

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

**Estudo químico de compostos de *Solanum lycopersicum* com atividade  
antifúngica para *Moniliophthora perniciosa***

**Felipe Gabriel Andrino**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

Piracicaba  
2010

Felipe Gabriel Andrino  
Engenheiro Químico

**Estudo químico de compostos de *Solanum lycopersicum* com atividade  
antifúngica para *Moniliophthora perniciosa***

Orientador:  
Prof. Dr. **FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

Piracicaba  
2010

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

Andrino, Felipe Gabriel

Estudo químico de compostos de *Solanum lycopersicum* com atividade antifúngica para *Monilophthora perniciosa* / Felipe Gabriel Andrino. - - Piracicaba, 2010.  
67 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.  
Bibliografia.

1. Alcalóides 2. Antifúngicos 3. Basidiomycota 4. Cacau 5. Fungos fitopatogênicos  
Tomate I. Título

CDD 635.642  
A573e

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



## DEDICATÓRIA

A minha família, exemplos de força e dedicação,  
base da minha educação, auxiliando com atenção e carinho  
meu crescimento pessoal e profissional.  
Aos mestres que despertaram a paixão pela ciência e pesquisa,  
souberam ensinar e guiar a direção correta para que  
esse crescimento seja possível e que continue indeterminadamente.  
Àqueles que me inspiram e fazem sempre querer continuar e melhorar.

Obrigado!



## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, **João Wesley Andrino**, **Roseli de Fátima Petroscki** e meu irmão **Victor Gabriel Andrino** que sempre me apoiaram e incentivaram nas minhas decisões, dando força nos momentos difíceis e saboreando as conquistas em conjunto.

- Aos amigos **Luiz Humberto Gomes** e **Keila Maria Roncato Duarte**, minha segunda família, pela convivência de todos esses anos, companhia, ensinamentos, acolhimento, orientação e despertar a paixão pela ciência e pesquisa, desde o início como estagiário aos dias de hoje.

- A Profa. Dra. **Simone Possedente de Lira** por acreditar e possibilitar a realização desta dissertação através dos valiosos ensinamentos, orientação, aconselhamentos, empenho e especialmente pela amizade. Muito Obrigado!

- Ao Prof. Dr. **Flavio Cesar Almeida Tavares** pelo incentivo, confiança e principalmente por sempre “abrir as portas” do Laboratório de Genética de Leveduras desde o início da minha carreira, estrutura esta que possibilitou a execução deste trabalho.

- A **Jeane Maria Cunha Machado** pela companhia, dedicação, amor e principalmente pela paciência e compreensão nos momentos que estive ausente.

- Aos amigos do Laboratório de Genética; **Ana Maria Bracalioni Giacomelli**, **Marcos Antonio Gorga**, **Lia Matelli Garcia**, **Thiago** e **Marina Gumiere**, **Elisa Souza Domingues**, e tantos outros que passaram e tive o prazer de conhecer e compartilhar o ambiente familiar nesses 15 anos de convivência.

- Aos amigos do Departamento de Ciências Exatas e do Setor de Química; **Ana Maria da Silva Maia Michelin**, **Rita de Cássia Leite de Castro**, **Gertrudes Claudia Barbieri Fornazier**, **Lenita Maria C. Pacheco E. Oliveira**, **Janaína Truffi**, **Lindomar Buck Santos**.

- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), através do **Departamento de Ciências Exatas** e especialmente aos Professores do Setor de Química; **Arquimedes Lavorenti, Arnaldo A. Rodella, Marcos Y. Kamogawa, Simone P. de Lira, Marcelo E. Alves**, por possibilitarem minha qualificação profissional enquanto funcionário do departamento.

- Ao Laboratório de Melhoramento de plantas sob responsabilidade do Prof. Dr. **Antonio Vargas de Oliveira Figueira** pela concessão da estrutura laboratorial e especialmente a **Juliana Deganello** pela ajuda no trabalho experimental em casa de vegetação e interpretação dos resultados.

- Ao Prof. Dr. **Roberto G. de S. Berlink** pela disponibilização da estrutura e dos equipamentos sob sua responsabilidade no Instituto de Química de São Carlos/USP

- A pesquisadora Dra. **Maria Stela Stenico** do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA/USP), pela ajuda nas análises cromatográficas.

- Aos **colegas do PPG-Microbiologia Agrícola** e a todos que de uma forma ou de outra participaram na realização desta obra, cujos nomes não foram citados, gostaria de agradecer o carinho e companheirismo.



Se for tentar  
siga em frente!

Senão, nem comece!  
Isso pode significar perder namoradas  
esposas, família, trabalho... e talvez a cabeça.

Pode significar ficar sem comer por dias,  
Pode significar congelar em um parque,  
Pode significar cadeia,  
Pode significar desprezo, desolação...

A desolação é o teste  
O resto é uma prova de sua paciência,  
do quanto realmente quis fazer  
E farei, apesar do menosprezo  
E será melhor que qualquer coisa que possa imaginar.

Se for tentar,  
Vá em frente.

Não há outro sentimento como este  
Ficará sozinho com os Deuses  
E as noites serão quentes  
Levará a vida com um sorriso perfeito  
É a única coisa que vale a pena.

“Charles ‘hank’ Bukowski”



## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE TABELAS .....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 <i>Solanum lycopersicum</i> .....	21
2.2 Metabólitos secundários .....	23
2.3 <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Técnicas microbiológicas .....	33
3.1.1 Linhagens utilizadas .....	33
3.1.2 Meios de cultura e condições de cultivo dos fungos .....	33
3.1.2.1 Meio de cultura TDA.....	34
3.1.2.2 Meio de cultura de extrato de folhas de tomateiro .....	34
3.1.2.3 Meio de cultura de extrato de folhas de tomateiro .....	34
3.1.2.4 Meio de cultura TDA com extrato de folhas de tomateiro .....	34
3.1.2.5 Meio de cultura TDA com extrato de folhas de cacaueteiro .....	35
3.2 Ensaio biológicos .....	35
3.3 Sementes e cultura das plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	35
3.4 Ensaio biológico nas plantas MicroTom .....	36
3.5 Técnicas físico-químicas .....	37
3.5.1 Isolamento do composto químico ativo das folhas de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	37
3.5.2 Isolamento do composto químico ativo dos frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	38
3.6 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas .....	39
3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear- RMN).....	39
3.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC e Espectrometria de Massas – EM .....	39
3.7 Técnicas cromatográficas .....	40
3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada - CCD.....	40

3.7.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada .....	40
3.7.3 Cromatografia em coluna.....	40
3.8 Solventes .....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1 Estudo da bioatividade de extrato bruto das folhas de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	41
4.2 Estudo dos compostos com atividade antifúngica de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	44
4.3 Investigação do composto antifúngico do extrato de folhas de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	45
4.4 Metodologia de obtenção de glicoalcalóides proposta por Friedman (2009) .....	54
4.5 Ensaio de bioatividade da $\alpha$ -tomatina em plantas inoculadas com <i>M. perniciosa</i> .....	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

## RESUMO

### **Estudo químico de compostos de *Solanum lycopersicum* com atividade antifúngica para *Moniliophthora perniciosa***

O fungo fitopatogênico hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença “Vassoura-de-Bruxa” no cacauzeiro (*Theobroma cacao*), é um dos maiores responsáveis pela contribuição do declínio da produção brasileira de cacau e constitui um problema fitopatológico em todas as regiões cacaucultoras. O gênero *Solanum*, do qual faz parte o tomate, berinjela, batata entre outros, é bem conhecido na literatura por conterem compostos que exibem atividade biológica tais como antifúngica, antiviral, moluscida, anticancerígena entre outras. O presente trabalho explorou o potencial de extrato bruto de folhas de *Solanum lycopersicum* como agente inibidor no controle de crescimento e desenvolvimento de três biotipos de *M. perniciosa* (cacau, solanácea e liana). Através de ensaios biológicos e métodos cromatográficos foi identificado o metabólito secundário  $\alpha$ -tomatina como responsável pela atividade antifúngica. Este glicoalcalóide, que apresentou potente atividade antifúngica em ensaios *in vitro*, foi utilizado como agente de controle no desenvolvimento do fungo e manifestação dos sintomas em plantas *in vivo*, onde foi verificado uma redução significativa no número de plantas com sintomas.

Palavras-chave:  $\alpha$ -tomatina; Vassoura de bruxa; Atividade antifúngica; *Moniliophthora perniciosa*



**ABSTRACT****Chemical studies of antifungal compounds from *Solanum lycopersicum* against *Moniliophthora perniciosa***

The hemibiotrophic phytopathogenic fungi *Moniliophthora perniciosa*, agent of witches broom disease of cocoa (*Theobroma cacao*) is one of the major responsible for the Brazilian cocoa production decay and it is a phytopathological problem in every cocoa yield area. *Solanum* genera, from each belongs tomatoes, eggplants, potatoes, among others, is well known as producer of biological activity such as antifungal, antiviral, anti mollus, anticancer, etc. This study explored the potential of crude extract leaves from *Solanum lycopersicum* as an inhibitor agent for the control of growing and development of three *M. perniciosa* biotypes. By the use of biological assays and chromatography,  $\alpha$ -tomatine, a secondary metabolite was identified as responsible for antifungal activity. This glycoalkaloid presented great antifungal activity on *in vitro* assays and it was used on the control and development of witches broom symptoms *in vivo*, where a significant reduction of symptomatic plants could be observed.

Keywords: Alpha-tomatine; Witches broom; Antifungal activity; *Moniliophthora perniciosa*





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da planta de <i>S. lycopersicum</i> com respectiva classificação taxonômica....	22
Figura 2 – Denominação do glicoalcalóide $\alpha$ -tomatina conforme perda dos açúcares.....	25
Figura 3 – Via biosintética e degradativa da $\alpha$ -tomatina nos frutos de <i>S.lycopersicum</i> .....	26
Figura 4 – Principais glicoalcalóides presentes em <i>S.tuberosum</i> .....	26
Figura 5 – Principais glicoalcalóides presentes em <i>S.lycopersicum</i> .....	27
Figura 6 – Modo de ação antifúngica proposta dos glicoalcalóides através da interação com as membranas dos microrganismos .....	28
Figura 7 - Ilustração da planta de <i>T. cacao</i> com respectiva classificação taxonômica .....	29
Figura 8 – Diagrama representando isolamento de compostos bioativos presentes em folhas de tomateiro .....	38
Figura 9 – Esquema ilustrativo do procedimento de extração de glicoalcalóides proposto por Friedman (2009) .....	38
Figura 10 - Ausência de crescimento dos biotipos de <i>M.Perniciosa</i> na fração butanólica quando comparados ao controle e fração aquosa. (FA fração aquosa, FB fração butanólica, C – biotipo cacau, L- biotipo Liana, S- biotipo solanácea.....	45
Figura 11 - Ausência de crescimento do fungo quando na presença das frações obtidas da separação cromatográfica de permeação em gel de Sephadex LH20.....	47
Figura 12 –Espectro de massas das frações obtidas na cromatografia de permeação em gel Sephadex LH20; A- sex1, B- sex2, C- sex3, D- sex4, E- sex5 .....	48
Figura 13 - Fórmula estrutural da molécula $\alpha$ -tomatina .....	49
Figura 14 –Teste de inibição de crescimento das frações obtidas em cromatografia SepPack C <sub>18</sub> .....	50
Figura 15 - Resultado do espectro de massas da fração 4 que demonstrou atividade antifúngica .....	50
Figura 16 - Espectro de massas da solução padrão de $\alpha$ -tomatina.....	51
Figura 17 - Teste de inibição de crescimento do fungo com a $\alpha$ -tomatina padrão; C- controle, 1- 20 ug, 2- 60 ug e 3- 100 ug de padrão .....	52
Figura 18 - Esquema ilustrativo das etapas de extração de folhas de <i>S. lycopersicum</i> , separação e purificação.....	52

Figura 19 - Teste de inibição de crescimento do fungo, utilizando o precipitado obtido na metodologia proposta por Friedman (2009). C controle, 1-1,0 mg, 2-1,5 mg, 3-2,0 mg, 4-2,5mg .....	55
Figura 20 - Resultado do espectro de massas na análise do precipitado .....	55
Figura 21 - Esquema ilustrativo da metodologia de extração de glicoalcalóides de frutos verdes de <i>S. lycopersicum</i> .....	56

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Medidas dos halos de crescimento dos biotipos nos meios testados; medidas em centímetros.....	42
Tabela 2 - Medidas do halo de crescimento dos fungos selecionados para teste de inibição de crescimento em meio de cultivo TDA e TDA+T com respectivos patógenos e aplicações. Medidas em centímetros. ....	43
Tabela 3 - Classificação taxonômica dos fungos selecionados para teste de inibição .....	44
Tabela 4 - Frações obtidas na cromatografia de permeação em gel e renomeadas com suas respectivas massas .....	46
Tabela 5 - Tratamentos utilizados no ensaio de inibição de crescimento do fungo em plantas....	58
Tabela 6 - Médias da evolução das medidas do caules em função dos dias das plantas inoculadas e que receberam os tratamentos.....	58



## 1 INTRODUÇÃO

Há muitos séculos a população humana tem conhecimentos sobre os benefícios da utilização de extratos de plantas e animais para os mais diversos fins, tais como medicina terapêutica, cosméticos, corantes e outros. Muitos destes produtos naturais são amplamente utilizados até os dias de hoje. As plantas, por exemplo, oferecem uma infinidade de compostos orgânicos de grande potencial e ampla utilização. No entanto são necessários estudos interdisciplinares para que seja compreendido, desde a sua identificação estrutural, atividade biológica, síntese, toxicidade, dentre outros.

O Brasil por ser um país de grandes proporções continentais com localização geográfica favorável apresentando os mais diversos climas, condições de solo propício para desenvolvimento das mais diversas espécies, é alvo da comunidade científica na busca de compostos que apresentem alguma aplicação, por exemplo, compostos com atividade biológica, economicamente viável com aplicações médico-farmacológicas, agrônômicas, ou ainda na busca de compostos naturais inéditos na literatura; esses estudos são chamamos de bioprospecção.

Os compostos orgânicos mais estudados para esses fins são conhecidos por metabólitos secundários e estão presentes em vários grupos de seres vivos, que em sua grande maioria parece não participar diretamente do processo de crescimento e desenvolvimento da mesma; geralmente estão distribuídos em concentrações diferentes nos tecidos, e muitas das suas funções ainda permanecem desconhecidas.

Os metabólitos secundários obtidos de matéria-prima vegetal oferecem uma larga variedade de moléculas com grande diversidade em suas estruturas e atividade biológicas. A atividade biológica pode se manifestar por meio de suas propriedades herbicidas, inseticidas, fungicidas ou ainda farmacológicas.

O gênero *Solanum* é o maior e mais complexo gênero da família *Solanaceae*, amplamente distribuída em zonas temperadas e quentes, e apresenta uma grande variedade de espécies incluindo batata, pimenta, berinjela e tomate que produzem metabólitos tóxicos conhecidos como glicoalcalóides esteroidais, que são conhecidos por possuir uma variedade de atividade biológica.

