

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS**

“ESTUDO QUÍMICO DE *Alternaria alternata* PATÓTIPO TANGERINA EM MEIO ARTIFICIAL E NA INTERAÇÃO COM *Guignardia citricarpa*”

**Kátia Roberta Prieto\***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, na área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva**

\*Bolsista: CNPq

São Carlos-SP

2012

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

P949eq

Prieto, Kátia Roberta.

Estudo químico de *Alternaria alternata* patótipo tangerina em meio artificial e na interação com *Guignardia citricarpa* / Kátia Roberta Prieto. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 295 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Química orgânica. 2. *Alternaria alternata*. 3. *Guignardia citricarpa*. 4. Espectrometria de massa. 5. Estudo de voláteis. 6. Ensaio biológico. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

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

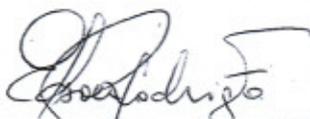
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Katia Roberta Prieto**, realizada em 03 de maio de 2012:*



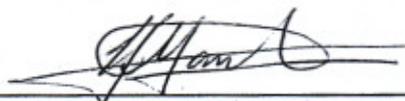
---

Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



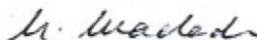
---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



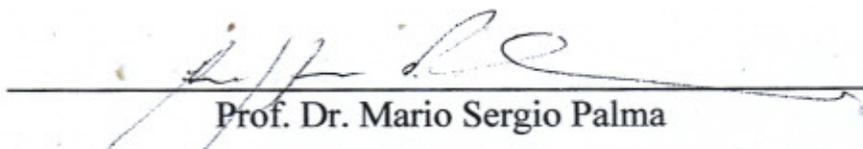
---

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos



---

Dr. Marcos Antonio Machado



---

Prof. Dr. Mario Sergio Palma

# *Dedico essa tese...*

*As pessoas mais importantes da minha vida,*

*As pessoas que sempre acreditaram em mim e sempre fizeram da tristeza um aprendizado, da alegria uma festa e dos sonhos concretizados uma vitória. Sem a presença de vocês nada teria sentido em minha vida...*

*Dedico aos meus pais Magda e Fernando, ao meu irmão Evandro e a minha avó Cilia.*

*Eu os amo de forma incondicional! Basta apenas um sorriso de vocês para eu me sentir amada, protegida e simplesmente feliz!!! Agradeço a Deus por ter vocês como minha família... Resumindo, um trecho de uma música que exprime tudo:*

*“Eu tenho tanto pra lhe falar, mas com palavras não sei dizer, como é grande o meu amor por você...”*

*Dedico também ao meu amor, Paulo, a pessoa que eu escolhi para compartilhar todos os momentos da minha vida, a pessoa que sempre está ao meu lado me apoiando de forma pura, sincera e amável. Há quatro anos nossa história começou, e logo percebi que não saberia mais viver sem você... Eu te amo!*

*“Eu sei q vou te amar, por toda a minha vida eu vou te amar, a cada despedida eu vou te amar...”*

*A vocês meus mais sinceros agradecimentos*

*Eu amo vocês....*

*“De tudo ficaram três coisas:*

*A certeza de que estamos começando,  
A certeza de que é preciso continuar e  
A certeza de saber que podemos ser interrompidos,  
Antes de terminar.*

*Fazer da interrupção um caminho novo,  
Fazer da queda um passo de dança,  
Do medo uma escada,  
Do sonho uma ponte,  
Da procura um encontro.  
E assim terá válido a pena existir.”*

*Fernando Sabino*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus por iluminar meu caminho e sempre estar presente nos momentos de aflições e alegrias.*

*À amiga e professora Fátima, obrigado pela orientação, confiança e amizade. A senhora é um exemplo a ser seguido. Obrigado principalmente por ter feito eu me apaixonar pela área de produtos naturais.*

*Aos professores membros da banca pelas sugestões.*

*Ao amigo e professor Dr. Edson Rodrigues Filho, muito obrigado pela ajuda, confiança, amizade e por ter feito eu me encantar pelo enorme mundo dos micro-organismos.*

*Ao Dr. Marcos A. Machado, seu aluno Rodrigo Stuart e toda a equipe do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Instituto Agrônomo de Campinas-IAC, pela doação de um isolado de *A. alternata* para a realização desta tese.*

*À prof Dra. Angélica Maria Penteado Martins Dias e a Dra Luciana do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCar pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura.*

*Aos professores do grupo de Produtos Naturais Dr. João Batista Fernandes, Dr. Paulo Cezar Vieira, Dr. Moacir Rossi Forim que participaram de alguma forma para a realização desse trabalho.*

*Ao grupo de RMN, principalmente aos professores Gilberto Ferreira e Thigo Venâncio.*

*À prof. Dra. Carla Cavalheiro e ao Dr. Éder Cavalheiro por sempre me apoiarem na decisões e me encorajar.*

*Ao amigo e doutor Leonardo Toffano pelo auxílio nos experimentos, pela paciência e principalmente pelos ensinamentos oferecidos.*

*Ao mestrando e irmão Evandro L. Prieto pela ajuda na identificação do fungo e também pelos bons momentos em casa e no laboratório.*

*À amiga Lu do RMN por sempre estar com um sorriso no rosto e disposta a ajudar.*

*À todos os amigos do grupo LaBioMMi principalmente aos amigos Zeh, Dianinha e Bié, a amiga Livia Soman e ao amigo Dr. Douglas Ferreira pelo auxílio nas análises de LC-MS e MALDI-TOF.*

*Ao Sabá que me ensinou a dar os primeiros passos no meu doutorado, minha eterna gratidão.*

*À família Oliveira, seu Paulo, Maria Tereza e Daniela, pelo carinho, pelos momentos felizes que sempre passamos juntos e por me acolherem sempre com sorriso no rosto.*

*À Glau, minha cunhadinha e ao Dudu, por fazerem parte da minha família e sempre estarem ao meu lado me fazendo rir.*

*As minhas amigas Leticia, Amanda, Aline, Eliana, Máira, Ferzinha, por estarem sempre ao meu lado mostrando que a vida é linda.*

*A todos os meus amigos de Batatais que sempre me proporcionaram ótimos momentos, em especial ao Puff, ao Ricardo e a Larissa.*

*Aos amigos Márcio e Poly, Ro e Lu por fazerem dos finais de semana uma festa, obrigado por acreditarem em mim e obrigado por compartilharem comigo mais uma etapa.*

*À pequenina Lais que com as suas mãozinhas de fada transformavam qualquer dia ruim em um belo e doce momento.*

*À minha amiga Marsele, minha eterna gratidão. Obrigado por toda ajuda, pelas conversas por telefone que sempre traziam uma nova ideia, pelos momentos de alegria e risadas que compartilhamos. Obrigado mais ainda por acreditar que eu podia concluir mais essa etapa e obrigado pela sua sincera amizade.*

*À todos os amigos do laboratório de produtos naturais, principalmente aqueles que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim: Tati Albarice, Paulinha, Vanessa Pasqualotto, Babi, Vivian, Samya, Gra, Evandro, High, Cristovam, Léo, Israel, Caio e principalmente ao Murilo, que sempre me ajudou e me encorajou nos momentos de desespero rs.*

*A todos que de qualquer forma contribuíram para a realização desse trabalho.*

*Ao CNPq pela bolsa concedida e a todos os órgãos de fomento.*





## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	acetato de etila
BuOH	butanol
ACN	acetonitrila
THF	Ácido trifluoracético
MeOH	metanol
MeOD	metanol deuterado
DMSO- <i>d</i> 6	dimetil sulfoxido deuterado
EtOH	etanol
CCD	cromatografia em camada delgada
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
SCoA	coenzima A
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear De Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear De Carbono
COSY	Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
δ	deslocamento químico em parte por milhão
ppm	parte por milhão
Hz	Hertz
MHz	Mega-hertz
<i>J</i>	constante de acoplamento

<i>s</i>	singleto
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>m</i>	Multipelto
HST	Host-specific toxin
ES	Electrospray Ionization
$M^+$	pico do íon molecular
<i>m/z</i>	relação massa carga
PCR	reação de cadeia em polimerase
<i>g</i>	grama
mg	miligrama
mL	mililitro
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
atm	atmosfera
<i>h</i>	altura da sílica na coluna de vidro
BDA	batata-dextrose-ágar
$\Phi$	diâmetro

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Área, produção e rendimento de tangerina no Brasil, no período 1970-2009.....	9
TABELA 1.2 - Algumas Toxinas Específicas de <i>A.alternata</i> e seus hospedeiros .....	17
TABELA 1.3 – Toxinas de <i>A. alternata</i> encontradas em citros .....	18
TABELA 3.1- Requisitos Nutricionais para induzir a esporulação.....	38
TABELA 3.2- Primes utilizados na PCR para a identificação do gênero .....	44
TABELA 3.3- Primes utilizados na PCR para a identificação da espécie.....	44
TABELA 3.4- Subextratos e suas respectivas massas.....	49
TABELA 3.5 – Proporção de Solventes utilizados para a extração dos metabólitos no co-cultivo .....	56
TABELA 3.6- Condições do espectrômetro de massas para as análises, ESI (+) .....	57
TABELA 3.7- Condições utilizadas nas análises por LC/MS.....	57
TABELA 3.8 - Método cromatográfico utilizado na análise por GC-MS para substâncias voláteis. ....	61
TABELA 4.1- Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 01 e comparação com dados da literatura.....	79
TABELA 4.2 – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de 02 e comparação com dados da literatura.....	86
TABELA 4.3- Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 03 e comparação com dados da literatura.....	93
TABELA 4.4- Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 04 e comparação com dados da literatura.....	101

TABELA 4.5- Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>05</b> e comparação com dados da literatura.....	119
TABELA 4.6- Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>06</b> e comparação com dados da literatura.....	126
TABELA 4.7- Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>07</b> e comparação com dados da literatura.....	127
TABELA 4.8 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de 08 e comparação com dados da literatura (DMSO, 400 MHz).....	132
TABELA 4.9- Dados de RMN de $^1\text{H}$ de 09 e comparação com dados da literatura.....	137
TABELA 4.10- Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de 09 e comparação com dados da literatura.....	137
TABELA 4.11- Dados de RMN de $^1\text{H}$ de 10 e comparação com dados da literatura.....	144
TABELA 4.12- Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de 10 e comparação com dados da literatura.....	144
TABELA 4.13- Ácidos graxos que esterificam o glicerol isolado .....	151
TABELA 4.14- Micotoxinas de <i>A. alternata</i> .....	158
TABELA 4.15- Siglas dos experimentos de co-cultivo de micro-organismos causadores de doenças de citros.....	161
TABELA 4.16- Substâncias identificadas do fungo <i>Alternaria alternata</i> em meio CZAPECK's extraídas pelo método da hidrodestilação .....	193
TABELA 4.17- Substâncias identificadas do fungo <i>Alternaria alternata</i> em meio sólido de arroz extraídas pelo método da hidrodestilação .....	197
TABELA 4.18 – Susbtâncias isoladas de raiz de <i>Waltheria brachypeta</i> .....	254
TABELA 4.19 - Substâncias ensaiadas frente ao <i>A. alternata</i> isoladas de diferentes partes de tangor 'Murcott'.....	257
TABELA 4.20 - Substâncias ensaiadas frente ao <i>A. alternata</i> isoladas de diferentes plantas.....	260

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Principais estados produtores de tangerina no Brasil em 2009. Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2009. Consultado em 05/11/2011. ....	8
FIGURA 1.2 - Produção de tangerina no Brasil, fonte IBGE, 2009. Produção brasileira de tangerina por região fisiográfica em 2009. Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2009. Consultado em 05/11/2010.....	9
FIGURA 1.3 - Lesões características de mancha marrom de alternaria em tangor ‘Murcott’. (A) Lesões em folhas de tangor ‘Murcot’ após 72 horas de infecção. (B) Lesão circundada pelo halo amarelo em folha de tangor ‘Murcott’ (C) Lesões em frutos de tangor ‘Murcot’ .....	11
FIGURA 1.4 - Ciclo de vida de <i>Alternaria sp.</i> ....	13
FIGURA 3.1 – Tangor ‘Murcot’ após a inoculação de <i>A. alternata</i> . ....	39
FIGURA 3.2 – Folhas de tangor ‘Murcot’ após 24 horas de inoculação do micro-organismo. ....	40
FIGURA 3.3 - Assepsia realizada para o isolamento do micro-organismo.....	41
FIGURA 3.4 - Meio de cultura arroz com <i>Alternaria alternata</i> : A) Fungo <i>A. alternata</i> com 20 dias de cultivo no meio de arroz; B) Fungo <i>A. alternata</i> com 26 dias de cultivo no meio de arroz. ....	46
FIGURA 3.5 - Procedimento de cultivo e extração de <i>Alternaria alternata</i> . ....	47
FIGURA 3.6- Coleta de Fragmentos dos micro-organismos na região de intersecção. ....	56
FIGURA 3.7- Representação do sistema de hidroddestilação utilizando o aparato de Clevenger.....	58
FIGURA 3.8 – <i>A. alternata</i> inoculado em meio sólido de arroz para a obtenção de compostos voláteis: A) Controle do experimento contendo somente o meio de cultivo; B) Meio de cultivo contendo fragmentos de <i>A. alternata</i> . ....	60

FIGURA 3.9 - Rampa de temperatura utilizada para as análise por GC-MS para substâncias voláteis. ....	61
FIGURA 3.10- (a) MEV da FEI Quanta 250 operando em ESEM. (b) Leica, com software Leica Application Suite (LAS) com montagem. ....	64
FIGURA 3.11- Metodologia de ensaio de inibição <i>in vitro</i> frente ao crescimento micelial. ....	66
FIGURA 3.12 - Obtenção de uma suspensão de esporos. ....	67
FIGURA 3.13 - Metodologia de Ensaio de inibição <i>in vitro</i> frente à germinação de esporo e formação de apressórios. ....	67
FIGURA 4.1- Gel de agarose 1% corado com brometo de Etídio. M- Marcador de peso molecular 1kb plus NEOBIO; 1- Produto de PCR (550pb- espécie; 370pb- gênero). ....	72
FIGURA 4.2- Espectro de RMN <sup>1</sup> H do subextrato Acetato de Etila (MeOD, 200MHz). ....	73
FIGURA 4.3- Espectro de RMN <sup>1</sup> H do subextrato Hexano (CDCl <sub>3</sub> , 200MHz). ....	73
FIGURA 4.4- Espectro de RMN <sup>1</sup> H do subextrato Metanol (MeOD, 200MHz). ....	73
FIGURA 4.5- Espectro de RMN <sup>1</sup> H do subextrato Butanol (MeOD, 200MHz). ....	74
FIGURA 4.6- Substância 01. ....	77
FIGURA 4.7- Alternariol monometil éter com os respectivos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono. ....	80
FIGURA 4.8- Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de alternariol monometil éter (DMSO, 400 MHz). ....	80
FIGURA 4.9- Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de alternariol monometil éter (DMSO, 400 MHz). ....	81
FIGURA 4.10- Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de alternariol monometil éter (DMSO, 400 MHz). ....	82

FIGURA 4.11- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alternariol monometil éter (DMSO, 400 MHz). .....	83
FIGURA 4.12- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de alternariol monometil éter (DMSO, 100 MHz). .....	84
FIGURA 4.13- Substância 02. ....	85
FIGURA 4.14- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alternariol (Acetona, 400 MHz). .....	87
FIGURA 4.15- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alternariol (Acetona, 400 MHz). .....	88
FIGURA 4.16- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alternariol (Acetona, 400 MHz). .....	89
FIGURA 4.17- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alternariol (Acetona, 400 MHz). .....	90
FIGURA 4.18- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alternariol (Acetona, 400 MHz). .....	91
FIGURA 4.19- Substância 3. ....	92
FIGURA 4.20- Substância 3 com alguns deslocamentos. ....	92
FIGURA 4.21- Alvertoxina com os respectivos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono. ....	94
FIGURA 4.22- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alvertoxina (DMSO, 400 MHz). ....	95
FIGURA 4.23- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alvertoxina (DMSO, 400 MHz). .....	96
FIGURA 4.24- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de alvertoxina (DMSO, 400 MHz). .....	97
FIGURA 4.25- Espectro de g-COSY de alvertoxina (DMSO, 400 MHz). .....	98
FIGURA 4.26- Mapa de contorno g-HSQC de alvertoxina (DMSO, 400 MHz). .....	99
FIGURA 4.27- Substância 04. ....	99

FIGURA 4.28- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	102
FIGURA 4.29- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de altenueno (DMSO, 400 MHz). .....	103
FIGURA 4.30- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de altenueno (DMSO, 400 MHz). .....	104
FIGURA 4.31- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de altenueno (DMSO, 400 MHz). .....	105
FIGURA 4.32- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de altenueno sem supressão para visualizar a presença da metila (DMSO, 400 MHz). .....	106
FIGURA 4.33- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de altenueno sem supressão para visualizar a presença da metila (DMSO, 400 MHz).....	107
FIGURA 4.34- Espectro de g-COSY de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	108
FIGURA 4.35- Ampliação do Espectro de g-COSY de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	109
FIGURA 4.36- Ampliação do Espectro de g-COSY de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	110
FIGURA 4.37- Ampliação do Espectro de g-COSY de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	111
FIGURA 4.38- Espectro de g-HSQC de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	112
FIGURA 4. 39- Ampliação do Espectro de g-HSQC de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	113
FIGURA 4.40- Ampliação do Espectro de g- HSQC de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	114
FIGURA 4.41- Espectro de g-HMBC de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	115
FIGURA 4.42- Ampliação do Espectro de g-HMBC de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	116
FIGURA 4.43- Ampliação do Espectro de g-HMBC de altenueno (DMSO, 400 MHz).....	117

FIGURA 4.44- Substância 05. ....	117
FIGURA 4.45- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de altenusina (MeOD, 400 MHz). ...	120
FIGURA 4.46- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de altenusina (MeOD, 400 MHz). ....	121
FIGURA 4.47- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de altenusina (MeOD, 400 MHz). ..	122
FIGURA 4.48- Mapa de contorno g-HMBC de altenusina (MeOD, 400 MHz). .....	123
FIGURA 4.49- Substâncias 6 e 7. ....	124
FIGURA 4.50- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de uridina e uracila (MeOD, 400 MHz). .....	128
FIGURA 4.51- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de uridina e uracila (MeOD, 400 MHz). ....	129
FIGURA 4.52- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de uridina e uracila (MeOD, 400 MHz). ....	130
FIGURA 4.53- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de uridina e uracila (MeOD, 150 MHz). ....	131
FIGURA 4.54- Substância 08 .....	132
FIGURA 4.55- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de 5'-inosil (DMSO, 400 MHz). ....	134
FIGURA 4.56- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de 5'-inosil (DMSO, 400 MHz). ....	134
FIGURA 4.57- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de 5'-inosil (DMSO, 400 MHz). ....	135
FIGURA 4.58- Substância 09 .....	136
FIGURA 4.59- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	139
FIGURA 4.60- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	140
FIGURA 4.61- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	141

FIGURA 4.62- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz). ...	142
FIGURA 4.63- Substância 10. ....	143
FIGURA 4.64- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de peróxido de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	146
FIGURA 4.65- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de peróxido de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	147
FIGURA 4.66- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de peróxido de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	148
FIGURA 4.67- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de peróxido de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	149
FIGURA 4.68- Substância 11. ....	150
FIGURA 4.69- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de triglicerídeos ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).151	
FIGURA 4.70- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de triglicerídeos ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	152
FIGURA 4.71- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de triglicerídeos ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	153
FIGURA 4.72- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de triglicerídeos ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	154
FIGURA 4.73- Cromatograma de íon selecionado para a micotoxina alternariol. ....	155
FIGURA 4.74- Espectro do íon produto $[\text{M}+\text{H}]^+$ 259 obtido via $\text{ESI}^+$ com 32 eV da micotoxina alternariol. ....	155
FIGURA 4.75- Cromatograma de íon selecionado para a micotoxina alternariol monometil éter.....	156
FIGURA 4.76- Espectro do íon produto $[\text{M}+\text{H}]^+$ 273 obtido via $\text{ESI}^+$ com 32 eV da micotoxina alternariol monometil éter. ....	156
FIGURA 4.77- Cromatograma de íons selecionados.....	157

FIGURA 4.78- Espectro de íons produtos $[M+H]^+$ 198 obtido via ESI <sup>+</sup> , com 20 eV. ....	157
FIGURA 4.79- Controle dos micro-organismos: A) <i>A. alternata</i> com 8 dias de crescimento; B) <i>A. alternata</i> com 13 dias de crescimento; C) <i>G. citricarpa</i> com 13 dias de crescimento. ....	159
FIGURA 4.80- Experimentos de co-cultivo de <i>Guignardia citricarpa</i> e <i>Alternaria alternata</i> : A) Inoculação de <i>A. alternata</i> após 05 dias de crescimento de <i>G. citricarpa</i> ; B) Final do experimento com o crescimento de ambos os fungos. ....	160
FIGURA 4.81- Experimentos de co-cultivo de <i>Guignardia citricarpa</i> e <i>Alternaria alternata</i> : A) Inoculação de <i>A. alternata</i> e <i>G. citricarpa</i> ao mesmo tempo; B) Final do experimento com o 13 dias de crescimento de ambos os fungos. ....	160
FIGURA 4.82- Cromatograma <i>full scan</i> dos extratos dos controles: 1) CA-EXPa; 2) CA-EXPb; 3) CG; (UV- 254 nm).....	162
FIGURA 4.83- Cromatograma de íons selecionados de ácido tenuazônico dos extratos: 1) CA-EXPa; 2) CA-EXPb. ( <i>m/z</i> 198). ....	163
FIGURA 4.84- Cromatograma de íons selecionados de alternariol dos extratos: 1) CA-EXPa; 2) CA-EXPb. ( <i>m/z</i> 259). ....	164
FIGURA 4.85- Cromatograma de íons selecionados de alternariol monometil éter dos extratos: 1) CA-EXPa; 2) CA-EXPb. ( <i>m/z</i> 273).....	164
FIGURA 4.86- Cromatograma <i>full scan</i> dos extratos de GA: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb (UV- 254 nm). ....	165
FIGURA 4.87- Cromatograma de íons selecionados ( <i>m/z</i> 198 – ácido tenuazônico) do extratos de GA: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb.....	166
FIGURA 4.88- Cromatograma de íons selecionados ( <i>m/z</i> 259 - alternariol) do extratos de GA: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb.....	166
FIGURA 4.89- Cromatograma de íons selecionados ( <i>m/z</i> 273 – alternariol monometil éter) do extratos de GA: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb.....	167

FIGURA 4.90- Cromatograma <i>full scan</i> dos extratos: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb; 3) CA-EXPa; 4) CA-EXPb; 5) CG; (UV- 254 nm).....	168
FIGURA 4.91- Cromatograma <i>full scan</i> dos extratos: 1) GA-EXPa; 2) CA-EXPa; 3) CG; (UV- 254 nm).....	169
FIGURA 4.92- Biossíntese da micotoxina Ácido tenuazônico. ....	169
FIGURA 4.93- Biossíntese da micotoxina Alternariol.....	170
FIGURA 4.94- Esquema de um caminho favorecido. ....	171
FIGURA 4.95- Cromatograma <i>full scan</i> dos extratos: 1) GA-EXPb; 2) CA-EXPb; CG; (UV- 254 nm).....	171
FIGURA 4.96- Esquema de um caminho favorecido. ....	172
FIGURA 4.97- Toxina HSTs ACTG, 346 Da.....	174
FIGURA 4.98- Cromatograma de íons selecionados ( <i>m/z</i> 347) do extrato de <i>A. alternata</i> (CA-EXPb). ....	174
FIGURA 4.99- Espectro de íons produtos $[M+H]^+$ 347 obtido via ESI <sup>+</sup> , com 15 eV: A) 25 minutos; B) 30 minutos.....	175
FIGURA 4.100- Espectro de íons produtos $[M+H]^+$ 347 obtido via ESI <sup>+</sup> , com 20eV: A) 25 minutos; B) 30 minutos.....	176
FIGURA 4.101- Proposta de fragmentação para $[M+H]^+$ 347.....	178
FIGURA 4.102- Proposta de fragmentação para diferenciar os possíveis isômeros de $[M+H]^+$ 347.....	179
FIGURA 4.103- Toxina HSTs ACTG, 362 Da. ....	179
FIGURA 4.104- Cromatograma de íons selecionados ( <i>m/z</i> 363) do extrato CA-EXPb de <i>A. alternata</i> . ....	180
FIGURA 4.105- Espectro de íons produtos $[M+H]^+$ 363 obtido via ESI <sup>+</sup> , com 15eV: A) 30,29 minutos; B) 25,74 minutos.....	181
FIGURA 4.106- Proposta de fragmentação para $[M+H]^+$ 363.....	182

FIGURA 4.107- Proposta de fragmentação para os possíveis isômeros de $[M+H]^+$ 363. ....	183
FIGURA 4.108- Toxinas ACTG, 364 Da. ....	183
FIGURA 4.109- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$ 365) do extrato CA-EXPb de <i>A. alternata</i> . ....	184
FIGURA 4.110 - Espectro de íons produtos $[M+H]^+$ 365 obtido via ESI <sup>+</sup> , com 15eV: A) 24,06 minutos; B) 19,68 minutos. ....	184
FIGURA 4.111- Proposta de fragmentação para $[M+H]^+$ 365. ....	185
FIGURA 4.112- Proposta de fragmentação para os possíveis isômeros de $[M+H]^+$ 365. ....	186
FIGURA 4.113- Toxina HSTs AK, 399 Da. ....	187
FIGURA 4.114- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$ 400) do extrato CA-EXPb de <i>A. alternata</i> . ....	187
FIGURA 4.115- Espectro de íons produtos $[M+H]^+$ 400 obtido via ESI <sup>+</sup> . ....	188
FIGURA 4.116- Proposta de fragmentação para $[M+H]^+$ 400. ....	189
Figura 4.117- Crescimento de <i>A. alternata</i> para a extração de compostos voláteis: A) micro-organismo cultivado em meio sólido de arroz; B) micro-organismo cultivado em líquido de Czapek's. ....	190
FIGURA 4.118 – Cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura sem a presença de <i>A. alternata</i> (controle). ....	191
FIGURA 4.119- Cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do micro-organismo <i>A. alternata</i> em crescimento no meio de cultura para a obtenção de compostos voláteis. ....	191
FIGURA 4.120- Ampliação do cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura na presença de <i>A. alternata</i> para a obtenção de compostos voláteis. ....	192
FIGURA 4.121- Compostos voláteis identificados de <i>A. alternata</i> . ....	193
FIGURA 4.122- Espectro de massas obtido do pico 1 em t.r. 20,68 minutos. .	194

FIGURA 4.123- Espectro de massa obtidos do pico 2 em t.r. 23,71 minutos..	194
FIGURA 4.124- Espectros de massas obtidos do pico 3 em t.r. 31,36 minutos. .....	194
FIGURA 4.125- Espectros de massas obtidos do pico 4 em t.r. 35,57 minutos. .....	195
FIGURA 4.126- Cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura sem a presença de <i>A. alternata</i> (controle).....	196
FIGURA 4.127- Cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura na presença de <i>A. alternata</i> para a obtenção de compostos voláteis. ...	196
FIGURA 4.128- Ampliação do cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura na presença de <i>A. alternata</i> para a obtenção de compostos voláteis.....	196
FIGURA 4.129- Ampliação do cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura na presença de <i>A. alternata</i> para a obtenção de compostos voláteis.....	197
FIGURA 4.130- Compostos voláteis identificados de <i>A. alternata</i> . ....	201
FIGURA 4.131- Espectro de massas obtido do pico 03 em t.r. 10,73 minutos. .....	202
FIGURA 4.132- Proposta de fragmentação para o pico 03. ....	202
FIGURA 4.133- Espectro de massas obtido do pico 05 em t.r. 12,92 minutos. .....	203
FIGURA 4.134- Proposta de fragmentação para o pico 05. ....	203
FIGURA 4.135- Espectro de massas obtido do pico 06 em t.r. 14,50 minutos. .....	204
FIGURA 4.136- Proposta de fragmentação para o pico 06. ....	204
FIGURA 4.137- Espectro de massas obtido do pico 12 em t.r. 16,55 minutos. .....	205
FIGURA 4.138- Proposta de fragmentação para o pico 12. ....	206

FIGURA 4.139- Espectro de massas obtido do pico 13 em t.r. 17,66 minutos. .....	207
FIGURA 4. 140- Possíveis estruturas referentes ao pico 13. ....	207
FIGURA 4.141- Proposta de fragmentação para o pico 13.....	208
FIGURA 4.142- Proposta de fragmentação para o pico 13.....	208
FIGURA 4.143- Espectro de massas obtido do pico 15 em t.r. 19,16 minutos. .....	209
FIGURA 4.144- Proposta de fragmentação para o pico 15.....	210
FIGURA 4.145- Proposta de fragmentação para o pico 15, sugerindo a presença de enxofre.....	210
FIGURA 4.146- Proposta de fragmentação para o pico 15, sugerindo a presença de enxofre.....	211
FIGURA 4.147- Espectro de massas obtido do pico 21 em t.r. 21,01 minutos. .....	212
FIGURA 4.148- Proposta de fragmentação para o pico 21.....	212
FIGURA 4.149- Compostos voláteis identificados de <i>A. alternata</i> . ....	213
FIGURA 4.150- Espectro de massas obtido do pico 1 em t.r. 8,53 minutos....	214
FIGURA 4.151- Proposta de fragmentação para o pico 01.....	214
FIGURA 4.152- Espectro de massas obtido do pico 4 em t.r. 12,65 minutos..	215
FIGURA 4.153- Proposta de fragmentação para o pico 04.....	215
FIGURA 4.154- Espectro de massas obtido do pico 7 em t.r. 14,87 minutos..	215
FIGURA 4.155- Proposta de fragmentação para o pico 07.....	216
FIGURA 4.156- Espectro de massas obtido do pico 8 em t.r. 15,19 minutos..	217
FIGURA 4.157- Proposta de fragmentação para o pico 08.....	217
FIGURA 4.158- Espectro de massas obtido do pico 9 em t.r. 15,67 minutos..	218
FIGURA 4.159- Proposta de fragmentação para o pico 09.....	218

FIGURA 4.160- Espectro de massas obtido do pico 10 em t.r. 16,03 minutos. .....	219
FIGURA 4.161- Proposta de fragmentação para o pico 10. ....	220
FIGURA 4.162- Espectro de massas obtido do pico 14 em t.r. 18,78 minutos. .....	220
FIGURA 4.163- Proposta de fragmentação para o pico 14. ....	221
FIGURA 4.164- Espectro de massas obtido do pico 29 em t.r. 23,29 minutos. .....	222
FIGURA 4.165- Proposta de fragmentação para o pico 29. ....	222
FIGURA 4.166- Espectro de massas obtido do pico 36 em t.r. 27,13 minutos. .....	223
FIGURA 4.167- Proposta de fragmentação para o pico 36. ....	223
FIGURA 4.168- Espectro de massas obtido do pico 38 em t.r. 30,63 minutos. .....	224
FIGURA 4.169- Proposta de fragmentação para o pico 38. ....	224
FIGURA 4.170- Compostos voláteis identificados de <i>A. alternata</i> . ....	225
FIGURA 4.171- Espectro de massas obtido do pico 2 em t.r. 9,09 minutos....	226
FIGURA 4.172- Proposta de fragmentação para o pico 02. ....	227
FIGURA 4.173- Espectro de massas obtido do pico 11 em t.r. 16,27 minutos. .....	228
FIGURA 4.174- Proposta de fragmentação para o pico 11. ....	229
FIGURA 4.175- Espectro de massas obtido do pico 16 em t.r. 19,97 minutos. .....	230
FIGURA 4.176- Proposta de fragmentação para o pico 16. ....	230
FIGURA 4.177- Espectro de massas obtido do pico 27 em t.r. 22,47 minutos. .....	231
FIGURA 4.178- Proposta de fragmentação para o pico 27. ....	231

FIGURA 4.179- Espectro de massas obtido do pico 31 em t.r. 24,67 minutos. .....	232
FIGURA 4.180- Proposta de fragmentação para o pico 31. ....	233
FIGURA 4.181- Espectro de massas obtido do pico 33 em t.r. 25,41 minutos. .....	233
FIGURA 4.182- Proposta de fragmentação para o pico 33. ....	234
FIGURA 4.183- Espectro de massas obtido do pico 34 em t.r. 27,02 minutos. .....	235
FIGURA 4.184- Proposta de fragmentação para o pico 34. ....	235
FIGURA 4.185- Proposta de biossíntese para o composto referente ao pico 34. .....	236
FIGURA 4.186- Espectro de massas obtido do pico 37 em t.r. 29,82 minutos. .....	236
FIGURA 4.187- Proposta de fragmentação para o pico 37. ....	237
FIGURA 4.188- Compostos voláteis identificados de <i>A. alternata</i> . ....	238
FIGURA 4.189- Espectro de massas obtido do pico 17 em t.r. 20,19 minutos. .....	239
FIGURA 4.190- Espectro de massas obtido do pico 18 em t.r. 20,35 minutos. .....	239
FIGURA 4.191- Espectro de massas obtido do pico 19 em t.r. 20,50 minutos. .....	239
FIGURA 4.192- Espectro de massas obtido do pico 20 em t.r. 20,73 minutos. .....	239
FIGURA 4.193- Espectro de massas obtido do pico 22 em t.r. 21,44 minutos. .....	240
FIGURA 4.194- Espectro de massas obtido do pico 23 em t.r. 21,60 minutos. .....	240

FIGURA 4.195- Espectro de massas obtido do pico 24 em t.r. 21,72 minutos. .....	240
FIGURA 4.196- Espectro de massas obtido do pico 25 em t.r. 29,82 minutos. .....	240
FIGURA 4.197- Espectro de massas obtido do pico 26 em t.r. 29,82 minutos. .....	241
FIGURA 4.198- Espectro de massas obtido do pico 28 em t.r. 22,84 minutos. .....	241
FIGURA 4.199- Espectro de massas obtido do pico 30 em t.r. 24,26 minutos. .....	241
FIGURA 4.200- Espectro de massas obtido do pico 32 em t.r. 25,09 minutos. .....	241
FIGURA 4.201- Espectro de massas obtido do pico 35 em t.r. 26,39 minutos. .....	242
FIGURA 4.202 - Imagem das lesões provocadas por <i>A. alternata</i> em tangor 'Murcot' visualizadas em esteremicroscópio (Lupa, Leica). (a) Lesão em 16 horas após a inoculação do fungo (b) Lesão em 48 horas após a inoculação do fungo.....	243
FIGURA 4.203- Imagens obtidas por MEV da folha controle de Tangor 'Murcott'. .....	245
FIGURA 4.204 - Eletrofotomicrografias de varredura obtidas da folha com 16 horas sintomáticas de Tangor 'Murcott': A) Superfície foliar com a presença de alguns conídios; B) Aumento de 1800 vezes em um conídio; C) Aumento de 5343 vezes em conídios.....	245
FIGURA 4.205 - Eletrofotomicrografias de varredura obtidas da folha de Tangor 'Murcott' com 24 horas após apresentarem lesões: A) Evolução da doença e formação de apressórios; B) Penetração do micro-organismo pelo estômato da folha; C) Corte vertical na folha de tangor 'Murcot'.....	247
FIGURA 4.206 - Eletrofotomicrografias de varredura obtidas da folha de Tangor 'Murcott' com 48 horas após a inoculação de <i>A. alternata</i> : A) Aumento de conídios na folha; B) Conídios interligados; C) Face inferior da folha; D)	

Suposta presença de apressórios nas cavidades dos estômatos; E) Corte vertical na folha de tangor ‘Murcot’ .....	249
FIGURA 4.207- Foto obtida na LUPA de um cultivo de <i>A. alternata</i> .....	250
FIGURA 4.208- Imagens obtidas no Microscópio eletrônico de varredura de <i>A. alternata</i> , crecido em placa de Petri em meio BDA. ....	252
FIGURA 4.209- Efeito dos compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> .....	255
FIGURA 4.210- Efeito dos compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> .....	259
FIGURA 4.211- Efeito dos compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> .....	261
FIGURA 4.212- Efeito dos compostos naturais isolados de <i>Waltheria brachypetala</i> ensaiados frente a germinação de esporos e formação de apressórios de <i>A. alternata</i> .....	264
FIGURA 4.213 - Efeito dos compostos naturais isolados de <i>C. sinensis</i> Osbeck x <i>C. reticulata</i> Blanco ensaiados frente a germinação de esporos e formação de apressórios de <i>A. alternata</i> .....	266
FIGURA 4.214- Efeito dos compostos naturais de diversas classes ensaiados frente a germinação de esporos e formação de apressórios de <i>A. alternata</i> .....	268
FIGURA 4.215- Efeito dos compostos naturais isolados de <i>A. alternata</i> ensaiados frente ao crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> .....	271
FIGURA 4.216- Efeito dos compostos naturais isolados de <i>A. alternata</i> ensaiados frente à germinação de esporos e formação de apressórios de <i>A. alternata</i> .....	272



## LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1 - Obtenção dos extratos através de partição líquido-líquido.....	48
FLUXOGRAMA 3.2- Fracionamento do subextrato metanol obtenção de 5 substâncias.....	50
FLUXOGRAMA 3.3- Fracionamento do subextrato acetato de etila obtenção de 3 substâncias.....	52
FLUXOGRAMA 3.4- Fracionamento do subextrato hexânico obtenção de 4 substâncias.....	53



## RESUMO

### **Estudo químico de *Alternaria alternata* patótipo tangerina em meio artificial e na interação com *Guignardia citricarpa***

O estudo do fungo fitopatógeno *Alternaria alternata* contribuiu com a química desse micro-organismo. O fungo foi cultivado em larga escala utilizando como meio de cultura arroz por um período de 26 dias. Após esse período o crescimento foi interrompido e foi feito um extrato do micro-organismo o qual foi fracionado utilizando várias técnicas cromatográficas obtendo 11 metabólitos de distintas classes sendo eles: alternariol monometil éter, alternariol, altertoxina, altenueno, altenusina, uridina, uracila, 5'-inosil, ergosterol, peróxido de ergosterol e triglicerídeo. Além disso, foi feito um estudo via LC-MS buscando identificar algumas toxinas de citros produzidas por *A. alternata*, sendo que foi possível a identificação de quatro dessas. Outra pesquisa realizada via LC-MS foi o estudo de co-cultivo entre os fungos *A. alternata*, o agente causal da mancha marrom de alternaria, e *Guignardia citricarpa*, o agente causal da mancha preta de citros. Nesse estudo foi possível observar a variação de alternariol e ácido tenuazônico, micotoxinas produzidas por *A. alternata*, quando este fungo está em contato com outro fitopatógeno. O estudo de identificação dos voláteis produzidos por *A. alternaria* em diferentes meios contribuiu muito para um maior conhecimento de sua química.

Sabendo que *A. alternata* é um fitopatógeno de tangor 'Murcott' foi realizado um estudo via microscopia eletrônica de varredura (MEV) a qual foi possível observar a penetração desse fungo pela cavidade estomatal de folhas jovens desse citros.

Visando a busca de inibidores naturais para o controle da doença, foram ensaiadas diversas classes de produtos naturais frente a *A. alternata*, sendo que

alcalóides e uma cumarina, a xantiletina, foram as substâncias que apresentaram uma maior inibição no crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios.

Pensando em inibidores naturais, foram ensaiados metabólitos produzidos pelo *A. alternata* frente ao *G. citricarpa*, e os resultados obtidos revelaram que alternariol monometil éter e alternariol foram as substâncias que apresentaram um potencial fungistático frente ao agente causal da mancha preta de citros.

## ABSTRACT

### **Chemical study of the *Alternaria alternata* pathotype tangor 'Murcot' in artificial medium and interaction with *Guignardia citricarpa***

The study of phytopathogenic fungi *Alternaria alternata* has improved the chemical of this micro-organism. The fungus was grown up in large scale incubated in rice medium for 26 days. After grown period was interrupted an extract of the microorganism was made and fractionated using several chromatographic techniques, obtaining 11 different classes of metabolites which are: alternariol monomethyl éter, alternariol, altertoxin, altenuen, altenusin, uridine, uracila, 5'-inosil, ergosterol, peróxido de ergosterol e triglycerides. Also, a study was made via LC-MS in order to identify some toxins produced by *A. alternata* like a pathogen of citrus, and it was possible to identify four of these. Other research via LC-MS was the study of co-cultivation of the fungus *A. alternata*, the causal agent of alternaria brown spot, and *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. In this study was possible to observe the variation in concentration of alternariol and thenuazonic acid, mycotoxins produced by *A. alternata* when this fungus is in contact with *G. citricarpa*. The study identification of the volatiles produced by *A. Alternaria* in different ways contributed significantly to improve the knowledge of their chemistry.

Once, the *A. alternata* is a pathogenic fungus of 'Murcott' a study was performed via scanning electron microscopy (ESEM). Thus it was possible to observe the penetration of this fungus by stomatal cavity of young leaves of citrus.

In order to search for natural inhibitors to control the disease, were tested several classes of natural products against the *A. alternata*, and some alkaloids, a

coumarin, a xanthyletin, and a flavonoid substances showed Higher inhibition of mycelial growth, spore germination and appressorium formation.

With the aim to obtain information on natural inhibitors were tested metabolites produced by *A. alternata* opposite and *G. citricarpa*, the results indicated that alternariol monomethyl ether and alternariol were substances that had a potential fungistatic against the causal agent of citrus black spot.

## SUMÁRIO

1.1. Introdução Interação Planta Patógeno .....	3
1.1.1. Fases para a Colonização .....	4
1.1.1.1. Fase Pré-Infecção .....	4
1.1.1.2. Fase da Infecção .....	5
1.1.1.3. Fase de Colonização .....	6
1.2. Citricultura .....	7
1.3. Mancha Marrom de <i>Alternaria</i> .....	10
1.3.1. Sintomas.....	10
1.3.2. Ciclo de vida do patógeno .....	12
1.3.3. O patógeno <i>Alternaria alternata</i> .....	13
1.3.4. <i>Alternaria</i> e Micotoxinas .....	15
1.4. Compostos Voláteis .....	22
1.4.1. Micro-organismos e compostos voláteis .....	24
1.4.2. Metodologia para a obtenção dos compostos voláteis .....	25
2. Objetivos .....	29
3. Parte Experimental.....	33
3.1. Materiais e Equipamentos.....	33
3.1.1. Materiais Cromatográficos .....	33
3.1.2. Solventes.....	34
3.1.3. Reagentes Utilizados para o isolamento, identificação, cultivo e conservação do micro-organismo <i>A. alternata</i> : .....	34
3.1.4. Equipamentos .....	35

3.2. Procedimento Experimental.....	37
3.2.1. Obtenção e re-isolamento do micro-organismo .....	37
3.2.2. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) .....	41
3.2.3. Cultivo do micro-organismo em meios de cultura .....	45
3.2.3.1. Cultivo de <i>Alternaria alternata</i> em meio sólido .....	45
3.2.4. Extração de metabólitos.....	46
3.2.4.1. Extração dos metabólitos a partir do meio de cultura sólido .....	46
3.2.5. Fracionamento dos Extratos Brutos e Isolamento das Substâncias de <i>A. alternata</i> .....	47
3.2.5.1. Fracionamento do extrato Etanólico do meio sólido.....	47
3.2.5.2. Fracionamento do extrato metanol .....	49
3.2.5.3. Fracionamento do Subextrato acetato de etila.....	51
3.2.5.4. Fracionamento do Subextrato hexano .....	52
3.2.6. Reação de Transesterificação para a Substância 10 .....	54
3.2.7. Metodologia para o estudo de co-cultivo via LC-MS .....	54
3.2.8. Metodologia para o estudo dos Voláteis .....	58
3.2.8.1. Hidrodestilação de <i>Alternaria alternata</i> cultivado em Meio Líquido Czapeck'S Enriquecido com Extrato de Levedura .....	59
3.2.8.2. Hidrodestilação de <i>Alternaria alternata</i> cultivado em Meio Sólido Arroz	59
3.2.8.3. Análise por cromatografia em Fase Gasosa- Espectrometria de Massas para substâncias voláteis .....	61
3.2.9. Metodologia para as Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
3.2.10. Metodologia para os Ensaio Biológicos ao Desenvolvimento de Micro-organismos.....	64

3.2.10.1. Ensaio de inibição <i>in vitro</i> frente ao crescimento micelial .....	64
3.2.10.2. Ensaio de inibição <i>in vitro</i> frente à germinação de esporo e formação de apressórios .....	66
4. Resultados e Discussões .....	71
4.1. Identificação de <i>Alternaria alternata</i> .....	71
4.2. Substâncias Isoladas e Identificadas .....	74
4.3. Identificações Estruturais das Substâncias Isoladas .....	77
4.3.1. Substância 01 - Alternariol Monometil Éter .....	77
4.3.2. Substância 02 - Alternariol .....	84
4.3.3. Substância 03 – Alvertoxina I .....	91
4.3.4. Substância 04 – Altenueno .....	99
4.3.5. Substância 05 - Altenusina .....	117
4.3.6. Substância 06 e 07 - Uridina e Uracila .....	123
4.3.7. Substância 08 - 5'-inosil .....	131
4.3.8. Substância 09 – Ergosterol .....	135
4.3.9. Substância 10 – Peróxido de Ergosterol .....	142
4.3.10. Substância Triglicerídeos – .....	149
4.4. Metabólitos Secundários de <i>Alternaria alternata</i> identificadas no co-cultivo via LC-MS .....	154
4.4.1. Avaliação dos metabólitos no co-cultivo .....	154
4.4.2. Identificação de toxinas de <i>A. alternata</i> como patógeno de citros.....	173
4.4.2.1. Análise do íon $[M+H]^+$ 347 .....	173
4.4.2.2. Análise do íon $[M+H]^+$ 363 .....	179
4.4.2.3. Análises do íon $[M+H]^+$ 365 .....	183
4.4.2.4. Análises do íon $[M+H]^+$ 400 .....	186

4.5. Identificação dos Compostos Voláteis extraídos de <i>A. alternata</i> .....	189
4.5.1. Hidrodestilação de <i>A. alternata</i> em meio Czapek's enriquecido com Levedura.....	191
4.5.2. Hidrodestilação de <i>A. alternata</i> em meio de Arroz.....	195
Ciclohexanol, 4-metil-1-(1-metil-etil)- .....	197
1H-Benzociclohepteno, 2,4a,5,6,7,8-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil-, (R)-.....	198
Espiro[4.5]dec-7-ene, 1,8-dimetil-4-(1-metiletênil)-, [1S-(1 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,5 $\alpha$ )]- .....	198
Naftaleno, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-4a,8-dimethyl-2-(1-metil eteno)-, [2R-(2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]- .....	199
Naftaleno, decahidro-4a-metil-1-metileno-7-(1-metiletênil)-, [4aR-(4 $\alpha\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )]- .....	199
1H-Benzocicloheptan-7-ol, 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-1,1,4a,7-tetrametil-, cis- .....	199
4.5.2.1. Grupo 01- Compostos voláteis de <i>A. alternata</i> .....	200
4.5.2.2. Grupo 02- Compostos voláteis de <i>A. alternata</i> .....	213
4.5.2.3. Grupo 03- Outros Compostos.....	225
4.5.2.4. Grupo 04- Compostos encontrados na literatura.....	237
4.6. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	242
4.6.1. MEV de tecido vegetal – Folha Tangor ‘Murcot’ .....	242
4.6.2. MEV do Patógeno <i>Alternaria alternata</i> .....	250
4.7. Ensaio Biológicos Frente a <i>Alternaria alternata</i> .....	253
4.7.1. Efeito das substâncias naturais frente ao crescimento micelial de <i>A. alternata</i> .....	253
4.7.1.1. Ensaio 01: substâncias isoladas de <i>Waltheria brachypetala</i> .....	254
4.7.1.2. Ensaio 2: Substâncias isoladas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck x <i>Citrus reticulata</i> Blanco (tangor ‘Murcott’) .....	256

4.7.1.3. Ensaio 3 – Substâncias isoladas de diversas plantas .....	260
4.7.2. Efeito das substâncias naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressório de <i>A. alternata</i> .....	262
4.7.2.1. Ensaio 01: substâncias isoladas de <i>Waltheria brachypetala</i> .....	262
4.7.2.2. Ensaio 2: Substâncias isoladas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck x <i>Citrus reticulata</i> Blanco (tangor ‘Murcott’). .....	264
4.7.2.3. Ensaio 3 – Substâncias isoladas de diversas plantas .....	266
4.7.3. Ensaio envolvendo o micro-organismo <i>Guignardia citricarpa</i> .....	268
4.7.3.1. Ensaio de Crescimento Micelial, Germinação de Esporos e Formação de Apressórios .....	270
5. Conclusões .....	277
6. Referências.....	283

# *INTRODUÇÃO*



## 1.1. Introdução Interação Planta Patógeno

Os vegetais diferem dos animais no que concerne ao combate a organismos invasores. Nos vegetais, não há produção de moléculas específicas como as imunoglobinas, mas existe uma considerável sofisticação baseada na ação conjunta de sistemas constitutivos e induzíveis. A ativação ou repressão desses sistemas é controlada por um grande número de moléculas sinalizadoras produzidas por ambos os organismos envolvidos na interação. Os produtos de genes (sistemas de interação gene a gene) podem resultar em respostas bioquímicas localizadas ou sistêmicas ou ainda conduzir a um quadro sintomatológico extremo conhecido como reação de hipersensibilidade, com morte celular programada. A condição patogênica depende, em grande parte, da troca de mensagens químicas entre o parasita e parasitado (PASCHOLATI *et al.*, 2008).

Apesar da alta dependência fisiológica e bioquímica, os fungos estão entre os organismos patogênicos mais aprimorados morfologicamente para o exercício da patogenicidade. Inúmeros componentes estruturais foram evolutivamente desenvolvidos com o objetivo de invadir e explorar o tecido das plantas hospedeiras. Nutrientes são retirados do vegetal para garantir o sustento do fungo invasor até a fase de produção e estruturas de dispersão. Didaticamente, a infecção por fungo envolve: 1) etapas anteriores à entrada do patógeno (fase pré-infecção), 2) a penetração do patógeno (fase de infecção) e 3) o parasitismo em si (fase de colonização). Especialmente, as condições encontradas no sítio de início da infecção são importantes para definir o processo da doença. O sítio de infecção pode estimular ou inibir as estratégias adotadas pelo fungo rumo ao interior da planta atacada (PASCHOLATI *et al.*, 2008).

O sucesso de fungos patogênicos depende, em primeira análise, de vários fatores, como: 1) da capacidade do fungo invasor de crescer na presença de compostos tóxicos depositados na superfície da planta; 2) da penetração, sem provocar a formação de barreiras intrasponíveis pela hospedeira (através da ativação do gene de defesa); e por fim, 3) de permanecer parasiticamente em contato com o tecido da planta, explorando-o de maneira prolongada, coordenada e proveitosa (compatibilidade). Em consequência, a planta hospedeira doente deverá sofrer redução de crescimento e alterações metabólicas que ocorrem na presença do invasor (PASCHOLATI *et al.*, 2008).

### **1.1.1. Fases para a Colonização**

As fases podem ser classificadas em três níveis, os quais serão explicados separadamente.

#### **1.1.1.1. Fase Pré-Infecção**

Na natureza, o crescimento micelial de fungos é resultado da abundância de nutrientes e ótimas condições de temperatura, umidade e outros fatores físicos. A fase de produção de esporos proporciona a colonização de outros tecidos. Quanto mais intensa a produção de esporos, maiores são as chances de sucesso na localização de substratos alternativos. Ao mesmo tempo, que forem desenvolvidas estratégias de produção massiva de esporos, também foram desenvolvidos mecanismos de proteção dessas estruturas, visando manter a viabilidade, e mecanismos para facilitar a localização do tecido-alvo, como: dispersão de esporos, espessamento de parede de células das áreas envolvidas e desenvolvimento de estruturas para a movimentação.

A maioria dos esporos de fungos é disseminada por correntes de ar como poeiras. Teoricamente, os esporos podem viajar longas distâncias, mas

usualmente acabam em regiões próximas de onde são produzidos. Alguns requerem água como veículo de dispersão, outros são dispersos por insetos e animais. Sementes contaminadas ou ferramentas utilizadas por agricultores também podem facilitar a dispersão de esporos.

Esporos também podem permanecer em condições de dormência até que se inicie a germinação. O solo é um ambiente onde os esporos podem permanecer sem germinação por longos períodos devido à presença de um grande número de micro-organismos antagonistas que competem por nutrientes e produzem substâncias inibitórias e toxinas.

Patógenos também podem sobreviver em estado vegetativo nos tecidos da planta hospedeira. Muitos podem permanecer em estado latente em tecidos vegetais por longos períodos sem causar o aparecimento de sintomas. Outros fungos podem viver saprofiticamente em ambientes com limitações nutricionais, podem viver na superfície de hospedeiros sem penetrar, mas podem alterar essa condição quando conveniente. A longevidade de esporos na natureza pode variar de meses até anos (PASCHOLATI *et al.*, 2008).

#### **1.1.1.2. Fase da Infecção**

A fase da penetração é bastante crítica e tem sido alvo de estudos e debates há vários anos. De um lado há um grupo que acredita na necessidade de dissolução enzimática da cutícula da planta hospedeira. Contrariamente, um grande número de pesquisadores acredita que a penetração ocorre por força mecânica exercida pelas estruturas de infecção. Um terceiro grupo trabalha com a possibilidade de que haja combinação de ação enzimática e força mecânica durante a penetração de fungos. Em trabalho recente foi admitido que espécies de *Pythium* produzem enzimas para auxiliar o combate à resistência imposta pelo tecido vegetal. Dados mostram que a resistência do tecido da planta

hospedeira é muitas vezes superior à pressão exercida pelas estruturas de penetração do fungo. Assim, na prática, seria impossível o sucesso da penetração pela hifa somente pela força mecânica. A ação conjunta vem sendo progressivamente mais aceita, contudo não há dúvida de que a pressão do apressório seja a força mais importante que torna possível a penetração (PASCHOLATI *et al.*, 2008).

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

#### **1.1.1.3. Fase de Colonização**

Hifas modificadas são as principais armas dos fungos durante a colonização. Os padrões de invasão dos tecidos variam de acordo com as habilidades das hifas em crescimento e vão de subcuticular até a formação de haustórios. Os haustórios são estruturas extremamente especializadas para a

captação de nutrientes. A absorção de nutrientes ocorre a partir do citoplasma das células.

O processo de colonização é marcado por uma série de mudanças na atividade metabólica da planta hospedeira. Essas alterações muitas vezes são difíceis de distinguir sob o ponto de vista prático se não existir informação prévia sobre o comportamento da interação. Essa dificuldade resulta do fato de que as reações fisiológicas de resistência (incompatibilidade) e patogenicidade (compatibilidade) são muito similares. As principais mudanças fisiológicas nos hospedeiros incluem: 1) alterações na respiração, 2) fotossíntese; 3) translocação de água e nutrientes, 4) transpiração, 5) regulação da taxa de crescimento (PASCHOLATI, *et. al.*, 2008).

## **1.2. Citricultura**

Desde 1962, quando começaram as primeiras exportações, a citricultura tem contribuído de forma definitiva para o desenvolvimento do Brasil. Em 2009, o setor gerou US\$ 60 bilhões em exportações e somente em 2010 esperava-se mais US\$ 2 bilhões. Os preços internacionais do suco sofrem incrível volatilidade, chegando a oscilar entre US\$ 700 e US\$ 2000 por tonelada em curto intervalo de tempo. Em 2009, as exportações do complexo citros somaram de 2,9 milhões de toneladas, sendo 1,129 milhão de toneladas de suco concentrado (FCOJ, sigla em inglês), 939 mil toneladas de NFC, (suco não concentrado, sigla em inglês com dados equivalentes) e 851 mil toneladas de subprodutos.

O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja, e exporta 98% do que produz e consegue 85% de participação no mercado mundial. Flórida e São Paulo detém 81% da produção mundial de suco. Analisando apenas o a região Sudeste, esta possui 53% do total, como pode ser observado na

FIGURA 1.1. No Brasil, ao analisar o ano de 2010, foram quase 165 milhões de árvores produzindo frutos, e na Flórida, 60 milhões.

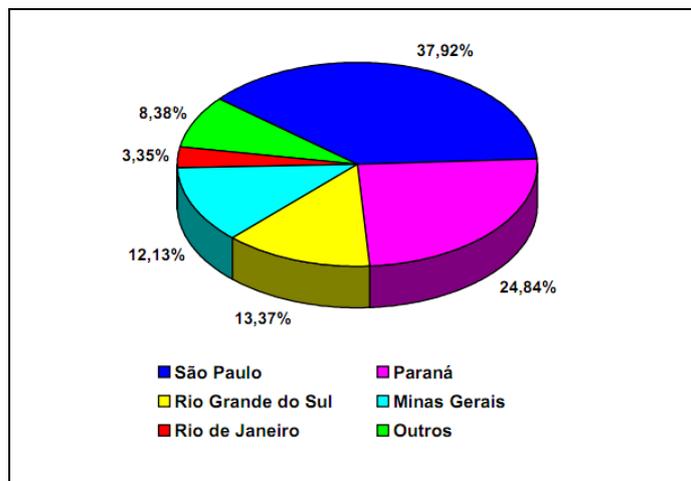


FIGURA 1.1- Principais estados produtores de tangerina no Brasil em 2009. Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2009. Consultado em 05/11/2011.

Embora o Brasil seja o maior produtor mundial de citros e o maior exportador de suco concentrado de laranja, e apesar de ter como principal espécie produzida a laranja-doce, também merecem destaque, nos pomares brasileiros, as tangerinas e alguns de seus híbridos, os quais têm como destino o mercado nacional de frutos in natura.

A produção mundial de tangerina girou em torno de 20,3 milhões de toneladas na safra de 2010/11, sendo que os principais produtores são a China (62% da produção mundial), Espanha (18% da produção mundial de tangerinas), Japão (5%) e o Brasil ocupando o quarto lugar, sendo que o Estado de São Paulo é o responsável por 38% da produção de tangerinas, como pode ser observado na FIGURA 1.2.

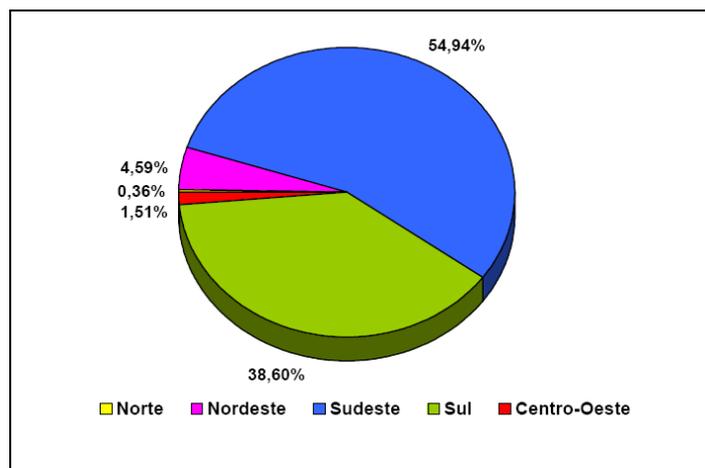


FIGURA 1.2 - Produção de tangerina no Brasil, fonte IBGE, 2009. Produção brasileira de tangerina por região fisiográfica em 2009. Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2009. Consultado em 05/11/2010.

No entanto, nas últimas décadas, a produção de tangerinas vem diminuindo no Brasil, como pode ser observado na TABELA 1.1, a qual ilustra a produção a partir da década de 70.

TABELA 1.1 - Área, produção e rendimento de tangerina no Brasil, no período 1970-2009

Anos	Área Colhida (ha)	Produção	Rendimento
		até 2000 (mil frutos) a partir de 2005 (t)	até 2000 (frutos/ha) a partir de 2005 (t/ha)
1970	26.312	2.44.854	92.918
1975	26.116	2.515.025	96.302
1980	36.014	3.405.011	94.547
1985	46.224	4.421.713	95.617
1990	44.926	4.407.542	98.107
1995	50.319	4.994.351	99.254
2000	61.513	6.017.412	97.823
2005	61.000	1.232.599	20,21
2009	54.814	1.094.429	19,97

Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2009. Consultado em 05/11/2010

Essa queda na produção de tangerinas pode estar relacionada à doença que afeta principalmente essa classe de citros, a Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA).

### **1.3. Mancha Marrom de *Alternaria***

#### **1.3.1. Sintomas**

A mancha marrom de *Alternaria* (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata* (*f.sp.citri*) patótipo tangerina, afeta frutos e ramos e ataca os tecidos imaturos ou em fase de crescimento da planta, como as folhas, expandindo-se pela ação da toxina hospedeiro-seletiva (ACT) produzida pelo micro-organismo, podendo causar desfolhamento intenso durante os períodos de infestação, em vista da necrose das folhas (AKIMITSU *et al.*, 2003). É no tecido morto de folhas e ramos que o fungo sobrevive e se reproduz, ou até mesmo em folhas em decomposição no solo (MAGNANI, 2007). Em folhas jovens, os sintomas iniciais caracterizam-se por pequenas manchas de coloração marrom ou preta, circundadas ou não por halos amarelados que, posteriormente, se estendem, podendo abranger grande área da folha. Normalmente, ocorrem nas nervuras, com morte de tecido, espalhando-se a partir delas, provocando deformação característica, ou seja, as folhas curvam-se lateralmente. O avanço das lesões seguindo as nervuras das folhas é um dos sintomas diferenciais da doença. As brotações novas, tanto vegetativas como da florada, apresentam um aspecto de requeima no caule, com morte dos ponteiros e posterior tendência ao envassouramento, pelo superbrotamento. Em ramos finos, ocorrem pequenas lesões corticosas, sem ou com halo clorótico (BASTIANEL, 2005).

Em frutos, isso não acontece, sendo nos mais jovens, infectados logo após a queda das pétalas, as lesões podem induzir a abscisão do fruto, limitando a produção da planta. As lesões dos frutos mais desenvolvidos são bastante variáveis quanto ao tamanho, podendo atingir grandes áreas da casca, com manchas escuras corticosas, as quais podem ser destacadas, deixando cicatriz na casca, depreciando o fruto. Pode haver penetração do fungo no fruto, fazendo com esse caia antes da maturação (TIMMER *et al.*, 2003).

A diferença entre este fungo que ocorre nas tangerinas e os da mesma espécie que atacam as folhas de limão “Cravo” e limão rugoso é a produção de uma toxina, que é específica, de acordo com a variedade das plantas afetadas (FUNDECITRUS, 2007). Em pomares do Estado de São Paulo, observou-se a presença de um líquido de consistência viscosa sobre as lesões, o que ainda não foi descrito nos casos observados em outros países (MAGNANI, 2007).

Na FIGURA 1.3 podem-se observar imagens obtidas no decorrer do trabalho de folhas e frutos infectados por *A. alternata*.



FIGURA 1.3 - Lesões características de mancha marrom de alternaria em tangor ‘Murcott’. (A) Lesões em folhas de tangor ‘Murcott’ após 72 horas de infecção. (B) Lesão circundada pelo halo amarelo em folha de tangor ‘Murcott’ (C) Lesões em frutos de tangor ‘Murcott’.

A mancha marrom de alternaria em outros países, como por exemplo, África do Sul, Argentina, Austrália, Colômbia, Cuba, Espanha, Estados Unidos, Israel, Itália e Turquia, é de grande importância econômica. No Brasil, foi introduzida em 2001, e desde então vem causando elevadas perdas em cultivos

comerciais de tangor Murcott (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* Osbeck) e tangerina Poncan (*C. reticulata* Blanco) (FEICHTENBERGER *et al.*, 2005; TIMMER 1998). No Brasil, foi verificada a presença da doença em pomares de tangerina ‘Dancy’ no Estado do Rio de Janeiro (GOES *et al.*, 2001) e nos anos subsequentes em São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (SPÓSITO *et al.*, 2003).

### **1.3.2. Ciclo de vida do patógeno**

Os fungos do gênero *Alternaria* sobrevivem entre um cultivo e outro em restos de cultura infectados, em hospedeiros intermediários, podendo sobreviver ainda em equipamentos agrícolas, estacas e caixas usadas ou até mesmo nas sementes. Além destas formas de sobrevivência, existe a possibilidade de o patógeno permanecer viável no solo na forma de micélio, esporos ou clamidósporos. Os conídios de *Alternaria* spp. são altamente resistentes a baixos níveis de umidade, podendo permanecer viáveis por até um ano nestas condições. Uma vez presentes na cultura, os conídios são dispersos pela ação da água, ventos e insetos. Além dessa forma de disseminação, trabalhadores, equipamentos e animais, em contato com as folhas molhadas podem disseminar o fungo. Havendo umidade e calor suficientes, os conídios germinam e infectam as plantas rapidamente podendo o fungo penetrar diretamente pela cutícula, com a formação de apressórios, ou por ferimentos ou também através dos estômatos. A colonização é intercelular, invadindo tecidos do hospedeiro, provocando alterações em diversos processos fisiológicos, que se exteriorizam na forma de sintomas. Em condições de campo as lesões surgem de três a cinco dias após a inoculação, todavia em condições controladas pontuações marrons podem ser verificadas 24 horas após a inoculação, sendo que os conídios germinam sobre o tecido suscetível, frutos, ramos e folhas novas, liberando uma toxina específica

ao hospedeiro tangerina, causando necrose rápida dos tecidos (TÖFOLI, 2004). O ciclo de vida do patógeno está descrito na FIGURA 1.4.

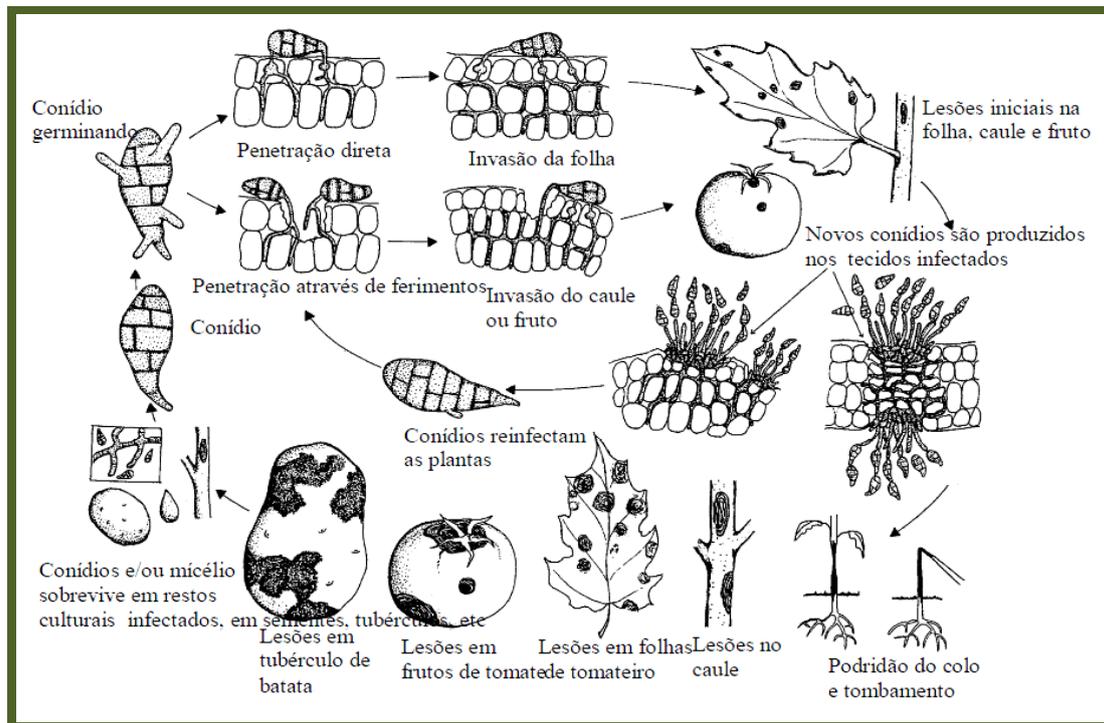


FIGURA 1.4 - Ciclo de vida de *Alternaria sp.*

### 1.3.3. O patógeno *Alternaria alternata*

Pertencente ao grupo dos Fungos Mitospóricos (ELLIS, *et al.*, 1970), *Alternaria alternata* pertence ao reino Fungi, ao sub-reino Dycaria, ao filo Ascomicota, classe Pleosporomycetidae e a ordem dos Pleosporales (ISSHIKI *et al.*, 2003; THOMMA, 2003).

O gênero *Alternaria* é composto por fungos mitospóricos que possuem conídios com comprimento e largura variável, geralmente individuais e raramente catenulados, retos ou ligeiramente curvos, com corpo oblongo ou elipsoidal que se afina em direção ao ápice, formando um bico comprido, sinuoso e ocasionalmente ramificado.

O crescimento da colônia ocorre de forma rápida, aproximadamente de três a quatro dias, sendo que a massa micelial formada apresenta um aspecto cotonoso (SASSERON, 2008) de coloração palha, parda ou ouro claro, no entanto dependendo do meio de cultura a coloração pode ser cinza intenso no centro e nas extremidades cinza, com septos transversais e poucos ou nenhum longitudinal. Os conídios são inseridos em conidióforos septados retos ou sinuosos que ocorrem isolados ou em grupos. As populações de *Alternaria spp.* são morfológicamente heterogênea, diferindo quanto à coloração do micélio, produção de pigmentos em meio de cultura, presença ou ausência de esporulação em condições de laboratório, bem como quanto a patogenicidade e formação de setores em meio de cultura (TÖFOLI, 2004).

Uma característica comum, observada em algumas espécies de *Alternaria*, está na baixa capacidade ou mesmo ausência de esporulação em meio de cultura. Um grande número de trabalhos indica diferentes métodos para induzir esporulação com variações quanto à luz utilizada, meios de cultura, ferimentos do micélio, temperaturas e idades das colônias. De maneira geral, as alternarioses são doenças típicas de primavera e verão, todavia podem causar danos importantes em outonos e invernos atípicos. Os sintomas aparecem primeiramente nas folhas mais velhas e evoluem posteriormente para as partes mais novas da planta. A doença costuma apresentar alto poder destrutivo em condições de altas temperaturas e umidade. A ocorrência de epidemias severas estão sempre associadas à temperaturas diárias de 25 a 32°C. Segundo a literatura as temperaturas mínimas, ótimas, e máximas necessárias para a germinação dos conídios são as de 5-7, 25-27 e 30-32°C, respectivamente. A umidade, fator importante na germinação de conídios, pode ser conferida pela chuva, água de irrigação ou orvalho. A presença de água livre na superfície foliar é fundamental para a germinação, infecção e esporulação do fungo. De maneira geral, os maiores índices de mancha de alternaria ocorrem em

condições de 40% de umidade relativa durante o dia e 95% durante a noite. A esporulação abundante do fungo ocorre na faixa de 14 a 26°C, com umidade relativa de 100% durante 24 horas (TÖFOLI, 2004).

Os metabólitos produzidos pelo micro-organismo são demonimados micotoxinas, sendo que algumas delas merecem destaques como por exemplo o alternariol monometil éter, altertoxinas, altenueno, altenusina, ácido tenuazônico. Essas toxinas podem ser encontradas, por exemplo, em tomates (STINSON, *et al.*, 1980 e 1981), maçãs (STINSON, *et al.*, 1980 e 1981), azeitonas (VISCANTI, *et al.*, 1986), uvas (MAGNOLI, *et al.*, 2003), papaia (BARKAI-GOLAN, 2001), pimentas (BARKAI-GOLAN, 2002) e beringelas (BARKAI-GOLAN, 2002).

#### **1.3.4. Alternaria e Micotoxinas**

Os fungos são capazes de produzir em condições naturais e laboratoriais, metabolitos secundários tóxicos. Os metabolitos secundários são compostos biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas (que constituem o metabolismo secundário), mas que não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo (BETINA, 1984). Estes compostos estão presentes no meio de cultura ou substrato onde os fungos estão se desenvolvendo. Alguns metabólitos secundários fúngicos têm propriedades antibióticas, e alguns demonstram toxicidade para animais. Esses metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que demonstram propriedades tóxicas em animais são designados genericamente de micotoxinas (FRISVAD, 1992).

As micotoxinas são produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, dos terpenóides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais (EDWARDS, *et al.*, 2002). Elas possuem baixo peso molecular e

estruturas químicas diversificadas. As diversidades dessas estruturas químicas das micotoxinas vão desde a presença de um único anel heterocíclico, a até oito anéis associados, o que está relacionado à diversidade de efeitos tóxicos (EDWARDS, *et al.*, 2002). As micotoxinas, ou simplesmente toxinas, são restritas a distribuição taxonômica e não são necessárias para a sobrevivência e reprodução do micro-organismo (WALTON, 1996).

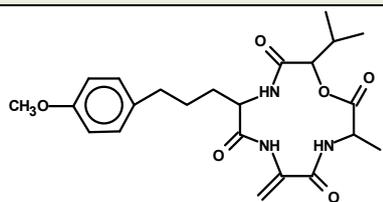
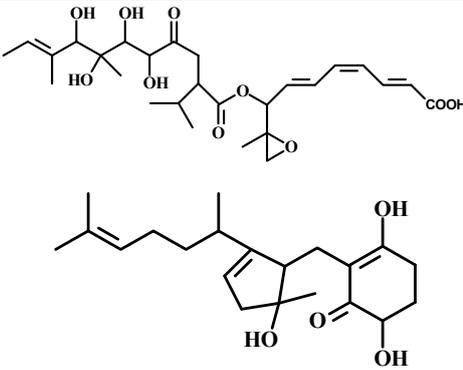
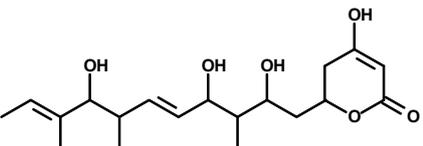
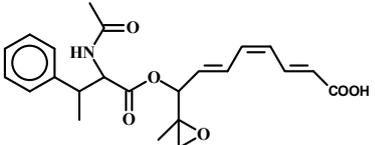
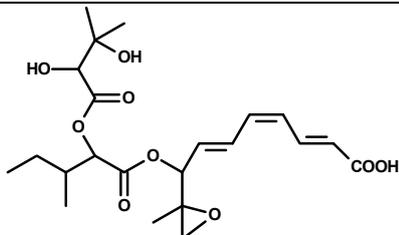
As toxinas podem ser classificadas como não-seletivas, ou seja, tóxicas a várias espécies de plantas, independentemente de o organismo toxicogênico provocar doenças nelas, ou serem classificadas como seletivas (host selective toxin - HSTs), isto é, tóxicas somente nas espécies naturalmente suscetíveis, sendo essenciais para o estabelecimento do patógeno e no estabelecimento da doença no hospedeiro (PASCHOLATI, 1995). As toxinas são geralmente tóxicas matando as células de seus hospedeiros. As HSTs são ativas em concentrações que variam de aproximadamente 10 pM a 1 $\mu$ M, e seu grau de especificidade (o seu hospedeiro seletivo) varia numa faixa de 100 a 10<sup>6</sup> $\mu$ M (WALTON, 1996).

