placa de CCD e posteriormente aquecido a 120°C por 5 minutos em estufa de chapa aquecedora.

Para o reagente Dragendorff (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 (compondo a solução A). Separadamente adicionaram-se 40 mL de água e 8 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água (compondo a solução B). As duas soluções foram misturadas na proporção de 1A:1B. Posteriormente borrifou-se à placa de CCD e aguardou-se a secagem natural.

4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de UV

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Agilent® HP 1100 (series UV/Vis) com bomba quaternária e detector de UV com comprimento de onda múltiplo (MWD).

A coluna utilizada foi a pré-empacotada com fase estacionária de sílica derivatizada com grupos octodecilsilano (C₁₈) da Agilent® Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4,6 x 250 mm - 5 µm), com fluxo de 1 mL min⁻¹.

4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com EM/ESI

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent® 1200) equipado com bombas binárias e injetor automático, acoplado ao

espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Agilent® 6410). A fonte de ionização foi EletroSpray (ESI) com inserção direta em modo positivo, a voltagem do cone foi de 50 V. A energia de colisão utilizada foi de 60 eV. A varredura dos íons foi de 100 a 1.700 Da. Controlado pelo programa Agilent MassHunter. As análises foram realizadas no Laboratório de Ecotoxicologia, do Prof. Dr. Valdemar Tornisielo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba – SP.

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE-UV-ELSD-MS

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplada a detectores de ultravioleta de varredura em detector de arranjo de diodos, espalhamento dinâmico de luz e espectrometria de massas. O cromatógrafo utilizado foi da marca Waters®, modelo Alliance 2695, com duas bombas modelo Pump 600, um degaseificador Degasser em linha, um detector espectrofotométrico UV-visível com detector de fotodiodos ("Photodiode Array Detector"), detector de espalhamento de luz modelo Waters 2424 ("Evaporative light scattering detector" – ELSD) e um detector de massas Micromass ZQ2000 com uma interface de EletroSpray. Todos gerenciados por um sistema MassLynx.

A coluna utilizada foi a pré-empacotada com fase estacionária de sílica derivatizada com grupos octodecilsilano (C₁₈) da Waters® XTerra RP18 (4,6 x 250 mm - 5 µm) ou Waters® XTerra MSC18 (2,1 x 50 mm - 3,5µm), com fluxo de 0,5 mL min⁻¹. As amostras foram diluídas em metanol na concentração de 1 mg ml⁻¹ e destas foram injetados 10 µl para análise. A varredura do espectrômetro de massas compreendeu íons de m/z (massa sobre carga) 150 à m/z 1500, a energia de ionização utilizada foi de 30 eV. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais, do Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), São Carlos – SP.

4.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência MS/MS

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, composto por bombas binárias (LC-20AD), injetor automático SIL-20A; detectores de arranjo de diodos (SPD-20A), controladores CB-20A, acoplado a um espectrômetro de massas ion trap (MS/MS), Bruker Daltonics Esquire 3000 plus. As

condições utilizadas foram: gás de nebulização: nitrogênio 27,0 psi, com fluxo de 7,0 L min⁻¹, temperatura de secagem de 320° C, voltagem do capilar: 4500 V.

A coluna utilizada foi a pré-empacotada com fase estacionária de sílica derivatizada com grupos octodecilsilano (C₁₈) da Phenomenex Gemini C-18 (4,6 x 250 mm – 5µm), com fluxo 1,0 mL min⁻¹. As amostras foram ressuspendidas em uma mistura de metanol:água:ácido fórmico (50:50:0,1%), e a varredura dos íons foi de 100 a 1.200 Da. As análises foram realizadas na Central Analítica Instituto de Química (CAIQ/USP), São Paulo - SP.

4.4 Técnica de Espectrometria de massas por MALDI -TOF

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex III (Bruker Daltonics®) equipado com laser smartbeam II, 1 KHz (335 nm) em faixa de leitura de 2 – 20 KDa onde cada spot da placa foi lido em modo randômico, gerando 36 espectros por amostra.

As amostras foram aplicadas na placa de aço MTP384 (Bruker Daltonics®) e em seguida foram sobrepostas por 1,5 µL de matriz (20 mg mL⁻¹ de ácido α-ciano-4-hidroxiciâmico (CHCA) em solução de acetonitrila: 2% / ácido trifluoracético aquoso (1:1)). Cada simplicata foi aplicada em 6 “spots”, obtendo um total de 36 pontos de aplicações por amostra.

Os espectros gerados foram analisados e processados pelo programa FLEX-Analysis 3.3, (Bruker Daltonics®) o qual realiza a comparação de múltiplos espectros de uma amostra. Em seguida, os espectros foram analisados no programa MALDI Biotyper software 3.1 e pré processados usando algoritmos padrões para subtração, alisamento e normalização da linha de base. As análises por MS-MALDI-TOF foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) sob responsabilidade do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e do Dr. Douglas Ferreira.

4.5 Solventes

Os solventes utilizados nas partições líquido-líquido, CCD e cromatografia em coluna foram todos de grau analítico (Synth® e Chemco®).

Para as cromatografias em CLAE e MALDI-TOF, foram utilizados solventes com alto grau de pureza (J.T.Baker® e PANREAC®).

Foi utilizada água ultrapura em sistema Milli-Q®, em todas as etapas do presente estudo.

4.6 Protocolos dos ensaios biológicos *in vitro*

4.6.1 Fitopatógenos avaliados nos ensaios biológicos *in vitro*

A seleção dos fitopatógenos para este estudo, também foi realizada pela abordagem randômica, levando em consideração os fungos que causam prejuízos nas lavouras e na economia brasileira ((MACIEL et al., 2002; ALBURQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Sendo assim, para os ensaios biológicos *in vitro* com os extratos brutos das plantas foram avaliadas 6 espécies de fitopatógenos, as quais estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Fitopatógenos avaliados nos ensaios biológicos *in vitro*

Fitopatógenos	Doença	Hospedeiro
<i>Colletotrichum acutatum</i> (Pess07)	Antracnose	Pêssego
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Col49)	Antracnose	Pimentão
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Antracnose	Feijão
<i>Fusarium solani</i>	Podridão-vermelha-da-raiz	Soja
<i>Moniliophthora Perniciosa</i> (FA553)	Vassoura-de-bruxa	Cacaueiro
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Podridão-das-raízes	Abacate

Os fitopatógenos *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* foram cedidos pelo Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Jr – ESALQ/USP, Piracicaba - SP.

Os fitopatógenos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora cinnamomi* foram cedidos pela Dra. Liliane de Diana Teixeira - Clínica Fitopatológica Prof. Hiroshi Kimati - ESALQ/USP, Piracicaba - SP.

O fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (FA553 – fase saprofítica) foi cedido pelo Professor Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira - CENA/USP, Piracicaba – SP.

4.6.2 Preservação e armazenamento dos fitopatógenos

As preservações dos fitopatógenos foram realizadas segundo o Método CASTELLANI (1939). Discos de 0,7cm contendo o fungo, retirados da borda da colônia, foram transferidos para frascos do tipo penicilina contendo 10 mL de água Milli-Q esterilizada. Em seguida os frascos foram tampados com rolhas de borrachas, lacrados e foram armazenados à temperatura ambiente.

O inóculo para todos os experimentos biológicos consistiu de um disco de 0,7cm contendo o fungo, retirado da borda de crescimento da colônia (7 dias). As avaliações dos experimentos foram realizadas após o crescimento total dos fitopatógenos em placas de Petri, que ocorria após 15 dias (para *M. perniciosa*) e 7 dias (para os demais fitopatógenos) em câmara incubadora do tipo B.O.D. a 25°C ± 2°C com fotoperíodo de 12 horas.

4.6.3 Ensaio biológico *in vitro* com os extratos brutos

Para a realização dos ensaios biológicos *in vitro* foi otimizada a concentração dos extratos a ser utilizada. Na literatura a maioria dos trabalhos com extratos brutos de plantas para controle de fitopatógenos utilizam concentrações acima de 10% (m/v) (ALMEIDA et al., 2009; CAMATTI-SARTORI et al., 2011; SILVA et al., 2012; VENTUROSIO et al., 2011; ZAKER, 2014). Na busca de extratos de plantas altamente promissores, decidiu-se utilizar uma concentração de 2% (m/v), ou seja, uma concentração menor do que as geralmente observadas na literatura.

A avaliação dos extratos brutos foi realizada pelo método de difusão em ágar, que é também chamado de difusão em placas. É um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólida e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (BARRY; THORNSBERRY, 1991; PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2008).

Os extratos brutos das folhas das solanáceas, na concentração de 2% (m/v) foram incorporados aos meios de cultura MEA (extrato de malte 20%, peptona 1%, glicose 20% e ágar 20%, com ajuste de pH 7,0 - 7,5) para *M. perniciosa* e BDA (batata 20%, dextrose 2% e ágar 2%, com ajuste de pH 7,0 – 7,5) para os demais fitopatógenos e foram esterilizados através de autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Em seguida foram vertidos (10 mL) em placas de Petri (60 x 15 mm). Após a solidificação do meio de cultura, foi disposto sobre este um disco de micélio (0,7 mm) dos fitopatógenos e as placas de Petri foram fechadas e mantidas em câmara incubadora do tipo B.O.D. a 25°C $\pm$ 2°C com fotoperíodo de 12 horas durante 15 dias (para *M. perniciosa*) e 7 dias (para os demais fitopatógenos). Como controle dos ensaios biológicos *in vitro* utilizou-se apenas os meios de culturas (MEA e BDA) com os inóculos dos fitopatógenos. Todos os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados em triplicata. Após o período de incubação, foi realizada a avaliação do crescimento micelial dos fitopatógenos (descritos nos itens 4.7.1 e 4.7.2).

4.6.4 Ensaio biológico *in vitro* com as frações semipurificadas

Para a verificação da presença de compostos bioativos nas frações semipurificadas foi utilizado o teste de difusão em disco. Este método qualitativo consiste na aplicação de frações com concentrações conhecidas em discos de papel filtro estéril, que são dispostos sobre o meio de cultura solidificado em placas de Petri. Em seguida, transferiu-se para o centro da placa de Petri um disco de micélio (0,7 mm) dos fitopatógenos. As placas foram fechadas e mantidas em câmara incubadora do tipo B.O.D. a 25°C $\pm$ 2°C com fotoperíodo de 12 horas durante 7 e 15 dias (dependendo do fitopatógeno). Como controle dos ensaios biológicos *in vitro* utilizou-se apenas disco de papel filtro estéril incorporado com o solvente metanol sobre o meio de cultura solidificado com o inóculo do fitopatógeno.

Após o período de incubação, o crescimento micelial dos fitopatógenos foi avaliado quanto à atividade inibitória de desenvolvimento de micro-organismos (descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2) (BARRY; THORNSBERRY, 1991; RABANAL et al., 2002).

4.6.5 Ensaio biológico *in vitro* com fungicidas comerciais

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos, foi realizado um ensaio biológico *in vitro* com fungicidas comerciais de amplo espectro como controle positivo. A escolha dos fungicidas foi realizada conforme a composição dos princípios ativos, que apresentam diferentes mecanismos bioquímicos de ação. Sendo, assim neste estudo foram utilizados o fungicida Comet[®] (princípio ativo piraclostrobina) e o fungicida misto Fox[®] (princípios ativos trifloxistrobina + protioconazol) (Figura 4).

Figura 4- Estrutura química dos compostos: (A) piraclostrobina, (B) trifloxistrobina e (C) protioconazol

O ingrediente ativo piraclostrobina pertence ao grupo químico das estrobilurinas. Seu mecanismo bioquímico de ação está relacionado com a inibição da respiração mitocondrial dos fungos, impedindo a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c do complexo III (citocromo bc1 – ubiquinol oxidase no sítio Qo), apresentando ação protetora e do tipo sistêmico.

O ingrediente ativo trifloxistrobina, também pertence ao grupo químico das estrobilurinas (mecanismo bioquímico de ação, já descrito), já o protioconazol pertence ao grupo químico dos triazolintiona (neste grupo, o mecanismo bioquímico de ação está relacionado com a inibição da biossíntese de ergosterol, importante componente da membrana celular dos fungos; são especificamente inibidores da

demetilação do C14), podem conferir ação protetora e curativa (GHINI; KIMATI, 2000; ZAMBOLIM et al., 2008; AGROFIT, 2014).

Os fungicidas foram diluídos em água ultrapura, para a obtenção de soluções estoques na concentração de 1000 mg L^{-1} do ingrediente ativo. Após a autoclavagem do meio de cultura, esperou-se a regressão da temperatura a $45 \pm 5^\circ\text{C}$ e foram adicionados os fungicidas, onde em cada placa de Petri (10 mL) ficou com as concentrações finais de 0,1 e 1,0 e 10 mg L^{-1} do ingrediente ativo. Após a solidificação do meio de cultura, foi disposto sobre esta um inóculo do fitopatógeno. Como controle dos ensaios biológicos *in vitro* utilizou-se apenas os meios de culturas (MEA e BDA) solidificados com o inóculo do fitopatógeno. Todos os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados em triplicata. As placas de Petri foram mantidas em câmara incubadora do tipo B.O.D. a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas durante 7 e 15 dias (dependendo do fitopatógeno). Após o período de incubação, o crescimento micelial dos fitopatógenos foram avaliados (descrito no item 4.7.1 e 4.7.2).

O valor do percentual de inibição foi correlacionado com o logaritmo da concentração do fungicida, com isto foi obtido o valor aproximado da dose efetiva mediana (ED_{50}), que é a concentração do produto químico necessário para inibir em 50% o crescimento micelial do fungo. Com os cálculos da ED_{50} , os fungicidas foram classificados em três categorias de eficiência, segundo a escala de Kataria e Grover (1978), onde,

$ED_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$: altamente eficiente; $ED_{50} = 1-10 \text{ mg L}^{-1}$: moderadamente eficiente; $ED_{50} = 10-50 \text{ mg L}^{-1}$: pouco eficiente e $ED_{50} > 50 \text{ mg L}^{-1}$: ineficiente.

4.7 Análises

4.7.1 Análises do percentual de inibição do crescimento micelial (PIC)

As medidas do diâmetro da área de crescimento do micélio fúngico foram realizadas em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas) com instrumento de precisão (paquímetro), e comparados com o controle contendo apenas meio de cultura e o fitopatógeno.

O percentual de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos dos tratamentos em relação ao controle foi realizado através da fórmula:

$$PIC = \frac{(\text{Diâmetro da test} - \text{Diâmetro do trat}) \times 100}{\text{Diâmetro da test}}$$

Onde:

PIC = Porcentagem de Inibição do Crescimento

Diâmetro do test = Diâmetro da testemunha

Diâmetro do trat = Diâmetro do tratamento

4.7.2 Análises estatísticas

Os ensaios biológicos foram realizados em delineamento inteiramente aleatorizado, com três repetições (sendo cada placa uma unidade experimental).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo esta realizada no programa ASSISTAT[®] versão 7.6 beta (SILVA, 2011).

Referências

ABRITTON, D.L.; WATSON, R.T. Methyl bromide interim scientific assessment. Montreal Protocol Assessment Supplementary Report. **The United Nations Environmental Program (UNEP)**, New York, v. 30, p. 1629-1626, 1992.

BALADRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLINGER, W.H. Natural plant: chemicals sources of industrial and medicinal materials. **Science**, New York, v. 228, p.1154-1160, 1985.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility Tests: diffusion test procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. (Eds). Manual of clinical microbiology. Washington: American Society for Microbiology, v. 5, 1991. p. 1117-1125.

BAUP, M. Extrait d'une lettre sur plusieurs nouvelles substances. **Annales Chimie et de physique**, Paris, v.31, p.108–109, 1826.

BRASIL. **Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 30 ago. 2014.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A. FONTES E APLICAÇÕES DE TANINOS E TANASES EM ALIMENTOS. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BLANKEMEYER, J.T.; McWILLIAMS, M.L.; RAYBUM, J.R.; WEISSENBREG, M.; FRIEDMAN, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food chemical toxicology**, England, v. 36, p. 383-389, 1998.

BHATTACHARJEE, I.; GHOSH, A.; CHANDRA, G. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cestrum diurnum* (L.) (Solanales: Solanaceae). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, p. 371-374, 2005.

BRUSSOTTI, B.; CESARIA, I.; DENTAMAROA, A.; CACCIALANZAA, G.; MASSOLINIA, G. Review: Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 87, 218– 228, 2014.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 100, p. 131-134, 2005.

CANTRELL, C.L.; SCHRADER, K.K.; MAMONOV, L.K.; SITPAEVA, G.T.; KUSTOVA, T. S.; DUNBAR, C.; WEDGE, D.E. Isolation and identification of antifungal and antialgal alkaloids from *Haplophyllum sieversii*. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.53, p.7741, 2005.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, p. 225, 1939.

CHAM, B.E. Solasodine rhamnosil glycosides specifically bind cancer cell receptors and induce apoptosis and necrosis, treatment for skin cancer and hope for internal cancer. **Research Journal of Biological Science**, Amsterdam, v.2, p. 503-514, 2007.

CHEN, Y.; DAI, G. Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum lagenarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.92, p. 1937–1943, 2012.

COGO, F D.; CORREA, A.; FERNANDES, L.G.; CARVALHO H.P.; CAMPOS, K. A.; Eficiência de extratos vegetais no controle de Cercosporiose em mudas de cafeeiro. Por extenso Revista **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, Paraíba, v.5, n.1, p.31-34, 2011.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B. ; GRUISSEM, W. ; JONEAS, R. Ed. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Biologists, Rockville, 2000. p. 1250–1268.

DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17 p. 4022–4034, 2009.

D'ARCY, W.G. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution. Ed. Hawkes, J.G.; Lester, R.N.; Nee, M.; Eschad, N. London: Royal Botanic Gardens, 1991. p.75-137.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A.A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J. ; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n.4, p. 414–430, 2012.

Di STASI, L.C. **Plantas medicinais**: Arte e ciência. São Paulo:Ed. Unesp, 1995. p.108-119.

DUKE, S.O; DAYAN, F.E; BAERSON, S.R; ROMAGNI, J.G; AGARWAL, A., OLIVA, A. NATURAL PHYTOTOXINS WITH POTENTIAL FOR DEVELOPMENT FOR WEED MANAGEMENT (DAN HESS MEMORIAL LECTURE). International Union of Pure and Applied Chemistry. **Chemistry of Crop Protection**, p.143-154, 2003.

EDWIN, J. E.; EDWIN, S.; SAINI, V.; DEB, L.; GUPTA, V. B.; WATE, S. P.; BUSARII, K.P.; Anti-inflammatory and anthelmintic activities of *Solanum khasianum* Clarke. **Nat. Prod. Res**, London, v. 22,p.269, 2008.

FEARS, R. ;ARO, E.M.; PAIS, M.S.; MEULEN. V. How should we tackle the global risks to plant health. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 19, n. 4 p.206-208, 2014.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, p. 369 – 394, 2006.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, , 2003. 412p.

FLOOD, J. The importance of plant health to food security. **Food Security**, New York, v. 2, p. 215–231, 2010.

FRIEDMAN, M. "Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, p. 8655-8681, 2006.

FRIEDMAN, M.; MCDONALD, G. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v.16, p. 55-132, 1997.

FRIEDMAN, M.; LEE, K.R.; KIM, H.J.; LEE, I.S.; KOZUKUE, N. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 6162-6169, 2005.

FUNDACENTRO. Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos: segurança e saúde no trabalho, n.3 São Paulo: Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Ministério do Trabalho, 1998.

FUKUHARA, K.; SHIMIZU, K.; KUBO, I. Arudonine, an allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. **Phytochemistry**, London, v. 65, n. 9, p. 1283-1286, 2004.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna,:Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GHINI, R. **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. 356p.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, Guildford, v. 46, 412-429, 2014.

GRABLEY, S.; THIERICKE, R. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 101-154, 1999.

GRIFFIN, J.W.; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, London, v. 53, p.623 – 637, 2000.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary**. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. London:Taylor & Francis, 1993. 791p.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Basel:Birkhauser Verlag, 1973. 882p.

HERRERA-SALGADO, Y.; GARDUÑO-RAMÍREZ, M. L.; VÁZQUEZ, L.; RIOS, M. Y.; ALVAREZ, L. Myo-inositol-derived glycolipids with anti-inflammatory activity from *Solanum lanceolatum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, p. 1031 – 1036, 2005.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soils. **California Agricultural Experimental Station**, Berkeley, 1950. 32p.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. SAPONINS. **Chemistry & Pharmacology of Natural Products**, Cambridge, 1995. 549p.

HUNZIKER, A.T. South American Solanaceae: a synoptic survey. In: HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; SKELDING, A.D. **The Biology and Taxonomy of the Solanaceae**. London: Academic Press, 1979. p. 49-85.

HUNZIKER, A.T. Two novelties for the tribe Solaneae (Solanaceae). **Kurtziana**, Córdoba, v. 28, p. 65-68, 2000.

IBAMA. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins**. Brasília: DIQUA/ CGASQ. Brasília: Ibama, 2009. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/manual-de-procedimento-para-registro-de-agrotoxicos/>>. Acesso em: 16 abr. 2013.

IKEDA, T.; TSUMAGARI, H.; NOHARA, T.; Cytotoxic Activity of Steroidal Glycosides from Solanum Plants. **Biological pharmaceutical. bulletin**, Tokyo, v. 26, p.1198, 2003.

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. 10, p. 3217-22, 2007.

KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D. M. Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 5, p. 285-291, 2004.

LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 04 Dez. 2014

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil:** um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190p.

MACHADO, L.H.B. As representações entremeadas no comércio de plantas medicinais em Goiânia/GO: uma reflexão geográfica. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v. 21, p. 159-172, 2009.

MDEE, L.K.; MASOKO, P.; ELOFF, J.N. The activity of extracts of seven common invasive plant species on fungal phytopathogens. **South African Journal of Botany**, Pretória, v.75, p.375–379, 2009.

MALIKA, J.; SHYAMALA, D.C.S.; Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 104, p. 156-163, 2006.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 736p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA. E ABASTECIMENTO (MAPA). **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. 2010. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 19 maio 2013.

ODY, P. **The complete medicinal herbal**. London:Dorling Kindersley, 1993. 192p.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 144, p. 31–43, 2006.

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

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 18, n.2, p. 301-307, 2008.

PEREIRA, L.G.C. CONTROLE FITOSSANITÁRIO: AGROTÓXICOS E OUTROS MÉTODOS. Brasília: Consultoria Legislativa, 2013. 16p.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. **É veneno ou é remédio?** Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. 384p.

PINTO, A.C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, p. 608-615, 1999.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.E.R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 45-61, 2002.

PINTO, F.C.L.; UCHO, D.E.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, F.M.; THEODORO, P.N. E.T.; ESPÍNDOLA, L.S. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 284-288, 2011.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325p.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. Biologia Química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

RABANAL R. M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C.C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 81, p.287-292, 2002.