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* é o agente causal da doença Vassoura-de-Bruca no cacauzeiro (*Theobroma cacao*), constitui o maior problema fitopatológico das regiões produtoras de cacau do continente americano e responsável por perdas significativas na produção

brasileira que em dez anos causou queda na produção brasileira de amêndoas em 75%, levando o país da posição de exportador para importador da matéria prima na fabricação de chocolate.

O fungo infecta as regiões meristemáticas da planta, principalmente frutos novos, causando danos nas almofadas florais e enfraquecimento geral da planta e conseqüentemente ocasionando queda acentuada na produção e na qualidade dos frutos e sementes.

Os métodos de controle da vassoura-de-bruxa incluem o controle químico, poda fitossanitária, controle biológico e resistência genética. O controle químico da Vassoura-de-Bruxa com fungicidas de contato não tem se mostrado eficiente, pois eles não protegem os tecidos em crescimento ativo, necessitando inúmeras pulverizações.

O objetivo deste trabalho foi explorar o potencial dos metabólitos secundários produzidos por *Solanum lycopersicum* (tomateiro), como agentes inibidores de crescimento e desenvolvimento do fungo *Monilliophthora perniciososa*.

O isolamento e purificação dos metabólitos secundários presente em *Solanum lycopersicum* foram realizados através de métodos químicos e as frações obtidas avaliadas em ensaios biológicos contra *Monilliophthora perniciososa*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Solanum lycopersicum*

A família *Solanaceae*, da qual faz parte o tomate, batata, berinjela, jiló e outros, compreende cerca de 96 gêneros e três mil espécies, habitando sistemas ecológicos estabelecidos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde a América do Sul está como centro de diversidade e distribuição (FRIEDMAN et al., 2009; GRIFFIN; LIN, 2000; NIÑO; CORREA; MOSQUERA, 2009; WINK, 2003).

O tomate é a 2ª hortaliça mais cultivada, depois da batata, em todo o mundo e apresenta diferentes variedades para atender as diversas demandas do mercado (MELO, 1989; SILVA e GIORDANO, 2000).

O tomateiro é uma dicotiledônea pertencente à família da *Solanaceae* (FILGUEIRA, 2003) e atualmente ao gênero *Solanum* (Figura 1). A nomenclatura científica do tomate tem uma longa história. Antes da classificação de Linnaeus, recebeu vários nomes, entre eles "Poma amoris" (maçã do amor). Por sua vez, Linnaeus classificou o tomate como *Solanum lycopersicum*, sendo incluído no mesmo gênero da batata (*Solanum tuberosum*). Entretanto, algum tempo depois de Linnaeus, taxonomistas decidiram que o tomate realmente pertencia ao gênero *Lycopersicon*. Então, o nome foi mudado para *Lycopersicon lycopersicum*. Todavia, devido à discordância entre os taxonomistas o nome da espécie foi alterado para *esculentum*, tornando-se *Lycopersicon esculentum*. Mais recentemente, alguns trabalhos têm mostrado que o tomate, *Lycopersicon esculentum*, possui uma afinidade genética muito próxima com espécies do gênero *Solanum*. Por conta disso, a classificação filogenética foi revista e o gênero *Lycopersicon* foi reintegrado ao gênero *Solanum* e a espécie voltou a ser *lycopersicum*, nome original dado por Linnaeus. Assim, a seção *Solanum* passou a incluir o tomate cultivado, *S. lycopersicum*, e outras espécies silvestres aparentadas (PERALTA; SPOONER, 2000; PERALTA; SPOONER, 2001).



**Reino:** *Plantae*  
**Divisão:** *Magnoliophyta*  
**Classe:** *Magnoliopsida*  
**Ordem:** *Solanales*  
**Família:** *Solanaceae*  
**Gênero:** *Solanum*  
**Espécie:** *Solanum lycopersicum*

Figura 1 - Ilustração da planta de *S. lycopersicum* com respectiva classificação taxonômica

Fonte: [http://luirig.altervista.org/cpm/albums/britton-brown-7/britt-4074-solanum-lycopersicum-var\\_-lycopersicum.jpg](http://luirig.altervista.org/cpm/albums/britton-brown-7/britt-4074-solanum-lycopersicum-var_-lycopersicum.jpg)

O tomateiro tem sua origem na parte ocidental da Américas do Sul, nas regiões andinas do Peru, Bolívia e Equador (EMBRAPA, 1993; FONTES; SILVA, 2002). Antes da colonização espanhola, o tomate foi levado para o México, que é considerado o centro de domesticação da espécie. Foi introduzido na Europa, via Espanha, entre 1523 e 1554. Da Europa, o tomate se difundiu para outros países, tendo sido reintroduzido nos Estados Unidos provavelmente em 1781, pelos colonizadores. No Brasil, seu hábito de consumo foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX (ALVARENGA, 2004).

As evidências indicam que os italianos, por volta de 1550, já haviam iniciado o cultivo do tomate. Na verdade, o tomateiro era cultivado como uma mera curiosidade, possivelmente pelo valor ornamental de seus frutos e eram considerados venenosos, devido a sua cor avermelhada, intimamente relacionada, à época, com perigo e morte. Sabe-se hoje que o tomate contém um alcalóide, a  $\alpha$ -tomatina, que se encontra em elevada concentração nas folhas e nos frutos verdes e que se degrada em componentes inertes nos frutos maduros (FILGUEIRA, 2003).

Assim sendo, várias espécies do gênero *Solanum*, incluindo batata, pimenta, berinjela e tomate podem conter compostos de interesse do ponto de vista ecológico e econômico (FUKUHARA; SHIMIZU; KUBO, 2004). A produção de metabólitos secundários são conhecidos



por possuir uma variedade de atividade biológica, incluindo antifúngica, antiviral, moluscida, teratogênica, embriotóxica e anticâncer (FRIEDMAN et al., 2009)

## 2.2 Metabólitos secundários

O interesse dos seres humanos por substâncias orgânicas teve sua origem ainda na pré-história onde pigmentos para tintas, perfumes e produtos usados na medicina popular eram basicamente compostos orgânicos, e requeriam algum tipo de extração da sua fonte natural, usualmente plantas. Muitos materiais orgânicos de origem natural foram isolados e purificados no século XIX. O estudo da suas reações constituiu o início da química orgânica, e durante muito tempo, esses produtos naturais constituíam a principal fonte de produtos químicos orgânicos.

O isolamento e o estudo de substâncias naturais é uma área de grande interesse devido sua aplicação nos mais diversos segmentos, desde cosmética, farmacológica, alimentícia, corantes, dentre outras.

Enquanto a bioquímica investiga a química de produtos naturais do metabolismo primário, que produz substâncias amplamente distribuídas nos seres vivos (aminoácidos, lipídios, carboidratos e macromoléculas) a química de produtos naturais do metabolismo secundário (especializado) é estudada por químicos orgânicos, especificamente na área da química de produtos naturais.

Metabólitos secundários são compostos orgânicos que estão envolvidas na adaptação do ser vivo ao meio ambiente, porém não fazem parte das vias bioquímicas primárias do desenvolvimento celular e reprodução (metabolismo primário). Na literatura, outros termos são utilizados para se referir a essas moléculas, de acordo com sua característica; por exemplo, compostos secundários, fotoquímicos, fatores antinutricionais, xenobióticos e aleloquímicos (HSU et al., 1996)

Os metabólitos secundários obtidos de matéria-prima vegetal oferecem uma larga variedade de moléculas com grande diversidade em suas estruturas e atividade biológica. A atividade biológica pode se manifestar por meio de suas propriedades herbicidas, inseticidas, fungicidas e/ou farmacológicas (BRUNETTON, 2001).

Baseado na premissa de que extratos de plantas que contenham os metabólitos secundários possam ser uma fonte promissora de substâncias bioativas, pesquisadores tem

conduzido estudos de bioprospecção usando extratos de plantas que possam exibir potencial antimicrobiano. (PURDY; SCHIMDT, 1996).

Dentre as inúmeras famílias botânicas que apresentam compostos com atividade em potencial, a família Solanácea apresenta elevada contribuição no fornecimento destes compostos, onde a grande parte das plantas do gênero *solanum* apresentam compostos classificados como saponinas, que podem exibir interações com outros animais e microorganismos em um comportamento principalmente de defesa contra fitopatógenos, fatores bióticos e abióticos, entre outros (WINK, 2003; PAUL; SANJAY; BHUTANI, 2008; FRIEDMAN, 2002)

As saponinas são glicosídeos produzidos pelas plantas, principalmente presente na família das solanaceas; são formados por uma aglicona que pode ser um triterpeno ou um esteróide e uma cadeia sacarídica. Possuem elevada massa molecular (600 a 2000 u.m.a.) e ainda podem exibir característica lipofílica ou hidrofílica dependendo de sua estrutura; ligado a triterpenos ou esteróides e açúcares respectivamente. Podem também ser classificadas de acordo com seu caráter ácido, básico ou neutro, de acordo com os grupamentos (carboxila ou nitrogenados) presentes nas frações agliconas, glicosilada ou em ambos (SIMÕES et al., 2004).

Dentre os representantes de saponinas produzidos pelas *solanaceas*, os da família dos alcalóides esteroidais são os mais abrangentes; consistem em uma estrutura de seis anéis esteroidais contendo um nitrogênio (aglicona), com uma fração sacarídica em cadeia de três a quatro açúcares (KEUKENS et al., 1995).

Dentre os glicoalcaloides presentes em *S. lycopersicum*,  $\alpha$ -tomatina consiste em uma tomatidina ligada a um tetrasacarídeo composto de uma xilose, uma galactose duas glicoses; onde a cadeia glicosilada é hidrofílica, a fração esteroidal hidrofóbica e o grupo nitrogenado com característica polar (LAURILA et al., 1996). Quando a molécula  $\alpha$ -tomatina é degradada, a mesma perde um desses açúcares, recebendo uma denominação diferente para a perda de cada açúcar perdido, conforme esquema da Figura 2.

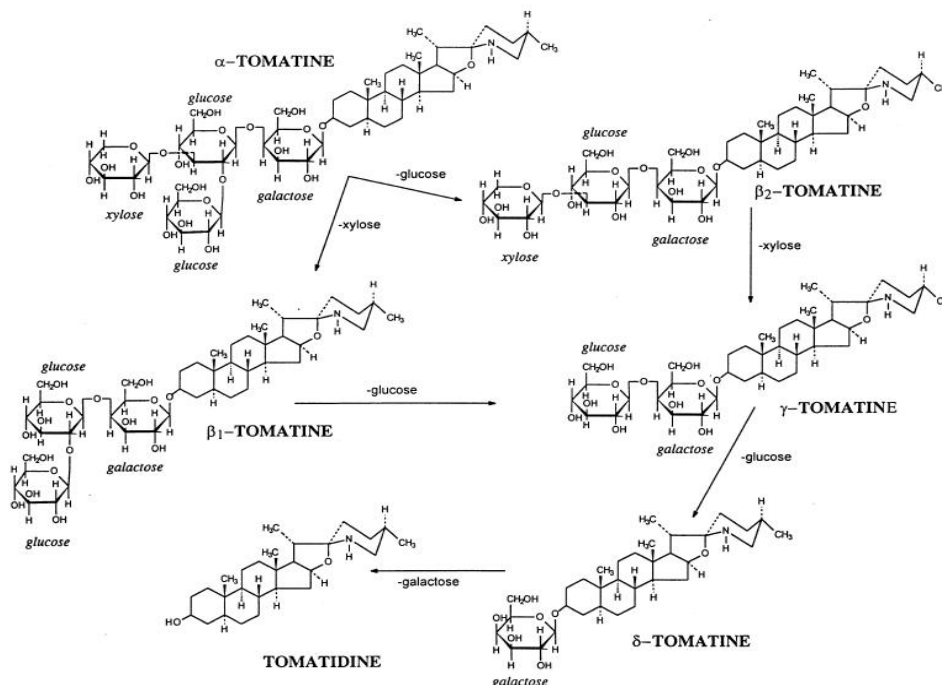


Figura 2 – Denominação do glicoalcalóide  $\alpha$ -tomatina conforme perda dos açúcares

Fonte: Friedman 2002

A  $\alpha$ -tomatina é um glicoalcalóide esteroidal encontrado em folha, raiz, caule, flores e frutos verdes do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) sendo distribuído naturalmente em todo tomateiro, porém sua concentração nos tecidos varia com o estágio de desenvolvimento da planta, condições de crescimento (temperatura, umidade, solo) e região de cultivo (KOZUKUE et al., 2004; FRIEDMAN, 2004).

Apesar da  $\alpha$ -tomatina estar distribuído por toda planta, é encontrada em maior concentração em frutos verdes, onde a degradação deste glicoalcalóide começa no instante da colheita até a maturação do fruto; Kozukue et al. (2004), determinou que sua concentração pode decair até 94% após 30 dias da colheita.

O ponto inicial de formação dos glicoalcalóides é o colesterol que é sintetizado a partir da reação do ácido mevalônico com coenzima A. O colesterol é uma molécula que não pode ser acumulada em plantas sendo rapidamente convertido em outras moléculas entre elas os glicoalcalóides. A figura 3 ilustra a via biosintética e degradativa dos glicoalcalóides no tomate,

isso explica hipoteticamente a presença dos compostos tomatidenol e tomatidina concomitante na planta (LAURILA et al., 1996).

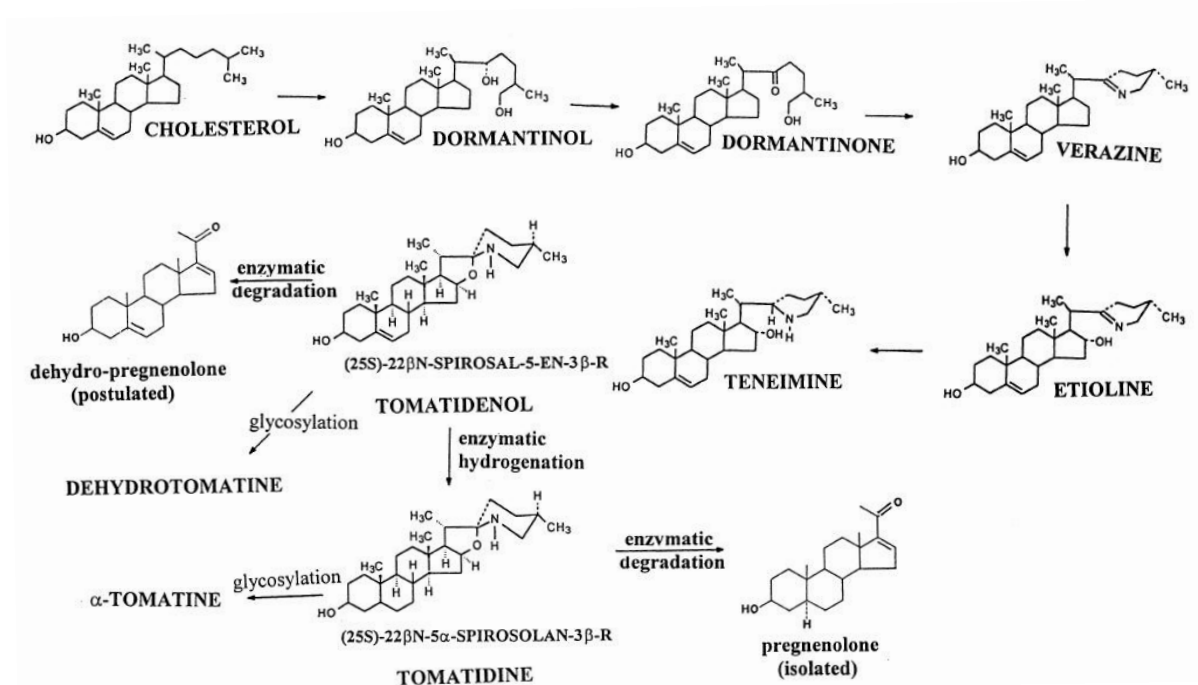


Figura 3 – Via biosintética e degradativa da  $\alpha$ -tomatina nos frutos de *S. lycopersicum*

Fonte: Friedman, 2002.