A estabelecida função da HSTs no sistema de interação patógeno-hospedeiro mostra que esses metabólitos secundários têm principalmente um papel ecológico, modulando assim a interação de um organismo com o seu ambiente e com os outros organismos. Metabólitos secundários são importantes em muitos outros aspectos, como por exemplo, a defesa da planta, controles biológicos e interações simbióticas (WALTON, 1996).

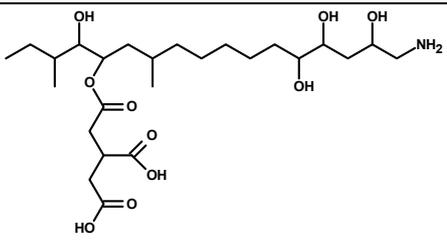
Em relação ao *Alternaria alternata*, na literatura existem descritas pelo menos 12 tipos de HSTs conhecidas, muitas das quais parecem ser variantes da espécie *A. alternata* (THOMMA, 2003). Os principais tipos de toxinas produzidas por esse patótipo são: AK (causa doença em pêras), AM (causa doença em maçãs), ACR (limão rugoso), ACT (alternaria citri toxini - tangerinas e híbridos), AL (causa doença em tomate) e AF (causa doença em morangos), as

quais seguem descritas na TABELA 1.2 (WALTON, 1996). Estudos demonstraram que esses patótipos são constituídos de pequenos cromossomos extras, dispensáveis para a sobrevivência do patógeno, diferentemente dos patótipos de *Alternaria* que não produzem HSTs (AKAMATSU *et al.*, 1999).

TABELA 1.2 - Algumas Toxinas Específicas de *A.alternata* e seus hospedeiros

Patótipo	Doença	Hospedeiro	Toxina	Estrutura
Maça	Mancha de Maça	Maça e Pêra	AM-Toxina	
Citros	Mancha marrom de <i>Alternaria</i>	Tangerina e híbridos	ACT-Toxina	
Citros	Mancha marrom de <i>Alternaria</i>	Limão Rugoso	ACR ou ACRL	
Pêra Japonesa	Pinta Preta de Pêra Japonesa	Pêra Japonesa	AK-Toxina	
Morango	Pinta Preta de Morango	Morango e Pêra Japonesa	AF-Toxina	

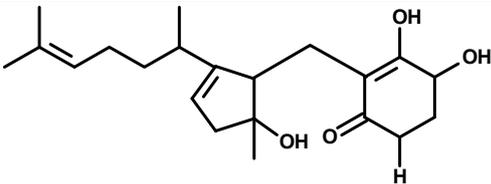
Continuação da TABELA 1.2

Tomate	Cancro da Haste do Tomate	Tomate	AL-Toxina	
--------	---------------------------	--------	-----------	--

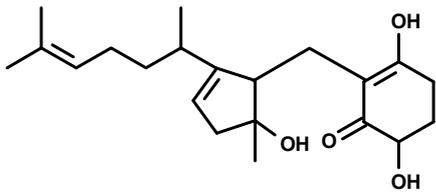
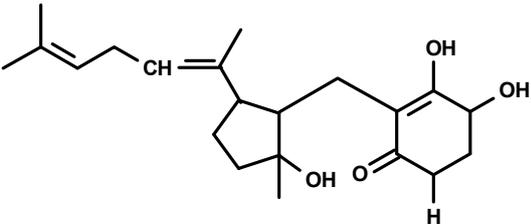
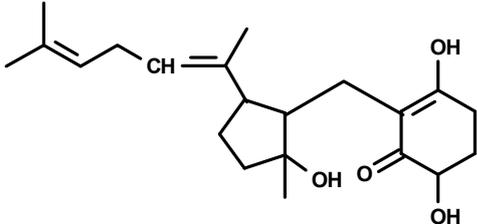
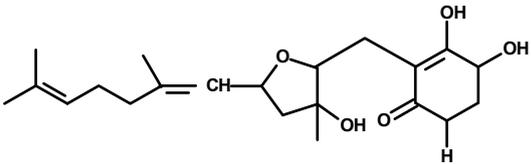
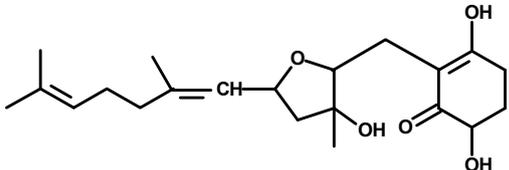
Analisando a TABELA 1.2 a qual apresenta algumas toxinas seletivas de *A. alternata* para seu hospedeiro (HSTs), uma merece especial destaque no presente trabalho, a HST conhecida como ACT-toxina, a qual é responsável pela patogenicidade em tangerinas e híbridos. O modo de ação dessa toxina ainda não está bem elucidado na literatura, mas evidências apontam que a ACT-toxina inicialmente atinge a membrana plasmática de células susceptíveis, sendo que uma pequena concentração da toxina ACT,  $2 \times 10^{-8}$  M ocasiona a necrose a partir da nervura seguindo para toda folha (STUART, *et al.*, 2009).

Outras toxinas seletivas (HSTs) causadoras de necrose em citros do tipo tangor ‘Murcot’ e em outros híbridos de tangerina foram isoladas do meio de cultivo do micro-organismo, as quais estão descritas na literatura, e seguem ilustradas na TABELA 1.3.

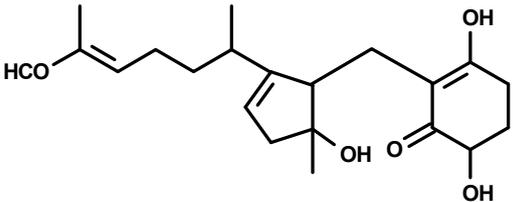
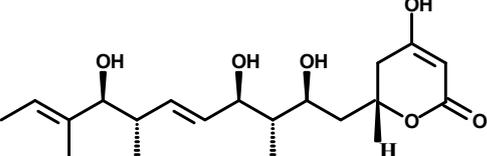
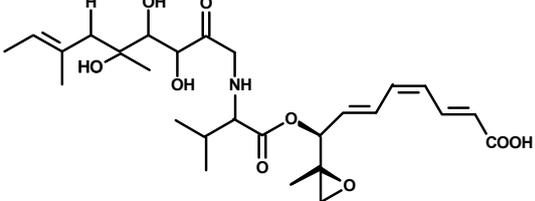
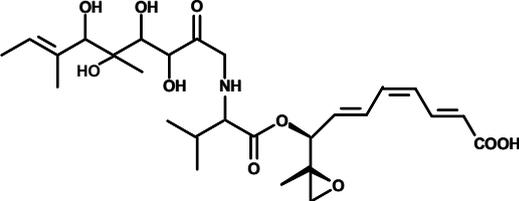
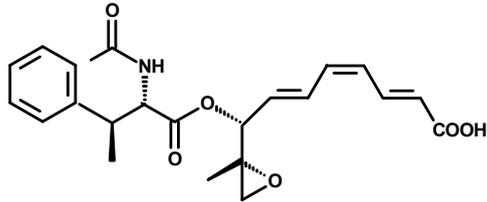
TABELA 1.3 – Toxinas de *A. alternata* encontradas em citros

Toxinas	Referências
 $C_{21}H_{32}O_4$	KONO <i>et al.</i> , 1986

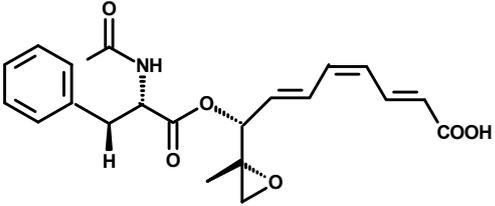
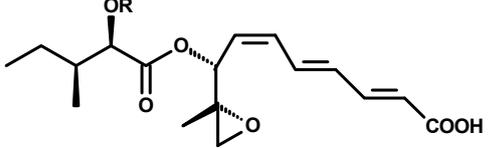
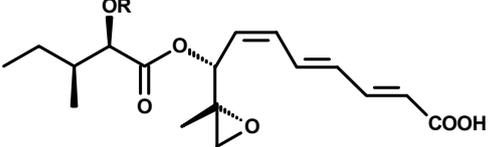
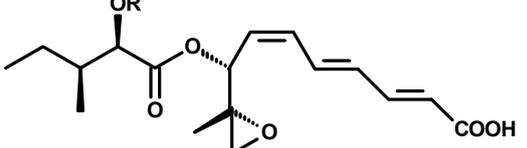
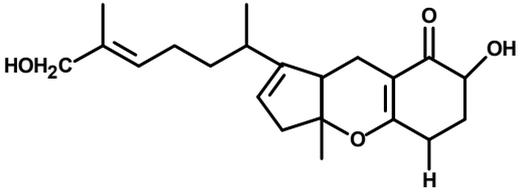
Continuação da TABELA 1.3

 <p style="text-align: center;"><math>C_{21}H_{32}O_4</math></p>	<p>KONO <i>et al.</i>, 1986</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{21}H_{32}O_4</math></p>	<p>KONO <i>et al.</i>, 1986</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{21}H_{32}O_4</math></p>	<p>KONO <i>et al.</i>, 1986</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{21}H_{32}O_5</math></p>	<p>KONO <i>et al.</i>, 1986</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{21}H_{32}O_5</math></p>	<p>KONO <i>et al.</i>, 1986</p>

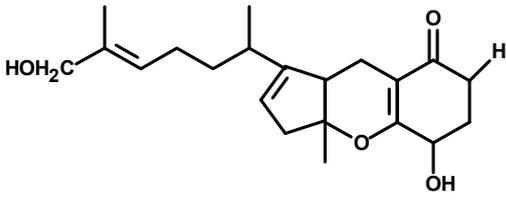
Continuação da TABELA 1.3

 <p style="text-align: center;"><math>C_{21}H_{30}O_5</math></p>	<p>KONO <i>et al.</i>, 1986</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{19}H_{30}O_6</math></p>	<p>MASUNAKA <i>et al.</i>, 2005</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{26}H_{39}NO_9</math></p>	<p>MASUNAKA <i>et al.</i>, 2005</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{23}H_{27}NO_6</math></p>	<p>MASUNAKA <i>et al.</i>, 2005</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{23}H_{27}NO_6</math></p>	<p>MASUNAKA <i>et al.</i>, 2000</p>

Continuação da TABELA 1.3

 <p style="text-align: center;"><math>C_{23}H_{25}NO_6</math></p>	<p>MASUNAKA <i>et al.</i>, 2000</p>
 <p style="text-align: center;"><math>R = H</math></p> <p style="text-align: center;"><math>C_{17}H_{24}O_6</math></p>	<p>MASUNAKA <i>et al.</i>, 2000</p>
 <p style="text-align: center;"><math>R = COCH(OH)C(CH_3)_2OH</math></p> <p style="text-align: center;"><math>C_{22}H_{33}O_9</math></p>	<p>MASUNAKA <i>et al.</i>, 2000</p>
 <p style="text-align: center;"><math>R = COCH(OH)CH(CH_3)_2</math></p> <p style="text-align: center;"><math>C_{22}H_{32}O_8</math></p>	<p>MASUNAKA <i>et al.</i>, 2000</p>
 <p style="text-align: center;"><math>C_{21}H_{30}O_4</math></p>	<p>LIEBERMANN <i>et al.</i>, 2000</p>

Continuação da TABELA 1.3

 <p style="text-align: center;"><math>C_{21}H_{30}O_4</math></p>	<p>LIEBERMANN <i>et al.</i>, 2000</p>
---	---------------------------------------

#### 1.4. Compostos Voláteis

Dentro das diversas classes de metabólitos secundários existentes, há um grande interesse pela pesquisa da química de metabólitos voláteis. Os óleos essenciais, produto do metabolismo secundário, são frações líquidas e voláteis que contêm substâncias responsáveis pelo aroma (GARLET, 2007).

São considerados óleos por serem, geralmente, líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente; por apresentarem volatilidade, recebem ainda o nome óleos voláteis; e são chamados de essências, devido ao aroma agradável, algumas vezes, e intenso da maioria de seus representantes. A denominação óleos etéreos é referente ao fato dos mesmos serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter. Outras características que podem ser identificadas nos óleos essenciais são: o sabor, o qual geralmente é acre (ácido) e picante; a cor, sendo que quando recentemente extraídos, os óleos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados. Quanto à sua estabilidade, normalmente os óleos essenciais são instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. A maioria dos óleos essenciais possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades estas usadas na sua identificação e controle da qualidade (CAMARGO, 2007).

Devido a essa versatilidade, os óleos essenciais vêm sendo utilizados com diversas aplicações comerciais, como por exemplo, fixadores de perfumes e conservantes na indústria de alimentos (HOLLEY e PATEL, 2005; SANTOS *et al.*, 2006). No meio científico, pesquisas apontam sua potencialidade como atrativo de insetos (MONTEIRO, 2008), como estomáquicos (WEYERSTAHL *et al.*, 1999), antioxidantes (MORAIS *et al.*, 2006), analgésicos (HEJAZIAN, 2006), antipiréticos e anti-inflamatórios (ABENA *et al.*, 2003), como agentes antibacterianos (COSTA *et al.*, 2008) e fungicidas (OXENHAM *et al.*, 2005), bem como a sua ação repelente, larvicida e propriedade inseticida contra mosquitos, podendo citar como exemplo o *Aedes aegypti* (COSTA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007; TELES, 2009).

Estes óleos essenciais são constituídos por uma mistura de, aproximadamente, 200 compostos, os quais são divididos em duas partes. A primeira parte, considerada a mais volátil, constitui cerca de 90 a 95 % do total do óleo essencial e é constituída, basicamente, por monoterpenos e sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, podendo apresentar diversas funções como aldeídos, derivados aromáticos, álcoois e ésteres. A segunda parte, considerada a menos volátil, é constituída por cerca de 5 a 10 % do óleo total e caracteriza-se quimicamente pela presença de compostos de massas moleculares maiores e termicamente mais estáveis, sendo composta por hidrocarbonetos de cadeia longa, ácidos graxos, esteróides, carotenóides, cumarinas e diterpenos. Na fração mais volátil, os terpenos são, em geral, compostos insaturados de fácil decomposição pela ação da luz, do calor e do oxigênio, produzindo compostos indesejáveis, que alteram o aroma original. A fração oxigenada é altamente odorífera e a principal responsável pelos aromas característicos do óleo (DE CASTRO, 1999).

A diversidade da composição do óleo essencial é proveniente de três rotas biossintéticas conhecidas: mevalonato, acetato e chiquimato. São provenientes

da rota do ácido mevalônico ou da condensação de unidades de acetato, por exemplo, os monoterpênicos: mircenol, linalol e geraniol e os sesquiterpênicos: farnesol e o nerolidol. Provenientes da rota do ácido chiquímico podem ser citados os fenilpropanóides: eugenol e o anetol. (CASSEL, 2010)

#### **1.4.1. Micro-organismos e compostos voláteis**

Compostos voláteis produzidos por micro-organismos é uma área a qual ainda não foi amplamente estudada. No entanto existem trabalhos que dedicam atenção ao estudo de produtos voláteis do metabolismo de micro-organismos. Esses compostos geralmente possuem baixa massa molecular e podem pertencer a diversas classes químicas tais como alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre.

O primeiro relato publicado sobre a capacidade de bactérias e fungos selecionados produzirem fragrância foi realizado por OMELIANSKI, em 1923. Em seu trabalho, o autor destacou as leveduras como um dos grupos mais importantes de micro-organismos que produz, em cultura, um forte aroma etéreo, de variada intensidade, que lembra o odor de frutas como morango, abacaxi, maçã, pêra e melão. Os gêneros *Mycoderma*, *Pichia*, *Willia* e *Torula* e outros isolados de uva, de grãos úmidos de cevada, de suco de abacaxi, de folhas de ruibarbo, de queijo e de kumis foram citados pelo autor como produtores de um agradável e complexo aroma de frutas. OMELIANSKI realizou uma série de experimentos com micro-organismos isolados do leite, do pão e de algumas frutas, onde variou a composição do meio de cultura e obteve, em diferentes substratos, o que chamou de aroma de morango, aroma de fruta impuro e aroma de queijo (OMELIANSKI, 1923).

A relação entre a fisiologia microbiana e a produção de metabólitos com odor, entretanto, só veio a ser identificada em estudos realizados nos anos 50. A

partir daí, um número significativo de trabalhos sobre compostos aromatizantes produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras começou a ser publicado. As pesquisas foram inicialmente direcionadas à otimização da biossíntese e à identificação de compostos de aromas específicos. Uma primeira lista de compostos voláteis em alimentos compreendia umas poucas centenas de constituintes. Com o advento de instrumentos de análise modernos, particularmente a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, o número de compostos identificados aumentou significativamente e uma compilação recente apontou mais de 10.000 compostos.

Tecnologias complementares contribuíram para a caracterização estrutural dos compostos aromatizantes, como os ésteres produzidos por *Pseudomonas fragi* (REDDY, 1969), o aroma de coco detectado em cultivos de *Trichoderma viride* (JANSSENS, *et al.* 1992), o suave aroma de maçã quando *K. marxianus* é cultivado em farelo de palma (MEDEIROS, *et al.* 2000), *Sporobolomyces odorus* é uma levedura que produz aroma de pêssigo (JANSSENS *et al.*, 1992). Outros micro-organismos produzem monoterpenos com qualidade sensorial de leve aroma frutal produzido por duas linhagens de *Kloeckera apiculata* e *Candida pulcherrima* (ZOHRE, 2002), e as notas frutais e florais produzidas por *Ceratocystis* (KEMPLER, 1983; JANSSENS *et al.*, 1992).

#### **1.4.2. Metodologia para a obtenção dos compostos voláteis**

A destilação a vapor é a técnica mais usada para extração de compostos voláteis de amostras odoríferas, de alimentos e de determinadas partes dos vegetais. Esta técnica pode ser dividida em duas categorias:

- a) **método direto (arraste vapor):** onde um fluxo de vapor é passado através do recipiente que contem o material a ser extraído, arrastando os compostos voláteis que após condensação são separados da água por decantação (NICULAU, 2011);

b) **método indireto (hidrodestilação):** onde a matriz a ser extraída é misturada ou suspensa com a água em um recipiente acoplado a um condensador. Depois permite-se o aquecimento até a temperatura de ebulição da água de forma que os compostos voláteis possam ser arrastados pelo vapor, o qual é condensado e recolhido. Posteriormente, a fase orgânica contendo os voláteis pode ser separada da fase aquosa com auxílio de um solvente orgânico ou o óleo pode ser recolhido diretamente dependendo da diferença de densidade e solubilidade em água dos compostos presentes no mesmo (NICULAU, 2011).

Para a obtenção de compostos voláteis de micro-organismos, existe na literatura relatos do uso da técnica de hidrodestilação, onde SANTOS FILHO, 2010, identificou vários compostos utilizando essa técnica.

## *OBJETIVOS*



## 2. Objetivos

O Brasil, embora seja o maior produtor mundial de citros movimentando cada vez mais a economia, ele também é um grande consumidor o uso de fungicidas, os quais têm sido cada vez mais necessários no controle de doenças, em especial a Mancha marrom de alternaria. Com isso torna-se necessário a descoberta de novos fungicidas, no entanto sem toxicidade ambiental, o qual pode ser buscado nos produtos naturais. Em vista disso os objetivos do trabalho foram:

### a) Objetivos Gerais

- Isolar o fungo *A. alternata* do citros suscetível tangor ‘Murcott’, a fim de garantir a sua patogenicidade;
- Realizar o estudo químico de extrato do fungo *A. alternata*;
- Isolar e identificar as toxinas e metabólitos;
- Desenvolver e implantar os ensaios de avaliação da atividade fungicida;

### b) Objetivos Específicos

- Desenvolvimento do fungo em larga escala;
- Realizar o estudo químico dos extratos obtidos;
- Obtenção de metabólitos secundários;
- Adaptar metodologia de ensaios de inibição do desenvolvimento de *A. alternata*;

- Avaliar o efeito de vários compostos isolados pelo grupo de PN da UFSCar na inibição do desenvolvimento de *A. alternata*;
- Avaliar o efeito dos compostos isolados do próprio fungo no estudo na inibição do desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*;
- Identificação das toxinas produzidas pelo *A. alternata* no co-cultivo com *G. citricarpa* via LC-MS e MALDI-TOF
- Estudo dos voláteis produzidos pelo micro-organismo através da técnica de hidrodestilação;
- Realizar imagens em microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de compreender o mecanismo de penetração e colonização do fungo *A. alternata* em folhas de tangor ‘Murcott’.

# *PARTE EXPERIMENTAL*



### **3. Parte Experimental**

Todo o trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Produtos Naturais na Universidade de São Carlos.

#### **3.1. Materiais e Equipamentos**

Nesse tópico serão abordados todos os materiais e equipamentos utilizados para a realização desse trabalho.

##### **3.1.1. Materiais Cromatográficos**

###### **a) Suporte para Cromatografia em Coluna (CC):**

- Sílica Gel (230-400 mesh)
- Sephadex LH-20
- C18

###### **b) Suporte para Cromatografia em Camada Delgada (CCD):**

- Folhas de alumínio (20x20 cm) de sílica gel 60 PF<sub>254</sub>

###### **c) Cromatografia em coluna**

- Foram utilizadas colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem fracionadas.

###### **d) Coluna Cromatográficas:**

- Agilent Eclipse C-18 (, 4,6 x 150 mm, com partícula de 5 µm)
- Agilent Eclipse C-18 (10,0 x 250 mm, com partícula de 10 µm)
- Coluna Preparativa Gemini C-18 (25,0 x 2,1 cm, partícula de 10 µm)

###### **e) Reveladores empregados**

- Câmara de UV (254 2 365 nm), cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spetroline modelo ENF-260C
- Vanilina em ácido sulfúrico

**f) Papel de Filtro**

- INLAB tipo 10, porosidade 3,0  $\mu\text{m}$

**3.1.2. Solventes**

**a) Solventes utilizados na obtenção de espectros de RMN:**

- Deuterados da Merck e Aldrich 98-99,9%

**b) Eluentes utilizados em cromatografia:**

- Solventes comerciais destilados no Departamento de Química da UFSCar
- Solventes grau HPLC JT Baker

**3.1.3. Reagentes Utilizados para o isolamento, identificação, cultivo e conservação do micro-organismo *A. alternata*:**

- Álcool 70%;
- Água destilada;
- Alça de platina;
- Alça de Drigalski;
- Bico de Bunsen;
- Lâminas de bisturi;
- Pinça;
- Gaze;
- Funil analítico;
- Câmara de Neubauer;
- Placas de Petri;
- Erlemneyers;
- Meio de Cultura Comercial Batata-Dextrose-Ágar – Acumedia;
- Nitrato de Sódio;
- Fostato de Potássio;
- Sulfato de Magnésia Heptahidratado;
- Cloreto de Potássio;

- Sulfato de Ferro Heptahidratado;
- Sulfato de Zinco;
- Glicose;
- Extrato de Levedura;
- Arroz parbolizado Uncle Ben's;
- dNTP MIX;
- Taq Buffer;
- MgCl<sub>2</sub>;
- Taq DNA polimerase;
- Brometo de etídio.

#### **3.1.4. Equipamentos:**

##### **a) Rotaevaporadores:**

- BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

##### **b) Espectrometro de Ressonância Magnética Nuclear:**

- Bruker ARX 200 MHz para o <sup>1</sup>H (4,7 Tesla).
- Bruker DRX 400 MHz para o <sup>1</sup>H (9,4 Tesla).

Ambos os equipamentos pertencem ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

##### **c) Cromatógrafo Gasoso Acoplado ao Espectrômetro de Massas:**

- Shimadzu QP 5000 GC-17A, coluna DB-130m x 0,25mm e HP-5, Ionização por Impacto Eletrônico.
- SHIMADZU QP2010 PLUS

**d) Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE)**

- Shimadzu LC-6AV, condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo e “loop” de 200 µL.
- Shimadzu modelo SCL-10A VP com válvula para reciclo, com injetor Rheodyne modelo 7725i e bomba Shimadzu modelo LC-10AD. Detector UV-Vis.
- ÄKTA, equipado com: válvula de injeção inv-907, bombas P-900 (P-901/903) e detector de UV-900.
- Agilent Technologies modelo 1200 equipado com bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1322A e detector ultravioleta G1314B. Acoplado a uma interface 1369A, software EZChrom Ellite.

**e) Espectrômetro de Massas:**

- Equipamento Quattro LC- Micromass, triple quadrupole.

**f) Balança Analítica**

- Sartorius modelo BP 210S

**g) Câmara de Fluxo Laminar**

- Veco VL FS-12M

**h) Autoclaves Verticais**

- Phoenix AV 30
- Phoenix AV 50
- Phoenix AV 75

**i) Estufa Incubadora (B.O.D.)**

- Fanem – 347 CD

**j) Banho de Ultra-som:**

- Branson 1510, Danburcy, CT

**k) Homegeneizador:**

- Turrax TE 102, Tecnal

**l) Microscópio**

- Binocular modelo L.2000A

**m) Termociclador**

- Mastercycler Gradient, Eppendorf, 96 tubos PCR 0,2mL

**n) Foto-documentador**

- Transluminador UVtrans

**o) Cuba Horizontal de Eletroforese**

- Cuba Digel media

**p) Fonte Elétrica**

- GSR Power Suply

### **3.2. Procedimento Experimental**

#### **3.2.1. Obtenção e re-isolamento do micro-organismo**

Uma cepa do fungo *A. alternata* foi cedida pelo Dr. Marcos Machado e pelo doutorando Rodrigo Makowiecky Stuart, do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Instituto Agrônômico de Campinas – IAC, Estação de Cordeirópolis-SP. O isolado fornecido foi mantido em conservação em placas de Petri no laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, São Carlos, SP.

No entanto, com a finalidade de garantir a patogenicidade do isolado e a produção de metabólitos secundários, o fungo foi colocado em contato direto com a planta hospedeira, o tangor Murcott, e re-isolado desta para o estudo.

O fungo *A. alternata* é descrito como tendo um crescimento lento e baixa esporulação em meios de cultura convencionais, por exemplo a linhagem ALT A de *A. alternata*, isolada por SILVA (1996) como degradadora do fungicida carbendazim também apresenta lento crescimento e esporulação reduzida, dificultando assim a produção do inóculo em grande escala. Com isto, no

presente trabalho o micro-organismo após crescer em meio de cultura BDA, foi transferido para placas de Petri contendo um meio de cultura pobre em nutrientes a fim de promover uma maior esporulação, o qual segue descrito na TABELA 3.1.

TABELA 3.1- Requisitos Nutricionais para induzir a esporulação

Nutrientes	Quantidade (gramas)
Carbonato de Cálcio	30
Sacarose	20
Ágar	20
Água Destilada	1L

O meio de cultura foi preparado da seguinte forma: em um erlenmeyer foi adicionado o carbonato de cálcio, Ágar e 1L de água destilada onde essa mistura foi mantida sob agitação até a completa dissolução. Em seguida adicionou-se 20,0 gramas de Sacarose submetendo novamente a mistura à agitação. Subsequentemente, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm por 20 minutos e a seguir foi adicionado em placas de Petri também esterilizadas em autoclave em ambiente estéril, ou seja, em uma capela de fluxo laminar.

*A. alternata* após crescer em toda a placa contendo BDA comercial (aproximadamente sete dias), esta foi toda cortada em cubos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> utilizando um bisturi sendo que os mesmos foram transferidos para uma segunda placa contendo o meio pobre em requisitos nutricionais com o micélio voltado para cima. Após a transferência dos cubos foi adicionado 2 mL de água previamente autoclavada sobre os cubos. As placas

foram mantidas no escuro à 27°C por 48 horas e posteriormente mantida em BOD por 05 dias sob fotoperíodo de 12 horas e 25°C. Passado esse período totalizado em 07 dias, foi feita uma suspensão de esporos.

A suspensão de esporos foi feita adicionando 0,5 mL de água destilada estéril sobre a superfície do fungo e com o auxílio de uma Alça de Drigalski, previamente esterilizada com álcool 70% e flambada, todos os esporos da placa foram removidos. Essa solução foi filtrada com a assistência de um funil e gaze com a finalidade de reter fragmentos de micélio. A suspensão de esporos foi quantificada utilizando uma câmara de Neubauer a uma concentração de  $1 \times 10^5$  esporos/mL. Essa suspensão foi borrifada diretamente nas folhas de tangor 'Murcott'. A fim de garantir a manifestação da doença Mancha Marrom de *Alternaria*, juntamente com a suspensão de esporos foi colocado sobre cada folha jovem da planta fragmentos de  $1 \text{ cm}^2$  de micélio. Portanto a inoculação foi feita via suspensão de esporos e via micelial. A FIGURA 3.1 ilustra a planta após a inoculação do fungo.



FIGURA 3.1 – Tangor 'Murcot' após a inoculação de *A. alternata*.

Após um período de 24 horas as folhas mais jovens de tangor ‘Murcott’ já apresentavam sintomas de Mancha Marrom de *Alternaria*, como pode ser observado na FIGURA 3.2.



FIGURA 3.2 – Folhas de tangor ‘Murcot’ após 24 horas de inoculação do micro-organismo.

As folhas que apresentaram as lesões típicas de Mancha Marrom de *Alternaria* foram retiradas da planta de tangor ‘Murcot’ sendo previamente lavada em água corrente. Em seguida, já em capela de fluxo laminar esterilizada por 30 minutos sob radiação ultra-violeta, foi feita a seqüência de esterilização superficial das folhas com as lesões com a finalidade de eliminar micro-organismos epifíticos e agentes contaminantes. As folhas foram mergulhadas seqüencialmente em etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 5% por 2 minutos, etanol 70% por um minuto, água destilada previamente autoclavada por dois minutos, a fim de remover resíduos dos agentes esterilizantes, e novamente água destilada estéril a fim de remover todos os possíveis vestígios dos agentes esterilizantes. Após esse procedimento as folhas foram colocadas sobre papel filtro com a finalidade de remover todo o excesso de líquidos existentes no processo de esterilização.

Com a utilização de um bisturi previamente autoclavado, retirou-se cuidadosamente uma área de transição entre a lesão e o tecido sadio da folha o qual foi colocado em placas de Petri contendo meio de BDA. As placas contendo os fragmentos das folhas foram colocadas incubadas em BOD a 25°C

sendo monitoradas em relação ao seu crescimento diariamente. Todo esse procedimento está descrito na FIGURA 3.3.

Com a finalidade de possuir um grande número de placas para o experimento de crescimento do micro-organismo em larga escala, foram realizados repiques sucessivos.

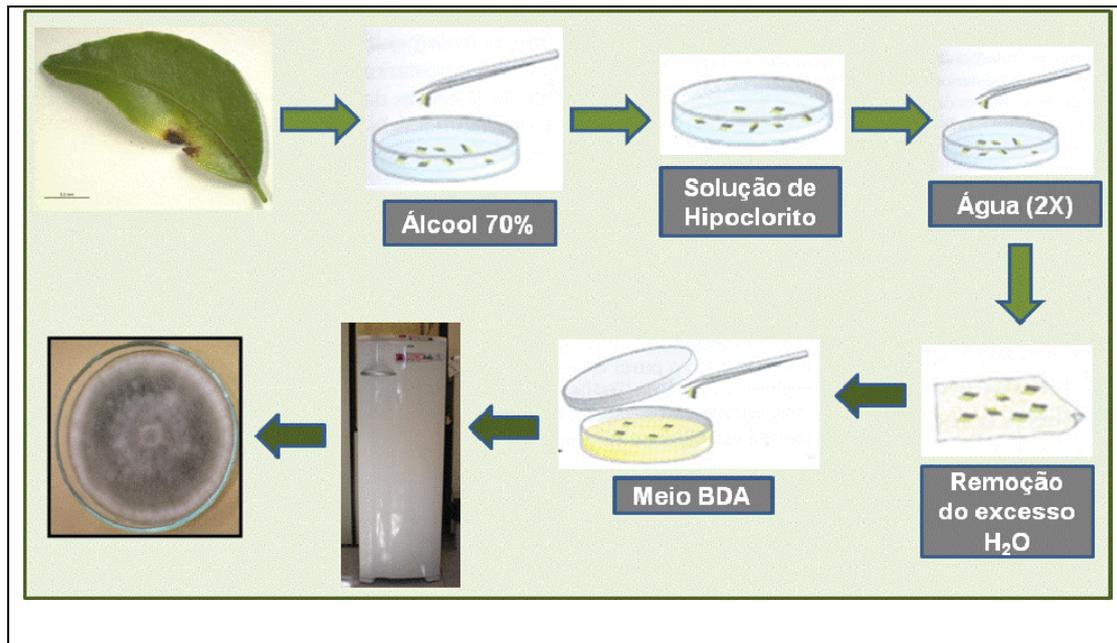


FIGURA 3.3 - Assepsia realizada para o isolamento do micro-organismo.

### 3.2.2. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Tendo em vista que durante todo o trabalho o fungo *A. alternata* foi inoculado e re-isolado várias vezes do citros suscetível Tangor ‘Murcott’, foi necessário em alguns momentos fazer a reação da cadeia da polimerase (PCR) a fim de garantir o gênero e a espécie.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida. Com a PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser

amplificadas milhões de vezes em poucas horas. O método PCR é usado habitualmente nos laboratórios de investigação médica e biológica para uma variedade de tarefas, como a detecção de doenças hereditárias, que é a identificação de "impressões digitais" genéticas, a construção de árvores filogenéticas (árvores de relação entre espécies), a clonagem de genes, testes de paternidade, exames para detecção de agentes patogênicos e etc.

A PCR está desenhada de acordo com o princípio natural de replicação de DNA. Este processo decorre em três passos, que em conjunto se designam como um ciclo e que se repete em um número específico de vezes:

- a- Ciclo I: Desnaturação
- b- Ciclo II: Hibridização ou Anelamento
- c- Ciclo III: Extensão

Para ocorrer à reação é preciso usar um termociclador, um aparelho que controla e alterna as temperaturas durante os períodos programados de tempo para o número apropriado de ciclos, que geralmente vão de 30 a 40 ciclos.

a- Ciclo I: Desnaturação: A temperatura elevada (geralmente  $>90^{\circ}\text{C}$ ) separa a dupla fita de DNA em dois filamentos, sendo este processo conhecido como “desnaturação”. Os dois filamentos ou cadeias de DNA são mantidos juntos por ligações de hidrogênio que, por serem relativamente fracas, quebram-se a altas temperaturas, ao passo que as ligações entre as moléculas de fosfato e desoxirribose, por serem ligações covalentes mais fortes, permanecem intactas.

b- Ciclo II: Hibridização ou Anelamento: O objetivo da PCR não é replicar a cadeia inteira de DNA, mas apenas replicar a seqüência de interesse que é única no organismo. Os iniciadores (ou primers) marcam as extremidades da seqüência alvo: estes iniciadores são curtas seqüências sintéticas de nucleotídeos, entre 20 e 30 bases. Numa PCR são incluídos dois primers, um para cada cadeia simples de DNA que foi produzida durante o passo de

desnaturação. O início da seqüência de DNA alvo é marcada pelos primers que se ligam (hibridizam) com a seqüência complementar. Temperatura de anelamento ou hibridização: normalmente encontra-se entre 40 °C e 65 °C, dependendo do comprimento dos primers e da sua seqüência. A escolha criteriosa desta temperatura permite que estas seqüências iniciadoras se liguem a seqüência alvo com elevada especificidade.

c- Ciclo III: Extensão: Após a ligação dos primers ou iniciadores às seqüências complementares de DNA, eleva-se a temperatura a aproximadamente 72 °C e a enzima Taq polimerase faz a replicação da cadeia de DNA. A Taq polimerase é uma polimerase de DNA termo-estável recombinante do organismo *Thermus aquaticus*, que, ao contrário de outras polimerases, se mantém ativa a temperaturas elevadas. O processo de síntese é iniciado numa zona com cadeia dupla (onde estão ligados os primers), incorporando os nucleotídeos complementares à seqüência alvo e utilizando os dNTPs livres em solução. A extensão inicia-se sempre no extremo 3' do primer, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples.

No final do primeiro ciclo da PCR, encontramos duas novas cadeias de DNA idênticas a original. A DNA polimerase não reconhece o final da seqüência, assim, as novas cadeias sintetizadas têm o seu início definido pelo primer, mas a sua extremidade 3' não está definida, podendo haver fragmentos de diferentes tamanhos. No entanto, no ciclo seguinte, esta cadeia vai servir de molde à síntese de uma nova cadeia, limitando o primer a outra extremidade da cadeia. A cadeia de DNA sintetizada a partir desse molde terá o compromisso definido, com os limites definidos pelos primers. Após alguns ciclos as cadeias de DNA que correspondem ao tamanho exato da seqüência alvo estão presentes em um número muito maior do que as seqüências de comprimento variável. A seqüência flanqueada pelos primers é a parte do DNA que se amplifica. Após o

término da reação é feita uma eletroforese em gel de agarose 1-3% corado com brometo de etídeo para a visualização do produto amplificado.

Para isso ocorrer é necessário utilizar marcadores moleculares, os quais podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Na identificação de gênero e espécie do fungo *A. alternata* foram utilizados primers sendo que as seqüências estão descritas nas TABELAS 3.2 e 3.3.

TABELA 3.2- Primes utilizados na PCR para a identificação do gênero

Forward Primer AaltrF1	5'-GGCGGGCTGGAACCTC-3'
Reverse Primer AltrR1-1	5' GCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTTCGTA-3'

TABELA 3.3- Primes utilizados na PCR para a identificação da espécie

Forward Primer LinF	5'-TATCGCCTGGCCACCTACGC-3'
Reverse Primer LinR	5'-TGGCCACGACAACCCACATA-3'

A amplificação do DNA por PCR para a confirmação da identidade do isolado de *A. alternata* foi realizada em reações de 25µL contendo Taq Buffer [tampão de amplificação (1X)], 200µM de dNTP MIX (misturas de nucleotídeos), 0,02mM de MgCl<sub>2</sub>, 50µM dos iniciadores citados nas TABELAS 3.2 e 3.3, 1,25u *Taq* DNA polimerase (enzima) e 2µL de DNA (aproximadamente 200-250 ng). A amplificação por PCR foi realizada em termociclador inicializada com desnaturação a 95°C por cinco minutos seguidos

de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. A extensão final foi realizada a 72 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL de gel) à 80V/cm. O peso molecular foi comparado ao padrão 1 Kb, e o gel foi fotografado após a corrida com foto-documentador.

A identificação do micro-organismo foi realizada com o auxílio do mestrando do laboratório do Departamento de Química da UFSCar Evandro Luis Prieto, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza.

### **3.2.3. Cultivo do micro-organismo em meios de cultura**

#### **3.2.3.1. Cultivo de *Alternaria alternata* em meio sólido**

O fungo foi cultivado também em meio sólido utilizando arroz parabolizado Uncle Ben's. Foi pesado 110g de arroz e adicionou-se 77 mL de água destilada (70% de umidade) em erlenmeyers de 1L. Os mesmos foram autoclavados por 45 minutos, à 120°C e 1 atm de pressão. Ao final da esterilização, os frascos foram agitados com a finalidade de desprender os grãos de arroz. Após 24 horas, foi realizada uma nova esterilização na autoclave nas mesmas condições descritas acima, também por 45 minutos. Novamente os erlenmeyers foram agitados e transferidos à capela de fluxo laminar, previamente esterilizada. Ao atingir a temperatura ambiente, transferiu-se para os erlenmeyers cinco fragmentos com 0,5 cm de diâmetro do fungo o qual estava em placa de Petri em meio de Carbonato de Cálcio. Os erlenmeyers foram mantidos em modo estático e condições normais de pressão e temperatura

com monitoramento diário, sendo que nos 5 primeiros dias os frascos foram agitados manualmente para homogeneizar o meio junto ao micélio em crescimento. Em paralelo ao experimento três erlenmeyers foram mantidos apenas com o meio de cultura para o controle microbiológico. No total foram cultivados 8 kg de arroz para o estudo em escala ampliada. Ao final de 26 dias, o desenvolvimento do fungo foi interrompido e o fungo foi extraído do meio de cultura. A FIGURA 3.4 ilustra o crescimento do micro-organismo no meio de arroz.

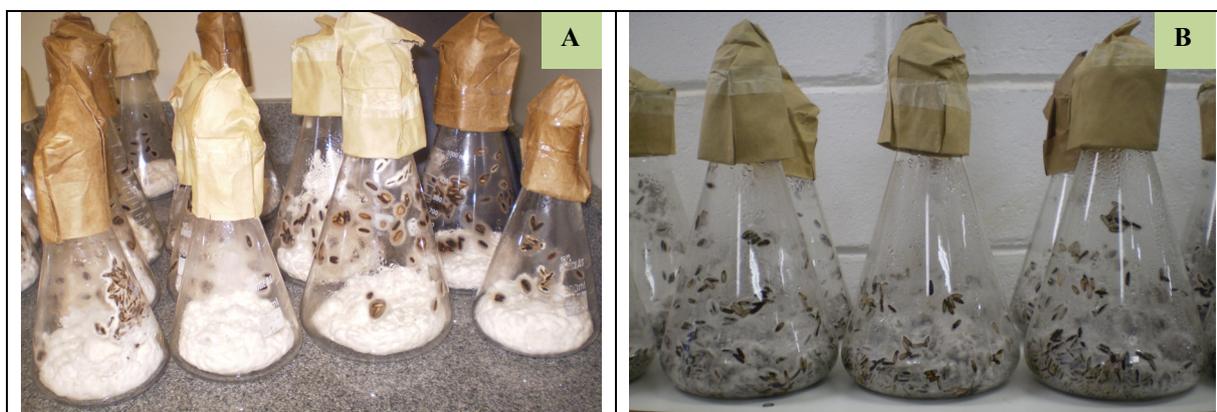


FIGURA 3.4 - Meio de cultura arroz com *Alternaria alternata*: A) Fungo *A. alternata* com 20 dias de cultivo no meio de arroz; B) Fungo *A. alternata* com 26 dias de cultivo no meio de arroz.

### 3.2.4. Extração de metabólitos

#### 3.2.4.1. Extração dos metabólitos a partir do meio de cultura sólido

Finalizado o período de incubação, em capela de fluxo laminar, foram adicionados 450 mL de EtOH (quantidade necessária para cobrir toda a massa micelial) aos frascos contendo o meio de cultura. Com o auxílio de Ultra Turrax, triturou-se completamente todo o conteúdo dos erlenmeyers e após 24 horas de extração, filtrou-se a pressão reduzida. O filtrado etanólico foi reservado e

adicionando-se novamente EtOH à massa micelial, um volume de 350mL. Depois de 24 horas, filtrou-se o conteúdo, reunindo o filtrado àquele reservado anteriormente. Ao micélio, adicionou-se 200 mL de água destilada, realizando-se a extração também em 24 horas e em seguida a filtração. Ambos os filtrados foram rotaevaporados, gerando o extrato etanólico e o aquoso. O procedimento de cultivo e extração em arroz é ilustrado no esquema representado pela FIGURA 3.5:

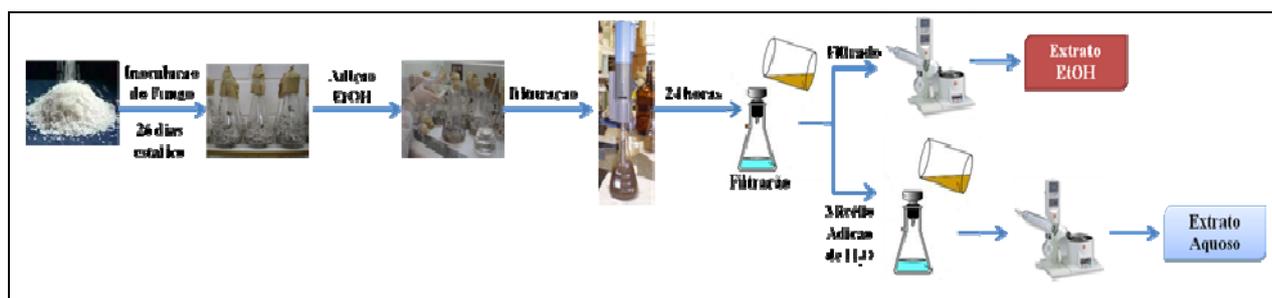


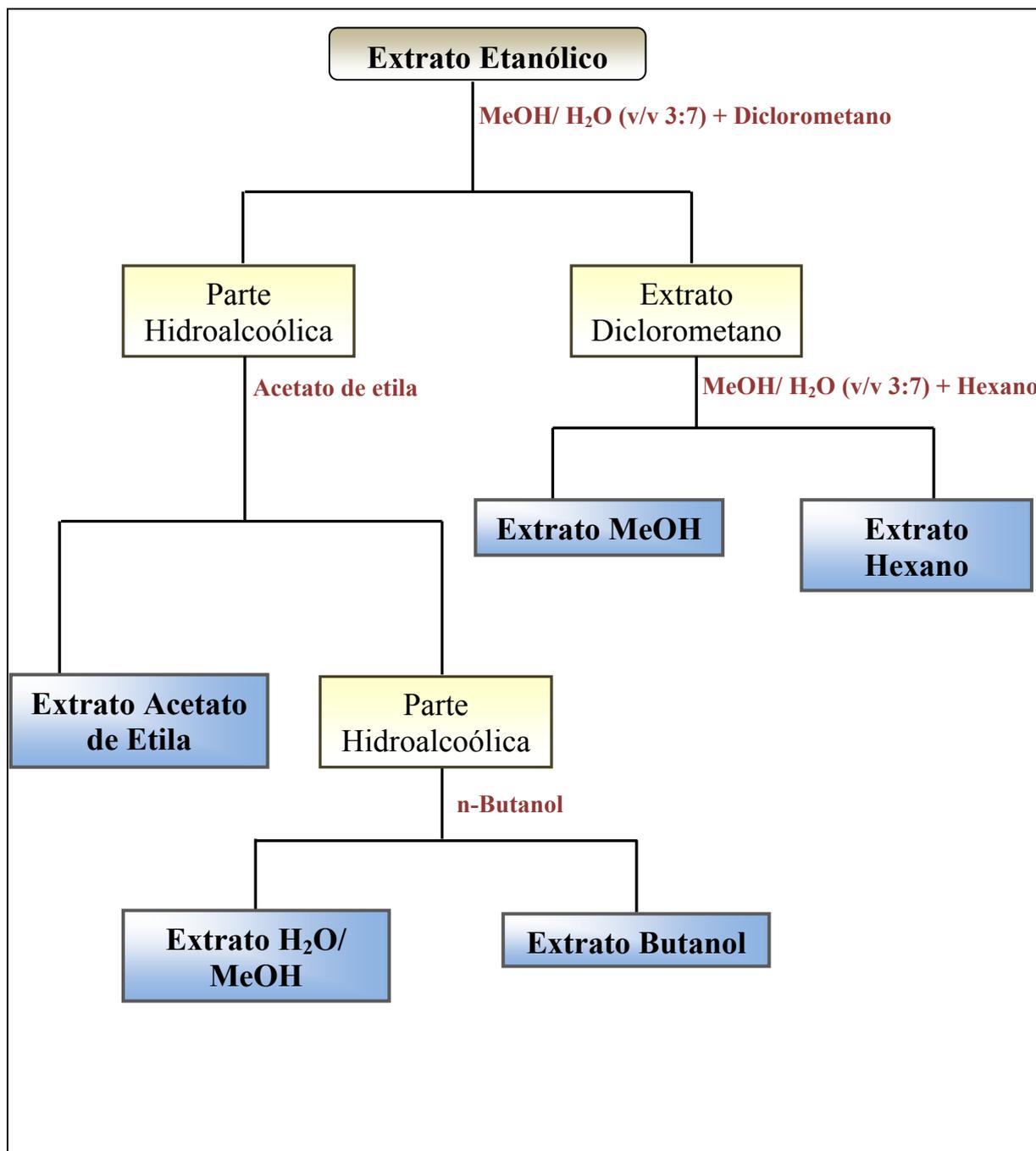
FIGURA 3.5 - Procedimento de cultivo e extração de *Alternaria alternata*.

Obteve-se com essa extração 80 g do extrato bruto etanólico e 40 g do extrato aquoso.

### 3.2.5. Fracionamento dos Extratos Brutos e Isolamento das Substâncias de *A. alternata*

#### 3.2.5.1. Fracionamento do extrato Etanólico do meio sólido

O extrato etanólico do meio sólido (26 dias de crescimento) foi submetido à partição líquido-líquido, conforme o procedimento descrito no FLUXOGRAMA 3.1.



FLUXOGRAMA 3.1 - Obtenção dos extratos através de partição líquido-líquido.

Analisando o FLUXOGRAMA 3.1, pode-se observar a obtenção de 5 subextratos a partir do extrato etanólico. A TABELA 3.4 descreve a massa obtida de cada subextrato.

TABELA 3.4- Subextratos e suas respectivas massas

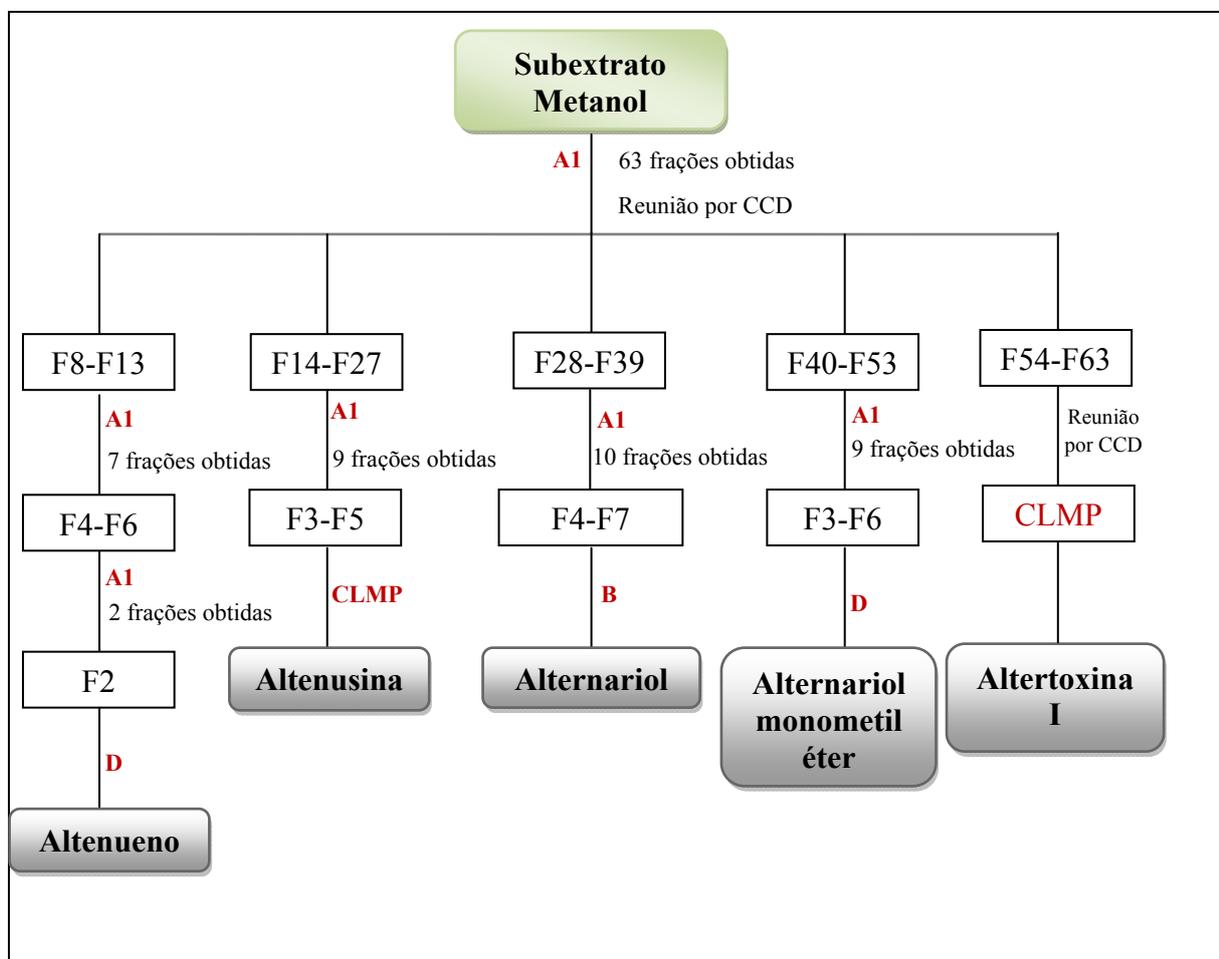
Subextratos	Massa (gramas)
Metanol (ML)	22,4
Hexano (HX)	17,9
Acetato de Etila (AE)	9,87
Butanol (BN)	8,46
H <sub>2</sub> O/ Metanol (HM)	12,73

Para cada subextrato foi realizado experimentos de RMN de <sup>1</sup>H para escolher os extratos para o trabalho. Com isso, foram escolhidos para o desenvolvimento do trabalho os subextratos metanol, hexano e acetato de etila sendo que os isolamentos serão descritos nos FLUXOGRAMAS 3.2, 3.3 e 3.4. Foi possível isolar os seguintes compostos: alternariol monometil éter (**01**), alternariol (**02**), altertoxina I (**03**), altenueno (**04**), altenusina (**05**), uridina (**06**), uracila (**07**), 5'inosil (**08**), ergosterol (**09**), peróxido de ergosterol (**10**), ácido palmítico (**11a**), ácido octadecadienóico (**11b**), ácido dodecenóico (**11c**).

### 3.2.5.2. Fracionamento do extrato metanol

O extrato metanol obtido a partir do meio sólido de *A. alternata* foi inicialmente fracionado via cromatografia por exclusão, utilizando como fase estacionária Sephadex LH 20, e como fase móvel o solvente destilado metanol. As frações obtidas a partir deste extrato foram submetidas à análise por CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas. A partir da união das frações, foram realizados experimentos de RMN <sup>1</sup>H, sendo que as frações que poderiam caracterizar substâncias de interesse foram novamente fracionadas por outras técnicas como segue descrito no FLUXOGRAMA 3.2. Esse extrato

proporcionou o isolamento das substâncias alternariol monometil éter (substância **01**), alternariol (substância **02**), altertoxina I (substância **03**), altenueno (substância **04**) e altenusina (substância **05**).



FLUXOGRAMA 3.2- Fracionamento do subestrato metanol obtenção de 5 substâncias.

**A1:** Cromatografia por Exclusão Sephadex LH20, eluição isocrática MeOH

**B:** Cromatografia por Adsorção

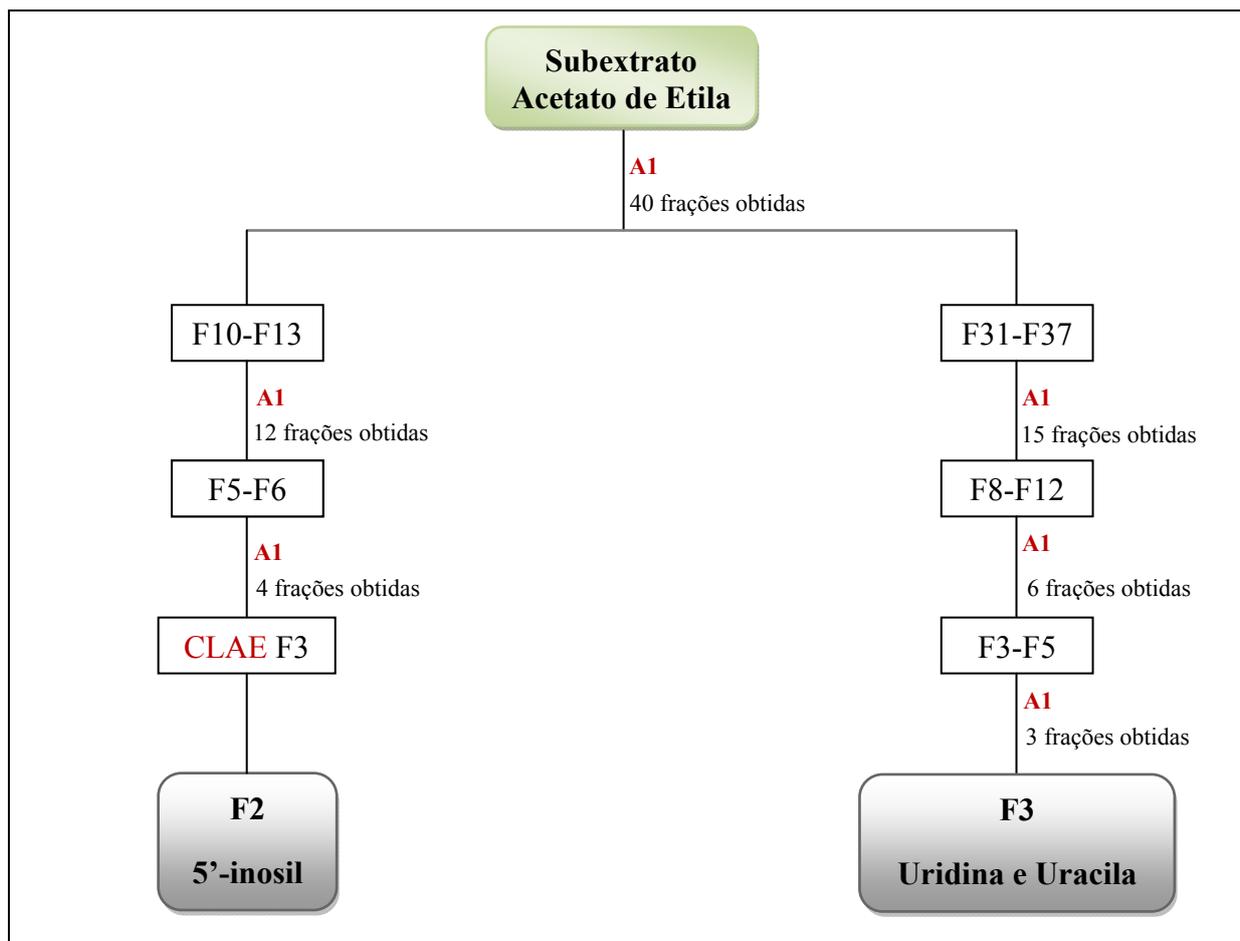
**CLMP (Ackta):** Coluna Preparativa Gemini C-18 (25,0 x 2,1 cm, partícula de 10 µm), Loop de 500 µL; Eluição com H<sub>2</sub>O/ACN (Gradiente de 5-100% de B); Detector UV – 217, 234 e 365 nm; Vazão de 20 mL.min<sup>-1</sup>, coletor automático 7mL por fração.

**D:** CLAE (10A) – Coluna Semi Preparativa C-18 (25,0 x 10,0 cm, partícula de 5 µm), Loop de 200 µL; Eluição com H<sub>2</sub>O:MeOH (8:2); Detector 217 e 234 nm; Vazão de 3,8 mL.min<sup>-1</sup>.

Todas as frações antes de serem refractionadas foram agrupadas após análise por CCD.

### **3.2.5.3. Fracionamento do Subextrato acetato de etila**

O extrato acetato de etila foi fracionado via cromatografia por exclusão, utilizando como fase estacionária Sephadex LH 20, utilizando como fase móvel o solvente destilado metanol. As frações obtidas a partir deste extrato foram submetidas à análise por CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas. Esse extrato proporcionou o isolamento das substâncias 5'-inosil, uridina e uracila como segue descrito no FLUXOGRAMA 3.3.



FLUXOGRAMA 3.3- Fracionamento do subextrato acetato de etila obtenção de 3 substâncias.

**A1:** Cromatografia por Exclusão Sephadex LH20, eluição isocrática MeOH

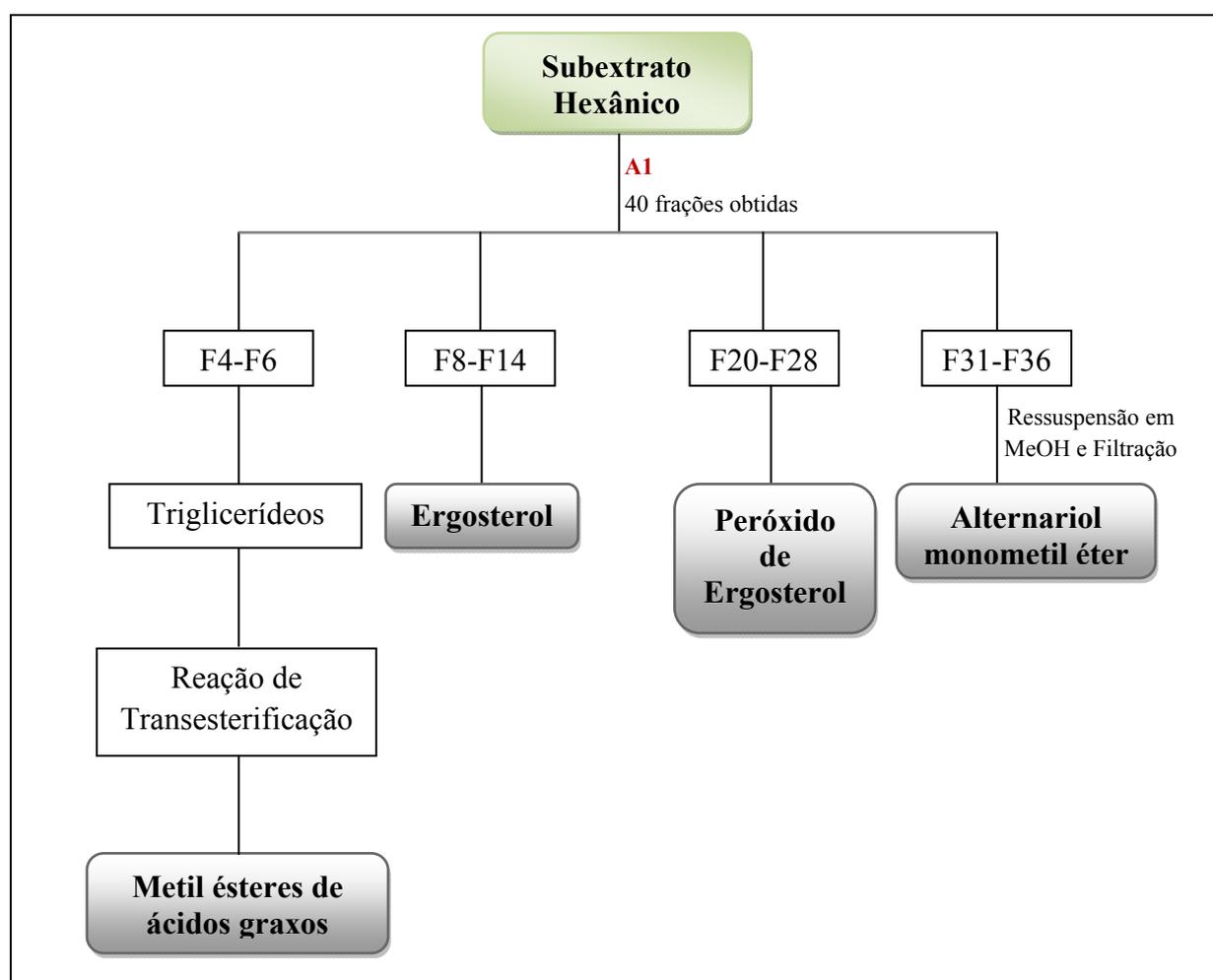
**CLAE:** 6A – Coluna Semi Preparativa C-18 (25,0 x 10,0 cm, partícula de 5 µm), Loop de 200 µL; Eluição com H<sub>2</sub>O:MeOH (8:2); Detector 217 nm; Vazão de 3,8 mL.min<sup>-1</sup>.

#### 3.2.5.4. Fracionamento do Subextrato hexano

O subextrato hexano foi fracionado via cromatografia por adsorção utilizando como fase estacionária sílica gel (230-400 mesh). Para o fracionamento foi utilizado solventes com ordem crescente de polaridade iniciando-se pelo solvente hexano e aumentando a polaridade para o dicloro

metano, acetato de etila e por último metanol. As frações obtidas foram submetidas à análise por CCD e agrupadas de acordo com suas similaridades químicas. Esse extrato proporcionou o isolamento das substâncias ergosterol e peróxido de ergosterol.

Vale ressaltar que os solventes utilizados nesse procedimento foram destilados no Departamento de Química da UFSCar.



FLUXOGRAMA 3.4- Fracionamento do subextrato hexânico obtenção de 4 substâncias.

**A1:** Cromatografia por adsorção Sílica gel (230-400mesh). Solventes utilizados: Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila e Metanol.

### 3.2.6. Reação de Transesterificação para a Substância 10

Em balão de fundo redondo, contendo 6,0 mg de ácido *p*-tolueno sulfônico, adicionou-se 20,7 mg de triglicerídeos denominado **11**, solubilizado em 1,5 mL de metanol. A mistura reacional foi aquecida à temperatura de 50 °C e agitada com refluxo durante 12 horas. Em seguida, o material obtido foi submetido à partição líquido-líquido com solução saturada de bicarbonato de sódio para a retirada do ácido remanescente e evaporado em rotaevaporador. O produto obtido foi analisado via CG-EM empregando as seguintes condições: rampa: 150 °C (1 min.), 06 °C/min., 28 °C (15 min.); temperatura do injetor: 225 °C; temperatura do detector: 250 °C; intervalo de massas: 45 a 500 u.m.a; ionização por impacto eletrônico a 70 eV.

### 3.2.7. Metodologia para o estudo de co-cultivo via LC-MS

O fungo *A. alternata* é o responsável pela doença em citros mancha marrom de alternaria, e o fungo *Guignardia citricarpa* é outro micro-organismo também responsável por uma doença em citros denominada mancha preta dos citros.

Procurando compreender o metabolismo do fungo *A. alternata* quando está em contato com outro micro-organismo foi realizado o estudo de co-cultivo.

Para isso, o fungo *A. alternata* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura propicio à esporulação (TABELA 3.1) e o fungo *G. citricarpa* foi cultivado em meio de cultura contendo BDA.

Após 20 dias de crescimento aguardando a esporulação de ambos os micro-organismos em suas respectivas placas, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA o qual foi autoclavado a 121°C, 1 atm de pressão

por 20 minutos e levado a capela de fluxo laminar previamente esterilizada e deixado em repouso até atingir a temperatura de 50 °C para ser vertido nas placas de Petri esterilizadas.

Em seguida, após o meio ter sido vertido e solidificado, um disco de micélio de 5 cm de  $\phi$  foi depositado nas laterais das placas de Petri. Como não havia relato na literatura sobre co-cultivo envolvendo esses fungos, dois experimentos em paralelo foram realizados. No primeiro experimento visando que o crescimento do fungo *G. citricarpa* é mais lento em relação ao *A. alternata*, o fungo *G. citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros, foi inoculado primeiro na placa de Petri, sendo que após cinco dias de crescimento do fungo, o *A. alternata* foi inoculado na outra extremidade da placa de Petri. O segundo experimento foi inoculando ambos os fungos no mesmo dia, cada um em uma extremidade da placa. Foi feito também, para ambos os experimentos, os controles de ambos os micro-organismos, onde estes eram inoculados no centro da placa de Petri.

Ambos os experimentos foram feito em quadruplicatas para o co-cultivo e duplicatas para o controle de ambos os fungos.

Totalizando treze dias de crescimento em ambos os experimentos (tempo necessário para que os micro-organismos se encontrem no centro da placa), o experimento foi finalizado.

Em capela de fluxo laminar previamente esterilizada, pedaços do meio de cultura contendo os micro-organismos foram colocados em frascos e adicionados solventes grau HPLC (na proporção indicada na TABELA 3.5) para a obtenção dos extratos.

TABELA 3.5 – Proporção de Solventes utilizados para a extração dos metabólitos no co-cultivo

Solvente	Proporção
Metanol	50%
Acetato	17%
Dicloro Metano	33%

Em placas contendo ambos os fungos, adquiriram-se fragmentos do centro da placa, onde havia a intersecção deles, como pode ser observado na FIGURA 3.6.

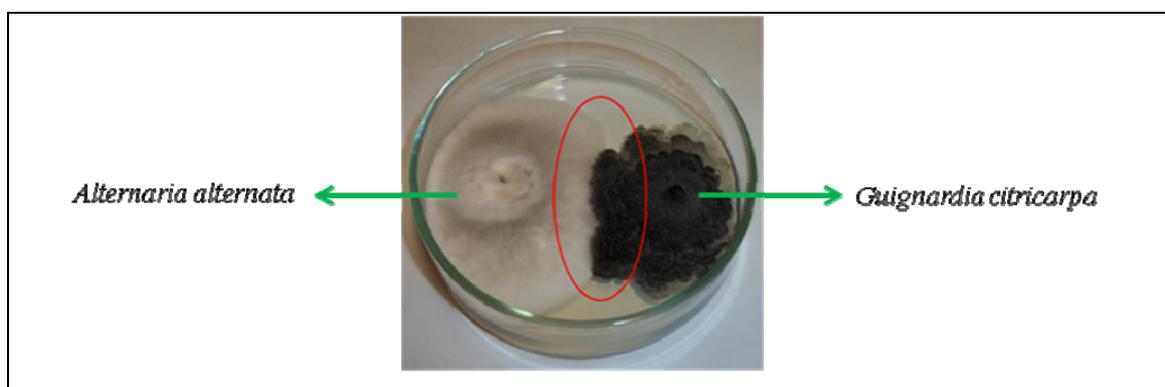


FIGURA 3.6- Coleta de Fragmentos dos micro-organismos na região de intersecção.

Os fragmentos dos fungos foram colocados em frascos, identificados e levados ao ultra-som por 15 minutos para auxiliar na extração dos possíveis metabólitos. Em seguida, utilizando pipetas de Pasteur e algodão, foi feita uma filtração e esse filtrado deixado para secar em uma capela. Após 24 horas com o filtrado totalmente seco, foi feita uma ressuspensão utilizando 1,5 mL de metanol grau HPLC e novamente foi realizada uma filtração com a assistência de uma seringa acoplada a um filtro 0,45 $\mu$ m a fim de reter todo e qualquer possível fragmento do meio de cultura. Esse volume foi transferido para um vial e levado a análise no LC-MS utilizando uma coluna C-18 com um fluxo de 0,3

mL/minuto. As condições de análises das amostras estão descritas na TABELA 3.6 e 3.7.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para a obtenção do extrato do controle dos dois micro-organismos, os quais foram cultivados separadamente em placas de Petri em meio de cultura BDA.

TABELA 3.6- Condições do espectrômetro de massas para as análises, ESI (+)

Temperatura da fonte	80 °C
Temperatura do probe	250 °C
Capilar	3,90 kVolts
Cone	20 Volts
Extrator	5 Volts
Lentes RF	0.70 Volts

TABELA 3.7- Condições utilizadas nas análises por LC/MS

Tempo (minutos)	H <sub>2</sub> O +0,1% de TFA (%)	Acetonitrila
0,0	85	15
40,0	0	100
49,0	0	100
53,0	85	15
60,0	85	15

### 3.2.8. Metodologia para o estudo dos Voláteis

Para o estudo dos voláteis do fungo *A. alternata* foi utilizado o micro-organismo que estava sendo cultivado em placas de Petri contendo meio de cultivo necessário para a produção de esporos (TABELA 3.1) o qual estava em crescimento por aproximadamente 20 dias.

Foram estudados dois meios de culturas distintos, o meio de cultura líquido, o Czapeck's enriquecido com extrato de levedura e o meio de cultura sólido, o Arroz.

Neste estudo foi realizada a técnica de hidrodestilação utilizando o aparato de Clevenger, representado na FIGURA 3.7.

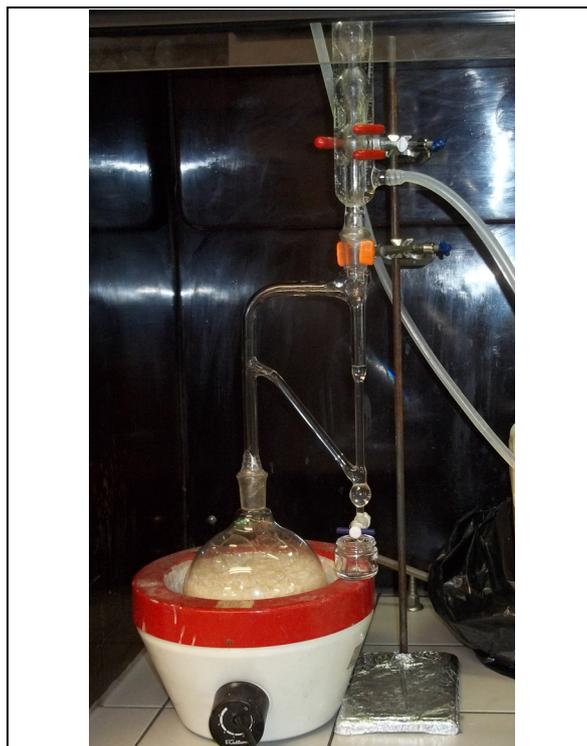


FIGURA 3.7- Representação do sistema de hidrodestilação utilizando o aparato de Clevenger.