RENAULT, S.; De LUCCA, A.J.; BOVE, S.; BLAND, J.M.; VIGO, C.B.; SELITREMIKOFF, C.P. CAY-1, a novel antifungal compound from cayenne pepper. **Med. Mycol.**, v.41, p.75, 2003.

RIBAS, P.P.; MATSUMURA, A.T.S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

SATISH, S. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. **Journal of Agricultural Technology**, Tehran, n.3, p.109-119, 2007.

SCHILLING, E.E. Foliar flavonoids of North American *Solanum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 12, p. 53-55, 1984.

SILVA, T.M.S.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M.F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 517 – 522, 2003.

SILVA, F. de A.S. e. ASSISTAT versão 7.6 beta. Grande-PB: Assistência Estatística, Departamento de Engenharia Agrícola do CTRN - Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Campina. Disponível em: <<http://www.assistat.com>>. Acesso em: 15 out. 2014.

SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **Brasil supera EUA no uso de agroquímicos**. 2009. Disponível em <<http://www.sindiveg.org.br/noticia.php?cod=1399>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **Venda de defensivos bate recorde no Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://www.sindiveg.org.br/noticiaonline.php?cod=2143>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **Mercado de defensivos pode chegar a US\$ 13 bi em 2014**. 2014. Disponível em: <<http://www.sindiveg.org.br/noticiaonline.php?cod=2421>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILCA, M.; GIACOMIN, L. 2012. *Solanaceae* In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000225>>. Acesso em: 08 ago. 2012.

STRANGE, R.N.; SCOTT, P.R. PLANT DISEASE: A Threat to Global Food Security. **Annual review of phytopathol**, Palo Alto, v. 43, p. 83–116, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. California: The Benjamin/Cummings Publishing Co 1998. 559p.

TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: Editora UFSC, 2004. , p.143-157.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 235–245, 2004.

VADNERE, G.P.; GAUD, R.S ; SINGHAI, A.K. Evaluation of anti-asthmatic property of *Solanum xanthocarpum* flower extracts. **Pharmacology**, Salerno, v.1, p.513-522, 2008.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 326-337, 2006.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, London, v. 64, p. 3–19, 2003.

ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M.C.; SILVA, A.A.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; JESUS JUNIOR, W.C. **Produtos fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas)**, Viçosa, ed. Viçosa: UFV, 2008. 652p.

ZHAO, N.; WANG, G.; NORRIS, A.; CHEN, X.; CHEN, F. Studying Plant Secondary Metabolism in the Age of Genomics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 32, 369–382, 2013.

5 SELEÇÃO DAS PLANTAS PERTENCENTES À FAMÍLIA SOLANACEAE COM ATIVIDADE FUNGITÓXICA A FITOPATÓGENOS

Resumo

A flora brasileira apresenta grande diversidade de espécies, muitas de aplicação terapêutica e na agricultura. As plantas da família Solanaceae são conhecidas por apresentarem várias espécies que produzem compostos bioativos com diversas aplicações. Os fitopatógenos *Colletotrichum acutatum*, *C. gloesporioides*, *C. lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora perniciosa* e *Phytophthora cinnamomi* são os agentes causais de doenças em diversas espécies de plantas, e são responsáveis por causar grandes perdas na produção, comercialização e exportação de produtos agrícolas. O objetivo deste trabalho foi investigar extratos de plantas da família Solanaceae com potencial fungitóxico sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos. Foi realizado um ensaio biológico *in vitro* com os extratos brutos das folhas de *Acnistus arborescens*, *Cestrum intermedium*, *Lycianthes rantonnei*, *Nicandra physaloides*, *Solanum aculeatissimum*, *Solanum americanum*, *Solanum argenteum*, *Solanum cernuum*, *Solanum lycocarpum*, *Solanum paniculatum*, *Solanum pseudocapsicum* e *Physalis peruviana*, *Capsicum cumari*, *Solanum gilo* e *Solanum melongena*. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos brutos das plantas *A. arborescens*, *C. intermedium*, *L. rantonnei*, *P. peruviana* e *S. americanum* apresentaram as melhores porcentagens de inibição aos fitopatógenos. Os resultados comparativos com os princípios ativos de fungicidas comerciais demonstraram que os extratos brutos das plantas são promissores na inibição desses fitopatógenos. A partir deste estudo foi possível selecionar três extratos de plantas para serem investigadas em um estudo químico mais aprofundado. São elas, *A. arborescens* (100% para *P. cinnamomi*), *S. americanum* (93,39 % para *M. perniciosa*) e *P. peruviana* (100% para *P. cinnamomi*).

Palavras-chaves: Compostos bioativos; Inibição; *Moniliophthora perniciosa*; *Physalis peruviana*

Abstract

The Brazilian flora has a great diversity of species, many therapeutic applications and agriculture. The plants of the Solanaceae family are known to have several bioactive species that produce compounds with multiple applications. The plant pathogens *Colletotrichum acutatum*, *C. gloesporioides*, *C. lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora cinnamomi* and *Moniliophthora perniciosa* are the causative agents of diseases in several species of plants, and are responsible for causing large losses in production, marketing and export of agricultural products. The aim of this study was to investigate Solanaceae plant extracts with potential fungitoxic on the mycelial growth of pathogens. We conducted an *in vitro* bioassay with crude extracts of the leaves of *Acnistus arborescens*, *Cestrum intermedium*, *Lycianthes rantonnei*, *Nicandra physaloides*, *aculeatissimum Solanum*, *Solanum americanum*, *argenteum Solanum*, *Solanum cernuum*, *lycocarpum Solanum*, *Solanum paniculatum*, *Solanum* and *Physalis peruviana pseudocapsicum*, *Capsicum cumari*, *Solanum melongena*

and *Solanum gilo*. The results showed that the crude extracts of the plants *A. arborescens*, *C. intermedium*, *L. rantonnei*, *P. peruviana* and *S. americanum* showed the best percentages of inhibition against pathogens. The comparative results with the active ingredients of commercial fungicides showed that crude extracts of plants are promising in the inhibition of these pathogens. From this study it was possible to select three plant extracts to be investigated in further chemical study. They are, *A. arborescens* (100% for *P. cinnamomi*), *S. americanum* (93,39% for *M. perniciosa*) and *P. peruviana* (100% for *P. cinnamomi*).

Keywords: Bioactive compounds; Inhibition; *Moniliophthora perniciosa*; *Physalis peruviana*

5.1 Introdução

A família Solanaceae é considerada como uma das maiores entre as plantas angiospermas e apresentam grande importância comercial e agrônômica (D'ARCY, 1991; OLMSTEAD, 2013).

Plantas pertencentes à esta família são conhecidas por produzirem uma variedade de metabólitos secundários com as mais diversas classes químicas como os esteroides, alcaloides, heterosídeos, flavonóis, flavonas, tropanos, piridinas, alcalóides esteroidais, vitanolídeos, ecdisteróides, sesquiterpenos, diterpenos e até antraquinonas (HEGNAUER, 1973; HEGNAUER, 1990; HARBORNE; BAXTER, 1993; GRIFFIN; LIN, 2000). Estes compostos geralmente apresentam atividades biológicas (WINK, 2003; EICH, 2008), de interesse para indústria farmacêutica devido as suas atividades antitumoral, anti-inflamatória, antiulcerogênica, citotóxica, e outras (KODORU et.al., 2007; NGUELEFACK et.al., 2008; HERRERA-SALGADO et.al., 2005; PINTO et al., 2011).

Uma das classes de compostos químicos mais encontrados nas espécies de plantas da família Solanaceae, principalmente no gênero *Solanum* (como batatas, tomates etc), são os glicoalcalóides. Estes glicoalcalóides apresentam diversas atividades biológicas de interesse, porém se consumidas em quantidades elevadas podem ser tóxicas. Por exemplo, os glicoalcalóides α -solanina e α -chaconina presente em batatas apresentam toxicidade aos seres humanos, se forem consumidos acima de 200 mg kg^{-1} . Esta toxicidade está relacionada com dois modos de ações no organismo humano: uma sobre a acetilcolinesterase, que afeta o sistema nervoso central; e outra atuando sobre as membranas celulares, causando ruptura das membranas do trato-gastrointestinal (MAGA, 1980; MORRIS, LEE, 1984; SLANINA, 1990). Alguns trabalhos demonstraram que os glicoalcalóides apresentam toxicidade a diversos insetos e micro-organismos (FEWELL, A. M.; RODDICK, 1993; SIMONS, et al., 2006; TINGEY, 1984; CANTELO et al., 1987; DAVIS et al., 2007).

Estes glicoalcalóides (α -chaconina e α -solanina) também foram avaliados quanto sua atividade fungitóxica a fitopatógenos. Sendo que o composto α -chaconina ($100\mu\text{M}$) inibiu a germinação dos esporos de *Alternaria brassicicola* (100%) e *Phoma medicaginis* (46,4%), e quando avaliados em conjunto ($50\mu\text{M}$ de cada composto) a porcentagem de inibição de *A. brassicicola* se manteve igual

enquanto que para *P. medicaginis* a inibição foi de 99,3%, o que demonstra o sinergismo entre os compostos (FEWELL; RODDICK, 1997).

Assim, podemos sugerir que os metabólitos secundários bioativos podem ser utilizados no controle fitopatógenos ou na proteção de culturas, se tornando mais um método de proteção/controle, e espera-se que estes apresentem um menor impacto ao ambiente e seres vivos, em contraste com os fungicidas sintéticos.

Diante deste fato torna-se necessário um estudo pela busca de compostos bioativos com atividade antifúngica.

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de 15 extratos de plantas pertencentes à família Solanaceae contra 6 fungos fitopatógenos de relevância na agricultura.

5.2 Material e Métodos

Foram selecionadas 15 espécies de plantas da família Solanaceae. Destas 12 foram coletadas: *Acnistus arborescens*, *Cestrum intermedium*, *Lycianthes rantonnei*, *Nicandra physaloides*, *Solanum aculeatissimum*, *Solanum americanum*, *Solanum argenteum*, *Solanum cernuum*, *Solanum lycocarpum*, *Solanum paniculatum*, *Solanum pseudocapsicum* e *Physalis peruviana*; outras 3 foram cultivadas em casa de vegetação: *Capsicum cumari*, *Solanum gilo* e *Solanum melongena*.

O extrato bruto foi obtido conforme descrito no capítulo 4, item 4.2.1. Os ensaios dos extratos das 15 plantas contra os 6 fitopatógenos foram realizados conforme descrito no capítulo 4, item 4.6.3 e as avaliações foram realizadas pelas medições do crescimento micelial (descrito no capítulo 4, itens 4.7.1 e 4.7.2).

A seguir está exposto o fluxograma (Figura 4) resumizando os procedimentos realizados.

Figura 4 - Fluxograma dos processos realizados com as 15 espécies de solanáceas

5.3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no ensaio biológico *in vitro* dos extratos brutos das plantas contra os fitopatógenos podem ser observados na Tabela 5, a seguir.

Tabela 5 - Porcentagem da inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos avaliados com o extrato bruto (2% m/v) de 15 espécies de plantas da família Solanaceae

Extratos brutos de solanáceas	Fitopatógenos					
	<i>C. acutatum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>F. solani</i>	<i>M. perniciosa</i>	<i>P. cinnamomi</i>
<i>A. arborescens</i>	0	0	0	0	11,16% $\pm 0,31^h$	100% ^a
<i>C. cumari</i>	4,16% $\pm 0,05^{f,g}$	27,37% $\pm 0,01^e$	0	0	26,78% $\pm 0,01^f$	0
<i>C. intermedium</i>	51% $\pm 0,07^a$	46,50% $\pm 0,12^a$	0	0	100% ^a	0
<i>L. rantonnei</i>	41,66% $\pm 0,31^c$	38,66% $\pm 0,28^b$	0	0	82,50% $\pm 0,79^c$	0
<i>N. physaloides</i>	2,72% $\pm 0,65^h$	0	0	0	0	0
<i>P. peruviana</i>	0	0	0	0	0	100% ^a
<i>S. aculeatissimum</i>	3,18% $\pm 0,04^{g,h}$	0	0	0	0	0
<i>S. americanum</i>	45,83% $\pm 0,21^b$	36,66% $\pm 0,10^c$	0	0	93,30% $\pm 0,37^b$	0
<i>S. argenteum</i>	7,34% $\pm 0,30^e$	13,41% $\pm 0,01^f$	0	0	6,41% $\pm 0,56^i$	0
<i>S. cernuum</i>	5,7% $\pm 0,05^{e,f}$	0	0	0	0	0
<i>S. gilo</i>	0	0	0	0	36,12% $\pm 0,04^e$	0
<i>S. lycocarpum</i>	0	7,66% $\pm 0,50^g$	0	0	0	0
<i>S. melongena</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S. paniculatum</i>	17,24% $\pm 0,04^d$	26,12% $\pm 0,02^d$	0	0	21,11% $\pm 0,90^g$	0
<i>S. pseudocapsicum</i>	7,20% $\pm 0,10^e$	3,30% $\pm 0,75^h$	0	0	44,68 $\pm 0,03^d$	0
Controle	0 ⁱ	0 ⁱ	0	0	0 ^j	0 ^b

Médias seguidas por letras iguais, nas mesmas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Como controles positivos foram avaliados os crescimentos micelial dos fitopatógenos em meios de culturas (BDA e MEA) sem a incorporação dos extratos. Ensaio biológico *in vitro* realizados em triplicata.

A partir destes resultados, foi possível verificar que a concentração utilizada foi eficiente para demonstrar o potencial inibitório dos compostos ativos presentes nos extratos aos fitopatógenos.

O resultado do ensaio biológico demonstrou que dos 15 extratos brutos avaliados, 14 apresentaram composto(s) bioativo(s) que alteram o crescimento micelial ao menos de um dos fitopatógenos estudados.

Somente o extrato de *Solanum melongena* (berinjela) não apresentou atividade inibitória para nenhum dos fitopatógenos avaliados.

Para o fitopatógeno *C. acutatum*, pode-se observar que 5 extratos não apresentaram atividade; 6 extratos causaram inibição abaixo de 10%; 3 extratos apresentaram inibição entre 10 e 50%, e apenas 1 extrato (*C. intermedium*) apresentou inibição superior a 50%, o qual foi considerado como o mais eficiente para o controle do fungo. No trabalho de Almeida et al. (2009) foram avaliados os extratos brutos de plantas que apresentam propriedades medicinais como a solanácea *Nicotiana tabacum*, e as aromáticas *Ruta graveolens* (arruda) e *Allium sativum* (alho) na concentração de 20% (m/v) sobre a inibição do crescimento micelial *in vitro* do fitopatógeno *C. acutatum*. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato da solanácea *Nicotiana tabacum* foi o mais promissor, controlando o desenvolvimento micelial de *C. acutatum* em 79,16 %, enquanto os extratos de arruda e alho causaram inibições de 66,6% e 62,5% respectivamente.

Para *C. gloeosporioides*, o ensaio biológico demonstrou que os extratos brutos de 7 plantas não apresentaram atividade, 2 extratos apresentaram inibições inferiores a 10%, enquanto outros 5 extratos apresentaram inibições com percentual variando entre 10 e 40%, e somente o extrato de *C. intermedium* apresentou inibição superior a 40%, sendo considerado o mais ativo para este fitopatógeno. Silva et al. (2012) avaliaram a inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* com os extratos brutos de diferentes espécies vegetais incorporados em meio de cultura (20% m/v). Os resultados mais promissores foram obtidos com os extratos de cravo-da-índia (100%) e alho (86,90%), já o extrato dos frutos da solanácea *Capsicum frutescens* (pimenta-malagueta) demonstrou apresentar propriedades fungitóxica sobre *C. gloeosporioides* inibindo o crescimento micelial em 32,16%.

Apesar de os resultados de inibições, obtidos por Almeida et al. (2009) e Silva et al. (2012), contra *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* terem sido superiores em

relação ao nosso trabalho, vale ressaltar que a concentração dos extratos utilizados em ambos trabalhos foram dez vezes maiores do que a do trabalho presente.

No ensaio biológico para o fitopatógeno *M. pernicioso*, 6 extratos de plantas não inibiram o seu crescimento micelial, somente 1 extrato apresentou inibição inferior a 10%, 4 extratos apresentaram inibições entre 10 e 40% e 4 extratos demonstraram inibições superiores a 40%. Entre os resultados obtidos, os extratos de *S. americanum* (93,30%) e *C. intermedium* (100%) foram considerados os mais promissores na inibição do crescimento micelial deste fitopatógeno.

A presença de compostos bioativos em espécies de plantas da família Solanaceae contra o fitopatógeno *M. pernicioso* já foi demonstrada por outros pesquisadores, como no trabalho de Silva e Bastos (2007) que avaliaram o crescimento micelial de *M. pernicioso* com diferentes concentrações do óleo essencial extraído de dez espécies de *Piper* spp. incorporados em meio de cultura e demonstraram que o crescimento micelial de *M. pernicioso* foi inibido em 100% a partir da concentração de $0,75 \mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo de *P. callosum* e na concentração de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo de *P. marginatum*. No entanto, neste trabalho o composto químico bioativo ao fitopatógeno não foi isolado e nem identificado. Já no trabalho de Gomes et al. (2014), o extrato bruto das folhas de *S. lycopersicum* a 8% (m/v) incorporado em meio de cultura, foi suficiente para inibir o crescimento micelial do fitopatógeno *M. pernicioso* em 100%, sendo que a bioatividade do extrato estava relacionada com a presença do metabólito secundário α -tomatina.

Os resultados do ensaio biológico obtidos para o fitopatógeno *P. cinnamomi* demonstrou que dos 15 extratos brutos avaliados, 13 não apresentaram nenhuma atividade ao fungo, já os extratos de *A. arborescens* e *P. peruviana* inibiram o crescimento micelial de *P. cinnamomi* em 100%. Segundo Tomassini et al. (2000) e Roumy et al. (2010) plantas pertencentes aos gêneros *Physalis* e *Acnistus* apresentam diversos constituintes químicos, como os flavonoides, alcaloides, terpenos e outros e muitos destes compostos podem apresentar atividade a micro-organismos.

Os fitopatógenos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani* não diferiram de seus respectivos controles, pois não apresentaram sensibilidade a nenhum dos extratos das plantas da família Solanaceae avaliados. A pesquisa de Khan; Nasreen (2010) demonstrou que os extratos metanólicos de plantas típicas da Índia, na concentração de 10% m/v apresentam compostos bioativos a *C.*

lindemuthianum, sendo que as maiores inibições do crescimento micelial do fitopatógeno foram obtidos com os extratos de *Lawsonia inermis* (81,81%), *Withania somnifera* (69,69%) e as solanáceas *Datura metel* (69,69%) e *Datura stramonium* (42,42%). Já no trabalho realizado por Nino et al. (2006), ao avaliarem a bioatividade de 11 espécies de plantas da família Solanaceae típicas da Colômbia sobre o fitopatógeno *Fusarium solani*, demonstraram que somente os extratos metanólicos de *S. lepidotum* e *Lycianthes synanthera* inibiram o crescimento do fitopatógeno. Diante desta abordagem, estes dados sugerem que os compostos presentes nos extratos das plantas analisadas neste trabalho, não foram eficientes para inibir o crescimento micelial dos fitopatógenos *C. lindemuthianum* e *F. solani*.

A partir destes resultados pode-se afirmar que os extratos das plantas que causaram as maiores porcentagens de inibição aos fitopatógenos avaliados neste estudo foram: *A. arborescens* e *P. peruviana* (ambos 100% para *P. cinnamomi*), *C. intermedium*, *S. americanum* e *L. rantonnei* (100%, 93,30% e 82,50% respectivamente sobre *M. perniciosa*).

Já os resultados do experimento para obter os valores da PIC dos fitopatógenos aos dois fungicidas avaliados e a ED₅₀ podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Porcentagem da inibição e a ED₅₀ do crescimento micelial *in vitro* de seis fitopatógenos, por fungicidas comerciais em diferentes concentrações

Fitopatógenos	Fungicidas							
	Piraclostrobina				Trifloxtrubina +Protioconazol			
	0,1 mgL ⁻¹	1,0 mgL ⁻¹	10,0 mgL ⁻¹	ED ₅₀	0,1 mgL ⁻¹	1,0 mgL ⁻¹	10,0 mgL ⁻¹	ED ₅₀
<i>C. acutatum</i>	56,83 ±0,47 ^d	81,62 ±0,08 ^c	100 ±0,65 ^a	<1	3,03 ±0,07 ^f	28,03 ±0,28 ^e	85,2 ±1,05 ^b	1-10
<i>C. gloeospo.</i>	13 ±0,33 ^e	34,5 ±0,15 ^c	79,6 ±0,90 ^a	1-10	5,17 ±0,20 ^f	19,46 ±0,17 ^d	63,8 ±0,10 ^b	1-10
<i>C. lindemuthi.</i>	0 ^e	9,16 ±0,05 ^d	34,5 ±0,30 ^c	>10	0 ^e	75,0 ±1,50 ^b	100 ±0,85 ^a	<1
<i>F. solani</i>	0 ^d	0 ^d	0 ^d	-	15,17 ±0,15 ^c	36,2 ±2,5 ^b	76,4 ±0,20 ^a	1-10
<i>M. perniciosa</i>	0 ^f	48,14 ±0,11 ^d	92,3 ±0,10 ^b	1-10	22,83 ±0,30 ^e	52,5 ±0,07 ^c	100 ±0,05 ^a	<1
<i>P. cinnamomi</i>	0 ^c	11,5 ±0,20 ^b	37,8 ±0,35 ^a	>10	0 ^c	0 ^c	0 ^c	-

Médias seguidas por letras iguais, nas mesmas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ED₅₀ (estimada).

Para o fitopatógeno *C. acutatum* o fungicida a base de piraclostrobina se apresentou altamente eficiente, já o fungicida com trifloxtrubina + protioconazol foi considerado como moderadamente eficiente.

Para o fitopatógeno *C. gloeosporioides* ambos os fungicidas avaliados se apresentaram moderadamente eficientes no controle do crescimento micelial do fitopatógeno.

Os nossos resultados corroboram com os obtidos por Fischer et al. (2012), que também avaliaram a eficiência de piraclostrobina, para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* sendo classificado como altamente e moderadamente eficiente, respectivamente para os fitopatógenos. Este resultado demonstra que os modos bioquímicos de ação de ambos fungicidas avaliados podem controlar o crescimento micelial destes fitopatógenos não demonstram especificidade. Os fungos

pertencentes ao gênero *Colletotrichum* apresentam ampla distribuição geográfica e diversos hospedeiros, onde o seu controle químico pode ser realizado por uma ampla variedade de fungicidas pertencentes a diferentes grupos químicos como ditiocarbamatos, benzimidazóis, triazóis, estrobilurinas, apresentando vários modos de ação (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; MACKENZIE et al., 2009; PHOULIVONG, 2011).