Os glicoalcalóides mais conhecidos em *solanum* discutidos na literatura são a  $\alpha$ -solanina e  $\alpha$ -chaconina (Figura 4) presentes em plantas de batata (*Solanum tuberosum*) e  $\alpha$ -tomatina e dehidrotomatina (Figura 5) que ocorrem em tomateiros (*S. lycopersicum*) (NISHIE; GUMBMANN; KEYL, 1971; BRUNETON, 2001).

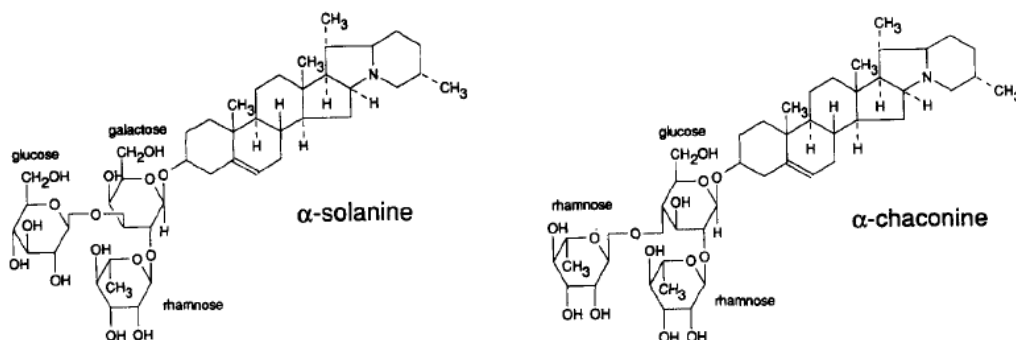


Figura 4 – Principais glicoalcalóides presentes em *S. tuberosum*

Fonte: Keukens et al, 1995

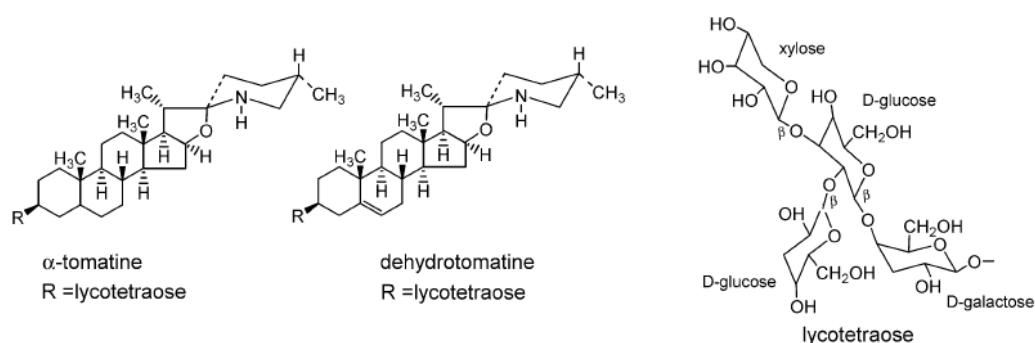


Figura 5 – Principais glicoalcalóides presentes em *S.lycopersicum*

Fonte: kozukue et al, 2004

Há vários relatos a respeito de intoxicações provocadas pela presença de glicoalcalóides como a solanina presente em batatas (principalmente nas partes aéreas, tubérculos verdes, germinados ou apodrecidos), causando no homem e em animais sintomatologia que envolve distúrbios gastrointestinais (cólicas no abdômen e no estômago, necrose gástrica e intestinal, diarreia e vômitos), sensação de queimação nos lábios e na boca, pele quente, febre, pulso rápido e cefaléia; rompimento das membranas celulares afetando o sistema digestivo, desordens de natureza neurológica, depressão do Sistema Nervoso Central e morte por parada respiratória (NISHIE; GUMBMANN; KEYL, 1971; MATOS, 1989; BRUNETON, 2001; VAN GELDER, 1990; BLANKEMEYER et al., 1992; RODDICK, 1989).

O modo de ação antifúngica de glicoalcalóide proposto é através de alteração da integridade da membrana celular através da ligação com os grupos 3 beta-hidróxi esteróis, causando um aumento da permeabilidade da membrana, formação de poros e conseqüente rompimento e perda da integridade celular. (LAIRINI; RUIZ-RUBIO, 1998; HOAGLAND, 2009; KEUKENS, 1995), conforme ilustrado na Figura 6.

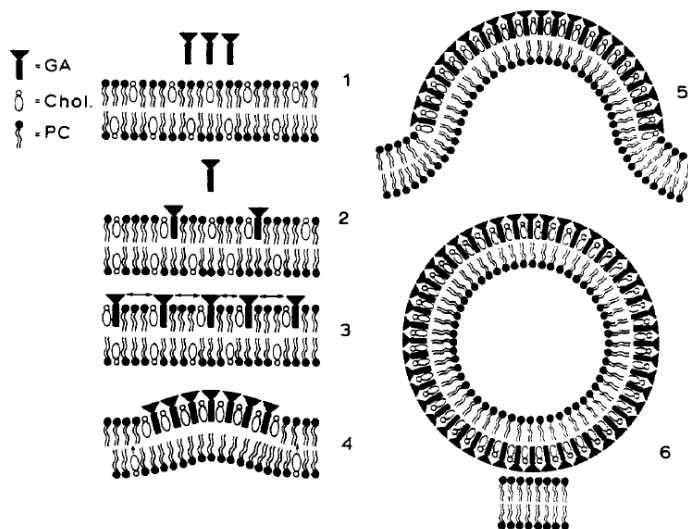


Figura 6 – Modo de ação antifúngica proposta dos glicoalcalóides através da interação com as membranas dos microrganismos

Fonte:Keukens et al 1995.

A característica da  $\alpha$ -tomatina apresentar interação com as membranas dos organismos, este glicoalcalóide se mostra um composto promissor como controle de crescimento de fungos, bactérias, vírus e até de anti-tumor e anti-câncer (FRIEDMAN et al., 2009).

O uso de compostos naturais a base de extratos vegetais que exibem bioatividade, tem estimulado pesquisas devido a problemas de poluição do meio ambiente por compostos sintéticos e efeitos tóxicos aos organismos não alvos. Sendo assim, os produtos de origem vegetal são uma importante fonte de novos defensivos agrícolas por apresentarem menor potencial tóxico ao ambiente e organismos (AMADIOHA, 2000).

### 2.3 *Moniliophthora perniciosa*

O cacauieiro (*Theobroma cacao*), pertencente à família *Sterculiaceae* (Figura 7), é uma planta nativa típica das florestas tropicais úmidas da Bacia Amazônica e é cultivado pelo interesse em suas sementes que quando fermentadas, secas, torradas e prensadas fornecem manteiga e o liquor de cacau, matérias primas fundamentais de grande valor econômico industrial principalmente no setores alimentícios, por ser matéria prima na fabricação de chocolates, mas também outros setores como cosmético. A produção mundial de cacau é de 3 a 4 milhões de

toneladas por ano sendo que 70% está concentrada no continente Africano (Costa do Marfim, Gana e Nigéria), o restante da produção mundial é obtido nos países da Ásia, América do Sul e Central que contribuem com 16% e 14%, respectivamente (GUYTON, 2006).



**Reino: Plantae**  
**Divisão: Magnoliophyta**  
**Classe Magnoliopsida**  
**Ordem: Malvales**  
**Família: Malvaceae**  
**Subfamília: Sterculioideae**  
**Genero: Theobroma**  
**Espécie: Theobroma cacao**

Figura 7 - Ilustração da planta de *T. cacao* com respectiva classificação taxonômica

O Brasil que já esteve a frente do mercado exportador de cacau, hoje ocupa a sexta posição, contribuindo com 160 mil toneladas/ano<sup>1</sup> (GUYTON, 2006) e 70% das lavouras cacaeiras estão localizadas na região do sul da Bahia (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 2003).

O principal motivo pela queda brasileira no cenário mundial é atribuído ao fitopatógeno responsável pela mais grave doença do cacaueteiro, vassoura-de-bruxa, uma doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que causa danos que afetam diretamente a produção, e dependendo da gravidade em alguns casos, chega a dizimar totalmente as plantações (ALBUQUERQUE et al., 2005).

O fungo *Crinipellis perniciosa*, com reclassificação proposta para *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), é um patógeno hemibiotrófico, que exibe um tipo de micélio em cada fase do ciclo de vida. Em tecidos infectados verdes, o micélio é largo (5 a 8 µm), biotrófico, sem grampos de conexão e com crescimento intercelular. Após a necrose do

<sup>1</sup>Disponível em: <<http://www.icco.org/statistics/cocoamap.pdf>>.

tecido infectado, por razões desconhecidas, o micélio típico torna-se mais fino (1,5 a 3  $\mu\text{m}$ ), com grampo de conexões e é encontrado inter e intracelularmente (DELGADO; COOK, 1976; GRIFFITH; HEDGER, 1994). O micélio saprofítico pode ser prontamente isolado em meio artificial, mas é incapaz de infectar o cacauzeiro e não produz basidiocarpos em cultura (PURDY; SMITH, 1996). A produção de basidiocarpos requer o crescimento de micélios em meio específico (GRIFFITH; HEDGER, 1993).

Nos basidiocarpos são produzidos os basidiósporos, única estrutura com capacidade de infectar do patógeno (PURDY; SMITH, 1996). Os basidiósporos depositados na planta, após a germinação, infectam os tecidos meristemáticos do cacauzeiro (ramos, almofadas florais, flores e frutos em desenvolvimento do cacauzeiro) induzindo uma série de sintomas, dependendo do órgão infectado e seu estágio de desenvolvimento (PURDY; SMITH, 1996). O crescimento hipertrófico de gemas infectadas, denominadas de vassouras, consiste no sintoma mais característico da doença. A infecção de almofadas florais leva o surgimento de lançamentos vegetativos, a produção de flores anormais e frutos paternocárpicos. As infecções nos frutos em desenvolvimento causam a perda direta de sementes, sendo que a produção de frutos também é afetada indiretamente pela infecção de flores e pela redução da área fotossintética devido à morte dos ramos doentes. O ciclo do patógeno completa-se com a produção de basidiocarpos em vassouras necrosadas e frutos secos e reinicia com a liberação de basidiósporos na atmosfera (PURDY; SMITH, 1996).

O fungo afeta principalmente tecidos meristemáticos em desenvolvimento, tais como gemas vegetativas, almofadas florais e frutos jovens, provocando sintomas característicos que se manifestam em forma de hipertrofias e superbrotamento, com proliferação de gemas laterais e engrossamento de tecidos infectados, formando as chamadas vassouras, daí seu nome. (ALBUQUERQUE et al., 2005).

A doença causada por este fitopatógeno é endêmica da região Amazônica e a sua proliferação para as regiões produtoras de cacau provocou o colapso das lavouras no Suriname, Trinidad, Equador (ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAIAMA, 1998) e no Sul da Bahia (PEREIRA et al., 1990). O aparecimento da vassoura-de-bruxa, no sul da Bahia em 1989 levou a total destruição da lavoura cacauzeira (PEREIRA et al., 1990), que era cultivada, principalmente, com variedades altamente suscetíveis (PINTO; PIRES, 1998).



Na América as perdas anuais geradas pela doença são estimadas em 450.000 toneladas (BOWERS et al., 2001). O controle da vassoura-de-bruxa no cacauero envolve a poda fitossanitária (remoção das partes infectadas); controle biológico, controle químico, uso de compostos capazes de induzir resistência na planta, além de adoção de variedades resistentes a doença (PURDY; SCHIMDT, 1996).

A poda fitossanitária é a remoção das vassouras durante o período da seca com o objetivo de reduzir o inoculo produzido no período chuvoso, diminuindo a incidência da doença no próximo ciclo produtivo da cultura. O fator limitante da adoção da poda fitossanitária é o custo elevado com a mão-de-obra e a necessidade de ser realizada anualmente e no mínimo 4 vezes ao ano, dificultando adoção pelos produtores (LUZ et al., 1997).

O Controle biológico consiste no uso de fungos saprofitos que são competidores pela colonização das vassouras de modo a evitar o desenvolvimento do *M. pernicioso* (SANOGO et al., 2002), porém poucos estudos publicados avaliaram o potencial de biocontrole contra doenças de frutos do cacau, e poucos microrganismos têm sido inteiramente comercializados (DE MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2003, 2004; DE MARCO et al., 2000).

O controle químico da vassoura-de-bruxa com fungicidas de contato não é eficiente, pois eles não protegem os tecidos em crescimento ativo, necessitando inúmeras pulverizações (ALBUQUERQUE et al., 2005). Pelo fato da lavoura de cacau somente se desenvolver em regiões de floresta de clima tropical, e estar intimamente ligado as condições que lhe é oferecida juntamente com as espécies nativas, a utilização do manejo químico é economicamente inviável ou até mesmo proibitiva por oferecer riscos e contaminação ao delicado ecossistema (AMADIOHA, 2000).

Dentre os métodos anteriormente descritos, o manejo fitossanitário da vassoura-de-bruxa juntamente com adoção de variedades resistentes, representa o manejo mais eficaz e ambientalmente viável na maioria dos países produtores de cacau e afetados pela vassoura-de-bruxa (ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAIAMA, 1998).

Nessa abordagem do processo de produção agrícola, procura-se substituir, pelo menos em parte, produtos sintéticos por produtos de origem natural. Tais produtos vêm ganhando mercado e credibilidade pelos seus baixos impactos sobre o ambiente e pela segurança à saúde humana. Portanto, a descoberta de moléculas de origem natural com atividade antifúngica à esses

patógenos podem representar uma importante alternativa no controle da doença (PEREIRA, 1998; OLIVEIRA, 1990; MOTA; BARROS; CASTILHO, 2010; SILVA; BASTOS, 2007).

Até o presente momento não se conhece na literatura um produto natural que apresente potente atividade e que possa ser um promissor agente no controle biológico da praga.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Técnicas microbiológicas

##### 3.1.1 Linhagens utilizadas

Para realização deste trabalho utilizaram-se três biotipos diferentes de *M. pernicioso*; CP 44 cacau, CP 322 solanácea e CP 105 liana. As linhagens de *M. pernicioso* utilizadas nesse trabalho, assim como os esporos para ensaio biológico em plantas, foram gentilmente cedidas por Figueira<sup>2</sup> (informação verbal).