### **3.2.8.1. Hidrodestilação de *Alternaria alternata* cultivado em Meio Líquido Czapeck'S Enriquecido com Extrato de Levedura**

Em um erlenmeyer adicionou-se 3,0 g NaNO<sub>3</sub>, 1,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g de KCL e 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O e 1L de água destilada, onde essa mistura foi agitada até ocorrer a completa dissolução dos sais. Em seguida, adicionou-se 30 g de glicose e uma nova agitação foi realizada para dissolução da glicose adicionada. Após isso, adicionou-se 20 g de extrato de levedura e homogeneizou-se o sistema. Em seguida, foi transferido aproximadamente 1L do meio de cultura para balões de fundo redondo de 2 litros o qual foi levado na autoclave para esterilização por 20 minutos. Após serem esterilizados e resfriados à temperatura ambiente os balões foram levados à capela de fluxo laminar, previamente esterilizada, e o cinco fragmentos do micro-organismo foi inoculado ao meio de cultura. Após a inoculação os balões foram mantidos estáticos, em condições normais de temperatura e pressão, sendo feito apenas uma agitação manual diariamente. Passados 14 dias de crescimento do fungo *A. alternaria*, os balões foram submetidos à hidrodestilação utilizando o aparato de Clevenger, sendo que as substâncias voláteis foram extraídas utilizando éter etílico grau HLPC, e mantidas após a extração á -20°C até análise via CG-MS. Como controle foi realizado a hidrodestilação apenas do meio de cultura Czapeck's sem a inoculação do micro-organismo. A hidrodestilação ocorreu por 5 horas.

### **3.2.8.2. Hidrodestilação de *Alternaria alternata* cultivado em Meio Sólido Arroz**

Em um balão de fundo redondo de 2L, foi adicionado 270g de arroz Uncle Ben's e 250mL de água destilada. Os balões foram levados à autoclave

para a esterilização por 45 minutos a 120°C e 1 atm de pressão. Após serem autoclavados, os balões foram agitados a fim de desprender os grãos de arroz. Após 24 horas uma nova esterilização foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao ter atingido a temperatura ambiente os balões foram levados á capela de fluxo laminar anteriormente esterilizada e cinco fragmentos de 0,5 cm de diâmetro do fungo foi inoculado. Deixou-se transcorrer um período de 14 dias para o crescimento do micro-organismo, em condições estáticas, apenas com uma agitação manual nos cinco primeiros dias, a temperatura ambiente, realizando em seguida a hidrodestilação utilizando o aparato de Clevenger. As substâncias voláteis foram extraídas utilizando éter etílico grau HPLC e armazenadas até análise via CG-MS. A hidrodestilação ocorreu por 5 horas. A FIGURA 3.8 ilustra o controle e o meio de cultivo contendo fragmentos do fungo.

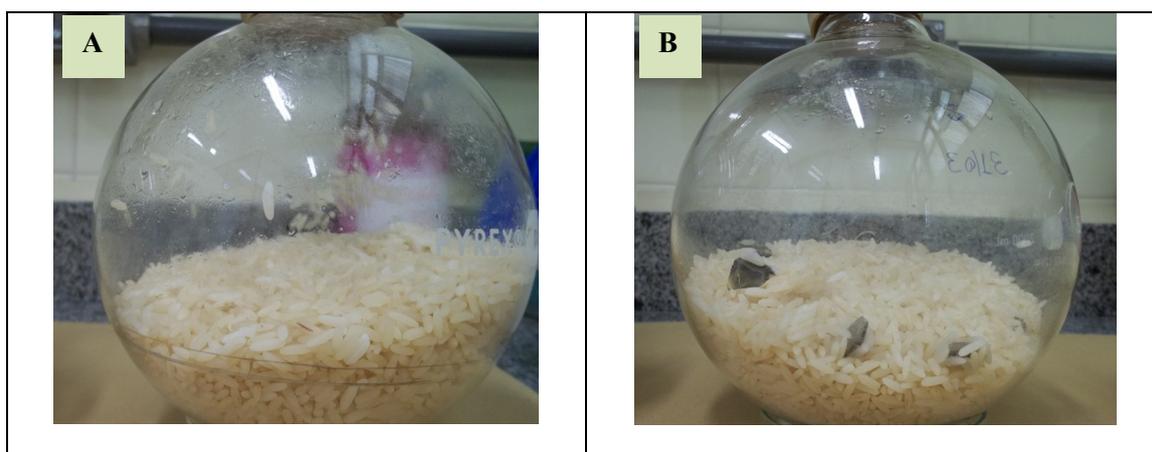


FIGURA 3.8 – *A. alternata* inoculado em meio sólido de arroz para a obtenção de compostos voláteis: A) Controle do experimento contendo somente o meio de cultivo; B) Meio de cultivo contendo fragmentos de *A. alternata*.

### 3.2.8.3. Análise por cromatografia em Fase Gasosa- Espectrometria de Massas para substâncias voláteis

Para o estudo de substâncias voláteis do micro-organismo foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) nas condições descritas na TABELA 3.8 utilizando uma coluna DB-5 .

TABELA 3.8 - Método cromatográfico utilizado na análise por GC-MS para substâncias voláteis.

<b>Temperatura do Injetor</b>	180°C
<b>Temperatura da Interface</b>	280°C
<b>Temperatura da Fonte de Ionização</b>	180°C
<b>Volume da Injeção</b>	2µL
<b>Modo de Ionização</b>	EI <sup>+</sup>
<b>Faixa de Detecção de Massas</b>	<i>m/z</i> de 50 a 750 Da

A rampa de temperatura utilizada esta descrita na FIGURA 3.9:

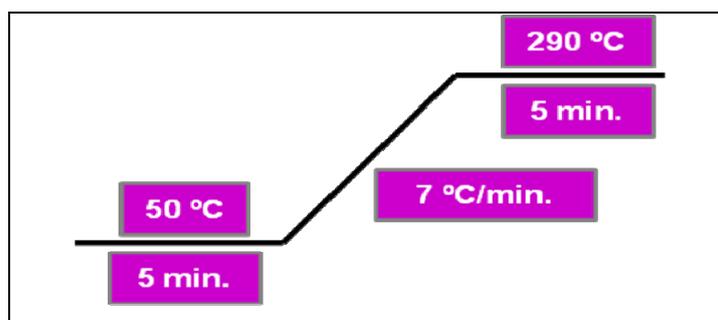


FIGURA 3.9 - Rampa de temperatura utilizada para as análise por GC-MS para substâncias voláteis.

### 3.2.9. Metodologia para as Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Um grande número de técnicas diferentes pode ser usado para compreender a extensão e a dinâmica de populações de micro-organismos em plantas. Estas podem ser divididas em duas abordagens: a) aquela onde o micro-organismo é extraído da planta ou b) aquela onde o micro-organismo é observado diretamente na superfície ou dentro das plantas, fornecendo assim informações sobre a distribuição na superfície da planta ou até mesmo a interação do micro-organismo e do seu hospedeiro. No entanto algumas dificuldades podem ser encontradas nas análises, como por exemplo, dificuldade na visualização ou identificação de pequenas estruturas e o uso de corantes ou material de fixação pode deteriorar o material.

Para impedir alguns desses inconvenientes, o uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície foliar foi adotado como técnica para observação nesse trabalho. Foi utilizado o modo ESEM, ou seja, a pressão ambiente, o qual oferece oportunidade singular e inigualável para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro, oferecendo assim uma visão geral acerca do processo de infecção, ajudando a compreender a penetração e colonização do hospedeiro e a fisiologia de interação, além de observar superfícies foliares e superfície do micro-organismo inalterados.

Visando isso, foram realizados estudos sobre a colonização do fungo *A. alternata* sobre o seu hospedeiro, o citros tangor 'Murcott' (cultivare suscetível ao micro-organismo) a fim de se entender a colonização do micro-organismo. Além disso, foram feitas imagens sobre a estrutura do fungo.

O isolado de *A. alternata* utilizado para a realização das imagens foi mantido em meio de carbonato de cálcio (descrito na TABELA 3.1), o qual proporciona a esporulação quando mantido em BOD a 25°C. Foi feita uma suspensão de esporos (como descrita no item 3.2.1) na concentração de  $10^5$

esporos/mL. A inoculação foi feita borrifando a suspensão na parte superior das folhas de tangor ‘Murcott’ sem destacá-las. As plantas tinham em média seis meses de idade. Em seguida as plantas ficaram em ambiente controlado de temperatura 25°C e umidade de 80%, condições necessárias para o desenvolvimento do micro-organismo. Após 24 horas os sintomas de mancha marrom de alternaria eram visíveis, iniciando-se pelas nervuras e progredindo para a folha. Nesse momento as folhas eram destacadas das plantas e preparadas para a realização das imagens.

Com o auxílio de uma lupa amostras de tecidos dos citros foram cortados com um tamanho aproximado de 16 mm<sup>2</sup> (4x4 mm) e montados sobre um porta amostra de metal. Em seguida, o material foi levado ao microscópio eletrônico de varredura (Quanta -250), o qual não necessita metalização da amostra, operando em pressão ambiente podendo ampliar as amostras em até dez mil vezes. A análise dos materiais processados para MEV foi apenas morfológica, não havendo quantificação de eventos.

Na FIGURA 3.10 está demonstrada uma foto da Lupa e do Microscópio utilizado no trabalho.

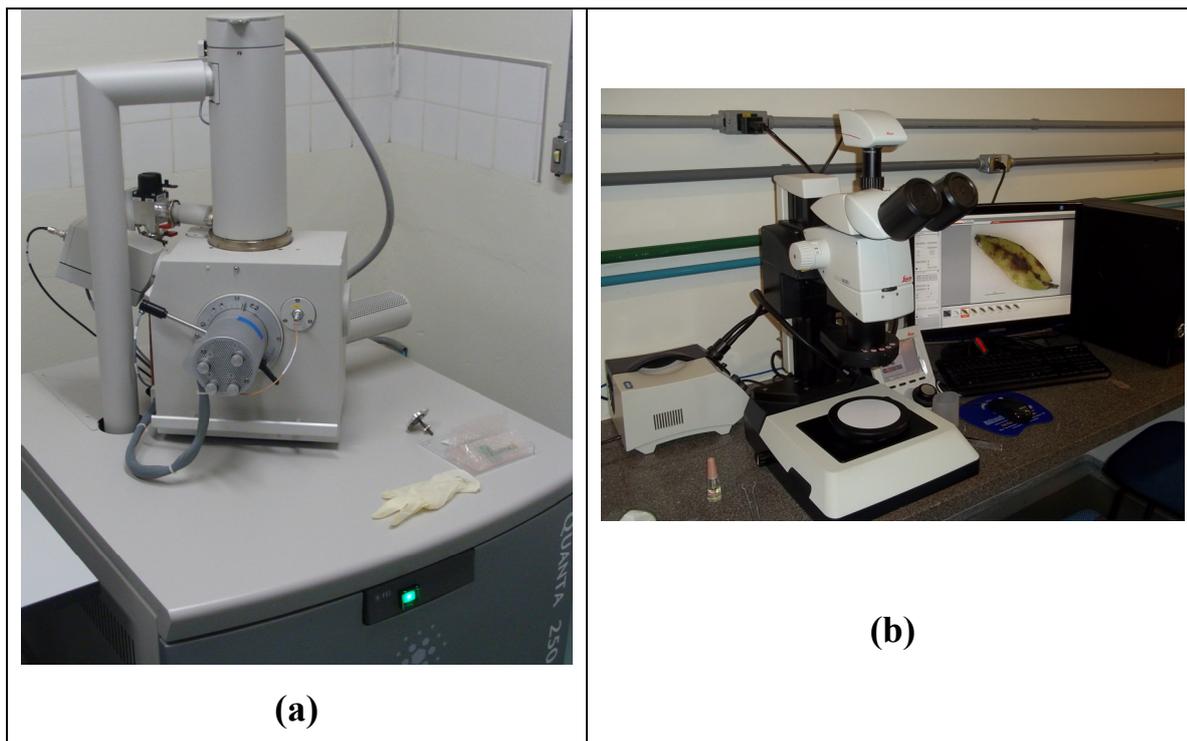


FIGURA 3.10- (a) MEV da FEI Quanta 250 operando em ESEM. (b) Leica, com software Leica Application Suite (LAS) com montagem.

Para a realização desse trabalho, foi feita uma parceria com o INCT HYMPAR (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira), com a professora Dra. Angélica Maria Penteadó Martins Dias no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, na Universidade Federal de São Carlos.

### **3.2.10. Metodologia para os Ensaio Biológicos ao Desenvolvimento de Micro-organismos**

#### **3.2.10.1. Ensaio de inibição *in vitro* frente ao crescimento micelial**

Foram preparados meio de cultura BDA comercial (foram pesados 2,43 g e solubilizado em 60 mL de água), o qual foi autoclavado à 121°C a 1atm de pressão. Após a esterilização do meio, o mesmo foi levado à capela de fluxo laminar previamente autoclavada e deixado em repouso até atingir a temperatura

de 50°C. Ao atingir essa temperatura, 10 mg de cada substância foram solubilizadas em 500 µL de solvente DMSO e agitadas em um agitador tipo Vortex até a completa solubilização, obtendo assim uma concentração final de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Após esse procedimento, as amostras foram filtradas em Millipore (0,2 µm) e incorporadas em 60 mL de meio de cultura BDA contido em erlenmeyers e agitados manualmente, Após a completa homogeneização, o meio de cultura juntamente com a substância incorporada foi vertido em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro a aguardo-se a solidificação. Em seguida discos de micélios (0,5 cm Ø) foram colocados no centro de cada placa, sendo que essas foram incubadas sob fotoperíodo de 12 horas a 25°C e avaliado o crescimento micelial das colônias em dias alternados realizando a medição radial do micro-organismo sobre o meio de cultura. Para cada substância testada foram realizadas cinco réplicas.

Como controle do experimento foi utilizado apenas a incorporação ao meio de cultura de 500 µL de DMSO filtrado também em Millipore (0,2 µm).

Esse mesmo procedimento foi feito para o micro-organismo *Alternaria alternata* e *Guignardia citricarpa*.

A seguir, na FIGURA 3.11 tem-se uma ilustração da metodologia descrita.

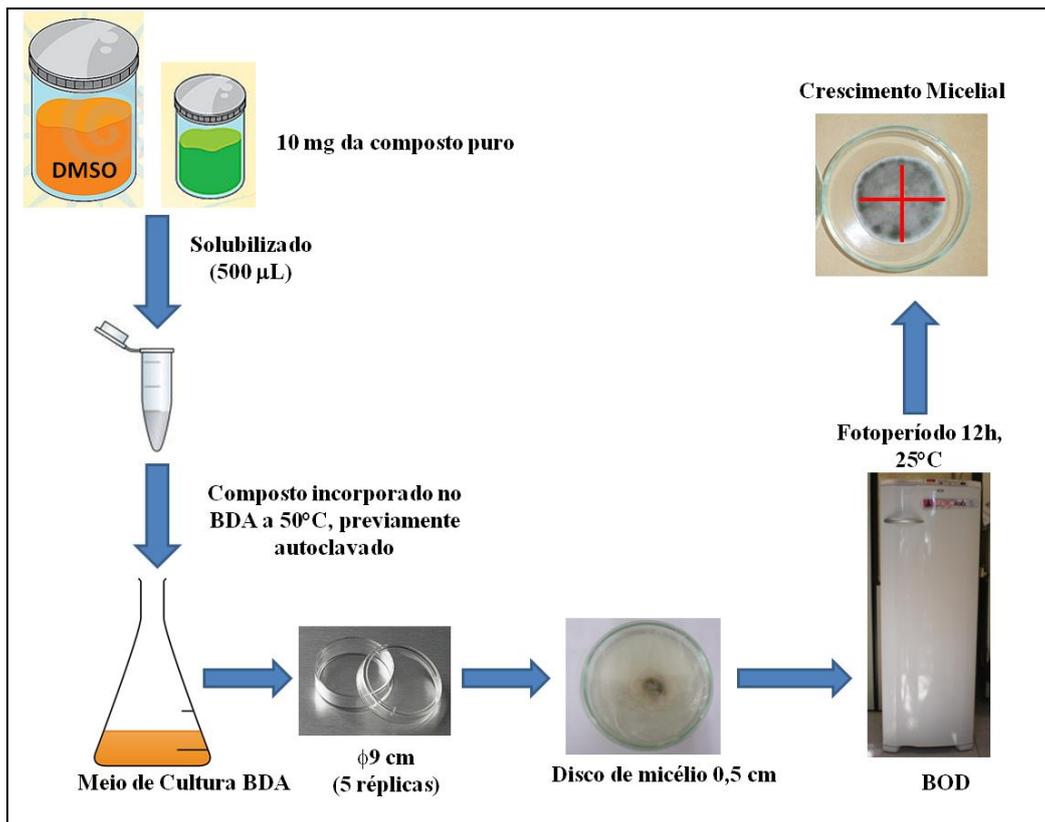


FIGURA 3.11- Metodologia de ensaio de inibição *in vitro* frente ao crescimento micelial.

### 3.2.10.2. Ensaio de inibição *in vitro* frente à germinação de esporo e formação de apressórios

Para a obtenção da suspensão de esporo utilizou-se um cultivo de *A. alternata* em meio de carbonato de cálcio e para o fungo *G. citricarpa* em meio de BDA. A metodologia para a obtenção da suspensão de esporo está descrita no item 3.2.1. Para os ensaios foram utilizadas placas de poliestireno ( $\phi = 9$  cm).

Foi utilizada 1mg de substância pura, a qual foi solubilizada em 500 µL de DMSO. Ao atingir a total solubilização, foi acrescentada a essa solução 10 mL de água destilada estéril, obtendo assim uma concentração final de 100 µg.mL<sup>-1</sup> (substância pura/água). Depois da completa homogeneização, foram colocadas nas placas gotas de 40 µL de cada solução das substâncias e 40 µL da

suspensão de esporo na concentração de  $10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>, totalizando por placa quatro repetições. Como testemunha foi preparada uma solução de 10 mL de água destilada estéril com 500 µL de DMSO.

As placas foram vedadas com filme PVC com a finalidade de manter a unidade e conservada em BOD sob fotoperíodo de 12 horas a 25°C por 24 horas de experimento. Após esse período a porcentagem da germinação e formação de apressório foi avaliada através da observação em microscópio óptico (aumento de 100 vezes). Foram considerados como germinados os esporos com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao crescimento dos esporos não germinados. Na FIGURA 3.12 segue uma ilustração do procedimento utilizado para a obtenção da suspensão de esporos e na FIGURA 3.13 a metodologia utilizada nesse ensaio.

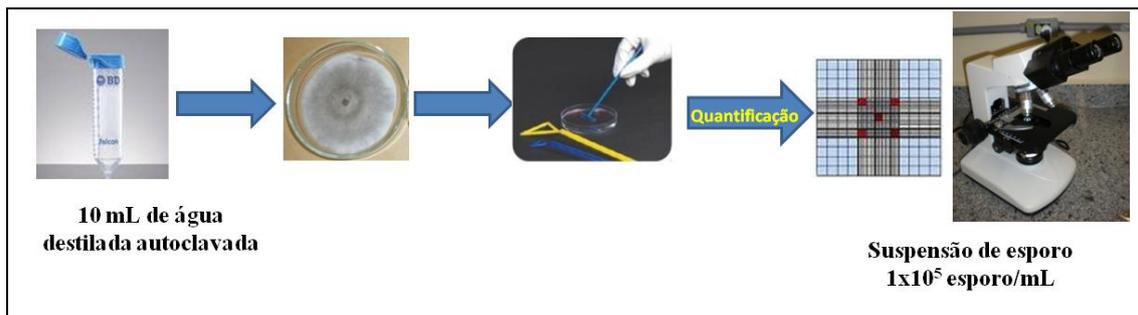


FIGURA 3.12 - Obtenção de uma suspensão de esporos.

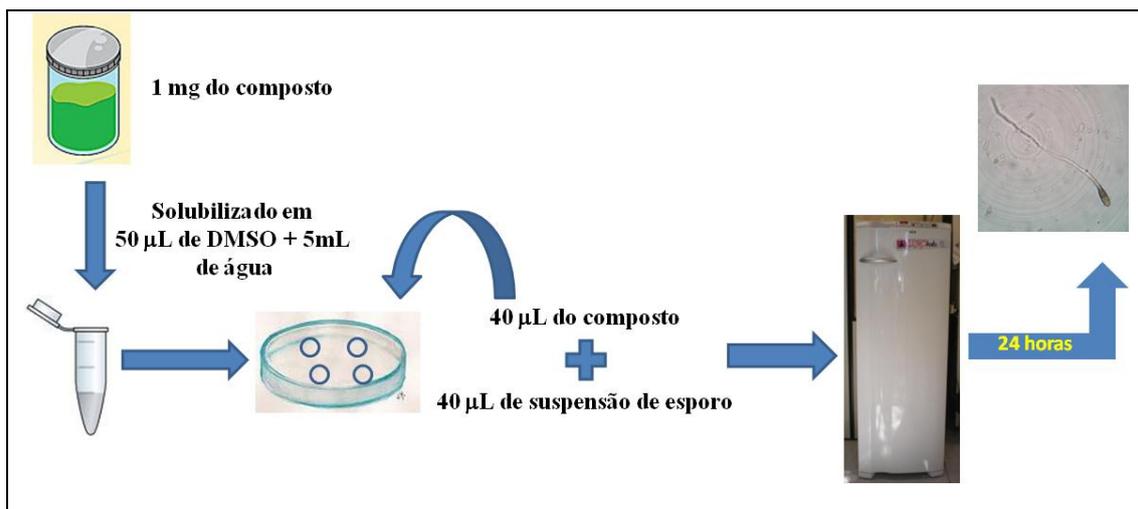


FIGURA 3.13 - Metodologia de Ensaio de inibição *in vitro* frente à germinação de esporo e formação de apressórios.

Vale ressaltar que todos os ensaios realizados (germinação de esporos e formação de apressórios) bem como todas as metodologias implantadas no laboratório de Produtos Naturais, contou com apoio do pós doutorando do Departamento de Química do Laboratório de Produtos Naturais, o doutor Leonardo Toffano.

## *RESULTADOS E DISCUSSÕES*



## 4. Resultados e Discussões

### 4.1. Identificação de *Alternaria alternata*

Na FIGURA 4.1 pode-se analisar a imagem do gel obtida através de um foto-documentador. Através da imagem pode-se observar o marcador de peso molecular (M) e 1 o produto obtido a partir de PCR, o qual identifica o micro-organismo.

A identificação do micro-organismo foi feita através de PCR com primers específicos os quais foram mencionados no item 3.2.2. Na reação foram utilizados dois primers, uma para a confirmação do gênero (370pb) e outro para a espécie (550pb).

Para visualizar a amplificação foi feito um gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, pois este entra no meio das bases de DNA, fazendo com que quando exposto à luz UV o mesmo fluoresce, facilitando assim a observar as bandas de amplificação. Com isso, fica comprovada a identificação do fungo em gênero e espécie em todas as amostras obtidas no decorrer do trabalho.

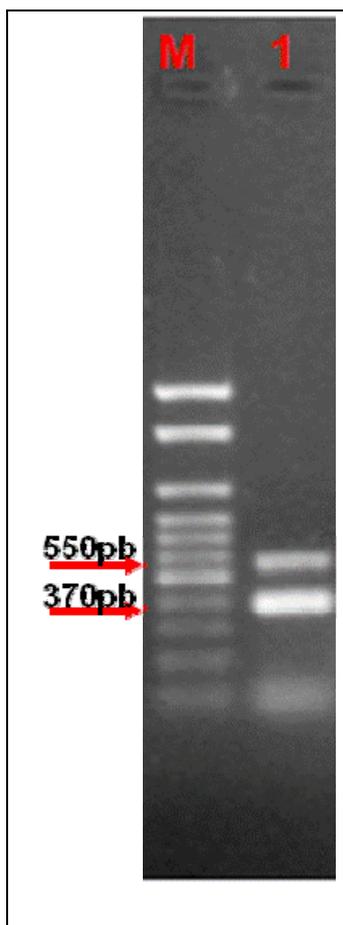


FIGURA 4.1- Gel de agarose 1% corado com brometo de Etídio. M- Marcador de peso molecular 1kb plus NEOBIO; 1- Produto de PCR (550pb- espécie; 370pb- gênero).

#### **4.2- Espectros de RMN $^1\text{H}$ dos extratos obtidos do cultivo de *Alternaria alternata* em meio de arroz**

Nas FIGURAS 4.2 a 4.5 estão demonstrados os experimentos de RMN  $^1\text{H}$  dos subextratos obtidos do cultivo do meio sólido de arroz. Com isso, foi possível escolher três subextratos para o trabalho, o subextrato hexano, metanol e acetato de etila.

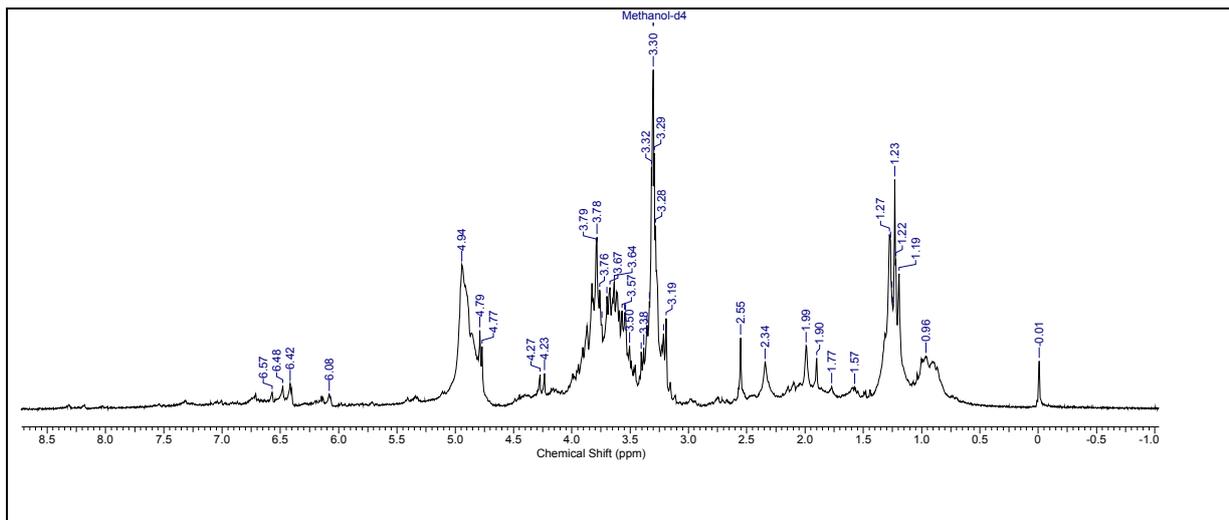


FIGURA 4.2- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do subextrato Acetato de Etila (MeOD, 200MHz).

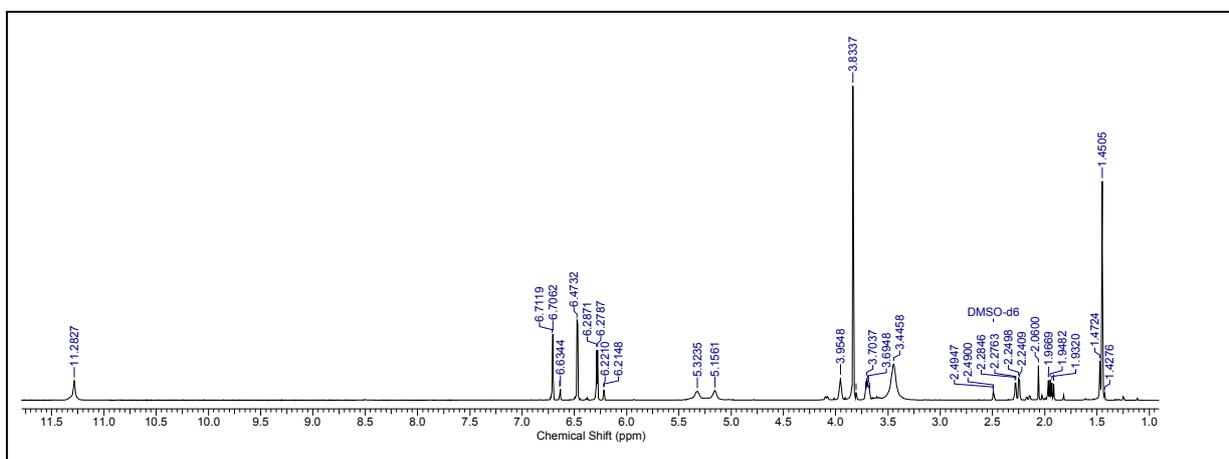


FIGURA 4.3- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do subextrato Hexano ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz).

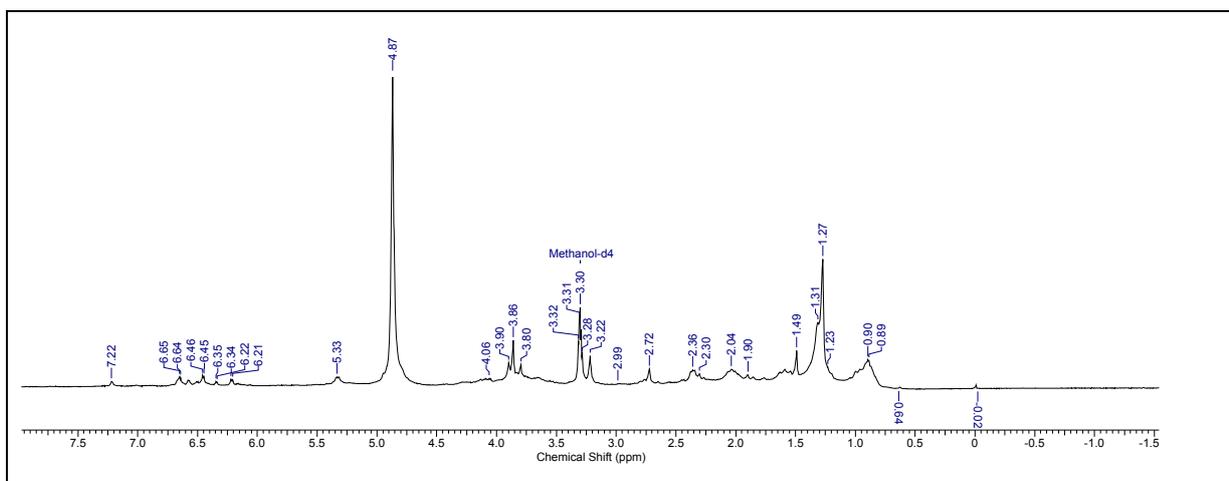


FIGURA 4.4- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do subextrato Metanol (MeOD, 200MHz).

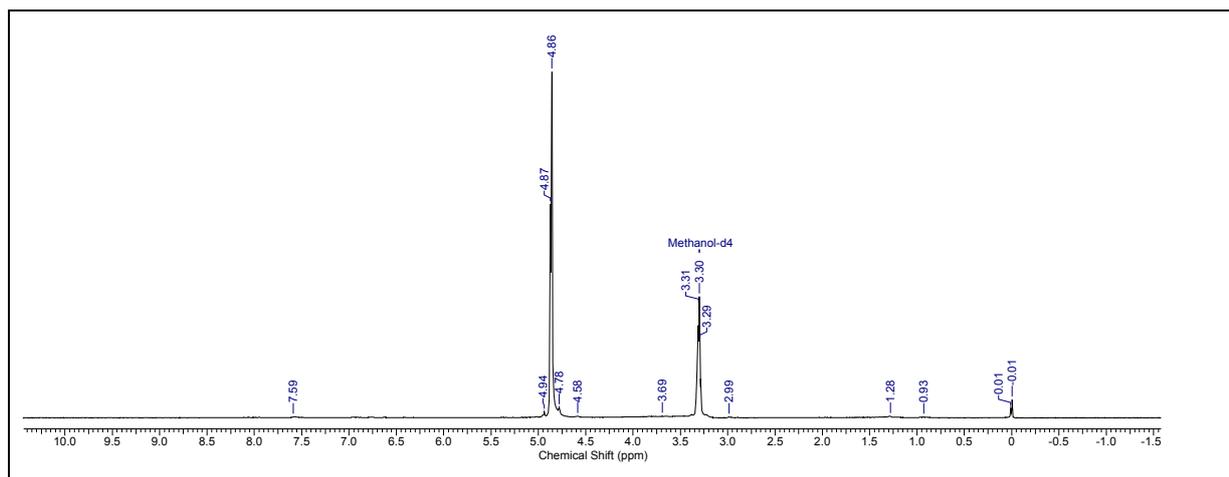
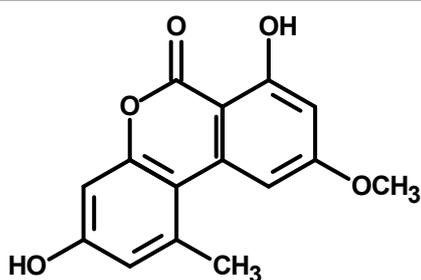


FIGURA 4.5- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do subextrato Butanol (MeOD, 200MHz).

De acordo com os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , os extratos escolhidos para o trabalho.

#### 4.2. Substâncias Isoladas e Identificadas

O estudo químico do fungo *A. alternata* permitiu o isolamento de 11 metabólitos de diferentes classes. Todas as estruturas moleculares estão descritas a seguir.

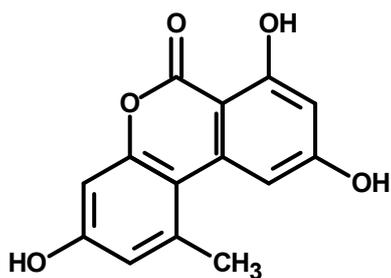


#### Substância 01

**Alternariol Monometil Éter**

Origem: subextrato hexânico

---

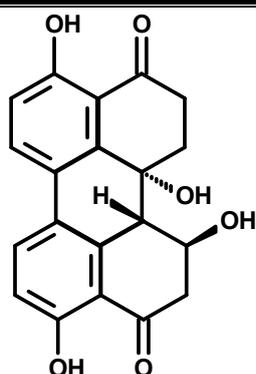


**Substância 02**

**Alternariol**

Origem: subextrato metanólico

---

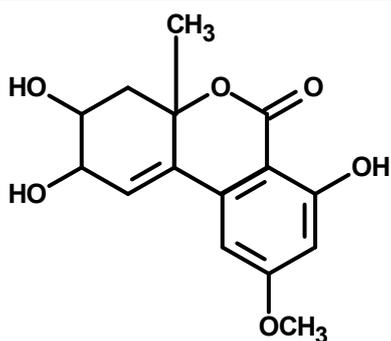


**Substância 03**

**Alvertoxina I**

Origem: subextrato metanólico

---

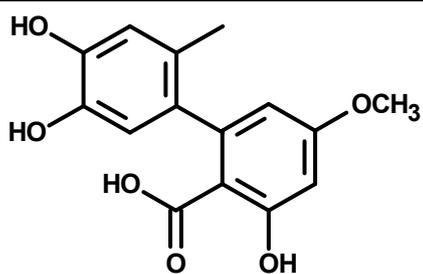


**Substância 04**

**Altenueno**

Origem: subextrato metanólico

---

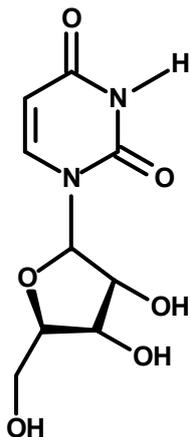


**Substância 05**

**Altenucina**

Origem: subextrato metanólico

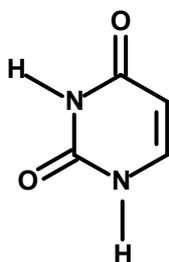
---



**Substância 06**

**Uridina**

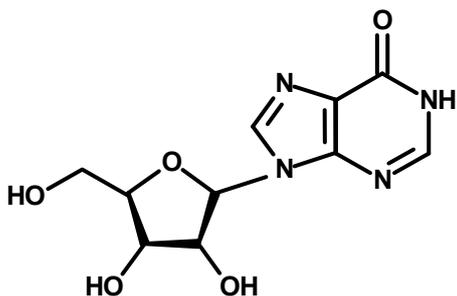
Origem: subextrato acetato



**Substância 07**

**Uracila**

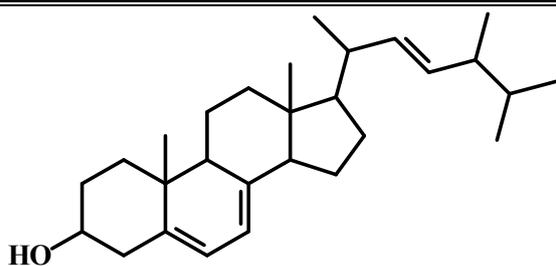
Origem: subextrato acetato



**Substância 08**

**5'-inosil**

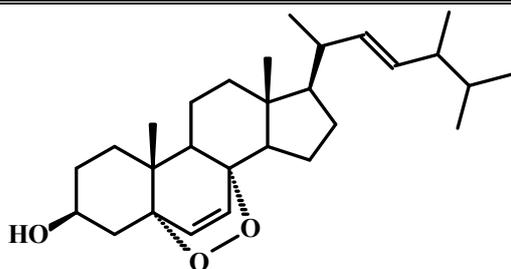
Origem: subextrato acetato



**Substância 09**

**Ergosterol**

Origem: subextrato hexânico



**Substância 10**

**Peróxido de Ergosterol**

Origem: subextrato hexânico

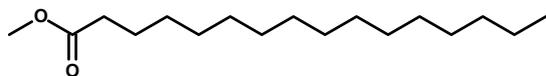
---

---

---

### Substância 11a

#### Ácido Palmítico



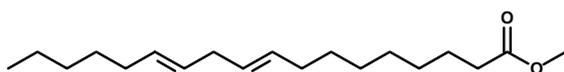
Origem: subextrato hexânico

---

---

### Substância 11b

#### Ácido Octadecadienóico



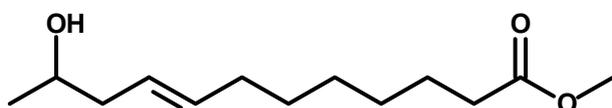
Origem: subextrato hexânico

---

---

### Substância 11c

#### Ácido 8-Dodecenóico



Origem: sub extrato hexânico

---

Além das substâncias descritas acima, foram identificadas substâncias via LC-MS, via CG-EM.

### 4.3. Identificações Estruturais das Substâncias Isoladas

Serão apresentadas nesse tópico as identificações estruturais dos metabólitos isolados de *A. alternata* dos três subextratos trabalhados.

#### 4.3.1. Substância 01 - Alternariol Monometil Éter

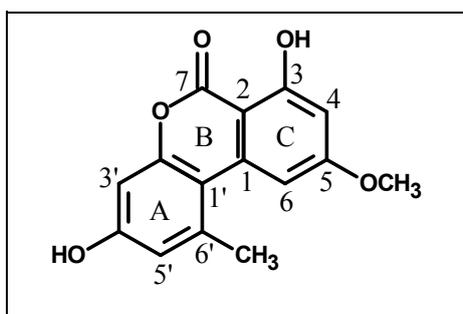


FIGURA 4.6- Substância 01.

A substância 01, ilustrada na FIGURA 4.6, o alternariol monometil éter, foi isolada do subextrato hexânico e metanólico do meio sólido em arroz, sendo que sua estrutura foi identificada através dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , e  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 4.8 a 4.12). Este composto isolado revelou positivamente com o reagente de vanilina com ácido sulfúrico em CCD. Sendo essa uma substância anteriormente elucidada e característica do micro-organismo, os valores obtidos foram comparados aos dados da literatura.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram observados quatro dubletos na região aromática ( $\delta$  variando de 6,63 à 7,24 ppm), com constantes de acoplamento meta ( $J$  variando 2,4 e 2,8 Hz), sugerindo a presença de dois anéis aromáticos. Dois dubletos em  $\delta$  6,63 (1H,  $d$ ,  $J = 2,8$  Hz) e  $\delta$  7,24 (1H,  $d$ ,  $J = 2,8$  Hz), respectivos aos acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos H-4 e H-6. Outro par de dubletos foi observado sendo um em  $\delta$  6,66 (1H,  $d$ ,  $J = 2,4$  Hz) e  $\delta$  6,73 (1H,  $d$ ,  $J = 2,4$  Hz), relativos aos acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos H-3' e H-5'. Observou-se também a presença de dois singletos intensos, sendo um deles em  $\delta$  2,74 o qual foi atribuído a metila ligada ao anel aromático, e outro singletto observado em  $\delta$  11,83 indicando, por estar nessa região, a presença de uma hidroxila quelada. Outro singletto observado, também intenso, na região de  $\delta$  3,92 indicou a presença de um grupo metoxil ligado ao anel aromático.

O espectro de HMBC apresenta o hidrogênio na posição H-3' correlacionando com os carbonos nas posições C-1' e C-2', afirmando a conectividade entre os anéis A e B. A mesma conectividade pode ser observada entre os anéis B e C, sendo que H-6 correlaciona com os carbonos C-1' e C-2.

Como essa substância é um metabólito comum de *A. alternata*, em comparação com a literatura e de acordo com as demais correlações atribuídas na TABELA 4.1, pode-se afirmar que o metabólito isolado trata-se do alternariol monometil éter.

TABELA 4.1- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **01** e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância 01 (400 MHz, DMSO)		ALY <i>et al.</i> , 2008 (500 MHz para $^1\text{H}$ , 125 MHz para $^{13}\text{C}$ , DMSO)	
	Valores Obtidos $\delta^1\text{H}$	Valores Obtidos $\delta^{13}\text{C}$	Valores Literatura $\delta^1\text{H}$	Valores Literatura $\delta^{13}\text{C}$
1	-	138,0	-	-
2	-	99,2	-	101,6
3	-	164,1	-	160,1
4	6,63 (d, $J = 2,8$ )	101,6	6,55 (d, $J = 2,3$ )	106,0
5	-	164,7	-	160,1
6	7,24 (d, $J = 2,8$ )	103,4	7,28 (d, $J = 2,3$ )	108,0
7	-	168,0*	-	-
1'	-	108,8	-	109,5
2'	-	152,6	-	153,2
3'	6,66 (d, $J = 2,8$ )	101,6	6,69 (d, $J = 2,3$ )	101,3
4'	-	158,6	-	159,0
5'	6,73 (d, $J = 2,8$ )	117,6	6,77 (d, $J = 2,3$ )	122,9
6'	-	138,4	-	139,5
6'-CH <sub>3</sub>	2,74 s	25,0	2,79 s	24,6
5-OCH <sub>3</sub>	3,92 s	55,8	3,97 s	53,6
3-OH	11,83 s	-	-	-

**Obs:** \*valor de carbono obtido através da Projeção do Mapa de Correlações HSQC.

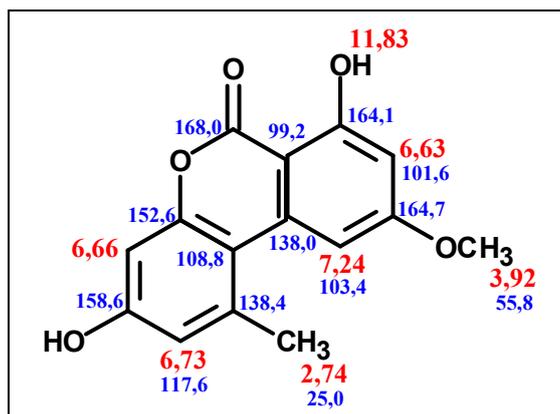


FIGURA 4.7- Alternariol monometil éter com os respectivos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono.

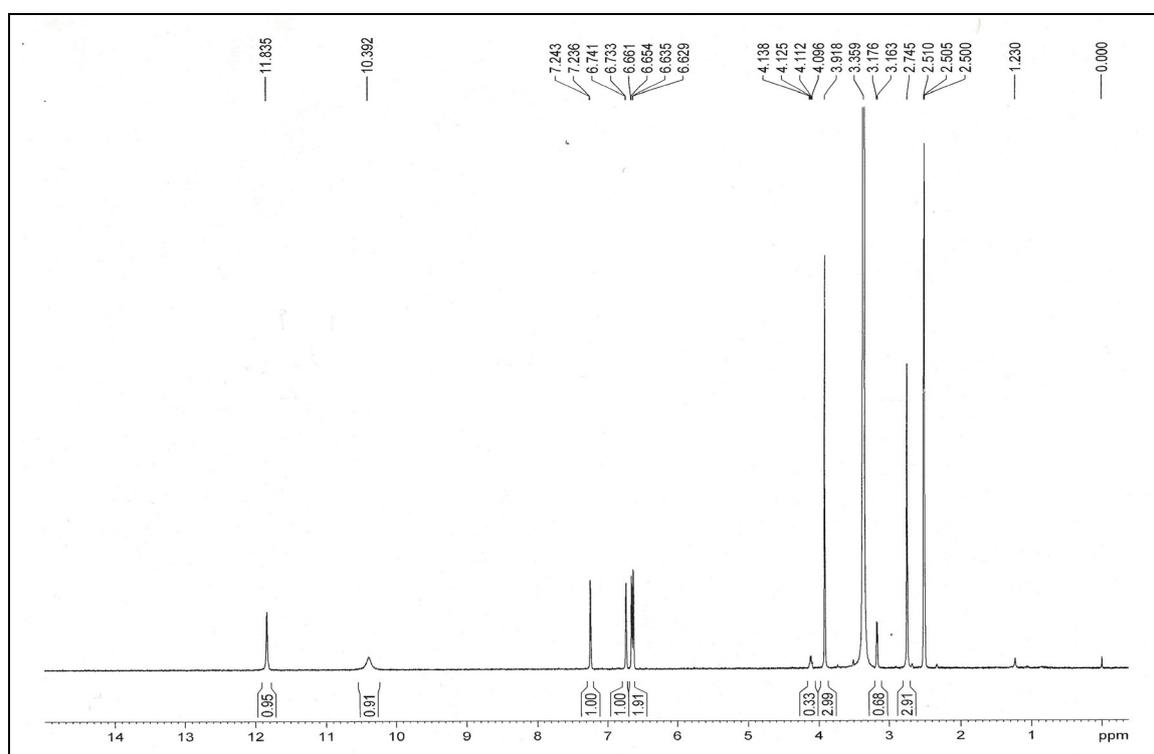


FIGURA 4.8- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de alternariol monometil éter (DMSO, 400 MHz).

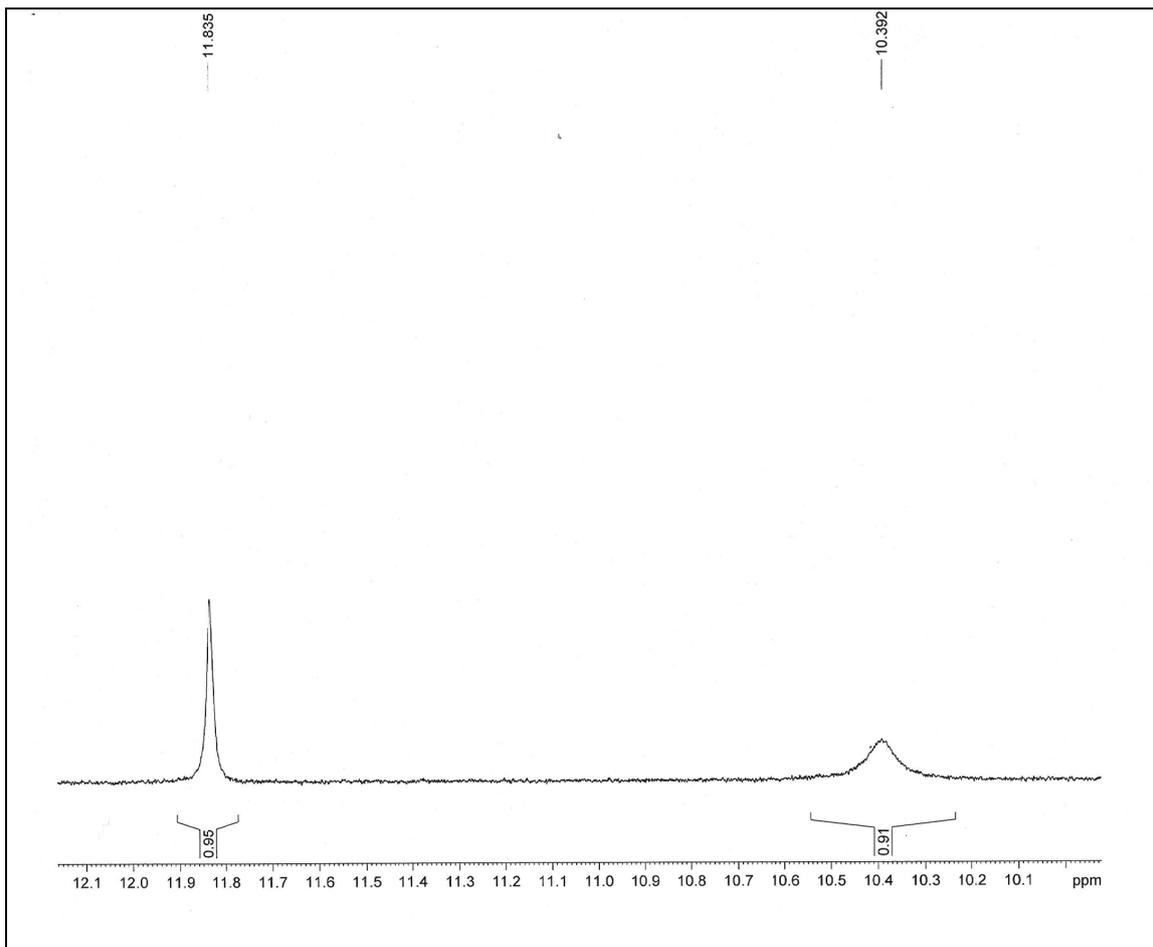


FIGURA 4.9- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alternariol monometil éter (DMSO, 400 MHz).

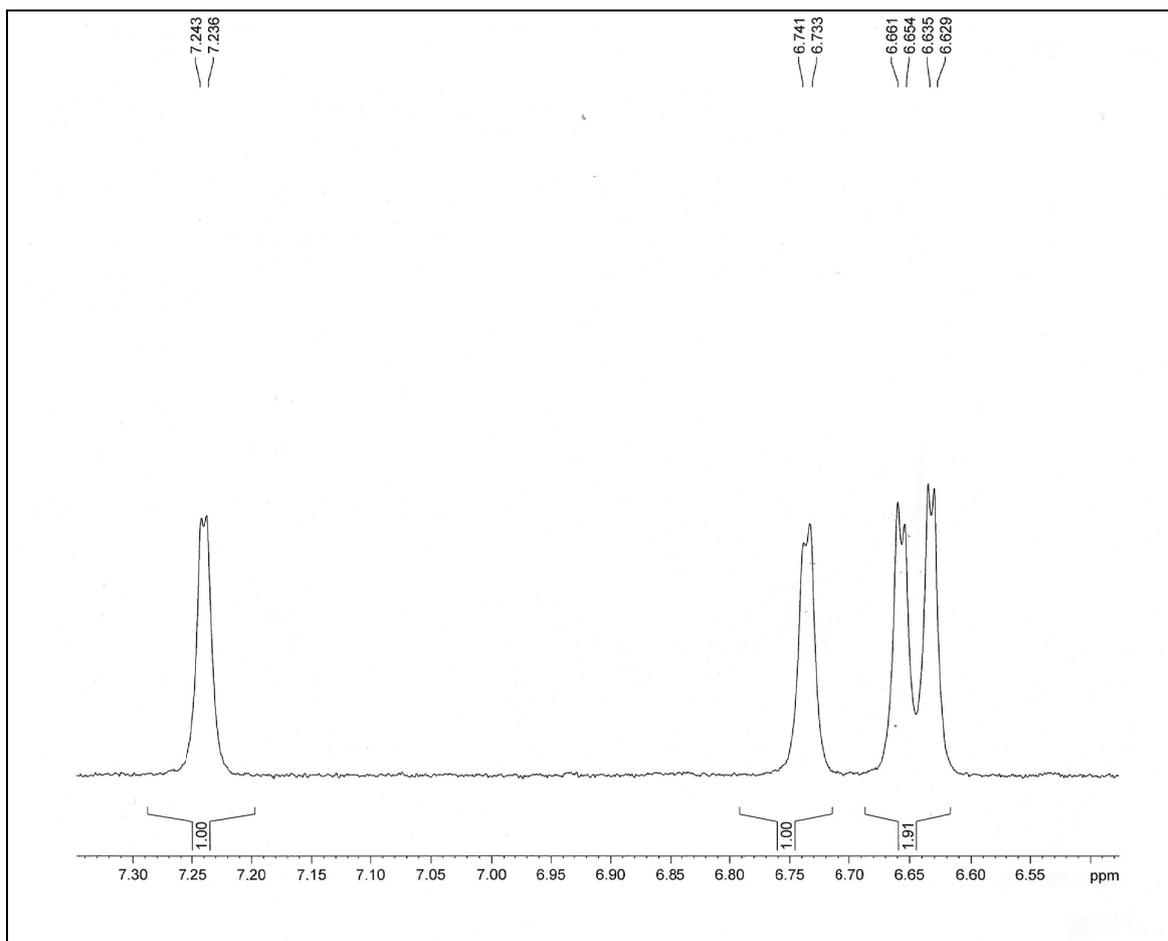


FIGURA 4.10- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alternariol monometil éter (DMSO, 400 MHz).

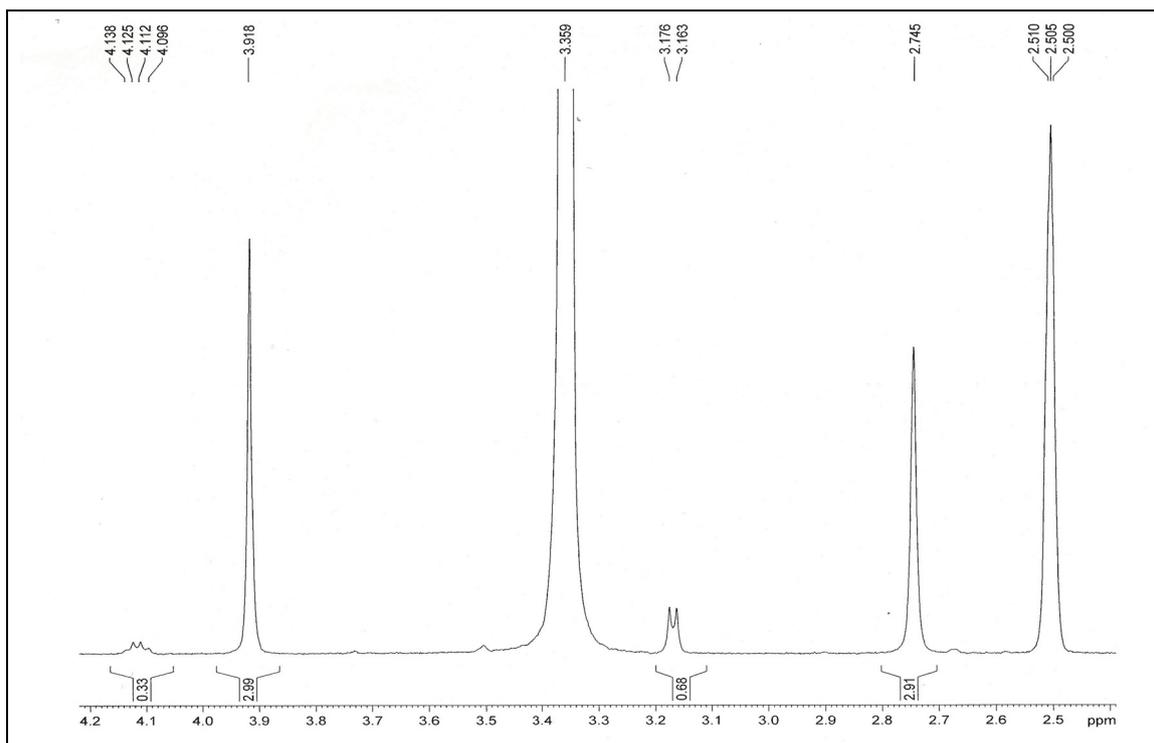


FIGURA 4.11- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alternariol monometil éter (DMSO, 400 MHz).

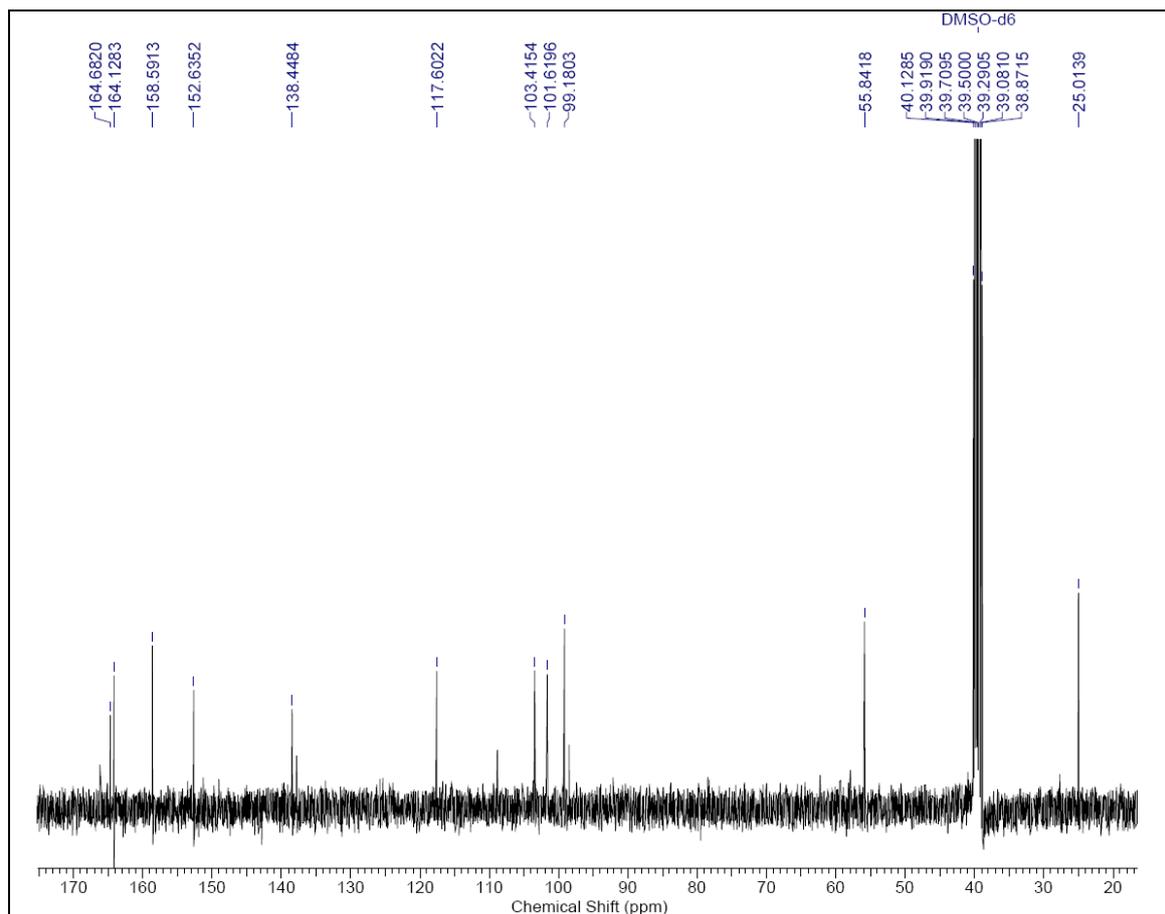


FIGURA 4.12- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de alternariol monometil éter (DMSO, 100 MHz).

#### 4.3.2. Substância 02 - Alternariol

A substância **02**, denominado alternariol, foi isolado do subextrato metanol do meio sólido em arroz, sendo que sua estrutura foi identificada através dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURAS 4.14 a 4.18).

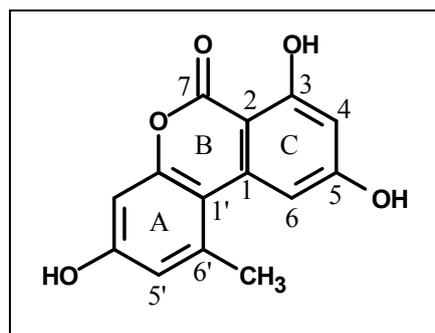


FIGURA 4.13- Substância 02.

Analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram observados quatro dubletos na região aromática com constantes de acoplamento meta, sugerindo igualmente a presença de dois anéis aromáticos. Dois dubletos em  $\delta$  6,42 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz) e  $\delta$  7,36 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz), representam respectivamente os acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos H-4 e H-6. Outro par de dubletos foi analisado sendo um deles em  $\delta$  6,71 (1H, *d*,  $J = 2,8$  Hz) e  $\delta$  6,79 (1H, *d*,  $J = 2,8$  Hz), relativos aos acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos H-3' e H-5'. Considerando todo o espectro de RMN  $^1\text{H}$  apenas outro sinal pode ser destacado, um singlete intenso em  $\delta$  2,74 ppm, caracterizando uma metila ligada ao anel aromático. Em relação à substância **01**, apresentada anteriormente no item 4.3.1, o único sinal que as diferem está na presença do grupo metoxil ligado ao anel C do alternariol monometil éter em  $\delta$  3,92. Com base nessas informações espectrais e com base na literatura, a substância **02** pode ser atribuída ao alternariol, outro composto muito comum produzido pelo micro-organismo estudado.

A TABELA 4.2 oferece todos os deslocamentos químicos obtidos para a determinação estrutural e dados da literatura a fim de se comprovar a proposta da substância.

TABELA 4.2 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **02** e comparação com dados da literatura

	<b>Substância 02</b> <b>(400 MHz, Acetona)</b>	<b>KOCH <i>et al.</i>, 2005</b> <b>(500 MHz <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>
<b>Posição</b> <b>H e C</b>	<b>Valores Obtidos</b>	<b>Valores</b> <b>Literatura</b>
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^1\text{H}$
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	6,42 (d, $J=2,4$ )	6,38 (d, $J=1,9$ )
5	-	-
6	7,36 (d, $J=2,4$ )	7,27 (d, $J=2,0$ )
7	-	-
1'	-	-
2'	-	-
3'	6,71 (d, $J=2,8$ )	6,32 (d, $J=2,6$ )
4'	-	-
5'	6,79 (d, $J=2,8$ )	6,71 (d, $J=2,6$ )
6'	-	-
6'- $\text{CH}_3$	2,78 (s)	2,77 (s)

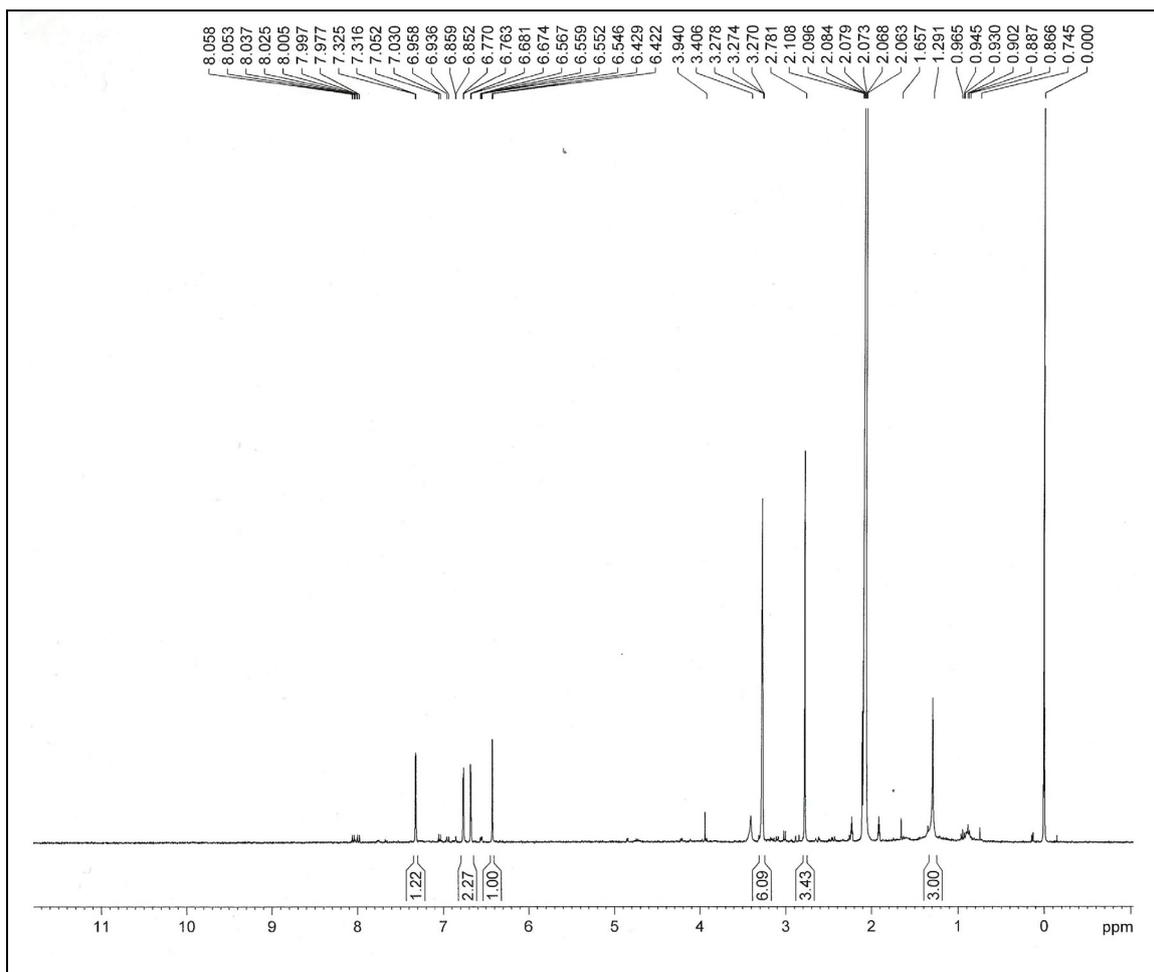


FIGURA 4.14- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alternariol (Acetona, 400 MHz).

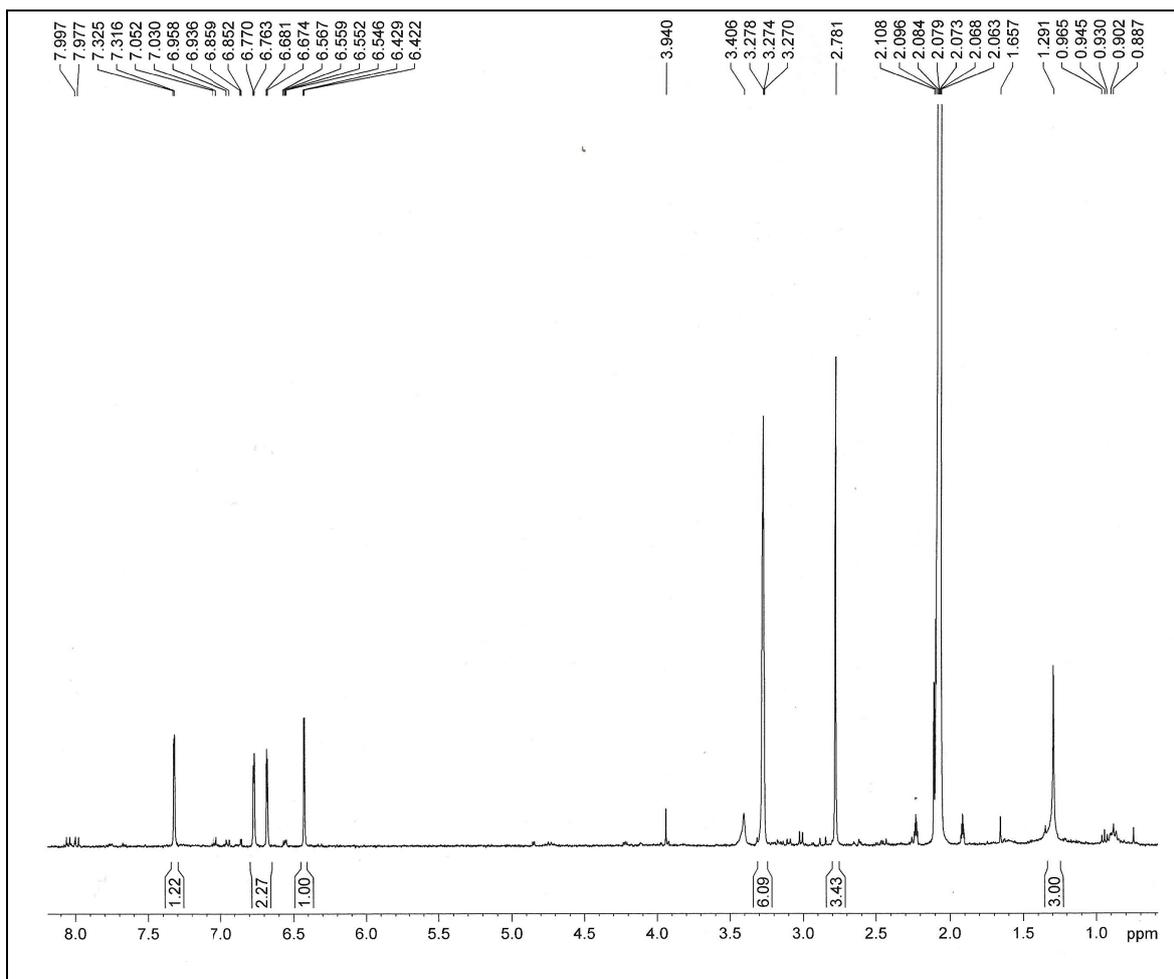


FIGURA 4.15- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alternariol (Acetona, 400 MHz).

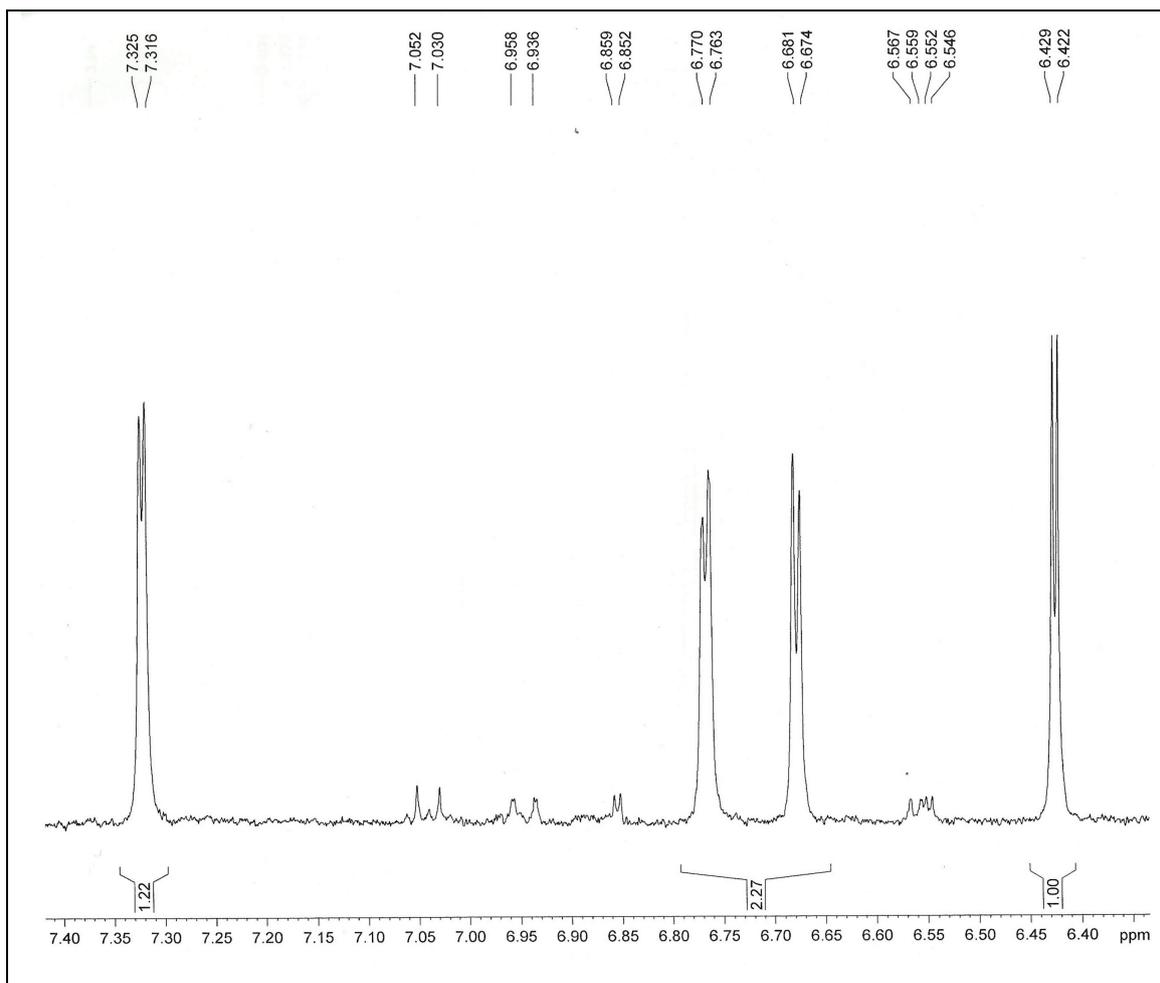


FIGURA 4.16- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alternariol (Acetona, 400 MHz).