Para *C. lindemuthianum* os fungicidas apresentaram resultados extremamente diferentes. Para piraclostrobina foi pouco eficiente e para trifloxtrobina + protioconazol foi altamente eficiente. Ambos fungicidas são indicados para o controle da doença antracnose causada pelo fitopatógeno *C. lindemuthianum*. No entanto, podemos observar que, o fungicida misto foi o que melhor controlou o desenvolvimento do fitopatógeno. Este resultado foi semelhante ao de Sartori, Maringoni (2008) que, ao avaliarem a ED₅₀ de vários fungicidas contra 20 isolados de *C. lindemuthianum* de diferentes regiões do Brasil, demonstraram que os fungicidas que apresentavam dois ingredientes ativos, dos grupos químicos estrobilurinas e triazol inibiram 19 isolados de *C. lindemuthianum*, sendo considerado como altamente eficientes. Talvez para o fungicida piraclostrobina que se apresentou pouco eficiente, uma maior concentração do princípio ativo deveria ser utilizada.

Para o fitopatógeno *F. solani*, o fungicida piraclostrobina não diferiu de seu respectivo controle em nenhuma das concentrações avaliadas, não sendo possível calcular a sua ED₅₀, entretanto, o fungicida trifloxtrobina + protioconazol foi moderadamente eficiente no controle do fitopatógeno.

Para o controle eficiente de *F. solani* é indicada a utilização de fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazóis, o qual apresenta modo bioquímico de ação relacionado com a inibição do desenvolvimento do tubo germinativo, na formação de apressório e no crescimento micelial (OLIVEIRA; MACHADO; OLIVEIRA FILHO, 1999; ZAMBOLIM et al., 2008).

Para o fitopatógeno *M. perniciosa* pode-se observar que piraclostrobina foi moderadamente eficiente, e trifloxtrobina + protioconazol foram altamente eficiente.

O resultado obtido corrobora com os de Oliveira (2000) e Oliveira e Luz (2005) que avaliaram diversos fungicidas e demonstraram que *M. perniciosa* pode ter o seu crescimento micelial inibido por fungicidas sistêmicos pertencentes ao grupo dos triazóis e das estrobilurinas que agem diretamente nas inibições da

respiração da mitocôndria e na biossíntese de esteróis. No entanto, atualmente o controle de *M. perniciosus* vem sendo realizado pelo manejo integrado de doenças, onde são aplicadas as podas fitossanitárias, aplicação de fungicidas cúpricos (protetores) e aplicações do fungo *Trichoderma stromaticum* (OLIVEIRA; LUZ 2005; MEDEIROS et al., 2010).

Nos ensaios biológicos para *P. cinnamomi*, nossos resultados demonstraram que os tratamentos com piraclostrobina e com trifloxistrobina + protioconazol, foram muito limitados, sendo que piraclostrobina foi pouco eficiente para o controle do fitopatógeno, e para trifloxistrobina + protioconazol não foi possível calcular a ED₅₀, já que o tratamento não diferiu de seu respectivo controle em nenhuma das concentrações avaliadas. Pode-se dizer que o resultado obtido neste trabalho ocorreu devido ao fato de que ambos os fungicidas atuam na inibição da biossíntese de esteróis da membrana celular, e o fitopatógeno *P. cinnamomi* pertence à classe dos Oomicetos, o qual se distingue de outros fungos, devido à presença de celulose em sua parede celular (ALEXOPOULOS et al., 1996; HARDHAM, 2005). Além disto, o controle químico para *P. cinnamomi* é realizado com fungicidas sistêmicos pertencentes aos grupos dos acilalaninatos e fosfonatos. Estes fungicidas apresentam diferentes modos de ação, o primeiro atua na inibição RNA ribossomal, e o segundo inibe a produção de oósporos e clamidósporos, além de atuar como ativador do mecanismo de defesa da planta (HARDY; BARRETT; SHEARER, 2001; SHEARER; FAIRMAN, 2007).

Na figura 6 é possível visualizar os ensaios biológicos com os extratos brutos de *A. arborescens*, *P. peruviana*, *C. intermedium*, *S. americanum* e *L. rantonnei* e os princípios ativos piraclostrobina e trifloxistrobina + protioconazol contra os fitopatógenos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. solani*, *M. perniciosus* e *P. cinnamomi*.

Fungos	Solanáceas					Fungicidas		Controle
	<i>Acnistus arborescens</i>	<i>Cestrum intermedium</i>	<i>Physalis peruviana</i>	<i>Solanum americanum</i>	<i>Lycianthes rantonnei</i>	Piraclostrobina 0,1 mg	Trifloxistrobina + Protiocanazol 0,1 mg	
<i>Colletotrichum acutatum</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
<i>Fusarium solani</i>
<i>Moniliophthora perniciosa</i>
<i>Phytophthora cinnamomi</i>

Figura 6 - Bioensaio *in vitro* com os extratos brutos das solanáceas (200 mg por placa) e os fungicidas (0,1 mg por placa) frente aos fitopatógenos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. solani*, *M. perniciosa* e *P. cinnamomi*

Para comparar os resultados obtidos, foram gerados gráficos comparando os resultados obtidos nos dois ensaios biológicos *in vitro* (um com os extratos brutos e outro com os fungicidas comerciais) (Figura 7). Para este estudo comparativo foram utilizados os resultados do ensaio com fungicida comercial na concentração de 0,1 mg por placa, enquanto que a concentração dos extratos brutos foi de 200 mg por placa.

Figura 7- Comparação da porcentagem de inibição dos fitopatógenos, entre o extrato bruto das solanáceas (200 mg) e os fungicidas com piraclostrobina e trifloxtrobina + protioconazol (0,1 mg). Gráficos com os fitopatógenos *C. lindemuthianum* e *F. solani*, não foram demonstrados devido ao fato de que os extratos de plantas não se mostrarem ativos aos fitopatógenos

Neste estudo comparativo pode-se observar que para estas concentrações avaliadas, os extratos das plantas (taxas de inibições maiores) são mais inibidores do que os fungicidas comerciais no desenvolvimento micelial dos fitopatógenos, exceto para *C. acutatum*.

Especificamente para o fitopatógeno *C. acutatum* três extratos se apresentam ativos com uma diferença de menos de 10% que o princípio ativo piraclostrobina.

Para os outros três fitopatógenos (*C. gloeosporioides*, *M. perniciosa* e *P. cinnamomi*) os extratos das plantas que se apresentaram ativas, inibiram mais que o dobro da porcentagem inibitória apresentada pelos fungicidas comerciais.

Estes resultados comparativos demonstraram que os extratos brutos das plantas são promissores na inibição desses fitopatógenos. Ainda mais se levarmos em consideração que o extrato bruto apresenta um conjunto complexo de compostos, enquanto os fungicidas utilizados apresentam um ou dois ingredientes ativos.

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é a toxicidade dos fungicidas.

O fungicida piraclostrobina avaliado neste trabalho apresenta classificação toxicológica II (altamente tóxico) e classificação ambiental II (produto muito perigoso ao meio ambiente). O fungicida trifloxtrobina + protioconazol apresenta classificação I (extremamente tóxico) e classificação ambiental II (produto muito perigoso ao meio ambiente) (AGROFIT, 2014).

Devido a grande variação de resultados que o extrato bruto da planta pode apresentar em relação aos compostos presentes, não foi realizada a avaliação toxicológica desses extratos. Somente após o isolamento e determinação estrutural do composto ativo, devem ser realizadas as avaliações toxicológicas.

Existem, portanto, vários motivos para que seja realizada a busca por compostos ativos que possam ser utilizados de forma segura, eficaz e ambientalmente correta. Assim, pode-se dizer que a utilização de produtos naturais que apresentam bioatividade a fitopatógenos é uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor.

Com os resultados obtidos no presente estudo podemos sugerir que os fitopatógenos que apresentaram as maiores porcentagens de inibição aos extratos das solanáceas avaliadas foram *M. perniciosa* e *P. cinnamomi*.

Assim pode-se concluir que os extratos das plantas selecionadas neste estudo apresentam compostos com potencial fungitóxico aos fitopatógenos. *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *M. perniciosa* e *P. cinnamomi*.

A partir deste estudo foi possível selecionar três extratos de plantas para serem investigadas em um estudo químico mais aprofundado. São elas, *A.*

arborescens (100% para *P. cinnamomi*), *S. americanum* (93,39 % para *M. pernicioso*; 45,83% para *C. acutatum* e 36,66% para *C. gloeosporioides*) e *P. peruviana* (100% para *P. cinnamomi*).

Referência

AGROFIT - **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários.**

<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> . Acesso em: 10 out. 2014.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas.

Brazilian Journal of Pharmacognosy, Curitiba, v.16, p.678-689, 2006.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELLI, M. **Introductory Mycology**. New York, 1996. 865p.

ALMEIDA, T.F.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R.C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 196-201, 2009.

CAMATTI-SARTORI, V; MAGRINI, F.E; CRIPPA, L.B; MARCHETT, C; VENTURIN, L; SILVA-RIBEIRO, R.T. Avaliação in vitro de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 6, p.117-122, 2011.

CANTELO, W. W.; DOUGLASS, L. W.; SANFORD, L. L.; SINDEN, S. L.; DEAHL, K. L. Measuring resistance to the colorado potato beetle (coleoptera, chrysomelidae) in potato. **J. Entomol. Sci.** v.22, p. 245–252, 1987.

D'ARCY, W.G., The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution. Ed HAWKES, J.G. ; LESTER, R.N.; NEE, M. ; ESCHAD, N. (ED.). London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1991. p.75-137.

DAVIS, J. A.; RADCLIFFE, E. B.; RAGSDALE, D. W. Resistance to green peach aphid, *Myzus persicae* (sulzer), and potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae* (thomas), in potato cultivars. **American Journal of Potato Research**, Illinois, v.84, p. 259–269, 2007.

EICH, E. Solanaceae y Convolvulaceae. Secondary metabolites: biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economics significance. Springer. Alemanha. 2008.

FEWELL, A.M.; RODDICK, J.G. Interactive antifungal activity of the glycoalkaloid solanine and chaconine. **Phytochemistry**, London, v.33, p.323-328, 1993.

FEWELL A.M.; RODDICK, J.G. Potato glycoalkaloid impairment of fungal development. **Mycology Research**, v.101, p.597–603, 1997.

FISCHER, I. H; SILVA, B.L; SOARES, A.R; ARRUDA, M.C; PARISI, M.C.M; AMORIM, L. Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, p.2753-2766, 2012.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GRIFFIN, J.W.; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, London, v. 53, p.623 – 637, 2000.

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

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary**. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. London: Taylor & Francis, 1993. 791p.

HARDHAM, A.R. *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.6, n.6, p.589–604, 2005.

HARDY, G.E.S.; BARRETT, S.; SHEARER, B.L. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v.30, p.133–139, 2001.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhauser Verlag, Basel, v.9, 786p., 1990.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhauser Verlag, Basel. 1973.

HERRERA-SALGADO, Y.; GARDUÑO-RAMÍREZ, M. L.; VÁZQUEZ, L., RIOS, M. Y.; ALVAREZ, L. Myo-inositol-derived glycolipids with anti-inflammatory activity from *Solanum lanceolatum*. **Journal of Natural Products**. v.68, p.1031 – 1036, 2005.

KATARIA, H.R.; GROVER, R K. Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping-off of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 88, n. 2, p. 257-263, 1978.

KHAN, Z.S.; NASREEN, S. Phytochemical analysis, antifungal activity and mode of action of methanol extracts from plants against pathogens. **Journal of Agricultural Technology**, v. 6(4): 793-805, 2010.

KODORU, S.; GRIERSON, D.S.; VAN DE VENTER, M.; AFOLAYAN. Anticancer Activity of Steroid Alkaloids Isolated from *Solanum aculeastrum*. **Pharmaceutical Biology**. v.45, n.8, p.613 – 618, 2007.

MACIEL, M.A.A.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MACKENZIE, S.J; PERES, N.A; BARQUERO, M.P; ARAUZ, L.F; TIMMER, L.W. Host range and genetic relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops and leatherleaf fern in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 99, n.5, p. 2009.

MAGA, J. Potato glycoalkaloids. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 12: 371-405, 1980.

MORRIS, S. C.; LEE, T. H. The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*). **Food Technol. Australia**, 36: 118- 124, 1984.

MEDEIROS, F.H.V.; POMELLA, A.W.V.; SOUZA, J. T.; NIELLA, R.; VALLE, R.; BATEMAN, R. P.; FRAVEL, D.; VINYARD, B.; HEBBAR, P.K. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v.29, p.704-711, 2010.

NGUELEFACK, T.B.; MEKHFI, H.; DIMO, T.; AFKIR, S.; NGUELEFACKMBUYO, E.P.; LEGSSYER, A.; ZIYYAT, A. Cardiovascular and Anti-Platelet Aggregation Activities of Extracts from *Solanum torvum* (Solanaceae) Fruits in Rat. **Journal of Complementary and Integrative Medicine** 5(1), 7, 2008.

NIÑO, J.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. Antibacterial and antifungal activities of crude plant extracts from Colombian biodiversity. **Revista de Biología Tropical**, São Paulo, v. 60, n.4, p. 1535-1542, 2006.

OLIVEIRA, M.L. Seleção de fungicidas in vitro e in vivo para o controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro na região sul da Bahia. **Agrotrópica**, Itabuna, v.12,n.2, p.111-118, 2000.

OLIVEIRA, M.L.; LUZ, E.D.M.N. Vassoura de bruxa. In: Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 1533p.

OLIVEIRA, W.F.; MACHADO, L.P.; OLIVEIRA FILHO, A.C. Efeito de diferentes concentrações de benomyl e pcnb sobre o crescimento radial de *Fusarium solani* e *Pythium* sp., in vitro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiana, v. 29, n.1, p.61-63, 1999.

OLMSTEAD, R.G. Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: a comparison of continental and intercontinental diversification patterns. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.171, p.80–102, 2013.

PINTO, F.C.L.; UCHO, D.E.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, F.M.; THEODORO, P.N. E.T. ; ESPÍNDOLA, L.S. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, Campinas, v.34, n.2, p.233-278, 2011.

PHOULIVONG, S. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**. Thailand, v.1, p.53-73, 2011.

ROUMY, V.; BIABIAN, M.; HENNEBELLE, T.; ALIOUAT, M.; POTTIER, M.; JOSEPH, H.; JOHA, S.; QUESNEL, B.; ALKHATIB, R.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F. Antifungal and Cytotoxic Activity of Withanolides from *Acnistus arborescens*. **Journal of natural products**, Cincinnati, v. 73, p. 1313–1317, 2010.

SARTORI, J.E.; MARINGONI, A.C. Effect of fungicides on colony growth of *colletotrichum lindemuthianum* (sacc. & magn.) scrib. **Journal of Plant Protection Research**. Botucatu, v.48, n.2, p.201-212, 2008.

SHEARER, B.L.; FAIRMAN R.G . A stem injection of phosphite protects Banksia species and Eucalyptus marginata from *Phytophthora cinnamomi* for at least four years. **Australasian Plant Pathol**, Clayton, v.36, p.78–86, 2007.

SILVA, D.M.H.; BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**. v.32, p.143-145, 2007.

SILVA, J.L.; TEIXEIRA, R.N.V.; SANTOS, D.I.P.; PESSOA, J.O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento in vitro de fitopatógenos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v.7, p.80-86, 2012.

SIMONS, V.; MORRISSEY, J. P.; LATIJNHOUWERS, M.; CSUKAI, M.; CLEAVER, A.; YARROW, C.; OSBOURN, A. Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother**. v.50, p. 2732–2740, 2006.

SLANINA, P. Solanine (glycoalkaloids) in potatoes: toxicological evaluation. **Food Chem. Toxicol.**, 28: 759-761, 1990.

TINGEY, W. M. Glycoalkaloids as pest resistance factors. **Am. Potato J.**, 61: 157-167, 1984.

TOMASSINI, T.C.B.; BARBI, N.S.; RIBEIRO, I.M.; XAVIER, D.C.D. Gênero *physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química nova**, São Paulo v. 23, n.1, 2000.

VENTUROSIO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L.; CONUS, L.A.; PONTIM, C.A.; BERGAMIN, A.C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.37, p.18-36, 2011.

WHARTON, P.S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v.61, p.3–22, 2004.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, London, v. 64, p. 3–19, 2003.

ZAKER, M. Antifungal evaluation of some plant extracts in controlling *Fusarium solani*, the Causal agent of potato dry in vitro and in vivo. **International Journal of Agriculture and Biosciences**, Ananbra, v.3, p. 190-195, 2014.

ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M.C.; SILVA, A.A.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; JESUS JUNIOR, W.C. **Produtos fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas)**. Viçosa: ed. Viçosa: UFV, 2008. 652p.

6 POTENCIAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS DA PLANTA *Solanum americanum* PARA O CONTROLE DE *Moniliophthora perniciosa*

Resumo

Fungos fitopatogênicos são responsáveis por causar diversas doenças e consideráveis perdas na agricultura. O controle das doenças é realizado através de métodos químicos, biológicos e físicos, porém vários fitopatógenos apresentam resistência aos métodos de controle o que vem causando grandes problemas na agricultura. Plantas pertencentes à família Solanaceae apresentam compostos potencialmente inibidores de crescimento de micro-organismos, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi explorar o potencial biológico e químico de metabólitos secundários produzidos por *Solanum americanum* ativos ao fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa nas culturas de cacau. O extrato bruto das folhas de *S. americanum* foi separado utilizando-se de técnicas cromatográficas, até a obtenção de uma fração semipura bioativa. A separação dos compostos foram biomonitorados por ensaios de atividade *in vitro* ao fitopatógeno. A fração bioativa semipura indicou a presença de compostos da classe química dos glicoalcalóides. Apesar de o composto ativo já ser conhecido na literatura, e a sua bioatividade já descrita, é a primeira vez que se relata a atividade antifúngica para o fitopatógeno *M. perniciosa*.

Palavras-chaves: *Solanum americanum*; *Moniliophthora perniciosa*; Inibição; Glicoalcalóides; Metabolitos secundários; Produtos naturais

Abstract

Pathogenic fungi are responsible for causing various diseases and considerable losses in agriculture. The disease control is accomplished through chemical, biological and physical methods, but many pathogens are resistant to control methods which has caused major problems in agriculture. Plants belonging to the Solanaceae family have potentially growth inhibitors of microorganisms. The aim of this study was to explore the biological and chemical potential of secondary metabolites produced by *Solanum americanum* assets to pathogen *Moniliophthora perniciosa*, which causes disease in Broom Witch disease on cocoa crops. The crude extract from the leaves of *S. americanum* was separated using chromatographic techniques, to obtain a semipure bioactive fraction. The separation of the compounds was biomonitorated by *in vitro* activity assays to the pathogen. The semipure bioactive fraction indicated the presence of compounds of the chemical class of glycoalkaloids. Despite the active compound already known in the literature, and its bioactivity already described, is the first time that reports the antifungal activity to the pathogen *M. perniciosa*.

Keywords: *Solanum americanum*; *Moniliophthora perniciosa*; Inhibition; Glycoalkaloids; Secondary metabolites; Natural products

6.1 Introdução

Solanum americanum Mill (*S. americanum*) é uma planta nativa pertencente ao gênero *Solanum* L. da família Solanaceae A. Juss, com ocorrência em vários países de clima tropical e temperado do continente americano (OGG; ROGERS; SCHILLING, 1981; LORENZI, 1982; D'ARCY, 1991; STEHMANN et al., 2014). Apresenta arbusto ereto, com tamanho variável entre 40 e 90 cm de altura, bem ramificado, com folhas simples, flores pequenas com coloração branca e frutos de bagas globosas, que quando imaturas (coloração verde) são considerados venenosos e quando maduros (coloração preta) são comestíveis (Figura 8) (LORENZI, 2002).

Figura 8 - *Solanum americanum*, espécie de planta pertencente à família Solanaceae
Fonte: http://taibif.org.tw/taibif_search/species_detail.php?name_code=204724

No Brasil, *S. americanum* é conhecida popularmente como maria-pretinha, maria-preta ou erva-moura, está presente em todo território brasileiro, e é considerada como uma das principais espécies de erva daninha do país, pois tem a capacidade de infestar lavouras anuais e perenes, pomares, cafezais, jardins e terrenos baldios. Pode interferir no crescimento e no desenvolvimento das plantas, devido à competição por nutrientes, água e luz (LORENZI; MATOS 2008; SILVA et al., 2010; RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 1997).

Na medicina popular brasileira, existem relatos de que *S. americanum* apresenta propriedades analgésicas e sedativas, suas folhas são utilizadas no tratamento de verminoses, furúnculos, dermatites, queimaduras e feridas (LORENZI, 2002; LORENZI; MATOS 2008). Além destas propriedades, a população rural do litoral da Bahia, também utiliza folhas de *S. americanum* no tratamento da

leishmaniose cutânea, causada pelo protozoário *Leishmania braziliensis* (FRANÇA et al., 1996).

A partir dos relatos de que diversas plantas apresentam propriedades medicinais, Braga et al. (2007) investigaram a atividade leishmanicida e antifúngica *in vitro* de diversas plantas, e confirmaram que o extrato metanólico das folhas de *S. americanum* apresenta compostos que controlam o desenvolvimento do protozoário *Leishmania amazonenses*, apresentando valores de IC₅₀ de 40 µg/mL, e também demonstrou apresentar propriedades antifúngicas, inibindo a proliferação da levedura *Candida albicans*, sendo a sua MCI de 5 mg/mL. Caceres et al. (1991) também comprovaram em seus estudos, que o extrato aquoso de *S. americanum*, apresenta alta atividade antidermatófica aos fungos: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, sendo a MCI de 5,1, 1, 4 e 3 µm/mL respectivamente.

Além dos trabalhos científicos que envolvem patologias que acometem o ser humano, também foi avaliado se *S. americanum* pode apresentar propriedades bioativas no controle de fitopatógenos, conforme demonstra o trabalho de Inagaki et al. (2008) que, ao avaliarem a fungitoxidade de 203 ervas daninhas sobre o fitopatógeno *Colletotrichum lagenarium* agente causal da antracnose em pepinos, observaram resultados promissores, pois o extrato aquoso das folhas de *S. americanum* na concentração de 0,2 (mg/µL) inibiu a germinação conidial de *C. lagenarium* em 97,8%, o que confirma sua atividade antifúngica ao fitopatógeno avaliado.

No entanto, vale ressaltar que os trabalhos citados anteriormente, somente avaliaram se *S. americanum* apresentava propriedades bioativas, sendo que os compostos responsáveis pela bioatividade não foram identificados.