CP44	Cacau	<i>Theobroma caçã</i>	Rondônia
ALF105	Solanácea	<i>Solanum lycocarpum</i>	Minas Gerais
ALF322	Liana*		Desconhecida

\*Por apresentar apenas um isolado, o biotipo liana foi considerado apenas com referência, não permitindo que os resultados obtidos para este isolado fossem extrapolados como características gerais do biotipo. O isolado foi coletado no Equador por Griffith.

Para teste de sensibilidade além do *M. pernicioso* utilizou-se os fungos *Alternaria solene*, *Rhizoctania solani*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* que são de propriedade do Laboratório de genética de leveduras da ESALQ/USP.

##### 3.1.2 Meios de cultura e condições de cultivo dos fungos

Os isolados foram mantidos em cultivos em tubo inclinado contendo meio TDA (3% de farelo de Trigo, 2% de Dextrose e 2% Ágar), cobertos com óleo mineral armazenados e protegidos da luz e temperatura ambiente. Os isolados foram multiplicados com a transferência de fragmento do meio do estoque para uma placa de Petri que continha o mesmo meio e o cultivo foi realizado no escuro e a 27 °C.

---

<sup>2</sup> Professor Antonio Vargas de Oliveira Figueira, do Laboratório de Melhoramento de Plantas II do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA, da Universidade de São Paulo - USP.

A partir deste cultivo inicial foi realizado um segundo cultivo com as hifas livres do óleo mineral residual, carregado com a retirada do fragmento. Este segundo cultivo serviu de inoculo para os cultivos subseqüentes em meio TDA que foi fonte contínua de inóculo para cultivos que objetivavam obtenção de micélio para os ensaios de sensibilidade aos compostos obtidos nas diferentes metodologias.

O inoculo para todos os experimentos biológicos consistiu de um disco de 0,7cm do meio de cultivo coletado da borda de crescimento da colônia em desenvolvimento.

### **3.1.2.1 Meio de cultura TDA**

Adicionar 3,0 gramas de farelo de trigo na água fervente, filtrar e adicionar 2,0 gramas de dextrose e 2,0 gramas de Agar e ajustar para 100 ml com água deionizada. Ajustar o pH para 6,8 – 7,0. Autoclavar por 15 minutos a 1 atm.

### **3.1.2.2 Meio de cultura de extrato de folhas de tomateiro**

Triturar 8,0 g de folhas do tomateiro em liquidificador com 50 ml de água deionizada e filtrar. Adicionar 2,0 g Agar, completar para 100 ml com água deionizada. Ajustar o pH para 6,8 – 7,0. Autoclavar por 15 minutos a 1 atm.

### **3.1.2.3 Meio de cultura de extrato de folhas de tomateiro**

Triturar 8,0 g de folhas do cacaueteiro em liquidificador com 50 ml de água deionizada e filtrar. Adicionar 2,0 g Agar, completar para 100 ml com água deionizada. Ajustar o pH para 6,8 – 7,0. Autoclavar por 15 minutos a 1 atm.

### **3.1.2.4 Meio de cultura TDA com extrato de folhas de tomateiro**

Meio TDA como descrito anteriormente, acrescido de 8,0 % de folhas do tomateiro trituradas

### **3.1.2.5 Meio de cultura TDA com extrato de folhas de cacauero**

Meio TDA como descrito anteriormente, acrescido de 8,0 % de folhas do cacauero trituradas

## **3.2 Ensaio biológico**

Para verificar a sensibilidade dos três biotipos de *M. perniciosa* aos compostos presentes nas folhas de tomateiro, bioensaios foram realizados pelo método de difusão em ágar. Este método também chamado de difusão em placas é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado a crescer contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólida e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo testado com a concentração conhecida da substância ensaiada (PINTO et al., 2003).

A metodologia do teste de difusão em ágar foi utilizada como teste qualitativo frente à sensibilidade aos compostos isolados dos tecidos vegetais de *S. lycopersicum*, e consiste em colocar discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro contendo o extrato vegetal, sobre o meio de cultura sólido apropriado em placas de Petri com um inóculo do microrganismo em um disco de 7 mm de diâmetro (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

As placas inoculadas foram mantidas em estufas tipo BOD a 26 °C marca Nova Técnica modelo NT 705, pelo período que até o controle dos tratamentos colonizasse toda a placa, tempo este que variava até 7 a 10 dias.

## **3.3 Sementes e cultura das plantas de *Solanum lycopersicum***

As sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) utilizadas para o cultivo para coleta das folhas foram da marca Agrocere, variedade Santa Clara I-5.300, lote 611625. As sementes foram germinadas em sementeiras de isopor usando substrato comercial (*Plantmax HT*, *Eucatex*, Brasil) e transplantadas para vasos contendo uma mistura 1:1 de solo e substrato, totalizando em média 70 dias de crescimento.

As folhas foram cortadas após a inflorescência e antes do aparecimento de frutos, lavadas em água destilada, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer -80 °C até o momento de uso.

### 3.4 Ensaio biológico nas plantas MicroTom

Sementes da planta cv. MicroTom foram germinadas em mistura 1:1 de substrato comercial (*Plantmax HT*, *Eucatex*, Brasil) e vermiculita expandida suplementada com 1 g/L de NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio, 10:10:10) e 4 g/L de calcário dolomítico.

Depois de 14 dias as mudas foram transferidas pra vasos individuais com o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação.

A inoculação do fungo foi feita 5 dias após o transplante das mudas, depositando na gema apical do caule 60 ul de uma solução de esporos do Biotipo-S na concentração de  $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>, e mantidas sob um copo plástico transparente para proporcionar as condições de temperatura e umidade de desenvolvimento do fungo.

Após 2 dias cada planta foi pulverizada com 300 uL das soluções contendo os glicoalcalóides provenientes das duas metodologias de extração; de folhas e de frutos verdes de *S. lycopersicum*, preparadas com espalhante adesivo DuFol<sup>®</sup> seguindo as recomendações do fabricante.

O espalhante adesivo é um espalhante não iônico destinado a adição em caldas de defensivos agrícolas (acaricida, fungicida, herbicida e inseticida) e fertilizantes, para melhorar a distribuição e aderência através da quebra da tensão superficial das gotículas, melhorando a eficiência agrônômica em plantas de difícil molhabilidade como por exemplo o tomateiro.

Como controle, um grupo de plantas foi pulverizado somente com o espalhante adesivo para verificar sua influência no desenvolvimento das plantas.

A cada cinco dias as plantas foram monitoradas a fim de verificar o aparecimento de sintomas como hiperplasia e tomado medidas do diâmetro do caule para acompanhar seu desenvolvimento. O experimento foi conduzido por 35 dias.

### 3.5 Técnicas físico-químicas

#### 3.5.1 Isolamento do composto químico ativo das folhas de *Solanum lycopersicum*

320,0 gramas de folhas congeladas foram trituradas com água MilliQ (16%) em liquidificador. Esse extrato foi congelado e liofilizado. O extrato seco (5,54) gramas foi dissolvido em água MilliQ (300 mL) submetido à partição líquido-líquido com diclorometano (300 mL) com auxílio de um funil de separação (repetindo-se por três vezes), obtendo-se duas fases: a fase diclorometano e a fase aquosa.

A fração aquosa foi novamente submetida à partição líquido-líquido com n-butanol da mesma maneira que descrito anteriormente.

A fração aquosa e butanólica foram testadas em bioensaio pelo método de difusão em agar, para verificar qual fase apresentava os compostos responsáveis pela inibição de crescimento do fungo *M. perniciosa*.

A fase butanólica apresentou atividade, portanto ela foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna de permeação em gel de *Sephadex LH-20* com eluição isocrática de metanol, onde as frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e revelador para UV.

As frações que apresentaram similaridade química foram reunidas e posteriormente submetidas ao teste de difusão em agar para verificar em qual fração estava presente os compostos responsáveis pela bioatividade. As frações que apresentaram atividade foram reunidas e a fração que demonstrou maior capacidade de inibição foi submetida à análise de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com detector de massas (HPLC-MS), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e bioensaio.

A Figura 8 ilustra resumidamente o esquema de isolamento dos compostos bioativos presentes em folhas de tomateiro.

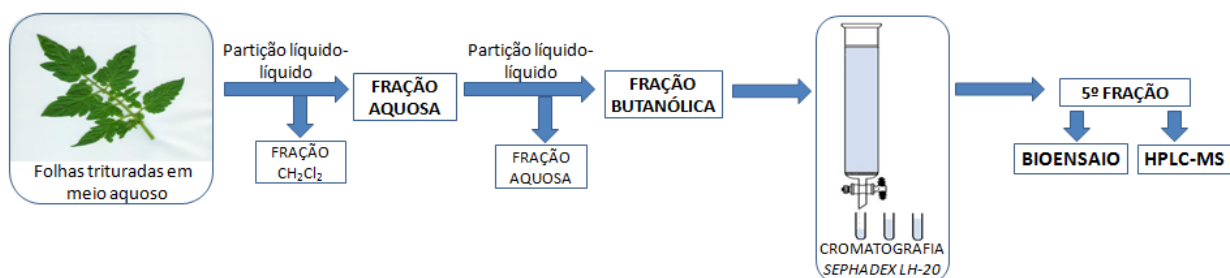


Figura 8 – Diagrama representando isolamento de compostos bioativos presentes em folhas de tomateiro

As frações que foram reunidas segundo a similaridade química foram submetidas a cromatografia do tipo *Sep-Pack* de sílica derivatizada com grupos octadecilsilano – C<sub>18</sub>, de 2,0 gramas do fabricante *Phenomenex*.

### 3.5.2 Isolamento do composto químico ativo dos frutos de *Solanum lycopersicum*

A metodologia utilizada para extração do composto ativo presente nos frutos verdes de tomate foi proposta por Friedman (2009), na qual consiste em uma extração em meio ácido e precipitação dos glicocalcóides por elevação do pH. A Figura 9 ilustra o procedimento:

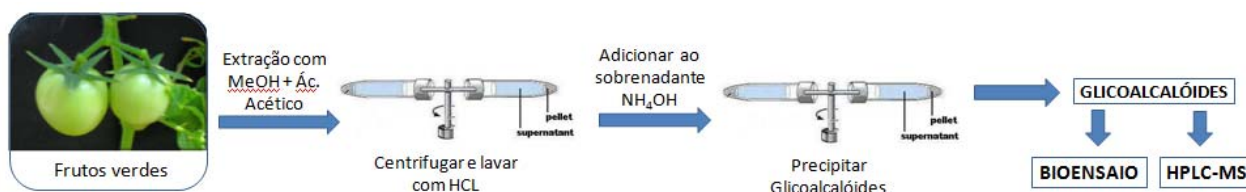


Figura 9 - Esquema ilustrativo do procedimento de extração de glicocalcóides proposto por Friedman (2009)

Uma alíquota desta extração foi diretamente injetada para análise em cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector de massas (HPLC-MS) e bioensaio.



### 3.6 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas

#### 3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear- RMN)

O espectro de RMN foi obtido utilizando o aparelho Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e a 100,10 MHz na frequência do Carbono ( $^{13}\text{C}$ ) no DQ- UFSCar.

As amostras para análise foram preparadas utilizando-se de solventes deuterados da Cambridge Isotopes: metanol deuterado ( $\text{MeOH-}d_4$ ), dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ), clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e acetonitrila deuterada ( $\text{MeCN-}d_3$ ). O padrão usado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS).

#### 3.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC e Espectrometria de Massas – EM

O equipamento utilizado nas cromatografias de alta eficiência (HPLC) consistiu em um sistema Alliance modelo 2695 da marca Waters, um detector de arranjo de fotodiodos (PDA- “Photodiode Array Detector”), que nos permitiu observar entre os comprimentos de ondas de 200 a 800 nm e um detector de massas modelo Micromass ZQ.

Para as análises por HPLC-PDA-MS foi utilizada uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C18), 250 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ , da marca *Inertsil*.

O equipamento utilizado nas cromatografias líquida acoplado a um detector de massas LC-MS/MS foi da marca *Agilent* 6410 MS (controlado pelo programa *Agilent MassHunter*) utilizando inserção direta em modo MRM. A voltagem do cone foi de 50 V e detector em modo positivo. A varredura dos íons foi de 100 a 1.200 Da. A energia de colisão utilizada foi de 60 eV.

Os espectros de massas foram obtidos por eletrospray em espectômetro VG-7070 operando a 70 eV. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos operando-se com resolução nominal 5000- 10000. Foi utilizado como padrão interno: perfluorquerosene, 3-nitrobenzil álcool ou polietilenoglicol.

### 3.7 Técnicas cromatográficas

#### 3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada - CCD

Para análise qualitativa em CCD foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F<sub>254</sub> 20 x 20 cm (Aldrich). As cromatofolhas foram eluidas na solução dos solventes diclorometano/metanol na proporção 8:2; e reveladas por inspeção sob luz ultravioleta (UV) com lâmpada *Spectroline* modelo ENF-240 C/FE nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm,

#### 3.7.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada

Foram realizadas cromatografias em colunas pré-empacotadas da marca Phenomenex *Strata*<sup>®</sup> de diferentes dimensões (2 e 5 g) com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C<sub>18</sub>) e fase móvel um gradiente água/metanol iniciando com 100% água e finalizando com 100% metanol. A escolha das colunas e eluentes foram de acordo com a característica da amostra em análise.

#### 3.7.3 Cromatografia em Coluna

Para cromatografia de permeação em gel utilizou-se de uma coluna de vidro com dimensões de 20 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro interno. O material utilizado como fase estacionária foi o *Sephadex LH-20* (*Pharmacia Biotech*<sup>®</sup>). A eluição foi feita em modo isocrático com metanol grau PA.

### 3.8 Solventes

Os solventes utilizados em CCD, *Sephadex LH-20* e *Sep-Pak* foram todos de grau analítico. A água utilizada em todas as cromatografias foi destilada e purificada em um sistema *Milli-Q Millipore*<sup>®</sup> equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo da bioatividade de extrato bruto das folhas de *S. lycopersicum*

Segundo Furlan et al. (1997) um dos meios mais utilizados na manutenção e crescimento de fungos filamentosos é o meio trigo-dextrose-ágar (TDA), onde o *Moniliophthora perniciosa* apresenta um bom crescimento, porém este meio é incapaz proporcionar as condições de indução de esporulação.

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de conseguir esporos deste fungo em laboratório, pois os esporos são a fase biotrófica que representa a fase de infecção do fungo na planta, o mecanismo responsável pela mudança da fase biotrófica para a fase saprofítica ainda não foi bem elucidado, devido as dificuldades de se obter esporos deste fungo em laboratório (LYNDEL et al., 2006).

Na tentativa de compor um meio de cultura para o fungo *Moniliophthora perniciosa*, que apresentasse condições de esporulação para os biotipos (cacau, solanácea e liana), foram preparados meios de cultura do tipo complexo contendo extrato de folhas do cacau (*Theobroma cacao*) e extrato de folhas do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) separadamente, onde os biotipos foram avaliados individualmente, pois acreditávamos que poderia haver algum nutriente que fosse essencial na indução da esporulação que pudesse estar presente nos extratos dessas plantas.