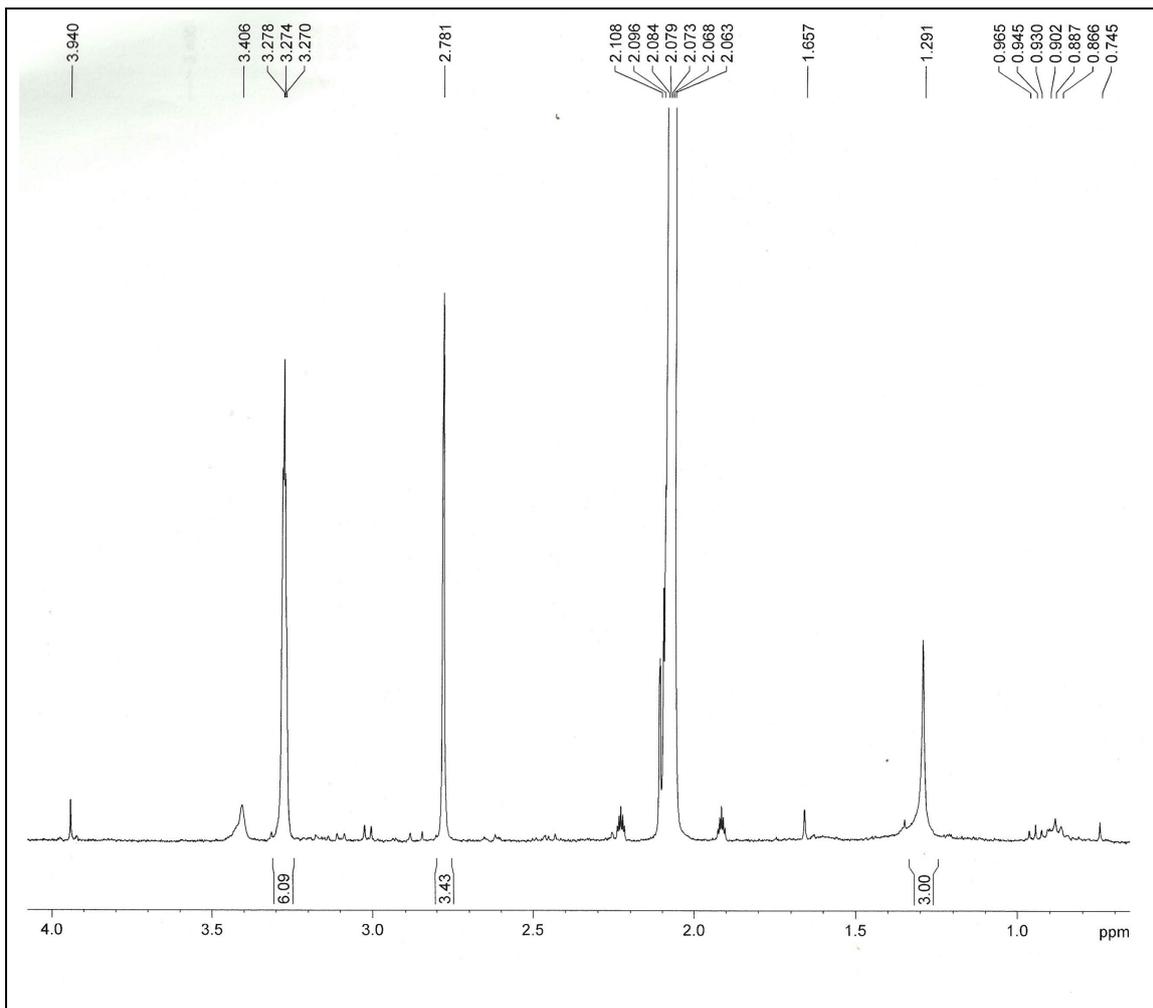


FIGURA 4.17- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alternariol (Acetona, 400 MHz).

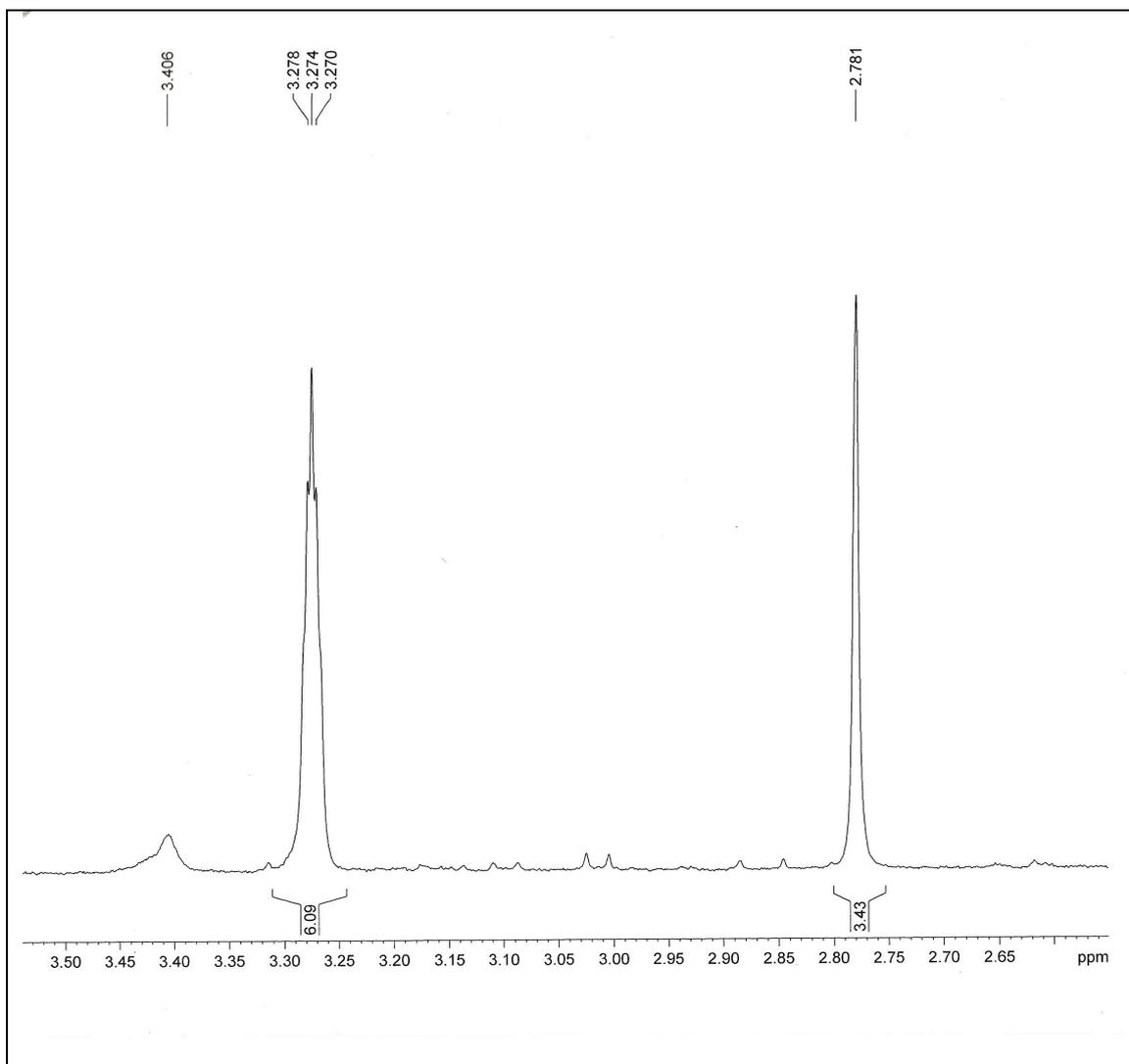


FIGURA 4.18- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alternariol (Acetona, 400 MHz).

### 4.3.3. Substância 03 – Altertoxina I

A substância **03**, conhecida como altertoxina I, foi isolada do subextrato Metanol do meio sólido em arroz. Essa substância foi identificada através dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC e HMBC, representados nas FIGURAS 4.22 a 4.26.

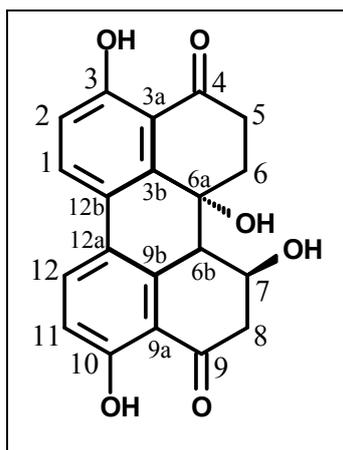


FIGURA 4.19- Substância 3.

Através do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , observou-se dois dubletos muito próximos, com um deslocamento químico de 7,04 ( $d, J = 8,4 \text{ Hz}$ ) e  $\delta$  6,95 ( $d, J = 8,4 \text{ Hz}$ ), referentes respectivamente ao H-2 e H-11. Outros dois dubletos são observados com  $\delta$  8,06 ( $d, J = 8,0 \text{ Hz}$ ) do H-1 e  $\delta$  8,01 ( $d, J = 8,0 \text{ Hz}$ ) referente ao H-12. Observaram-se também sinais na região de hidrogênios metilênicos e também dois sinais bastantes desblindados com deslocamento químico de  $\delta$  12,73 e 12,34, sugerindo a presença de hidroxila quelada na molécula, sendo que esse dado foi confirmado ao analisar o HMBC o qual fornece um valor de carbono de  $\delta$  161,8 ppm. Com esses dados pode sugerir uma simetria na molécula.

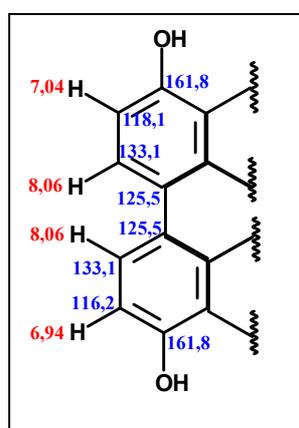


FIGURA 4.20- Substância 3 com alguns deslocamentos.

Através do COSY foi possível obter acoplamentos dos hidrogênios metilínicos na região de 1 à 4,5 ppm, sendo que H-5 $\alpha$  e H-5 $\beta$  apresentam deslocamentos respectivamente de  $\delta$  3,02 e 2,43, sendo que ambos estão ligados ao C-5,  $\delta$  34,2. Ainda analisando o COSY, observou-se o acoplamento de H-6 $\alpha$  e H-6 $\beta$ , respectivamente,  $\delta$  3,18 e 2,70, os quais estão ligados ao C-6,  $\delta$  34,1. Outro acoplamento que pode ser observado ocorre entre H-6b e H-7, respectivamente  $\delta$  3,07 e 4,53. Entretanto ao analisar o HSQC, observa-se sinal de carbono ligado à hidroxila, portanto foi atribuído o valor de deslocamento aos carbonos  $\delta$  51,6 para o C-6b e  $\delta$  66,8 para C-7. Finalmente, também foi possível observar o acoplamento de H-8 $\alpha$  e H-8 $\beta$ , os quais apresentam um deslocamento de  $\delta$  3,08 e 2,92, ligados ao carbono,  $\delta$  48. Analisando o mapa de correlações HSQC foram observados os demais sinais de correlação, e através dos dados da literatura pode-se concluir que a substância **03** trata-se da alvertoxina I, uma substância usualmente isolada de *Alternaria alternata*.

TABELA 4.3- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de 03 e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância 03 (400 MHz, DMSO)		ARNONE, 1986 (300,13 MHz para $^1\text{H}$ e 75,47 MHz para $^{13}\text{C}$ , DMSO); Stinson, 1982 (270 MHz para $^1\text{H}$ e 67,2, $\text{CDCl}_3$ ; MHz para $^{13}\text{C}$ , $\text{ACN}d$ )	
	Valores Obtidos $\delta$ $^1\text{H}$	Valores Obtidos $\delta$ $^{13}\text{C}$	Valores Literatura $\delta$ $^1\text{H}$	Valores Literatura $\delta$ $^{13}\text{C}$
1	8,06	133,1	8,14	133,6
2	7,04	118,1	6,81	117,0 ou 119,2
3	-	161,8	-	162,0 ou 162,5

Continuação da TABELA 4.3

4	-	203,0	-	204,5 ou 207,0
5	2,43 ( $\alpha$ ) 3,02 ( $\beta$ )	34,2	2,43 ( $\alpha$ ) 3,02 ( $\beta$ )	35,7
6	2,70 ( $\alpha$ ) 3,18 ( $\beta$ )	34,1	2,70 e 3,18	34,5
7	4,53	66,8	4,77	66,2
8	2,92 ( $\alpha$ ) 3,08 ( $\beta$ )	48,0	2,92 ( $\alpha$ ) 3,10 ( $\beta$ )	48,2
9	-	203,0	-	204,5 ou 207,0
10	-	161,8	-	162,5 ou 162,0
11	6,94	116,2		119,2 ou 117,0
12	8,06	133,1		133,6
3a	-	113,7	-	114,8 ou 117,8
3b	-	141,4	-	138,4 ou 141,1
6a	-	64,8	-	69,8
6b	3,07	51,6		52,5
9a	-	113,7	-	117,8 ou 114,8
9b	-	141,4	-	141,1 ou 138,4
12a	-	125,5	-	125,8 ou 124,5
12b	-	125,5	-	124,5 ou 125,8
3-OH	12,34	-	12,34	-
10-OH	12,73	-	12,71	-

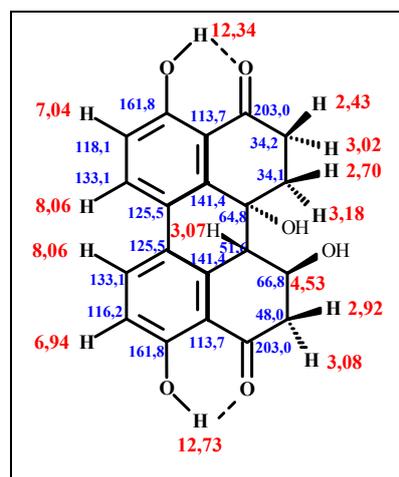


FIGURA 4.21- Alvertoxina com os respectivos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono.

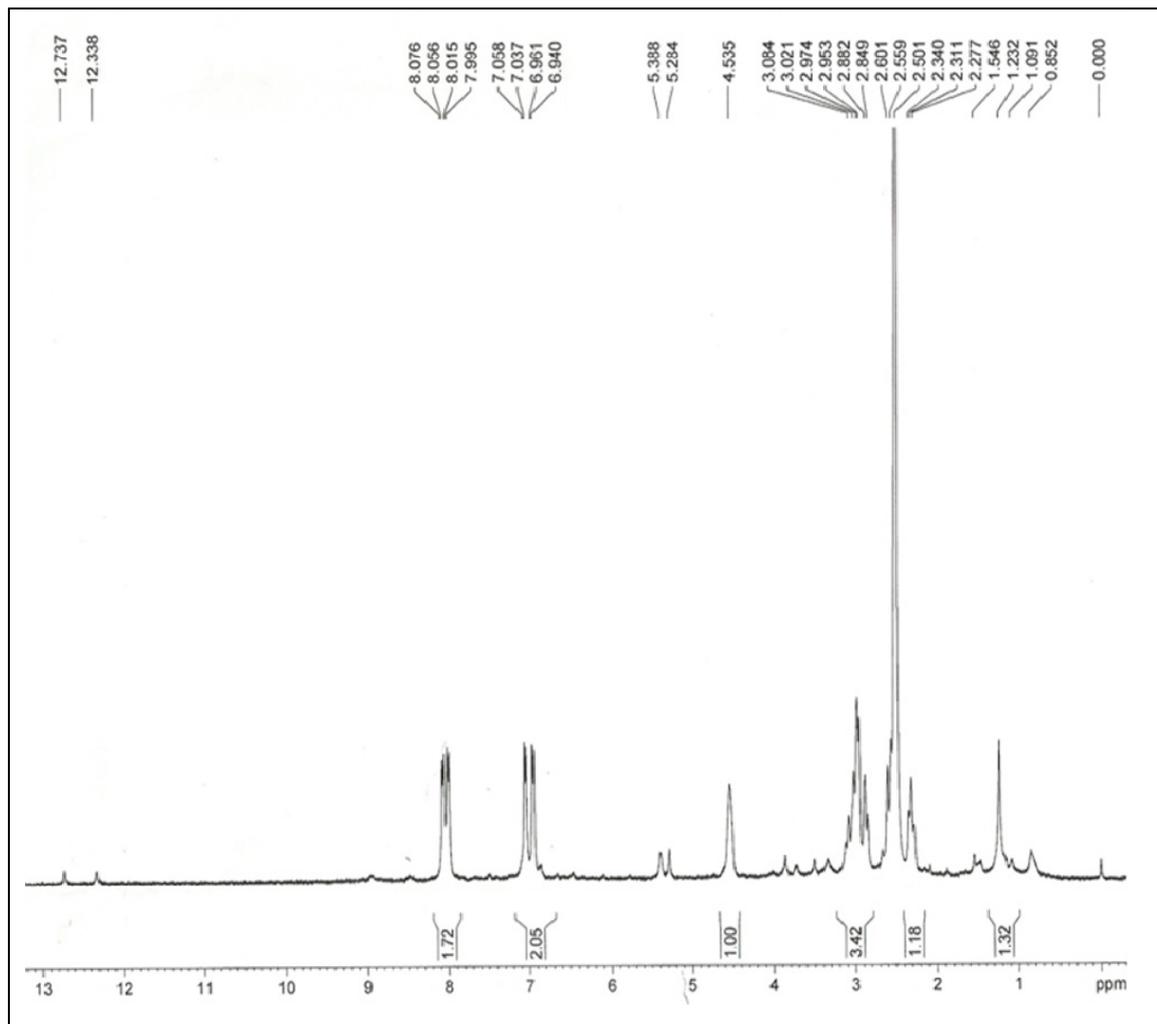


FIGURA 4.22- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alvertoxina (DMSO, 400 MHz).

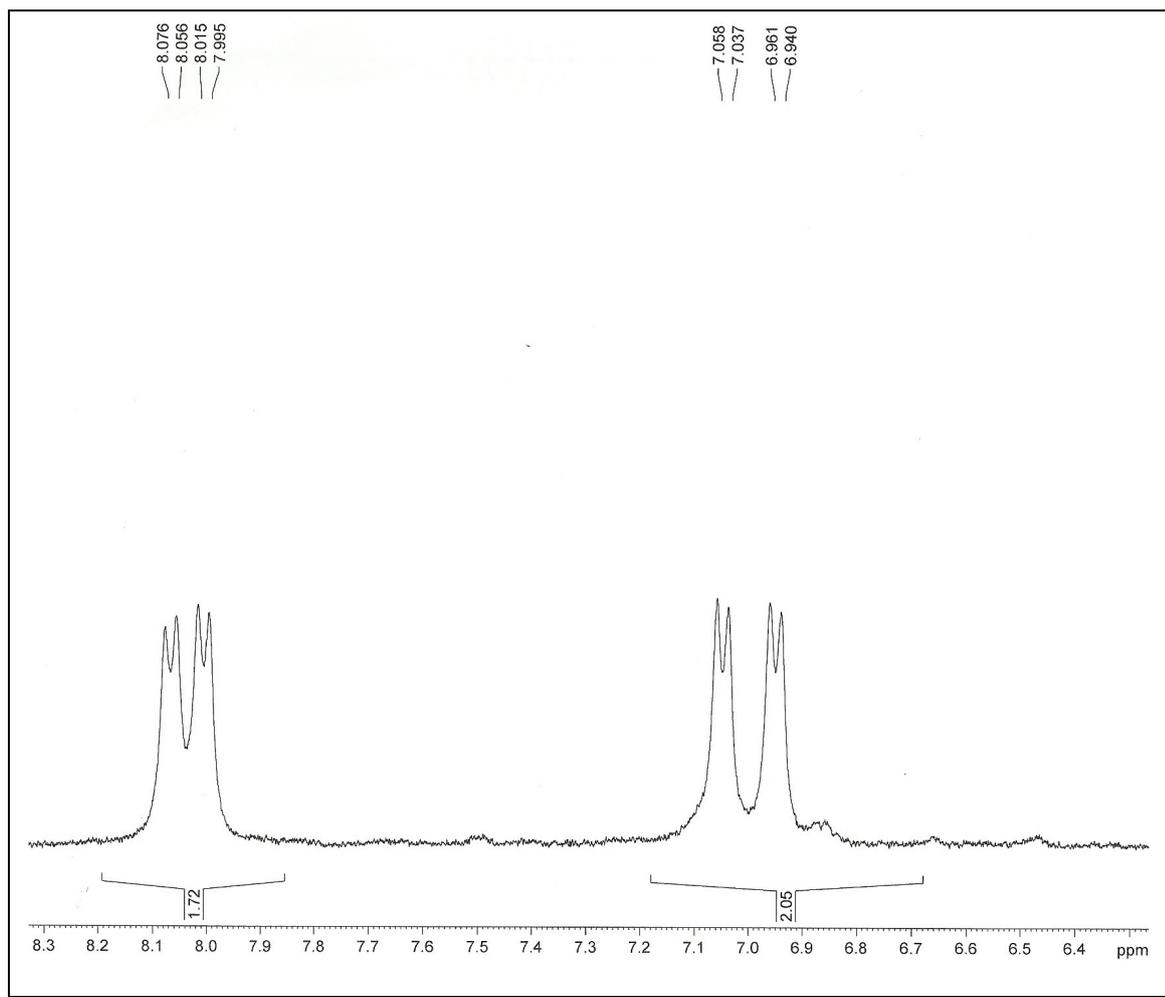


FIGURA 4.23- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de altermoxina (DMSO, 400 MHz).

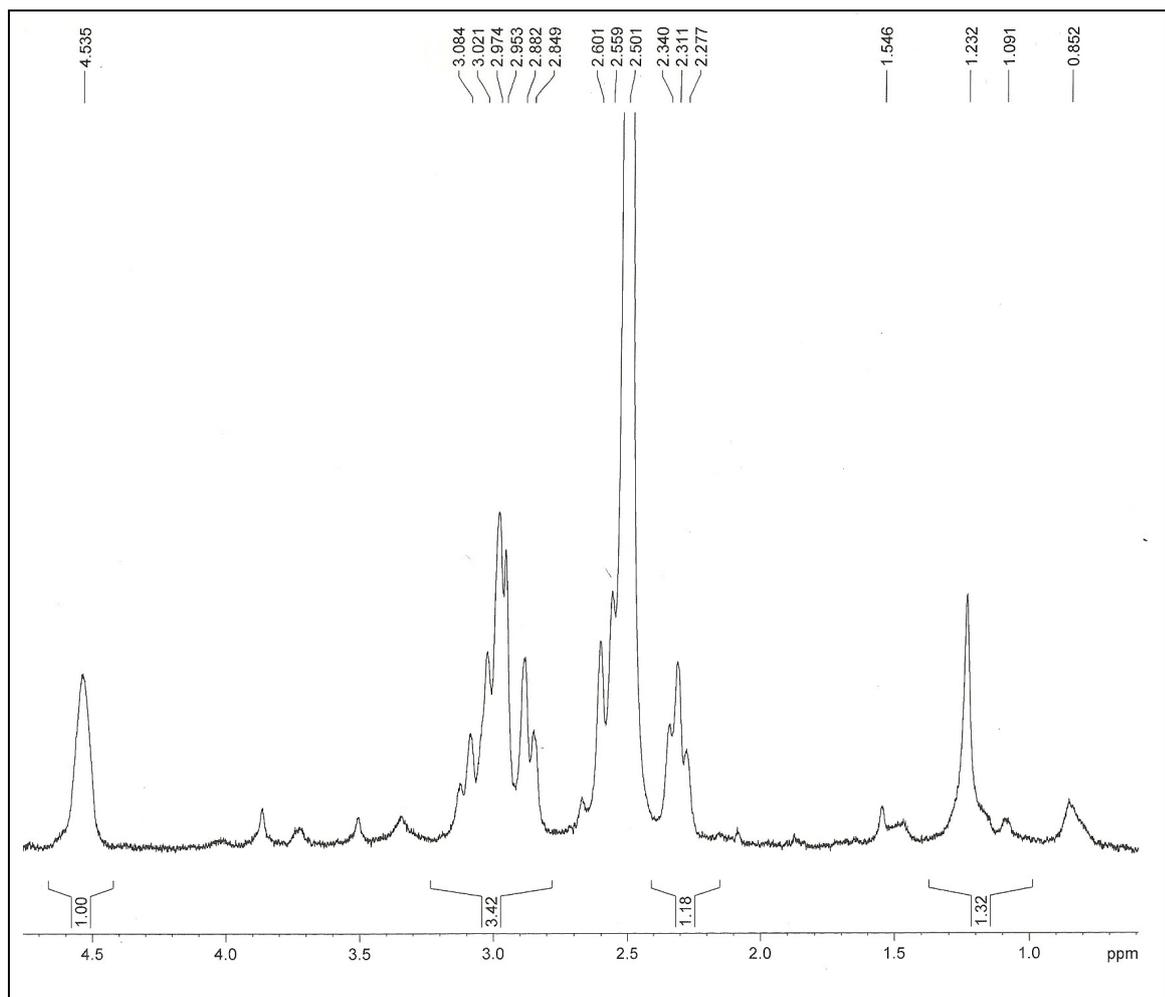


FIGURA 4.24- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de altermoxina (DMSO, 400 MHz).

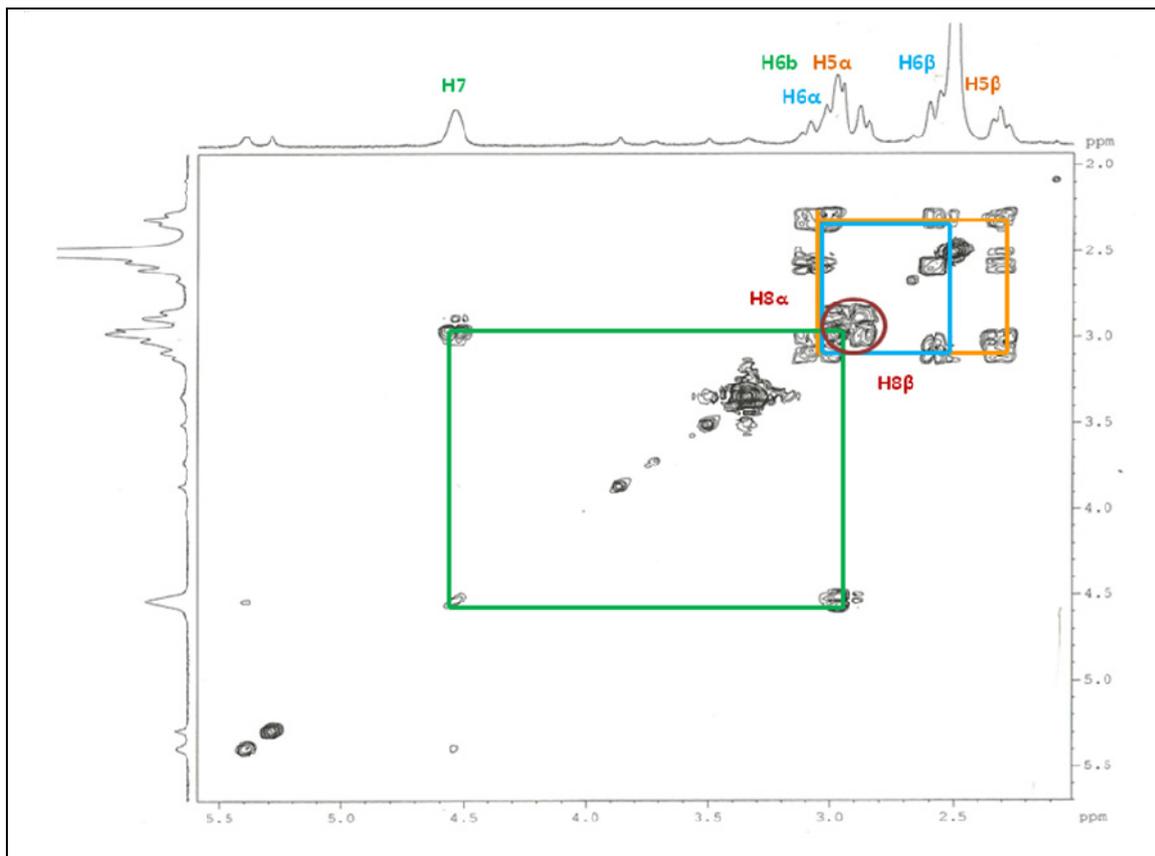


FIGURA 4.25- Espectro de g-COSY de alvertoxina (DMSO, 400 MHz).

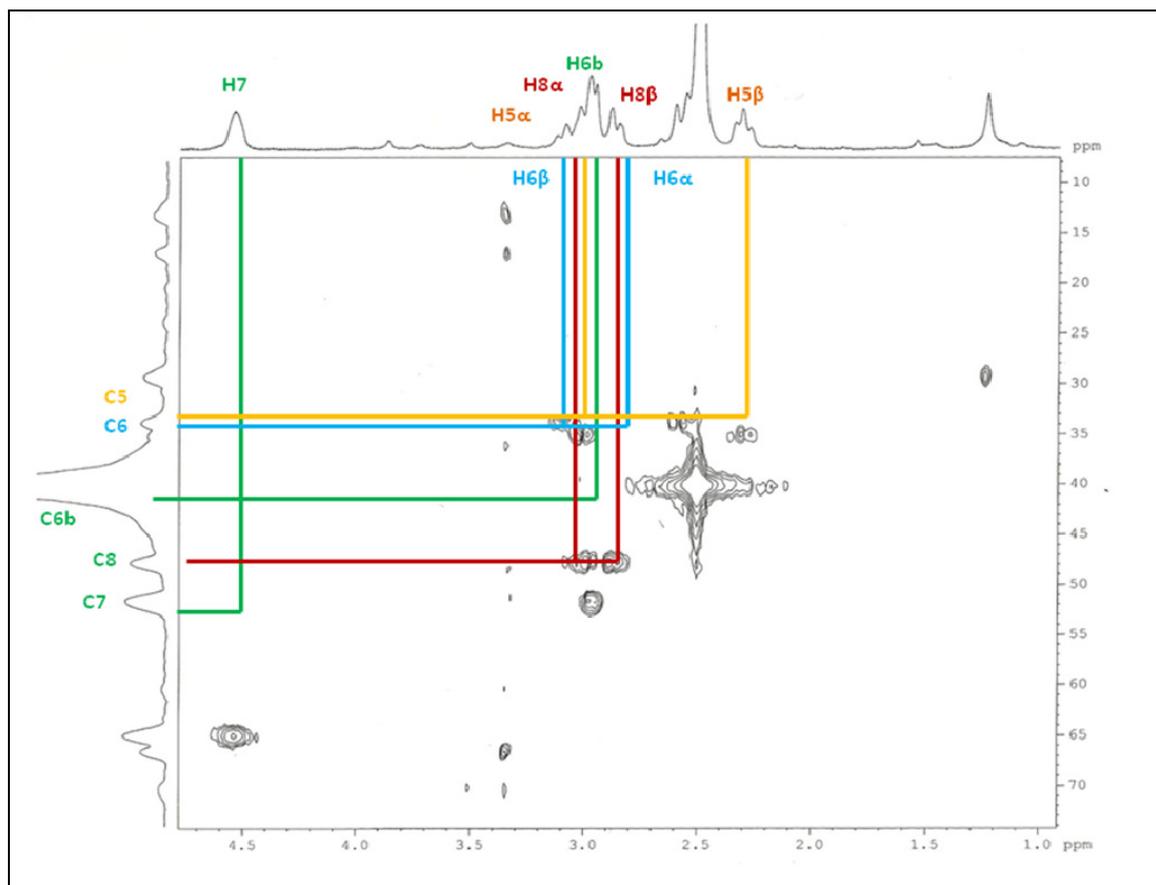


FIGURA 4.26- Mapa de contorno g-HSQC de altertoxina (DMSO, 400 MHz).

#### 4.3.4. Substância 04 – Altenueno

A substância 04, denominado altenueno, foi isolada do subextrato metanol do meio sólido em arroz. A sua estrutura foi identificada através dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC e HMBC (FIGURAS 4.28 a 4.43).

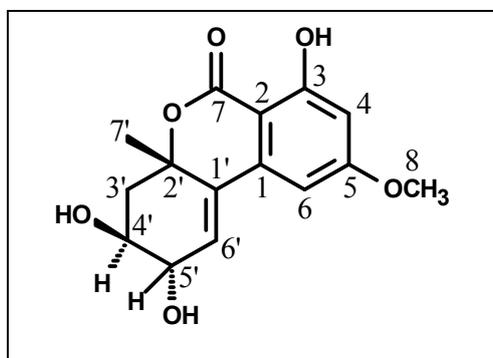


FIGURA 4.27- Substância 04.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra dois duplos dubletos em  $\delta$  2,27 ( $J = 14,0$  e  $4,0$  Hz) e  $\delta$  1,95 ( $J = 14,0$  e  $8,0$  Hz) diastereotópicos, pois se correlacionam com o mesmo carbono em  $\delta_{\text{C}}$  39,0 no HSQC, atribuídos aos hidrogênios H-3' $\alpha$  e H-3' $\beta$ , prótons equatorial e axialmente situados, respectivamente. Através do espectro de COSY é possível observar o acoplamento entre si destes dois hidrogênios com  $J = 14,0$  e destes com um hidrogênio em  $\delta$  3,71 ( $m$ ), atribuído ao H-4' e este, por sua vez, acopla com H-5' em  $\delta$  4,09 ( $d$ ,  $J = 4,0$  Hz). O sinal em  $\delta$  6,47 ( $J = 4,0$  Hz) é atribuído a H-6', devido a uma correlação observada através do espectro de COSY deste com H-5'. A presença de uma metila em C-2' é observada devido a correlações no HMBC entre os hidrogênios metílicos e C-2', C-3' e C-6'. São atribuídas hidroxilas em H-4' e H-5', devido aos deslocamentos dos seus respectivos carbonos  $\delta$  69,0 e  $\delta$  70,0, característicos de carbonos carbinólico e também por estes se tratarem de centros quirais. Outras correlações observadas no HMBC que corroboram com esta proposta são: H-4' com C-5' e C-6'; H-3' com C-7', C-4', C-2' e H-6' com C-5', C-2', C-1'.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  também apresenta dois dubletos em  $\delta$  6,71 ( $J = 3,4$  Hz) e  $\delta$  6,47 ( $J = 3,4$  Hz), atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-4, respectivamente e foi possível observar o acoplamento entre eles através do espectro de COSY. É também observado um singlete em  $\delta$  3,83 (3H), característico de metoxila ligada a anel aromático e a correlação observada no HMBC entre os hidrogênios H-6 e H-4 com um carbono em  $\delta$  166,0 confirma a presença desta metoxila neste anel.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  é observado um sinal em  $\delta$  11,30, característico de hidroxila quelatogênica e a correlação de H-4 com um carbono em  $\delta$  166,0 posicionou esta hidroxila em C-3 e uma carboxila ligada ao C-2.

Outras correlações podem ser observadas no HMBC que corroboram com esta proposta são: H-4 com C-2 e C-6 e H-6 com C-1, C-3 e C-4. O conjunto de

dados acima e a comparação com os dados da literatura permitiram a identificação desta substância como sendo o Altenueno, isolado anteriormente de *A. alternata*, também cultivado no meio de arroz (BRADBURN, *et. al.*, 1994)

TABELA 4.4- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **04** e comparação com dados da literatura

	Substância 04 (DMSO-400 MHz,)		BRADRURN, <i>et al.</i> , 1994 (270,06 MHz para $^1\text{H}$ e 67,80 MHz para $^{13}\text{C}$ , CDCl <sub>3</sub> -DMSO)	
Posição H e C	Valores Obtidos	Valores Obtidos	Valores Literatura	Valores Literatura
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	132,0	-	133,9
2	-	101,8	-	100,9
3	-	166,2	-	166,0
4	6,47	101,2	6,41	100,9
5	-		-	163,9
6	6,71	102,8	6,53	102,6
7	-		-	168,6
8	3,83	58,5	3,86	55,7
1'	-		-	138,6
2'	-	82,8	-	81,1
3'	$\alpha$ 2,27 $\beta$ 1,95	39,2	$\alpha$ 2,54 $\beta$ 1,84	39,8
4'	3,68	69,0	3,77	66,9
5'	4,09	70,0	4,11	67,3
6'	6,47	132,3	6,41	128,2
7'	1,46	27,8	1,49	27,8

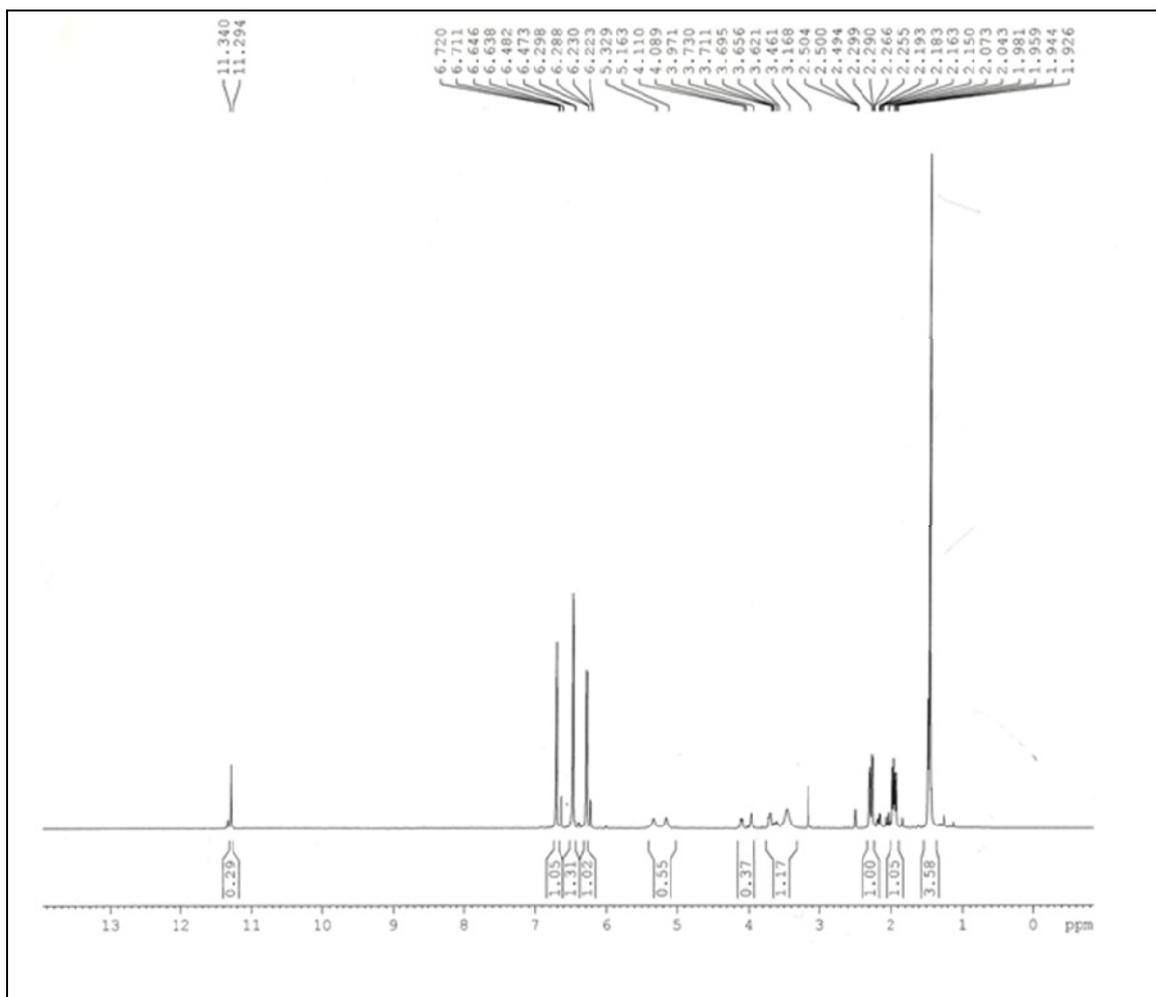


FIGURA 4.28- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de altenueno (DMSO, 400 MHz).

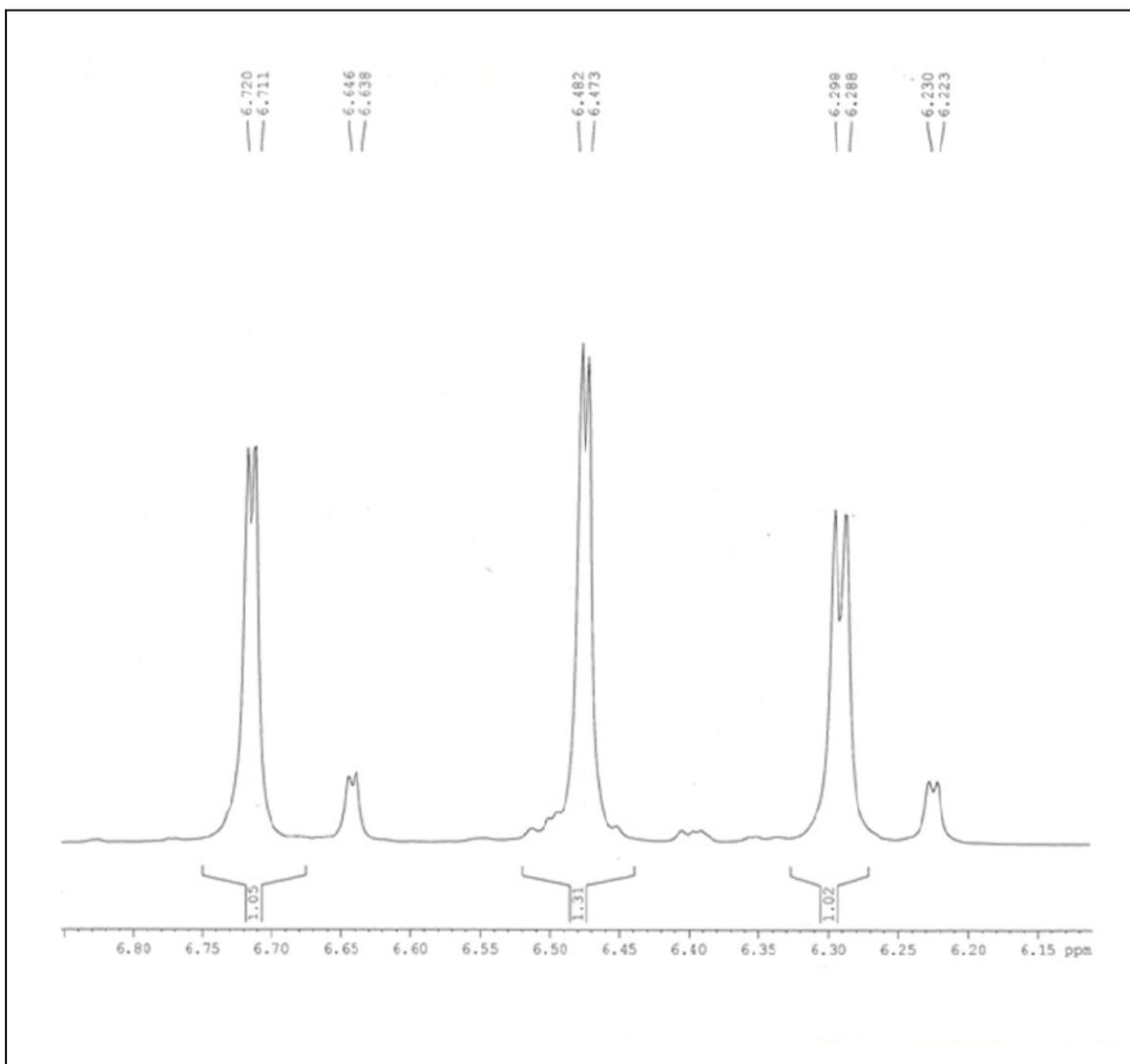


FIGURA 4.29- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de altenueno (DMSO, 400 MHz).

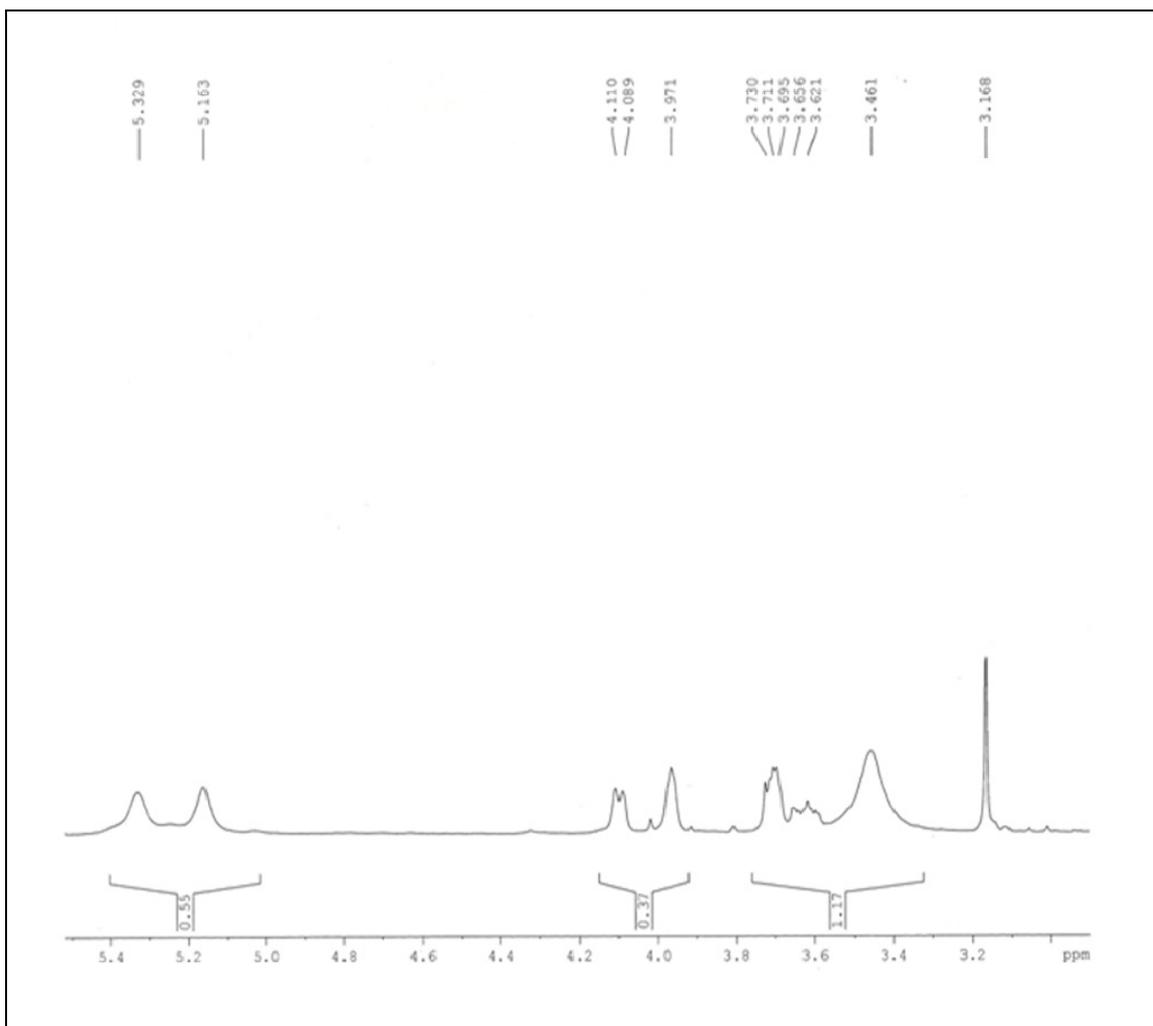


FIGURA 4.30- Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de altenueno (DMSO, 400 MHz).

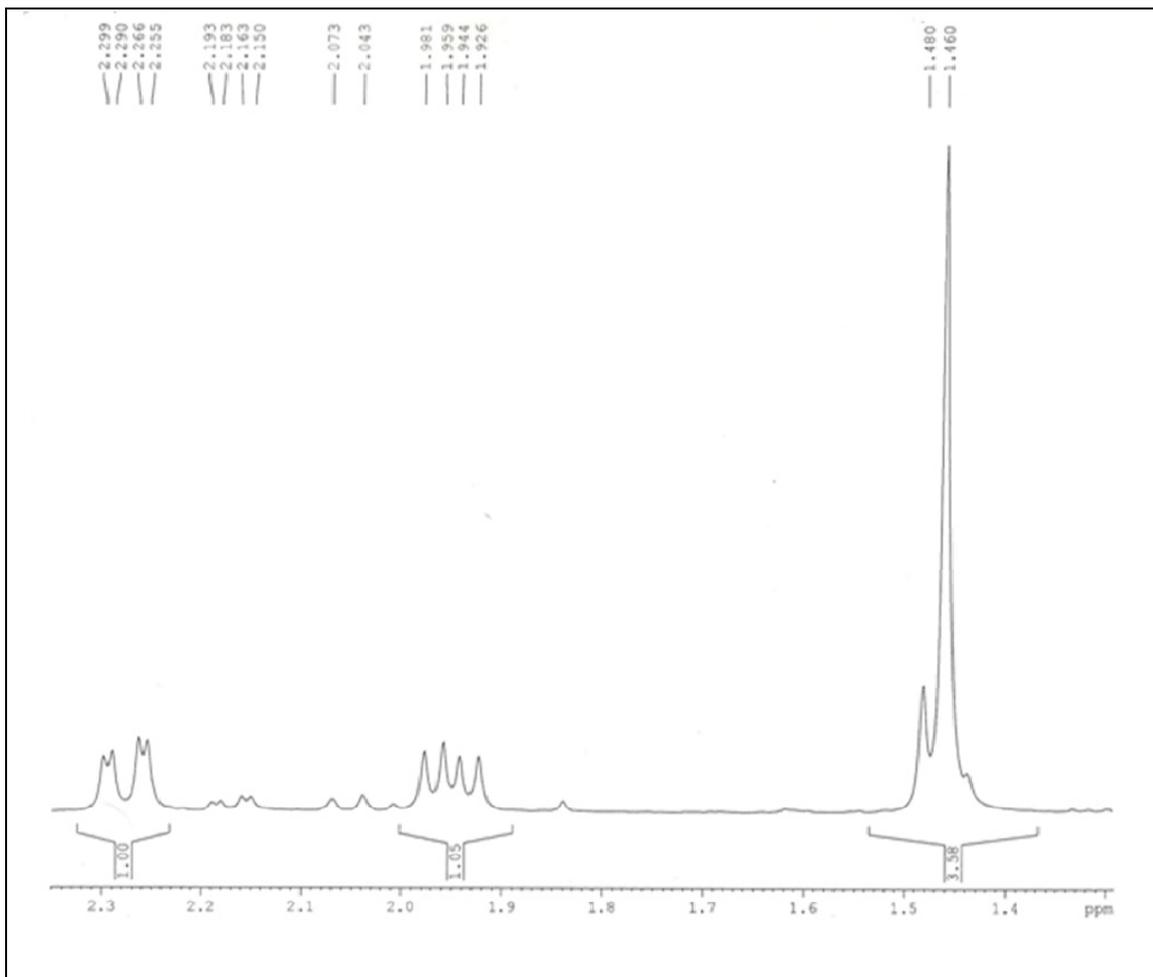


FIGURA 4.31- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de alutenueno (DMSO, 400 MHz).

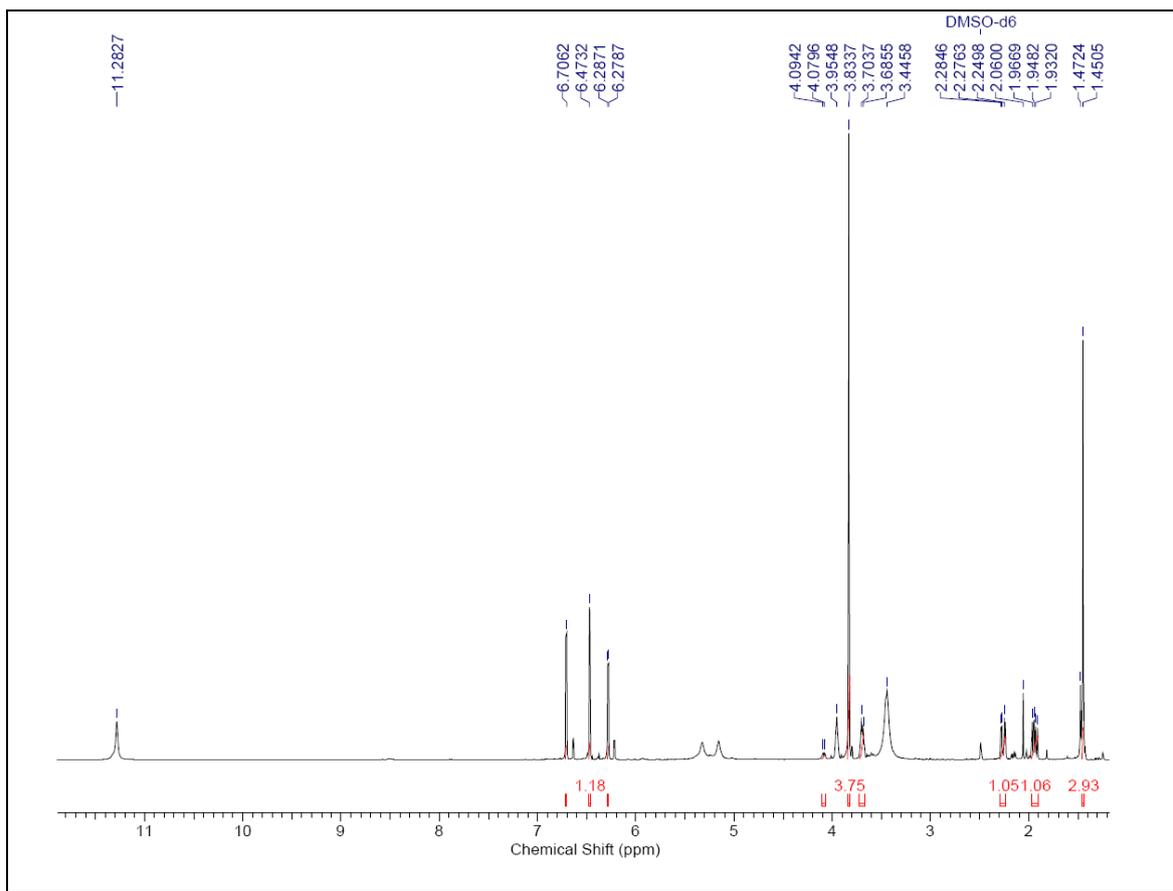


FIGURA 4.32- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de altenueno sem supressão para visualizar a presença da metila (DMSO, 400 MHz).

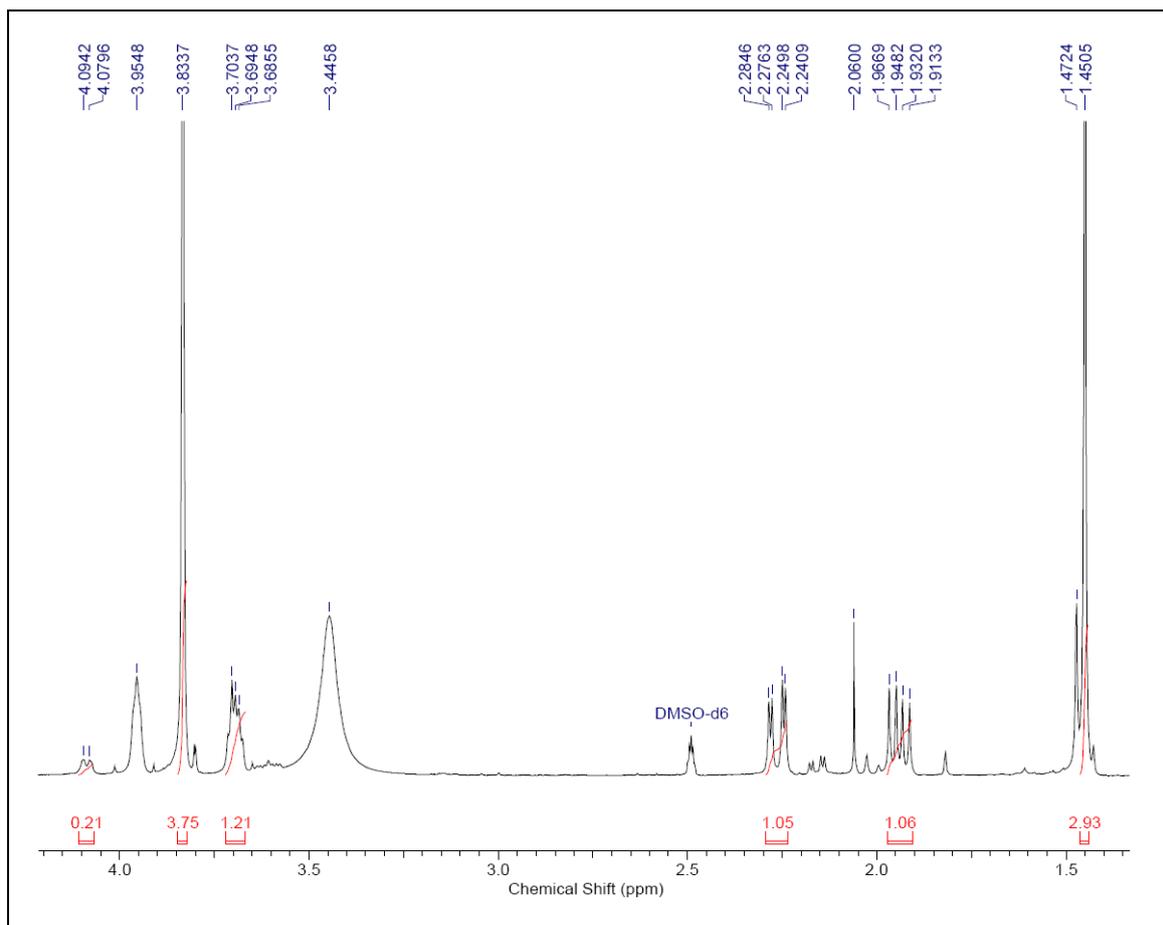


FIGURA 4.33- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de altenueno sem supressão para visualizar a presença da metila (DMSO, 400 MHz).

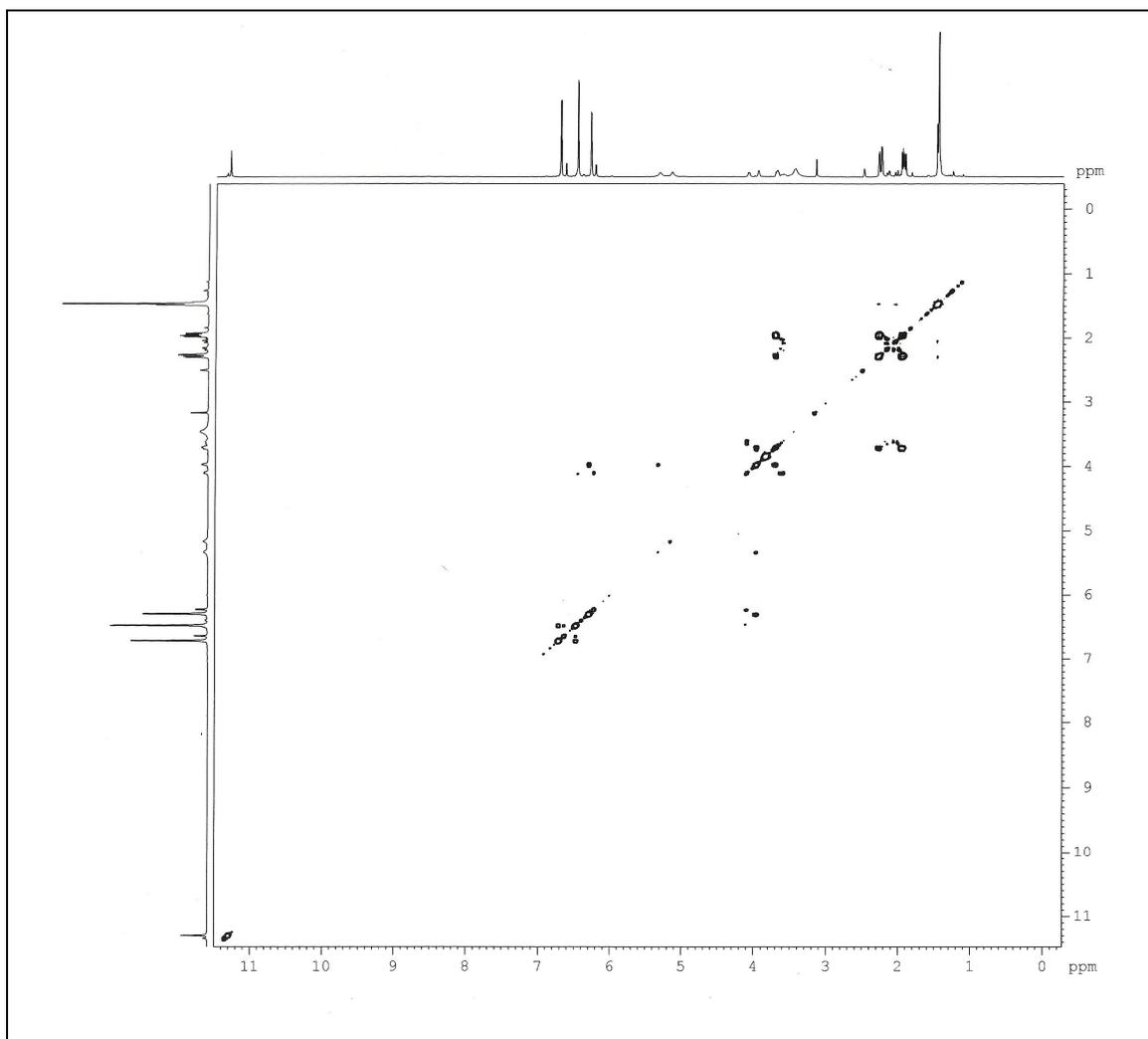


FIGURA 4.34- Espectro de g-COSY de albuterol (DMSO, 400 MHz).

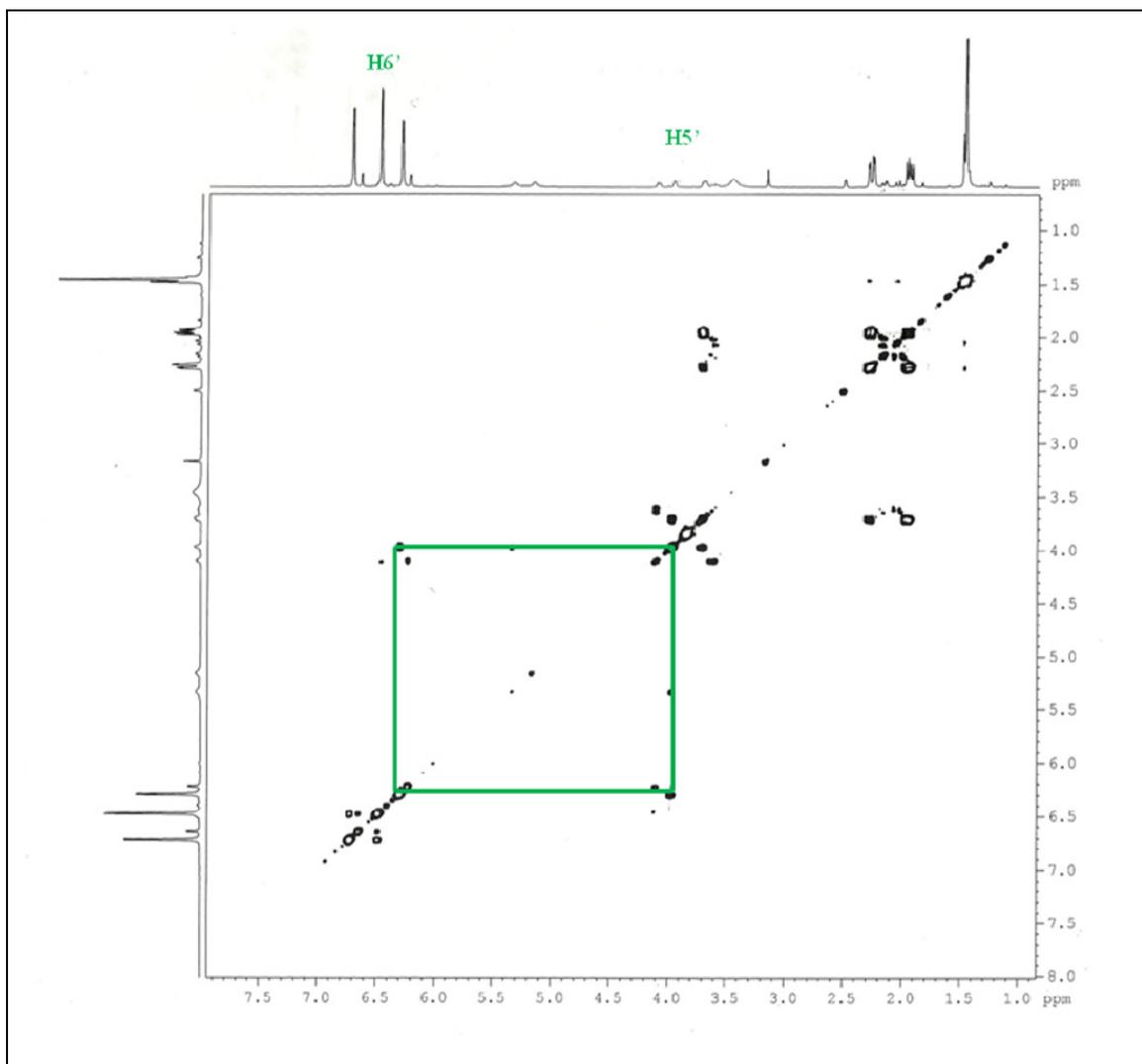


FIGURA 4.35- Ampliação do Espectro de g-COSY de alutenueno (DMSO, 400 MHz).

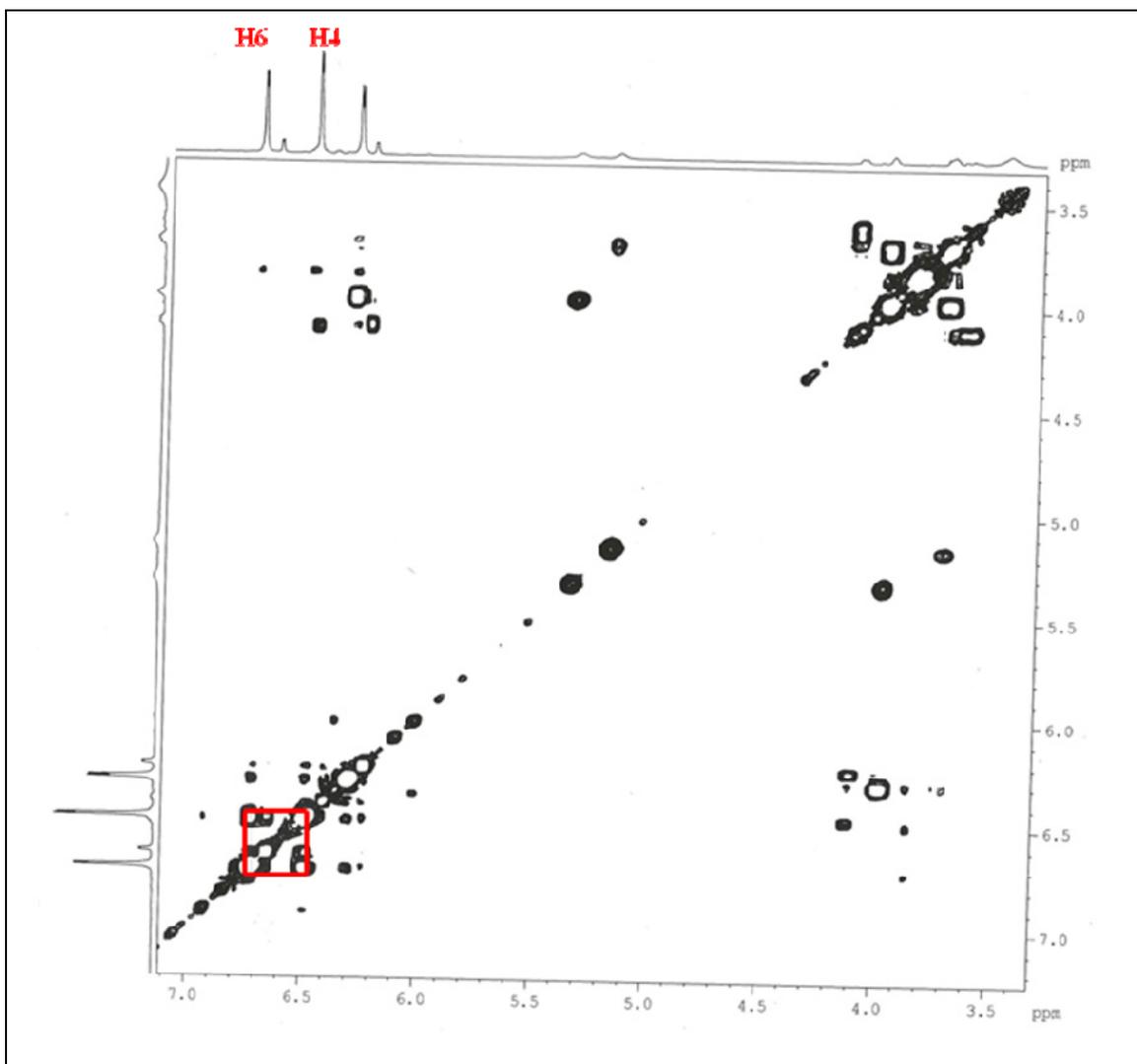


FIGURA 4.36- Ampliação do Espectro de g-COSY de alprenone (DMSO, 400 MHz).

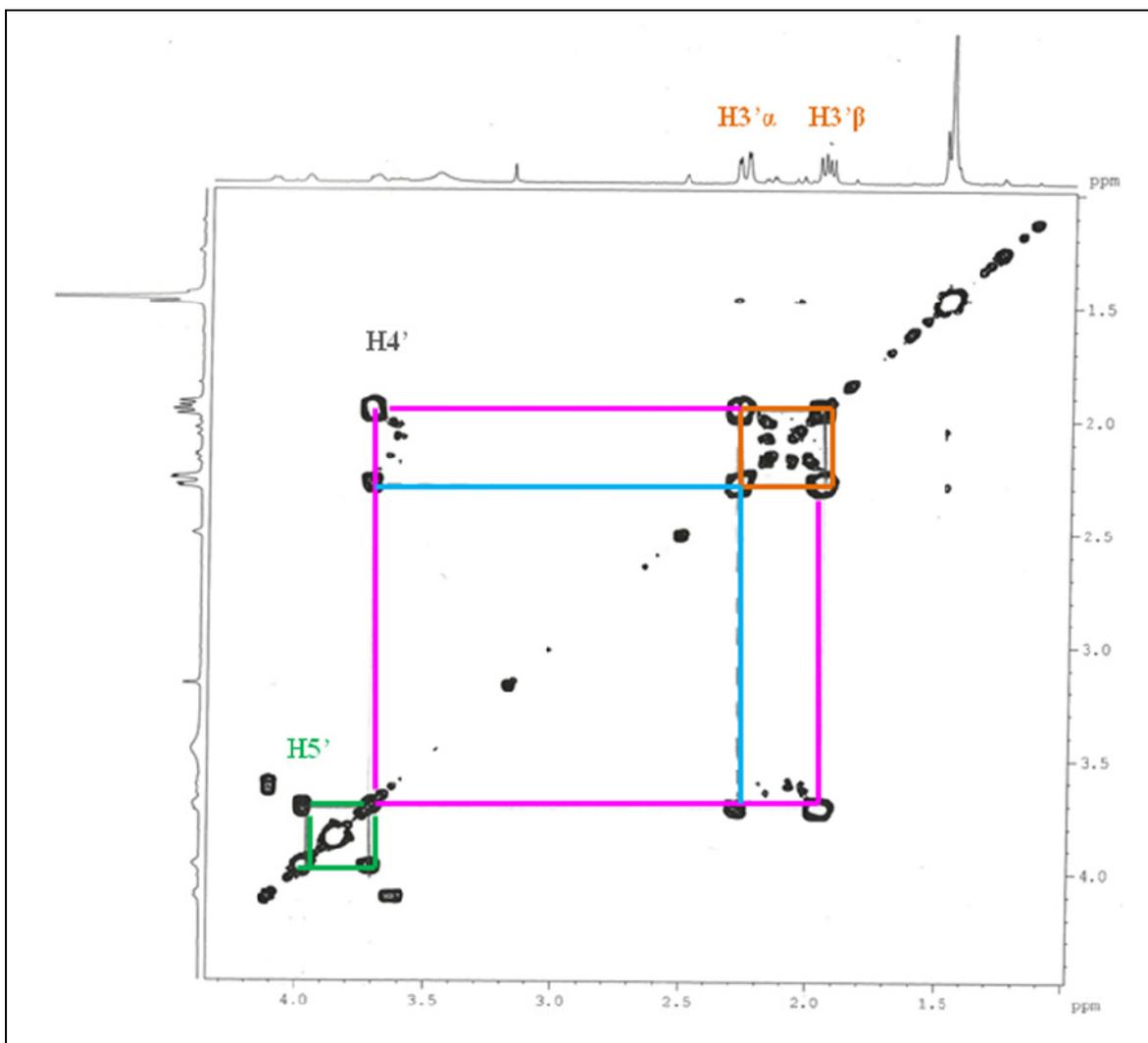


FIGURA 4.37- Ampliação do Espectro de g-COSY de altenueno (DMSO, 400 MHz).