O gênero *Solanum* L. é o maior e mais complexo da família Solanaceae habitando sistemas ecológicos estabelecidos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Agra, 1993). Compreende diversas espécies de plantas e algumas destas apresentam controversa taxonômica internacional, a qual é baseada em caracteres morfológicos. Com intuito de esclarecer as diferenças entre algumas espécies de plantas, MOHY-UD-DIN et al. (2010) realizaram um estudo quimiotaxonômico entre as espécies *S. americanum* e *Solanum nigrum* (*S. nigrum*), para avaliar o perfil dos glicoalcalóides presentes nas espécies, através das técnicas físicas químicas HPLC e GC-MS. Os resultados obtidos demonstraram que ambas

as espécies apresentam um perfil de glicoalcalóides (solasonina, α -solamargina, β -solamargina e α -solanina) semelhante, diferindo somente na presença do glicoalcalóide β -solamargina em *S. nigrum* e na ausência do composto em *S. americanum*. Na análise de agrupamento *S. americanum* teve seu alinhamento distante de *S. nigrum*, devido ao maior percentual de solasodina e menor de solanidina, confirmando que *S. americanum* e *S. nigrum* são espécies distintas.

Os glicoalcalóides solasonina, α -solamargina e α -solanina são metabólitos secundários, conhecidos por apresentarem uma ampla variedade de atividades biológicas (MILNER et al., 2011).

Sendo assim, neste trabalho, foi avaliado se o extrato das folhas de *S. americanum* apresentam propriedades fungitóxica, capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos *M. perniciosa*, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

6.2 Material e métodos

Amostras da planta *S. americanum* foram coletadas na região de Piracicaba, São Paulo, em junho de 2011. Um exemplar teve sua identificação confirmada.

As folhas foram destacadas, lavadas, secas em estufa de circulação forçada a 40° C e em seguida trituradas. Este pó foi submetido a extração por infusão em água destilada 100° C, gerando um extrato bruto.

O extrato bruto foi submetido à partição líquido-líquido entre água e n-butanol, obtendo-se duas frações: aquosa e butanólica. A fração butanólica foi submetida à separação cromatográfica por permeação em gel do tipo Sephadex LH-20, com eluição isocrática de metanol. As frações obtidas foram reunidas seguindo similaridade química observadas por CCD, resultando em 12 frações (nomeadas Sa1 a Sa12). As 12 frações foram avaliadas por ensaio biológico *in vitro*, e após a confirmação da bioatividade as frações Sa1 a Sa3 e Sa4 a Sa6 foram reunidas e renomeadas em Sa1 e Sa2, respectivamente. A fração Sa2 foi submetida à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada de sílica derivatizada com grupos octodecilsilano C₁₈, utilizando com fase móvel um gradiente de água em metanol. Desta foram obtidas, após reunião por similaridade química, 12 frações. Após a avaliação em ensaio biológico *in vitro*, a 6ª, 7ª e 8ª fração foram reunidas (SA2F) e foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV, onde foram obtidas 4 frações. A 3ª fração (ativa) foi novamente submetida à

cromatografia líquida em condições otimizadas, para se obter uma fração com melhor grau de pureza possível. As frações Sa2F3C (3^a) e Sa2F3D (4^a) foram analisadas em espectrometria de massas MALDI-TOF. Devido à similaridade dos resultados obtidos, somente a fração Sa2F3D foi submetida a uma análise em espectrômetro de massas CLAE-MS/MS.

Todas as etapas cromatográficas foram monitoradas por ensaios biológicos *in vitro* antifúngicos ao fitopatógeno *M. perniciosa*.

O fluxograma (Figura 9) apresentado a seguir sumariza os procedimentos realizados com *S. americanum*.

Figura 9 - Fluxograma dos processos realizados com *S. americanum*

Legenda:

M = Massa; B = Bioensaio qualitativo; R = Rendimento; a = Partição líquido-líquido em água e n-butanol; b = Eluição isocrática em metanol; c = Fase móvel: gradiente de água em metanol; d = Fase móvel: modo isocrático água:metanol:acetonitrila (10:45:45); e = Fase móvel: modo isocrático 30 % acetonitrila para 70% tampão de fosfato de amônio monobásico 0,05M, pH 6,5; CCD = Cromatografia em Camada Delgada.

6.3 Resultados e discussões

O extrato bruto das folhas de *S. americanum* apresentou inibição de crescimento micelial a três fitopatógenos: *C. acutatum* (45,83%), *C. gloeosporioides* (36,66%) e *M. pernicioso* (93,30%), dados apresentados no capítulo 3. Por ter apresentado este resultado promissor, foi selecionada para uma investigação química mais detalhada quanto aos metabólitos secundários presentes. Toda a investigação química foi monitorada por ensaios biológicos *in vitro* de inibição micelial ao fitopatógeno *M. pernicioso*. Apesar de o extrato ter sido ativo a três fitopatógenos, foi selecionado apenas um para os ensaios de monitoramento químico da separação dos compostos ativos, por ter apresentado maior potencial de inibição.

O extrato bruto de *S. americanum* foi analisado quimicamente em cromatografia de camada delgada (CCD). Após aplicação e eluição dos compostos na placa, foi realizada uma inspeção sob a luz UV (nos comprimentos de ondas 254 e 365 nm). O resultado obtido demonstrou a presença de vários compostos que absorveram em ambos comprimento de onda.

O extrato bruto também foi analisado em espectrômetro de massas CLAE-EM/ESI, e apresentou o seguinte espectro (Figura 10).

Figura 10 - Espectro de massas CLAE-EM/ESI do extrato bruto das folhas de *S. americanum*

No espectro de massas, pudemos observar picos, referentes aos valores da relação massa/carga (m/z) dos compostos íons-moleculares $[M+H]^+$, presentes no extrato bruto de *S. americanum*. Os principais valores de m/z obtidos foram: 1283,7;

1089,7; 954,7; 868,60; 679,20; 550,70; 381,10; 253,20 e outros. Devido à complexidade do extrato bruto ativo, este foi submetido a uma partição líquido-líquido com água e n-butanol.

Para monitorar o(s) composto(s) responsável(s) pela atividade foi realizado um ensaio biológico *in vitro* com as frações obtidas, como mostra a Figura 11.

Figura 11- Ensaio de atividade antifúngica contra *M. pernicioso* utilizando 20 mg da fração n-butanólica, pelo método de difusão em disco

No ensaio de atividade antifúngica a *M. pernicioso*, o resultado foi positivo para a fração n-butanólica, ocorrendo inibição de 100% do crescimento micelial do fitopatígeno, ao ser comparado ao seu respectivo controle. O resultado com a fração aquosa foi negativo (dado não demonstrado devido à contaminação no ensaio de atividade antifúngica).

A fração butanólica também foi analisada em espectrofotômetro de massas, como mostra a Figura 12.

Figura 12- Espectro de massas CLAE-EM/ESI obtido da fração n-butanólica da *S. americanum*

O espectro obtido para a fração butanólica foi comparado com o espectro obtido do extrato bruto. Foi possível verificar que a fração butanólica apresentou menos compostos em comparação ao extrato bruto. Os valores de m/z referentes

aos compostos que permaneceram na fração ativa foram: 1267,6; 1213,5; 868,60; 253,10 e outros de menor intensidade. Ou seja, os compostos presentes no extrato bruto foram separados por partição líquido-líquido entre a fase aquosa e butanólica, e esta separação mostrou ser apropriada para a extração dos compostos ativos.

Sendo assim, a fração butanólica foi submetida a uma cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20, sendo obtidas 12 frações que foram avaliadas em ensaio biológico antifúngica a *M. pernicioso*, como mostra a Figura 13.

Figura 13 - Ensaio de atividade antifúngica contra *M. pernicioso* com as frações obtidas da cromatografia em permeação em gel de Sephadex LH-20, utilizando 20 mg, pelo método de difusão em disco. M = Controle metanol

No ensaio de atividade antifúngica pudemos verificar que as frações Sa2, Sa3 e Sa7 se apresentaram moderadamente ativas e as frações Sa4, Sa5 e Sa6 apresentaram maior ação fungitóxica a *M. pernicioso*. Todas as frações foram avaliadas quanto à similaridade química (CCD). Levando em consideração os dois parâmetros (químico e biológico) as frações foram reunidas e renomeadas da seguinte forma: Sa1(Sa1 + Sa2 + Sa3), Sa2 (Sa4 + Sa5 + Sa6); a partir de Sa7 não foram reunidas.

A fração Sa2 (Sa4 + Sa5 + Sa6) demonstrou resultado positivo quando revelada com o reagente Dragendorff, sugerindo a presença de compostos

pertencentes à classe dos alcaloides ou a compostos que contém nitrogênio em sua estrutura.

Esta fração (Sa2) foi submetida à cromatografia em coluna Sep-pak pré-empacotada de sílica derivatizada com grupos C₁₈ com gradiente de água em metanol. Desta cromatografia foram obtidas 12 frações que foram avaliadas em ensaio de atividade antifúngica, como mostra a Figura 14.

Figura 14 - Ensaio de atividade antifúngica contra *M. perniciosus* com as frações obtidas da cromatografia em coluna Sep-pak C₁₈, utilizando 20 mg, pelo método de difusão em disco

Com este ensaio foi possível verificar que as frações ativas foram Sa2E à Sa2J. As frações foram analisadas por CCD e reveladas com o reagente Dragendorff e as que apresentaram perfil químico semelhante e melhor resposta fungitóxica a *M. perniciosus* foram reunidas. Assim as frações Sa2F, Sa2G e Sa2H foram reunidas e renomeadas como Sa2F. A fração Sa2F foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), como mostra a figura 15.

Figura 15- Cromatograma da fração Sa2F. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 4,6X250mm, 5 um. Fase móvel água:metanol:acetonitrila (10:45:45), monitorada em 242 nm

No cromatograma é observada a presença de vários compostos, representados por picos (ou bandas) em diferentes tempos de retenções (t_R). Foi realizada uma separação cromatográfica coletando os compostos da seguinte forma: Sa2F1 (0 a 3,5 minutos); Sa2F2 (3,60 a 10,5 minutos); Sa2F3 (10,60 a 12,50 minutos) e Sa2F4 (12,60 a 14,50 minutos). Após a concentração do solvente em sistema de evaporador rotativo as 4 frações obtidas foram avaliadas em ensaio de atividade antifúngica a *M. perniciosus* (Figura 16).

Figura 16 - Ensaio de atividade antifúngica a *M. perniciosus* com as frações, utilizando 0,5 mg, pelo método de difusão em disco

Na figura 16 pode-se observar que a fração Sa2F3 se apresenta ativa. Pela massa obtida foi possível concluir que também é o majoritário. A fração Sa2F3, foi novamente submetida a CLAE, porém outras condições cromatográficas foram avaliadas buscando uma melhor separação dos compostos contidos nesta fração ativa. Com a otimização da separação chegou-se a composição da fase móvel 40/60 (H₂O:MeOH) por 7 minutos, em seguida 100% metanol até 15 minutos, como mostra a figura 17.

Figura 17 - Cromatograma da fração SA2F3. Condições: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 4,6X250mm, 5 µm. Fase móvel água:metanol (40:60), e corrida monitorada nos comprimentos de onda 210 e 242 nm

Analizando o cromatograma da fração Sa2F3, foi possível verificar a presença de vários compostos. Com isso, foi realizada uma busca na literatura, de metodologias específicas para isolamento de glicoalcalóides em CLAE, que provavelmente estão presentes na fração ativa (por revelação na reagente Dragendorff).

A metodologia selecionada foi a proposta por Aziz et al. (2012), que utiliza como fase móvel um sistema de 30 % acetonitrila para 70% tampão de fosfato de amônio monobásico 0,05M, pH 6,5 e monitorada nos comprimentos de onda de 200, 202, 210 e 254 nm. (Figura 18).

Figura 18 - Cromatograma da fração Sa2F3. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 4,6X250mm, 5 µm. Fase móvel 30:70 de acetonitrila:tampão de fosfato de amônio monobásico 0,005M com pH 6,5, analisado em 200, 202, 210 e 254nm

No cromatograma foi possível observar que os picos apresentaram um perfil diferente do anterior. Principalmente no t_R de 11 a 14 minutos no qual foi possível verificar a presença de 2 compostos que na condição anterior, esses se apresentavam no mesmo t_R (13 minutos). Também foi possível verificar que o composto de interesse absorve mais em comprimentos de ondas menores (200, 202 e 210nm). Esse resultado confirma o já observado na placa de CCD, onde a fração ativa é positiva somente quando revelada com reagente Dragendorff e não observada sob luz UV.

Muitos autores já relataram compostos isolados de solanáceas, pertencentes à classe dos glicoalcalóides, com estas mesmas características. Principalmente no que se refere à baixa absorção no espectrofotômetro de ultravioleta (FRIEDMAN et al., 1994; KURONEN; VAANANEN; PEHU, 1999).

Segundo Milner et al. (2011), a estrutura dos compostos pertencentes à classe dos glicoalcalóides, é formado por dois componentes estruturais: a aglicona, que apresenta um esqueleto de 27 carbonos colestano hidrofóbico com um nitrogênio incorporado em seu anel F; e a glicona, que é a estrutura hidrófila da molécula, sendo composta por uma cadeia lateral de hidratos de carbonos que fica ligado na posição 3-OH do anel A da aglicona (Figura 19).

Figura 19 - Estrutura glicoalcalóide
Adaptado Milner et al., 2011

A glicona ou glicosídeo residual pode ser formado por três ou quatro moléculas de açúcares (D-glucose, D-galactose, D-xilose e L-ramnose.) com

diferentes combinações entre si, que podem dar origem a: chacotriose, solatriose, comertetraose e licotetraose (Figura 20).

Figura 20 - Estrutura das gliconas: Chacotriose, Solatriose, comertetraose e licotetraose Adaptado Milner et al., 2011.

As agliconas dos glicoalcalóides, também são conhecidas como alcalinas, e dependendo do tipo de estrutura, podem ser classificadas: Espirosolanos (A) onde a porção alcaloídica é do tipo oxa-azaspirodecano; 22,26-epiminocolestanos (B) que apresentam um esqueleto heterocíclico 22/23, 26-epiminocolestano; Solanidanos (C) que são caracterizados por anéis fundidos do tipo indolizidínicos; α -epiminociclohemiacetal (D) onde ocorre a presença do grupo funcional epiminociclohemiacetal; Aminoestirostanos (E) que é caracterizado pela presença de um grupo amino na posição C3; Leptinas (F) que são caracterizadas por anéis fundidos do tipo indolizidínicos, com um grupo hidroxila ou acetoxi no C23 (Figura 21) (GHISALBERTI, 2006; MILNER et al., 2011).

Figura 21- Estrutura das agliconas: (A) espirosolano, (B) 22,26-epiminocolestano, (C) solanidanos, (D) α-epiminociclohemiactal, (E) aminoespirostanos, (F) leptinas Adaptado Ghisalberti, 2006; Milner et al., 2011

Visando purificar os compostos ativos, a amostra Sa2F3 foi submetida a uma separação cromatográfica por CLAE e os compostos foram coletados da seguinte forma: Sa2F3A (0 a 2,5 minutos); Sa2F3B (2,6 a 10,0 minutos); Sa2F3C (10,60 a 12,50 minutos) e Sa2F3D (12,60 a 15,00 minutos).

Para eliminar o sal oriundo do tampão de fosfato de amônio, foi realizado um clean-up em coluna Sep-pak C₁₈ em gradiente de água e metanol, onde todo o sal foi retirado na fração aquosa e os compostos de interesse na fração metanólica.

Com o intuito de se identificar os compostos ativos, as frações Sa2F3C (figura11) e Sa2F3D (Figura 22), foram analisadas por espectrometria de massas MALDI-TOF - MS.

Figura 22 - Full scan da amostra Sa2F3C, analisada por espectrometria MALDI-TOF-MS

No espectro de *full scan* da fração Sa2F3C verifica-se pouco da fração SA2F3D, como também foi possível observar outros valores de relação m/z . Podemos destacar o composto de m/z 884,6169 $[M+H]^+$, que muito provavelmente se refere ao composto mais representativo nesta amostra.

A partir desses resultados foi realizada uma busca na literatura, em bancos de dados como: Dictionary of Natural Products e ScinFinder utilizando os valores m/z e as demais informações sobre a espécie *S. americanum* e suas bioatividades.

Foram localizados na literatura três compostos que apresentam m/z 884,1 referentes aos compostos α -solamarina, α -solasonina e leptinina II, todos pertencentes a classe dos glicoalcalóides e comumente encontrados em diferentes espécies de plantas da família Solanaceae.

A seguir, na Tabela 7, estão apresentadas as comparações entre os três glicoalcalóides.

Tabela 7 - Estruturas químicas dos glicoalcalóides α -solamarina α -solasonina e leptinina II e demais informações

Composto (fórmula molecular, peso molecular, CAS).	Aglicona (classe, peso molecular).	Glicosídeo	Fórmula estrutural (aglicona + glicosídeo).
α -solamarina $C_{45}H_{73}NO_{16}$ 884,1 20318-30-3	tomatidenol 413,6	solatriose
α -solasonina $C_{45}H_{73}NO_{16}$ 884,1 19121-58-5	solasodina 413,6	solatriose
leptinina II $C_{45}H_{73}NO_{16}$ 884,1 100994-57-8	leptinidina 413,6	solatriose

Fonte adaptado: DISTL; WINK, 2009 e SciFinder[®]

Com os dados da Tabela 7, é possível verificar que os glicoalcalóides α -solamarina, α -solasonina e leptinina II apresentam o mesmo valor de peso e fórmula molecular, ou seja, são isômeros constitucionais, sendo diferenciados pelo tipo de aglicona.

Para a fração Sa2F3D, também foi realizada a análise espectrométrica de massas. O resultado pode ser observado na Figura 23.

Figura 23 - Full scan da amostra Sa2F3D, analisada por espectrometria MALDI-TOF-MS

No espectro de *full scan* da fração Sa2F3D, pudemos constatar que este também continha um pouco da fração SA2F3C (devido à repetição de íons com o mesmo valor de m/z) e também ocorreu a presença de outros compostos, entre os quais pode-se destacar os compostos de m/z 722,4463 e 868,5169 $[M+H]^+$, sendo os mais representativos nesta amostra. A partir desses resultados foi realizada uma busca na literatura, no Dictionary of Natural Products e SciFinder utilizando os valores m/z e as demais informações sobre a espécie *S. americanum* e suas bioatividades.

Foram localizados na literatura quatro compostos que apresentam m/z 868,1 referentes aos compostos α -solanina, α -solamargina, β -solamarina e leptinina I, todos pertencentes à classe dos glicoalcalóides e comumente encontrados em diferentes espécies de plantas da família Solanaceae (Tabela 9). Para o íon de m/z 722,4463 $[M+H]^+$ não foi encontrado nenhum composto conhecido, mas supõe-se que este esteja relacionado com o composto m/z 868,5169 $[M+H]^+$, sendo um fragmento comum de sua estrutura. Os compostos pertencentes à classe dos glicoalcalóides apresentam em sua estrutura ligações interglicosídicas fracas, e essas quando analisadas em equipamentos com alta energia de ionização, são facilmente fragmentadas (STOBIECKI et al., 2003; CATALDI et al., 2005). A seguir, na Tabela 8, estão apresentadas as comparações entre os quatro glicoalcalóides.

Tabela 8 - Estruturas químicas dos glicoalcalóides α -solanina α -solamargina, β -solamarina e leptinina I e demais informações

Composto (fórmula molecular, peso molecular, CAS).	Aglicona (classe, peso molecular).	Glicosídeo	Fórmula estrutural (aglicona + glicosídeo).
α -solanina $C_{45}H_{73}NO_{15}$ 868,1 20562-02-1	solanidina 397,6	solatriose
α -solamargina $C_{45}H_{73}NO_{15}$ 868,1 20311-51-7	solasodina 413,6	chacotriose
β -solamarina $C_{45}H_{73}NO_{15}$ 868,1 3671-38-3	tomatidenol 413,6	chacotriose
leptinina I $C_{45}H_{73}NO_{15}$ 868,1 101009-59-0	leptinidina 413,6	chacotriose

Fonte adaptado: DISTL; WINK, 2009 e SciFinder®

Os dados da Tabela 8 demonstram que os glicoalcalóides α -solanina, α -solamargina, β -solamarina e leptinina I, também apresentam o mesmo valor de peso e fórmula molecular, sendo que a diferenciação entre ambos é mediante o tipo de aglicona, presente em sua composição química.

A partir dos resultados obtidos, optou-se por realizar uma análise em um espectrômetro de massas CLAE-MS/MS - Ion Trap (Esquire 3000 plus), somente com a fração Sa2F3D, já que essa apresentava os íons moleculares m/z 868 e 884 $[M+H]^+$ para avaliar o perfil de fragmentação dos compostos.

No cromatograma da fração Sa2F3D (Figura 24), pode-se confirmar que durante a corrida de 25 minutos, ocorre a presença de um pico base com t_R 6,5 e 7,5 minutos, e também outros picos com intensidade de absorção menores.

Figura 24 - Cromatograma obtido pela fração SA2F3D - em LC-MS/MS - Ion Trap (Esquire 3000 plus). Coluna Phenomenex Gemini C-18 4,6X250mm, 5 μ m. A fase móvel empregada foi gradiente água:metanol (80:20). Monitorada em 210 nm

Foi realizada a análise em MS/MS da fração Sa2F3D para analisar quais os íons moleculares presentes no t_R 6,5 e 7,5 minutos (Figura 25).

Figura 25 - Espectro de MS/MS obtido da fração SA2F3D - Ion Trap (Esquire 3000 plus)

No espectro de MS/MS da figura 14 pode-se observar a presença de seis íons moleculares m/z 884,5; 868,5; 722,4; 590,3; 576,3 e 414,2 $[M+H]^+$, sendo que os íons moleculares de m/z 884 e m/z 868, são comuns para alguns compostos pertencentes à classe dos glicoalcalóides (DISTL; WINK, 2009).

Em vários trabalhos realizados com glicoalcalóides é demonstrado que durante a análise em que se utiliza MS/MS ocorre a clivagem das ligações interglicosídica da molécula, processo conhecido como fragmentação, que resulta em fragmentos iônicos, formados a partir da molécula original (STOBIECKI et al., 2003; CATALDI et al., 2005); esta fragmentação da molécula, pode auxiliar na identificação do composto de interesse.

Sendo assim, optou-se por realizar a fragmentação dos compostos de m/z 884,7 (Figura 26) e 868,5 $[M+H]^+$ (Figura 27).

Figura 26 - Espectro de MS/MS do íon molecular m/z 884,7 $[M+H]^+$ da amostra Sa2F3D - em MS/MS-Ion Trap (Esquire 3000 plus)

O espectro de MS/MS do íon molecular m/z 884,7 $[M+H]^+$ apresentou o fragmento de m/z 866,4 $[M+H]^+$, o que sugere a perda de uma molécula de H_2O (-18).

No espectro de MS/MS do íon molecular m/z 868,5 $[M+H]^+$, ocorreu o fragmento de m/z 850,5 $[M+H]^+$, o que também sugere a perda de uma molécula de H_2O (-18).

Figura 27 - Espectro de MS/MS do íon molecular m/z 868,5 $[M+H]^+$ da amostra Sa2F3D - em MS/MS -Ion Trap (Esquire 3000 plus)

Segundo o trabalho de Cataldi et al. (2005) ao avaliaram o perfil de fragmentação de glicoalcalóides por LC/ESI-MS, foi possível observar que a perda de moléculas de H_2O $[M+H-H_2O]$ é comum em todos compostos que apresentam uma aglicona com estrutura do tipo espirosolano, enquanto que os compostos que apresentam outro tipo de aglicona pode ou não perder moléculas de H_2O durante a fragmentação (SHAKYA; NAVARRE 2008).