O novo meio sólido foi composto com água, extrato de folhas e agar. Os três biotipos do fungo foram inoculados nos dois meios, contendo 8% de extrato de folhas do tomateiro (Meio T), 8% de extrato de folhas do cacau (Meio C) e as placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 26 °C, por dez dias.

Após os dez dias de incubação as placas foram analisadas, e verificou-se que nos meios onde havia o extrato das folhas do tomateiro não houve crescimento de nenhum dos 3 biotipos inoculados, ao contrário do que se verificou no meio com a presença do extrato das folhas do cacau, onde os três biotipos apresentaram um crescimento superior quando comparados ao meio amplamente utilizado (meio TDA), resultado esse que pode ser verificado pela medida do diâmetro do crescimento micelial apresentado na Tabela 1. Apesar do bom crescimento apresentado pelos três biótipos, o meio C não foi capaz de induzir a esporulação.

Tabela 1 – Medidas dos halos de crescimento dos biótipos nos meios testados; medidas em centímetros

Biotipo	Meio T	Meio C	Meio TDA
Biótipo CP 44 Cacau	0,0	4,5	3,6
Biótipo CP 322 Solanacea	0,0	4,8	3,8
Biótipo CP 105 Liana	0,0	4,2	3,3

A ausência de crescimento do fungo *Moniliophthora perniciosa* no meio com extrato de folhas do tomateiro nos levaram a duas hipóteses: a primeira seria a falta de algum nutriente necessário ao crescimento do fungo, e a segunda hipótese, seria a presença de um composto inibidor do crescimento presente na folha. Para verificar as duas hipóteses, o meio TDA, onde o fungo se desenvolve bem, foi acrescido de extrato de folhas do tomateiro, e os três biótipos foram inoculados novamente em TDA mais extrato de folhas do tomateiro (Meio TDA+T) e TDA sem extrato de folhas do tomateiro como controle.

Novamente as placas foram incubadas em BOD a 26 °C por dez dias. Após esse período, as placas foram analisadas e novamente se constatou que no meio TDA+T, os três biótipos não apresentaram crescimento; ao contrário do observado no meio TDA sem adição de extrato das folhas do tomateiro, onde os três biótipos cresceram com média de 3,6 cm de raio a partir do disco de inóculo.

Podemos ainda salientar que todos os meios (TDA+T) foram autoclavados por 20 minutos a uma atmosfera, condição esta que pode ter levado a formação de algum composto tóxico durante este processo de esterilização; portanto todos os ensaios foram repetidos preparando-se meios com os extratos de folhas esterilizados por filtração em filtro de 0,22 µm. Os resultados obtidos foram os mesmo que ensaios com os meios autoclavados, ou seja, os três biótipos não cresceram no meio TDA incorporado com extrato de folha de tomateiro (TDA +T).

Com este experimento pudemos verificar que no extrato de folhas de tomateiro existe um composto capaz de inibir o desenvolvimento do *M perniciosa*. A partir deste resultado decidimos ampliar nossos objetivos investigando a eficiência do extrato de folhas de *S. lycopersicum* com potencial atividade antifúngica. Os fungos utilizados neste ensaio e a medida do crescimento estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 - Medidas do halo de crescimento dos fungos selecionados para teste de inibição de crescimento em meio de cultivo TDA e TDA+T com respectivos patógenos e aplicações. Medidas em centímetros

Fungo	Controle (TDA)	TDA +T	Patógeno	Aplicação
<i>Cercospora kikuchii</i>	3,8	2,6	Soja	
<i>Colletotrichum truncatum</i>	2,6	2,9	Soja	
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,0	0,3	Feijão/Algodão	
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	3,8	0,0	Cacau	
<i>Alternaria solani</i>	4,2	3,9	Tomate	
<i>Beauveria bassiana</i>	3,8	3,5	Insetos	Bioinseticida
<i>Trichoderma reesei</i>	4,5	4,4		Celulases
<i>Rhizoctonia solani</i>	3,5	3,2	Batata	
<i>Metarhizium anisopliae</i>	4,6	4,3	insetos	Bioinseticida
<i>Trichoderma viride</i>	4,5	4,3		Biofungicida

Os fungos selecionados para este bioensaio são causadores de doenças em culturas de interesse agrônomo com vasto número de hospedeiros, causando importantes doenças na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo, além de serem patógenos de insetos, e alguns de interesse industrial. Estes fungos pertencem a dez diferentes famílias de fungos conforme apresentado Tabela 3.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2 observamos que o composto presente no extrato das folhas do tomateiro reduziu significativamente a capacidade de crescimento do fungo *Fusarium oxysporum*, patógeno de algodão e feijão e inibiu completamente o crescimento do fungo *Moniliophthora perniciosa*, fato este, já constatado em ensaios anteriores. Os outros oito fungos não apresentaram nenhuma redução da capacidade de crescimento na presença do extrato de folhas do tomateiro.

Visando a utilização do composto presente nas folhas do tomateiro como um agente promissor no controle da vassoura de bruxa, este ensaio nos possibilitou inferir que a sua utilização em áreas de plantio de cacau não afetará o desenvolvimento da população de diferentes fungos normalmente presentes no ambiente, causando assim um mínimo impacto ambiental por interação com outros fungos.

Tabela 3 - Classificação taxonômica dos fungos selecionados para teste de inibição

	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
<i>C.kikuchii</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Mycosphaerellaceae</i>	<i>Cercosceptoria</i>
<i>C. truncatum</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Phyllachorales</i>	<i>Phyllachoraceae</i>	<i>Colletotrichum</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>
<i>M. perniciosa</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycetes</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Tricholomataceae</i>	<i>Moniliophthora</i>
<i>A. solani</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Alternaria</i>
<i>B.bassiana</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Beauveria</i>
<i>T. reesei</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>R. solani</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Cantharellales</i>	<i>Ceratobasidiaceae</i>	<i>Rhizoctonia</i>
<i>M. anisopliae</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Metarhizium</i>
<i>T. viride</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Trichoderma</i>

Esses resultados nos conduziu a isolar e identificar os compostos que conferem essa característica antifúngica. Dentre os fungos que apresentaram inibição de crescimento o *M. perniciosa* foi escolhido devido sua importância para a cultura do cacau e a ausência de trabalhos na literatura utilizando este fungo.

#### 4.2 Estudo dos compostos com atividade antifúngica de *Solanum lycopersicum*

Baseado nos resultados dos ensaios realizados previamente neste trabalho, onde o extrato bruto das folhas de *S. lycopersicum* apresentou atividade inibitória para os fungos *M. perniciosa* e *F. oxysporum*, a investigação dos seus compostos ativos levou ao desenvolvimento de uma metodologia que teve o objetivo buscar e identificar o composto responsável por esta atividade antifúngica.

Duas metodologias foram utilizadas visando isolar os compostos, metodologias essas que proporcionasse fácil identificação por métodos cromatográficos e espectrométricos, portanto com uma matriz com relativo elevado grau de pureza.

#### 4.3 Investigação do composto antifúngico do extrato de folhas de *Solanum lycopersicum*

As folhas de *S. lycopersicum* foram coletadas, trituradas com água MilliQ na concentração 30% e posteriormente submetido a diversas partições liquido-liquido. A primeira etapa envolveu uma partição da fração aquosa com diclorometano. A fração diclorometano foi descartada e a fração aquosa foi submetida à nova partição com solvente n-butanol.

Após a recuperação em funil de decantação, ambas frações (aquosa e butanólica), foram submetidas a teste de bioensaio com os três biotipos de *M. perniciososa* (biotipo cacau, solanácea e liana) a fim de verificar a presença do composto antifúngico encontrado nas folhas em uma das frações.

A Figura 10 apresenta o resultado deste bioensaio, onde a fração aquosa não apresentou atividade de inibição de crescimento e a fração butanólica apresentou atividade de total inibição de crescimento dos biotipos testados quando comparados ao controle (meio TDA).

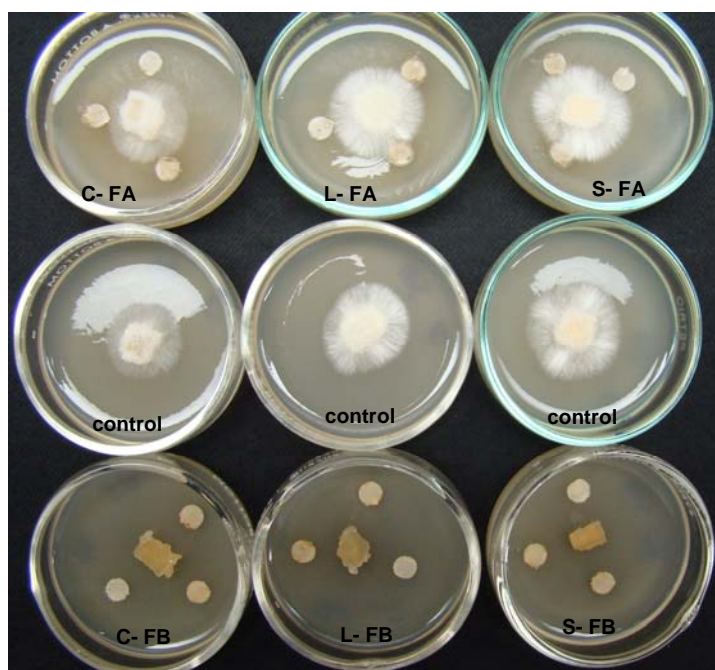


Figura 10 - Ausência de crescimento dos biotipos de *M.Perniciosa* na fração butanólica quando comparados ao controle e fração aquosa. (FA fração aquosa, FB fração butanólica, C – biotipo cacau, L- biotipo Liana, S- biotipo solanácea

Por não apresentar atividade antifúngica, a fração aquosa foi descartada e a fração butanólica foi submetida à separação cromatográfica em coluna de permeação em gel de *Sephadex -LH-20*, onde foram obtidas 14 frações, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), e reunidas 8 frações segundo suas similaridade química que foram renomeadas conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Frações obtidas na cromatografia de permeação em gel e renomeadas com suas respectivas massas

Frações reunidas	Renomeadas	Massa da fração (mg)
1 – 5	Sex - 1	17,2
6	Sex - 2	9,4
7	Sex - 3	9,0
8 - 9	Sex - 4	10,7
10	Sex - 5	3,6
11	Sex - 6	3,0
12 - 14	Sex - 7	4,6
15	Sex - 8	24,1

Para determinação da presença do composto inibidor do crescimento do fungo, as oitros 8 frações obtidas anteriormente foram testadas em um novo bioensaio onde a quantidade de amostra em cada disco de papel de filtro foi padronizada para 1,0 mg. A Figura 11 demonstra o resultado deste bioensaio para o biotipo cacau.





Figura 11 - Ausência de crescimento do fungo quando na presença das frações obtidas da separação cromatográfica de permeação em gel de Sephadex LH20

Com base na observação de inibição de crescimento do fungo apresentado na figura x podemos concluir que as frações Sex - 1 a Sex - 6 contém maior concentração dos compostos responsáveis pela capacidade de inibir o crescimento do *M. perniciosa*, sendo assim foram analisadas por espectrometria de massas a fim de identificar as moléculas presentes nessas amostras.

A Figura 12 apresenta os espectros de massas das frações ativas, onde é possível observar um sinal em relação massa/carga ( $m/z$ ) de 1034 e 578 nas frações que demonstram atividade.

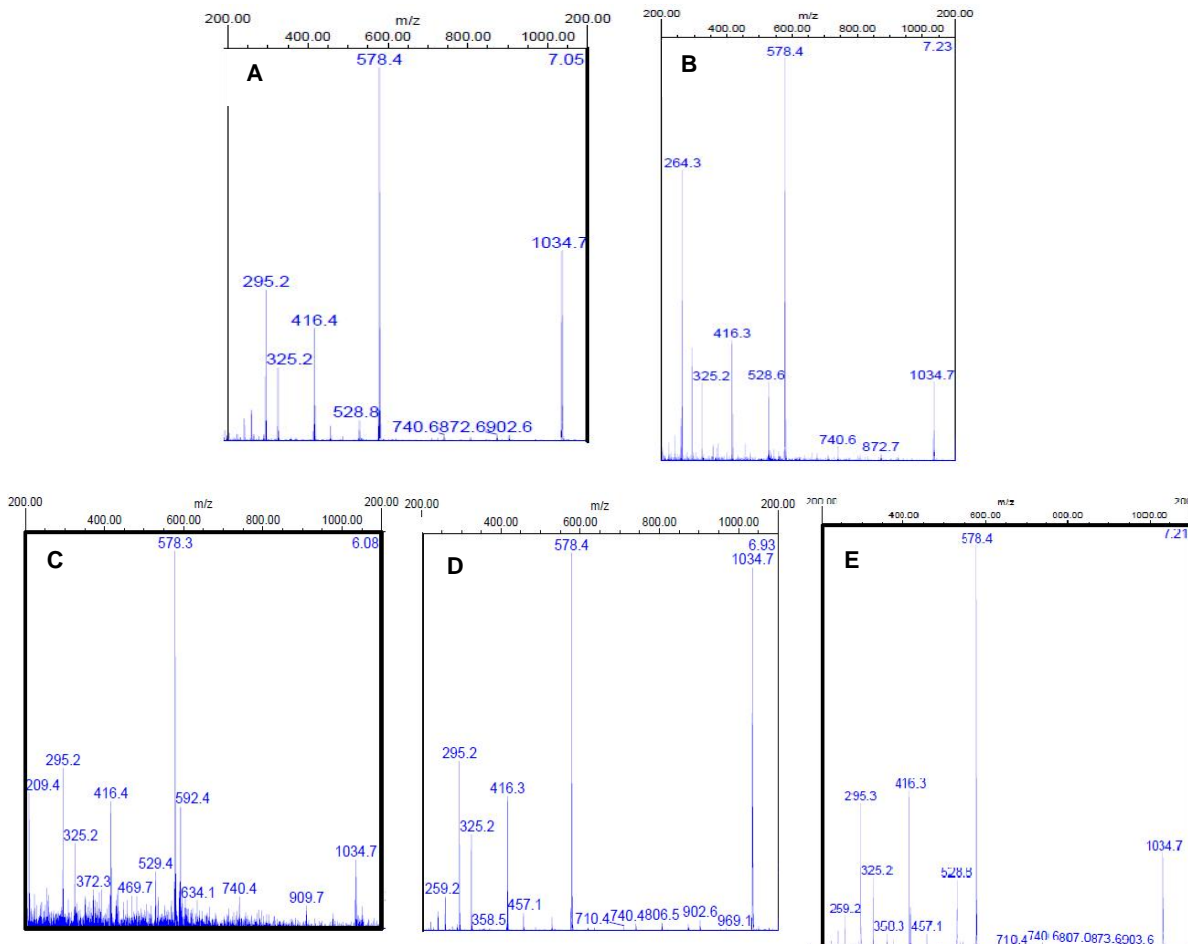


Figura 12 –Espectro de massas das frações obtidas na cromatografia de permeação em gel Sephadex LH20; A- sex1, B- sex2, C- sex3, D- sex4, E- sex5

Por apresentar melhor inibição de crescimento do fungo e um resultado do espectro de massas sem interferentes em relação às demais, as frações sex -3 e sex -5 foram encaminhadas para ressonância magnética nuclear de hidrogênio para tentativa de identificação do composto presente através de elucidação da estrutura dos compostos presente na amostra.