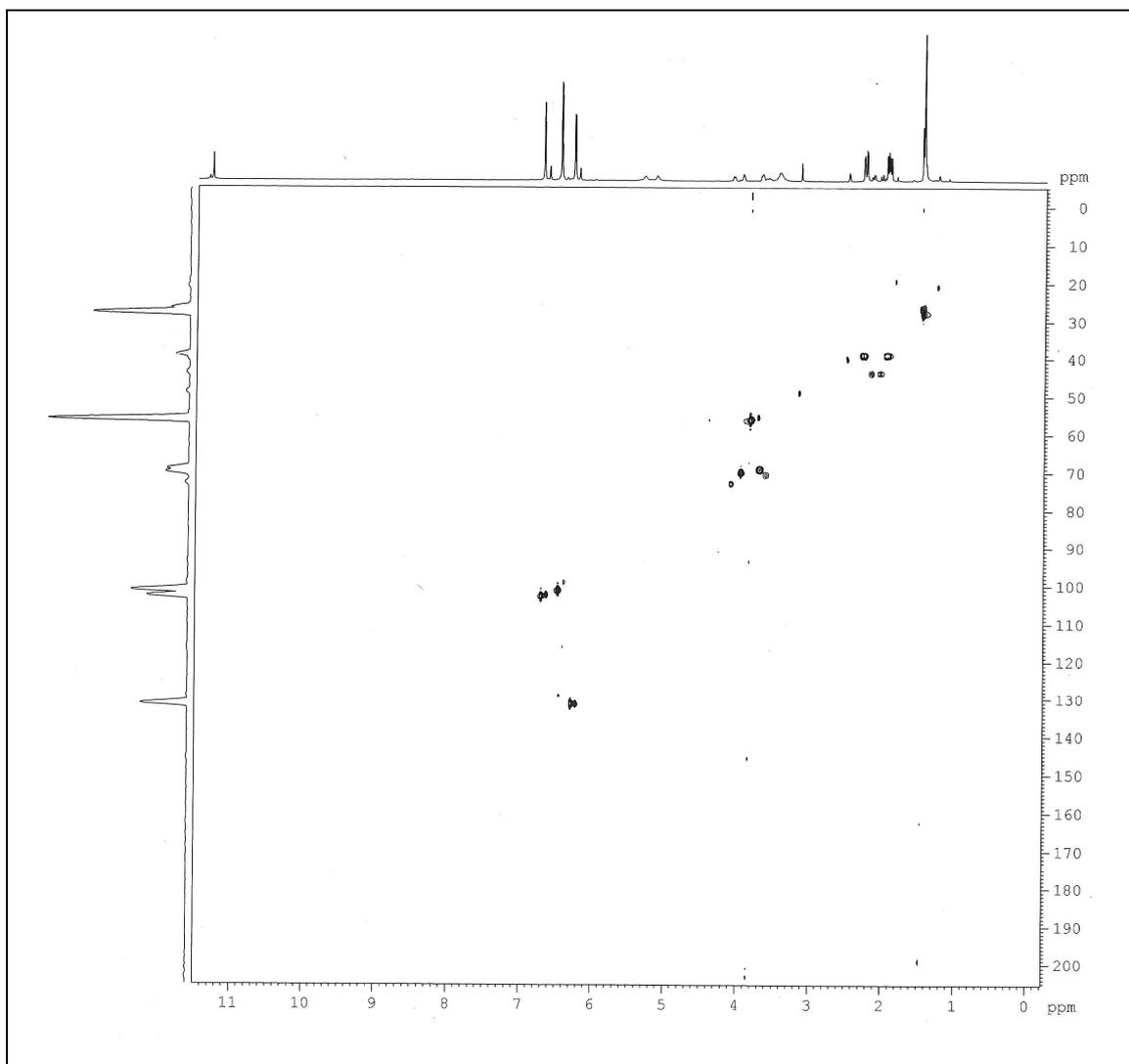


FIGURA 4.38- Espectro de g-HSQC de alprenolol (DMSO, 400 MHz).

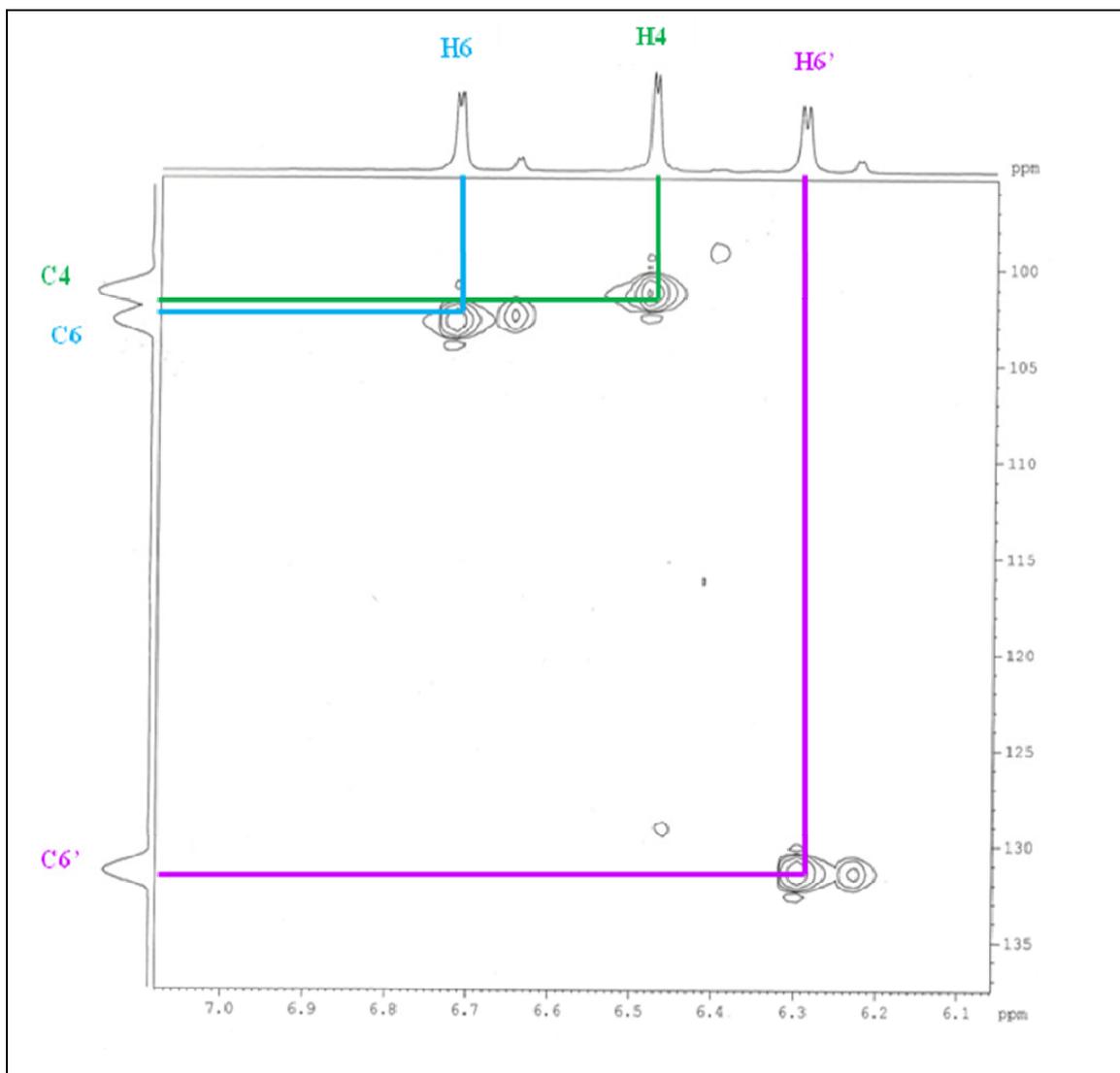


FIGURA 4. 39- Ampliação do Espectro de g-HSQC de alenueno (DMSO, 400 MHz).

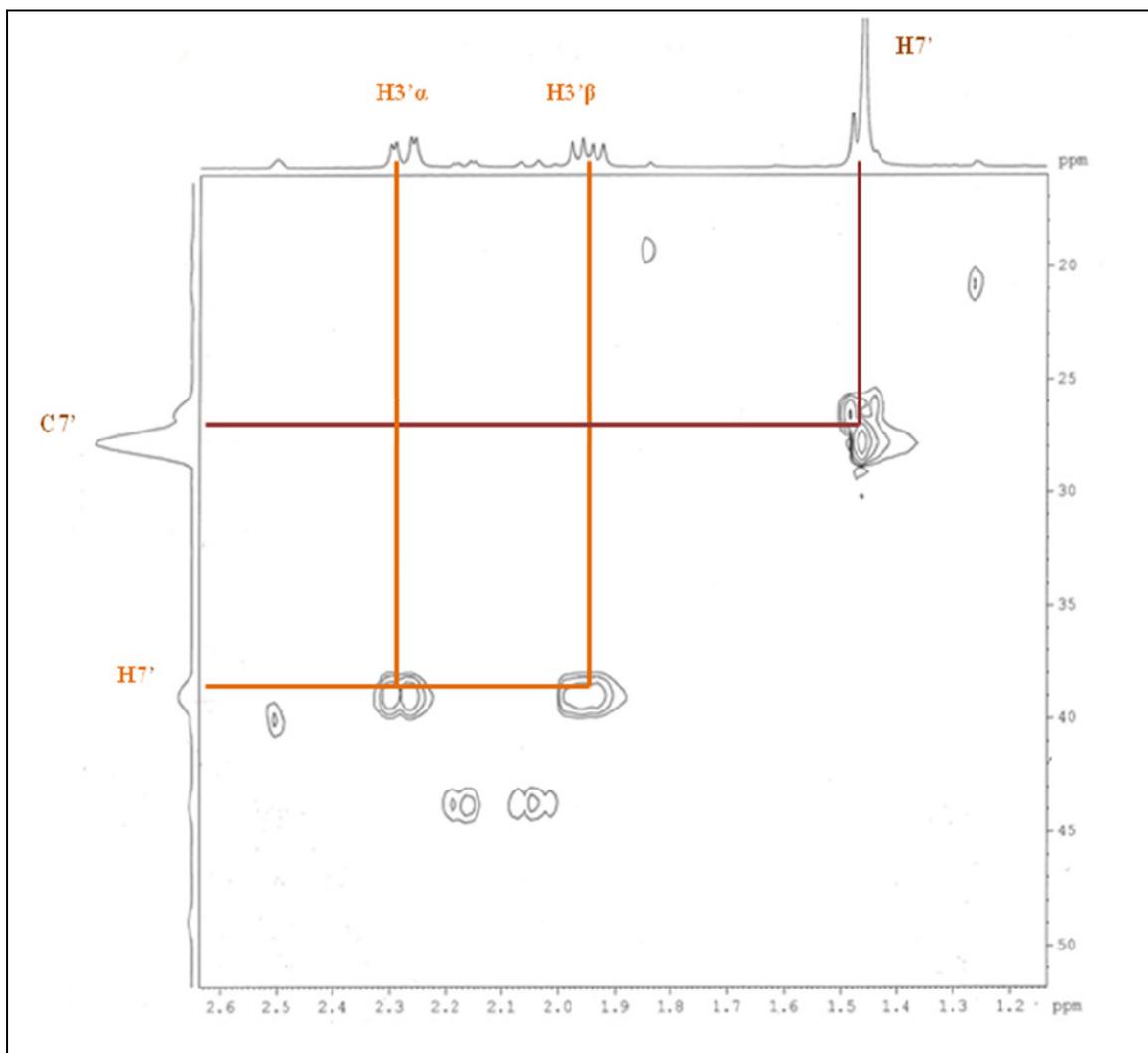


FIGURA 4.40- Ampliação do Espectro de g- HSQC de altenueno (DMSO, 400 MHz).

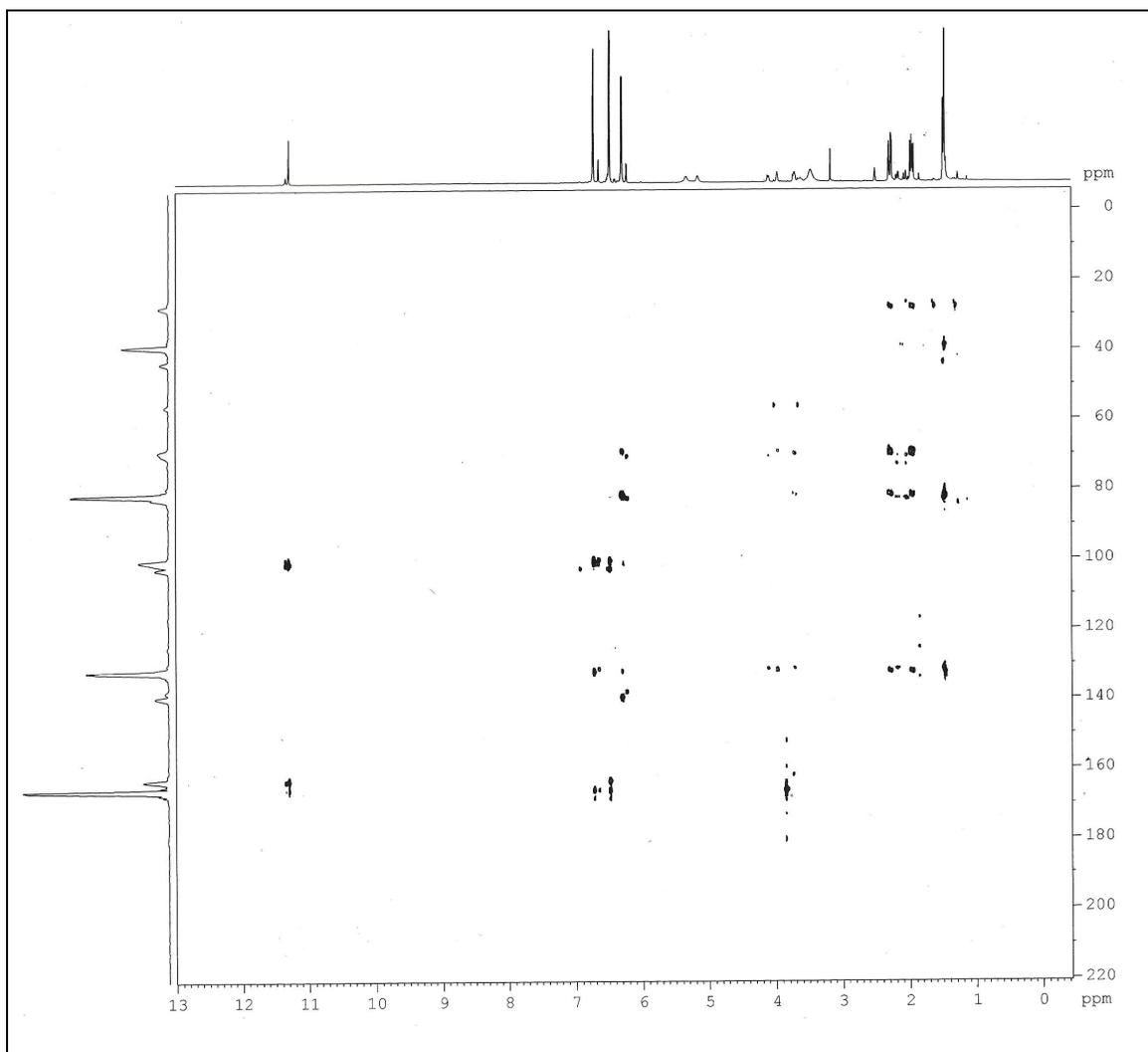


FIGURA 4.41- Espectro de g-HMBC de altenueno (DMSO, 400 MHz).

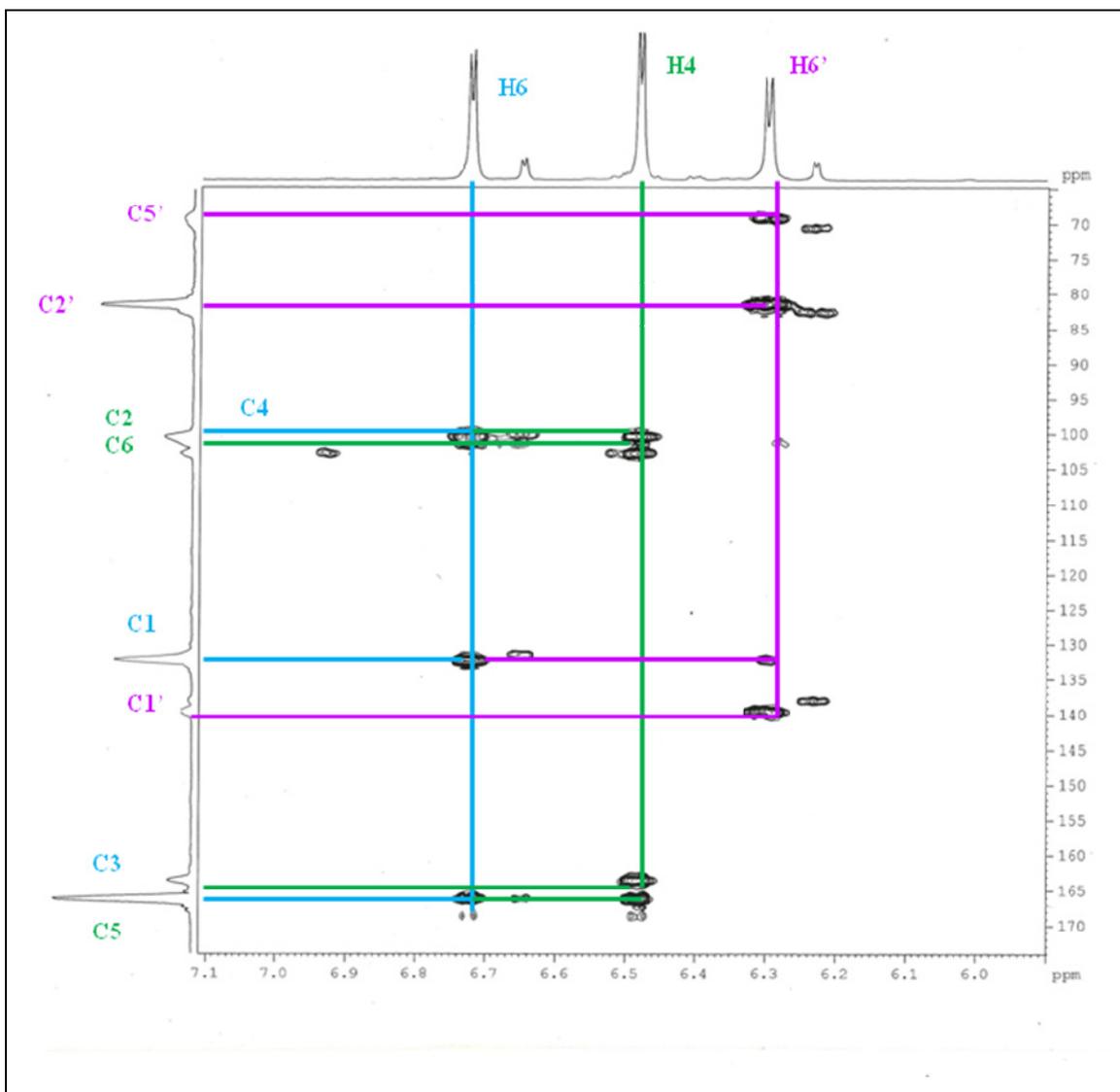


FIGURA 4.42- Ampliação do Espectro de g-HMBC de alenueno (DMSO, 400 MHz).

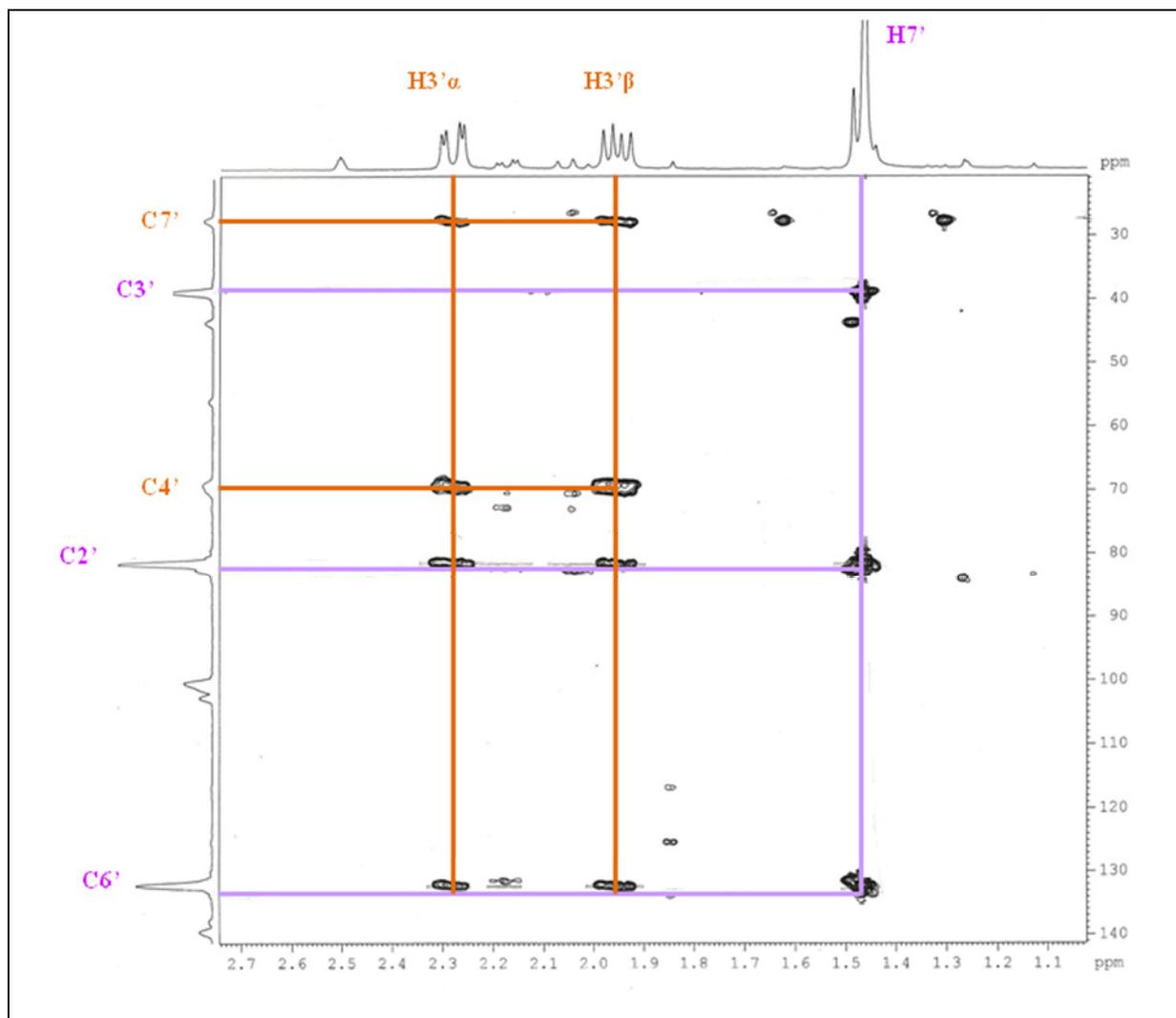


FIGURA 4.43- Ampliação do Espectro de g-HMBC de altenueno (DMSO, 400 MHz).

#### 4.3.5. Substância 05 - Altenucina

A substância **05** foi isolada do extrato metanol do meio de cultura arroz.

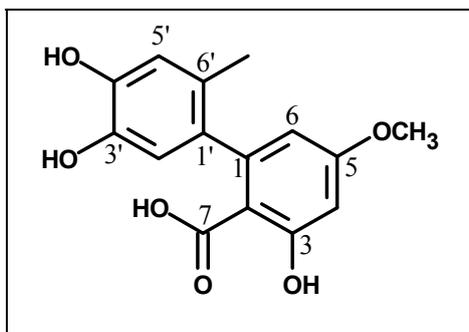


FIGURA 4.44- Substância 05.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrada dois singletos em  $\delta$  6,57 e 6,49, os quais correspondem respectivamente aos H-5' e H-2', bem como dois, dubletos, em  $\delta$  6,39 e 6,13 (ambos  $J= 2,4$  HZ), correspondentes aos H-4 e H-6, respectivamente. Foi observado também, um sinal de metila ligada ao carbono aromático com um deslocamento químico de 1,91 ppm. Através do RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível observar um sinal em 174,3 indicando a presença de um grupo carboxila localizado no C-2. A estrutura foi estabelecida com base nos dados de HMBC, o qual mostra as correlações de um acoplamento meta entre H-4 e C-2, C-3, C5 e C-6, bem como H-6 com C-2 e C-4, concluindo assim a estrutura de um anel aromático. Para o grupo metoxila não foi possível obter a correlação, no entanto sabe-se que o mesmo encontra-se ligado ao C-5. Além disso, foi possível observar as correlações da metila, a qual está ligada ao anel aromático, com C-1', C-5' e C-6', H-5' se correlacionando com C-1', C-3', C-4' e 6'-  $\text{CH}_3$ . Foi também observado a correlação de H-2' com C-3', C-4' e C-6', finalizando assim o segundo anel aromático. A correlação de H-6 com C-1' e do H-2' com C-1, estabeleceu a correlação de C1-C1' ligando assim os dois anéis. Os dados obtidos foram comparados com a literatura (NAKANISHI *et al.*, 1995), podendo portanto concluir que a substância **05** é denominada altenusina. As FIGURAS 4.45 a 4.48 ilustram os espectros de RMN para essa substância.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  encontram-se na TABELA 4.5 em comparação com aqueles da literatura para a altenusina.

TABELA 4.5- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **05** e comparação com dados da literatura

	Substância 05 ( MeOD - 400 MHz,)		NAKANISHI <i>et al.</i> , 1995 (500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ , DMSO)	
Posição H e C	Valores Obtidos	Valores Obtidos	Valores Literatura	Valores Literatura
	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$
1	-	148,0	-	148,3
2	-		-	106,5
3	-	164,4	-	163,0
4	6,39 (d, $J= 2,4$ )	100,4	6,25 (d, $J= 2,2$ Hz)	102,3
5	-	165,4		165,7
6	6,13 (d, $J= 2,4$ )		6,03 (d, $J= 2,2$ Hz)	112,1
7	-	174,2	-	-
1'	-	135,9	-	135,8
2'	6,49 (s)	116,7	6,46 (s)	116,6
3'	-	143,2	-	143,2
4'	-	144,7	-	144,7
5'	6,57 (s)	117,3	6,55 (s)	117,2
6'	-	127,4	-	127,3
CH <sub>3</sub>	1,91 (s)	19,4	1,90 (s)	19,3
OCH <sub>3</sub>	-	55,8	-	-

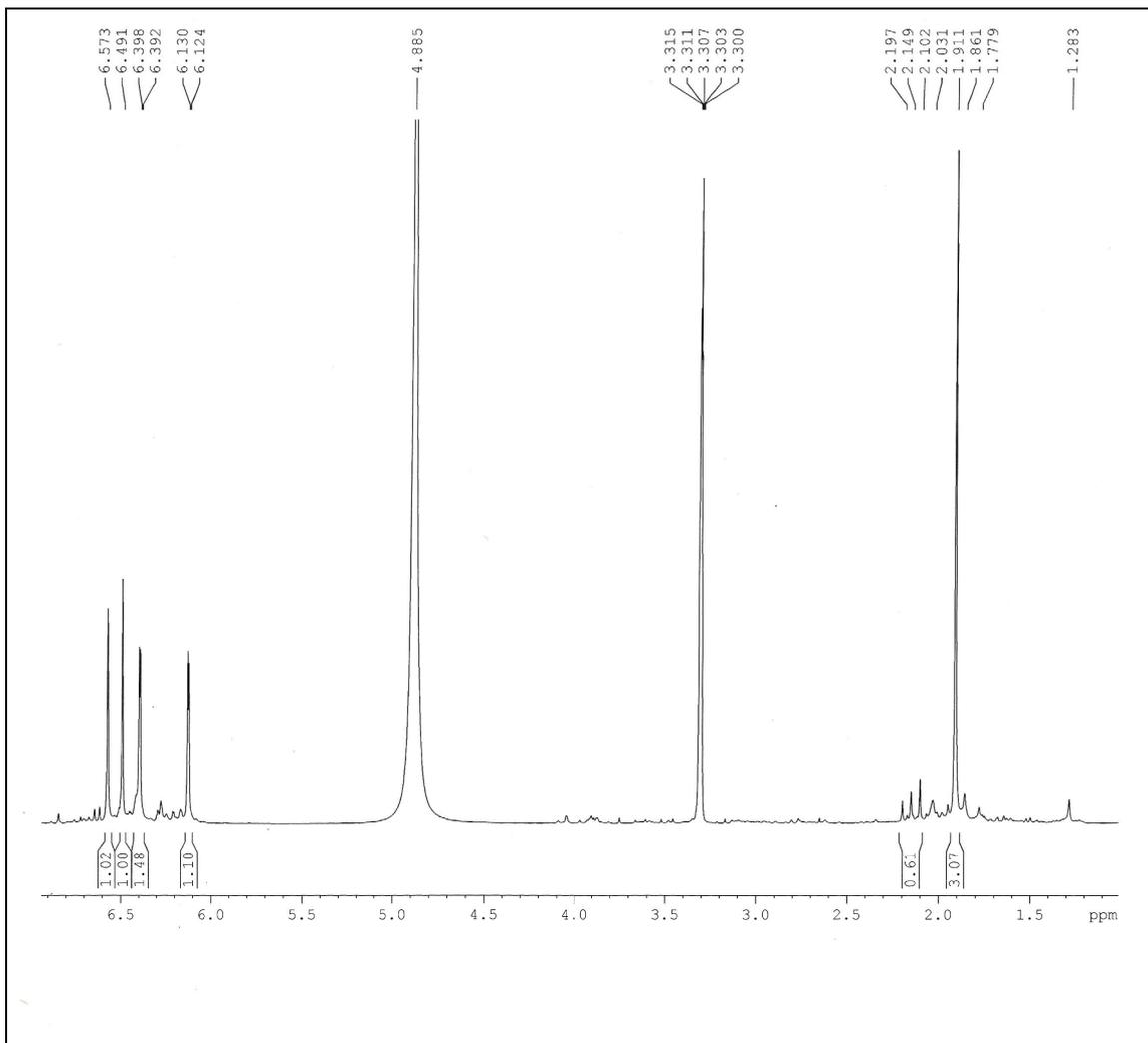


FIGURA 4.45- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de altenusina (MeOD, 400 MHz).

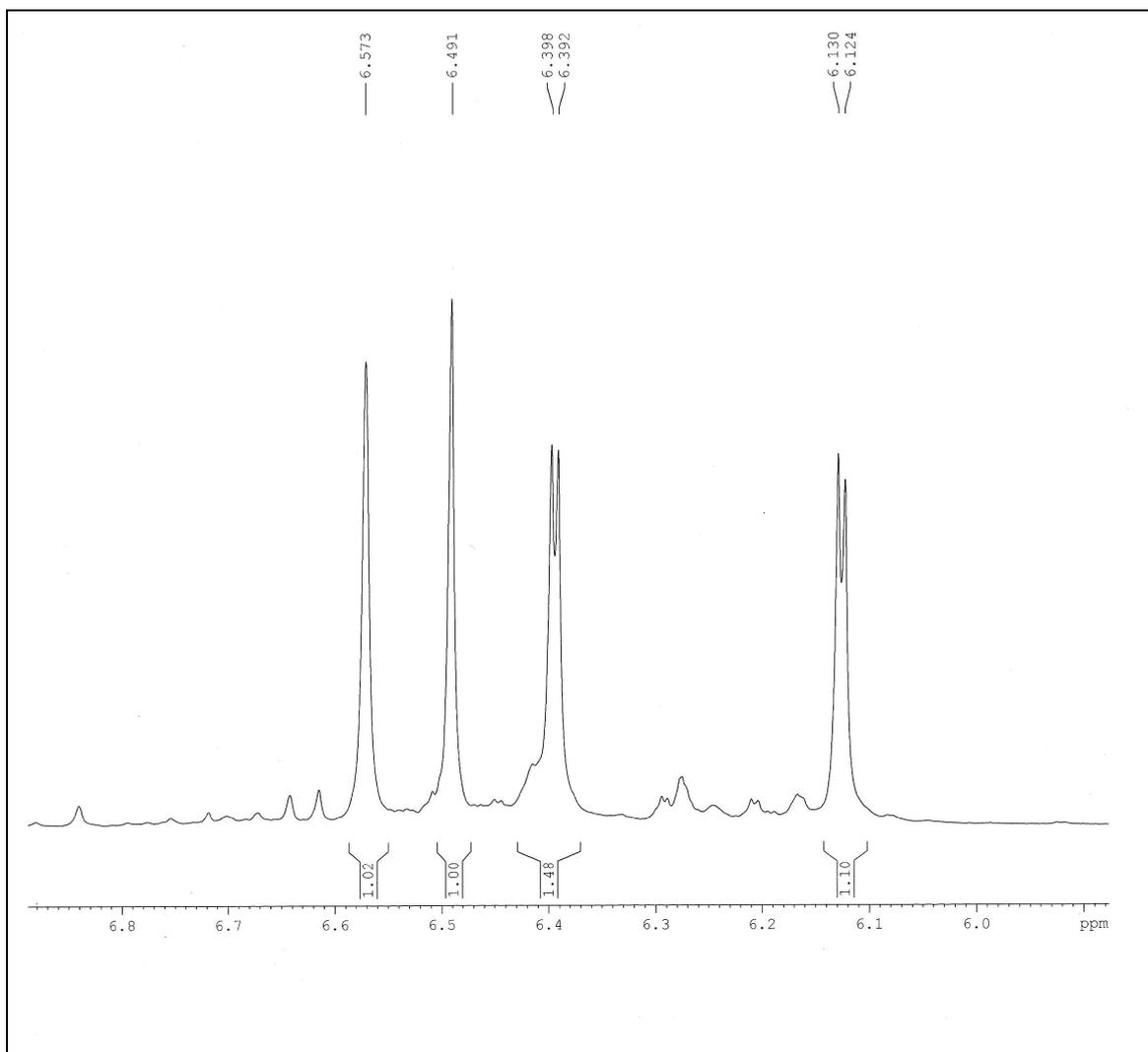


FIGURA 4.46- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de altenusina (MeOD, 400 MHz).

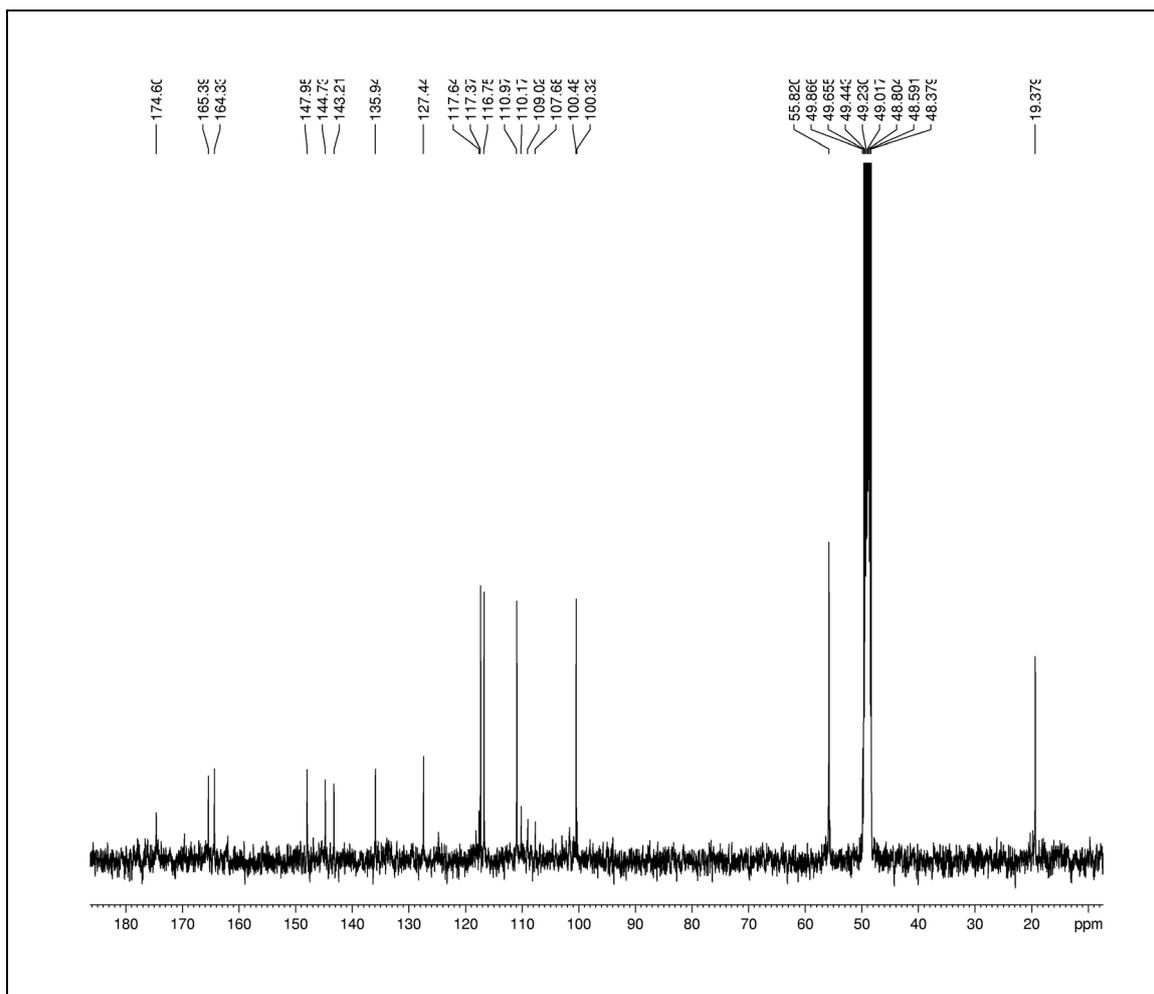


FIGURA 4.47- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de altenusina (MeOD, 400 MHz).

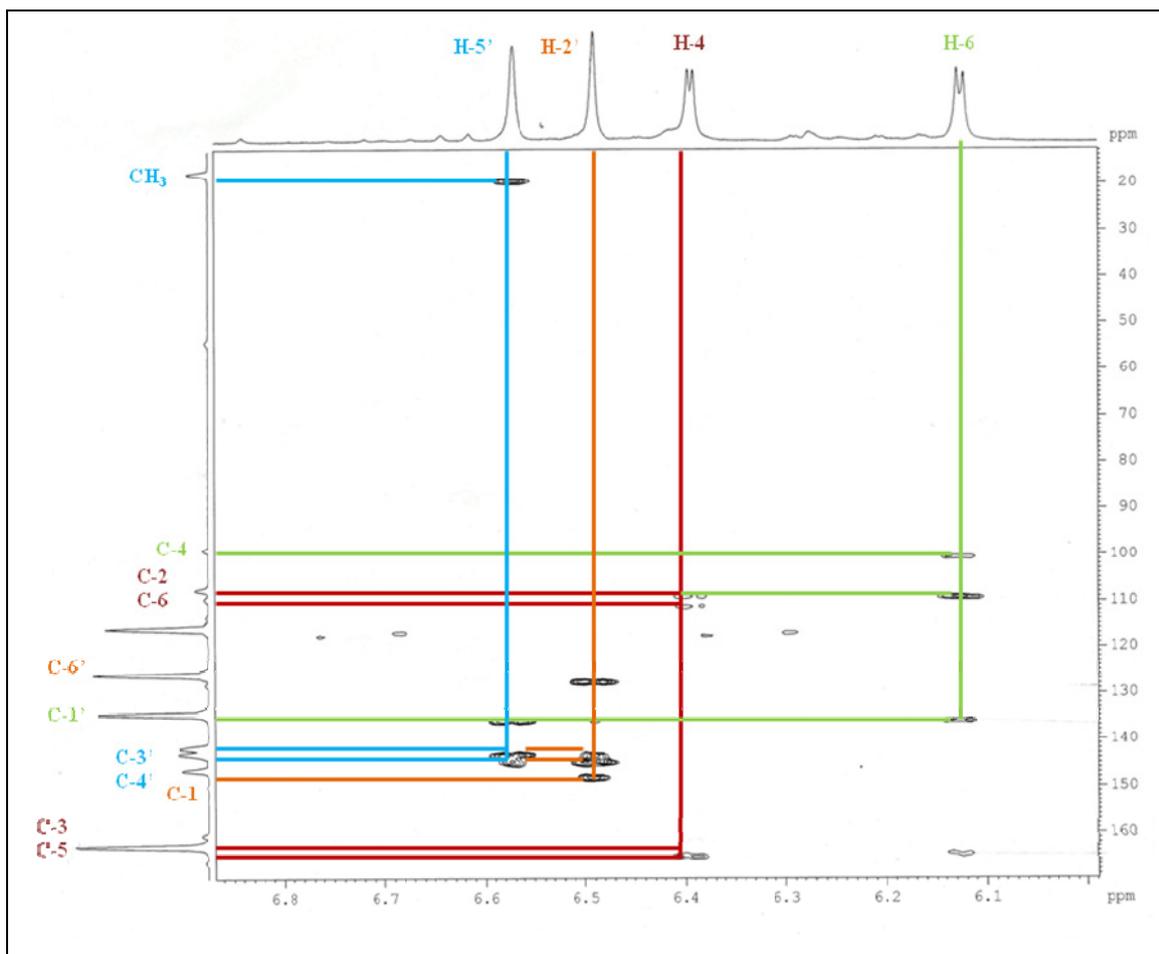


FIGURA 4.48- Mapa de contorno g-HMBC de altenusina (MeOD, 400 MHz).

#### 4.3.6. Substância 06 e 07 - Uridina e Uracila

As substâncias **06** e **07** foram isoladas em mistura do extrato acetato de etila do cultivo do fungo em meio sólido. Suas estruturas foram identificadas através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 4.50 a 4.53), e por ser uma substância conhecida, seus valores foram comparados com dados da literatura.

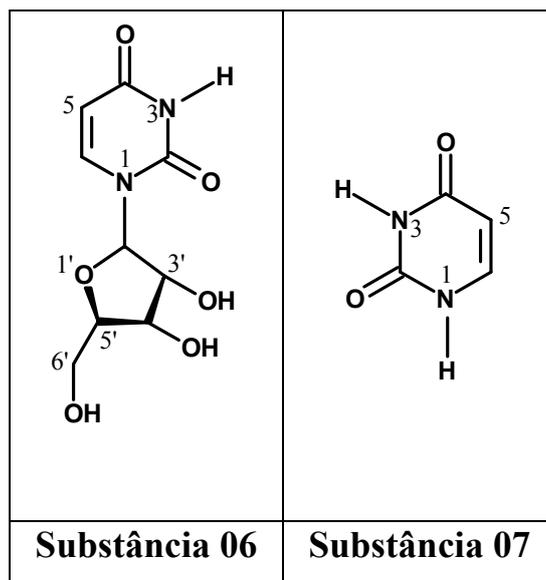


FIGURA 4.49- Substâncias 6 e 7.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **06** foi possível observar dois dubletos acoplando entre si em  $\delta$  7,99 (1H) e 5,68 (1H) com constante de acoplamento de aproximadamente 8,0 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-6 e H-5, respectivamente, e um dubleto em  $\delta$  5,88 (1H,  $J = 5$  Hz), o qual foi atribuído ao hidrogênio H-2'. Observou-se dois tripletos em  $\delta$  4,17 (1H,  $J = 5,0$  Hz) e 4,13 (1H,  $J = 5,0$  Hz) referentes aos hidrogênios H-3' e H-4' respectivamente; um multipletto em  $\delta$  3,99 (1H) referente ao sinal de H-5' e dois duplos dubletos em  $\delta$  3,82 (1H,  $J = 3$  e 13 Hz) e  $\delta$  3,72 (1H,  $J = 3$  e 12 Hz), os quais foram atribuídos aos dois hidrogênios diasterotópicos H-6a' e H-6b' respectivamente.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  observou-se dois sinais de carbonos característicos de carbamidas em  $\delta$  152,5 e 166,3 os quais foram atribuídos aos carbonos C-2 e C-4 respectivamente, além destes observou-se ainda os sinais de carbonos olefínicos C-5 em  $\delta$  102,8 e C-6 em  $\delta$  142,8, cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos (90,8; 75,9; 71,4 e 86,6) e um metilénico em  $\delta$  62,3, indicando uma unidade de ribose.

Para a substância **07**, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observaram-se apenas dois dubletos acoplando entre si em  $\delta$  7,38 (1H) e  $\delta$  5,60 (1H) com constante de

acoplamento de aproximadamente 7,5 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-6 e H-5, respectivamente. Além destes não se observou nenhum outro sinal típico da unidade ribose.

Os dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mais a comparação dos dados encontrados na literatura levaram a inferir que as duas substâncias discutidas acima são dois nucleosídeos sendo a **06** denominada de uridina, o qual é um nucleosídeo constituído da base nitrogenada pirimidica uracila ligada ao açúcar ribose através de uma ligação  $\beta$ , e a **07** denominada de uracila. Os dados obtidos e comparados com a literatura das estruturas **06** e **07** estão dispostos nas TABELAS 4.6 e 4.7 respectivamente.

É importante ressaltar que quando um grupo fosfato é adicionado ao açúcar, os nucleosídeos passam a ser denominados de nucleotídeos, os quais constituem os ácidos nucléicos (RNA), que são macromoléculas de extrema importância biológica em todos os organismos vivos e responsáveis pela transmissão da informação genética na célula (CAMPBELL & FARRELL, 2007).

TABELA 4.6- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **06** e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância 06 (600 MHz, MeOD)		FERREIRA <i>et al.</i> , 2010 (400/100 MHz, D <sub>2</sub> O)	
	Valores Obtidos	Valores Obtidos	Valores Literatura	Valores Literatura
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2	-	152,8	-	151,7
4	-	166,3	-	166,2
5	5,68 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	102,8	5,89 ( <i>d</i> )	102,3
6	7,99 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	142,8	7,88 ( <i>d</i> )	141,9
2'	5,88 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,0 Hz)	90,8	5,90 ( <i>d</i> )	89,4
3'	4,17 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 5,0 Hz)	75,9	4,36 ( <i>t</i> )	73,7
4'	4,13 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 5,0 Hz)	71,4	4,23 ( <i>t</i> )	69,4
5'	3,99 ( <i>m</i> )	86,6	4,14 ( <i>m</i> )	84,4
6'a	3,82 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 12; 3Hz)	62,3	3,92 ( <i>dd</i> )	60,8
6'b	3,72 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 12; 3Hz)	62,3	3,81 ( <i>dd</i> )	60,8

TABELA 4.7- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **07** e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância 07 (600 MHz, MeOD)		MARINHO <i>et al.</i> , 2007 (400/50 MHz, DMSO)	
	Valores Obtidos	Valores Obtidos	Valores Literatura	Valores Literatura
	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$
2	-	153,6	-	151,7
4	-	167,4	-	166,2
5	5,68 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	101,7	5,89 ( <i>d</i> )	102,3
6	7,99 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	143,6	7,88 ( <i>d</i> )	141,9

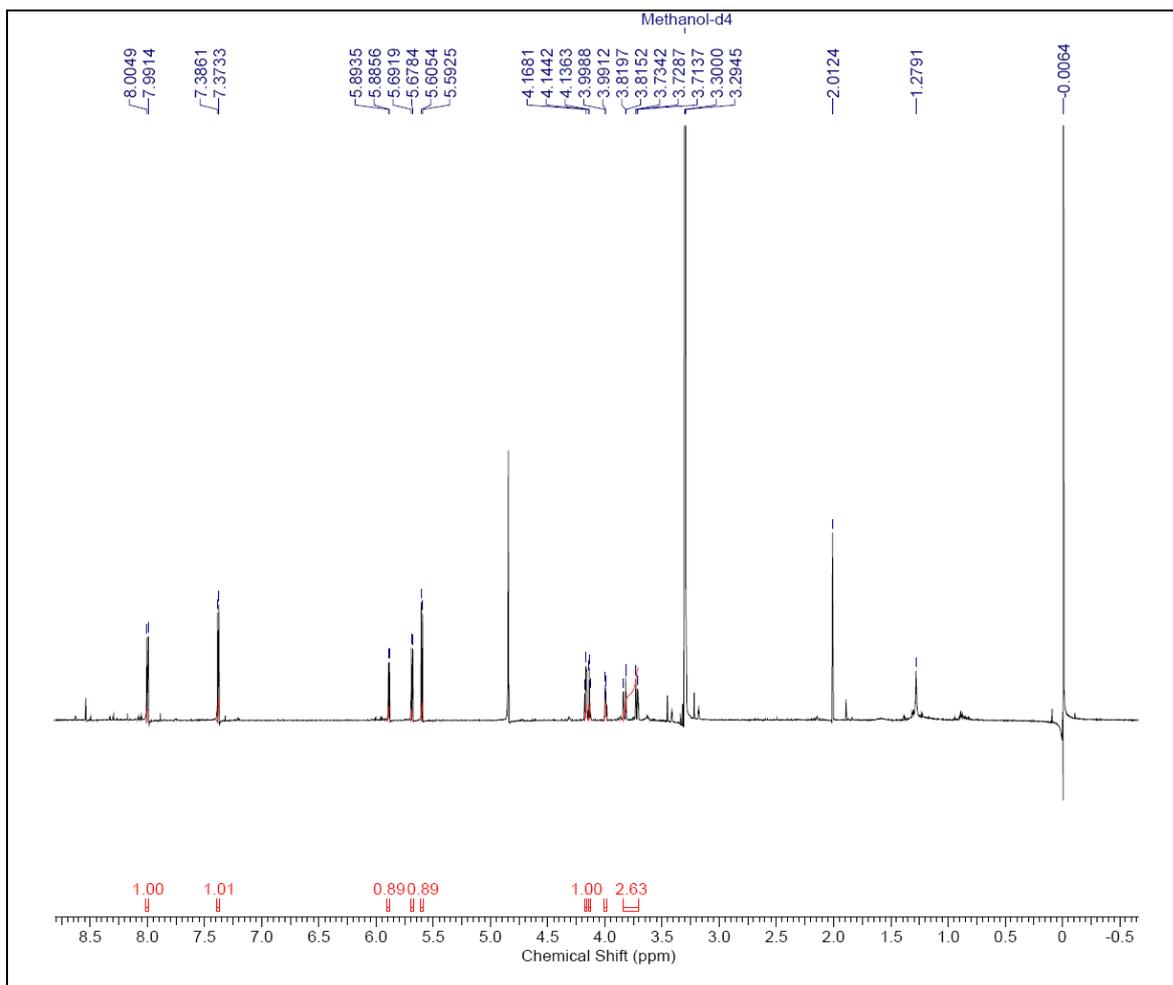


FIGURA 4.50- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de uridina e uracila (MeOD, 400 MHz).

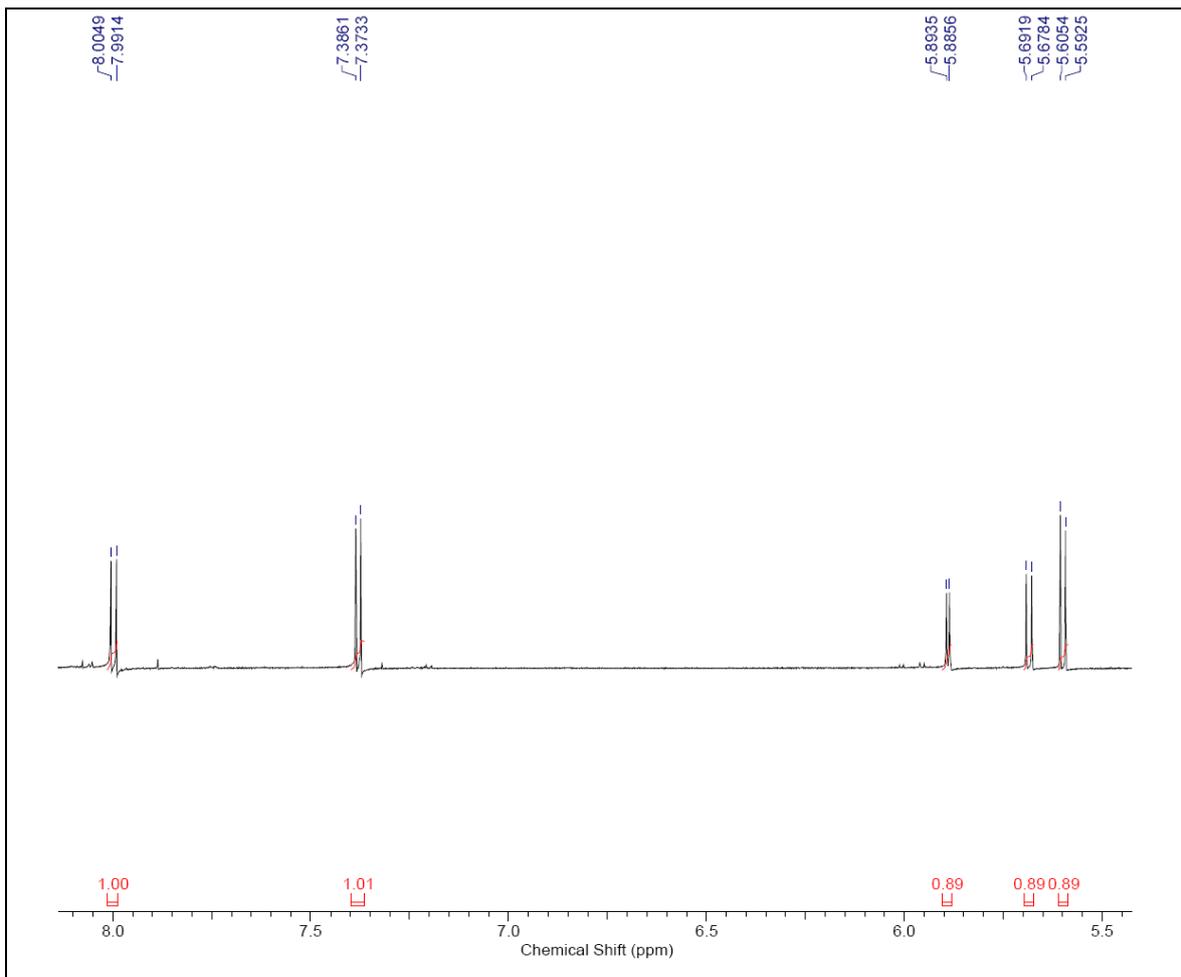


FIGURA 4.51- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de uridina e uracila (MeOD, 400 MHz).

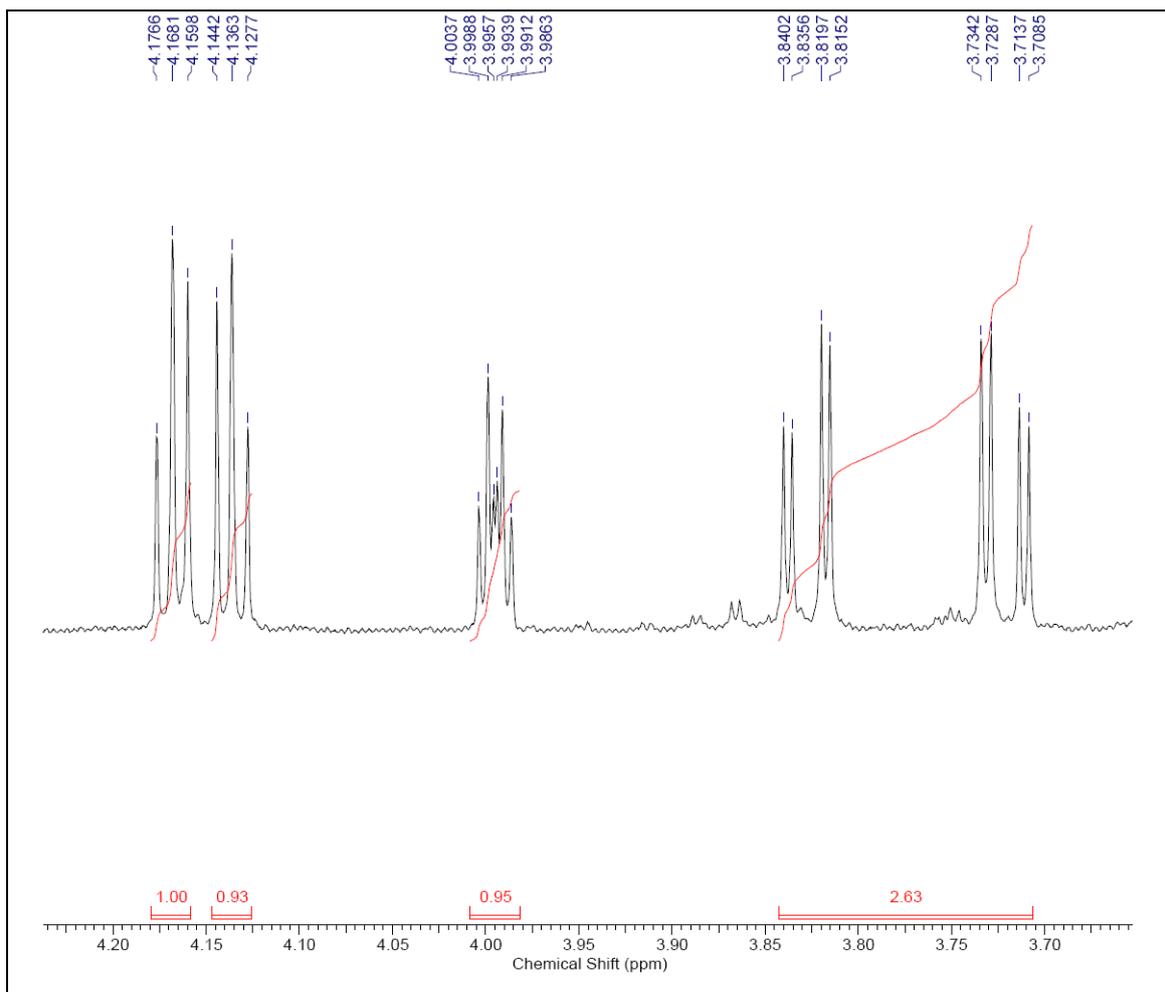


FIGURA 4.52- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de uridina e uracila (MeOD, 400 MHz).

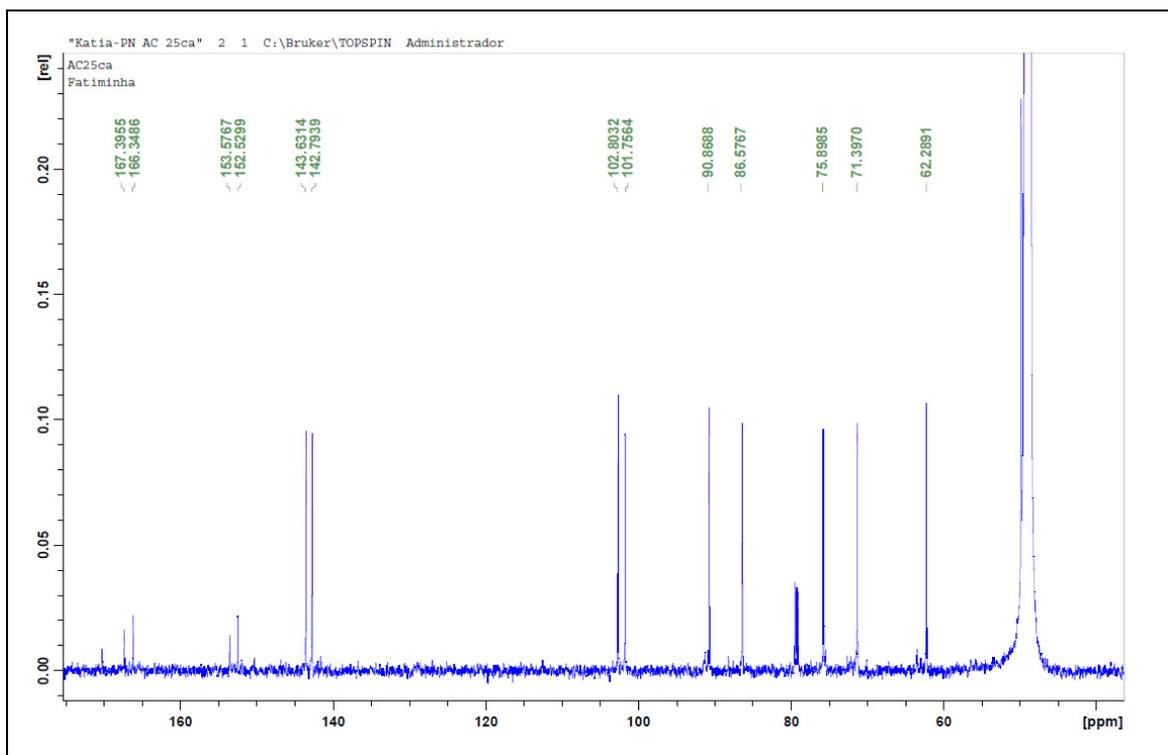


FIGURA 4.53- Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de uridina e uracila (MeOD, 150 MHz).

#### 4.3.7. Substância 08 - 5'-inosil

A substância **08**, denominada 5'-inosil foi isolada do extrato acetato de atila com o fungo sendo cultivado no meio sólido de arroz. A determinação estrutural desse composto foi realizada apenas com o auxílio dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (FIGURAS 4.55 a 4.57) por se tratar de uma substância já conhecida, sendo que seus dados foram comparados com os já existentes na literatura.

Analisando o espectro de RMN <sup>1</sup>H, observa-se dois singletos cada um integrando para um hidrogênio com deslocamentos químicos de δ 8,34 e δ 8,316 os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-8 e H-2 respectivamente. Foi observado também um dubleto, integrando para um hidrogênio, em δ 5,87 (*J* = 6,0 Hz) referente ao hidrogênio H-2', embora o sinal não esteja bem definido,

sugere um duplete em  $\delta$  4,61 ( $J = 4$  Hz), o qual pode ser atribuído ao hidrogênio H-3', um dublete em  $\delta$  4,14, no entanto o sinal não está bem resolvido, podendo esse ser atribuído ao H-4'. Ainda analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observa-se um duplo dublete em  $\delta$  3,96 ( $J = 5,2$  e  $8,4$ ) referente ao hidrogênio H-5' e dois multipletos  $\delta$  3,67 e  $\delta$  3,54.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  observa-se um sinal de carbono característico de lactama com um deslocamento químico de  $\delta$  156,15, o qual foi atribuído ao carbono C-4. Foram observados também sinais de carbonos olefínicos referentes ao C-2 e C-8 em  $\delta$  149,04 e 139,90, respectivamente. Foram atribuídos aos carbonos C-5 e C-6 sinais de carbonos olefínicos totalmente substituídos com os respectivos deslocamentos de  $\delta$  119,35 e 152,36. Outros cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos ( $\delta$  87,89;  $\delta$  73,42;  $\delta$  70,65 e  $\delta$  87,89) e um metilénico com deslocamento de  $\delta$  61,66 foram observados, indicando, portanto a presença de uma unidade de ribose ligada à estrutura.

De acordo com essas informações, pode-se concluir que o composto **08** é conhecido na literatura como o nucleotídeo 5'-inosil.

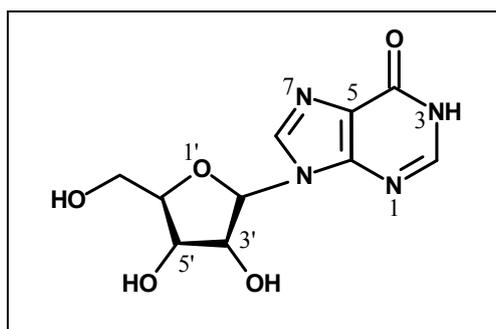


FIGURA 4.54- Substância 08

TABELA 4.8 - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **08** e comparação com dados da literatura (DMSO, 400 MHz)

Posição H e C	Substância 08 (400 MHz, DMSO)		SILVA, 2007 (400 MHz para <sup>1</sup> H- DMSO/ 100 MHz para <sup>13</sup> C, MeOD)	
	Valores Obtidos $\delta$ <sup>1</sup> H	Valores Obtidos $\delta$ <sup>13</sup> C	Valores Literatura $\delta$ <sup>1</sup> H	Valores Literatura $\delta$ <sup>13</sup> C
2	8,343 (s, 1H)	149,0	8,34 (s, 1H)	149,1
4	-	156,1	-	156,2
5	-	119,3	-	119,4
6	-	152,4	-	152,4
8	8,316 (s, 1H)	139,9	8,13 (s, 1H)	140,0
1'	-	-	-	-
2'	5,87 (d, J = 6,0 Hz, 1H)	87,9	5,86 (d, J = 6,4 Hz, 1H)	87,9
3'	4,61	73,4	4,59 (t, J = 5,5 Hz, 1H)	73,9
4'	4,14	70,7	4,12 (t, J = 4,4 Hz, 1H)	70,7
5'	3,96 (dd, J = 5,2 Hz, 8,4 Hz)	85,9	3,95 (dd, J = 3,2 e 6,4 Hz, 1H)	86,0
6'	3,67 (m)	61,7	3,65 (d, J = 12,1 Hz, 1H)	61,7
	3,54 (m)		3,53 (dd, J = 12,1 e 4,0 Hz, 1H)	

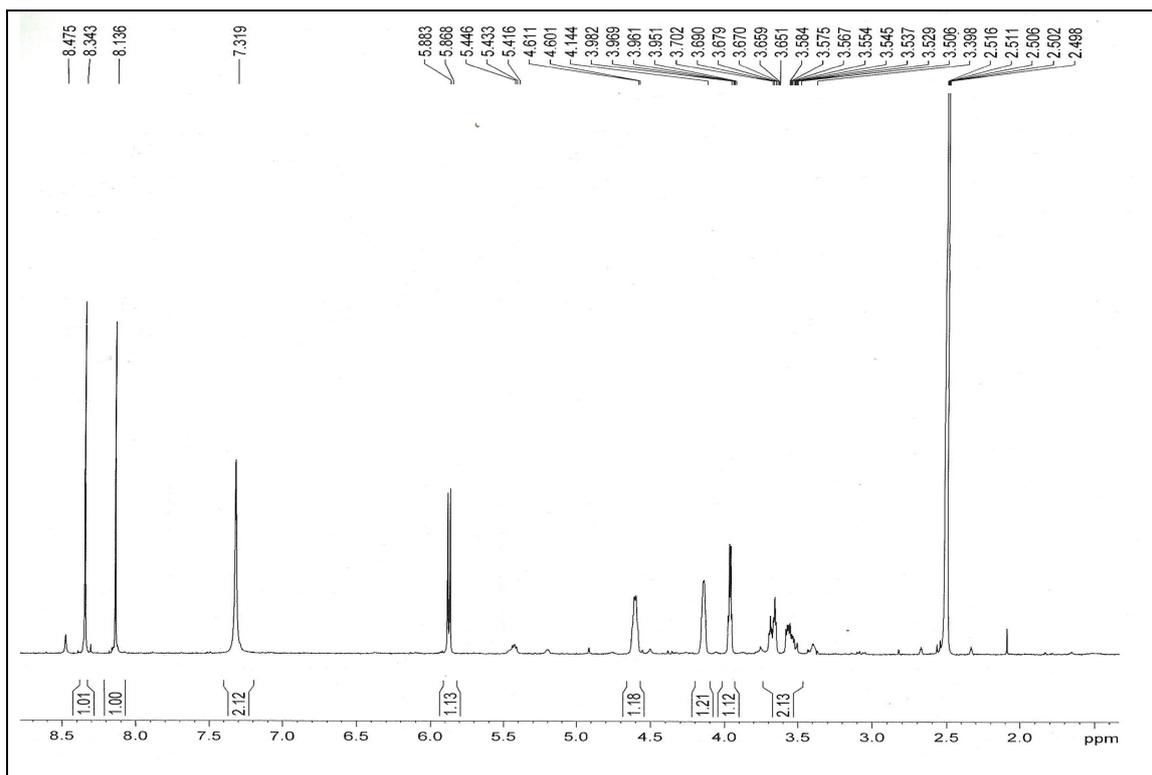


FIGURA 4.55- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 5'-inosil (DMSO, 400 MHz).

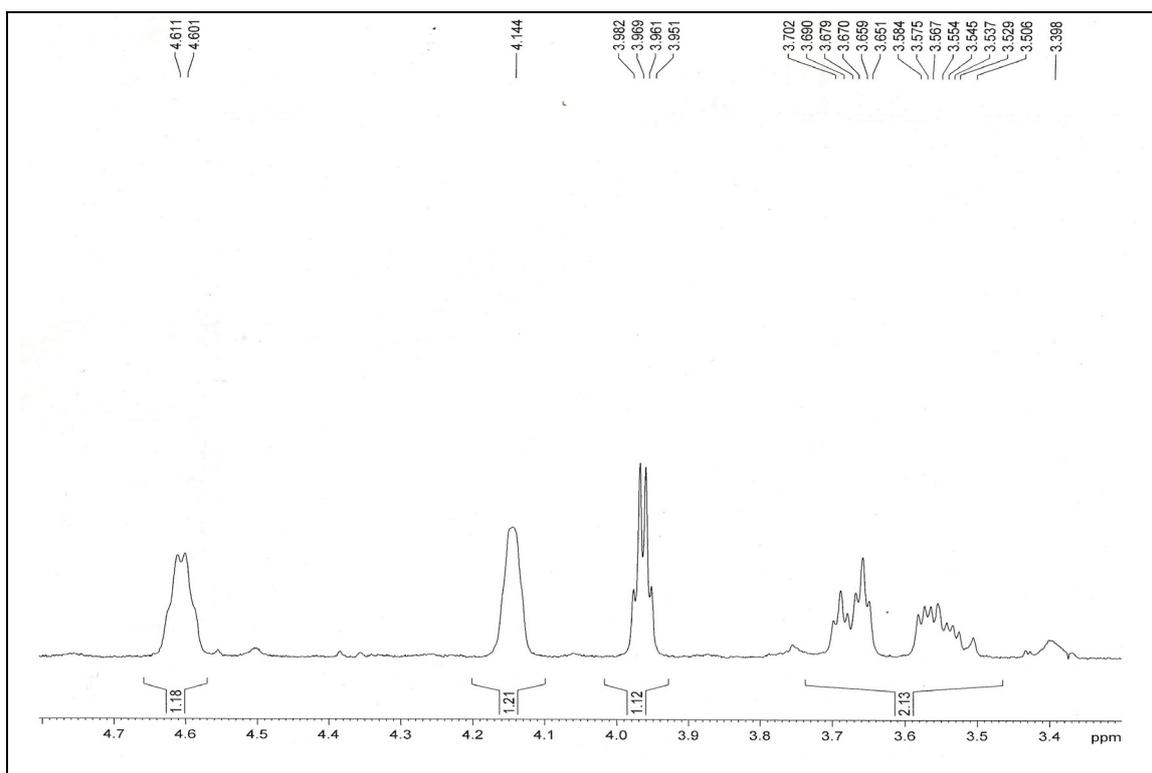


FIGURA 4.56- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 5'-inosil (DMSO, 400 MHz).

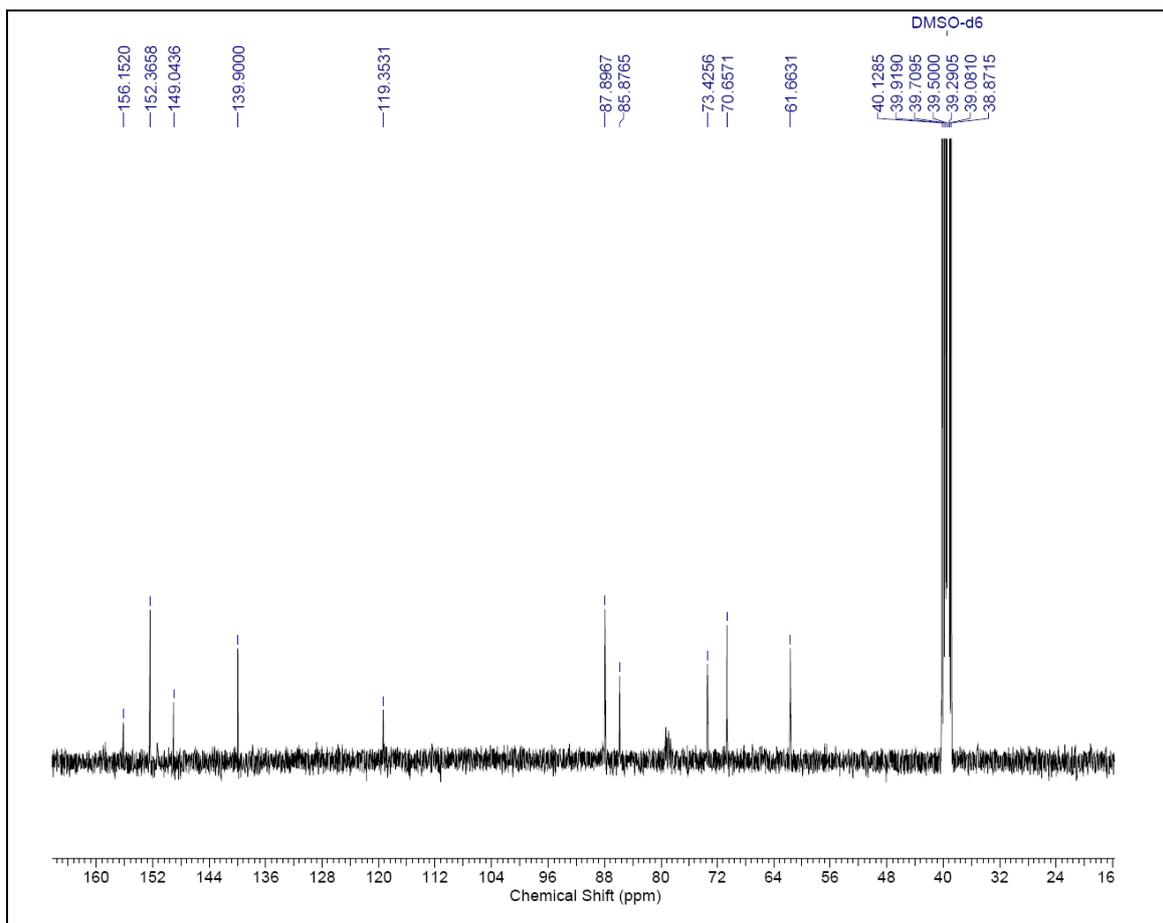


FIGURA 4.57- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 5'-inosil (DMSO, 400 MHz).

#### 4.3.8. Substância 09 – Ergosterol

A substância **09**, denominada, ergosterol, foi isolada do extrato hexânico com o fungo cultivado no meio sólido de arroz. A identificação estrutural desse composto foi realizada apenas com o auxílio dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 4.59 a 4.62) por se tratar de uma substância já conhecida, sendo que seus dados foram comparados com os já existentes na literatura.

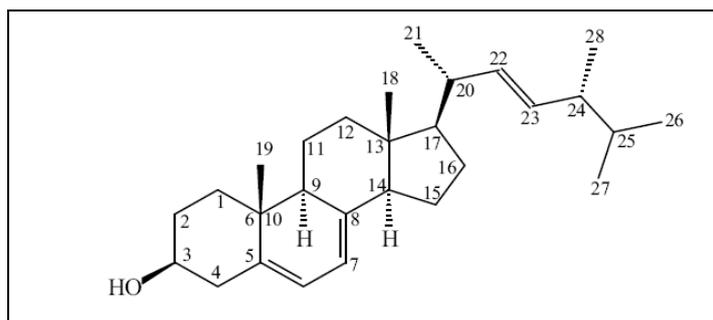


FIGURA 4.58- Substância **09**

Observou-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  dois duplos dubletos na região de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,37 e 5,55. Foi também possível observar no espectro um multipletto em  $\delta$  5,18, sinais característicos de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. Os sinais de hidrogênio em  $\delta$  0,84; 0,81; 1,02, 0,92, 0,91, 0,61 observados no espectro caracterizam-se pelo esqueleto de uma substância esteroidal.