Conforme os dados obtidos na literatura para compostos pertencentes à classe dos glicoalcalóides, sabe-se que a fragmentação também ocorre por clivagem das ligações interglicosídica da molécula, ou seja, ocorre a eliminação de um resíduo de monossacarídeo, o qual pode ser 132 Da (pentose), 146 Da (deoxihexose) e 162 Da (hexose) (STOBIECKI et al., 2003; CATALDI et al., 2005; DISTL; WINK, 2009).

Este perfil de fragmentação pode ser observado espectro de MS/MS com t_R 7,1 minutos (Figura 28).

Figura 28 - Espectro de MS/MS da amostra Sa2F3D, com t_R 7,1 minutos

Com a análise dos fragmentos obtidos por MS/MS, pode-se sugerir que a fragmentação para íon molecular m/z 868,5 $[M+H]^+$ ocorreu por clivagem das ligações interglicosídicas : m/z 722,5 $[M+H-146]^+$; m/z 576,4 $[M+H-146-146]^+$; m/z 414,2 $[M+H-146-146-162]^+$.

A partir desta fragmentação, e com a análise de todos os espectros obtidos, é possível afirmar que íon molecular m/z 868,5 $[M+H]^+$ não pertence ao composto α -solanina, pois o seu padrão de fragmentação é diferente, o seu resíduo glicosídico corresponde a uma solatriose e os valores dos fragmentos de m/z são: 722; 706; 560 $[M+H]^+$ conforme demonstrado na sigura 29 (DISTL; WINK, 2009). A aglicona da α -Solanina é solanidina m/z 398 $[M+H]^+$, e compostos que apresentam aglicona do tipo solanidano quando é fragmentada apresenta um íon (m/z 327) indicativo de sua estrutura (SHAKYA, NAVARRE 2008). Estas informações não foram obtidas em nenhum dos espectros observados neste estudo.

Figura 29 - Perfil de fragmentação da molécula α -Solanina (DISTL; WINK, 2009)

Com este resultado, pode-se sugerir que o íon molecular m/z 868,5 $[M+H]^+$ seja de um dos seguintes compostos: α -solamargina, β -solamarina ou leptinina I. Portanto foram adquiridos outros espectros de massas para estudarmos os padrões de fragmentos da aglicona presente na fração Sa2F3D, com o objetivo de identificação do composto ativo. O espectrograma pode ser visualizado na Figura 30.

Figura 30 - Espectro de MS/MS do íon molecular m/z 414 $[M+H]^+$ da amostra Sa2F3D - em MS/MS - Ion Trap (Esquire 3000 plus)

Para os compostos que apresentam aglicona do tipo espirosolano, espera-se encontrar alguns fragmentos como os íons moleculares m/z 271 e 253, os quais correspondem à clivagem do anel E/F e o íon m/z 126 $[M+H]^+$ o qual corresponde ao íon nitrogenado da molécula (CATALDI et al., 2005; SHAKYA; NAVARRO 2008; CAHILL et al., 2010; IJIMA et al., 2013).

O espectro de MS/MS do íon molecular m/z 414,5 $[M+H]^+$ apresentou os seguintes fragmentos de m/z 396,1; 290,7; 271,1; 252,9; 223,9; 196,9; 170,9; 156,9; 140,9; 126,1 $[M+H]^+$. Com estes fragmentos identificamos o íon molecular m/z 396,1 $[M+H-H_2O]^+$, o qual corresponde a perda de uma molécula de água, e os íons moleculares m/z 271,1 e 252,9 $[M+H]^+$ que podem estar relacionados com a clivagem do anel E/F da aglicona e íon molecular 126,1 $[M+H]^+$ o qual pode estar relacionado ao íon nitrogenado.

Segundo o trabalho de Distl e Wink (2009), algumas moléculas de glicoalcalóides são epímeras, como as agliconas solasodina e tomatidenol são pertencentes à classe dos espirosolanos e a diferença entre as duas ocorre apenas na orientação espacial dos seus átomos de nitrogênio, apresentando o mesmo peso molecular de 413,6. A aglicona leptinidina também apresenta o mesmo peso molecular e perfil de fragmentação igual a de solasodina e tomatidenol, apesar de sua aglicona ser diferenciada pela presença de um radical hidroxil adicional no C-23 (Figura 31) (KUHN; LOW, 1961; SHAKYA; NAVARRE, 2008; DISTL; WINK, 2009; MILNER, 2011).

Figura 31- Estrutura dos compostos α -solamargina, β -solamarina e leptinina I, e suas diferenças

Os glicoalcalóides presentes em diversas espécies de plantas pertencentes ao gênero *Solanum* estão relacionados com o mecanismo de defesa da planta, agindo contra ataque de organismos patogênicos e herbívoros (RODDICK, 1996). A atividade biológica destes glicoalcalóides está atribuída à inibição de acetilcolinesterase (uma enzima importante na transmissão do impulso nervoso) e a capacidade de se complexar com a membrana esteróide 3β -hidroxilada, causando a perturbação da estrutura da membrana celular eucariótica através da ligação com o componente de esteroide das membranas (RODDICK, 1996; RODDICK 2001).

Os compostos α -solamargina e β -solamarina são muito conhecidos por estarem envolvidos na inibição do crescimento de diversas células cancerígenas (KUPCHAN et al., 1965; JAHAN et al., 2007; MUNARI et al., 2013). Além disso, ambos os metabólitos apresentam atividade moluscicida (WANYONYI et al., 2002;

QUIJANO et al., 2014). A atividade antifúngica já foi descrita para α -solamargina, a qual inibiu o desenvolvimento micelial dos fungos *P. medicaginis* e *R. solani* (FEWELL; RODDICK; WEISSENBERG, 1994). A bioatividade da leptinina I está relacionada com a inibição da herbívoros causada pelo besouro-da-batata (*Leptinotarsa decemlineata*) o qual é responsável por perdas entre 30-50% em plantações de batata (SHAKYA; NAVARRE, 2008; TAI et al., 2014). O que demonstra que os compostos α -solamargina, β -solamarina e leptinina I, “supostamente” avaliados neste trabalho, apresentam as mais diversas bioatividades. Além da bioatividade destes compostos, em algumas plantas do gênero *Solanum* é comum encontrar dois glicoalcalóides (alcalóides emparelhados), os quais apresentam uma aglicona em comum, e muitos destes compostos podem interagir sinergicamente (RODDICK; RIJNENBERG, 1987; RODDICK et al., 1988; FEWELL; RODDICK, 1993; FEWELL et al., 1994).

No trabalho realizado por Roddick, Rijnenberg e Weissenberg (1990) foi demonstrado que o composto α -solamargina causou a desestruturação da membrana lipídica, numa concentração $>50 \mu\text{M}$, enquanto que a α -solasonina foi ineficaz em até $150 \mu\text{M}$. No entanto, quando avaliados em conjunto ocorreu sinergismo entre as moléculas. Estes mesmos glicoalcalóides também foram avaliadas em conjunto e individuais sobre protoplastos (*Penicillium notatum*) e eritrócitos (bovinos). O resultado do ensaio demonstrou que ambos glicoalcalóides causaram lise na membrana celular e nos protoplastos, sendo que solamargina foi mais agressiva, e quando avaliados em conjunto, ocorreu sinergismo.

BAGALWA et al. (2010) realizaram um estudo biomonitorado com *S. sisymbriifolium*, e observaram que a fração B, obtida após separações cromatográficas, apresentava uma bioatividade mediana a vários organismos (insetos aquáticos, peixes, larvas e moluscos), enquanto que a fração C, apresentava alta bioatividade, sendo considerada como biocida para alguns organismos avaliados. Ambas as frações foram analisadas por RMN para identificação dos compostos bioativos, sendo que a fração B apresentou o composto α -solamargina, e na fração C foram encontrados dois compostos α -solamargina e β -solamarina. Segundo os autores, a fração B (α -solamargina) poderia ser utilizada como um moluscicida, pois não apresenta uma alta toxicidade como a demonstrada pela fração C, o que evitaria efeitos prejudiciais para o meio ambiente.

Com esses resultados, podemos sugerir que o composto que apresenta atividade fungitóxica a *M. pernicioso* é da classe dos glicoalcalóides. Para confirmar a identidade do composto, seria necessária após a purificação final do composto, a aquisição de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para compará-la com os dados da literatura e com moléculas padrões dos compostos, pois apesar de alguns glicoalcalóides apresentarem o mesmo peso molecular e o mesmo perfil de fragmentação, estes podem ser compostos diferentes.

Ainda assim, apesar do composto ativo já ser conhecido na literatura, e a sua bioatividade já descrita para alguns organismos, é a primeira vez que se relata a atividade antifúngica para o fitopatógeno *M. pernicioso*.

Referência

- AGRA, M.F.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M.G.; SILVA, T.M. Ocorrência de Flavonas, Flavonóis e seus Glicosídeos em Espécies do Gênero Solanum (Solanaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, 517-522, 2003.
- AZIZ, A.; RANDHAWA, M.A.; BUTT, M.S.; ASGHAR, A.; YASIN, M.; SHIBAMOTO, T. Glycoalkaloids (α -chaconine and α -solanine) contents of selected Pakistani potato cultivars and their dietary intake assessment. **Journal of Food Science**. Champaign, v. 77, n.3, p.58-61, 2012.
- BAGALWA, J.J.M.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; SAYAGH, C.; BASHWIRA, A.S. Evaluation of the biological activity of the molluscicidal fraction of Solanum sisymbriifolium against non target organisms. **Fitoterapia**, Milan, v.81, p. 767–771, 2010.
- BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and Antifungal Activity of Plants Used in Traditional Medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.111, p. 396–402, 2007.
- CACERES, A.; LOPEZ, B.R.; GIRON, M.A.; LOGEMANN, H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 31, p. 263-276, 1991.
- CAHILL, M.G.; CAPRIOLI, G.; VITTORI, S.; JAMES, K.J. Elucidation of the mass fragmentation pathways of potato glycoalkaloids and aglycons using Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v.45, p.1019–1025, 2010.

CHEN, Y.; DAI, G. Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum lagenarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.92, p. 1937–1943, 2012

CATALDI, T.R.I.; LELARIO, F.; BUFO, S.A. Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, London, v.19, p. 3103–3110, 2005.

D'ARCY, W.G., The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Solanaceae III – Taxonomy, chemistry, evolution. Ed HAWKES, J.G. ; LESTER, R.N.; NEE, M. ; ESCHAD, N. (ED.). London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1991. p.75-137.

DISTL, M.; WINK, M. Identification and Quantification of Steroidal Alkaloids from Wild Tuber-Bearing Solanum Species by HPLC and LC-ESI-MS. **Potato Research**, Wageningen, v.52, p.79–104, 2009.

FEWELL, A.M.; RODDICK, J.G.; WEISSENBERG, M. Interactions between the glycoalkaloids solasonina and solamargina in relation to inhibition of fungal growth. **Phytochemistry**, London, v. 37, p. 1007-1011, 1994.

FRANCA, F.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.29, p.229–232, 1996.

FRIEDMAN, M.; McDONALD, G.; HADDON, W.F. Kinetics of acid catalyzed hydrolysis of potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.42, p.1956–1964, 1993.

GHISALBERTI, E. Steroidal glycoalkaloids: isolation, structure, analysis and biosynthesis. por extenso **Natural Product Communications**, Westerville, v.10, p. 859–884, 2006.

IJIMA, Y.; WATANABE, B.; SASAKI, R.; TAKENAKA, M.; ONO, H.; SAKURAI, N.; UMEMOTO, N.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D.; AOKI, K. Steroidal glycoalkaloid profiling and structures of glycoalkaloids in wild tomato fruit. **Phytochemistry**, London, v.95, p.145–157, 2013.

INAGAKI, H.; YAMAGUCHI, A.; KATO, K.; KAGEYAMA, C.; YOZUMI, H.; OKI, I. Screening of weed extracts for antifungal properties against *Colletotrichum lagenarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber. **Weed Biology and Management**, Carlton, v. 8, p. 276–283, 2008.

KUHN, R.; LÖW, I. Zur Konstitution der Leptine. Por extenso **Chemische Berichte**, Weinheim, v.94, p.1088–1095, 1961.

KUPCHAN, S.M.; BARBOUTIS, S.J.; KNOX, J.R.; CAM, L. Beta solamarina: tumor inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. **Science**, New York, v.150, p. 1827-1828, 1965.

KURONEN, P.; VAANANEN, T.; PEHU, E. Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous profiling of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 863, p. 25-35, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas daninhas no Brasil**: terrestre, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa, 1982. 180p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

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

MOHY-UD-DIN, A.; ZAHEER-UD-DIN K.; MUSHTAQ, A.; MUHAMMAD, A. Chemotaxonomic Value of Alkaloids in *Solanum nigrum* Complex. **Pak. Journal of Botany**, New York, v.42, n.1, p.653-660, 2010.

MUNARI, C.C.; OLIVEIRA, P.F.; CAMPOS, J.C.; MARTINS, P.; COSTA, J.C.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. Antiproliferative activity of *Solanum lycocarpum* alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine, in tumor cell lines. **Journal of natural medicines**, Tokyo, v.68, n.1, p.236-241, 2013.

OGG JR, A.G.; BS ROGERS, B.S.; SCHILLING, E.E. Characterization of black nightshade (*Solanum nigrum*) and related species in the United States. **Weed Science**, Champaign, v.29, n.1, p.27-32, 1981.

QUIJANO, M.; RIERA-RUÍZ, C.; BARRAGÁN, A.; MIRANDA, M.; ORELLANA, T.; MANZANO, P. Molluscicidal activity of the aqueous extracts from *Solanum mammosum* L., *Sapindus saponaria* L. and *Jatropha curcas* L. against *Pomacea canaliculata*. **Emirates Journal Food Agriculture**, United Arab Emirates, v.26, n.10, p.871-877, 2014.

RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. Weed ecology: implications for management. 2nd.ed. New York: Wiley, 1997. 588p.

RODDICK, J.G.; DRYSDALE, R.B. Destabilization of liposome membranes by the steroidal glycoalkaloid R-tomatine. **Phytochemistry**, London, v.23, p.543–547, 1984.

RODDICK, J.G. Steroidal glycoalkaloids: nature and consequences of bioactivity. In: WALLER, G.R. YAMASAKI, K. (Ed). **Saponins Used in Tradicional amd Modern Medicine**. New York: Plenum Press,, 1996 p. 277-295.

- RODDICK, J.G. RIJNENBERG, A.L. Synergistic interaction between potato glycoalkaloids solanine and chaconine in relation to destabilization on cell membranes: ecological implications. **Journal of Chemical Ecology** New York, v.14, p. 889-901, 1988.
- RODDICK, J.G. RIJNENBERG, AL.; OSMAN, S.F. Synergistic interaction between the potato glycoalkaloids solanine and chaconine in relation to lysis of phospholipid/sterol liposomes. **Phytochemistry**, London, v. 26, p. 1325-1328, 1987.
- RODDICK, J.G. RIJNENBERG, A.L.; WEISSENBERG, M. Alterations to the permeability of liposome membranes by the solasodina-based glycoalkaloids solasonina and solamargine. **Phytochemistry**, London, v.31, p. 1951-1954, 1992.
- RODDICK, J.G.; WEISSENBERG, M.; LEONARD, A.L. Membrane disruption and enzyme inhibition by naturally-occurring and modified chacotriose-containing Solanum steroidal glycoalkaloids. **Phytochemistry**, London, v.56, p.603–610, 2001.
- SHAKYA, R.; NAVARRE, D.A. LC-MS Analysis of Solanidane Glycoalkaloid Diversity among Tubers of Four Wild Potato Species and Three Cultivars (*Solanum tuberosum*). **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington , v.56, p.6949–6958, 2008.
- SILVA, B.P.; CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.C.A.; SOUZA, M.C.; MAGÁRIO, F. B. Interferência de caruru-de-mancha, maria-pretinha, picão-preto e tiririca em tomateiro industrial. **Bragantia**, Campinas, v.69, n.2, p.313-318, 2010.
- STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILCA, M.; GIACOMIN, L. 2012. *Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000225>>. Acesso em: 08 ago. 2014.
- STOBIECKI, M.; MATYSIAK-KATA, I.; FRANSKIC, R.; SKALA, J.; SZOPA, J. Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry. **Phytochemistry**, London, v.62, p.959–969, 2003.
- TAI, H.H.; WORRALL, K.; PELLETIER, Y.; KOEYER, D.; CALHOUN, L.A. Comparative Metabolite Profiling of *Solanum tuberosum* against Six Wild Solanum Species with Colorado Potato Beetle Resistance. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v.62, p.9043–9055, 2014.

7 POTENCIAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS DA PLANTA *Acnistus arborescens* PARA O CONTROLE DE *Phytophthora cinnamomi*

Resumo

Fungos fitopatogênicos são responsáveis por causar perdas significativas na agricultura. Atualmente o controle de fitopatógenos é realizado por métodos químicos, biológicos e físicos, no entanto alguns fungos desenvolvem resistência a estes métodos, o que torna necessário o desenvolvimento constante de alternativas para o controle. Plantas pertencentes à família Solanaceae apresentam compostos potencialmente inibidores de crescimento de micro-organismos, sendo assim, a investigação química e biológica destes compostos é de extrema importância, podendo se tornar uma alternativa no controle de fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi explorar o potencial biológico e químico de metabólitos secundários produzidos por *Acnistus arborescens* bioativos na inibição do desenvolvimento do fitopatógeno *Phytophthora cinnamomi*. A separação dos compostos foi biomonitorada por ensaios de atividade *in vitro* ao fitopatógeno. A fração bioativa com melhor grau de pureza indicou que os compostos ativos são da classe química dos vitanolidos, muito provavelmente se trata do composto 7 β -acetoxivitanolido D, que é conhecido na literatura por apresentar atividade citotóxica a diversos tipos de câncer e também a outras doenças infecciosas a humanos. Apesar do composto ativo já ser conhecido na literatura, é a primeira vez que se relata uma atividade antifúngica a fitopatógeno para a classe destes compostos.

Palavras-chaves: *Phytophthora cinnamomi*; *Acnistus arborescens*; Metabolitos secundários; Inibição; Produtos naturais

Abstract

Pathogenic fungi are responsible for causing significant losses in agriculture. Currently the control of pathogens is accomplished by chemical, biological and physical, though some fungi develop resistance to these methods, which makes necessary the development of alternatives to constant control. Plants belonging to the family Solanaceae present compounds potentially inhibiting the growth of micro-organisms, so the chemical and biological investigation of these compounds is extremely important and can become an alternative for control of plant pathogens. The aim of this study was to explore the potential biological and chemical secondary metabolites produced by *Acnistus arborescens* showing bioactivity against the development of pathogen *Phytophthora cinnamomi*. The separation of the compounds was biomonitorated by *in vitro* activity assays to the pathogen. The bioactive fraction with better purity indicated that the active compounds are chemical class of withanolides, most likely it is the 7 β -acetoxylwithanolide D compound, which is known in the literature by presenting cytotoxic activity to various types of cancer and also to other diseases infectious to humans. Despite the active compound already known in the literature, is the first time that reports an antifungal activity the pathogen to the class of these compounds.

Keywords: *Phytophthora cinnamomi*; *Acnistus arborescens*; Secondary metabolites; Inhibition; Natural products

7.1 Introdução

Acnistus arborescens (L.) Schltd., conhecida popularmente como marianeira ou fruto-do-sabiá é uma planta pertencente ao gênero *Acnistus* Schott da família Solanaceae A. Juss, e é considerada como uma espécie nativa da América do Sul e Central. Por ser uma planta bastante resistente ao frio e ao calor, a sua distribuição geográfica no Brasil ocorre em todos os estados próximos as regiões da mata atlântica desde o nordeste até o sul do país (HAWKES et al. 1991; HUNZIKER 2001; STEHMANN, et al. 2014).

Acnistus arborescens (*A. arborescens*) é uma planta arbustiva, de rápido crescimento, podendo atingir de 2 a 4 metros de altura, suas folhas são simples e grandes (10 a 30 cm de comprimento, membranáceas, ovadas a lanceoladas), produz inflorescências caulinares de flores brancas tubulares em cachos, os frutos são pequenos (0,7 a 1,2 cm) com haste longa, e quando maduros são alaranjados (Figura 32) (CARVALHO; BOVINI, 2006). É uma espécie de planta que vem sendo muito utilizada no reflorestamento e recuperação de mata nativa, pois seus frutos são muito apreciados por diversas espécies de aves (ATHIÊ; DIAS 2012).

Figura 32 - *Acnistus arborescens*, espécie de planta pertencente à família Solanaceae

Fonte: http://ilovenature123.blogspot.com.br/2012/01/arvores-do-brasil-93_6563.html

A solanácea *A. arborescens* apresenta propriedades medicinais, sendo muito utilizada popularmente no tratamento de doenças do fígado e do baço. Um estudo

sobre os compostos em seu extrato confirmou a presença do esteroide, o vitanolido vitaferina A (Figura 33) (isolado também da planta indiana *Withania somnifera*), bastante conhecido por apresentar atividade citotóxica a células cancerígenas (KUPCHAN et al., 1969; CHEN; HE; QIU, 2011; ZHANG et al., 2012).

Figura 33 – Estrutura geral da classe dos vitanolidos e estrutura do composto - vitaferina A. Adaptado Zhang et al., 2012

Os vitanolidos são compostos pertencentes ao grupo dos vitaesteróides que apresentam um esqueleto ergostano C28 em que os C-26 e C-22 ou C-26 e C-23 são oxidados a fim de formar um δ ou γ -lactona. Esta classe é conhecida pela diversidade de estruturas que envolvem o núcleo do esteróide e a cadeia lateral, incluindo a formação de anéis adicionais. Comumente, por serem compostos altamente oxigenados, pode ocorrer a fissão ou ciclização do anel e rearranjos no esqueleto, resultando em diversos compostos (TOMASSINI et al., 2000; CHEN; HE; QIU, 2011).

Mesmo após a descoberta da vitaferina A (1º vitanolido isolado) a comunidade científica continua tendo interesse por compostos desta classe, devido às suas características estruturais e suas atividades farmacológicas antitumoral, anti-inflamatórias e imunomoduladores (KUPCHAN et al., 1969; BARATA, 1970; HABTERMARIAM, 1997; MINGUZZI et al., 2002; MISICO et al. 2002; VERAS et al., 2004). Atualmente existem descritos 22 esqueletos de carbono (estrutura) diferentes, que deram origem a 750 vitanolidos. Esses compostos foram isolados de 25 gêneros

(*Acnistus*, *Datura*, *Deprea*, *Discopodium*, *Dunalia*, *Lochroma*, *Jaborosa*, *Lycium*, *Nicandra*, *Physalis*, *Solanum*, *Trechonaetes*, *Tubocapsicum*, *Vassobia*, *Withania* e *Witheringia*) da família Solanaceae. Também já foram encontrados em outras famílias de plantas como na Dioscoreaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Taccaceae, e já foram encontrados em duas espécies de gênero marinhos da família Alcyoniidae (ZHANG et al., 2012).