Para a análise de ressonância nuclear a amostra deve estar com elevado grau de pureza, por este motivo o resultado das frações não forneceu nenhum dado que possibilitasse a identificação estrutural do composto bioativo presente nestas frações.

Uma busca na literatura de compostos presentes nas espécies *Solanum*, especificamente compostos que exibem atividade antifúngica, aponta a  $\alpha$ -tomatina Figura 13 como o principal agente antifúngico presente em *S. lycopersicum* (Roddick, 1974).

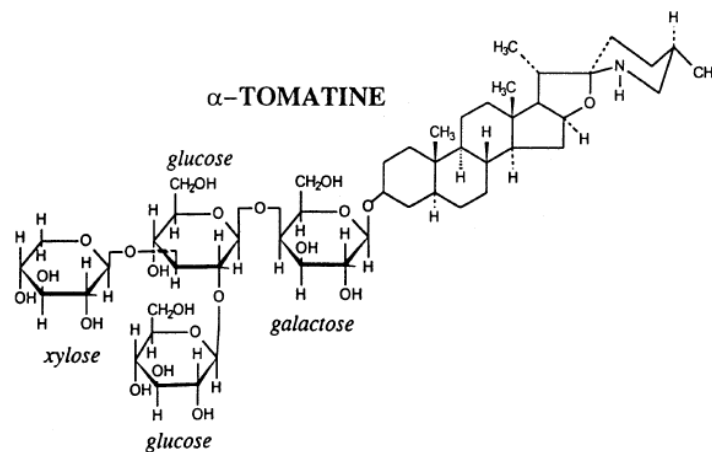


Figura 13 - Fórmula estrutural da molécula  $\alpha$ -tomatina

Fonte:kozukue et al, 2004.

O sinal  $m/z$  1034,7 é referente a  $\alpha$ -tomatina (tomatidina ligada a uma xilose, uma galactose e duas glucoses) e o sinal 578,4  $m/z$  é um produto da fragmentação da mesma (tomatidina ligada a uma galactose), conforme relatado na bibliografia (ABELL; SPORNS, 1996; CATALDI; LELARIO; BUFO, 2005).

As frações sex-1, sex-2 e sex-4 foram reunidas para purificação em cromatografia SepPack  $C_{18}$  usando como eluente um gradiente de água em metanol. Foram obtidas 55 frações que foram reunidas em 6 frações por semelhança química observada em cromatoplasmas de CCD. Essas 6 frações foram novamente submetidas a teste de bioensaio antifúngico para localização da fração ativa.

Como pode ser observado na Figura 14, a fração número 4 foi a única que apresentou atividade de inibição de crescimento do *M. perniciosa*, portanto foi analisada por HPLC-MS-MS.

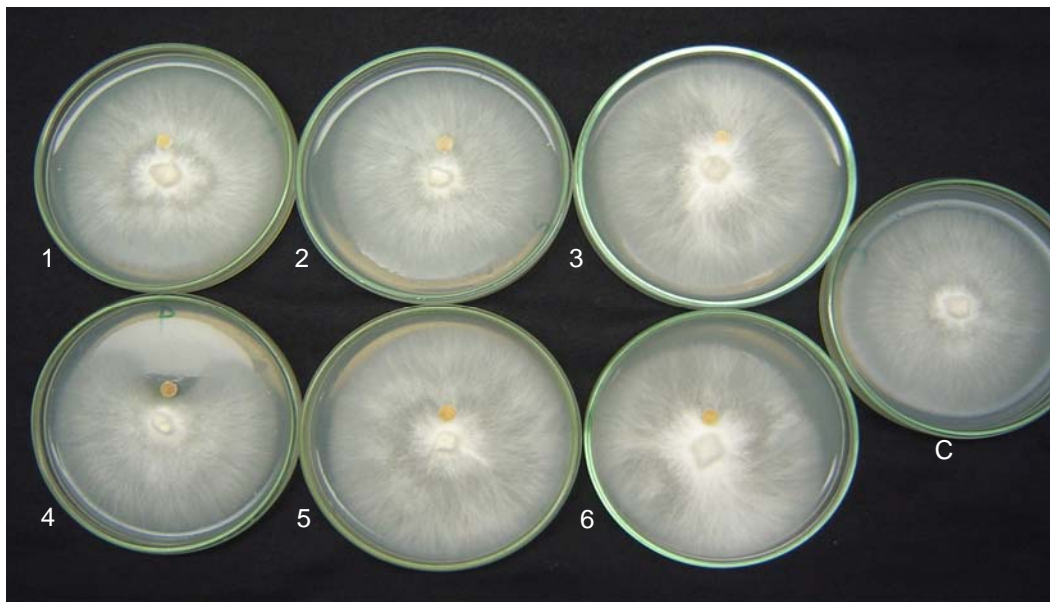


Figura 14 – Teste de inibição de crescimento das frações obtidas em cromatografia SepPack C<sub>18</sub>

A Figura 15 representa o resultado da análise de espectro de massas da fração 4 proveniente da separação Sep-Pak que demonstrou atividade antifúngica.

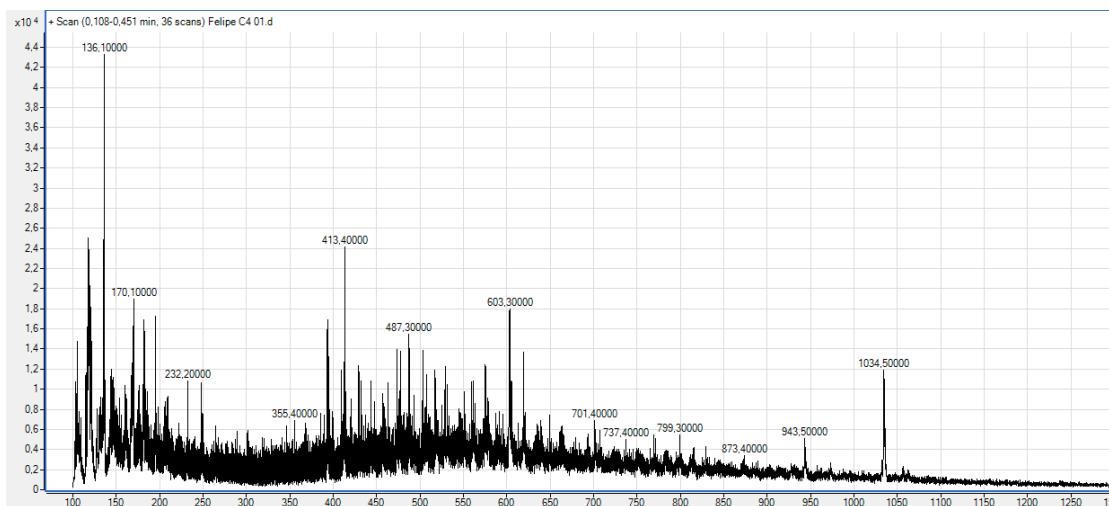


Figura 15 - Resultado do espectro de massas da fração 4 que demonstrou atividade antifúngica

A princípio, buscamos desenvolver um procedimento de isolamento dos compostos presentes em folhas de tomateiro que tem a capacidade de inibir o crescimento do *M. perniciosa*,

na qual não tínhamos conhecimento de qual era esse composto. Os resultados preliminares de espectrometria de massas juntamente com os dados disponíveis na literatura nos levou a sugerir que a  $\alpha$ -tomatina é responsável por esta bioatividade.

Diante dos resultados obtidos e baseando-se nas informações da literatura que indicavam que a molécula presente nas folhas poderia ser a  $\alpha$ -tomatina, um padrão de alta pureza grau HPLC de  $\alpha$ -tomatina (SIGMA T2830) foi adquirido para comparação dos sinais espectrométricos.

Uma solução deste padrão (1mg/ml) foi preparada e submetida à análise em espectrômetro de massa onde foram observados os mesmos sinais presentes nas amostras bioativas. A Figura 16, apresenta o espectro de massas do padrão.

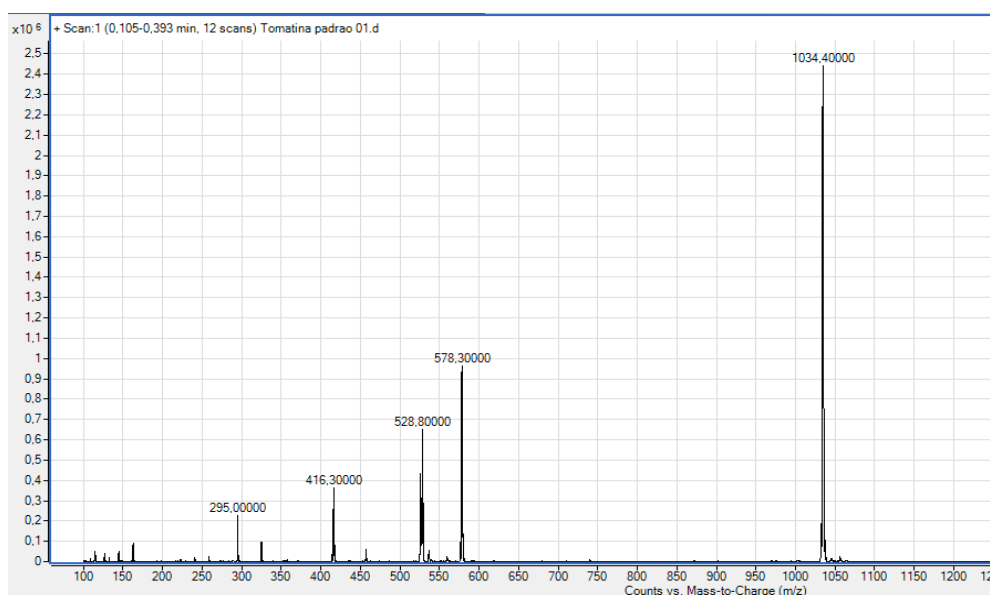


Figura 16 - Espectro de massas da solução padrão de  $\alpha$ -tomatina

Devido os resultados obtidos de confirmação da presença da  $\alpha$ -tomatina nas frações que exibiram atividade antifúngica, um bioensaio usando a solução padrão foi realizado para verificar realmente se é este composto responsável pela atividade antifúngica e não outros constituintes minoritários das frações. Neste bioensaio apresentado na Figura 17, cada disco de papel de filtro continha 20 $\mu$ g, 60 $\mu$ g e 100 $\mu$ g de  $\alpha$ -tomatina padrão.

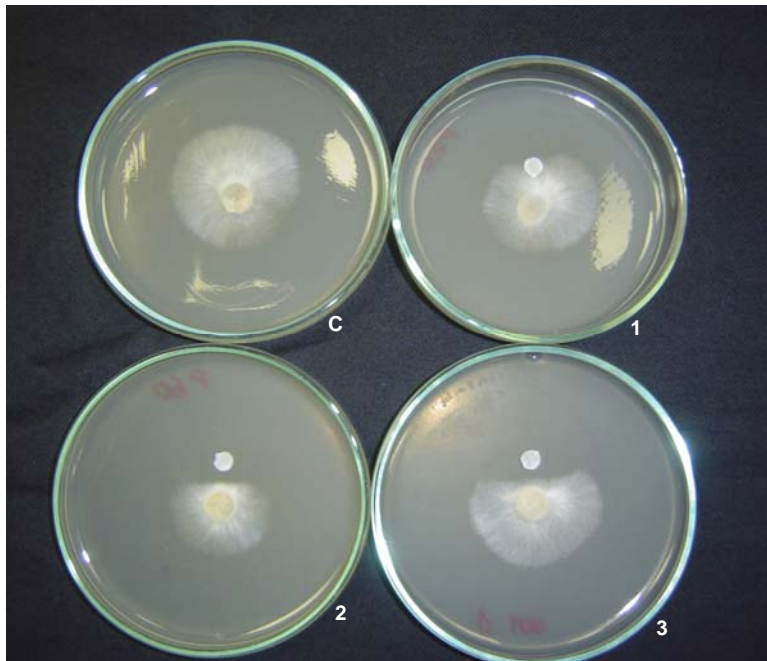
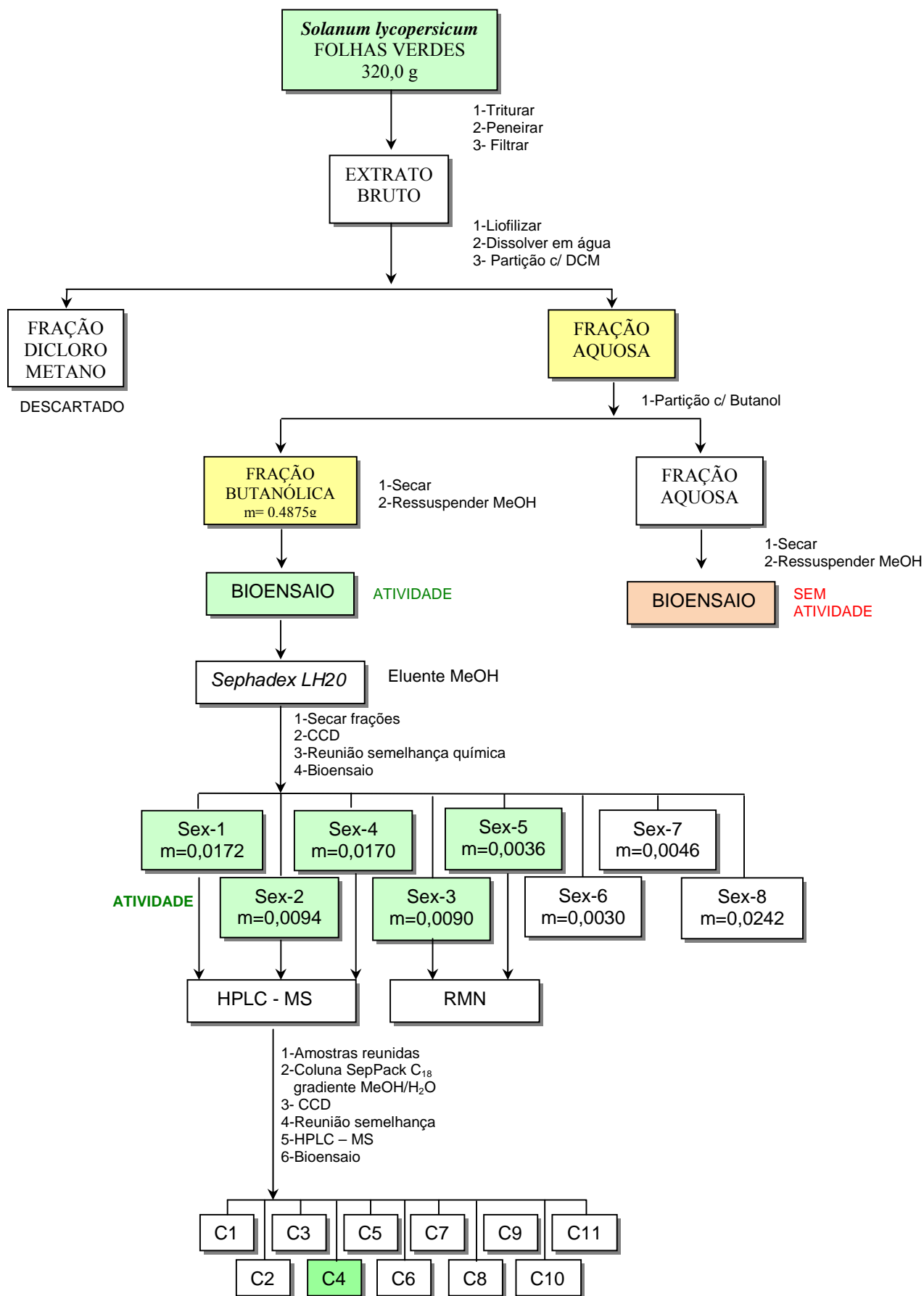


Figura 17 - Teste de inibição de crescimento do fungo com a  $\alpha$ -tomatina padrão; C- controle, 1- 20  $\mu\text{g}$ , 2- 60  $\mu\text{g}$  e 3- 100  $\mu\text{g}$  de padrão

Devido à ausência de crescimento do fungo, e resultados anteriormente apresentados é possível confirmar que o composto ativo presente nas folhas de *S. lycopersicum* é a  $\alpha$ -tomatina.