Na região de deslocamento de  $\delta$  0,5 e 1,0 observa-se a presença de singletos, dupletos e tripletos, sendo que esse esqueleto se caracteriza em uma substância esteroidal.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível observar seis sinais de  $\text{Csp}^2$  sendo esses com deslocamentos em 141,3 (C-8); 139,8 (C-5); 135,5 (C-22); 132,0 (C-23); 119,6 (C-6) e 116,3 (C-7), além de apresentar sinais de carbonos metílicos. Observou-se também um sinal em  $\delta$  70,5 típico de carbono carbinólico (C-3). Os demais valores de carbonos foram comparados à literatura.

Portanto, a comparação dos valores dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio encontra-se listados nas TABELAS 4.9 e 4.10, e conclui-se que a substância é o ergosterol, um composto muito comum em fungos. Segundo SUBBIAH, *et al.*, 2003 o ergosterol tem atividade inibidora de células cancerígenas em ensaios realizados “in vitro”.

TABELA 4.9- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **09** e comparação com dados da literatura

Posição H	Valores Obtidos	Valores Literatura
	$\delta$ $^1\text{H}$	SILVA, 2007 (200 MHz para $^1\text{H}$ - $\text{CDCl}_3$ )
3	3,62	3,61 ( <i>m</i> , 1H)
6	5,56	5,56 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,4 e 2,2 Hz, 1H)
7	5,37	5,38 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,4 e 2,5 Hz, 1H)
18	0,93	0,95 ( <i>s</i> , 3H)
19	0,62	0,63 ( <i>s</i> , 3H)
21	1,02	1,00 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H)
22	5,18	5,20 ( <i>m</i> , 1H)
23	5,18	5,20 ( <i>m</i> , 1H)
26	0,82	0,84 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,7/6,8 Hz, 3H)
27	-	-
28	0,93	0,93 ( <i>s</i> , 3H)

TABELA 4.10- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **09** e comparação com dados da literatura

Posição C	Valores Obtidos	Valores Literatura
	$\delta$ $^{13}\text{C}$	SILVA, 2007 (200 MHz para $^{13}\text{C}$ - $\text{CDCl}_3$ )
1	38,4	38,3
2	32,0	32,0
3	70,5	70,5
4	40,4	40,4
5	141,3	141,3
6	119,6	119,6
7	116,3	116,3
8	139,8	139,8
9	46,2	46,3

Continuação da TABELA 4.10

10	37,0	37,0
11	21,1	21,1
12	28,3	28,2
13	42,8	42,8
14	54,5	54,6
15	23,0	23,0
16	39,1	39,1
17	55,7	55,7
18	12,1	12,0
19	16,3	16,2
20	40,4	40,3
21	19,6	19,6
22	132,0	131,9
23	135,5	135,5
24	42,9	42,9
25	19,9	19,9
26	33,1	33,0
27	21,1	21,0
28	17,6	17,6

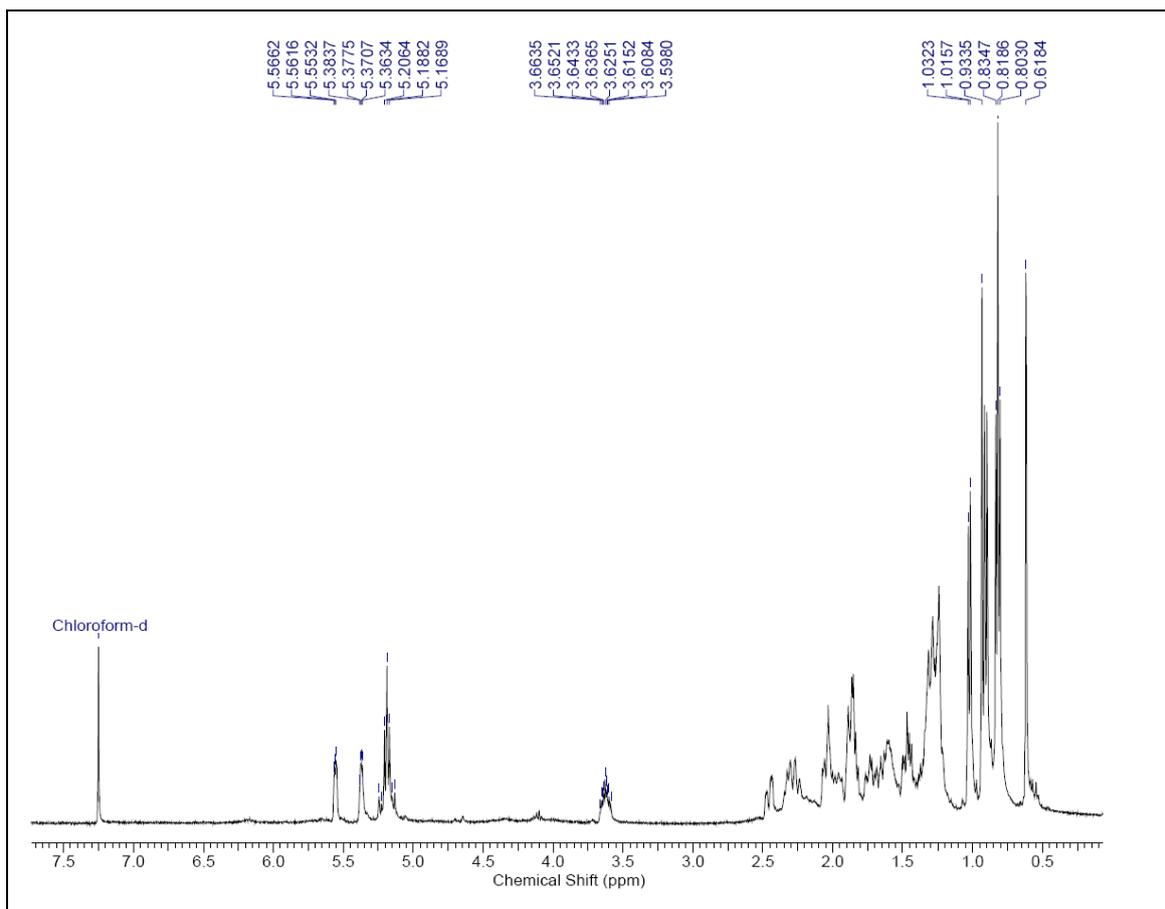


FIGURA 4.59- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

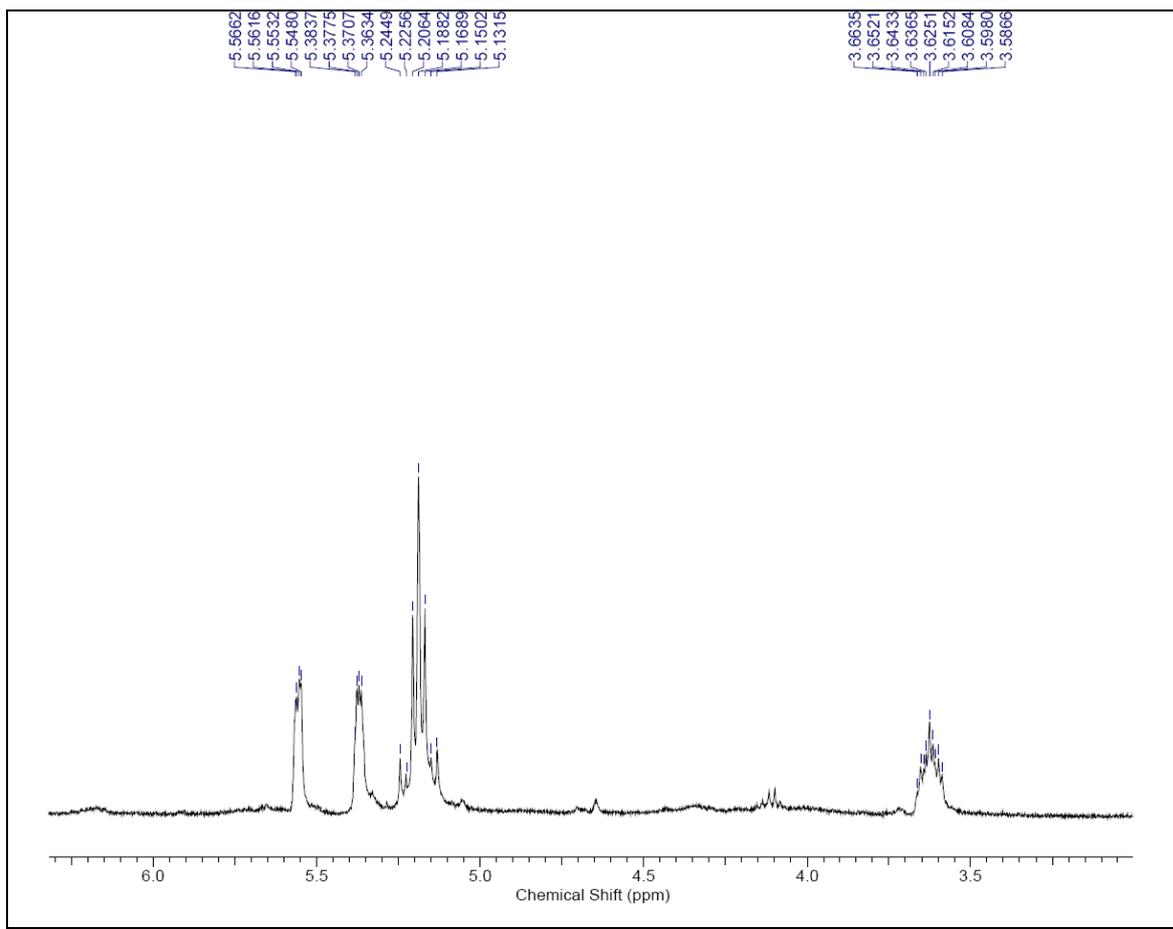


FIGURA 4.60- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

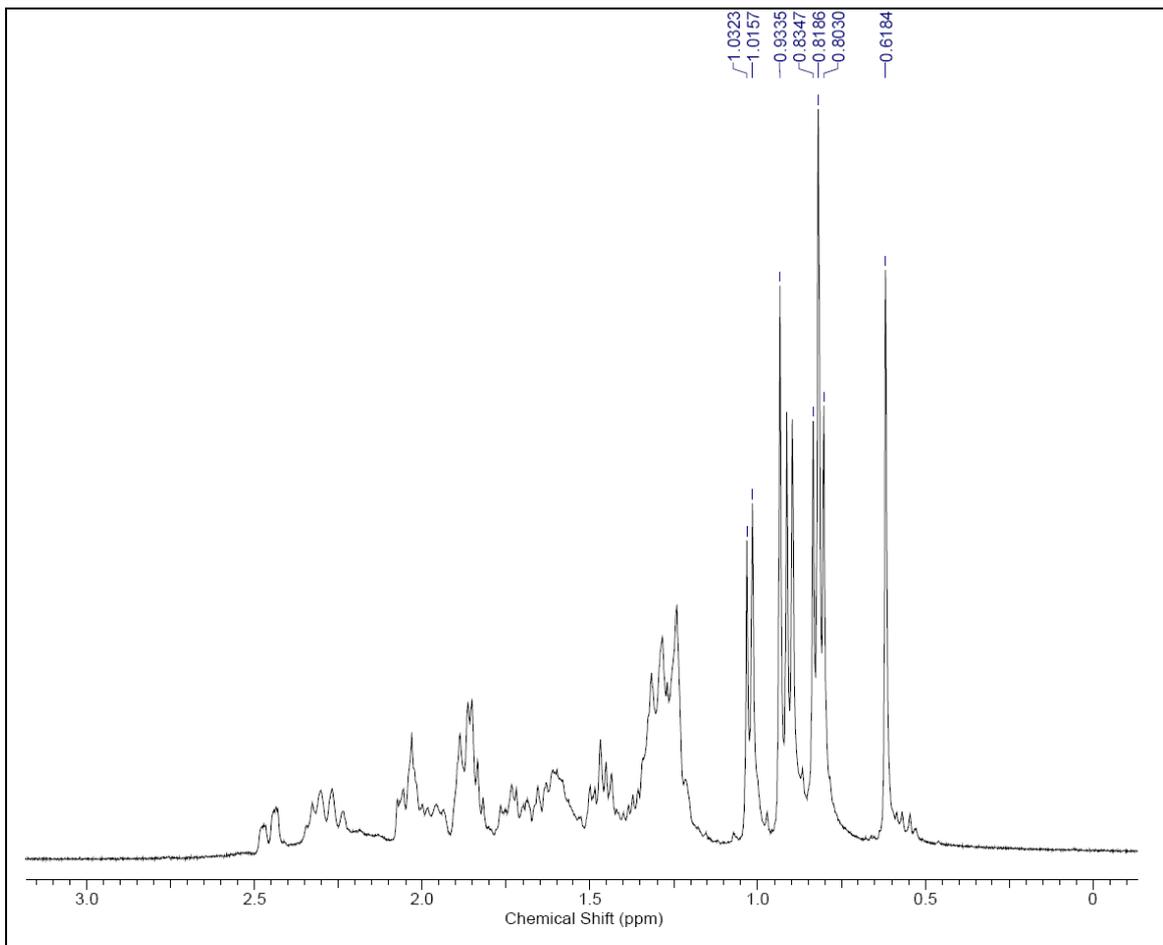


FIGURA 4.61- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

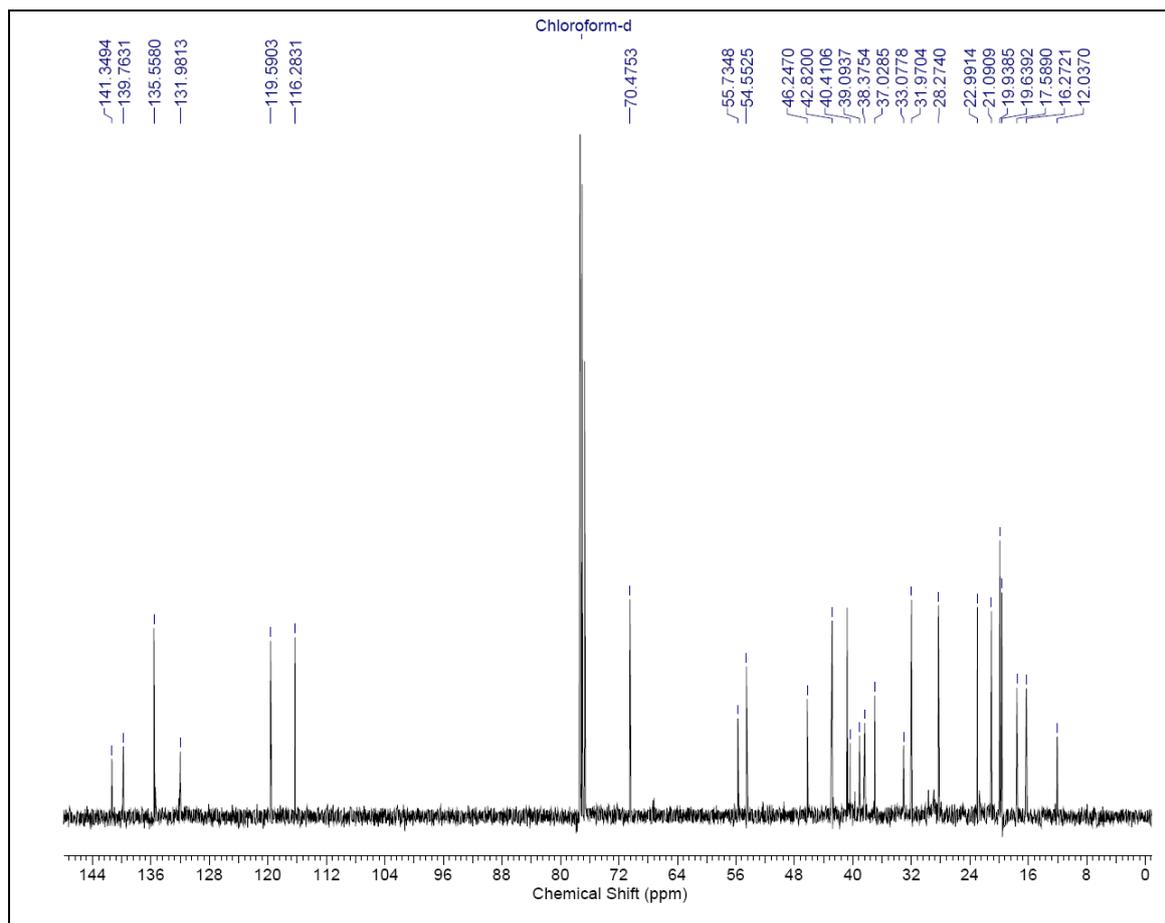


FIGURA 4.62- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

#### 4.3.9. Substância 10 – Peróxido de Ergosterol

A substância **10**, denominada peróxido de ergosterol, foi isolada do extrato hexânico com o fungo cultivado no meio sólido de arroz. Por ser tratar de uma substância conhecida sua identificação foi feita utilizando os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 4.64 a 4.67), os quais foram comparados com a literatura.

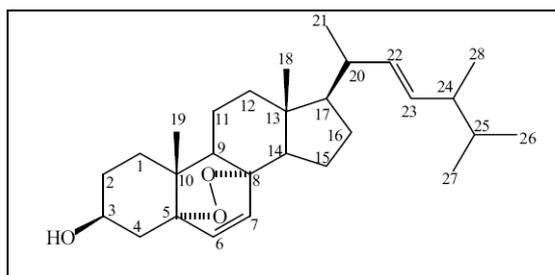


FIGURA 4.63- Substância 10.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 10 apresenta sinais de hidrogênios alifáticos, metílicos, carbinólicos e vinílicos. Observaram-se dois dupletos característicos de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  6,47 ( $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  6,25 ( $J = 8,5$  Hz). Ainda foi possível observar multipletos  $\delta$  5,17 típico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. Na região entre  $\delta$  0,70 e 1,25 observa-se a presença de dubletos e singletos, no entanto a região está de difícil visualização, mesmo assim podem-se observar dois singletos, um em  $\delta$  0,70 (H-19) e 1,06 (H-18), e dubletos em  $\delta$  H 0,97 (H-21), 0,80 (H-26), 0,88 (H-27), 1,25 (H-28), os quais foram atribuídos aos hidrogênios metílicos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresenta 28 sinais de carbonos, sendo seis deles atribuídos a carbonos metílicos, quatro  $\text{Csp}^2$  em  $\delta$  135,4; 135,1; 132,2; e 130,6. Foram observados também três sinais no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  82,1; 79,4 e 66,5 sendo dois destes carbonos quaternários.

Em comparação com dados da literatura, pode-se concluir que a substância **10** refere-se ao peróxido de ergosterol. Todos os valores de deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como os valores da literatura, estão descritos nas TABELAS 4.11 e 4.12 respectivamente.

TABELA 4.11- Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **10** e comparação com dados da literatura

Posição H	Valores Obtidos	Valores Literatura
	$\delta$ $^1\text{H}$	SILVA, 2007 (200 MHz para $^1\text{H}$ - $\text{CDCl}_3$ )
3	3,93	3,95 ( <i>m</i> , 1H)
6	6,25	6,25 ( <i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)
7	6,47	6,49 ( <i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)
18	1,23	1,25 ( <i>s</i> , 3H)
19	0,87	0,87 ( <i>s</i> , 3H)
21	0,91	0,91 ( <i>s</i> , 3H)
22	5,17	5,18 ( <i>m</i> , 2H)
23	5,17	5,18 ( <i>m</i> , 2H)
26	0,82	0,82 ( <i>d</i> , $J = 6,7$ Hz, 3H)
27	0,79	0,80 ( <i>d</i> , $J = 6,4$ Hz, 3H)
28	0,96	0,95 ( <i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)

TABELA 4.12- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **10** e comparação com dados da literatura

Posição C	Valores Obtidos	Valores Literatura
	$\delta$ $^{13}\text{C}$	SILVA, 2007 (200 MHz para $^{13}\text{C}$ - $\text{CDCl}_3$ )
1	30,4	30,1
2	34,6	34,7
3	66,3	66,5
4	39,3	39,3
5	82,1	82,1
6	135,2	135,2
7	130,7	130,7
8	79,3	79,4
9	51,0	51,1

Continuação da TABELA 4.12

10	36,8	37,0
11	20,6	20,6
12	36,9	37,0
13	44,5	44,6
14	51,6	51,7
15	23,3	23,4
16	28,6	28,6
17	56,1	56,2
18	12,9	12,9
19	18,1	18,2
20	39,7	39,7
21	20,8	20,9
22	135,4	135,4
23	132,2	132,3
24	42,8	42,8
25	33,0	33,1
26	19,6	19,6
27	19,9	19,9
28	17,49	17,5

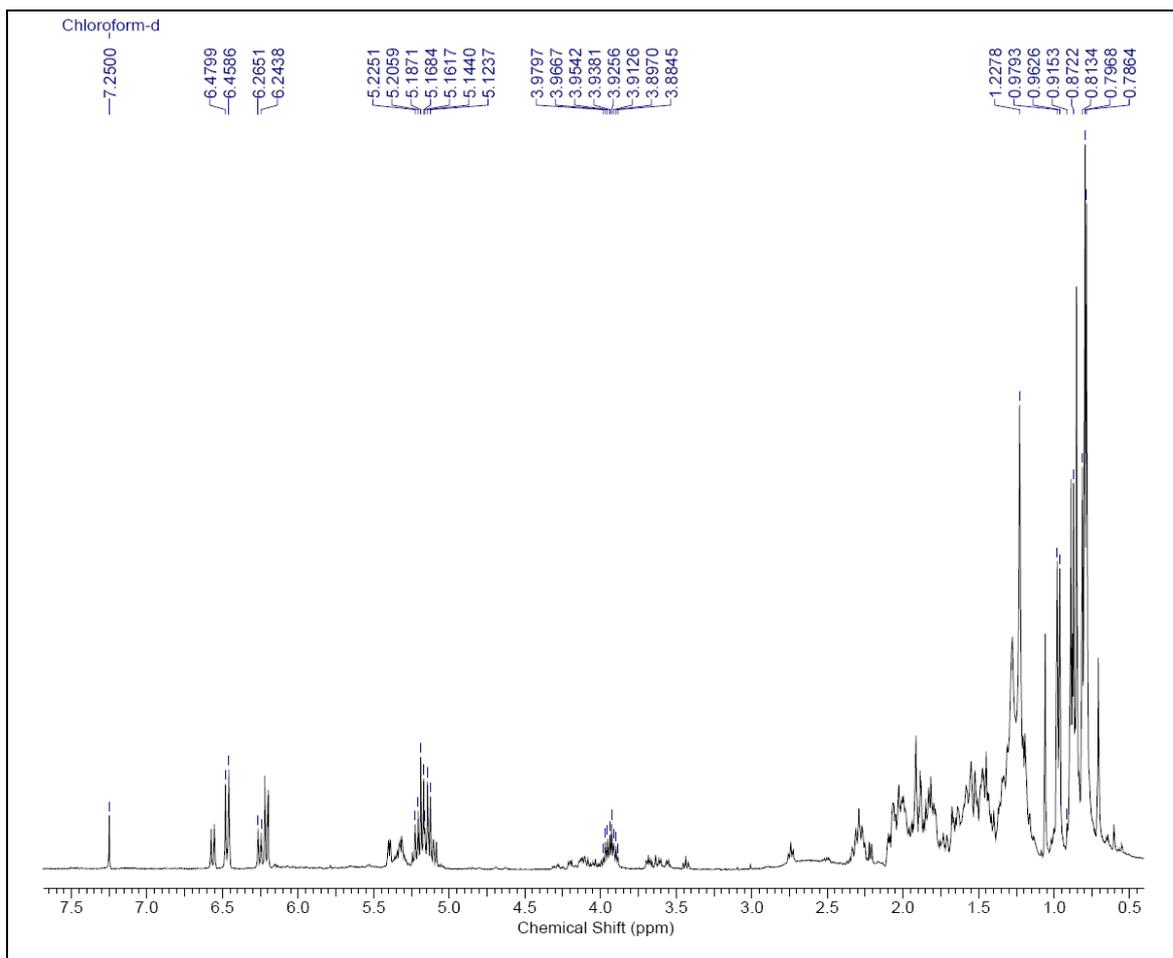


FIGURA 4.64- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de peróxido de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

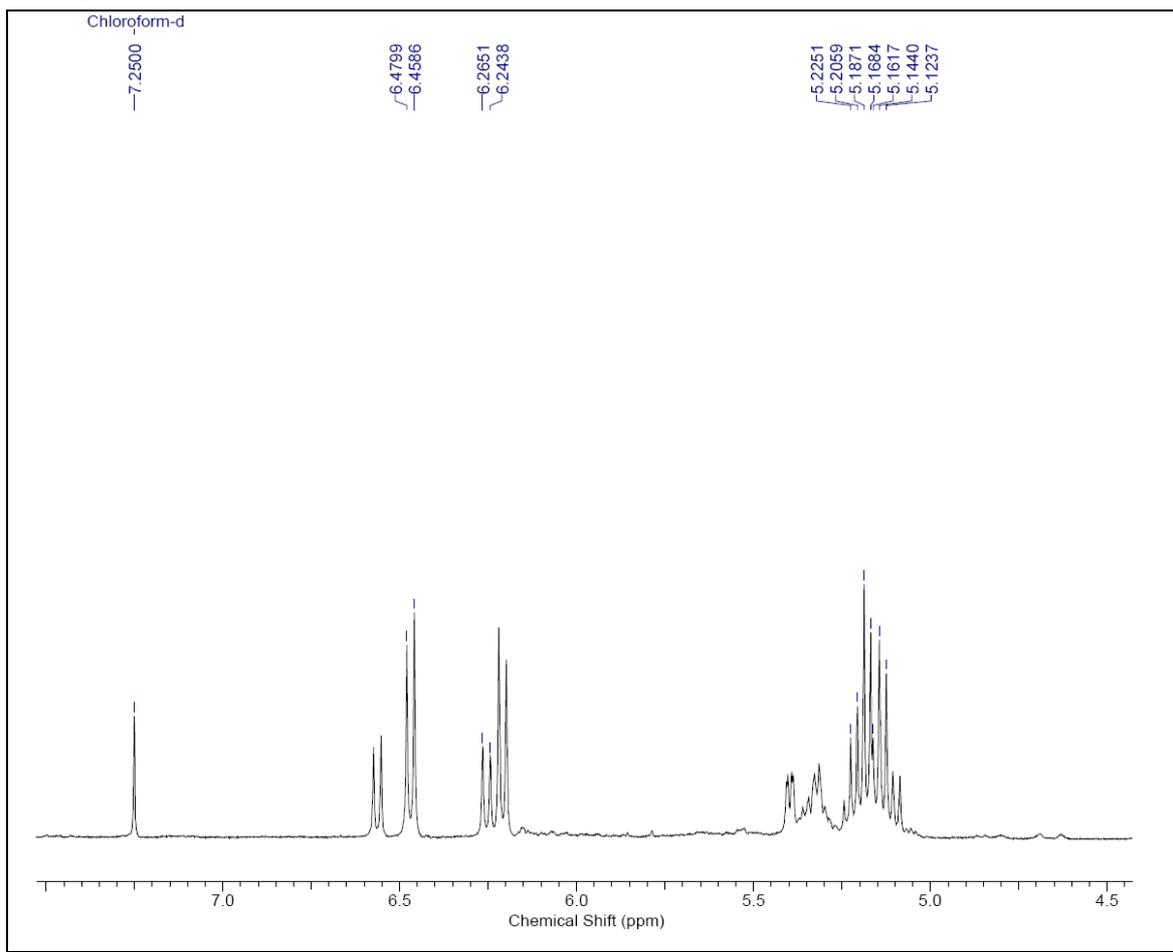


FIGURA 4.65- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de peróxido de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

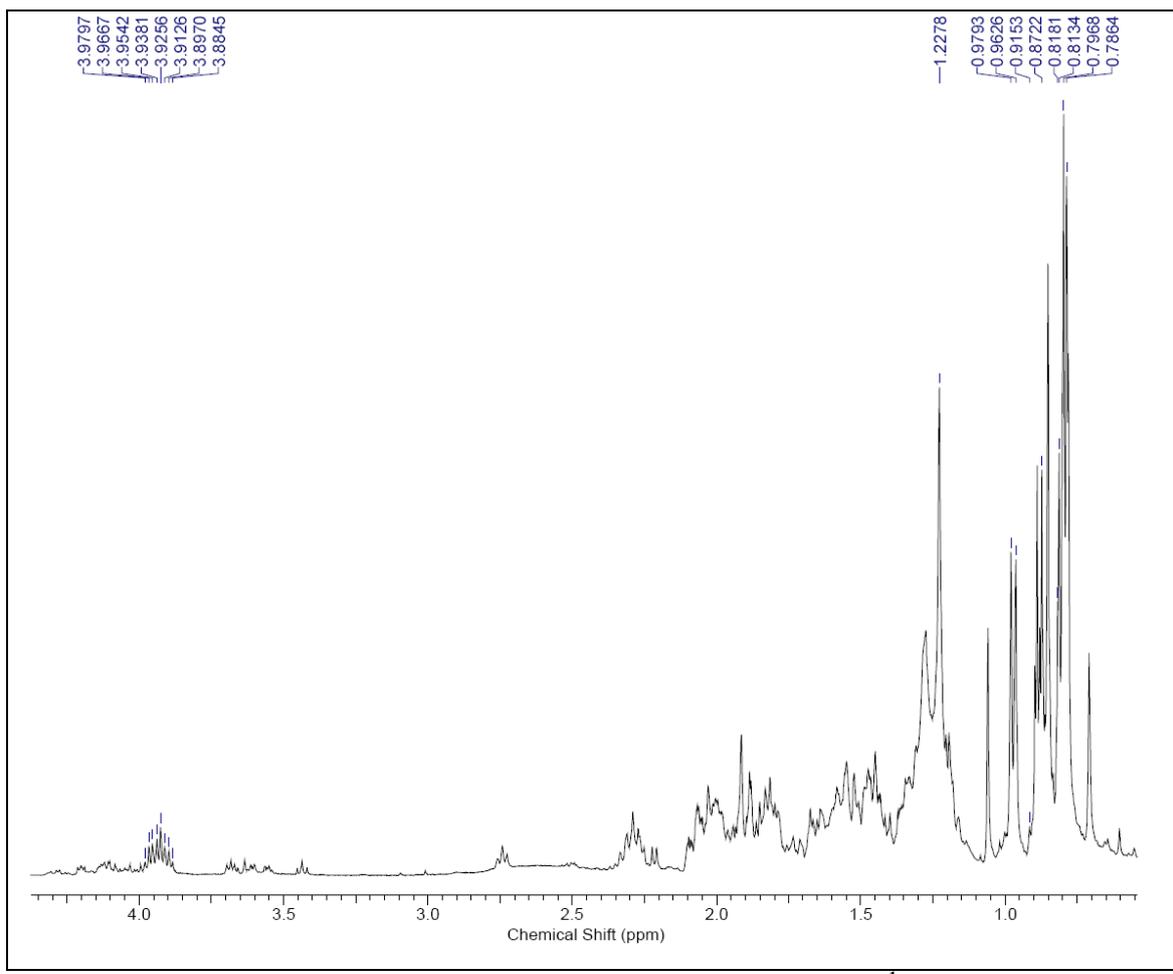


FIGURA 4.66- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de peróxido de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

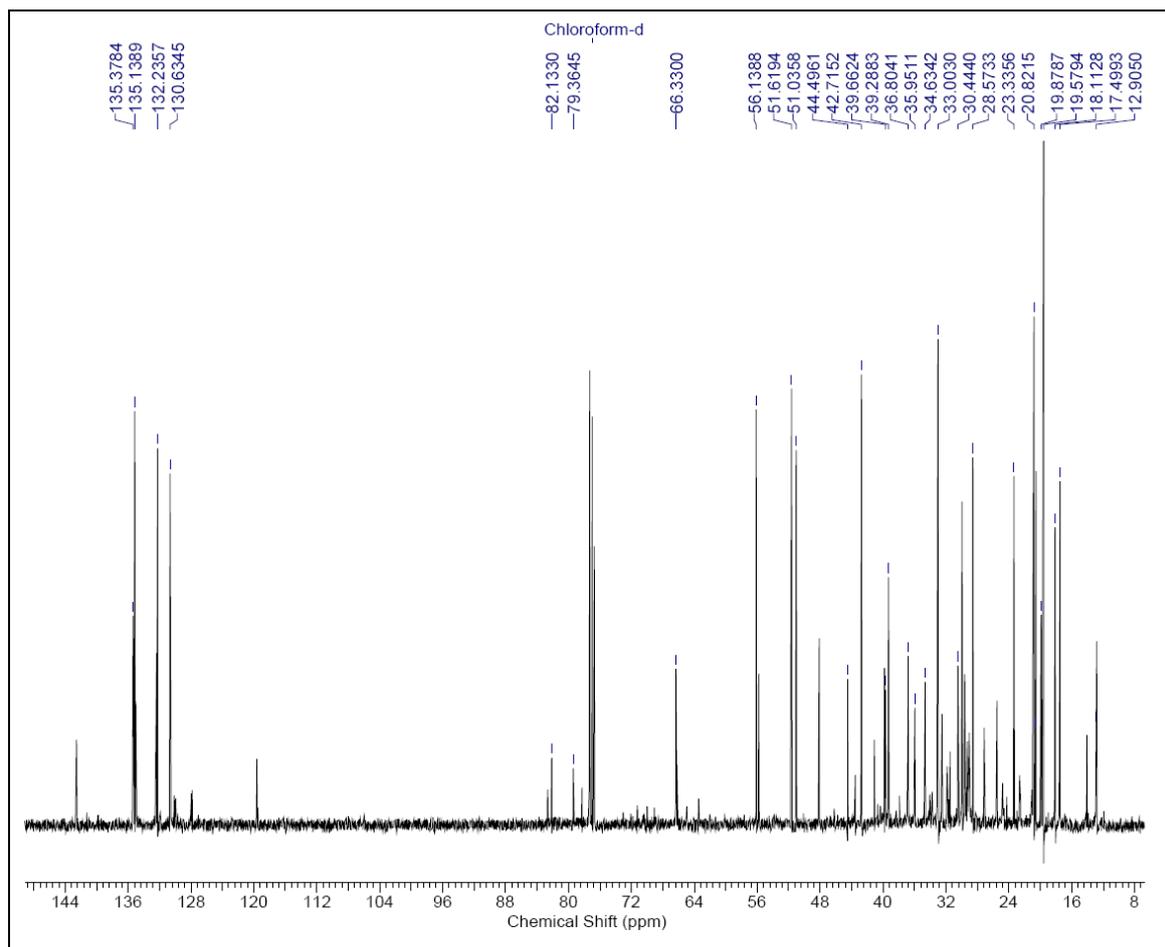


FIGURA 4.67- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de peróxido de ergosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

#### 4.3.10. Substância Triglicerídeos –

**Substância 11a (Ácido Palmítico)**

**Substância 11b (Ácido Octadecadienóico)**

**Substância 11c (Ácido-8-dodecenóico)**

Os ácidos ligados ao glicerol, após reação de transesterificação, foram identificados como ácido palmítico (**11a**), ácido octadecadienóico (**11b**) e ácido-8-dodecenóico (**11c**). A fração contendo triglicerídeos foi isolada do subextrato hexânico do meio de arroz, sendo que suas estruturas foram identificadas através

de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , CG-EM e comparação com dados da literatura (SILVA, 2007).

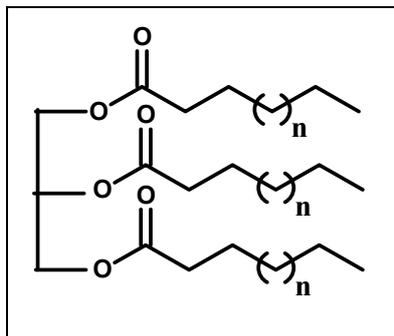


FIGURA 4.68- Substância 11.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos triglicerídeos **11** apresentou um multipletto em  $\delta$  0,79, sinal típico de metila terminal; sinais intensos na região de  $\delta$  1,19 característicos de metilenos de cadeia alquílica, um triplete em  $\delta$  1,52 referente aos metilenos  $\alpha$  a carboxila de éster, um multipletto em  $\delta$  1,94 característico de metilenos vizinhos a ligação dupla na cadeia alquílica, um triplete em  $\delta$  2,18 de metileno  $\alpha$  a carboxila de éster, um duplo dubleto em  $\delta$  4,01, um triplete em  $\delta$  2,67 do metileno  $\alpha$  a carboxila e um multipletto em  $\delta$  5,24 do metino acilcarbinólico (FIGURAS 4.69 a 4.72). Estes dados obtidos foram comparados com a literatura e levaram a confirmação de um triglicerídeo.

Para a identificação dos ácidos graxos que esterificam o glicerol isolado, foi realizada reação de transesterificação (descrita no item **3.2.6**) e o produto obtido foi injetado no CG-EM para análise. Os dados obtidos são descritos na TABELA 4.13.

TABELA 4.13- Ácidos graxos que esterificam o glicerol isolado

Picos	Tr (min)	[M <sup>+</sup> ]	FM	Nome
01	11,73	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	Ácido Hexadecanóico
02	14,46	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294	Ácido-9,12 Octadecadienóico
03	14,89	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	Ácido Octadecanóico

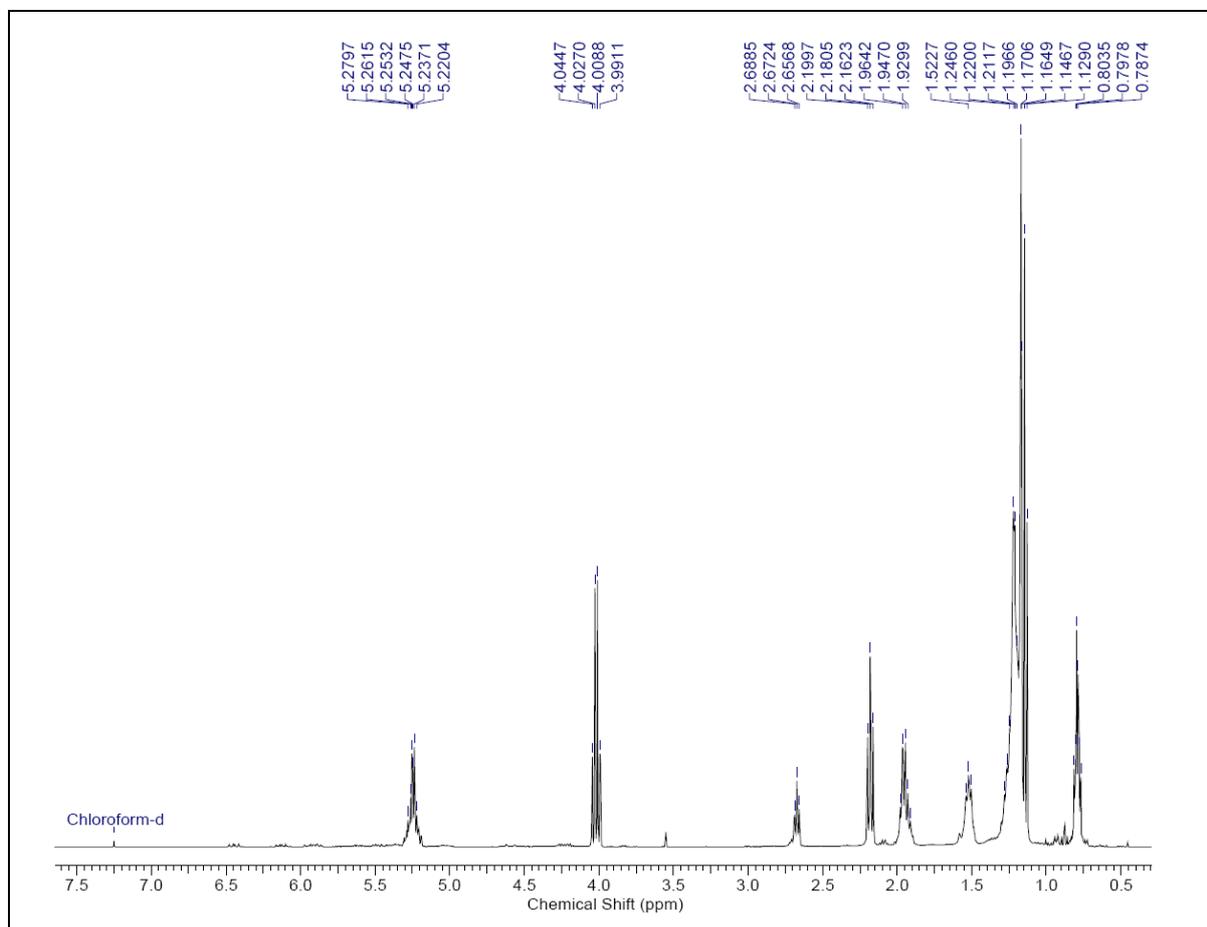


FIGURA 4.69- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de triglicerídeos (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

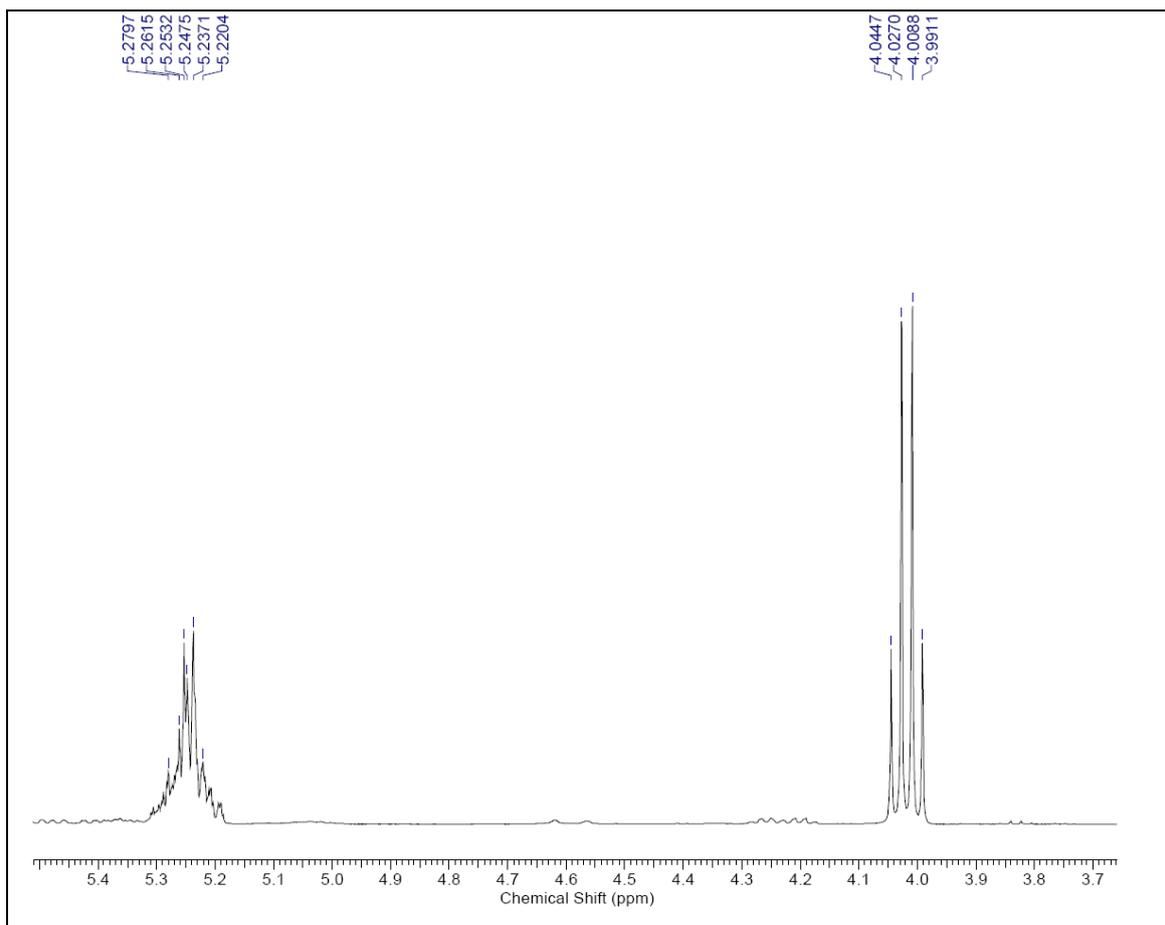


FIGURA 4.70- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de triglicerídeos ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

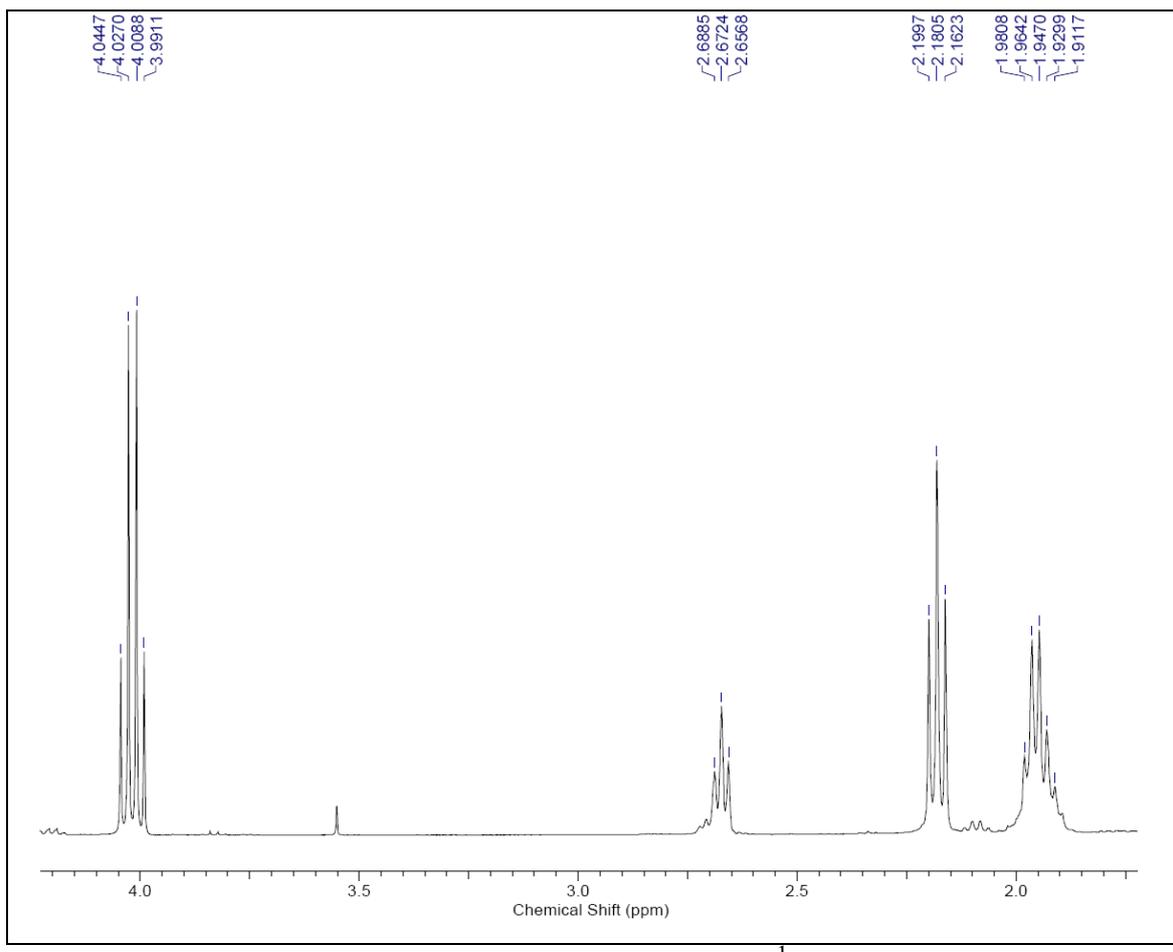


FIGURA 4.71- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de triglicerídeos ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

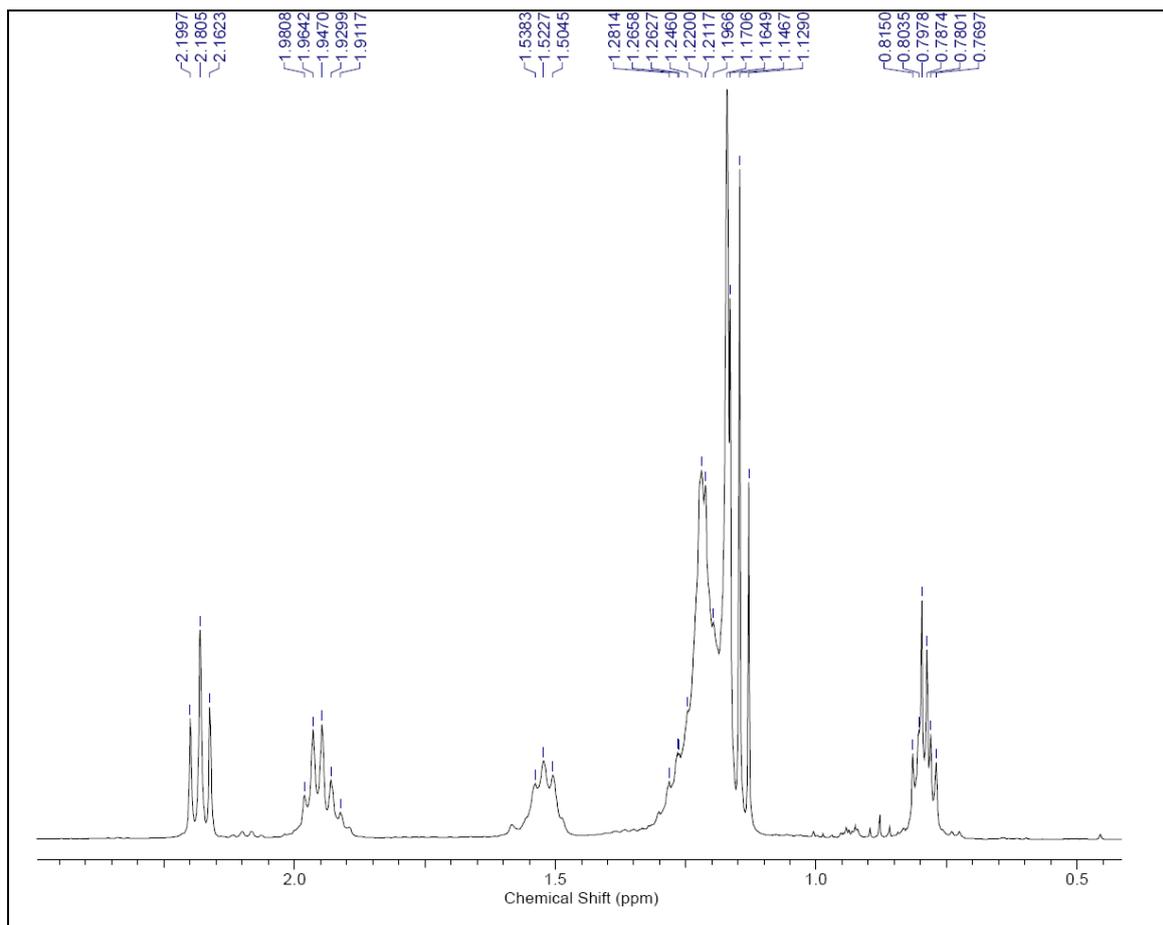


FIGURA 4.72- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de triglicerídeos ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

#### 4.4. Metabólitos Secundários de *Alternaria alternata* identificadas no co-cultivo via LC-MS

##### 4.4.1. Avaliação dos metabólitos no co-cultivo

Uma vez otimizados os parâmetros no espectrômetro de massas foram realizadas análises de micotoxinas existentes no fungo *A. alternata* utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, utilizando como ferramenta do software Mass Lynx V4.1 a opção de íons selecionados. Inicialmente foram injetadas como padrão as micotoxinas isoladas, o alternariol

e o alternariol monometil éter, e analisadas via *ESI* modo positivo. Como resultado foram obtidos cromatogramas onde podem-se observar bandas com tempo de retenção de 25,64 minutos para o alternariol e 31,20 minutos para a micotoxina alternariol monometil éter. Nas FIGURAS 4.73 e 4.76 estão ilustrados os cromatogramas de íons selecionados bem como seus espectros de íons produtos.

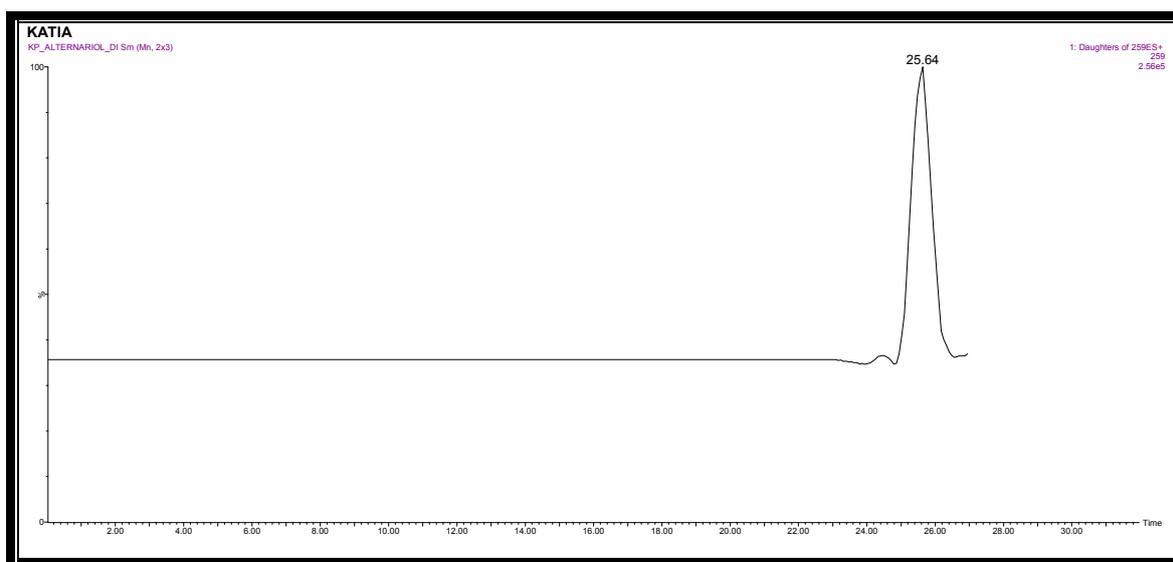


FIGURA 4.73- Cromatograma de íon selecionado para a micotoxina alternariol.

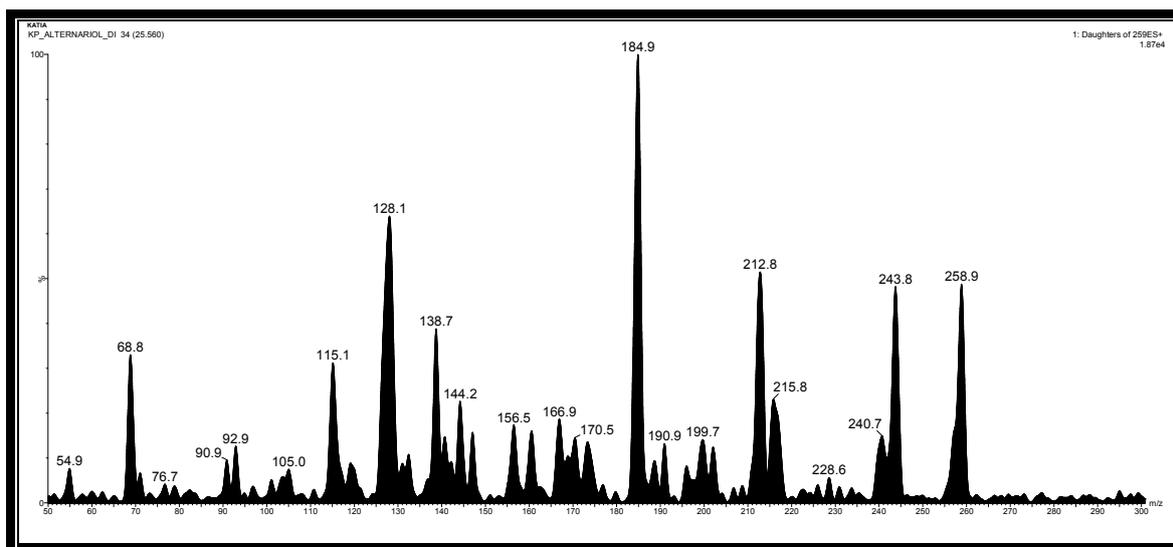


FIGURA 4.74- Espectro do íon produto  $[M+H]^+$  259 obtido via  $ESI^+$  com 32 eV da micotoxina alternariol.

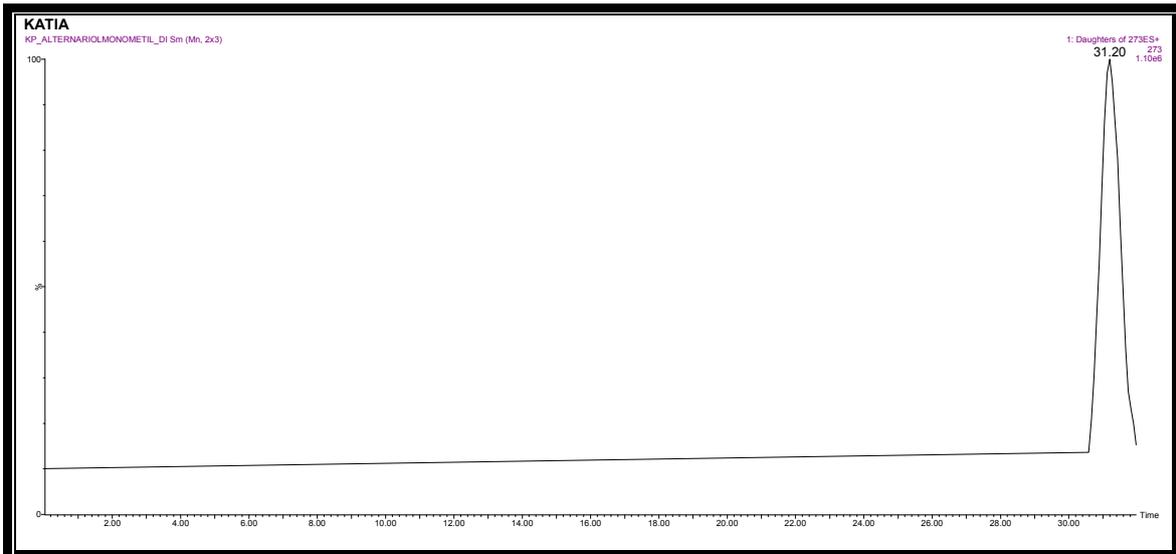


FIGURA 4.75- Cromatograma de íon selecionado para a micotoxina alternariol monometil éter.

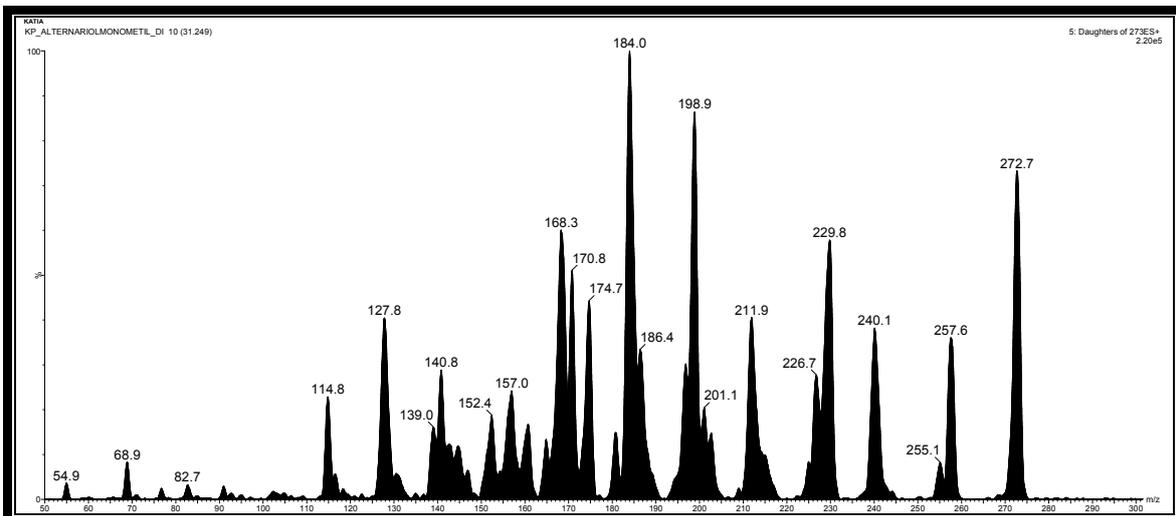


FIGURA 4.76- Espectro do íon produto  $[M+H]^+$  273 obtido via ESI<sup>+</sup> com 32 eV da micotoxina alternariol monometil éter.

A micotoxina ácido tenuazônico foi identificada no extrato de *A. alternata* a qual apresentou uma banda de absorção no cromatograma de íon selecionado em 24, 81 minutos, representado na FIGURA 4.77:

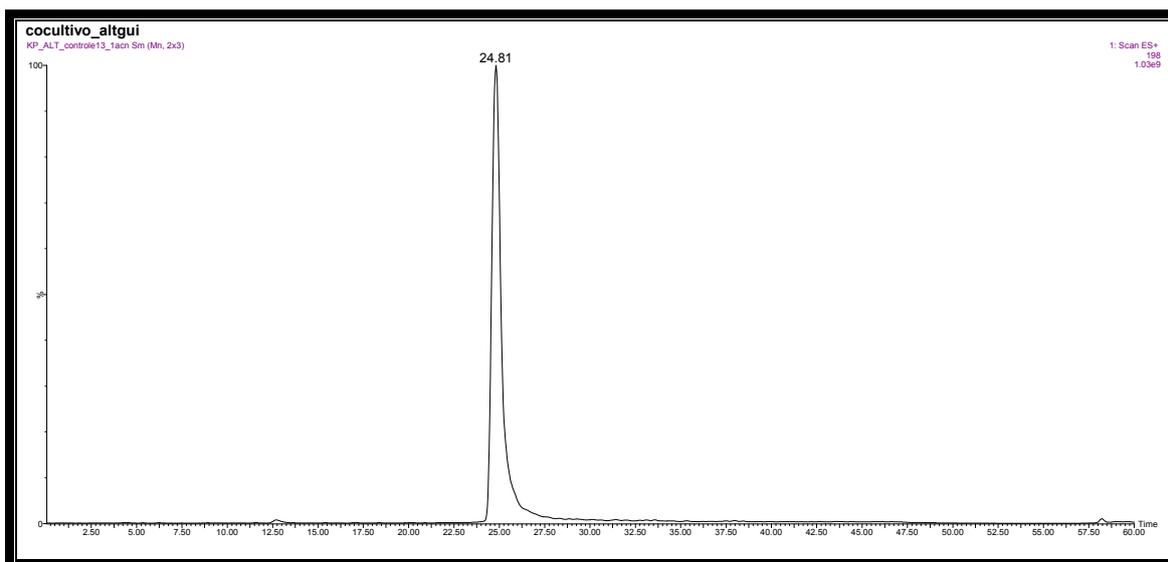


FIGURA 4.77- Cromatograma de íons selecionados.

Para confirmar que essa substância identificada refere-se ao ácido tenuazônico, foi feita a fragmentação do íon precursor,  $[M+H]^+$  198, o qual pelo perfil do espectro obtido e pela proposta de fragmentação pode-se confirmar a presença da micotoxina no extrato de *A. alternata*.

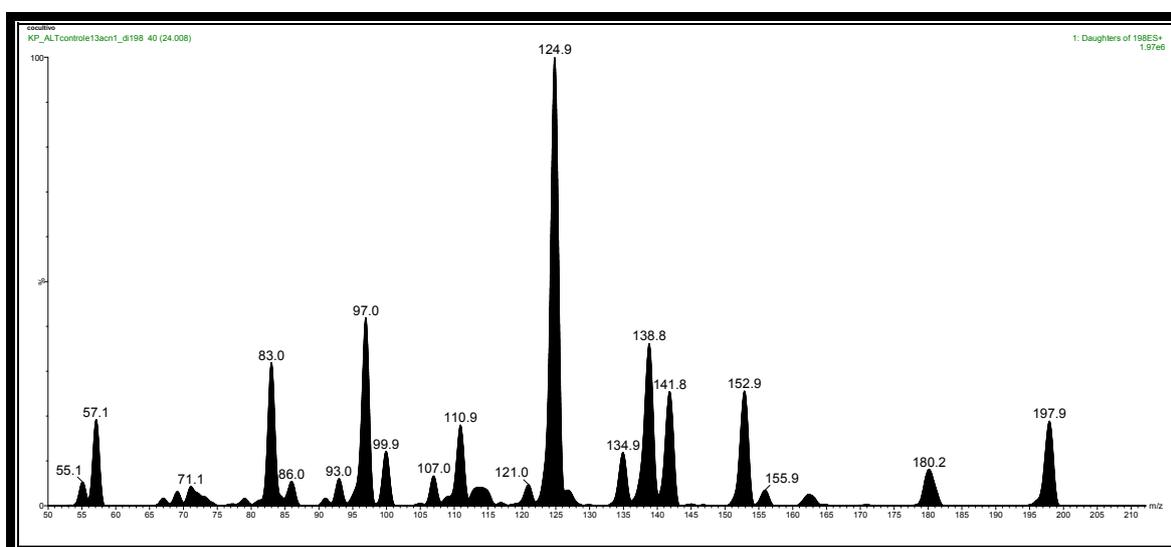
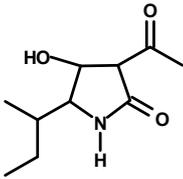
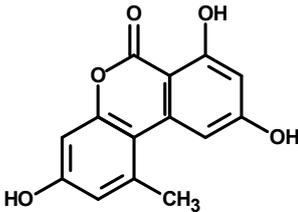
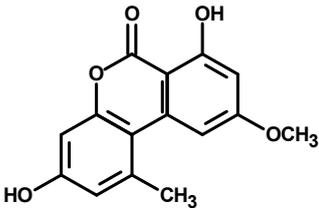


FIGURA 4.78- Espectro de íons produtos  $[M+H]^+$  198 obtido via ESI<sup>+</sup>, com 20 eV.

Resumidamente, a TABELA 4.14 traz os respectivos tempos de retenção obtidos e as u.m.a. das micotoxinas que foram utilizadas na otimização dos parâmetros necessários para análises.

TABELA 4.14- Micotoxinas de *A. alternata*

Micotoxina	u.m.a.	Tempo de retenção (minuto)
<p>Ácido Tenuazônico</p> 	197	24,81
<p>Alternariol</p> 	258	25,63
<p>Alternariol Monometil Éter</p> 	272	31,20

Uma vez otimizadas as condições para as análises, os experimentos de comparação de co-cultivo deram início. Como já foi dito anteriormente, foram realizados dois experimentos em paralelo, ou seja, os micro-organismos *Guignardia citricarpa* e *Alternaria alternata* foram inoculados com cinco dias de diferença, sendo que o *G. citricarpa* foi inoculado primeiro, e no segundo experimento foram inoculados ambos os fungos no mesmo dia. Após 13 dias

de experimentos, foi feito um extrato do micro-organismo da região de intersecção dos fungos.

Para cada experimento foi feito um cultivo dos micro-organismos para o controle (FIGURA 4.79). A foto **A** ilustra *A. alternata* com 8 dias de crescimento, a foto **B** *A. alternata* com 13 dias de crescimento e a foto **C** *G. citricarpa* com 13 dias de crescimento.

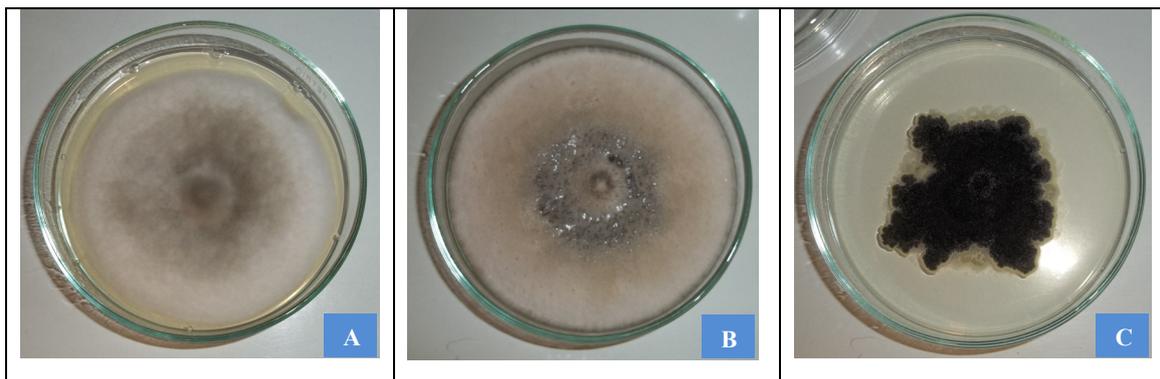


FIGURA 4.79- Controle dos micro-organismos: A) *A. alternata* com 8 dias de crescimento; B) *A. alternata* com 13 dias de crescimento; C) *G. citricarpa* com 13 dias de crescimento.

A FIGURA 4.80 mostra os resultados de experimento de co-cultivo, onde *A. alternata* foi inoculado após cinco dias de crescimento de *G. citricarpa*. A foto **A** mostra o início do experimento e **B** o final do mesmo.

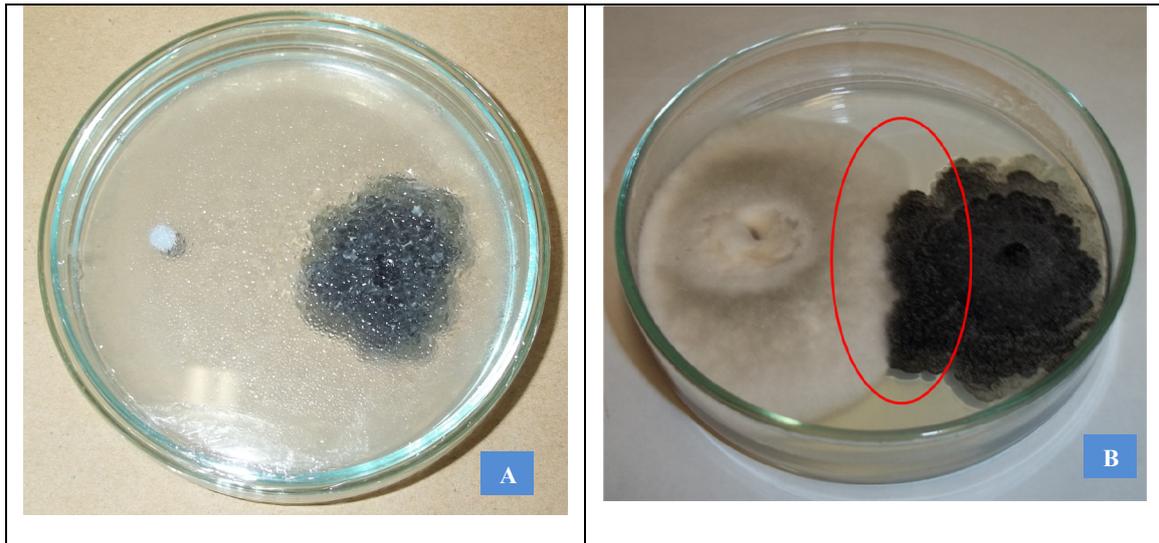


FIGURA 4.80- Experimentos de co-cultivo de *Guignardia citricarpa* e *Alternaria alternata*: A) Inoculação de *A. alternata* após 05 dias de crescimento de *G. citricarpa*; B) Final do experimento com o crescimento de ambos os fungos.

A FIGURA 4.81 mostra os resultados de experimento de co-cultivo, onde *A. alternata* e *G. citricarpa* foram inoculados ao mesmo tempo na placa de Petri. A foto **A** mostra o início do experimento e **B** o final do mesmo.

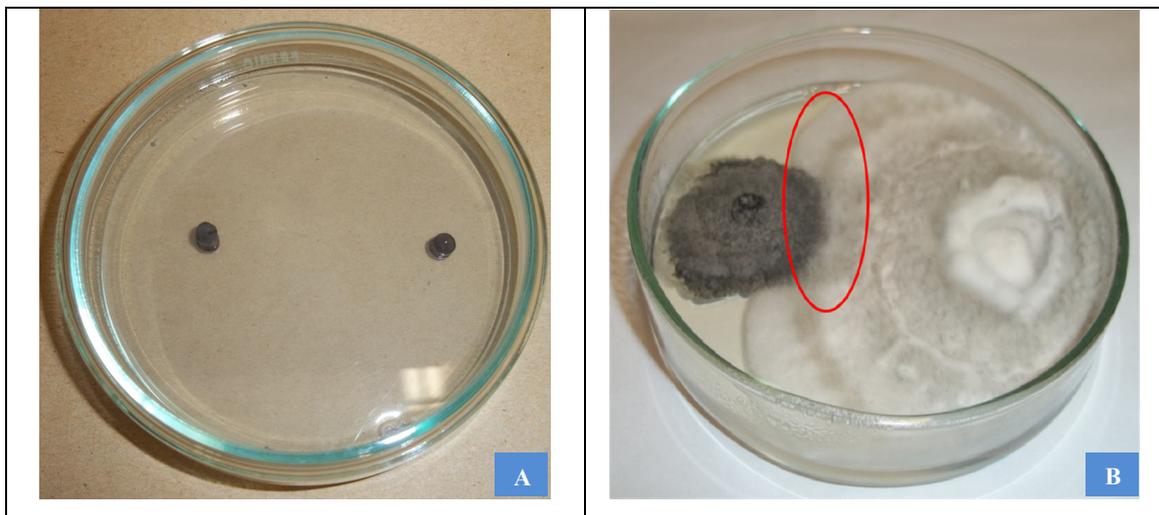


FIGURA 4.81- Experimentos de co-cultivo de *Guignardia citricarpa* e *Alternaria alternata*: A) Inoculação de *A. alternata* e *G. citricarpa* ao mesmo tempo; B) Final do experimento com o 13 dias de crescimento de ambos os fungos.