Por ter apresentado atividade fungitóxica promissora, o objetivo deste estudo foi investigar o extrato das folhas de *A. arborescens* na atividade ao fitopatógeno *P. cinnamomi*.

7.2 Material e Métodos

As folhas da planta *A. arborescens* foram coletadas na região de Piracicaba – SP, em maio de 2013. Com um exemplar foi confeccionada uma exsicata que teve sua identificação confirmada.

As folhas foram destacadas, lavadas, secas em estufa de circulação forçada a 40° C e em seguida trituradas. Este pó foi submetido à extração por infusão (água destilada 100° C) e em seguida foi filtrada, gerando um extrato bruto. O extrato bruto foi submetido a 3 partições líquido-líquido independentes, com água e solventes orgânicos (n-butanol, acetato de etila, diclorometano). Foram obtidas seis frações que foram avaliadas por ensaio biológico *in vitro* antifúngico, conforme descrito (4.6.4), na concentração de 10 mg por disco de papel filtro.

A fração n-butanólica foi submetida à separação cromatográfica por permeação em gel do tipo Sephadex LH-20, com eluição isocrática de metanol. As frações obtidas foram reunidas seguindo similaridade química observadas por CCD, resultando em 13 frações (nomeadas AA1 a AA13). As 13 frações foram avaliadas por ensaio biológico (1mg). As frações AA4 a AA7 foram reunidas e renomeadas para AA4 e foram submetidas à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada Sep-Pak (nas mesmas condições da última cromatografia realizada, porém alterando as proporções de solventes) com fase estacionária de sílica-gel e fase móvel em gradiente de diclorometano e metanol. Desta, foram obtidas 5 frações, que foram avaliadas por CCD e ensaio de atividade, as frações AA4A e AA4B foram reunidas e renomeadas em AA4A, com esta fração foi realizada uma nova separação cromatográfica em coluna pré-empacotada Sep-Pak e foram

obtidas 6 frações. A fração AA4A1 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV, utilizando-se uma coluna de sílica derivatizada com C₁₈ e como fase móvel em modo gradiente água:metanol (30:70), a corrida cromatográfica foi monitorada nos comprimentos de onda 254 nm. Nesta foram obtidas 8 frações (AA4A1A-AA4A1H), as quais foram avaliadas por ensaio biológico. A fração AA4A1C foi selecionada para ser analisadas por CLAE-UV-ELSD-MS e por CLAE-MS/MS. Todas as separações cromatográficas foram monitoradas por ensaio biológico *in vitro* ao fitopatógeno *P. cinnamomi*.

O fluxograma (Figura 34) apresentado a seguir sumariza os procedimentos realizados com *A. arborescens*.

Figura 34 - Fluxograma dos processos realizados com *P. cinnamomi*

Legenda:

M = Massa; B = Bioensaio qualitativo; R = Rendimento;

a = Partição líquido-líquido em água e n-butanol, acetato de etila e diclorometano; CCD = Cromatografia em Camada Delgada; b = Eluição isocrática em metanol; c = Fase móvel em gradiente de diclorometano e metanol; c = Fase móvel em gradiente de diclorometano e metanol; e = Fase móvel em modo gradiente água:metanol.

7.3 Resultados e discussões

A planta *A. arborescens* foi selecionada para uma investigação química mais aprofundada, pelo fato de seu extrato bruto ter apresentado inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno *P. cinnamomi* (100%) dados apresentados no item 5.

O extrato bruto de *A. arborescens* foi submetido a partições líquido-líquido gerando seis frações, que foram submetidas a avaliação em ensaio biológicos a *P. cinnamomi*, como mostra a Figura 35.

Figura 35 - Ensaio de atividade antifúngica contra *P. cinnamomi* com as frações obtidas por partição líquido-líquido com os solventes orgânicos (10 mg por disco de papel filtro), após 7 dias de incubação em B.O.D. Legenda: Fr. = Fração

Com este ensaio foi possível verificar que as três frações orgânicas, n-butanol (76%), acetato de etila (74%) e diclorometano (68%) foram ativas. A única fração aquosa que apresentou atividade foi aquela particionada com diclorometano. Este resultado demonstrou que a partição realizada com este solvente orgânico não foi eficiente, na extração dos compostos ativos. Este fato foi verificado pois as duas frações geradas nesta partição se apresentaram ativas, ainda que não se possa

atribuir se os mesmos compostos foram para fases diferentes ou se ocorre a presença de compostos com características químicas diferentes que possuem atividade fungitóxica.

As frações orgânicas acetato de etila e n-butanólica foram analisadas quimicamente em cromatografia de camada delgada (CCD). Após eluição dos compostos na placa, foi realizada uma inspeção sob a luz UV (nos comprimentos de ondas 254 e 365 nm). O resultado obtido demonstrou que ambas frações, apresentaram perfil cromatográfico semelhante, sendo que alguns compostos absorvem no comprimento de onda 254 nm, outros em 365 nm e outros em ambos comprimentos.

Portanto, por ter apresentado perfil semelhante e porcentagem de inibição maior em relação às outras, a fração n-butanólica foi submetida a uma cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20. Desta, foram obtidas 13 frações (AA1 - AA13), que foram avaliadas em ensaio biológico *in vitro* antifúngico (qualitativo) contra *P. cinnamomi* na concentração de 1 mg por disco de papel filtro (Figura 36).

Figura 36 - Ensaio de atividade antifúngica para *P. cinnamomi* com as frações obtidas da cromatografia de permeação em gel de Sephadex (1 mg por disco de papel filtro), após 7 dias de incubação em B.O.D

Neste ensaio pudemos verificar que várias frações inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno. As frações AA4, AA5, AA6 e AA7, foram as que

apresentaram maior ação fungitóxica a *P. cinnamomi*, enquanto que as frações AA3, AA8, AA12 se apresentaram moderadamente ativas. O perfil cromatográfico de todas as frações obtidas foram avaliadas quanto à similaridade química (CCD).

Ao avaliar a CCD, pode-se notar que as frações AA4, AA5, AA6 e AA7 apresentavam perfis similares, e também demonstraram resultado positivo quando reveladas com os reagentes Dragendorff e PMA, os quais são indicadores de compostos pertencentes à classe dos alcaloides ou a compostos que contém nitrogênio em sua estrutura, e compostos da classe dos esteróis ou terpenos. O resultado obtido foi semelhante ao de Morantes et al. (2006) que avaliaram a fração butanólica ativa de *A. arborescens* por CCD, e confirmaram a presença de compostos pertencentes a classe dos esteroides, terpenos e flavonoides glicolizados.

Levando em consideração os parâmetros químicos e biológicos, as frações AA4, AA5, AA6 e AA7 foram reunidas e renomeadas para AA4.

A fração AA4 (ativa) foi submetida a uma cromatografia em coluna Sep-pak com fase estacionária de sílica-gel e fase móvel com gradiente de diclorometano e metanol. Desta cromatografia foram obtidas 5 frações (AA4A - AA4E) que foram avaliadas em ensaio de atividade antifúngica (1mg por papel filtro), como mostra a figura 37.

Figura 37- Ensaio de atividade antifúngica para *P. cinnamomi* com as frações obtidas da cromatografia em coluna Sep-pak® (1 mg por disco de papel filtro), após 7 dias de incubação em B.O.D

O ensaio qualitativo de atividade antifúngica indicou que as frações AA4A e AA4B apresentaram ação fungitóxica a *P. cinnamomi*. Em seguida as frações foram analisadas por CCD e reveladas com os reagentes Dragendorff e PMA. As frações AA4A e AA4B apresentaram perfil químico semelhante e ao serem avaliadas com o revelador Dragendorff apresentaram resultado negativo, e para PMA foram positivas. Este resultado indicou que o composto(s) bioativo(s) presente(s) nesta fração pode ser da classe dos esteroides ou de outros compostos redutores. A partir deste resultado, essas duas frações foram reunidas e renomeadas para AA4A.

A fração ativa AA4A foi submetida a uma separação cromatográfica nas mesmas condições da anterior, somente alterando a proporção da fase móvel. Desta cromatografia foram obtidas 6 frações (AA4A1 - AA4A6) que foram avaliadas em ensaio de atividade antifúngica (0,5 mg por papel filtro), como mostra a Figura 38.

Figura 38 - Ensaio de atividade antifúngica para *P. cinnamomi* com as frações obtidas da cromatografia em coluna Sep-pak (0,5 mg por disco de papel filtro), após 7 dias de incubação em B.O.D.

No ensaio de atividade antifúngica, somente a fração AA4A1, inibiu o crescimento micelial de *P. cinnamomi*. Todas as frações obtidas foram analisadas quimicamente por CCD, e apresentaram perfis diferentes.

A partir destes resultados, a fração AA4A1 foi submetida à análise em espectrômetro de massas CLAE-UV-ELSD-MS, a qual é utilizada para a investigação de compostos, pela medida da relação massa/carga de íons protonados (HOOFFMANN; STROOBANT, 2007). O espectro obtido nesta análise para a fração AA4A1 pode ser observado na Figura 39.

Figura 39- Cromatograma da fração AA4A1. Condições: coluna Waters® XTerra RP18 (4,6 x 250 mm - 5 μ m), A fase móvel empregada foi gradiente água:metanol com fluxo de 0,5 mL min⁻¹.

No cromatograma da fração AA4A1, foi possível observar a presença de cinco picos (referentes a cinco compostos) entre os tempos de retenção (t_R) 18 a 21 minutos. Estes foram analisados individualmente como mostra a figura 40 - A, B, C, D e E, a seguir.

Figura 40 - Espectros de massas das frações AA4A1(A-E). Condições: coluna Waters® XTerra RP18 (4,6 x 250 mm - 5 µm), A fase móvel empregada foi gradiente água:metanol com fluxo de 0,5 mL min⁻¹

Para melhorar o grau de pureza, esta fração foi submetida a uma separação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de UV (CLAE-UV), em fase reversa, utilizando uma coluna de sílica derivatizada com C₁₈ e como fase móvel em modo gradiente água:metanol (30:70), a corrida cromatográfica foi monitorada nos comprimentos de onda 254 nm, como mostra a Figura 41.

Figura 41- Cromatograma da fração AA4A1. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 4,6X250mm, 5µm. Fase móvel água:metanol (30:70), monitorada em 254nm

Foi realizada a separação cromatográfica coletando manualmente os compostos (referentes aos picos ou intervalos) da seguinte forma: AA4A1A (0 a 2,0 minutos), AA4A1B (2,1 a 6,0 minutos), AA4A1C (6,1 a 6,6 minutos), AA4A1D (6,7 a 7,0 minutos), AA4A1E (7,1 a 7,5 minutos), AA4A1F (7,6 a 8,0 minutos), AA4A1G (8,1 a 10 minutos) e AA4A1H (10,1 a 14 minutos). As frações obtidas foram avaliadas em ensaio de atividade antifúngica a *P. cinnamomi*, utilizando 0,5 mg de composto por disco papel filtro, Figura 42.

Figura 42- Ensaio de atividade antifúngica para *P. cinnamomi* avaliando a as frações provenientes da CLAE (0,5 mg por disco de papel filtro), após 7 dias de incubação em B.O.D.

No ensaio de atividade ficou evidente que 5 frações (AA4A1B, AA4A1C, AA4A1D, AA4A1E e AA4A1G) apresentavam composto(s) bioativo(s) fungitóxicos a *P. cinnamomi*.

Para dar continuidade ao estudo do composto(s) bioativo(s) presente em *A. arborescens*, foi escolhida a fração AA4A1C, por apresentar atividade e maior quantidade de massa. O cromatograma da fração AA4A1C pode ser visualizada na Figura 43.

Figura 43- Cromatograma da fração AA4A1C. Condições: Coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 4,6X250mm, 5µm. Fase móvel água:metanol (30:70), monitorada em 210, 230 e 254nm

A fração AA4A1C foi analisada em espectrômetro de massas CLAE- UV-ELSD-MS, Figura 44, a seguir.

Figura 44- Espectro de massas da fração AA4A1C. Condições: coluna Waters® XTerra RP18 (4,6 x 250 mm - 5 μ m), a fase móvel empregada foi gradiente água:metanol com fluxo de 0,5 mL min⁻¹

O cromatograma obtido para a fração AA4A1C indicou a presença de um composto com t_R 7,5 a 8,5 minutos. No espectrograma da fração, foram obtidos os seguintes valores de m/z 1057,9; 1058,9; 529,4; 511,4; 451,3; 433,3 $[M+H]^+$ e outros de menor intensidade. Estes mesmos valores de m/z , obviamente já tinham sido

observados em sua fração precursora AA4A1 (Figura 40-B). A partir desses resultados foi realizada uma busca na literatura, no Dictionary of Natural Products e SciFinder utilizando os valores m/z e as demais informações sobre a espécie da planta.

As plantas do gênero *Acnistus* (Solanaceae) são conhecidas por produzirem compostos com lactonas esteroidais C28 conhecidas como vitaesteróis e podem ser classificadas como acnistinas, vitanolidos, jaborols, e vitafisalininas (MINGUZZI; BARATA, 2002; ZHANG et al., 2012). Quando os compostos pertencentes à classe dos vitanolidos, são analisados em espectrometria de massas, é comum ocorrer a presença do fragmento m/z 169 $[M+H]^+$, o qual corresponde à fissão entre C17 e C20 da molécula (Figura 45).

Figura 45 - Fragmentação de um vitanolídeo – rompimento entre C17 e C20 da molécula, dando origem ao fragmento m/z 169. Adaptado (Zhang et al., 2012)

O valor de m/z 169 $[M+H]^+$ foi observado em nosso espectro de massa na Figura 44, apesar deste equipamento gerar espectros de baixa resolução e sem a possibilidade de fragmentar a molécula

Segundo Silverstein, Webster (2007), as ligações C-C próximos a um heteroátomo frequentemente se quebram, deixando a carga no fragmento que contém o heteroátomo, cujos elétrons não ligantes estabilizam o fragmento por ressonância. No entanto, existem mais de 750 compostos descritos, e a identificação destes não são simples somente pela observação deste tipo de espectro.

A partir dos resultados obtidos realizou-se uma análise em outro espectrômetro de massas CLAE-MS/MS - Ion Trap (Esquire 3000 plus), com a fração AA4A1C, para avaliar o perfil de fragmentação da molécula (Figura 46).

Figura 46 - Cromatograma da fração AA4A1C - em CLAE-MS/MS - Ion Trap (Esquire 3000 plus). Coluna Phenomenex Gemini C-18 4,6X250mm, 5 μ m. A fase móvel empregada foi gradiente água:metanol (80:20)

No cromatograma da fração AA4A1C, pode-se confirmar que ocorre a presença de dois picos com t_R 10,0 a 11,0 minutos.

A análise de fragmentação em MS/MS da fração AA4A1C foi realizada para observar quais os íons moleculares estavam presentes no t_R 10,0 e 11,5 minutos (Figura 47).

Figura 47- Espectro de MS/MS obtido da fração AA4A1C - Ion Trap (Esquire 3000 plus)

No espectro de MS/MS da fração AA4A1C pode-se observar a presença de quatro íons moleculares m/z 529,2; 1057,5; 511,2 e 451,2 $[M+H]^+$ e outros de

menores intensidades. A partir destes resultados optou-se por realizar a fragmentação de dois íons moleculares m/z 529,2 (Figura 48) e 1057,5 (Figura 49) $[M+H]^+$.

Figura 48 - Espectro de MS/MS obtido da fração AA4A1C, m/z 529,2 - Ion Trap (Esquire 3000 plus)

O espectro de MS/MS do íon molecular m/z 529,2 $[M+H]^+$ apresentou seis fragmento de m/z 511,1; 493,1; 451,1; 433,0; 415,3 e 387,1 $[M+H]^+$. Ao analisar os fragmentos pode-se sugerir que ocorreu a fragmentação do íon molecular m/z 529,2 devido à perda consecutiva de molécula de água $[M + H - 1H_2O]^+$, gerando o fragmento m/z 511,1, que novamente perde uma água (-18 u.m.a.), gerando o fragmento m/z 493,1 e entre os fragmentos m/z 451,1 e m/z 415,3 também ocorreu a perda consecutiva de duas moléculas de água $[M + H - 2H_2O]^+$. Segundo Silverstein, Webster (2007), em compostos hidroxilados lactonas, o processo de quebra é favorecido nas ligações dos átomos de carbono ramificados, ou seja, quanto mais ramificado mais provável é a quebra, o que explica a perda consecutiva de moléculas de H_2O .

A fragmentação do íon molecular m/z 1057,8 $[M+H]^+$ pode ser observado na Figura 49.

Figura 49 - Espectro de MS/MS obtido da fração AA4AIC, m/z 1057,5 - Ion Trap (Esquire 3000 plus)

No espectro de MS/MS do íon molecular m/z 1057,8 foram obtidos os fragmentos de m/z 1039,4; 511,1 e 451,1. Ao analisar os valores obtidos no espectro podemos sugerir que o íon de m/z 1057,8 perde uma molécula de água gerando o m/z 1039,4 e o m/z 529,2 também perde uma água gerando o m/z 511,1. Outro resultado obtido com a análise dos fragmentos é que o íon molecular m/z 1057,8 é um dímero do íon molecular de m/z 529,2; pois este corresponde ao dobro do valor mais uma unidade de massa referente à protonação.

Segundo Hoffmann, Stroobant (2007), a dimerização de íons ($M + M + H$) ou em ordem mais elevada, ocorre com frequência em análise de espectrometria de massas devido ao nível de energia envolvida durante a fragmentação da molécula. Os espectrômetros de massas acoplados com analisadores do tipo ion trap, apresentam um campo elétrico em seu interior que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantêm “aprisionados” mantendo-os em uma órbita estável, quando um potencial de radio frequência é aplicado, os íons são desestabilizados, ocasionando um aumento na energia da colisão das moléculas; nesta situação pode ocorrer uma transferência de carga de um fragmento carregado para outro fragmento neutro, o qual pode ser proveniente da molécula ou ser ainda um produto neutro qualquer da matriz (AZEVEDO, 2004; CROTTI et al., 2006; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Com este resultado podemos sugerir que o íon molecular de m/z 529 $[M+H]^+$, é o possível valor do composto bioativo de *A. arborescens*. Com esse dado, foi

realizada uma nova busca na literatura, no Dictionary of Natural Products® e SciFinder®.

Para o íon molecular de m/z 529 $[M+H]^+$, foi encontrado um composto de mesmo valor, o vitanolido 7 β -acetoxivitanolido D (7 β -acetoxi-4 β ,20 R -dihidroxy-5 β ,6 β -epoxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide) presente no extrato de folhas da solanácea *A. arborescens* (Figura 50) (BARATA, et al., 1970; MINGUZZI et al., 2002).

Figura 50 - Estrutura 7 β -acetoxivitanolido D ($C_{30}H_{40}O_8$) – Número de registro CAS 30655-47-1- Adaptado Minguzzi et al., 2002

Mesmo com fortes indícios de ser a mesma molécula encontrada no nosso trabalho, o padrão de fragmentação não foi a mesma descrita pelo autor Minguzzi et al. (2002) onde o padrão de fragmentação foi diferente dos valores obtidos em nosso trabalho. Os valores de m/z da literatura foram: 468 $[M-HOAc]^+$; 403 $[M-125]^+$; 385 $[M-125-H_2O]^+$; 343 $[M-125-HOAc]^+$; 325 $[M-125-HOAc-H_2O]^+$; 169 e 126 $[M+H]^+$.

Contudo, já era de se esperar que não fossem idênticos ao nosso. Isso porque o equipamento utilizado foi diferente, e as energias de colisão, bem como outros parâmetros utilizados também foram diferentes, o que gerou fragmentos com adutos e consequentemente valores de m/z diferentes dos obtidos em nosso trabalho.

Este trabalho ainda, realizado por Minguzzi et al. (2002), também avaliou a atividade citotóxica (enzima quinona redutase) do vitanolido 7 β -acetoxivitanolido D em células de hepatocarcinoma murinho (Hepa 1c1c7). O resultado do ensaio demonstrou que 7 β -acetoxivitanolido D induziu a atividade da enzima quinona

redutase (QR), apresentando IC_{50} de 0,45 mg/ mL enquanto que a do controle positivo 4'- Bromoflavona foi de $IC_{50} >0,20$ mg/ mL, evidenciando seu potencial quimiopreventivo. Segundo Pezzuto et al. (2005) as substâncias capazes de induzir a produção de QR, são de grande importância, pois estas possuem atividade quimiopreventiva comprovada contra a iniciação do câncer.

No entanto, não é possível afirmar que todos os vitanolidos induzem a enzima QR, como demonstrado pela pesquisa realizada por Misico et al. (2002) que avaliaram 37 vitanolidos isolados de diversas espécies de plantas, quanto ao potencial para induzir a enzima QR contra células cancerígenas (Hepa 1c1c7). Neste estudo, 8 vitanolídeos não apresentaram quaisquer nível de indução a enzima QR e outros 5 vitanolidos apresentaram baixa atividade com valores IC_{50} entre 42,7 e 58,4 μ M em comparação com a atividade do controle positivo, o composto sulforafano (IC_{50} entre 11,7 μ M). Estes resultados demonstram que o mecanismo de ação para muitos vitanolidos ainda não foram confirmados.

A atividade citotóxica de 7 β -acetoxivitanolido D e de seus derivados (acetilação e hidrogenação) também foram avaliados contra outros tipos de células tumorais e foram comparados com os de camptotecina (fármaco com atividade antitumoral). Os resultados mais significativos para 7 β -acetoxivitanolido D foi obtido em células cancerígenas do cólon humano com valores de ED_{50} de 0,03 μ g/mL, próximo ao da camptotecina ($ED_{50} = 0,02$ μ g/mL). Os derivados de 7 β -acetoxivitanolido D (acetilação) e (hidrogenação) apresentaram um aumento da atividade citotóxica para as células cancerígenas de pulmão em relação ao seu precursor, com ED_{50} de 0,19 e 0,63 μ g/mL, respectivamente, enquanto que, 7 β -acetoxivitanolido D apresentou $ED_{50} = 1,30$ μ g/mL e camptotecina $ED_{50} = 0,01$ μ g/mL (MINGUZZI; BARATA; CORDELL, 2011).

A camptotecina é um alcaloide pentacíclico altamente insaturado que contém um sistema de anéis quinolônicos (anéis A e B), um anel piridona (anel D) e um anel α -hidroxilactona terminal (anel E). A sua estrutura apresenta um centro quiral (C-20) no anel lactônico (Figura 51); este composto é extraído e isolado das cascas da árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae), e seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima topoisomerase I, a qual está envolvida nos processos de transcrição e replicação do DNA (DEY; WARNER, 1996).