A seguir é apresentada a Figura 18, a qual apresenta um esquema resumindo as etapas de extração, separação e purificação dos compostos obtidos de folhas de *S. lycopersicum*.

Figura 18 - Esquema ilustrativo das etapas de extração de folhas de *S. lycopersicum*, separação e purificação



#### 4.4 Metodologia de obtenção de glicoalcalóides proposta por Friedman (2009)

Kozukue et al (2004), isolou e purificou a-tomatina e dehidrotomatina de cálice, flores, folhas, raízes e caule e frutos em diversos estágios de maturação, onde a a-tomatina variou de 521 a 16 285 ug/g de peso fresco nesses tecidos. Especificamente em frutos a concentração variou de acordo com o estágio de maturação, onde a maior concentração é encontrada em frutos verdes 10 dias depois da inflorescência (795+-88ug/g).

Friedman (2009) que utiliza os glicoalcalóides obtidos de frutos verdes, entre eles a a-tomatina, para ensaios de indução de morte celular de células cancerosas de humanos; portanto supõe-se os glicoalcalóides obtidos por essa metodologia são de elevada pureza.

Desta forma, essa mesma metodologia foi utilizada para extração da a-tomatina de frutos verdes de *S. lycopersicum* em quantidade suficiente para teste de desenvolvimento dos sintomas do fungo em plantas.

Para teste preliminar desta metodologia, 200 gramas de frutos verdes de *S. lycopersicum* cultivados em casa de vegetação e sem adição de defensivos. Ao final da metodologia de precipitação dos glicoalcalóides foi obtido 0,152g que foram ressuspensos em metanol para análise de espectrometria de massas e bioensaio.

Para verificar o poder de inibição de crescimento dos glicoalcalóides obtidos nessa extração contra o fungo em estudo, um bioensaio foi preparado no qual cada disco de papel recebeu um volume em que cada disco de papel recebesse 1,0 1,5 2,0 e 2,5 miligramas do precipitado obtido na extração e então foram colocados em meios de cultura no qual os fungos foram desafiados e crescer. Os fungos sofreram inibição de crescimento em todos os ensaios quando em comparação com controle de conforme observado na Figura 19.



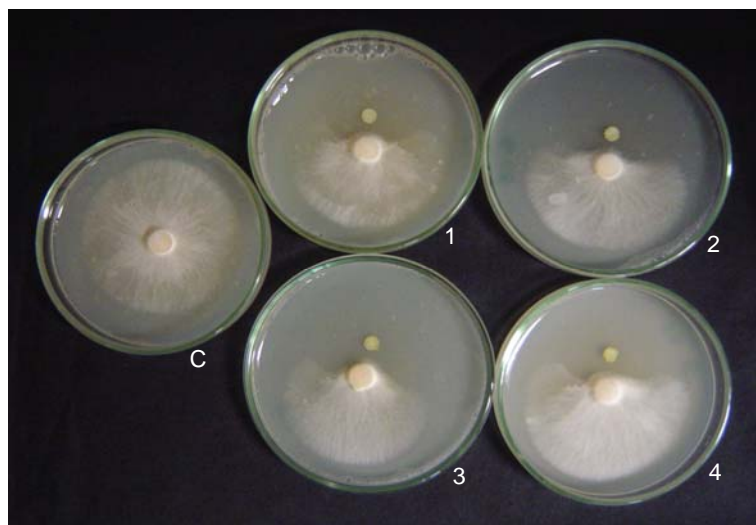


Figura 19 - Teste de inibição de crescimento do fungo, utilizando o precipitado obtido na metodologia proposta por Friedman (2009). C- controle, 1-1,0 mg, 2-1,5 mg, 3-2,0 mg, 4-2,5mg

Na análise de espectrometria de massas, novamente os sinais majoritários 1034 e 578 em relação massa carga ( $m/z$ ), referentes a  $\alpha$ -tomatina e dehidrotomatina respectivamente, foram novamente observados, Figura 20.

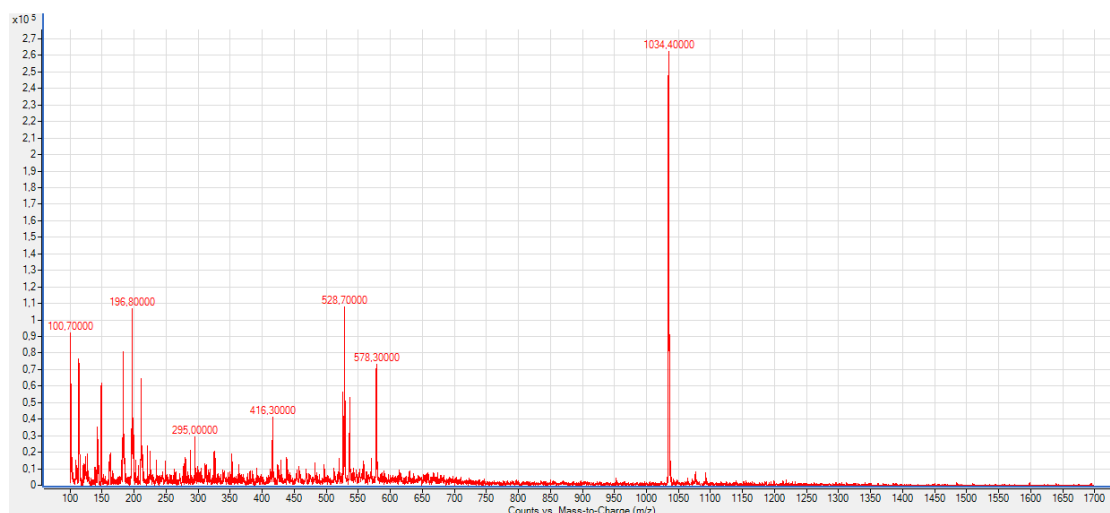


Figura 20 - Resultado do espectro de massas na análise do precipitado utilizando metodologia de precipitação de glicoalcalóides

A Figura 21 apresenta um esquema ilustrativo resumindo a metodologia de extração de glicoalcalóides dos frutos verdes de *S. lycopersicum*.

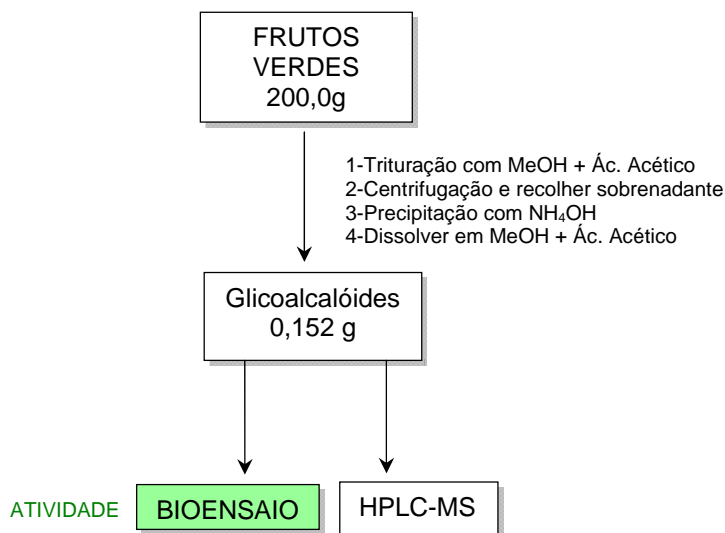


Figura 21 - Esquema ilustrativo da metodologia de extração de glicoalcalóides de frutos verdes de *S. lycopersicum*

Friedman et al. (1994) utilizando metodologias de extração líquido-líquido e purificação em fase sólida conseguiu cromatogramas livres de interferências, levando assim a resultados satisfatórios na identificação e quantificação dos glicoalcalóides presentes em *S. lycopersicum*.

Na investigação química dos compostos que apresentam atividade para os biótipos estudados, as metodologias utilizadas (extração líquido-líquido de folhas e precipitação dos glicoalcalóides de frutos) também conseguiu resultados análogos, visto que foi possível chegar a espectros similares, inclusive com a presença dos dois picos majoritários referentes a  $\alpha$ -tomatina e dehidrotomatina.

Em ambas as metodologias foi possível isolar e identificar a  $\alpha$ -tomatina como composto bioativo para os 3 biótipos de *M. perniciosa* em estudo.

A metodologia descrita por Friedman (2009) se apresenta mais vantajosa principalmente por utilizar frutos verdes e não folhas de *S. lycopersicum*, onde a concentração da  $\alpha$ -tomatina é superior quando comparadas aos outros tecidos. Podemos citar também como vantagem a não utilização de solventes orgânicos, como por exemplo o diclorometano e n-butanol, minimizando assim os resíduos laboratoriais.

#### 4.5 Ensaio de bioatividade da $\alpha$ -tomatina em plantas inoculadas com *M. pernicioso*

Uma vez selecionada a metodologia mais indicada para nossos objetivos de extração de  $\alpha$ -tomatina de *S. lycopersicum*, uma extração em larga escala foi realizada para obter material necessário para um teste de bioatividade desta molécula como agente antifúngico em plantas inoculadas com o fungo *M. pernicioso*.

Meissner et al. (1997) propôs o cultivar miniatura, Micro-Tom (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom), como um modelo de estudo em pesquisas, principalmente pela facilidade de cultivo em vasos de 50-150 ml com substrato, além de completar seu ciclo de vida entre 70-90 dias. Adicionalmente, experimentos com Micro-Tom (MT) exibem vantagens na sua utilização em pesquisas e estudos fisiológicos facilitando seu cultivo e condução dos testes biológicos em casa de vegetação (MARTÍ et al., 2006).

A planta modelo (Micro-Tom) selecionada para o teste de atividade da  $\alpha$ -tomatina é uma solanácea, portanto utilizamos como inoculo de *M. pernicioso* o biotipo-S (solanácea), onde foi avaliada a capacidade de desenvolvimento do fungo em plantas que receberam uma pulverização dos extratos.

A metodologia utilizada para a obtenção da  $\alpha$ -tomatina foi da precipitação dos glicoalcalóides dos frutos verdes de *S. lycopersicum* proposta por Friedman (2009). Nesta metodologia obtivemos 1,1543 gramas de glicoalcalóides a partir de 1,6 kg de frutos.

Para melhorar a distribuição, aderência, e garantir o contato do agente antifúngico na superfície das plantas foi utilizando um espalhante adesivo marca Dufol. A concentração recomendada pelo fabricante para a sua utilização é 0,05%, assim a massa obtida na extração (1,1543 g) foi dissolvida em 30 ml de solução aquosa de dispersante adesivo. Cada planta foi pulverizada com 300ul desta solução que continha 11,54 mg de  $\alpha$ -tomatina.

Apesar dos frutos verdes possuírem maior concentração de  $\alpha$ -tomatina, um extrato bruto de folhas de tomateiro também foi preparado na concentração de 30% em solução de espalhante adesivo, e pulverizado sob as plantas para avaliar sua capacidade de inibir o desenvolvimento do fungo, no mesmo ensaio plantas foram pulverizadas somente com o espalhante adesivo para avaliar uma possível interferência no desenvolvimento das plantas.

Os sintomas das plantas que receberam pulverização do extrato bruto de folhas (EBF) e pulverização da extração dos frutos verdes (EFV) foram comparados aos das plantas que foram inoculadas e não receberam aplicação de nenhum extrato (MT) e com plantas que não foram inoculadas e não sofreram pulverização (controle), cada tratamento contou com vinte repetições como ilustrado no Quadro 1

Tratamento 1	Plantas inoculadas e pulverizadas com extrato bruto folhas (EBF)
Tratamento 2	Plantas inoculadas e pulverizadas com extração frutos verdes (EFV)
Tratamento 3	Plantas pulverizadas com espalhante adesivo (AD)
Tratamento 4	Plantas somente inoculadas (MT)
Tratamento 5	Plantas sem inoculação e pulverização – controle (C)

Quadro 1 - Tratamentos utilizados no ensaio de inibição de crescimento do fungo em plantas

Os primeiros sintomas esperados nas plantas nos dias após a inoculação e utilizados para controle da manifestação sintomatológica são hiperplasia do caule, aumento do número de células causando “inchaço”, e aparecimento das “vassouras” (superbrotamento).

As inspeções dos sintomas e medições de hiperplasia nos caules das plantas foram realizadas a cada cinco dias, totalizando 35 dias após a inoculação do fungo. As inspeções consistiram de medida do diâmetro do caule e verificação do aparecimento dos sintomas (hiperplasia e brotamento lateral “vassouras”).

A Tabela 6 apresenta as médias da evolução das medidas do caule das plantas a cada cinco dias, nos cinco tratamentos e a porcentagem de plantas que apresentaram sintomas.

Tabela 6 - Médias da evolução das medidas do caules em função dos dias das plantas inoculadas e que receberam os tratamentos

	Dias após inoculação							% plantas com sintomas
	5	10	15	20	25	30	35	
<b>EBF</b>	0,19	0,28	0,35	0,52	0,58	0,66	0,70	70%
<b>EFV</b>	0,18	0,24	0,30	0,43	0,51	0,54	0,55	30%
<b>MT</b>	0,19	0,27	0,36	0,48	0,56	0,65	0,70	60%
<b>C</b>	0,19	0,29	0,38	0,46	0,50	0,54	0,56	
<b>AD</b>	0,20	0,29	0,36	0,46	0,49	0,54	0,52	

As plantas que somente são inoculadas com o fungo e não sofrem qualquer tratamento (controle), nem todas apresentam os sintomas esperados, devido a fatores de penetração do basidiósporo e condições apropriadas para desenvolvimento e instalação do patógeno, portanto devido a ensaios anteriores é esperada uma taxa de aproximadamente 60 a 70% de plantas com manifestação dos sintomas.