Observa-se que quando *A. alternata* e *G. citricarpa* são inoculados ao mesmo momento na placa de Petri, o micro-organismo causador da mancha marrom de alternaria tem o seu crescimento acelerado quando comparado com o experimento onde o agente causal da mancha preta dos citros é inoculado primeiro (FIGURA 4.81). Quando o *G. citricarpa* é inoculado primeiro na placa de Petri, observa-se que o mesmo consegue ter o seu desenvolvimento um pouco mais evidenciado, como pode ser visto na FIGURA 4.80.

Para simplificar a discussão, a partir desse momento os experimentos serão chamados por siglas, como pode ser observado na TABELA 4.15:

TABELA 4.15- Siglas dos experimentos de co-cultivo de micro-organismos causadores de doenças de citros

<b>Experimentos</b>	<b>Siglas</b>
Fungos inoculados com cinco dias de diferença	EXPa
Fungos inoculados no mesmo dia	EXPb
Controle <i>Guignardia citricarpa</i>	CG
Controle <i>A. alternata</i> para fungos inoculados com cinco dias de diferença	CA-EXPa
Controle <i>A. alternata</i> para fungos inoculados no mesmo dia	CA-EXPb
Co-cultivo de <i>G. citricarpa</i> e <i>A. alternata</i> para fungos inoculados com cinco dias de diferença	GA-EXPa
Co-cultivo de <i>G. citricarpa</i> e <i>A. alternata</i> para fungos inoculados no mesmo dia	GA-EXPb

Deste modo, para compreender melhor o metabolismo de *A. alternata* os extratos foram analisados via LC-MS. Inicialmente foi realizada uma comparação de ambos os experimentos com a finalidade de observar possíveis alterações no perfil químico. Em um primeiro momento, foi realizada uma

comparação dos experimentos através dos extratos dos controles dos dois micro-organismos, os quais podem ser observados na FIGURA 4.82:

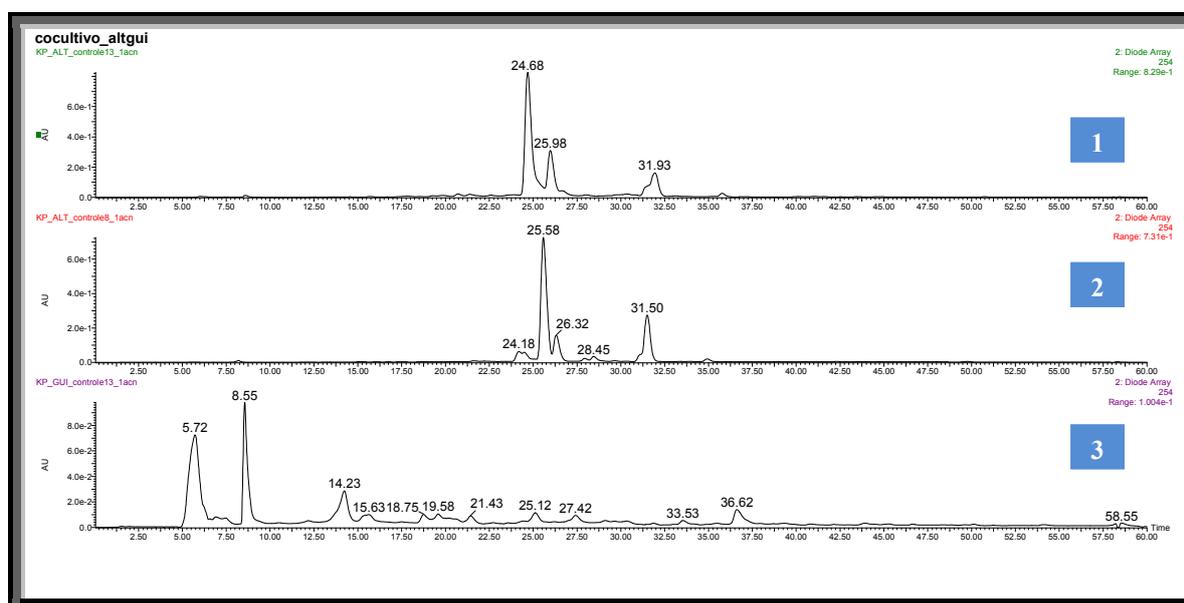


FIGURA 4.82- Cromatograma *full scan* dos extratos dos controles: 1) CA-EXPa; 2) CA-EX Pb; 3) CG; (UV- 254 nm).

O cromatograma *full scan* (FIGURA 4.82) foi possível observar três picos com tempos de retenção respectivamente para CA-EXPa (1) e CA-EX Pb (2), 24,18 e 24,68; 25,58 e 25,98; 31,50 e 31,93 minutos, no entanto, estes dados não foram observados no cromatograma referente ao controle de *G. citricarpa*. O tempo de retenção destes picos sugere a presença das toxinas ácido tenuazônico, alternariol e alternariol monometil éter. Estas toxinas mostraram tempos de retenção muito próximos quando analisados separadamente nas mesmas condições, como pode ser visto na TABELA 4.14.

Um dado que chama a atenção são duas toxinas com tempo de retenção de aproximadamente 24 minutos e 25 minutos, os quais podem ser atribuídos às toxinas ácido tenuazônico e alternariol, respectivamente. Observa-se que no extrato CA-EXPa a micotoxina majoritária é o alternariol (24,6 minutos) e no extrato CA-EX Pb é o ácido tenuazônico (25,6 minutos). Essa diferença pode estar diretamente relacionada ao desenvolvimento do micro-organismo, onde no

extrato CA-EXPb o fungo já está com seu metabolismo desenvolvido e com esporos formados. O mesmo não ocorreu no extrato CA-EXPa, onde o micro-organismo permaneceu em crescimento por apenas 8 dias. Já o alternariol monometil éter (31,9 e 31,5 minutos) permanece praticamente inalterado nos dois extratos, como pode ser observado no cromatograma *full scan* na FIGURA 4.82.

Visando confirmar a presença destas toxinas nos extratos CA-EXPa e CA-EXPb, utilizou-se a ferramenta do software Mass Lynx V4.1, analisando os íons selecionados  $m/z$  198 (ácido tenuazônico),  $m/z$  259 (alternariol) e  $m/z$  273 (alternariol monometil éter).

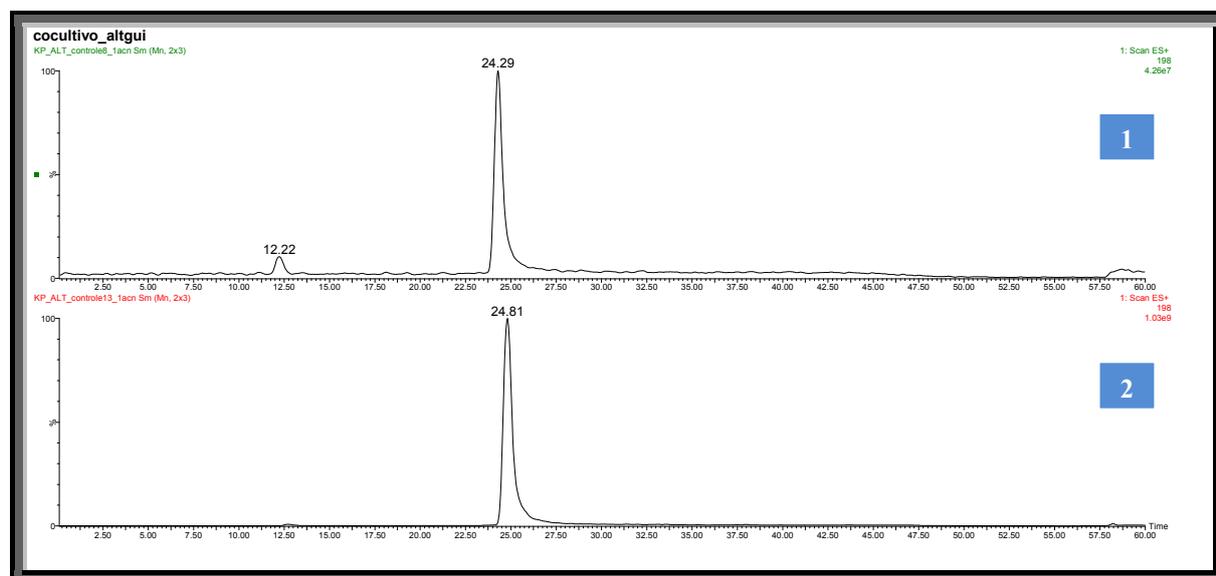


FIGURA 4.83- Cromatograma de íons selecionados de ácido tenuazônico dos extratos: 1) CA-EXPa; 2) CA-EXPb. ( $m/z$  198).

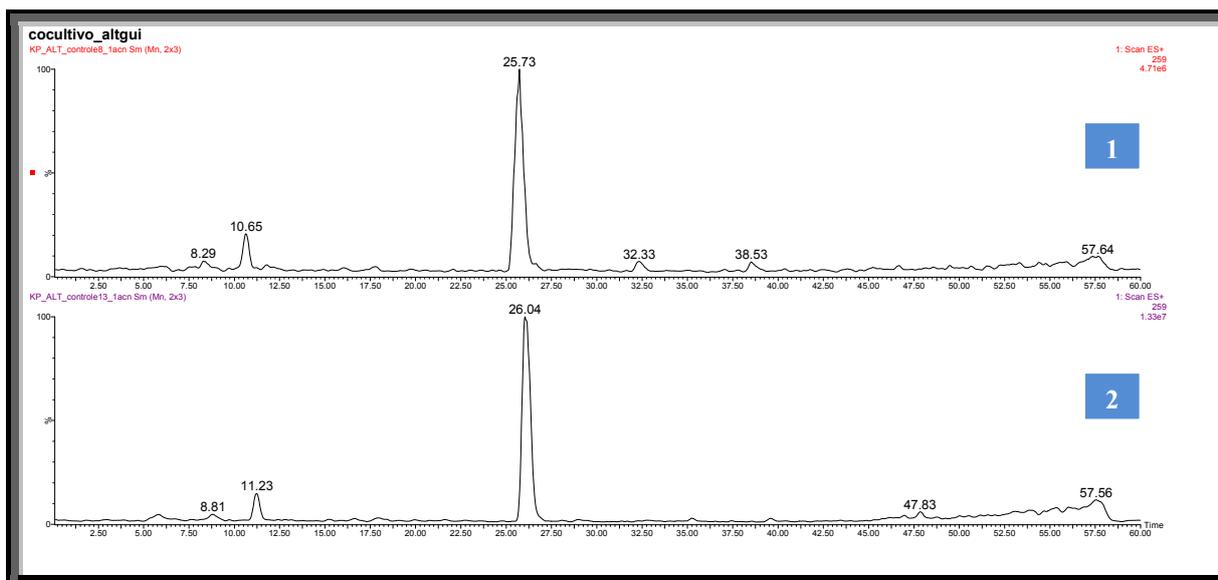


FIGURA 4.84- Cromatograma de íons selecionados de alternariol dos extratos: 1) CA-EXPa; 2) CA-EXPb. ( $m/z$  259).

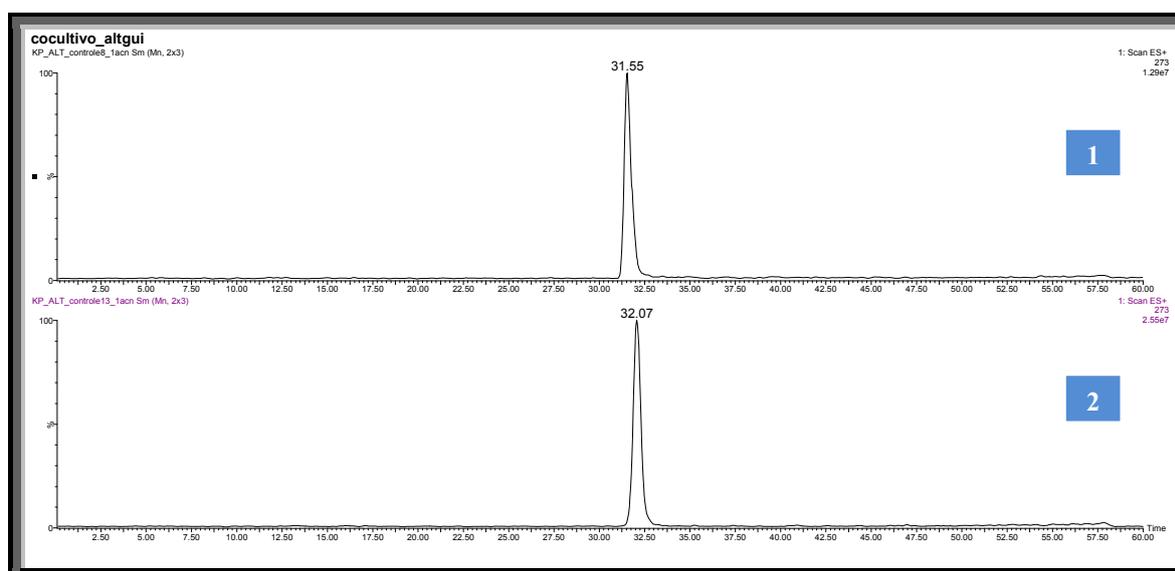


FIGURA 4.85- Cromatograma de íons selecionados de alternariol monometil éter dos extratos: 1) CA-EXPa; 2) CA-EXPb. ( $m/z$  273).

Como pode ser observado nos cromatogramas de íons selecionados apresentados (FIGURA 4.83; 4.84 e 4.85), para todos os íons as bandas de absorção são registradas em tempos de retenção bem próximos aos das micotoxinas utilizadas como padrão. Com isso pode-se confirmar a presença desses metabólitos produzidos pelo micro-organismo.

No entanto, não basta apenas verificar a presença dessas toxinas somente nos extratos dos controles. Portanto foi realizada a mesma análise com o extrato obtido na região de intersecção dos micro-organismos, denominada GA. No cromatograma *full scan* (FIGURA 4.82) no modo UV o qual também foi possível observar três picos com tempos de retenção, os quais indicam as mesmas micotoxinas como descritas anteriormente na TABELA 4.14, sugerindo, portanto a presença destas também nesses extratos.

A FIGURA 4.86 traz uma comparação dos extratos GA trabalhados através dos cromatogramas de *full scan*.

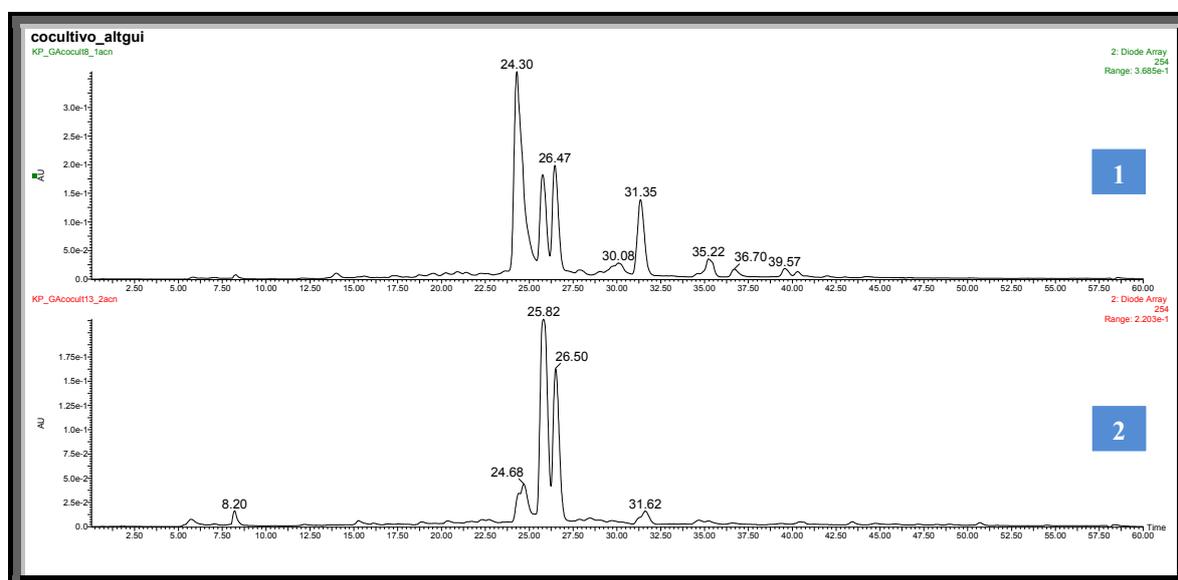


FIGURA 4.86- Cromatograma *full scan* dos extratos de GA: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb (UV- 254 nm).

Uma vez proposta à presença das micotoxinas discutidas anteriormente, foram processados os cromatogramas de íons selecionados de  $m/z$  198,  $m/z$  259,  $m/z$  273, os quais seguem descritos nas FIGURAS 4.87, 4.88 e 4.89.

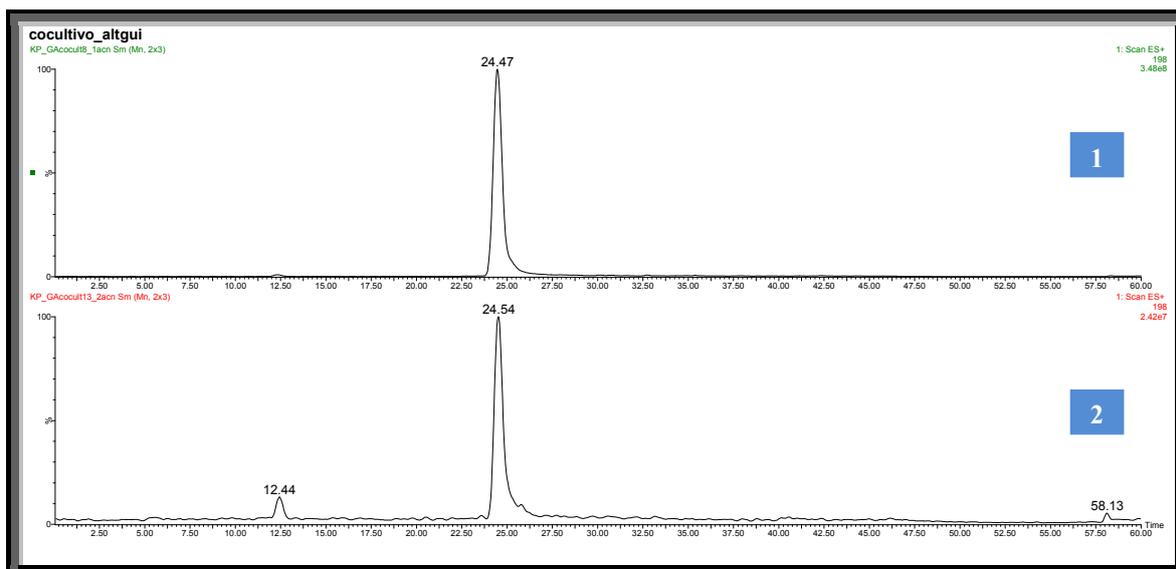


FIGURA 4.87- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$  198 – ácido tenuazônico) do extratos de GA: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb.

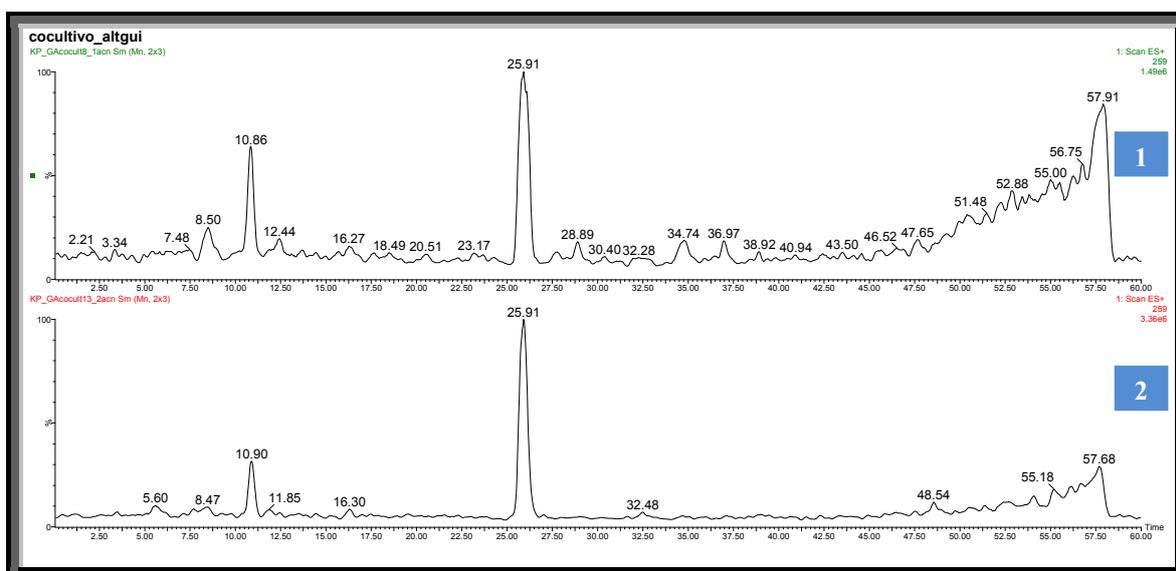


FIGURA 4.88- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$  259 - alternariol) do extratos de GA: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb.

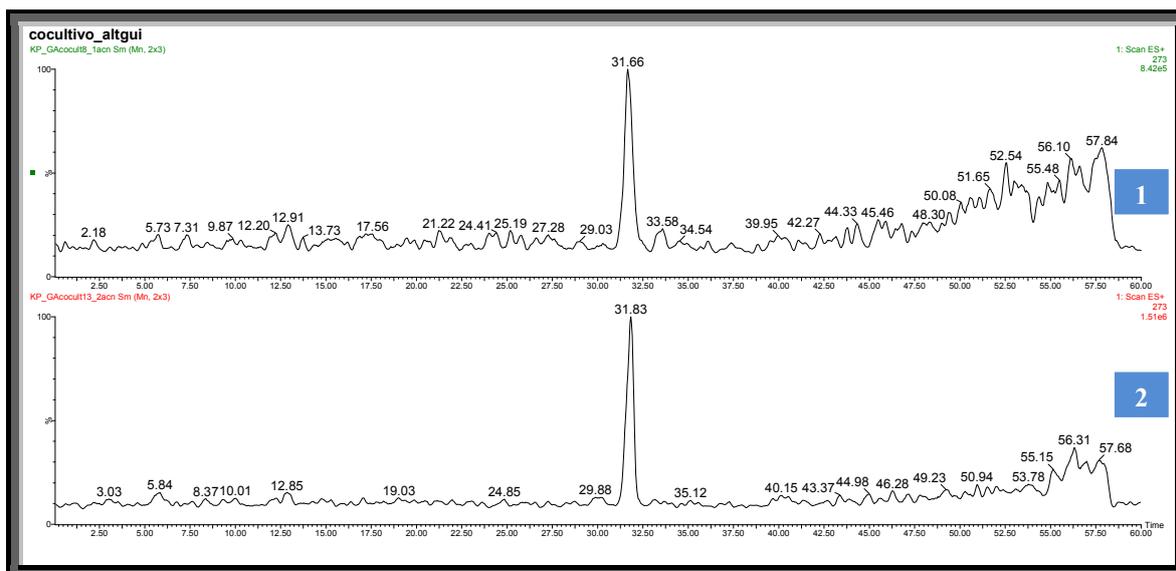


FIGURA 4.89- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$  273 – alternariol monometil éter) do extratos de GA: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb.

Observando todos os cromatogramas de íons selecionados nos extratos de GA, pode-se mais uma vez concluir que as micotoxinas ácido tenuazônico, alternariol e alternariol monometil éter estão presentes.

Uma vez que existem as toxinas nos extratos dos controles e nos extratos da região de intersecção dos micro-organismos (GA) é de extrema importância uma comparação desses extratos para uma análise mais aprofundada em relação ao metabolismo de *A. alternata*. Para isso foi feita uma comparação dos cromatogramas *full scan* no modo UV de todos os extratos em ambos os experimentos, o qual segue descrito na FIGURA 4.90.

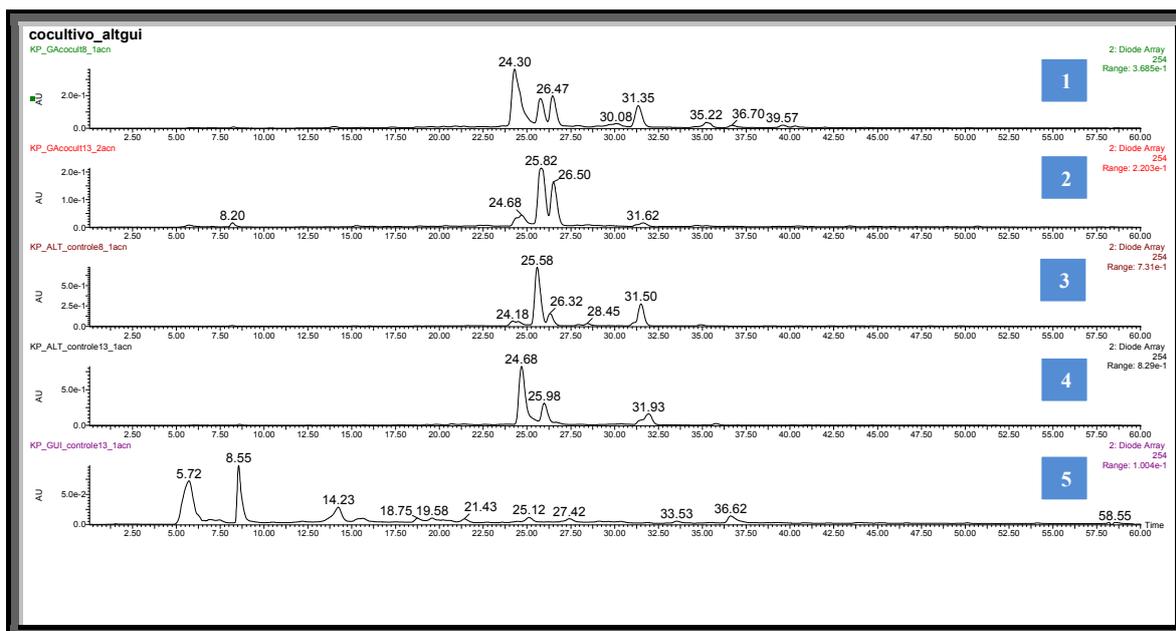


FIGURA 4.90- Cromatograma *full scan* dos extratos: 1) GA-EXPa; 2) GA-EXPb; 3) CA-EXPa; 4) CA-EXPb; 5) CG; (UV- 254 nm).

O cromatograma *full scan* descrito na FIGURA 4.91 pertencem aos extratos quando o fungo *A. alternata* foi inoculado após cinco dias de crescimento de *G. citricarpa*. Nesse período pode-se observar pelo cromatograma que no CA-EXPa a micotoxina ácido tenuazônico (tr 24,18 min) está em menor concentração e o alternariol (tr 25,58 min) é a toxina majoritária. No entanto ao analisar o extrato GA EXPa ocorre uma inversão, isto é, o ácido tenuazônico (tr 24,30 min) passa a ser a toxina majoritária.

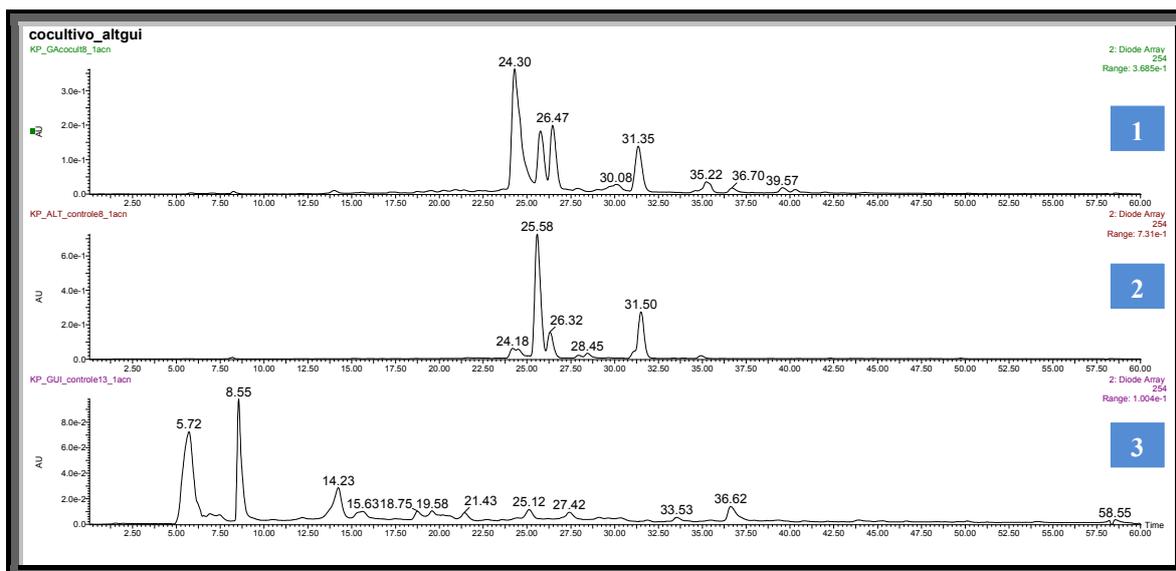


FIGURA 4.91- Cromatograma *full scan* dos extratos: 1) GA-EXPa; 2) CA-EXPa; 3) CG; (UV- 254 nm).

Para uma melhor interpretação dos resultados, já é de conhecimento na literatura que a concentração do ácido tenuazônico aumenta a partir de cinco dias de cultivo, atingindo seu valor máximo entre o 13<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia (STICKINGS, *et al.*, 1961). Outra informação importante é que a rota biossintética dessa toxina é proveniente da via do acetato, o qual utiliza um aminoácido, a iso-leucina e a enzima Acetil CoA para a sua formação, como mostra a FIGURA 4.92, e a biossintese da micotoxina alternariol é também originada pela via do acetato, porém envolvendo uma cadeia bem maior (FIGURA 4.93).

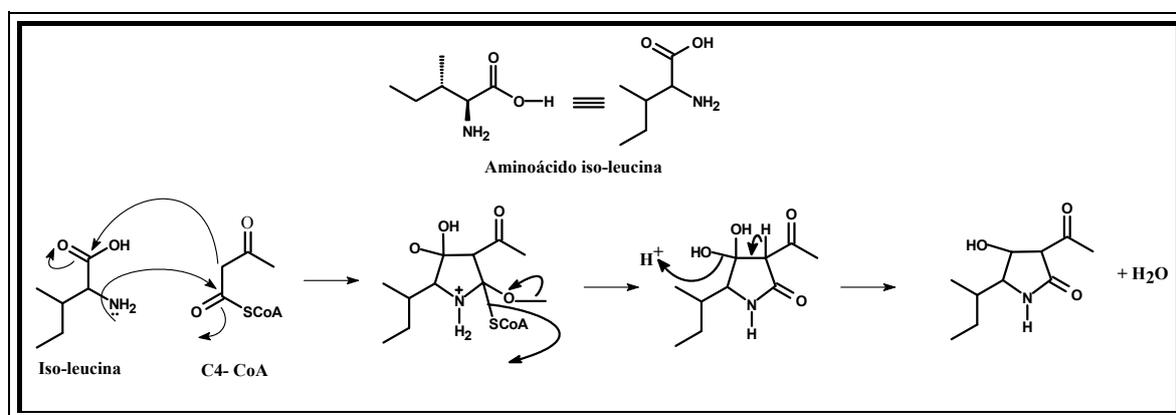


FIGURA 4.92- Biossintese da micotoxina Ácido tenuazônico.

Outra informação importante é que as toxinas alternariol e alternariol monometil éter, também tem a sua biossíntese proveniente da via do acetato, sendo que a rota biossintética do alternariol esta descrita na FIGURA 4.93.

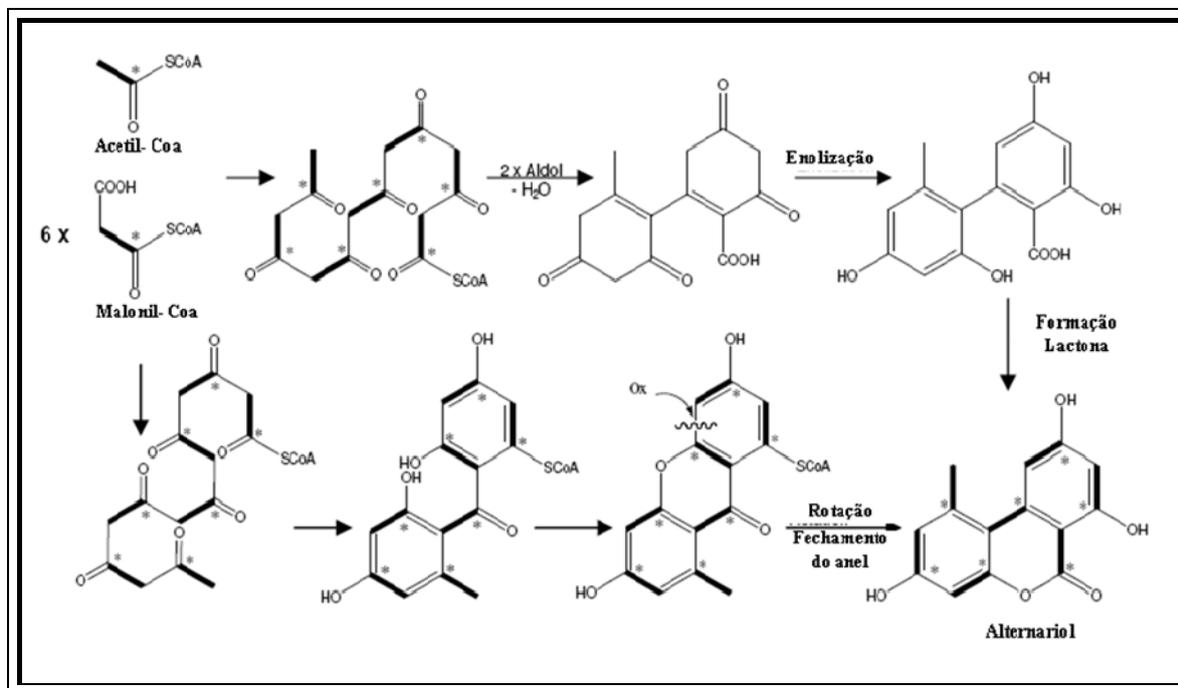


FIGURA 4. 93- Biossíntese da micotoxina Alternariol.

Portanto, se sugere numa primeira observação que *A. alternata* em apenas 08 dias no meio de cultura em contato com outro micro-organismo, não estava em condições favoráveis para o seu desenvolvimento, visto que quando este foi inoculado no meio de cultura, *G. citricarpa* já estava presente e seu metabolismo em crescente desenvolvimento. Com isso, *A. alternata* para se defender e se desenvolver desviou o seu metabolismo a favorecer a rota de biossíntese para o caminho dos aminoácidos, o qual sobrevém do ciclo de Krebs. Com isso, como o ácido tenuazônico é formado pelo aminoácido iso-leucina e pela Acetil-CoA sua formação é favorecida, e portanto é possível observar seu aumento significativamente. A FIGURA 4.94 esboça um esquematicamente um caminho favorecido bem resumidamente.

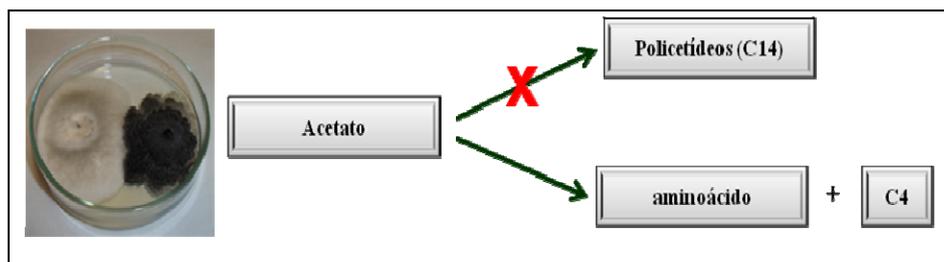


FIGURA 4. 94- Esquema de um caminho favorecido.

A FIGURA 4.95 ilustra o estudo utilizando a ferramenta de íons selecionados dos extratos da área de intersecção dos micro-organismos inoculados ao mesmo tempo (GA-EXPb), o controle de *A. alternata* (CA-EXPb) e o controle de *G. citricarpa* (CG). No cromatograma *full scan* obtido (FIGURA 4.91), foi possível observar que no CA-EXPb a micotoxina majoritária é o ácido tenuazônico (tr 24,68 min) e no extrato GA-EXPb a majoritária é o alternariol (tr 25,82 min), sendo que no extrato controle de *G. citricarpa* essas toxinas não estão presentes. Em ambos os extratos a micotoxina alternariol monometil éter permanece praticamente inalterada. No final de 13 dias de experimento, observando os resultados, pode-se sugerir que *A. alternata* teve seu desenvolvimento mais evidenciado devido a condições favoráveis podendo assim ter proporcionado uma maior esporulação.

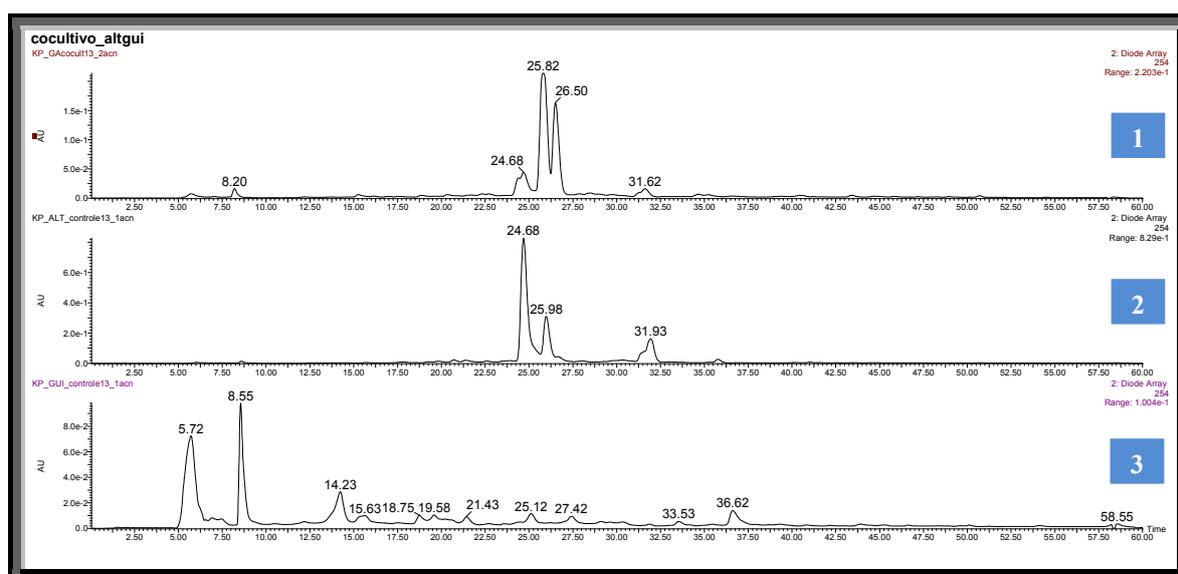


FIGURA 4.95- Cromatograma *full scan* dos extratos: 1) GA-EXPb; 2) CA-EXPb; CG; (UV- 254 nm).

Além desse fato, como já foi mencionado, a concentração do ácido tenuazônico aumenta a partir de cinco dias de cultivo, atingindo seu valor máximo entre o 13º e 15º dia (STICKINGS, *et al.*, 1961).

Ao analisar os cromatogramas de *full scan* representados na FIGURA 4.95, observa-se que o ácido tenuazônico no controle (CA-EXPb) se apresentava como a toxina majoritária, confirmando assim os dados da literatura, o qual afirma que a produção de ácido tenuazônico tem o seu ótimo em aproximadamente 14 dias de cultivo. No entanto o que pode ser observado é que quando se analisa a faixa de intersecção dos micro-organismos, o alternariol apresenta um aumento significativo e o ácido tenuazônico um decréscimo. Com isso pode-se sugerir que *A. alternata* para inibir o crescimento de *G. citricarpa* e provavelmente para se defender, favorece a produção de alternariol e alternariol monometil éter desativando a rota biossintética (ciclo de Krebs), para a produção do ácido tenuazônico. Com o aumento de alternariol e seu derivado, *A. alternata* se mostrou um patógeno fungistático para o crescimento de *G. citricarpa*.

A FIGURA 4.96 ilustra um esquema de um caminho favorecido bem resumidamente.

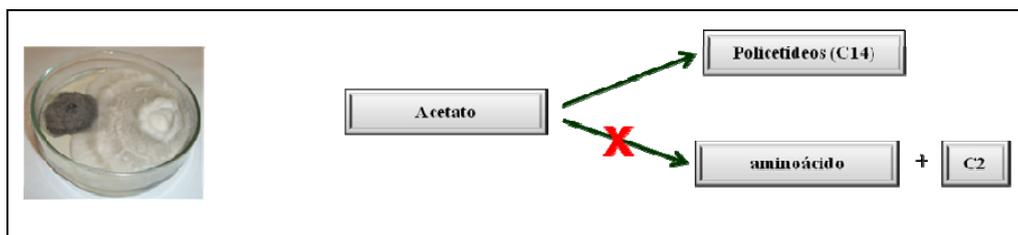


FIGURA 4.96- Esquema de um caminho favorecido.

Vale destacar que os micro-organismos apresentam metabolismos distintos, como por exemplo, *A. alternata* tem uma média de crescimento de 10

dias e o *G. citricarpa* aproximadamente 21 dias. Mesmo em relação à produção de esporos *G. citricarpa* é mais lenta.

#### **4.4.2. Identificação de toxinas de *A. alternata* como patógeno de citros**

Como já foi mencionado anteriormente *A. alternata* produz toxinas específicas para seus hospedeiros, como por exemplo, na presença de citros, ou seja, as ACTs (TABELA 1.3). Essas toxinas não foram isoladas no estudo do fungo desenvolvido em larga escala. Contudo estas poderiam estar presentes em concentração a serem detectadas apenas por espectrometria de massas. Assim o extrato de *A. alternata* obtido por desenvolvimento em placa durante 13 dias de cultivo, foi analisado por íons selecionados utilizando a ferramenta do software Mass Lynx V4.1, onde foram selecionados os íons referentes às toxinas ACTG de massas moleculares 346, 363, 365 e 400 Da.

##### **4.4.2.1. Análise do íon $[M+H]^+$ 347**

A toxina isolada do micro-organismo *A. citri*, o agente causal da mancha marrom de alternaria, foi isolada por KONO, *et. al* (1986), a qual é conhecida por ACTG. Essa toxina é conhecida por ser uma HSTs, ou seja, uma toxina específica encontrada em tangerinas Dancy e outras mandarinas. Na literatura são descritos dois isômeros de posição para esta toxina, onde varia somente a posição da hidroxila. A FIGURA 4.97 mostra estes dois isômeros.

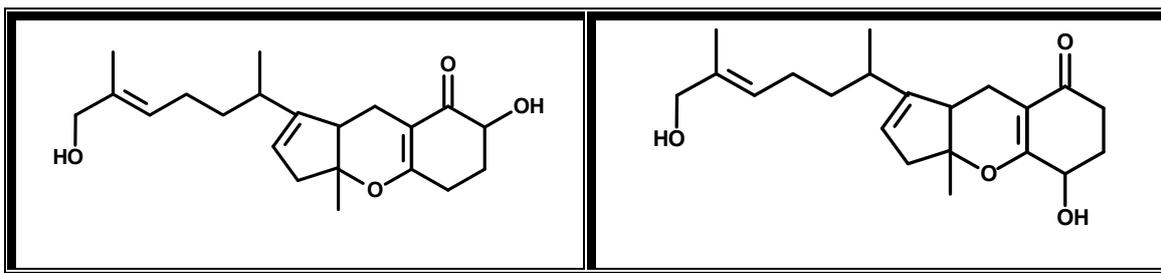


FIGURA 4.97- Toxina HSTs ACTG, 346 Da.

A fim de identificar essas duas toxinas no extrato de *A. alternata*, foi selecionado o íon  $[M+H]^+$  347. O cromatograma de íon selecionado da FIGURA 4.98  $[M+H]^+$  347, mostrou a presença deste em duas bandas cromatográficas uma em 25,36 minutos e a outra em 30,56 minutos com intensidade de 100 e 90%, respectivamente. Entretanto vale ressaltar que as demais bandas não foram analisadas por se tratarem de adutos.

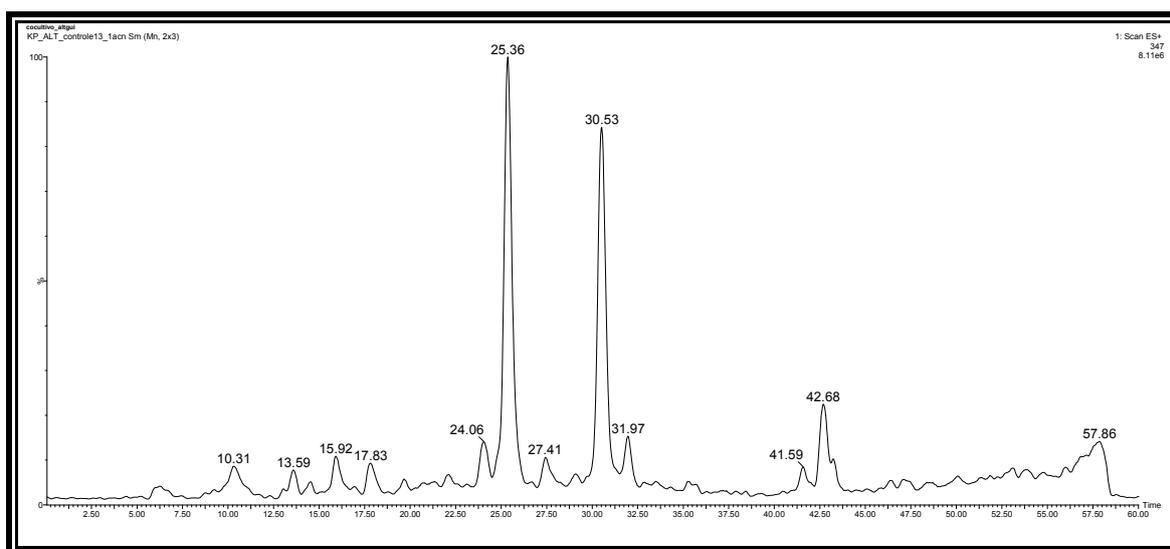


FIGURA 4.98- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$  347) do extrato de *A. alternata* (CA-EXPb).

Para contatar os metabólitos referentes aos tempos de retenção de 25 e 30 minutos aproximadamente, foi feita a fragmentação do íon precursor  $m/z$  347, para os dois tempos de retenção, onde pode ser obtido o espectro de íons

produtos, os quais estão ilustrados nas FIGURAS 4.99 e 4.100. Para uma melhor fragmentação dos íons precursores foram utilizadas as energias de 15 e 20 eV.

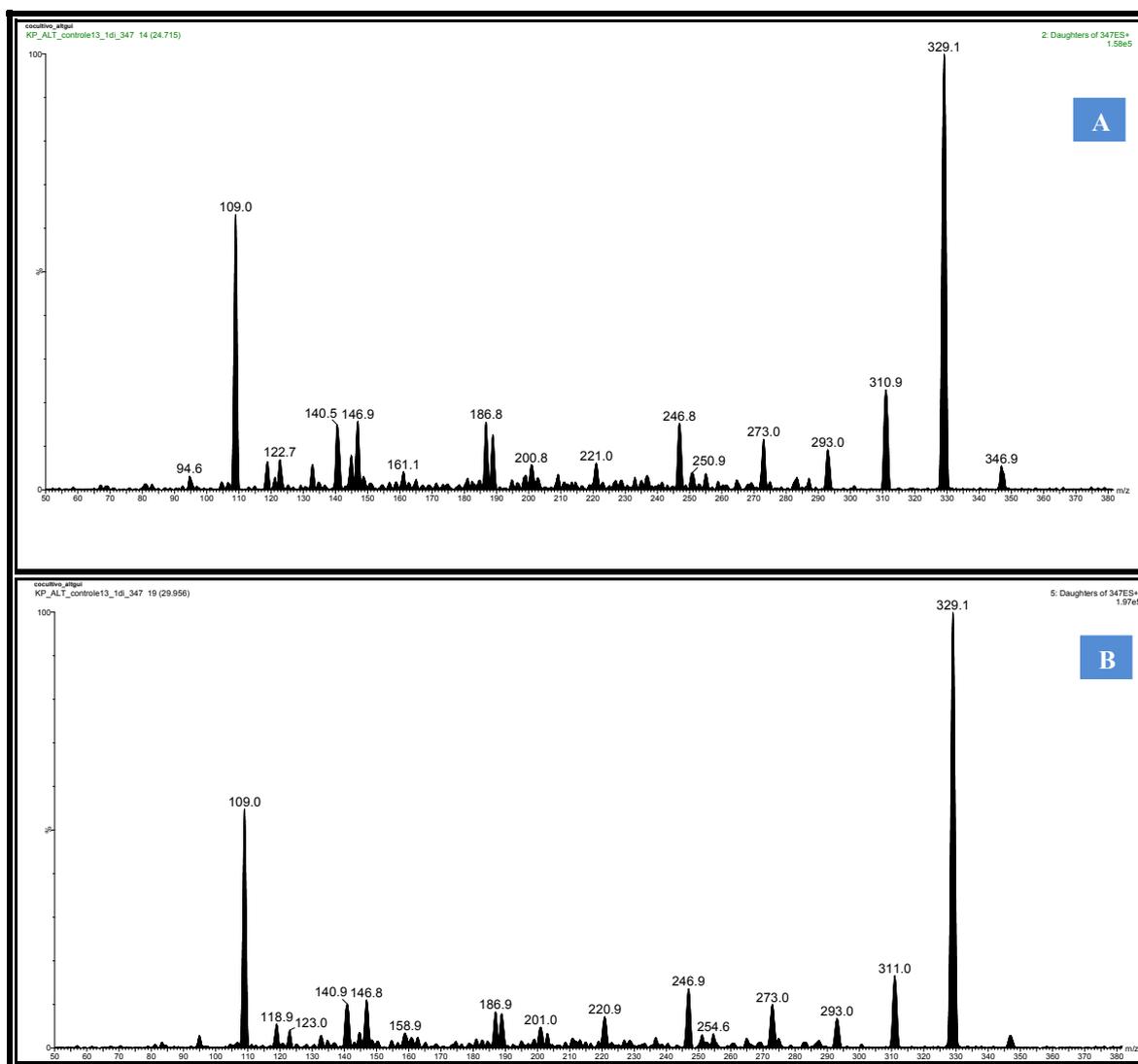


FIGURA 4.99- Espectro de íons produtos  $[M+H]^+$  347 obtido via ESI<sup>+</sup>, com 15 eV: A) 25 minutos; B) 30 minutos.

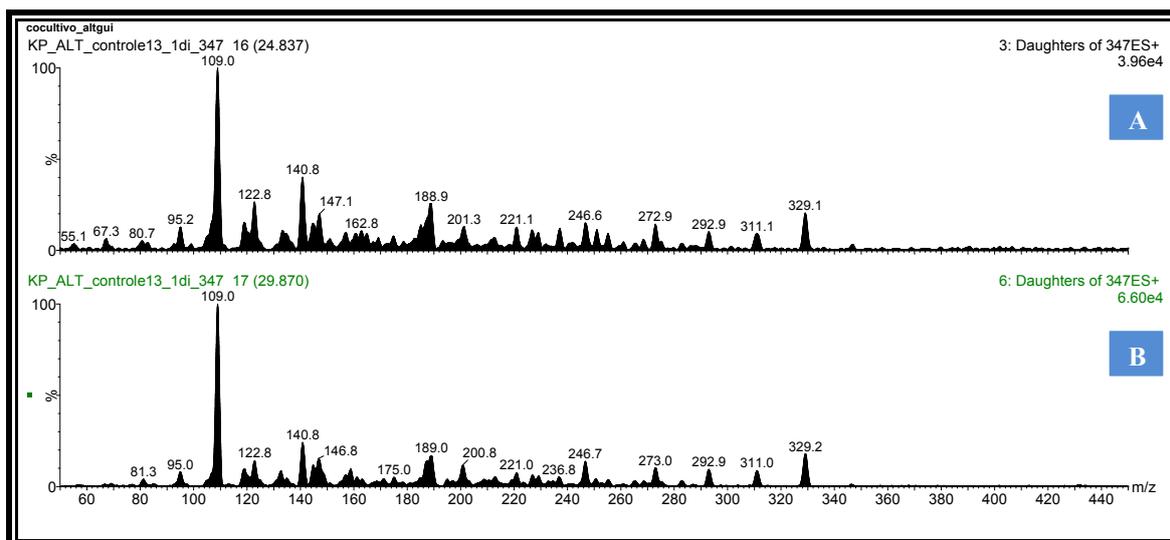


FIGURA 4.100- Espectro de íons produtos  $[M+H]^+$  347 obtido via ESI<sup>+</sup>, com 20eV: A) 25 minutos; B) 30 minutos.

De acordo com o perfil do espectro dos íons produtos, pode-se sugerir um caminho de fragmentação para as estruturas as quais foram lustradas na FIGURA 4.97. Ambas as estruturas são semelhantes, exceto pela posição da hidroxila,  $\alpha$  ou  $\gamma$  à carbonila. Portanto, devido a essa diferença, apenas a fragmentação envolvendo a quebra do anel seria conclusiva para a confirmação dos isômeros. As demais fragmentações envolvendo a cadeia lateral seriam as mesmas para as duas toxinas.

Portanto, observando o espectro de íons produtos, foram propostos alguns perfis de fragmentação. Um deles se inicia ocorrendo a perda de uma molécula de água a partir do íon  $m/z$  347 fornecendo um íon  $m/z$  329 com uma intensidade de 100%, quando foi fragmentado com uma energia de 15 eV ou com uma intensidade de 30% quando fragmentado com uma energia de 20eV.

A partir também de  $m/z$  347, o qual ocorre perde de toda a cadeia lateral juntamente com o anel de cinco membros, pode-se detectar o íon  $m/z$  141 com uma intensidade de 40% para a energia de colisão de 20eV. Nesse íon rapidamente pode ocorrer à perda de uma molécula de água detectando assim o íon de razão massa/carga de 123.

Pode ocorrer também fragmentação similar à Retro Diels-Alder envolvendo abertura no anel de seis membros com o heteroátomo de oxigênio, origina o íon  $m/z$  207, o qual pode perder uma molécula de água produzindo o íon  $m/z$  189.

A partir do íon  $m/z$  329, a saída da cadeia lateral pode formar o íon  $m/z$  109 com uma intensidade de 100% para a energia de 20eV. Essas propostas de fragmentação podem ser observadas na FIGURA 4.101.

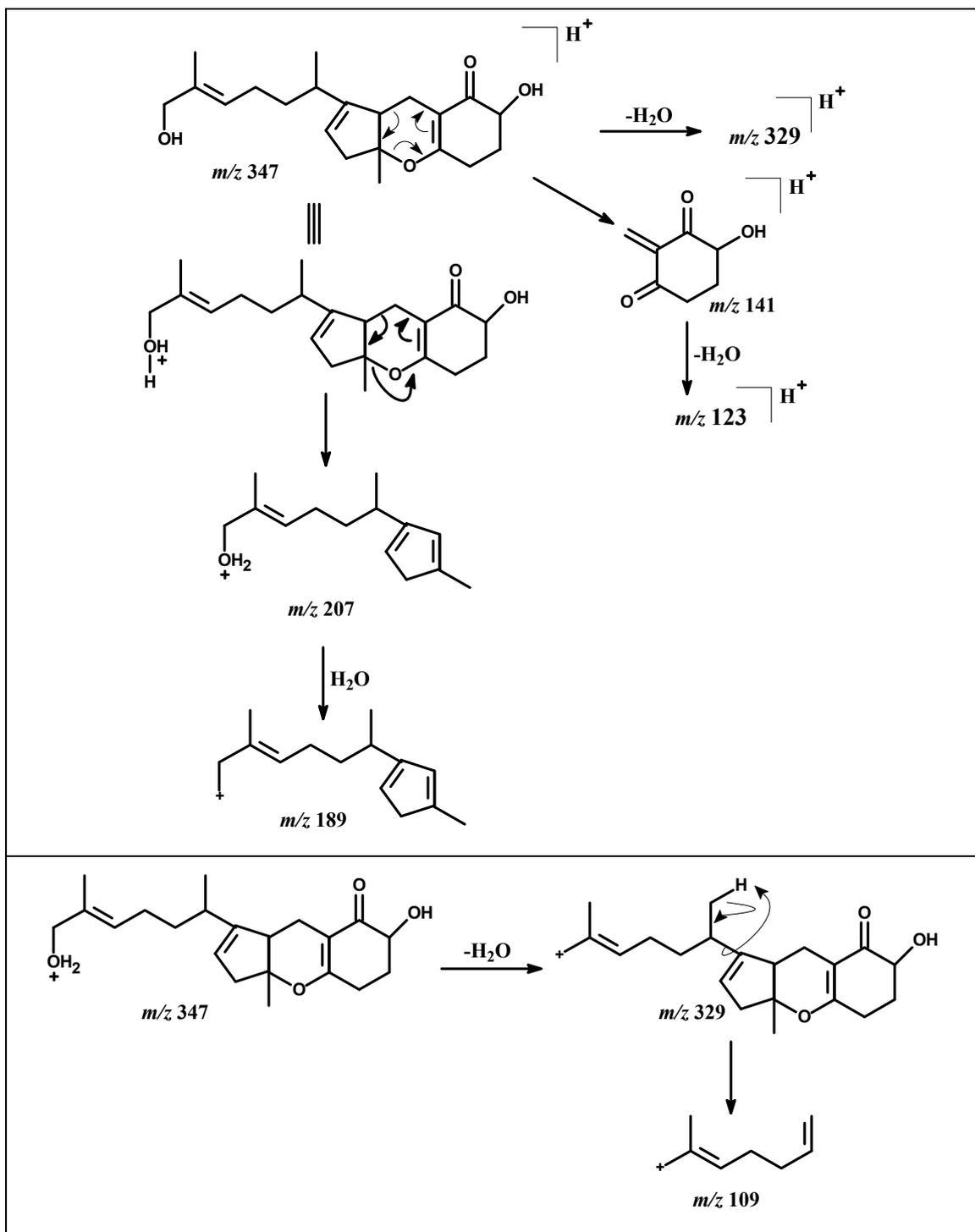


FIGURA 4.101- Proposta de fragmentação para  $[M+H]^+$  347.

Para diferenciar os dois isômeros, seria necessário observar nos espectros de íons produtos a razão massa/carga que referente aos íons propostos na FIGURA 4.102. No entanto esses íons não foram detectados. Contudo, pode-se sugerir a existência desses isômeros devido aos tempos de retenção próximos e

devido aos perfis de fragmentação da cadeia lateral idêntica para ambas às toxinas, mas não se pode concluir a presença deles.

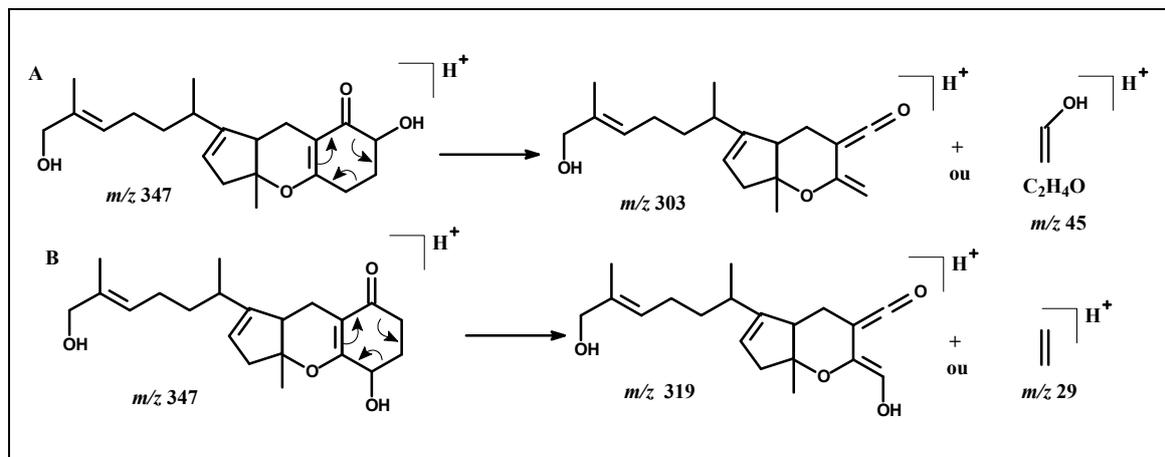


FIGURA 4.102- Proposta de fragmentação para diferenciar os possíveis isômeros de  $[M+H]^+$  347.

#### 4.4.2.2. Análise do íon $[M+H]^+$ 363

Uma micotoxina de *A. alternata*, foi isolada por KONO, *et. al* (1986), a qual é conhecida por ACTG. Essa micotoxina é uma HSTs, ou seja, uma toxina específica encontrada em tangerinas e em seus híbridos cuja massa molar é 362 Da.

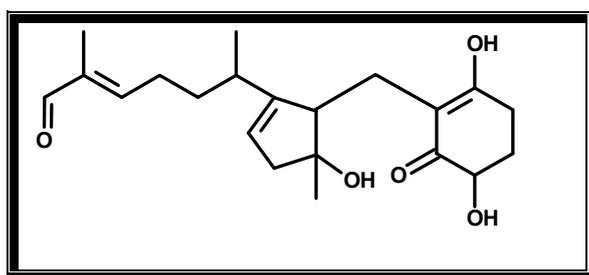


FIGURA 4.103- Toxina HSTs ACTG, 362 Da.

Com o propósito de procurar íons da ACTG no extrato CA-EXPb (TABELA 4.15) de *A. alternata*, foi realizado o monitoramento do íon  $m/z$  363

utilizando a ferramenta do software mass Lynx V4.1 de íons selecionados. Para isso, foi selecionada a razão massa/carga de 363, onde foi possível observá-lo em duas bandas cromatográficas com um tempo de retenção de 25,74, e 30,29 minutos respectivamente, como pode ser observado na FIGURA 4.104, sugerindo a presença de isômeros no extrato. As demais bandas não foram analisadas por se tratarem de adutos.

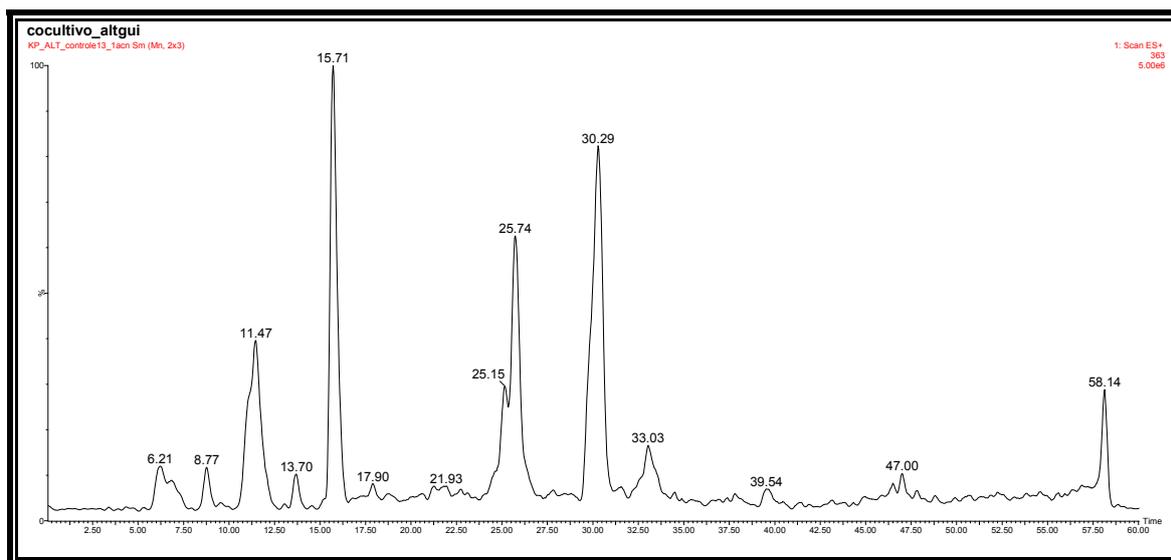


FIGURA 4.104- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$  363) do extrato CA-EXPb de *A. alternata*.

Para identificar com clareza os metabólitos condizentes com esses tempos de retenção foi feita a fragmentação do íon precursor  $m/z$  363 onde foi será obtido os espectros de íons produtos ilustrados nas FIGURAS 4.105. Para a fragmentação dos íons precursores foram utilizados as energias de 15 eV.

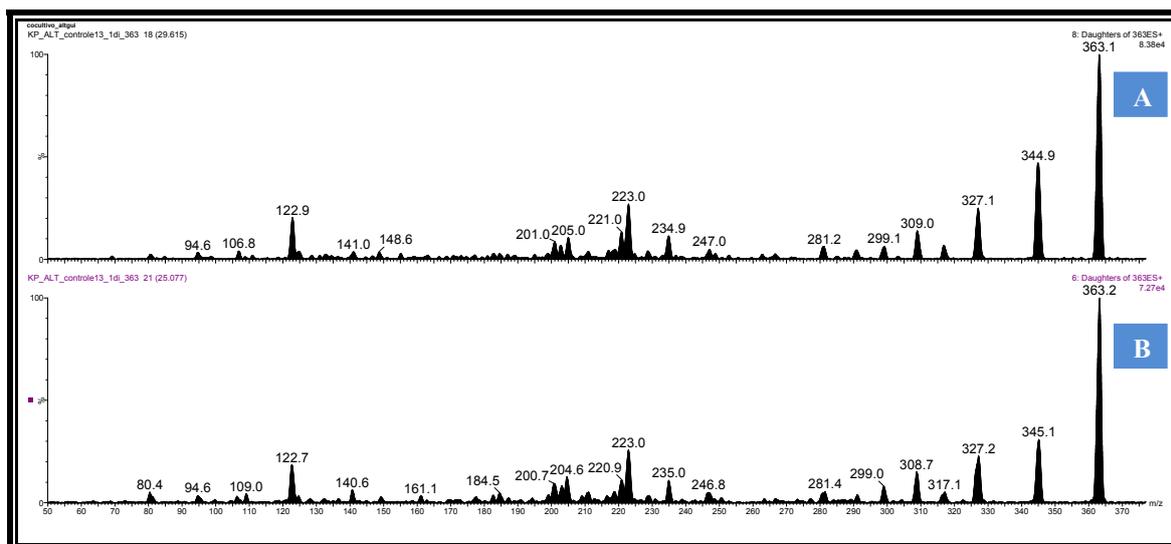


FIGURA 4.105- Espectro de íons produtos  $[M+H]^+$  363 obtido via ESI<sup>+</sup>, com 15eV: A) 30,29 minutos; B) 25,74 minutos.

Levando em consideração as informações contidas nos espectros pode-se propor um perfil de fragmentação para a toxina  $m/z$  363 (FIGURA 4.106). Através de perdas sucessivas de molécula de água tem origem dois íons, o  $m/z$  345 e  $m/z$  327. Outro caminho de fragmentação observado é a origem do íon  $m/z$  223, com aproximadamente 25% de intensidade a partir de  $m/z$  363 o qual se forma com a clivagem do anel de cinco membros.

O íon  $m/z$  363 pode sofrer perda de água em uma fragmentação concertada, levando a clivagem da ligação entre o  $CH_2$  e o anel de cinco membros, formando o íon  $m/z$  205.

Outro fragmento possível a partir do íon  $m/z$  363 é a detecção da cadeia lateral levando ao íon  $m/z$  125 e posteriormente o  $m/z$  123.

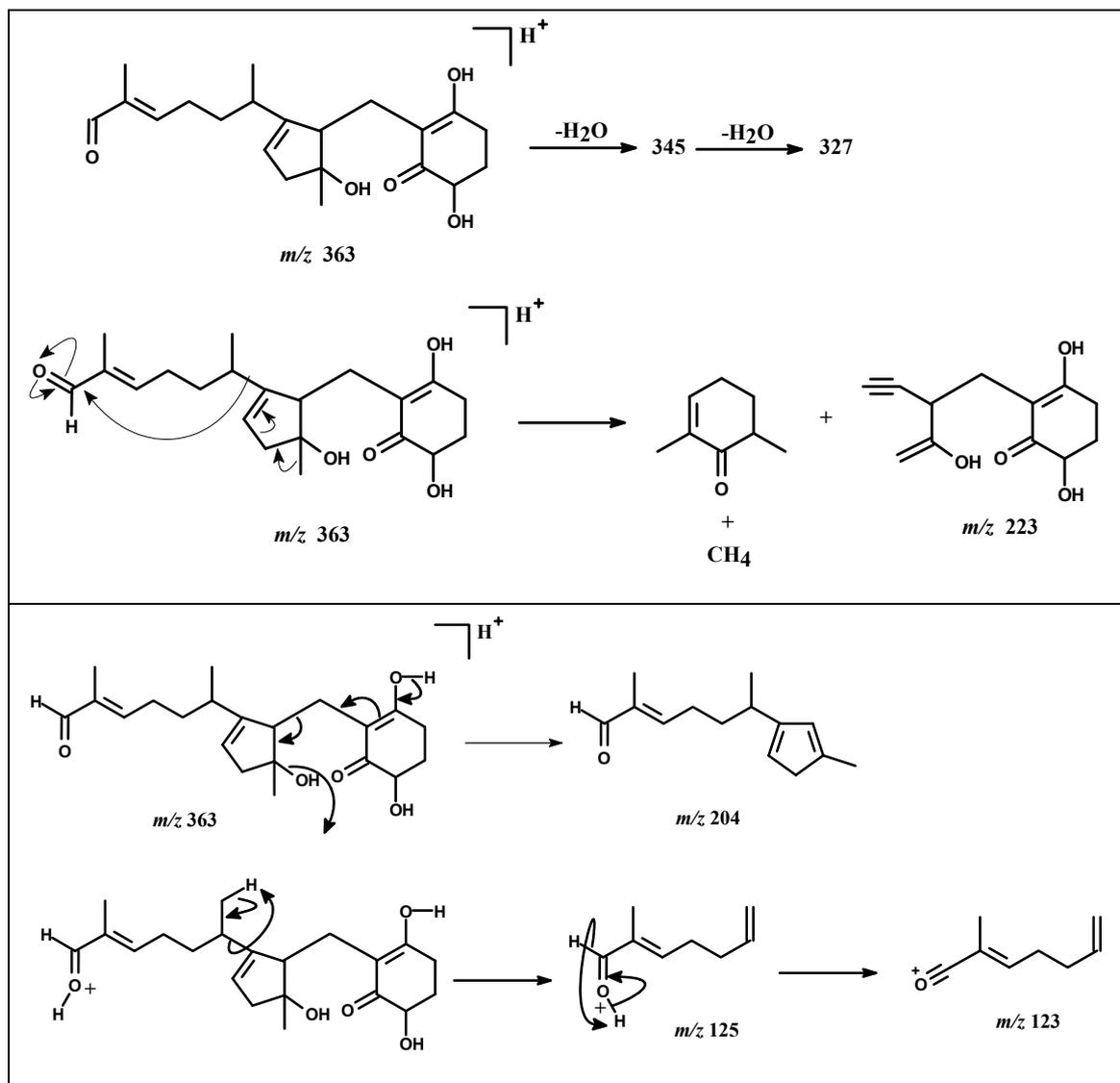


FIGURA 4.106- Proposta de fragmentação para  $[M+H]^+$  363.

Para diferenciar os dois isômeros, seria necessário observar nos espectros de íons produtos a razão massa/carga que referente aos íons propostos na FIGURA 4.107. No entanto alguns desses íons não foram detectados. Contudo, pode-se sugerir a existência desses isômeros devido aos tempos de retenção próximos e devido aos perfis de fragmentação da cadeia lateral idêntica para ambas às toxinas, mas não se pode concluir a presença deles.

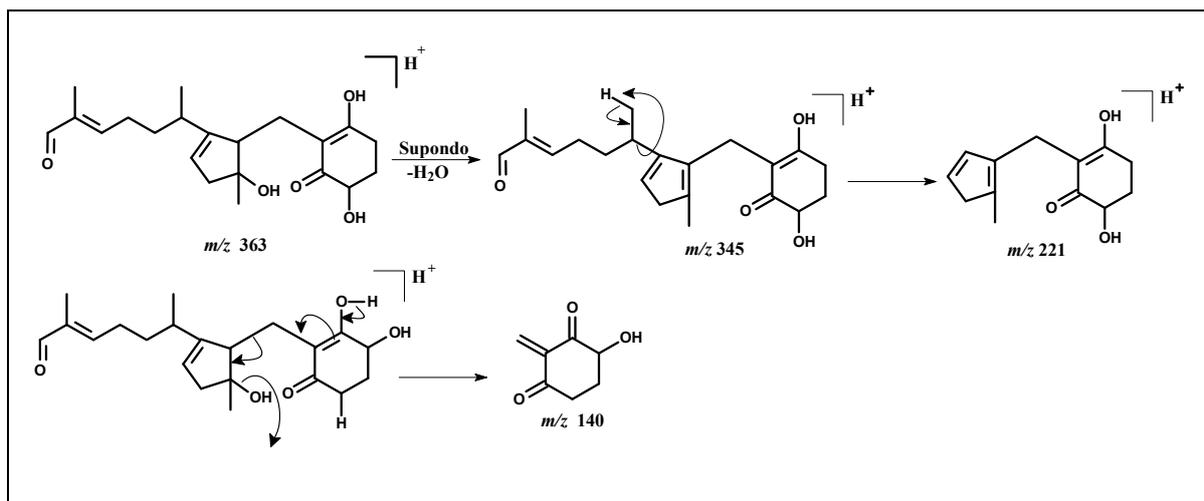


FIGURA 4.107- Proposta de fragmentação para os possíveis isômeros de  $[M+H]^+$  363.