Figura 51 - Estrutura da camptotecina.

Adaptado (Dey; Warner, 1996)

O mecanismo bioquímico de ação dos vitanolídeos presentes na solanácea *Datura metel* L. também foi estudado por Bellila et al. (2011). Estes foram avaliados quanto à citotoxicidade nas células de adenocarcinoma de colon (DLD-1). Os compostos Daturametelin B e Withametelin foram altamente citotóxicos contra as células cancerosas (DLD-1) com $IC_{50} = 0,6$; $0,7$ respectivamente. A partir deste resultado foram conduzidos experimentos para avaliar o seu modo de ação. A análise foi realizada por citometria de fluxo para avaliar o ciclo celular e a camptotecina (induz a parada do ciclo celular na fase S e início G2) foi utilizada como controle positivo. Os resultados obtidos demonstraram que ambos vitanolídeos induziram uma acumulação de células DLD-1 na fase S (43-77% de células) em comparação com 33% para células não tratadas. Segundo os pesquisadores, uma possível explicação para este resultado é que os vitanolídeos possuem um anel de lactona em sua estrutura, e este poderia estar relacionado com a inibição da atividade da topoisomerase I como a camptotecina. Além deste resultado, também foi demonstrado que os compostos Daturametelin B e Withametelin em dose baixa ($0,1 \mu M$) induzem a apoptose das células (93% e 67% respectivamente) e em dose elevada ($5 \mu M$) ocorre a necrose celular (80%); estes resultados sugerem que os vitanolídeos avaliados neste estudo podem apresentar mais de um mecanismo de ação sobre as células cancerosas.

As maiores das pesquisas realizadas com os compostos pertencentes à classe dos vitanolidos avaliam a atividades anticancerígenas (MISICO et al., 2002; MINGUZZI et al., 2002; VERAS et al., 2004; MORANTES et al., 2006; CORDERO et al., 2009; ROUMY et al., 2010; MINGUZZI; BARATA; CORDELL, 2011; ZHANG, et al., 2012; ALALI et al., 2014). São poucos os trabalhos que avaliam a bioatividade destes compostos sobre outro organismo, como demonstrado por Roumy et al. (2010), que realizaram o isolamento de compostos bioativos, presentes em folhas de

A. arborescens e os avaliaram contra 13 fungos responsáveis por infecções humanas. Os resultados obtido demonstraram que somente o fungo *Pneumocystis carinii* apresentou inibição do crescimento micelial (41% de inibição do crescimento em $1\mu\text{g mL}^{-1}$) com a fração MeOH de *A. arborescens*. A purificação da fração metanólica de *A. arborescens* biomonitorado contra *Pneumocystis carinii*, levou ao isolamento de três compostos pertencentes à classe dos vitanolidos.

As informações obtidas em pesquisas que avaliam o mecanismo de ação e outros testes toxicológicos, bem como a determinação ideal de doses são de extrema importância.

Como conclusão, podemos sugerir que o composto que apresenta atividade fungitóxica a *P. cinnamomi* é da classe dos vitanolidos, e muito provavelmente se trata do composto 7 β -acetoxivitanolido D. Para assertivamente confirmar a identidade do composto ativo, seria necessário após a purificação da fração, obter os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para confirmar a presença do C28 e se seus deslocamentos químicos estão em total conformidade com a estrutura sugerida. Adicionalmente uma análise em infravermelho também seria útil para indicar a presença de grupamentos de hidroxila, carbonila, grupo acetoxi, lactona insaturada, cetona cíclica com anéis de seis membros e funções C=C.

Ainda assim, apesar do composto ativo já ser conhecido na literatura, é a primeira vez que se relata uma atividade antifúngica a um fitopatógeno para classe destes compostos.

Referências

ALALI, F.Q.; AMRINE, C.S.M.; EL-ELIMAT, T.; ALKOFABI, A.; TAWAHA, K.; GHARAIBAH, M.; SWANSON, S.M.; FALKINHAM, J.O.; CABEZA, M.; SANCHEZ, A.; FIGUEROA, A.; OBERLIES, N.H. Bioactive withanolides from *Withania obtusifolia*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.9, p.96–101, 2014.

ATHIE, S.; DIAS, M.M. Frugivoria por aves em um mosaico de Floresta Estacional Semidecidual e reflorestamento misto em Rio Claro, São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 26, p.84-93, 2012.

AZEVEDO, D.A. **Espectrometria de Massas**. Instituto de Química. Rio de Janeiro :Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

BARATA, L.E.S.; MORS, W.B.; KIRSON, I.; LAVIE, D. A new withanolide isolated from *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.42, p.401–407, 1970.

BELLILA, A.; TREMBLAY, C.; PICHETTE, A.; MARZOUK, B.; MSHVILDADZE, V.; LAVOIE, S.; LEGAULT, J. Cytotoxic activity of withanolides isolated from Tunisian *Datura metel* L. **Phytochemistry**, London, v.72, p.2031–2036, 2011.

CARVALHO, L.A.F.C.; BOVIN, M.G.. SOLANACEAE NA RESERVA RIO DAS PEDRAS, MANGARATIBA, RIO DE JANEIRO – BRASIL. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro v.57, p.75-98, 2006.

CHEN, L.X.; HE, H.; QIU, F. Natural withanolides: an overview. **Natural product reports**, London, v. 28, 705, 2011.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v.31,n.3, p.623-636, 2008.

CORDERO, C.P.; MORANTES, S.J.; PAEZ, A.; RINCON, J.; ARISTIZABAL, F.A.; Cytotoxicity of withanolides isolated from *Acnistus arborescens*. **Fitoterapia**, Milano, v.80, p.364-368, 2009.

CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, São Paulo, vol.29, 2006.

DEY, J.; WARNER, I.M. Excited state tautomerization of camptothecin in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v.101, p.21-27, 1996.

HABTEMARIAM, S. Cytotoxicity and immunosuppressive activity of withanolides from *Discopodium penninervium*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, p.275–276, 1997.

HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; NEE M, ESTRADA, N. Solanaceae. Taxonomy, Chemistry, Evolution, London: Kew: Royal Botanic Gardens; v. 27, p.19, 1991.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Ed.. John Wiley, 2007. 489p.

HUNZIKER, A.T. Genera Solanacearum: The genera of Solanaceae Illustrated, Arranged According to a New System. Gantner, Ruggell (Liechtenstein). 2001.

KUPCHAN, S. M.; ANDERSON, W. K.; BOLLINGER, P.; DOSKOTCH, R. W.; SMITH, R. M.; SAENZ RENAULD J. A.; SCHNOES, H. K.; BURLINGAME, A. L.; SMITH, D. H. Tumor Inhibitors. XXXIX. Active principles of *Acnistus arborescens*. Isolation and structural and spectral studies of withaferin A and withacnistin. **Journal Organic Chemistry**, New York, v. 34, p. 3858-3866, 1969.

MINGUZZI, S.; BARATA, L.E.S.; CORDELL, G.A. derivados citotóxicos de vitanolidos isolados das folhas de *Acnistus arborescens*. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n.2, p.237-241, 2011.

MINGUZZI, S.; BARATA, L.E.S.; SHIN, Y.G.; JONAS, P. F.; CHAI, H.B.; PARK, E. J.; PEZUTTO, J.M.; CORDELL, G.A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 635-641. 2002.

MISICO, R.I.; SONG, L.L.; VELEIRO, A.S.; CIRIGLIANO, A.M.; TETTAMANZI, M.C.; BURTON, G.; BONETTO, G.M.; NICOTRA, V.E.; SILVA, G.L.; GIL, R. R.; KINGHORN, A.D.; PEZZUTO, J.M. Induction of quinone reductase by withanolides. **Journal of natural Products**, Cincinnati, v.65, 677-680, 2002.

MORANTES, S. J.; PÁEZ, A.; CORDERO, C. P.; RINCÓN, J.; ARISTIZÁBAL, F. A.; Actividad Citotóxica y Análisis Fitoquímico de Fracciones Aisladas del Extracto Etanólico total de *Acnistus arborescens*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.25,n.4, p.491-496, 2006.

PEZZUTO, J.M.; KOSMEDER II, J.W.; PARK, E. ; LEE, S.K.; CUENDET, M.; GILLS, J.; BHAT, K.; GRUBJESIC, S.; PARK, H.S.; MATA-GREENWOOD, E.; TAN, Y.M.; YU, R.; LANTVIT, D.D.; KINGHORN, A.D. Characterization of natural product chemopreventive agents. **Cancer Chemoprevention: Strategies for Cancer Chemoprevention**. Totowa: Humana Press, v. 2, cap.1, , 2005. p. 3-37.

ROUMY, V.; BIABIANI, M.; HENNEBELLE, T.; ALIOUAT, M.; POTTIER, M.; JOSEPH, H.; JOHA, S.; QUESNEL, B.; ALKHATIB, R.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F. Antifungal and Cytotoxic Activity of Withanolides from *Acnistus arborescens*. **Journal of natural products**, Cincinnati, v. 73, p. 1313–1317, 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Espectrometria de massas. In: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, cap. 1, p. 1-35, 2007.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILCA, M.; GIACOMIN, L. 2012. *Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000225>>. Acesso em: 08 ago.2014.

TOMASSINI, T.C.B.; BARBI, N.S.; RIBEIRO, I.M.; XAVIER, D.C.D. Gênero *physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química nova**, São Paulo v. 23, n.1, 2000.

VERAS, M.L.; BEZERRA, M.Z.B.; LEMOS, T.L.G.; UCHOA, D.E.A.; BRAZ-FILHO, R.; CHAI, H.B.; CORDELL, G.A.; PESSOA, O.D.L. Cytotoxic Withaphysalins from the Leaves of *Acnistus arborescens*. **Journal of natural products**, Cincinnati, v. 67, p. 710-713, 2004.

ZHANG, H.; SAMADI, A.K.; COHEN, M.S.; TIMMERMANN, B.N. Anti-proliferative withanolides from the Solanaceae: a structure-activity study. **Pure and applied chemistry**, London, v.84, n.6, p.1353–1367, 2012.

8 POTENCIAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS DA PLANTA

Physalis peruviana PARA O CONTROLE DE *Phytophthora cinnamomi*

Resumo

As plantas da Família Solanaceae apresentam capacidade em biossintetizar diversos metabólitos secundários com atividade biológica, dentre estes, alguns são potencialmente inibidores de crescimento de fungos. Neste contexto, a investigação destes compostos corrobora no aumento de alternativas para solucionar problemas na agricultura, como danos causados por fungos fitopatógenos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica do extrato bruto das folhas de *Physalis peruviana* contra o fitopatógeno *P. cinnamomi*. A separação dos compostos bioativos presentes no extrato de *P. peruviana* foi realizada por técnicas cromatográficas e todas as etapas foram biomonitoradas por ensaios de atividade *in vitro* ao fitopatógeno. A fração ativa com maior grau de pureza foi submetida a uma análise em CLAE- MS/MS e sua análise indicou a presença do composto pertencente a classe dos vitanolidos. Esta é a primeira vez que se relata uma atividade antifúngica ao fitopatógeno *P. cinnamomi* para a classe destes compostos.

Palavras-chave: *Physalis peruviana*; *Phytophthora cinnamomi*; Inibição; Metabolitos secundários; Produtos naturais

Abstract

The plants of the Solanaceae family has ability to biosynthesize many secondary metabolites with biological activity, among them, some are potentially fungal growth inhibitors. In this context, investigation of these compounds confirms the increase of alternatives to solve problems in agriculture, such as damage caused by plant pathogens fungi. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of the crude extract of the leaves of *Physalis peruviana* against the pathogen *P. cinnamomi*. The separation of bioactive compounds present in *P. peruviana* extract was performed by chromatographic techniques and all steps were biomonitor activity by the pathogen *in vitro* assays. The active fraction with higher purity was subjected to an analysis in HPLC- MS/MS and their analysis indicated the presence of the compound belonging to the class of withanolides. This is the first time that reports an antifungal activity to pathogen *P. cinnamomi* for the class of these compounds.

Keywords: *Physalis peruviana*; *Phytophthora cinnamomi*; Inhibition; Secondary metabolites; Natural products

8. 1 Introdução

Physalis peruviana L. é uma espécie de planta pertencente ao gênero *Physalis* L.(família Solanaceae) o qual atualmente é representado por 120 espécies de plantas, que estão distribuídas nas zonas temperadas do globo terrestre até a América do Sul. No Brasil, encontram-se distribuídas entre os estados do Sul, Sudeste e algumas regiões do Nordeste (AHMAD et al., 1999; HUNZIKER et al., 2001; LORENZI; MATOS, 2002; STEHMANN et al., 2014).

Physalis peruviana L. (*P. peruviana*) é uma planta herbácea, perene e ramificada podendo chegar a 2,0 metros de altura. Suas folhas, flores e frutos apresentam um denso número de tricomas, o que confere a estes órgãos uma superfície aveludada. Apresentam flores solitárias, pedunculadas e hermafroditas, seus frutos carnosos se apresentam em forma de bagas e quando maduros são alaranjados e saborosos, conferindo alto valor nutricional e econômico (SOARES et al., 2009) (Figura 52).

Figura 52- *Physalis peruviana*, espécie pertencente a família Solanaceae

Fonte: <http://www.fancyplants.de/encontent/plants/physalis.htm>

Diversas espécies de *Physalis* são consumidas devido às propriedades medicinais que lhe são atribuídas, como: antiespasmódico, diurético, anti-séptico, sedativo, analgésico, vermífugo, antidiabético, malária, asma, (PERRY, 1980; WU et al. 2004; ZAVALA et al., 2006; FRANCO et al., 2007; PUENTE et al., 2011).

Devido às propriedades bioativas de *P. peruviana*, vários estudos estão sendo realizados para isolar e identificar os seus compostos, sendo que diversos compostos pertencentes a classe das fisalinas (fisalina A, fisalina B) e dos vitanolidos (piperunolido A, vitanolido E, vitanolido C) (Figura 53) foram isolados e avaliados por ensaios de atividade contra o desenvolvimento de células cancerígenas e foram ativos (WU et al., 2004; LAN et al., 2009; PUENTE et al., 2011).

Figura 53 - Compostos bioativos isolados de *Physalis peruviana*

Segundo Tomassini et al. (2000), o gênero *Physalis* é o mais evoluído na família Solanaceae devido ao nível de oxidação biogenética, conferindo a presença de metabólitos polioxigenados, derivado do ergostano C28, com grupos funcionais dos tipos lactonas, epóxidos e enonas. O sistema enzimático, nas plantas do gênero *Physalis* possui habilidade de oxidar o átomo de carbono do núcleo esteroidal e da cadeia lateral, com exceção aos carbonos C-8, C-9 e C-11. Essa função proporciona a ocorrência de uma variedade de estruturas, que podem ser classificadas em oito grupos: vitanolidos (1), vitanolidos “modificados” (2), vitafisalinas (4), acnistinas (5)

ixocarpalactonas (6), perulactonas (7), fisalinas (8) conforme demonstra a Figura 54, a seguir.

Figura 54 - Estruturas dos vitaesteróides.

Fonte: Tomassini et al., 2000

Estes oito grupos estruturais encontram-se distribuídos entre plantas pertencentes à família Solanaceae, principalmente entre os gêneros: *Acnistus*,

Datura, *Deprea*, *Dunalia*, *Ioichroma*, *Jaborosa*, *Lycium*, *Nicandra*, *Physalis*, *Salpichroa*, *Trechonates*, *Tubocapsicum*, *Withania* e *Witheringia* (TOMASSINI et al., 2000).

Devido ao fato do extrato bruto de *P. peruviana* ter apresentado atividade fungitóxica promissora, o objetivo deste estudo foi aprofundar a investigação do extrato das folhas de *P. peruviana* ao fitopatógeno *P. cinnamomi*.

8.2 Material e Métodos

As folhas de *P. peruviana* foram coletadas na região de Piracicaba – São Paulo em maio de 2011. Com um exemplar foi confeccionada uma exsicata que teve sua identificação confirmada.

As folhas foram destacadas, lavadas, secas em estufa de circulação forçada a 40° C e em seguida trituradas. Este pó foi submetido a extração por infusão em água destilada 100° C, em seguida foi filtrada, gerando um extrato bruto.

O extrato bruto foi submetido a 3 partições líquido-líquido independentes, com água e solventes orgânicos (n-butanol, acetato de etila, diclorometano). Foram obtidas seis frações que foram avaliadas por ensaio biológico *in vitro* (10 mg por disco de papel filtro estéril).

A fração n-butanólica foi submetida à separação cromatográfica por permeação em gel do tipo Sephadex LH-20, com eluição isocrática de metanol. As frações obtidas foram reunidas seguindo similaridade química observadas por CCD, resultando em 9 frações (nomeadas PP1 a PP9). As 9 frações foram avaliadas por ensaio biológico *in vitro* por disco difusão (1 mg por disco de papel filtro estéril). A fração PP3 (PP3+PP4) foi submetida à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada Sep-Pak com fase estacionária de sílica-gel e fase móvel em gradiente de diclorometano e metanol. Desta foram obtidas, após reunião por similaridade química, 4 frações, que foram nomeadas por PP3A-PP3D, e foram avaliadas em ensaio de bioatividade (1 mg por disco de papel filtro estéril). A fração PP3A foi a que apresentou a melhor inibição ao fitopatógeno, e esta foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV, utilizando-se uma coluna de sílica derivatizada com C₁₈ e como fase móvel em modo gradiente água:metanol (60:40), a corrida cromatográfica foi monitorada em 210, 233, 254, 265 e 280 nm.

Desta foram obtidas 8 frações (PP3A1-PP3A8), as quais foram avaliadas por ensaio biológico (0,5 mg por disco de papel filtro estéril) e as frações PP3A3(ativa) foi selecionada para ser analisada em CLAE-UV-ELSD-MS e CLAE-MS/MS. Todas as etapas cromatográficas foram monitoradas por ensaios biológicos *in vitro* antifúngicos ao fitopatógeno *P. cinnamomi*.

A seguir está exposto o fluxograma (Figura 55) resumizando todos os procedimentos realizados com *P. cinnamomi*.

Figura 55- Fluxograma dos processos realizados com *P. cinnamomi*

Legenda:

M = Massa; B = Bioensaio qualitativo; R = Rendimento;

a = Partição líquido-líquido em água e n-butanol, acetato de etila e diclorometanos;

b = Eluição isocrática em metanol;

c = Fase móvel em gradiente de diclorometano e metanol; d = Fase móvel em modo isocrático água:metanol;

CCD = Cromatografia em Camada Delgada.

8.3 Resultados e discussões

O extrato bruto de folhas de *P. peruviana* foi avaliado por ensaio de atividade *in vitro* antifúngico a seis fitopatógenos (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. solani*, *M. perniciosa* e *P. cinnamomi*). O resultado do ensaio biológico demonstrou que *P. peruviana* inibiu em 100% o crescimento micelial do fitopatógeno *P. cinnamomi*. A partir deste resultado promissor do extrato bruto de *P. peruviana*, foi realizado um estudo do(s) composto(s) bioativo(s)

O extrato bruto de *P. peruviana* foi submetido a 3 partições líquido-líquido, obtendo-se 6 frações que foram submetidas à ensaio de atividade fúngica (10 mg por disco de papel filtro), conforme demonstrado na figura 56.

Figura 56 - Ensaio de atividade antifúngica contra *P. cinnamomi* com as frações obtidas por partição líquido-líquido com os solventes: n-butanol, acetato de etila e diclorometano (10 mg por disco de papel filtro), após 7 dias de incubação em B.O.D. Legenda: Fr. = Fração

O ensaio de atividade antifúngica demonstrou que todas as frações orgânicas obtidas foram ativas contra o crescimento do fitopatógeno *P. cinnamomi*. A porcentagem de inibição foi de 73, 65 e 56% para as frações n-butanol, acetato de etila e diclorometano, respectivamente.

A partição utilizando o solvente orgânico n-butanol se mostrou um pouco mais eficiente do que as outras, na extração dos compostos ativos. A fração aquosa

obtida, nesta partição não apresentou atividade inibitória ao fitopatógeno. Já nas outras frações aquosas é possível observar uma pequena atividade, indicando que os solventes orgânicos acetato de etila e diclorometano, não extraíram todos os compostos bioativos a *P. cinnamomi*, o que pode ser comprovado pelo ensaio de bioatividade, pois apresentaram uma menor porcentagem de inibição.

Dependendo do solvente orgânico utilizado na partição, é possível extrair compostos de diversas classes químicas, com as mais diversas aplicações. Shariff et al. (2010) testaram os extratos orgânicos (metanol, clorofórmio, benzeno e éter de petróleo) obtidos das folhas de *Physalis minima* contra os fungos *Aspergillus ochreaceous*, *Aspergillus flavipes*, *Fusarium verticilloides* e *Penicillium* sp. O extrato orgânico obtido com clorofórmio foi mais eficaz contra os fungos patogênicos, em que MCI foi de 2 mg L⁻¹ para *A. ochreaceous* e *A. flavipes*, e de 4 mg L⁻¹ para *F. verticilloides* e *Penicillium* sp. O extrato metanólico também foi ativo, sendo a MCI de 6 mg L⁻¹ (*A. ochreaceous*), 10 mg L⁻¹ (*A. flavipes*), 2 mg L⁻¹ (*F. verticilloides*), e 20 mg L⁻¹ (*Penicillium* sp). Os extratos obtidos com os solventes orgânicos benzeno e éter de petróleo foram ineficazes na extração dos compostos inibidores do crescimento fungos.

Como a fração n-butanólica foi a que apresentou a maior atividade contra o fitopatógeno avaliado, essa foi selecionada para investigação. A fração n-butanólica foi submetida à separação cromatográfica de permeação em gel em coluna Sephadex LH-20, eluída com MeOH. Nesta separação foram obtidas 12 frações, que foram analisadas por CCD (eluente: 7 diclorometano:3 metanol e inspecionadas sob luz UV em 254 e 365 nm, e reveladas com os reagentes Draggendorf e PMA). O resultado foi positivo quando analisado com o revelador PMA, o que indica a presença de esteróis e derivados lipídicos nas frações.

Nathiya e Dorcus (2012) realizaram um estudo fitoquímico dos extratos orgânicos de *P. mínima*, com nove reveladores de classes de compostos (alcalóides, antraquinonas, flavonóides, glicosídeos cardíacos, fenóis, saponinas, esteróides, taninos e terpenos). O resultado obtido demonstrou que os extratos orgânicos avaliados foram positivos a oito reveladores, sendo que as confirmações mais promissoras foram as que indicaram a presença de taninos, terpenos e flavonóides, e a única classe de composto não encontrada foi das antraquinonas.

As frações que apresentaram similaridade química foram reunidas, resultando em 9 frações (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, PP6, PP7, PP8 e PP9), que

foram submetidas ao ensaio de atividade antifúngica a *P. cinnamomi* na concentração de 1 mg por disco de papel filtro estéril (Figura 57).