Comparando os resultados obtidos nas plantas que sofreram pulverização com o extrato bruto de folhas (EBF) que apresentaram 70% de manifestação dos sintomas, com o as plantas que foram inoculadas e não receberam pulverização alguma (MT) onde apresentou 60% de sintomas, podemos concluir que o extrato bruto de folhas não exibiu atividade antifúngica.

Diante dos resultados obtidos nas plantas pulverizadas com o extrato frutos verdes, apenas 30% das plantas apresentaram os sintomas, podemos então concluir que a  $\alpha$ -tomatina presente nessa solução foi capaz de reduzir significativamente a ação patogênica deste fungo. É possível afirmar que este tratamento (EBF), na concentração utilizada (30%), a  $\alpha$ -tomatina não é capaz de exibir sua propriedade antifúngica.

Sendo assim, podemos concluir que a  $\alpha$ -tomatina quando pulverizada em plantas inoculadas é responsável pela atividade antifúngica, inibindo a sintomas causados pelo *M. perniciosa*

Para avaliar a evolução sintomática da hiperplasia no caule causado pelo *M. perniciosa*, um gráfico pode ser construído (Gráfico 1) levando em consideração as medidas do diâmetro do caule das plantas dos tratamentos em função dos dias. Neste gráfico é possível visualizar as diferenças do diâmetro entre tratamentos utilizados.

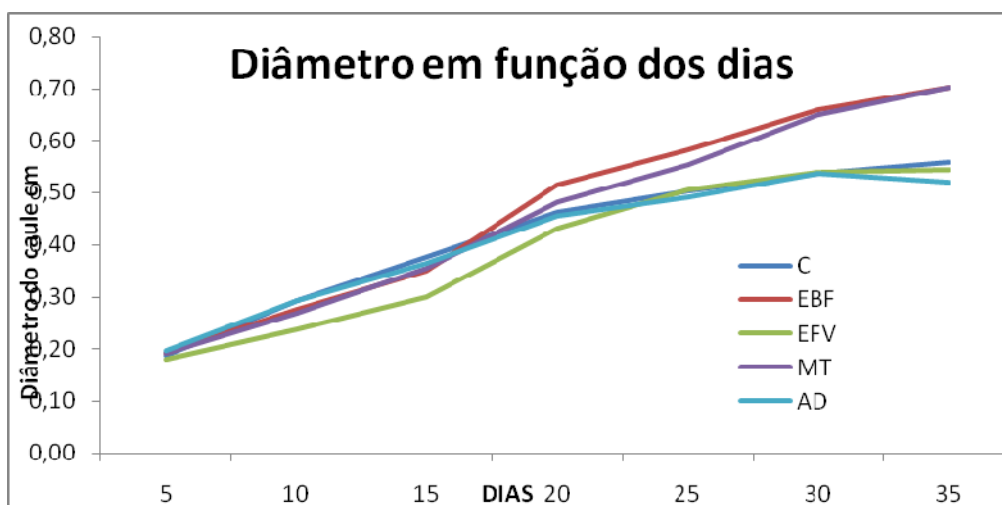


Gráfico 1- Evolução do diâmetro dos caules das plantas que receberam os tratamentos. C controle, EBF pulverização com extrato bruto de folhas, EFV pulverização com extração de frutos verdes, MT plantas somente inoculadas, AD pulverização com espalhante adesivo

As plantas que foram pulverizadas com extrato bruto de folhas tiveram comportamento similar às plantas que foram inoculadas e não receberam pulverização (MT), ou seja, o extrato bruto de folhas não controlou o desenvolvimento do fungo baseado na medida da hiperplasia.

No entanto, as plantas que sofreram pulverização com a extração de frutos verdes (EFV), além de diminuir a incidência do número de plantas que manifestaram os sintomas, apresentaram desenvolvimento do caule similar as plantas não inoculadas e não receberam pulverização (controle-C). Portanto o precipitado obtido nesta extração (EFV) se mostra eficiente na inibição desenvolvimento do fungo observado pelo comportamento do diâmetro do caule similar das plantas controle.

As plantas que receberam a pulverização do espalhante adesivo (AD) comportaram-se da mesma maneira que as plantas controle (C), possibilitando afirmar que este produto adicionado aos extratos visando melhor aderência as folha não interfere no crescimento e desenvolvimento normal das plantas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As metodologias de extração do composto antifúngico de folhas e frutos verdes de *Solanum lycopersicum* se mostram oportunas no isolamento e identificação do glicoalcalóide  $\alpha$ -tomatina, um composto que exibe atividade antifúngica para o fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* biotipos Cacao, Solanácea e Liana.

Os frutos verdes e as folhas contêm  $\alpha$ -tomatina, portanto podem ser utilizados como matéria prima na extração do composto com atividade antifúngica; apesar dos frutos verdes conterem maior concentração do glicoalcalóide, a utilização das folhas se mostra mais viável por não possuírem valor de mercado, necessitando assim maiores estudos para sua utilização.

Os resultados obtidos em laboratório apresentaram resultados satisfatórios quanto à atividade antifúngica da  $\alpha$ -tomatina, e os ensaios realizados em casa de vegetação apresentaram resultados promissores, porém necessitam de maiores estudos devido envolver variáveis de cultivo das plantas, concentração e período de pulverização dos extratos, número de plantas avaliadas, entre outros.





## REFERÊNCIAS

- ABELL, D.C.; SPORNS, P. Rapid quantitation of potato glycoalkaloids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 8, p. 2292-2296, 1996.
- AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, Sept./Oct. 2005.
- ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacauero. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZEMBE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Ceres, 2005. cap. 18, p. 151-164.
- ALGER, K.; CALDAS, M. Cacau na Bahia: decadência e ameaça a mata atlântica. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 117, p. 28-35, jan./fev., 1996.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate**: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras: Ed. UFLA, 2004. 400 p.
- AMADIOHA, A.C. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachia indica*. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 5, p. 287-290, 2000.
- ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C. de; NAKAIAMA, L.H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (STAHLE) Singer: a experiência da amazônia brasileira. **Agrotropica**, Itabuna, v. 10, n. 2, p. 49-60, maio 1998.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL – 2003. Rio de Janeiro, v. 63, p. 3-23, 2003.
- BLANKEMEYER, J.T.; STRINGER, B.K.; RAYBURN, J.R.; BANTLE, J.A.; FRIEDMAN, M. Effects of potato alkaloids  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine on membrane potential of frog embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 10, p. 2022-2025, 1992.
- BOWERS, J.H.; BAILEY, B.A.; HEBBAR, P.K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R.D. The impact of plant disease on world chocolate production. 2001. 15p. Plant Health Progress. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/cacao>>. Acesso em: 28 jun. 2010.
- BRUNETON, J. **Plantas tóxicas**: vegetales peligrosos para el hombre y los animales. Zaragoza: Acribia, 2001. 540 p.
- CALDWELL, K.A.; GROSJEAN, O.K.; HENIKA, P.R.; FRIEDMAN, M. Hepatic ornithine decarboxylase induction by potato glycoalkaloids in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 531-535, 1991.

CATALDI, T.R.; LELARIO, F.; BUFO, S.A. Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, Cidade, v. 19, n. 21, p. 3103-3110, 2005.

De MARCO, J.L.; LIMA, L.H.C.; De SOUSA, M.V.; FELIX, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 383-386, June 2000.

De MARCO, J.L.; VALADARES-INGLIS, M.C.; FELIX, C.R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 33-38, Jan./Mar. 2003.

\_\_\_\_\_. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 64, n. 1, p. 70-75, Mar. 2004.

DELGADO, J.C.; COOK, A.A. Nuclear condition of the basidia basidiospore and mycelial of *Marasmius perniciosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, n.3, p. 66-72, 1976.

EMBRAPA. **A cultura do tomateiro (para a mesa)**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1993. 92 p.

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

FONTES, P.C.R.; SILVA, D.J.H. **Produção de tomate de mesa**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 197 p.

FRIEDMAN, M. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, n. 1/2, p. 143-155, Oct. 2004.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C.E.; MCDONALD, G.M. Alpha-tomatine determination in tomatoes by HPLC using pulsed amperometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 9, p. 1959-1964, 1994.

FRIEDMAN, M.; MCDONALD, G.M. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 55-132, 1997.

FRIEDMAN Tomato Glycoalkaloids: Role in the Plant and in the Diet. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v.50, n.21, p 5751–5780, 2002. DOI: 10.1021/jf020560c

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C. E.; SEUNG-UN LEE, HYUN -JEONG KIM. Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, p.5727–5733, 2009.

- FUKUHARA, K.; SHIMIZU, K.; KUBO, I. Arudonine, an allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. **Phytochemistry**, New York, v. 65, n. 9, p. 1283-1286, May 2004.
- FURLAN, S.A.; VIRMOND, L.J.; MIERS, D.A.; BONATTI, E.M.; GERN, R.M.M.; JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.13, n. 6, p.689-692, 1997.
- GRIFFIN, W.J.; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, New York, v. 53, n. 6, p. 623-637, Mar. 2000.
- GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* using a bran-vermiculite medium. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, n. 4, p. 227-230, July 1993.
- GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**, London, v. 71, n. 3, p. 278-289, Mar. 1994.
- GUYTON, B. **Cocoa market**: supply and outlook. Chocolate Manufactures Association. Production and Marketing statistics. 2006. 123p. Disponível em: <<http://www.worldcocoafoundation.org/info-center/fact-sheet.asp>>. Acesso em: 28 jun. 2010.
- HOAGLAND, R.E. Toxicity of tomatine and tomatidine on weeds, crops and phytopathogenic fungi. **Allelopathy Journal**, New York, v. 23, n. 2, p. 425-436, 2009.
- HSU, S.H.; TSAI, T.R.; LIN, C.N.; YEN, M.H.; KUO, K.W. Solamargine purified from *Solanum incanum* Chinese herb triggers gene expression of human TNFR I which may lead to cell apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 229, n. 1, p. 1-5, 1996.
- KEUKENS, E.A.J.; DE VRIJE, T.; VAN DEN BOOM, C.; DE WAARD, P.; PLASMAN, H.H.; THIEL, F.; CHUPIN, V.; JONGEN, W.M.F.; DE KRUIJFF, B. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica et Biophysica Acta – BBA**. Amsterdam, v. 1240, n. 2, p. 216-228, Dec. 1995.
- LAIRINI, K.; RUIZ-RUBIO, M. Detoxification of  $\alpha$ -tomatine by *Fusarium solani*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 11, p. 1375-1380, Nov. 1988.
- LAURILA, J.; LAAKSO, I.; VALKONEN, J.P.T.; HILTUNEN, R.; PEHU, E. Formation of parental-type and novel glycoalkaloids in somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. **Plant Science**, Limerick, v. 118, n. 2, p. 145-155, 1996.
- LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENE, M.L.V.; OLIVEIRA, M.L. Cacao. In. VALE, F.X.R.; ZAMBOLI, L. (Ed.). **Controle de doenças de planta**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília: Ministério da Agricultura e Desenvolvimento, 1997. cap. 13, p. 611-656.

LYNDEL, W. ;MEINHARDT, C. de M.B. ;RINCONES, J.;AZEVEDO, R.A. CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis pernicios*, the Causal Agent of Witches' Broom Disease of *Theobroma cacao* **Current Microbiology**, New York, v. 52, n.3, p.191-196, 2006.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G. J.; DIXON, M.S. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 9, p. 2037-2047, 2006.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas medicinais do nordeste do Brasil. Fortaleza: IOCE, 1989. 144 p.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEY, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, n.4, p. 1465-1472, 1997.

MELO, P.C.T. **Melhoramento genético do tomateiro**. Campinas: ASGROW, 1989. 55 p.

MOTA, S.G.R.; BARROS, T. F.; CASTILHO, M.S. *In vitro* Screening and Chemometrics Analysis on a Series of Azole Derivatives with Fungicide Activity Against *Moniliophthora pernicios*. **Journal Brazilian Chemistry Society**, Lisse, v. 21, n. 3, p. 510-519, 2010.

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

NISHIE, K.; GUMBMAN, M.R.; KEYL, A.C. Pharmacology of solanine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 81-92, 1971.

NOBUYUKI KOZUKUE, N.; HAN, J.S.; LEE, K.R.; FRIEDMAN, M. Dehydrotomatine and  $\alpha$ -Tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 7, p. 2079-2083, 2004.

OLIVEIRA, M.L. **Studies on the taxonomy, ecology, survival and control of *Phytophthora palmivora*, *P. capsici* and *P. citrophthora* from cacao (*Theobroma cacao* L.) in Brazil**. 1990. 216 p. Tese (Ph.D in Phytopatology) - University of California, Riverside, 1990.

PAUL, A.T.; SANJAY, V.; BHUTANI, K.K. Liquid chromatography–mass spectrometry-based quantification of steroidal glycoalkaloids from *Solanum xanthocarpum* and effect of different extraction methods on their content. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1208, n. 1-2, p. 141-146, Oct. 2008.

PERALTA, I.E.W.; SPOONER, D.M. Classification of wild tomatoes: a review. **Kurtziana**, Córdoba, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2000.

\_\_\_\_\_. Granule-bound starch synthetase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill) Wettst. Subsection *Lycopersicon*). **American Journal of Botany**, Ohio, v. 88, n.3, p. 1888-1902, 2001.

- PEREIRA, J.L. **Alternative strategies for the chemical control of *Phytophthora* pod rot of cocoa in Bahia, Brazil**. 1998. 220 p. Tese (Ph.D.) - University of Bristol, Bristol Kingdom, 1998.
- PEREIRA, J.L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J.M.; ALMEIDA, L.C.C. First record on the presence of witches' broom disease in the principal cocoa-producing area of Brazil. **Tropical Agriculture**, London, v. 67, n. 2, p. 188-189, Apr. 1990.
- PINTO, L.R.M.; PIRES, J.L. **Seleção de plantas de cacau resistentes a vassoura-de-bruxa**. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento. 1998. 34 p. (Boletim Técnico, 181).
- 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. 325 p.
- PURDY, L.H.; SCHIMDT, R.A. Status of cacao witches broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n.3, p. 573-594, 1996.
- RODDICK, J.G. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Phytochemistry**, New York, v. 28, n. 10, p. 2631- 2634, 1989.
- RODDICK, J.G. The steroidal glycoalkaloid  $\alpha$ -tomatine. **Phytochemistry**, New York, v. 13, n. 1, p. 9-25, Jan. 1974.
- RODDICK, J.G.; RIJENENBERG, A.L.; WEISSENBERG, M. Alterations to the permeability of liposome membranes by the solasodine-based glycoalkaloids solasonine and solamargine. **Phytochemistry**, New York, v. 31, n. 6, p.1951-1954, 1992.
- SANOGO, R.C.; POMELLA, A.; HERBAR, P.K.; BAYLE, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J.; LUMESDEN, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cocoa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 10, p. 1032-1037, Oct. 2002.
- 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**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.
- SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Embrapa Hortaliças, 2000. 168 p.
- SIMÕES, C.M.O.; GUERRA, M.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. 1102 p.
- VAN GELDER, W.M.J. Chemistry, toxicology, and occurrence of steroidal glycoalkaloids: potential contaminants of the potato. In: RIZK, A.F. **Poisonous plants contaminating edible plants**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 117-156.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, New York, v. 64, n.1, p. 3-19, 2003.