Figura 57- Ensaio de atividade antifúngica a *P. cinnamomi* com as frações (1 mg por disco de papel filtro) obtidas na cromatografia Sephadex LH-20, após 7 dias de incubação em B.O.D. Legenda C = controle metanol

No ensaio de atividade antifúngica, das nove frações avaliadas, as frações PP3 e PP4 foram as que apresentaram maior inibição ao crescimento de *P. cinnamomi* em comparação ao seu controle. Essas frações foram reunidas e recodificadas para PP3.

A fração PP3 (ativa) foi submetida à cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak com fase estacionária de sílica-gel (5g) e fase móvel em gradiente de diclorometano e metanol. Após a separação cromatográfica foram obtidas 7 frações, e essas foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança no perfil químico, resultando em 4 frações que foram codificadas por PP3A, PP3B, PP3C, PP3D, e avaliadas em ensaio de atividade antifúngica (Figura 58).

Figura 58 - Ensaio de atividade antifúngica a *P. cinnamomi* com as frações (1 mg por disco de papel filtro) obtidas na cromatografia coluna pré-empacotada Sep-Pak com fase estacionária de sílica-gel (5g) e fase móvel em gradiente de diclorometano e metanol, após 7 dias de incubação em B.O.D.

Neste ensaio de atividade foi possível verificar que todas as frações apresentaram alguma porcentagem de atividade contra o desenvolvimento do fitopatógeno, o que sugere que pode ocorrer a presença de mais de um composto bioativo.

A fração PP3A foi que apresentou maior inibição ao fitopatógeno e foi submetido a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de UV (CLAE-UV), utilizando-se uma coluna de sílica-gel (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ de dimensões 250 x 4,6 mm), em modo gradiente MeOH/H₂O 60:40, monitorada em 210, 233, 254, 265 e 280 nm. O cromatograma obtido através do CLAE da fração PP3A é apresentado na Figura 59.

Figura 59 - Cromatograma da fração PP3A. Condições: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 4,6X250mm, 5 μ m., eluentes metanol e água, comprimento de onda 201, 233, 254, 265 e 280 nm.

No cromatograma é evidenciada a presença de vários compostos, que observados sob a luz UV do detector são representados por picos (ou bandas) em diferentes tempos de retenções (t_R). A utilização de vários comprimentos de ondas demonstrou que alguns compostos presentes nessa fração apresentam absorvância específica.

O conhecimento do espectro de absorvância de cada composto presente na amostra permite selecionar o comprimento de onda de máxima absorvância de cada um deles, melhorando a detecção e eliminando possíveis picos interferentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Em seguida foi realizada uma separação cromatográfica em CLAE (nas mesmas condições, descrita anteriormente), coletando os compostos (picos) da fração PP3A, da seguinte forma: PP3A1 (0 a 3,0 minutos); PP3A2 (3,10 a 6,0 minutos); PP3A3 (6,0 a 6,5 minutos), PP3A4 (6,6 a 7,0 minutos), PP3A5 (7,10 a 8,0 minutos), PP3A6 (8,10 a 9 minutos), PP3A7(9,10 a 13,5 minutos) PP3A8 (13,6 a 14,5 minutos). Após a concentração do solvente em sistema de evaporador rotativo as 8 frações obtidas foram avaliadas em ensaio de atividade antifúngica a *P. cinnamomi*, utilizando 0,5 mg de fração por disco de papel filtro, como mostra a Figura 60.

Figura 60- Ensaio de atividade antifúngica a *P. cinnamomi* com as frações (0,5 mg de fração por disco de papel filtro) obtidas após CLAE. Condições: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 4,6X250mm, 5 um., eluentes metanol e água, comprimento de onda 201, 233, 254, 265 e 280 nm.

Neste ensaio de atividade ao fitopatógeno, ficou evidente que algumas frações não apresentaram atividade (PP3A1, PP3A2, PP3A4, PP3A6, PP3A7 e PP3A8) e outras frações apresentaram baixa atividade (PP3A3e PP3A5). A este fato, pode-se relacionar que, foi utilizada uma concentração menor em comparação a outros ensaios realizados, e também pode ser que algum composto seja sinérgico e quando separados perdem ou diminui sua atividade.

As frações foram reinjetadas no CLAE, para analisar se a separação cromatográfica apresentavam compostos isolados. O cromatograma da fração PP3A3 (ativa) apresentou um maior grau de pureza em comparação com as outras frações (Figura 61).

Figura 61- Cromatograma da fração PP3A3. Condições: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 4,6X250mm, 5 μ m., eluentes metanol e água, comprimento de onda 233 nm

A fração PP3A3 foi submetida à análise em espectrometria de massas (CLAE-UV-ELSD-MS), A Figura 62 apresenta o cromatograma, e o espectro de massas em modo positivo da fração PP3A3 pode ser visualizado na Figura 63.

Figura 62- Cromatograma da fração PP3A3. Condições: coluna Waters® XTerra RP18 (4,6 x 250 mm- 5 μ m), A fase móvel empregada foi gradiente água:metanol com fluxo de 0,5 mL min⁻¹

O cromatograma da fração PP3A3 apresentou dois picos majoritário (íon protonado $[M+H]^+$), com t_R 7,067 e 7,766 minutos, que foram selecionados e analisados separadamente.

O espectro de massas para o composto com t_R 7,067 minutos, pode ser observado na Figura 63 a seguir.

Figura 63 - Espectro de massas CLAE-UV-ELSD-MS, modo positivo da fração PP3A3, com t_R 7,067

No espectro de MS da Figura 63, pode-se observar a presença de vários íons moleculares, sendo um majoritário com m/z 169,9 e outros menos intensos m/z 1005,9; 485,4; 773,9 $[M+H]^+$ dentre outros.

O espectro de massas do segundo composto com t_R 7,766 minutos, apresentou dois íons moleculares majoritários m/z 149,2 e 245,2 $[M+H]^+$ e outros com menores intensidades (Figura 64).

Figura 64 - Espectro de massas CLAE-UV-ELSD-MS modo positivo da fração PP3A3, com t_R 7,766

A partir destas informações, foi realizada uma busca por todos esses valores no banco de dados dos programas “SciFinder”, “Dictionary of Natural Products” e na literatura.

Com as informações obtidas, foi possível sugerir que a fração PP3A3 pertence ao grupo dos vitaesteróides, pois o íon molecular m/z 169 é característico de compostos deste grupo, e indica o rompimento entre os carbonos C17 e C20 da molécula (MINGUZZI et al., 2002; CORDERO et al., 2009). Este resultado é semelhante ao obtido no estudo da planta *Acnistus arborescens* (conforme descrito no item 7.3.1).

Com o intuito de se identificar o composto(s) bioativo(s) presente na fração PP3A3, foi realizada uma análise em espectrômetro de massas ion trap (CLAE-MS/MS), para se obter mais informações sobre essa fração. A Figura 65 apresenta o espectro de MS/MS e os espectros de MS/MS dos possíveis picos ativos fragmentados.

Figura 65 - **A)** Espectro de MS/MS em modo positivo da fração PP3A3. **B)** Espectro de MS/MS – fragmentação do pico m/z 1005,9 (t_R 11,2)

Ao analisar os dados obtidos por espectro de MS/MS (Figura 65A) e a fragmentação por MS/MS (Figura 65B) em conjunto, pode-se sugerir que o íon molecular m/z 525,0 $[M + Na]^+$ é um aduto de sódio. Segundo Hoffmann e Stroobant (2007), um aduto é um íon formado pela combinação direta de uma molécula neutra e um íon “ionizante” diferente do próton. E o íon molecular m/z 1005,9 $[2M + H]^+$ é o seu dímero. A partir desses, dados foi realizada uma busca nos bancos de dados para o íon molecular m/z 525,0 $[M + Na]^+$ e compostos pertencentes à classe dos vitaesteróides.

A identificação da classe de um composto, pode ser determinada quando se conhece a fragmentação das moléculas. No estudo de Musharraf et al. (2010) foi analisada a fragmentação de vitanolidos por ESI-QqTOF-MS e CID-MS/MS. A fragmentação da molécula ocorreu pela perda H_2O , seguida de clivagem e rearranjo da lactona. O esqueleto ergostano $[M + H - Lac]^+$, da molécula é indicado pelo íon

m/z 299, com perda subsequente de 2 moléculas de H_2O , apresentando a detecção dos íons m/z 281 e 263.

Esse perfil de fragmentação pode ser observado em nossos resultados, pois ocorreram perdas subsequentes de moléculas de H_2O , como mostra os íons moleculares m/z 485, 467, 449, 431, 413, 395 que correspondem a $[M + H - H_2O]^+$, $[M + H - 2H_2O]^+$, $[M + H - 3H_2O]^+$, $[M + H - 4H_2O]^+$, $[M + H - 5H_2O]^+$, $[M + H - 6H_2O]^+$ respectivamente. O esqueleto ergostano $[M + H - Lac]^+$, da molécula também foi confirmado, devido ao fragmento do íon m/z 299, seguido da perda subsequente de 2 moléculas de H_2O , íons m/z 281 e 263 $[M + H - H_2O]^+$, $[M + H - 2H_2O]^+$. No entanto, não foi possível identificar se a fração PP3A3 é um vitanolídeo do tipo 27-Deoxi ou 27-Hidroxi (íons m/z 67 e 95), pois não foi possível observar o espectrograma nesta faixa (Figura 66).

Figura 66 – Esquema da fragmentação do íon molecular m/z 525,0 $[M + Na]^+$.

Com estas informações e com as buscas nos bancos de dados, para o íon molecular de m/z 525 $[M+Na]^+$, foi encontrado um composto de mesmo valor, a vitaperuvina L ((20S,22R)-5 β ,6 β -epoxy-7 β ,14 α ,17 β ,20-tetrahydroxy-1-oxowitha-2,24-dien-26,22-olide) presente no extrato de folhas da solanácea *P. peruviana* (Figura 67) (FANG, LIU, LI, et al., 2012).

Figura 67- Estrutura vitaperuvina L ($C_{28}H_{38}O_8$) – Número de registro CAS 1353093-19-2

Adaptado Fang, Liu, Li, et al., (2012)

No trabalho de Fang et al. (2012) o composto vitaperuvina L, também apresentou um aduto de sódio m/z 525 $[M+Na]^+$ e um dímero com m/z 1027 $[2M+Na]^+$. No entanto, os valores de m/z do espectro de fragmentação do composto, não foram informados pelos autores. Com isto não possível realizar a comparação entre os resultados. A atividade biológica de vitaperuvina L não foi descrita até o momento.

Para o íon molecular de m/z 525 $[M+Na]^+$, também foi encontrado um outro composto de mesmo valor, a isocarpalactona B ((17*R*,20*R*,22*S*,23*S*,24*R*,25*R*)-4β,20β,22α-trihydroxy-5β,6β;16β,23-diepoxy-1-oxowitha-2-en-26,23-olide) presente no extrato de folhas da solanácea *P. philadelphica* (Figura 68) (SU et al., 2002).

Figura 68 - Estrutura isocarpalactona B ($C_{28}H_{38}O_8$) – Número de registro CAS 71801-44-0

Adaptado Su et al., (2002)

No trabalho de Su et al. (2002) foi realizada a fragmentação da isocarpalactona B e os valores obtidos de m/z foram: 502 $[M]^+$; 485 $[M-OH]^+$; 484

$[M-H_2O]^+$; 361 $[M-125-OH]^+$; 356; 283; 189; 175; 169; 147 e 95. Neste caso, já era esperado que os valores de m/z não fossem idênticos aos de nosso estudo, pois os parâmetros utilizados e os equipamentos foram diferentes.

A identificação do composto bioativo presente no extrato das folhas *P. peruviana* é grande importância, já que muitos compostos pertencentes ao gênero *Physalis* apresentam algum tipo de atividade.

No trabalho de Su et al. (2002) a atividade citotóxica (enzima quinona redutase) do composto isocarpalactona B foi avaliada em células de hepatocarcinoma murinho (Hepa 1c1c7). O resultado obtido demonstrou que isocarpalactona B apresenta atividade quimiopreventiva. Ding et al. (2014) também avaliaram a atividade citotóxica de sete vitanolidos isolados de *P. angulata*. O ensaio demonstrou que todos os vitanolidos avaliados induziram a atividade da enzima quinona redutase, porém dentre estes, fisagulina N, vitaminimina e fisagulina Q, foram mais promissores do que o controle positivo 4'-Bromoflavona.

Lan et al. (2009), a partir da investigação química dos extratos etanólico das folhas *P. peruviana*, isolaram sete compostos pertencentes à classe dos vitanolidos, e avaliaram sua atividade citotóxica. Dentre os sete vitanolidos isolados, quatro se apresentaram altamente citotóxicos a células cancerígenas do pulmão, mama e fígado. O composto fisalina B (isolado de *P. alkekengi*) apresenta atividade citotóxica comprovada contra células cervicais uterinas (HeLa), em células de hepatoma (SMMC – 7721) e em linhagem celulares tumorais (HL-60) (Li et al., 2014).

A atividade contra micro-organismos com os extratos de plantas pertencentes ao gênero *Physalis*, também já vou relatada, como demonstrada por Tomassini et al. (2005) que realizaram um estudo da atividade antimicrobiana do composto fisalina B e uma fração mista de fisalinas (B, D, F, G) isolados de *P. angulata*, contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans* por ensaio de difusão em ágar. Os resultados obtidos demonstraram que somente a bactéria *S. aureus* apresentou inibição (85%) ao composto fisalina B (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$); já a fração mista de fisalinas (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou inibição de 100% sobre o patógeno. Os pesquisadores concluíram que o composto fisalina B é o maior responsável pela atividade bacteriana em *P. angulata*.

Para *P. peruviana*, um estudo realizado recentemente por Goztok e Zengin (2013) demonstraram que os frutos desta espécie apresentam propriedades microbianas ao serem avaliadas contra bactérias (*Bacillus megaterium*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*), leveduras (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*) e dermatófitos (*Trichophyton* sp. e *Epidermophyton* sp.). Todos os micro-organismos avaliados demonstraram sensibilidade aos extratos dos frutos de *P. peruviana* sendo que a MCI variou entre 128µg/mL (*E. aerogenes*) e 1054 µg/mL (*E. coli*).

O extrato etanólico de *P. virginiana* apresenta propriedades antibacterianas, pois foi eficaz no controle de cepas bacterianas Gram positivas. A citotoxicidade do seu extrato também foi avaliada por ensaio com *Artemia salina* e demonstrou que os compostos antibacterianos presentes no extrato de *P. virginiana* pode ser tolerado por organismos eucariontes. O isolamento e a identificação do composto foi realizado e sua bioatividade foi atribuída ao composto fisagulina V (GIBSON et al., 2012).

Como conclusão, podemos sugerir que o composto que apresenta atividade fungitóxica a *P. cinnamomi* é da classe dos vitanolidos. No entanto, para a identificação do composto ativo, seria necessária além da purificação do composto, a aquisição de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para confirmar a presença do C28 e se seus deslocamentos químicos estão em conformidade com as estruturas sugeridas. Adicionalmente uma análise em infravermelho também seria útil para indicar a presença de grupamentos de hidroxila, carbonila, grupo acetoxi, δ-lactona ou δ-lactol e γ-lactona ou γ-lactol, cetona cíclica com anéis de seis membros e funções C=C.

Apesar de não ter realizado a identificação do composto ativo, é a primeira vez que se relata uma atividade antifúngica ao fitopatógeno *P. cinnamomi* para a classe destes compostos.

Referências

AHMAD, S.; MALIK, A.; YASMIN, R.; ULLAH, N.; GUL, W.; KHAN, P. M.; NAWAZ, H. R.; AFZA, N. Withanolides from *Physalis peruviana*. **Phytochemistry**, London, v. 5, p. 647-651, 1999.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos da cromatografia, 5.ed. Campinas: UNICAMP, 2006. 456p.

CORDERO, C.P.; MORANTES, S.J.; PAEZ, A.; RINCON, J.; ARISTIZABAL, F.A.; Cytotoxicity of withanolides isolated from *Acnistus arborescens*. **Fitoterapia**, Milano, v.80, p.364-368, 2009.

DING, H.; HU, Z.; YU, L.; MA, Z.; MA, X.; CHEN, Z.; WANG, D.; ZHAO, X. Induction of quinone reductase (QR) by withanolides isolated from *Physalis angulata* L. var. *villosa* Bonati (Solanaceae). **Steroids**, London, v. 86, p.32–38, 2014.

FANG, S.; LIU, J.; LI, BO. Ten new withanolides from *Physalis peruviana*. **STEROIDS**, San Francisco, v.77, p.36–44, 2012.

FRANCO, L.; MATIZ, G.; CALLE, J.; PINZON, R.; OSPINA, L. Antiinflammatory activity of extracts and fractions obtained from *Physalis peruviana* L. calyces. **Biomedica**, Bogota, v. 27, n.1, p.110–115, 2007.

GIBSON, K. A.; REESE, R.N.; HALAWEISH, F.T.; YULIN, R. Isolation and characterization of a bactericidal withanolide from *Physalis virginiana*. **Pharmacognosy Magazine**, Mumbai, v.8, p. 22-28, 2012

GOZTOK, F.; ZENGİN F. The antimicrobial activity of *Physalis peruviana* L. Journal of Science and Technology **BITLIS EREN UNIVERSITY**, Bitlis, v.3, p.15-17, 2013.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Ed.. John Wiley, 2007. 489p.

HUNZIKER, A.T. Genera Solanacearum: The genera of Solanaceae Illustrated, Arranged According to a New System. Gantner, Ruggell (Liechtenstein). 2001.

LI, X.; ZHAO, J.; YANG, M.; LIU, Y.; LI, Z.; LI, R.; LI, X.; LI, N.; XU, Q.; KHAN, I.A.; YANG, S. Physalins and withanolides from the fruits of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and the inhibitory activities against human tumor cells. **Phytochemistry Letters**, Netherlands, v.10, p. 95–100, 2014.

LAN, Y. H.; CHANG, F. R.; PAN, M. J.; WU, C. C.; WU, S. J.; CHEN, S. L.; WANG, S. S.; WU, M. J.; WU, Y. C. New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. **Food Chemistry**, Barking, v.116, n.2, p.462–469, 2009.

LOPES, D.C.D.X.P.; FREITAS, Z.M.F.; SANTOS, E.P.; TOMASSINI, T.C.B. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v.16, p.206-210, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 2., 2002.

MINGUZZI, S.; BARATA, L.E.S.; SHIN, I.G.; JONAS, P.F.; CHAI, H.; PARK, E.J.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G.A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, London, v.59, p.635–641, 2002.

MUSHARRAF, S.G.; ALI, A.; ALI, R.A.; YOUSUF, S.; RAHMAN, S.; CHOUDHARY, M.I. Analysis and development of structure-fragmentation relationships in withanolides using an electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry hybrid instrument. **Rapid communications in mass spectrometry**, London, v. 25, p.104–114, 2011.

NATHIYA, M.; DORCUS, D. Preliminary phytochemical and anti-bacterial studies on *Physalis minima* Linn. **International journal of current microbiology and applied sciences**, Kancheepuram, p.24-30, 2012.

PERRY L.M. **Medicinal plants of East and Southeast Asia**: attributed properties and uses. Springer, Cambridge, Massachusetts, 1980.620p.

PUENTE, L.A.; PINTO-MUÑOZ, C.A.; CASTRO, E.S.; CORTÉS, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research International**, Ottawa, v.44, p.1733–1740, 2011.

SHARIFF, N.; SUDARSHANA, M.S.; UMESHA, S.; HARIPRASAD, P. Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n.10, p. 946-950, 2006.

SOARES, E.L.C.; VENDRUSCOLO, G.S.; VIGNOLI-SILVA, M.; THODE, V.A.; SILVA, J.G.; MENTZ, L.A. O gênero *physalis* L. (*solanaceae*) no rio grande do sul, brasil. **pesquisas, botânica**. São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas, n. 60, p.323-340, 2009.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILCA, M.; GIACOMIN, L.2012. *Solanaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000225>>. Acesso em: 08 ago.2014.

SU. B.; MISICO, R.; PARK, E.J.; SANTARSIERO, B.D.; MESECAR, A.D.; FONG, AH.H.S.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis peruviana*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 58, p.3453-3466, 2002.

TOMASSINI, T.C.B.; BARBI, N.S.; RIBEIRO, I.M.; XAVIER, D.C.D. Gênero *physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química nova**, São Paulo v. 23, n.1, 2000.

WU, S.J.; NG, L.T.; LIN, D.L.; HUANG, S.N.; WANG, S.S.; LIN, C.C. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.215, n.2, p.199–208, 2004.

ZAVALA, D.; MAURICIO, Q.; PELAYO, A.; POSSO, M.; ROJAS, J.; WOLACH, V.
Citotoxic effect of *Physalis peruviana* (capuli) in colon cancer and chronic myeloid
leukemia. **Anales de la Facultad de Medicina**, Uruguay, v.67,n.4, p.283–289, 2006.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de extratos de 15 plantas da família Solanaceae demonstrou que 14 espécies de plantas apresentaram potencial fungitóxico para algum dos fitopatógenos avaliados.

Os extratos das plantas que apresentaram as maiores porcentagens de inibição aos fitopatógenos avaliados neste estudo foram: *A. arborescens* (100% para *P. cinnamomi*), *P. peruviana* (100% para *P. cinnamomi*), *C. intermedium* (100% para *M. perniciosa*), *S. americanum* (93,30% para *M. perniciosa*) e *L. rantonnei* (82,50% para *M. perniciosa*).

As 3 espécies de plantas (Solanaceae), selecionadas para terem o extrato de suas folhas estudados quimicamente foram as espécies *S. americanum*, *A. arborescens* e *P. peruviana*, por terem apresentado resultados promissores.

A fração semipura bioativa de *S. americanum*, após a caracterização química por técnicas espectroscópicas, indicou a presença de compostos pertencentes à classe dos glicoalcalóides.

A fração semipura bioativa de *A. arborescens* obtida por técnicas cromatográficas, demonstrou que o composto ativo pertence a classe dos vitanolidos, sendo sugerida a sua atividade ao composto 7 β -acetoxivitanolido D, a qual é relatada a atividade antifúngica a um fitopatógeno pela primeira vez.

A fração bioativa de *P. peruviana* obtida por técnicas cromatográficas, demonstrou que o composto ativo pertence à classe dos vitanolidos. É a primeira vez que se relata uma atividade antifúngica ao fitopatógeno *P. cinnamomi* para a classe destes compostos.

Estudos mais aprofundados são necessários para realizar a identificação dos compostos bioativos presentes em espécies de plantas da família Solanaceae, além de avaliar a MCI e seus efeitos tóxicos ao meio ambiente e aos seres vivos.

O presente trabalho representa uma nova contribuição científica, pois os extratos e frações semipuras apresentaram-se muito promissoras como inibidoras no desenvolvimento micelial dos fungos e pesquisas realizadas com os metabólitos secundários bioativos de plantas podem contribuir de modo coadjuvante e alternativo no controle de fitopatógenos.