#### 4.4.2.3. Análises do íon $[M+H]^+$ 365

Essa toxina de *A. alternata*, foi obtida por KONO, *et. al* (1986), a qual é denominada de ACTG e possui massa molar de 364 Da (FIGURA 4.108). Essa toxina pode causar danos em tangerinas do tipo Dancy e em mandarinas.

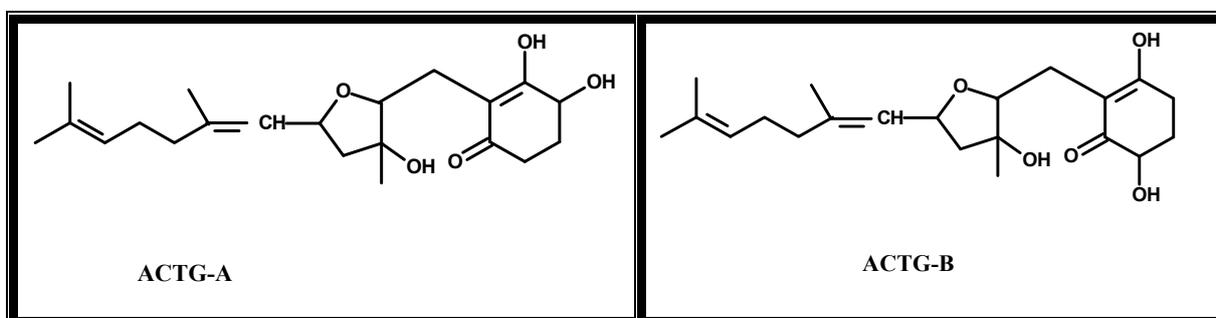


FIGURA 4.108- Toxinas ACTG, 364 Da.

Para identificar íons dessa toxina no extrato CA-EXPb, inicialmente foi feito um monitoramento desse íon através do experimento de íons selecionados. Ao selecionar  $m/z$  365, observam-se duas bandas de absorção, sendo uma delas de média intensidade e outra bastante intensa com tempos de retenção, respectivamente de, 19,68 e 24,06 minutos, sendo que as demais bandas são

relacionadas à adutos de sódio e acetonitrila (FIGURA 4.109). Mais uma vez, pode sugerir a presença de isômeros de posição.

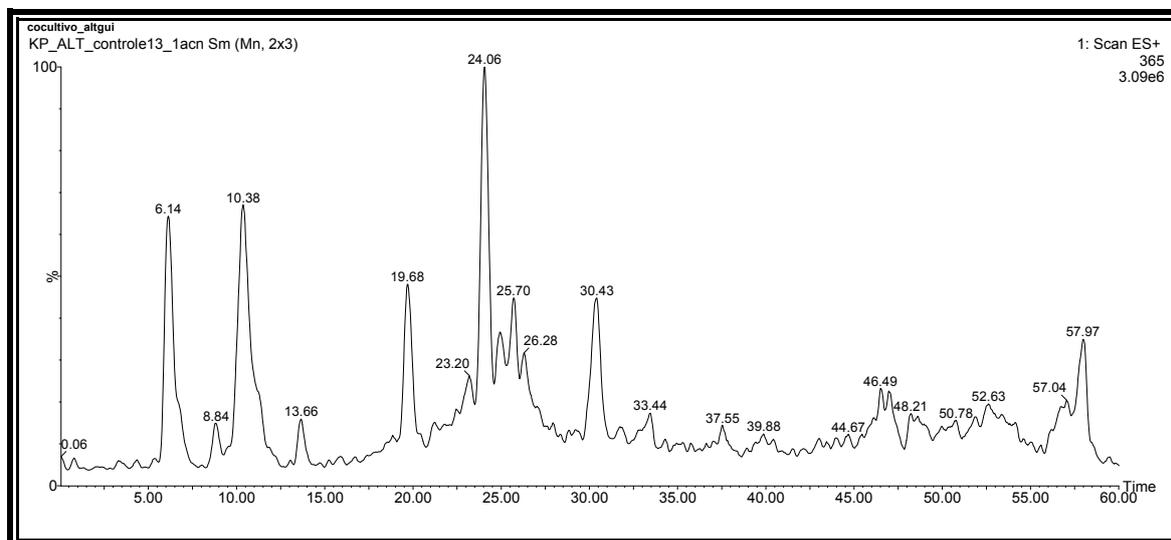


FIGURA 4.109- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$  365) do extrato CA-EXPb de *A. alternata*.

Para identificar realmente a presença dessas toxinas de acordo com os tempos de retenção, foi feita a fragmentação do íon precursor  $m/z$  365, onde foi obtido o espectro de íons produtos o qual está representado na FIGURA 4.110. Para a fragmentação dos íons precursores foram utilizados as energias de 15 eV.

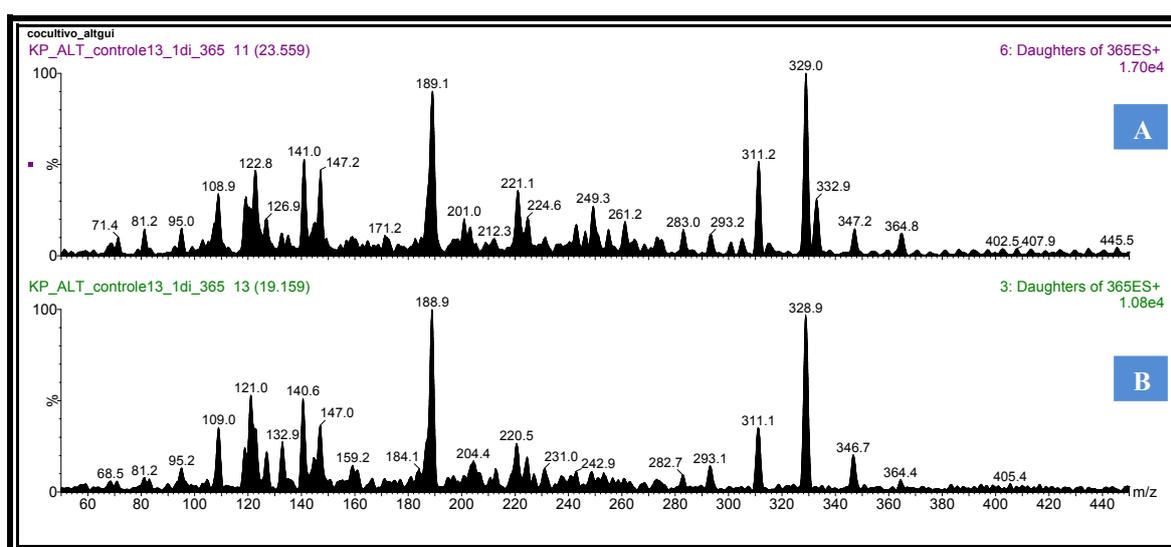


FIGURA 4.110 - Espectro de íons produtos  $[M+H]^+$  365 obtido via ESI<sup>+</sup>, com 15eV: A) 24,06 minutos; B) 19,68 minutos.

Ao analisar os espectros de íons produtos, pode-se propor um perfil de fragmentação (FIGURA 4.111) o qual se inicia com a perda de duas moléculas de água originando o íon  $m/z$  329. A partir desse íon, pode ocorrer um rearranjo na molécula proporcionando a abertura do anel de cinco membros. Essa abertura facilita a perda de uma molécula de água, formando assim o íon  $m/z$  311.

No entanto outro caminho de fragmentação pode ser sugerido. A partir da molécula protonada,  $m/z$  365, ocorre a perda do anel de seis e de  $H_2O$ , formando assim o íon  $m/z$  207. Na estrutura do íon formado, ocorre um rearranjo ocasionando a abertura do anel de cinco membros e a protonação da molécula na hidroxila. Após esse estágio, a molécula protonada sofre diretamente a perda de uma unidade de água formando o íon  $m/z$  189.

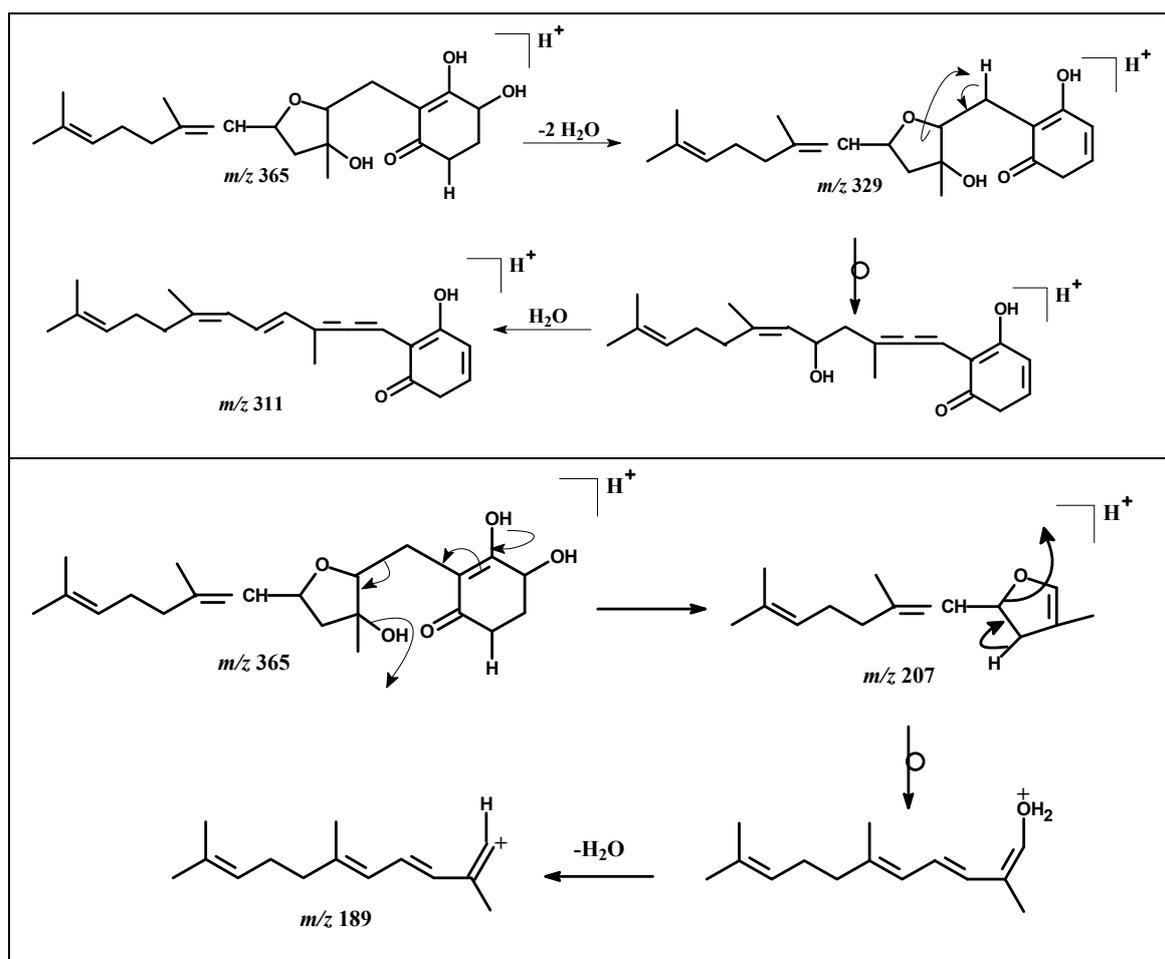


FIGURA 4.111- Proposta de fragmentação para  $[M+H]^+$  365.

Novamente foi sugerida à presença de isômeros de posição nos tempos de retenção de 19,68 e 24,06 minutos. Para distingui-los é necessária obter fragmentos de razão massa/carga específicos, como mostra a FIGURA 4.112. No entanto, esses íons não foram identificados para poder afirmar a presença dos isômeros. Contudo, a literatura mostra que *A. alternata* produz os dois isômeros que ACTG-A e ACTG-B, sugerindo que as duas bandas cromatográficas identificadas nesta análise devem corresponder a estes dois isômeros.

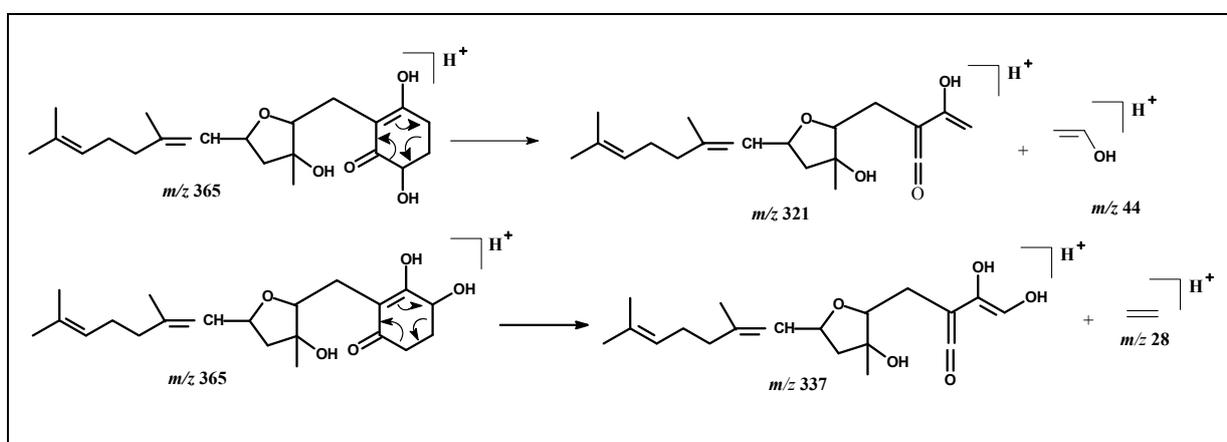


FIGURA 4.112- Proposta de fragmentação para os possíveis isômeros de  $[M+H]^+$  365.

#### 4.4.2.4. Análises do íon $[M+H]^+$ 400

Outra micotoxina de *A. alternata*, foi previamente isolada por MASUNAKA, *et al.*, 2000, a qual é denominada de AK e possui massa molar de 399 Da. Essa micotoxina é uma HSTs, ou seja, uma toxina específica encontrada em pera japonesa e morango.

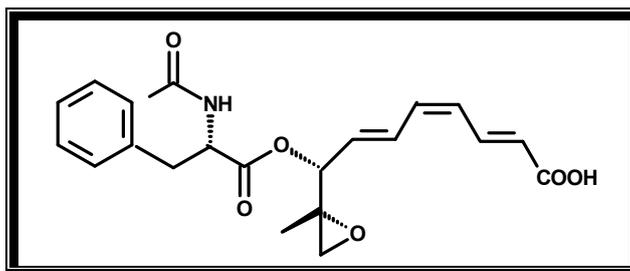


FIGURA 4.113- Toxina HSTs AK, 399 Da.

Com o propósito de procurar íons da AK no extrato CA-EXPb de *A. alternata*, foi feito o monitoramento desse íon através do experimento de íons selecionados. Selecionando a razão massa/carga de 400, observa-se a presença deste em uma banda cromatográfica intensa com um tempo de retenção de 41,66 minutos, como pode ser observado na FIGURA 4.114. O espectro de íons produtos obtido apenas para a banda cromatográfica em 41,66 minutos corresponde a toxina AK (FIGURA 4.115).

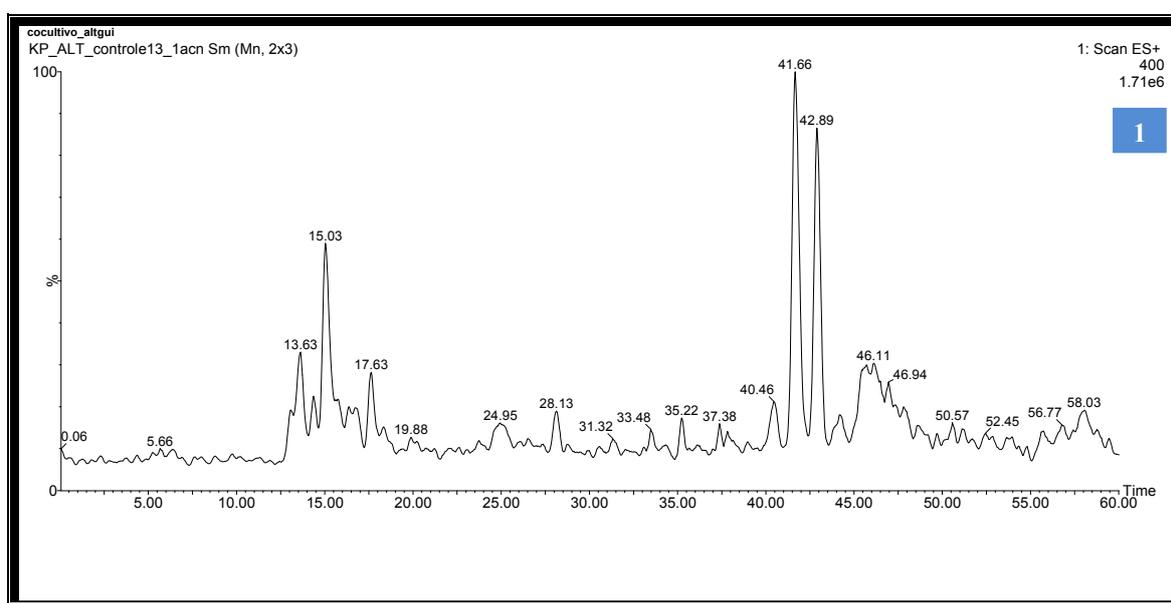


FIGURA 4.114- Cromatograma de íons selecionados ( $m/z$  400) do extrato CA-EXPb de *A. alternata*.

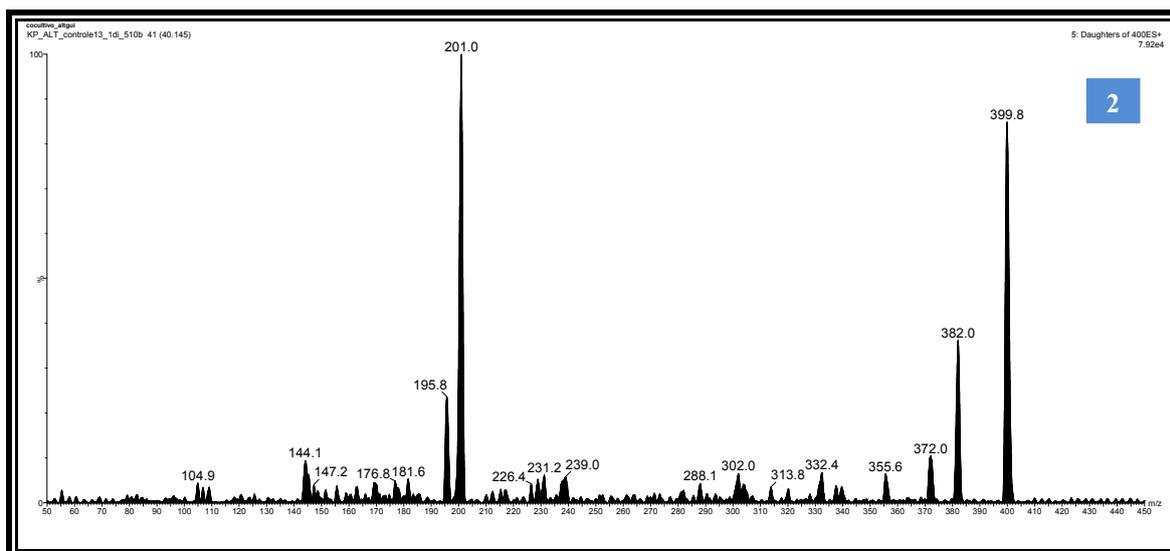


FIGURA 4.115- Espectro de íons produtos  $[M+H]^+$  400 obtido via ESI<sup>+</sup>.

Observando o espectro de íons produtos, pode-se propor o mecanismo de fragmentação para essa estrutura o qual se inicia podendo seguir por dois caminhos: o primeiro começa com a eliminação de água, formando um íon  $m/z$  382, de intensidade de aproximadamente 37% (FIGURA 4.116). O segundo caminho inicia-se com a perda da cadeia alifática insaturada e abertura do éoxido, fornecendo o íon  $m/z$  219 o qual apresenta uma intensidade de aproximadamente 5%. Esse íon por ser instável sofre rapidamente perda de uma molécula de água originando assim o pico base, o íon  $m/z$  201 de intensidade 100%.

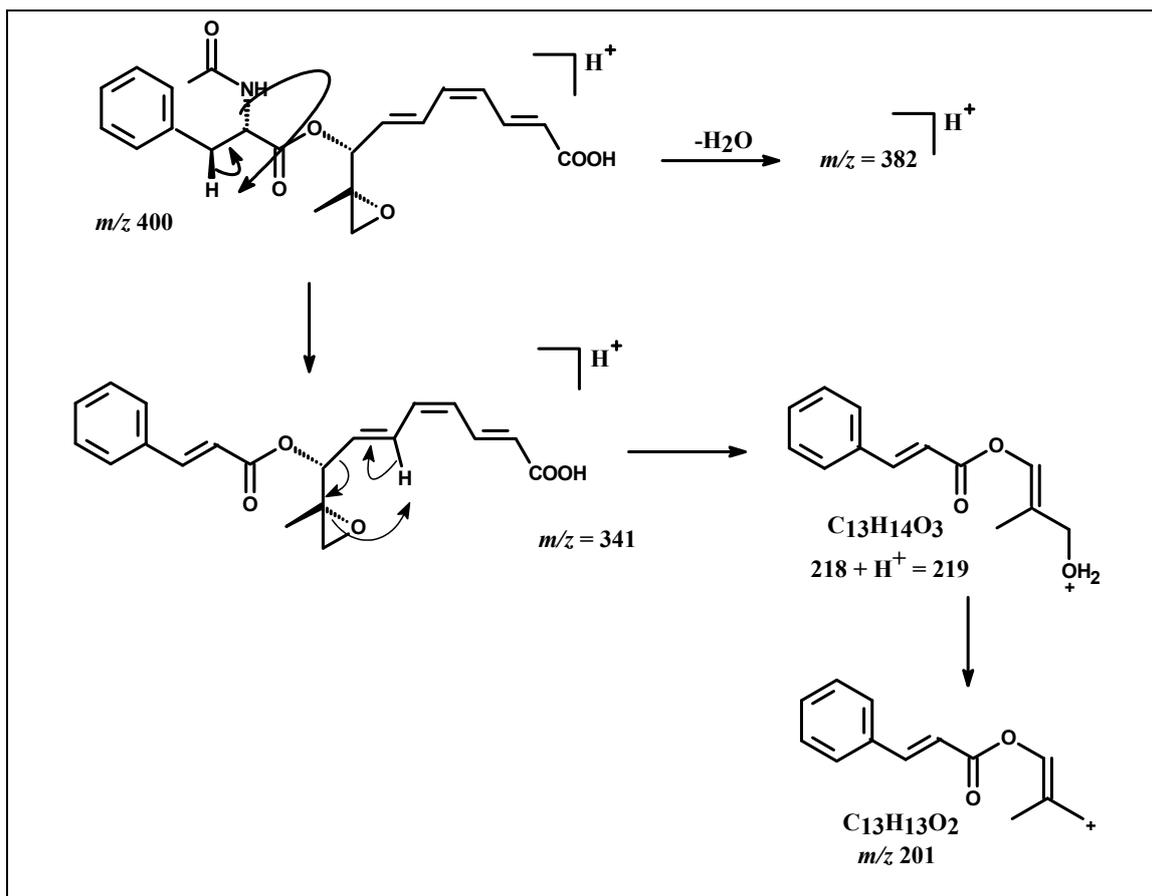


FIGURA 4.116- Proposta de fragmentação para  $[M+H]^+$  400.

#### 4.5. Identificação dos Compostos Voláteis extraídos de *A. alternata*

O fungo *Alternaria alternata* foi submetido ao estudo de compostos voláteis. Como já foi explicado anteriormente esse fungo foi isolado de tangor ‘Murcott’. Não existe até o momento relatos na literatura sobre a identificação de óleo essencial desse micro-organismo, sendo assim, dessa forma, todo o trabalho tem uma contribuição importante para o entendimento da produção de metabólitos de *A. alternata*.

A extração do óleo essencial foi realizada utilizando a técnica de hidrodestilação, utilizando dois meios de cultura distintos para o fungo, sendo eles o meio líquido Czapek’s (como descrito no item 3.2.8.1) enriquecido com

20,0 gramas de levedura, e o meio sólido arroz. A FIGURA 4.117 mostra o micro-organismo em ambos os meios de cultura antes da extração dos compostos voláteis.

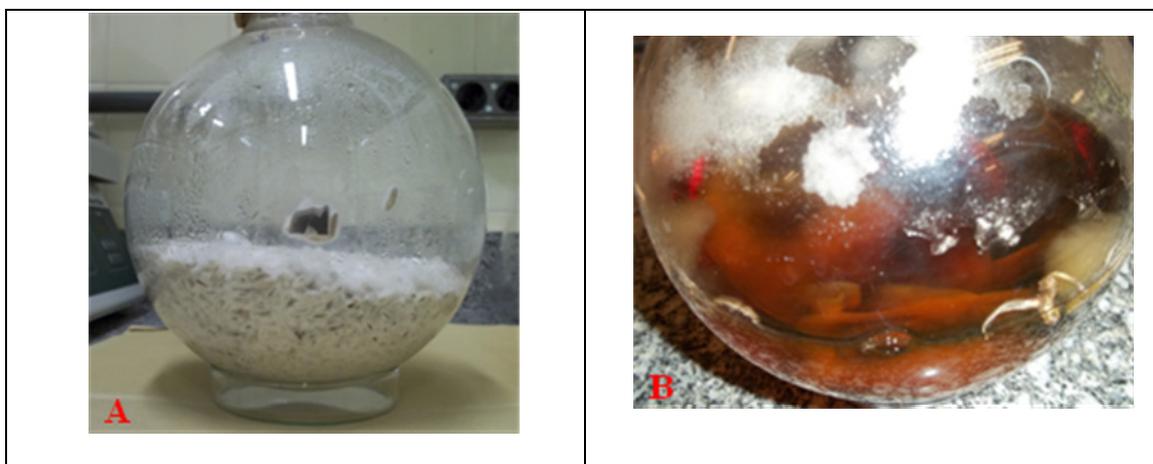


Figura 4.117- Crescimento de *A. alternata* para a extração de compostos voláteis: A) micro-organismo cultivado em meio sólido de arroz; B) micro-organismo cultivado em líquido de Czapek's.

Foram observadas diferenças entre os compostos identificados nos diferentes meios de cultivo. No meio sólido de arroz houve a produção de 38 substâncias voláteis sendo que no meio líquido Czapek's enriquecido com levedura apenas quatro compostos foram identificados. No entanto em ambos podem ser observados compostos de baixo peso molecular. Os dois meios de cultivo apresentaram um odor característicos de micro-organismos, portanto pode-se atribuir aos compostos de baixo peso molecular a responsabilidade desse aroma.

Para a identificação desses compostos foram obtidos os índices de retenção e comparados com a biblioteca existente no equipamento CGMS-QP2010 PLUS – SHIMADZU, no entanto nem todos os compostos puderam ser confirmados. Portanto foram utilizados também como referências para a identificação dos compostos o livro “Identification of Essential oil Components

by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry” do autor Dr. Robert P. Adams e a biblioteca online <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.

Para um melhor entendimento sobre os compostos identificados, será feito um detalhamento de acordo com os meios de cultivo.

#### 4.5.1. Hidrodestilação de *A. alternata* em meio Czapek's enriquecido com Levedura

Foi realizado a hidrodestilação do meio de cultura sem conter fragmentos de *A. alternata*, sendo esse denominado o controle do experimento e também foi feita a hidrodestilação do micro-organismo em crescimento no meio de cultura, os quais estão representados respectivamente nas FIGURAS 4.118 e 4.119.

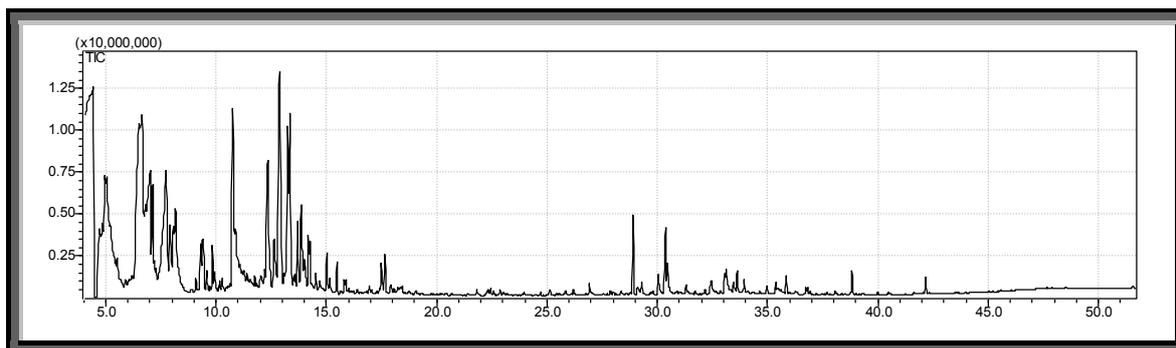


FIGURA 4.118 – Cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura sem a presença de *A. alternata* (controle).

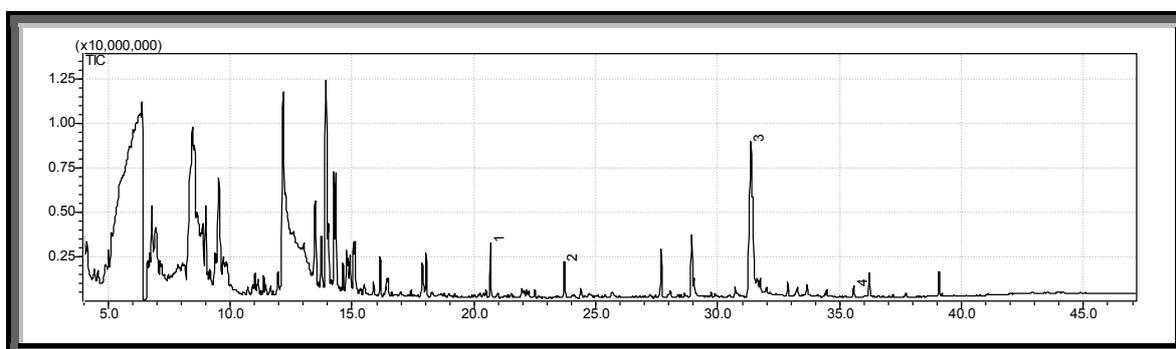


FIGURA 4.119- Cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do micro-organismo *A. alternata* em crescimento no meio de cultura para a obtenção de compostos voláteis.

Realizando uma análise cuidadosa e criteriosa ao comparar a hidrodestilação do controle com a hidrodestilação do micro-organismo, observam-se quatro picos na extração dos voláteis de *A. alternata* os quais não existiam no controle. Pode-se, portanto atribuir esses sinais a compostos voláteis produzidos pelo fungo. Na FIGURA 4.119 pode ser observado esses picos, no entanto na FIGURA 4.120 está a ampliação da região de interesse.

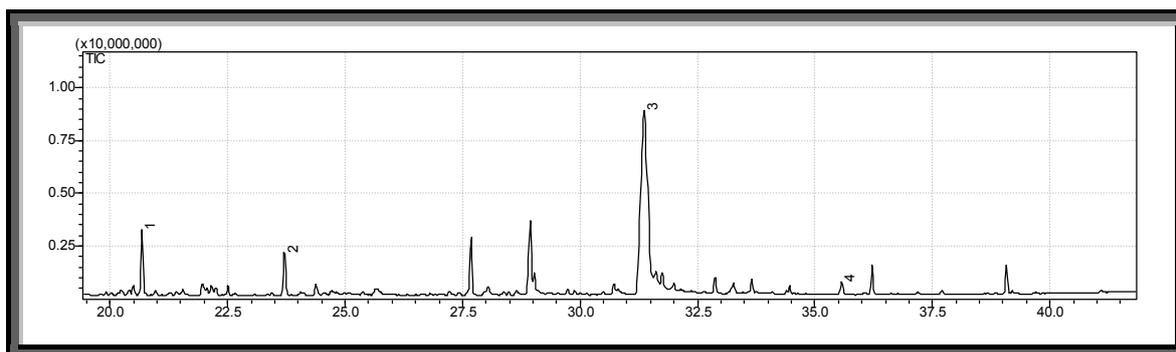


FIGURA 4.120- Ampliação do cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura na presença de *A. alternata* para a obtenção de compostos voláteis.

Todos os compostos identificados, quando comparados com a biblioteca NIST apresentaram similaridade superior a 95%, os quais estão descritos na FIGURA 4.121.

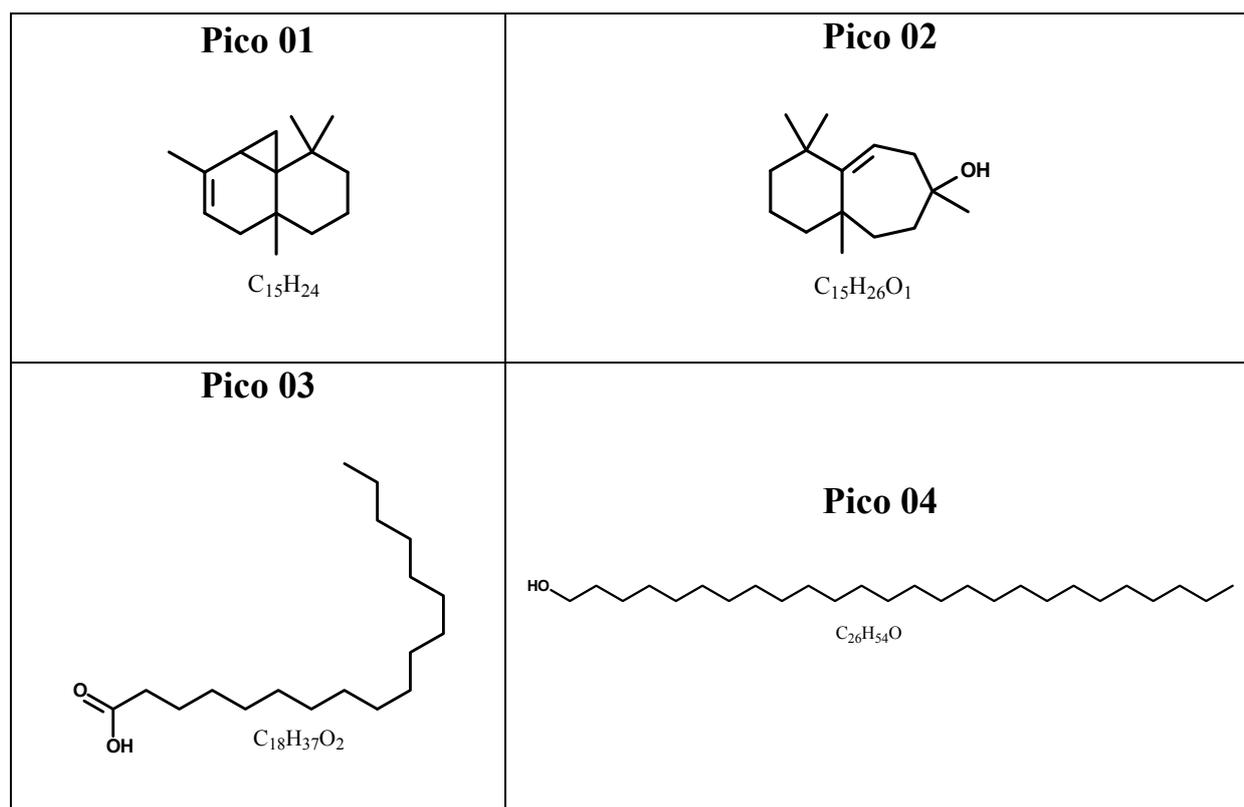


FIGURA 4.121- Compostos voláteis identificados de *A. alternata*.

A TABELA 4.16 descreve os tempos de retenção para cada composto juntamente com o índice de retenção experimental obtido.

TABELA 4.16- Substâncias identificadas do fungo *Alternaria alternata* em meio CZAPECK's extraídas pelo método da hidrodestilação

Pico	Tempo de retenção (min.)	Composto	(%) CG-EM	IR experimental	IR literatura
1	20.680	Cis-thujopsene	8.23	1447	1449
2	23.708	Widrol	5.66	1612	1612
3	31.365	Ác. linoleico	83.89	2136	2183
4	35.568	1-Hexaconasol	2.22	2500	2500

Nas FIGURAS 4.122 á 4.125 estão ilustrados os espectros de massas obtidos para cada pico.

### Pico 1

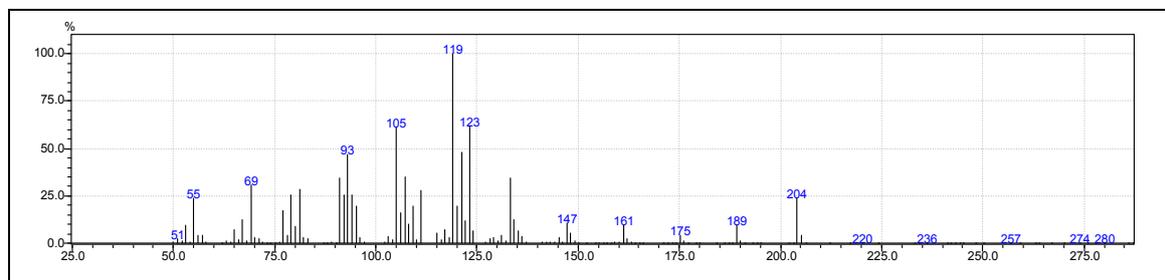


FIGURA 4.122- Espectro de massas obtido do pico 1 em t.r. 20,68 minutos.

### Pico 2

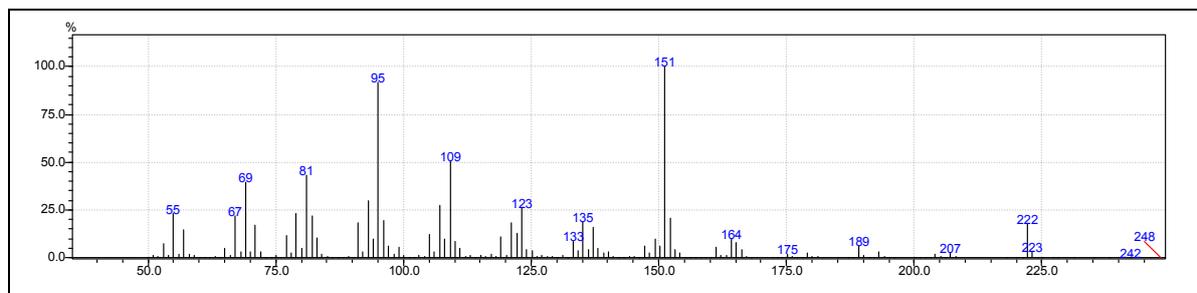


FIGURA 4.123- Espectro de massa obtidos do pico 2 em t.r. 23,71 minutos.

### Pico 3

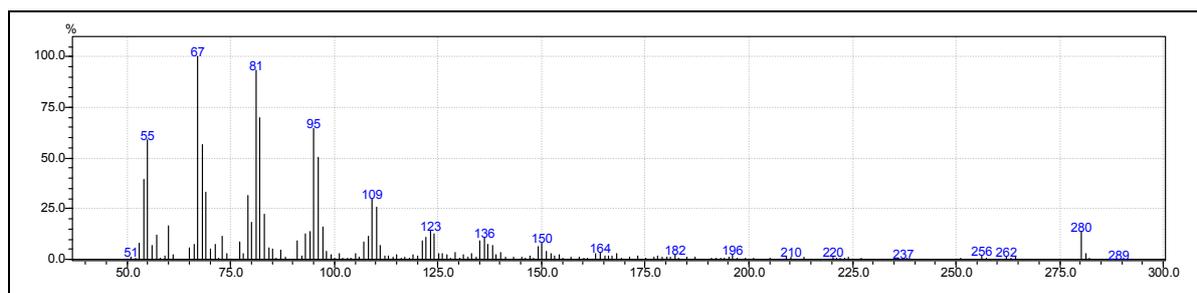


FIGURA 4.124- Espectros de massas obtidos do pico 3 em t.r. 31,36 minutos.

## Pico 4

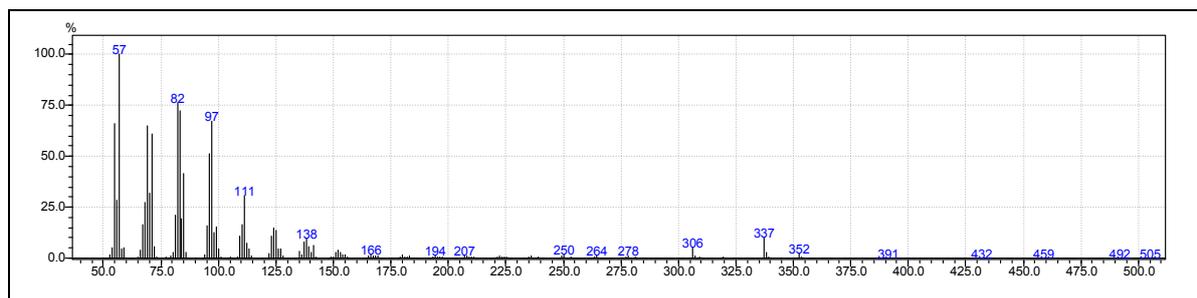


FIGURA 4.125- Espectros de massas obtidos do pico 4 em t.r. 35,57 minutos.

### 4.5.2. Hidrodestilação de *A. alternata* em meio de Arroz

Também foi realizado a hidrodestilação do micro-organismo no meio de cultura e através da hidrodestilação. Para esse estudo também foi feito a hidrodestilação somente do meio de cultura, sem a presença do micro-organismo e a hidrodestilação do meio de cultura na presença do fungo. Foram analisados pico por pico, sendo que os picos presentes na hidrodestilação do meio de cultura na presença do fungo foram identificados como sendo os compostos voláteis.

Para essa condição de meio de cultura, o micro-organismo teve um crescimento visivelmente grande sendo que isso pode ser comprovado através da produção de 38 compostos voláteis identificados. A FIGURA 4.126, 4.127, 4.128 e 4.129 ilustra respectivamente os cromatogramas do controle, do experimento para a extração dos voláteis e suas ampliações.

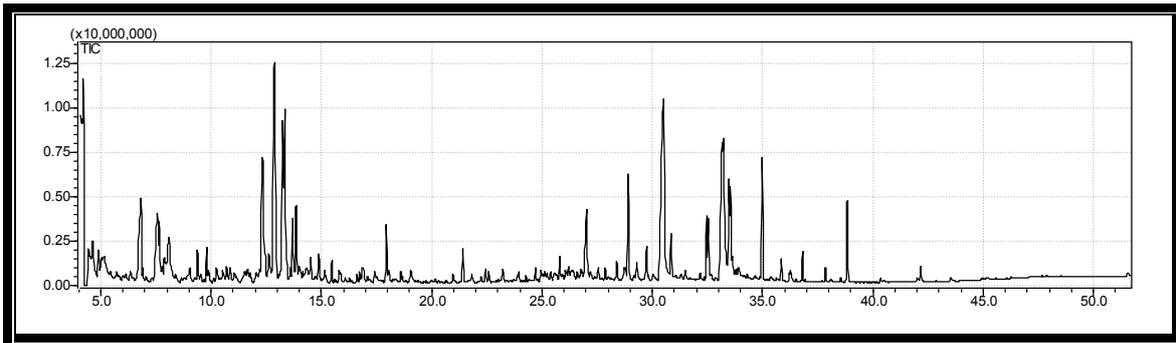


FIGURA 4.126- Cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura sem a presença de *A. alternata* (controle).

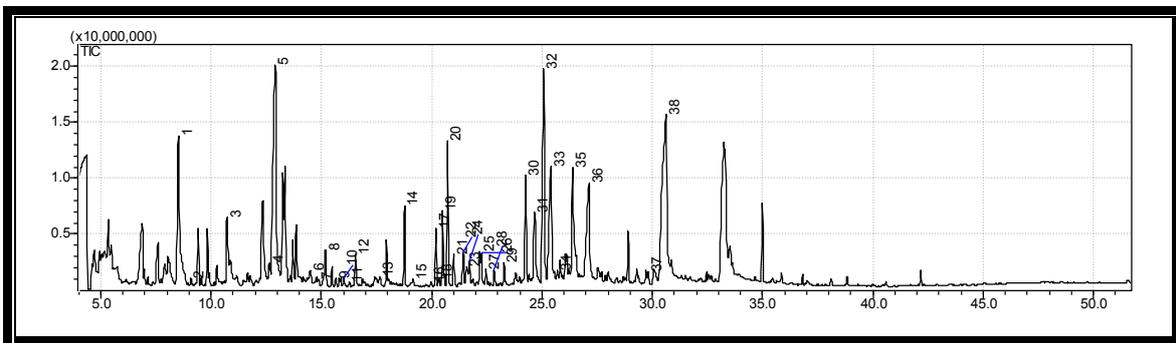


FIGURA 4.127- Cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura na presença de *A. alternata* para a obtenção de compostos voláteis.

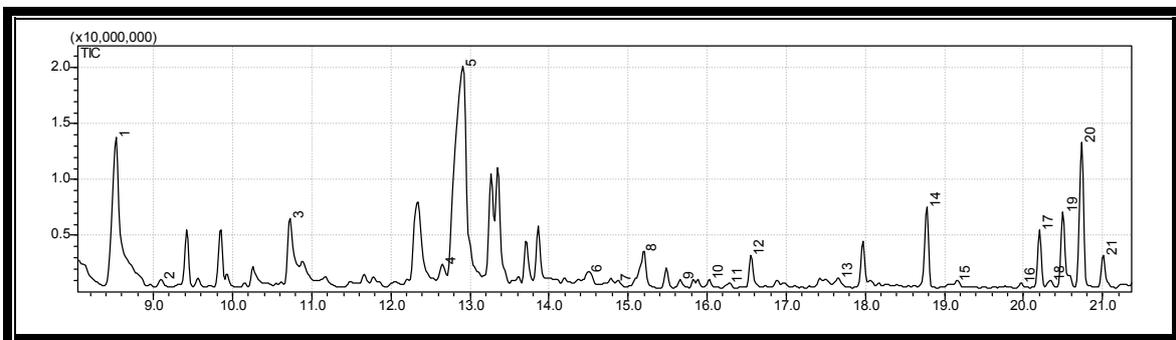


FIGURA 4.128- Ampliação do cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura na presença de *A. alternata* para a obtenção de compostos voláteis.

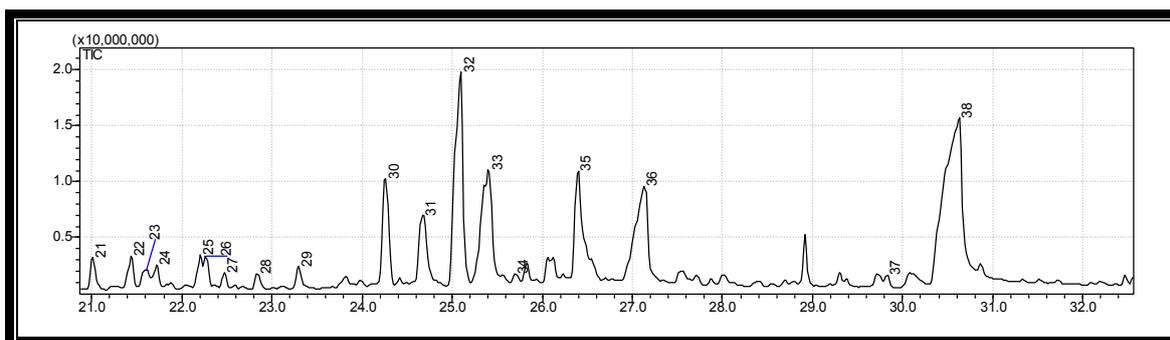


FIGURA 4.129- Ampliação do cromatograma do óleo obtido da hidrodestilação do meio de cultura na presença de *A. alternata* para a obtenção de compostos voláteis.

Através de cálculos de índice de retenção (IR) e comparação com bibliotecas de massas possibilitaram a identificação das substâncias presentes no óleo essencial do fungo *A. alternata* em meio sólido. A TABELA 4.17 traz os compostos obtidos juntamente com os respectivos índices.

TABELA 4.17- Substâncias identificadas do fungo *Alternaria alternata* em meio sólido de arroz extraídas pelo método da hidrodestilação

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	IR exp.*
1	8,529	Ácido hexanóico, 2-hidroxi-propil éter	7,68	970
2	9,099	Ciclohexanol, 4-metil-1-(1-metil-etil)-	0,25	989
3	10,729	Benzenoacetaldeído	1,97	1042
4	12,648	Ácido Pentanóico	0,46	1107

Continuação da TABELA 4.17

5	12,916	Benzeno (pencil-oxi) metil	16,37	1117
6	14,502	Ácido propanóico	0,44	1179
7	14,872	Ácido heptanóico	0,06	1193
8	15,191	-	0,80	1206
9	15,667	-	0,18	1226
10	16,029	Ácido hexanóico	0,17	1240
11	16,273	-	0,15	1250
12	16,554	2-fenil etil éster	0,88	1261
13	17,663	Ácido 2-butanóico fenil metil éster ou Benzeno,[(2)-2 buten-1-iloxi] metil	0,25	1307
14	18,778	2-feniletíl ester	2,37	1356
15	19,160	Benzeno etanol, $\alpha$ -etil- $\alpha$ -metil	0,13	1373
16	19,974	1H-Benzociclohepteno, 2,4a,5,6,7,8-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil-, (R)-	0,05	1410
17	20,199	Espiro[4.5]dec-7-ene, 1,8-dimetil-4-(1-metileténil)-, [1S-(1 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,5 $\alpha$ )]-	1,58	1420
18	20,346	-	0,19	1426
19	20,503	-	1,97	1434

Continuação da TABELA 4.17

20	20,732	-	4,77	1445
21	21,011	Benzeno [(heptiloxi)metil]	0,72	1458
22	21,438		1,01	1478
23	21,606	Naftaleno, 1,2,3,4,4a,5,6,8a- octahidro-4a,8- dimethyl-2-(1-metil eteno)-, [2R- (2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,8 $\alpha$ )]-	0,53	1485
24	21,719	Naftaleno, decahidro-4a-metil- 1-metileno-7-(1- metiletenil)-, [4aR- (4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha$ )]-	0,32	1491
25	22,204	-	1,05	1513
26	22,268	-	0,62	1516
27	22,472	-	0,31	1525
28	22,838	-	0,43	1542
29	23,298	-	0,61	1564
30	24,259	1H- Benzocicloheptan-7- ol, 2,3,4,4a,5,6,7,8- octahidro-1,1,4a,7- tetrametil-, cis-	4,00	1608
31	24,675	-	2,91	1630
32	25,094	-	10,42	1651
33	25,406	-	7,43	1667

Continuação da TABELA 4.17

34	25,702	-	0,22	1682
35	26,393	-	4,39	1720
36	27,132	Ácido tetradecanóico	6,83	1762
37	29,827	-	0,20	1917
38	30,626	Ácido hexanóico	17,28	1968

Os compostos obtidos via CG-EM foram comparados com os sugeridos pela biblioteca do equipamento, pela biblioteca virtual (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>) e pelo livro ADANS 2005, através do índice de retenção. Após análise cuidadosa de comparação, seguem representados nas FIGURAS 4.130, 4.149, 4.170, 4.188 os compostos voláteis identificados presentes no óleo essencial de *Alternaria alternata*.

Alguns compostos foram sugeridos, no entanto ao realizar uma busca na literatura (SCIENCE FINDER) não foi possível obter informações dos mesmos.

Para um melhor entendimento em relação aos compostos identificados, os mesmos foram reunidos em três grupos, onde a seguir tem-se sugestões para cada pico e as propostas de fragmentações.

#### **4.5.2.1. Grupo 01- Compostos voláteis de *A. alternata***

Nesse grupo foram reunidos os compostos que apresentam na sua estrutura anel aromático e tiveram suas fragmentações semelhantes.

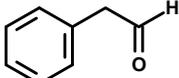
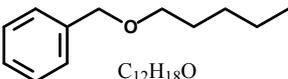
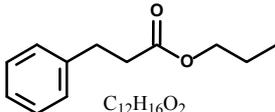
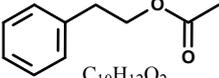
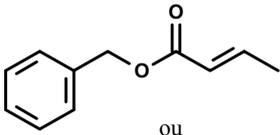
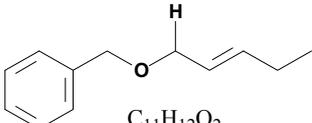
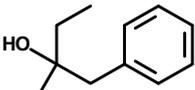
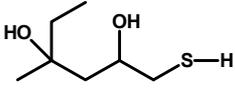
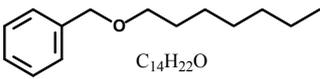
<p align="center"><b>Pico 03</b></p>  <p align="center"><math>C_8H_8O</math></p>	<p align="center"><b>Pico05</b></p>  <p align="center"><math>C_{12}H_{18}O</math></p>	<p align="center"><b>Pico 06</b></p>  <p align="center"><math>C_{12}H_{16}O_2</math></p>
<p align="center"><b>Pico 12</b></p>  <p align="center"><math>C_{10}H_{12}O_2</math></p>	<p align="center"><b>Pico 13</b></p>  <p align="center">ou</p>  <p align="center"><math>C_{11}H_{12}O_2</math></p>	<p align="center"><b>Pico 15</b></p>  <p align="center">ou</p>  <p align="center"><math>C_{11}H_{16}O</math></p>
<p align="center"><b>Pico 21</b></p>  <p align="center"><math>C_{14}H_{22}O</math></p>		

FIGURA 4.130- Compostos voláteis identificados de *A. alternata*.

### Identificação do Pico 03

O espectro de massa do pico com um tempo de retenção de 10,73 minutos mostrou similaridade de 97% com o composto benzeno acetaldeído quando comparado com a biblioteca NIST 05. Analisando o cromatograma na FIGURA 4.131, pode-se observar que o composto possui um íon molecular de  $m/z$  120, o qual fornece fragmentos de  $m/z$  91 e 65. O íon  $m/z$  91 é o mais intenso no cromatograma, com uma intensidade de 100%, o que é de se esperar, uma vez que esse íon, o chamado íon tropílio, é estável.

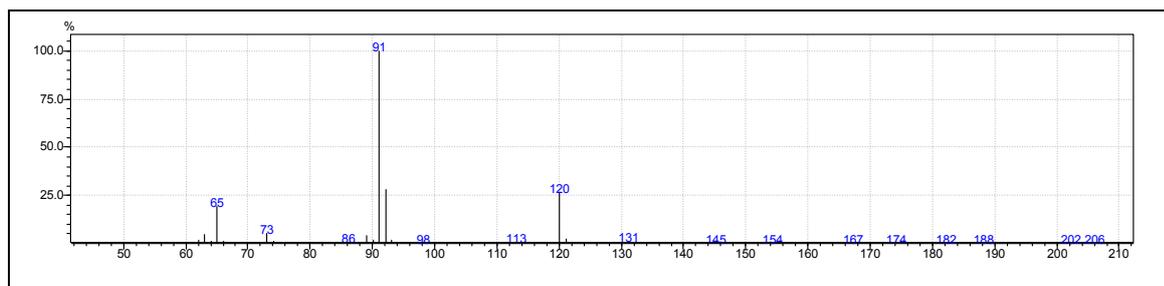


FIGURA 4.131- Espectro de massas obtido do pico 03 em t.r. 10,73 minutos.

Com base no cromatograma, pode-se sugerir uma proposta de fragmentação, a qual segue ilustrada na FIGURA 4.132.

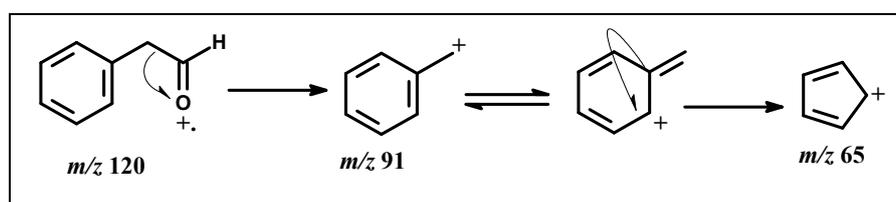


FIGURA 4.132- Proposta de fragmentação para o pico 03.

Esse composto já foi identificado em *Vaccinium arctostaphylos* (NICKAVAR, *et al.*, 2002).

### Identificação do Pico 05

O espectro de massa do pico 05 apresentou um tempo de retenção de 12,92 minutos. Em comparação com a biblioteca NIST esse composto apresentou apenas 78% de similaridade. Portanto foi analisando o cromatograma ilustrado na FIGURA 4.133, sugerindo um composto com o pico do íon molecular de  $m/z$  178, diferente daquele sugerido pela biblioteca. Este fornece fragmentos de  $m/z$  122, 92, 91 e 84, sendo que o íon tropílio,  $m/z$  91, é o mais intenso no cromatograma, com uma intensidade de 100%.

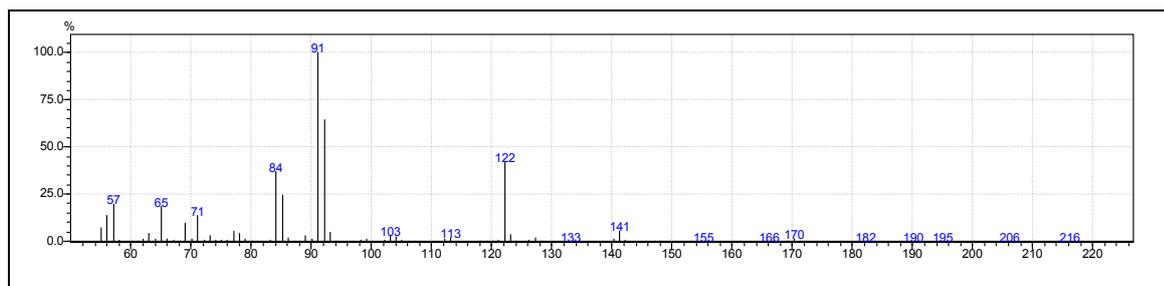


FIGURA 4.133- Espectro de massas obtido do pico 05 em t.r. 12,92 minutos.

Com base nesse espectro, podem-se sugerir dois possíveis mecanismos de fragmentação, como pode ser ressaltado na FIGURA 4.134, os quais confirmam a proposta feita para o pico 05 de  $m/z$  178.

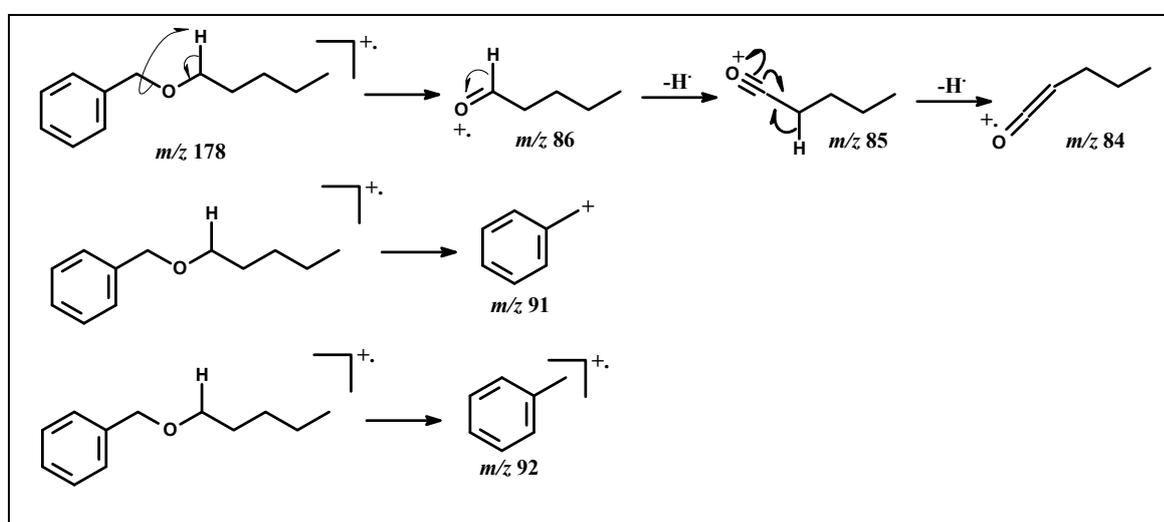


FIGURA 4.134- Proposta de fragmentação para o pico 05.

### Identificação do Pico 06

O espectro de massas referente ao pico 06 apresenta um tempo de retenção de 14,50 minutos. Em comparação com a biblioteca NIST esse composto apresentou um pequeno grau de similaridade. Sendo assim, foi analisando o cromatograma, o qual está ilustrado na FIGURA 4.135, sugerindo um composto com o pico do íon molecular de  $m/z$  192, diferente daquele sugerido pela biblioteca. Este forneceu fragmentos de  $m/z$  104 (o mais intenso),

91 e 60, sendo que outros íons de estão presentes, no entanto em intensidade baixa.

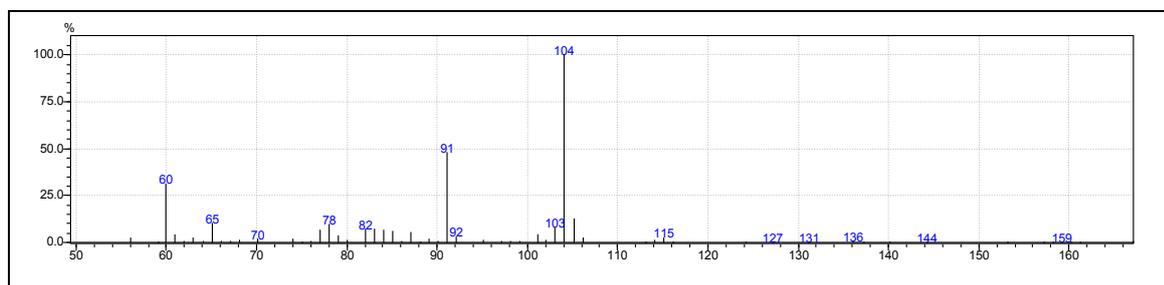


FIGURA 4.135- Espectro de massas obtido do pico 06 em t.r. 14,50 minutos.

Ao analisar o espectro de massas, pode-se sugerir um composto que tenha na sua estrutura um anel aromático, podendo assim propor quatro caminhos de fragmentação. Vale ressaltar que o íon molecular não foi detectado. Contudo, os fragmentos detectados (FIGURA 4.136) confirmam a proposta feita.

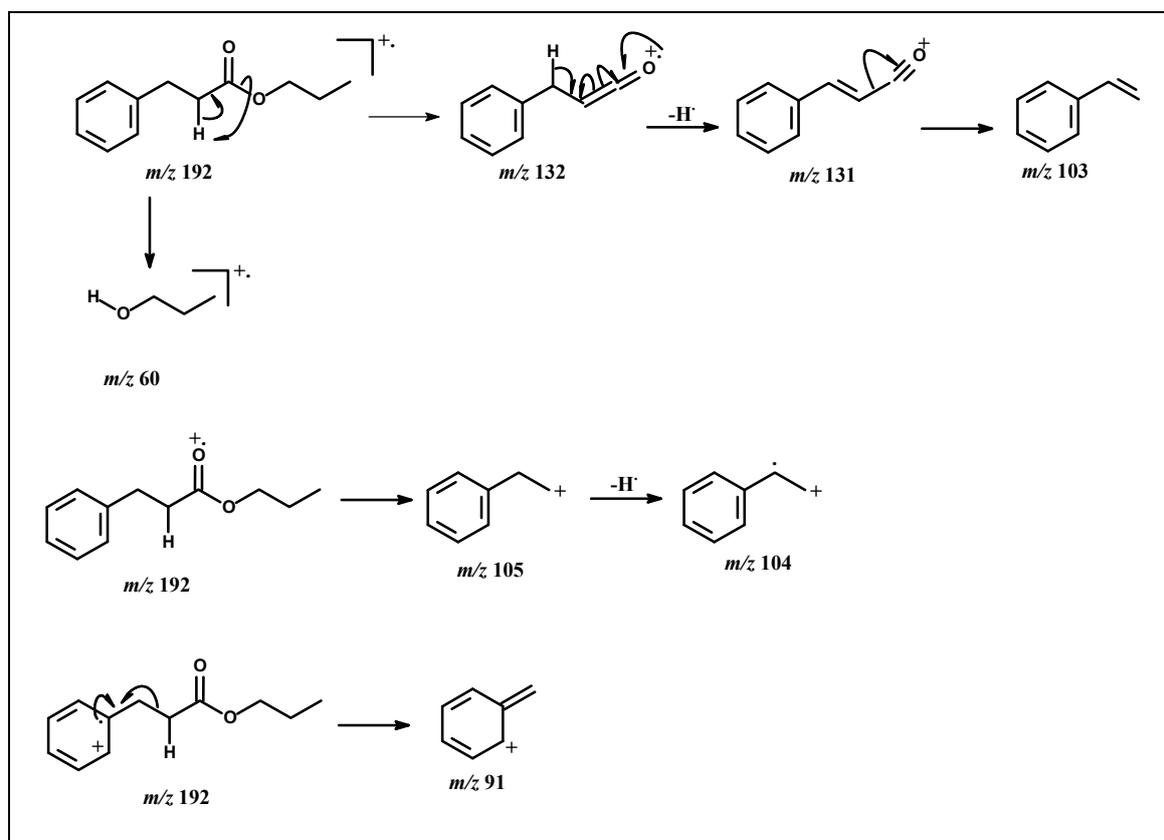


FIGURA 4.136- Proposta de fragmentação para o pico 06.

Esse volátil já foi identificado em seis variedades de frutas denominadas “craapple” (*Malus* sp.), sendo que dentre elas pode ser citado o morango (LI, *et al.*, 2008).

### Identificação do Pico 12

O espectro de massas referente ao pico com um tempo de retenção de 16,55 minutos mostrou similaridade de 97% com o composto 2-fenil-etil-acetato ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) quando comparado com a biblioteca NIST 05 e também com ADANS, 2007, apresentando assim um pico do íon molecular  $m/z$  164. Analisando a FIGURA 4.137, observa-se que o composto fornece fragmentos de  $m/z$  104 (o qual é o mais intenso), e 91, podendo assim sugerir a partir do íon tropílio a presença de anel aromático, confirmando a estrutura sugerida pela biblioteca e pelo ADANS, 2007. Essas informações podem ser confirmadas ao observar o espectro de massas na FIGURA 4.137.

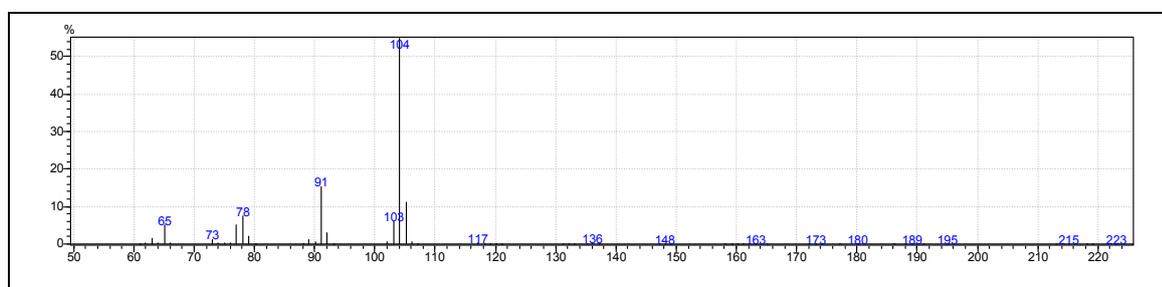


FIGURA 4.137- Espectro de massas obtido do pico 12 em t.r. 16,55 minutos.

Com base no espectro mostrado na FIGURA 4.137, pode-se propor dois mecanismos de fragmentação que explica os íons citados. A proposta de fragmentação está ilustrada na FIGURA 4.138.

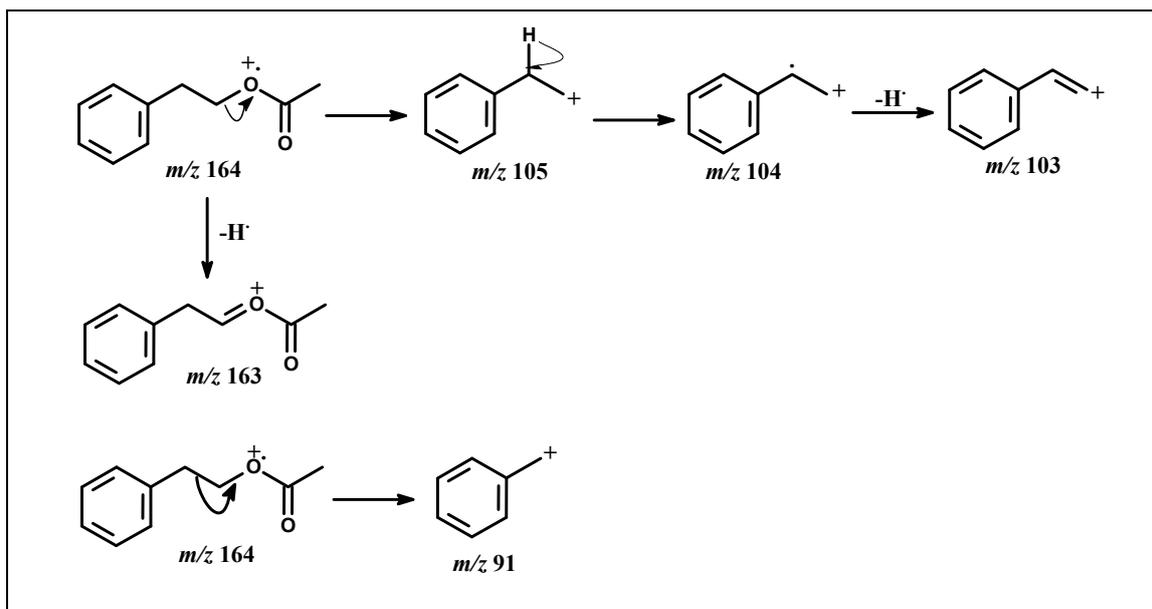


FIGURA 4.138- Proposta de fragmentação para o pico 12.

Esse composto volátil identificado como ácido acético, 2-fenil etil éster, é responsável pelo aroma em diferentes queijos franceses, o qual foi produzido por oito grupos de bactérias *Brevibacterium linens*, *Microbacterium foliorum*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus equorum*, *Brachybacterium sp.*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter sp.* (DEETA, *et al.*, 2007).

### Identificação do Pico 13

O espectro de massa do pico 13, o qual apresenta um tempo de retenção de 17,66 minutos, apresentou baixa similaridade quando comparado com modelos existentes na literatura. Desde modo, foi analisando a FIGURA 4.139, sugerindo um composto com o pico do íon molecular de  $m/z$  176. Este origina fragmentos de  $m/z$  176, 92 (o qual é o mais intenso), e 91, podendo assim sugerir mais uma vez a presença de um anel aromático na estrutura. Esses dados podem ser confirmados pelo espectro de massas representado na FIGURA 4.139.

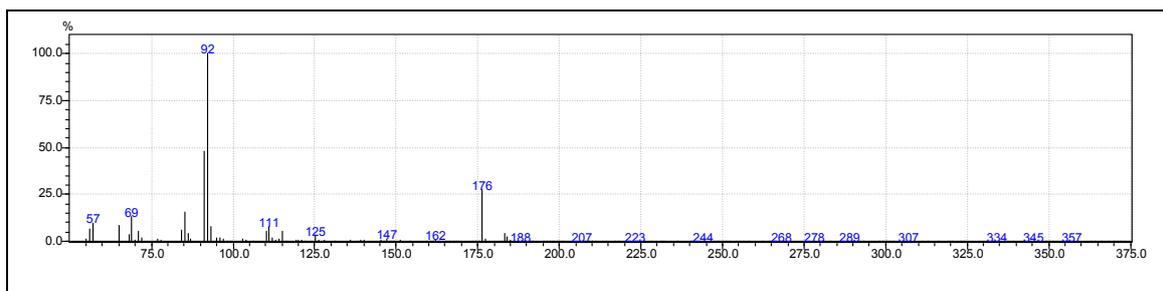


FIGURA 4.139- Espectro de massas obtido do pico 13 em t.r. 17,66 minutos.

Pode sugerir duas estruturas com  $m/z$  176, sendo que ambas estão representadas na FIGURA 4.140.

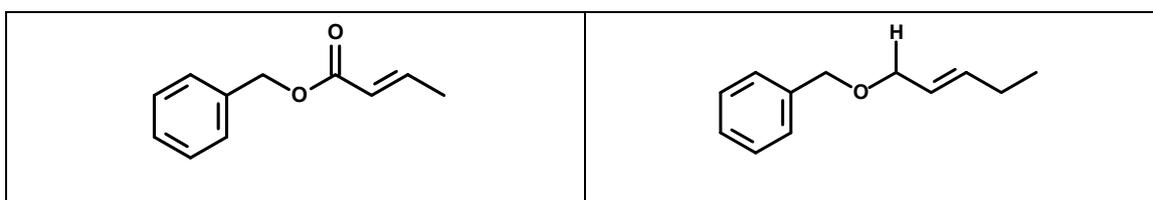


FIGURA 4. 140- Possíveis estruturas referentes ao pico 13.

Para cada uma dessas moléculas são sugeridas propostas de fragmentação listadas nas FIGURAS 4.141 e 4.142, sendo que em ambas tem-se a formação do íon  $m/z$  92 e 91. No entanto somente na proposta de fragmentação ilustrada na FIGURA 4.141 dá origem ao íon  $m/z$  69 ( $C_5H_9$ ) através de uma quebra homolítica na cadeia. No entanto ambas as estruturas são aceitáveis, não podendo assim concluir a estrutura exata do composto presente no óleo.

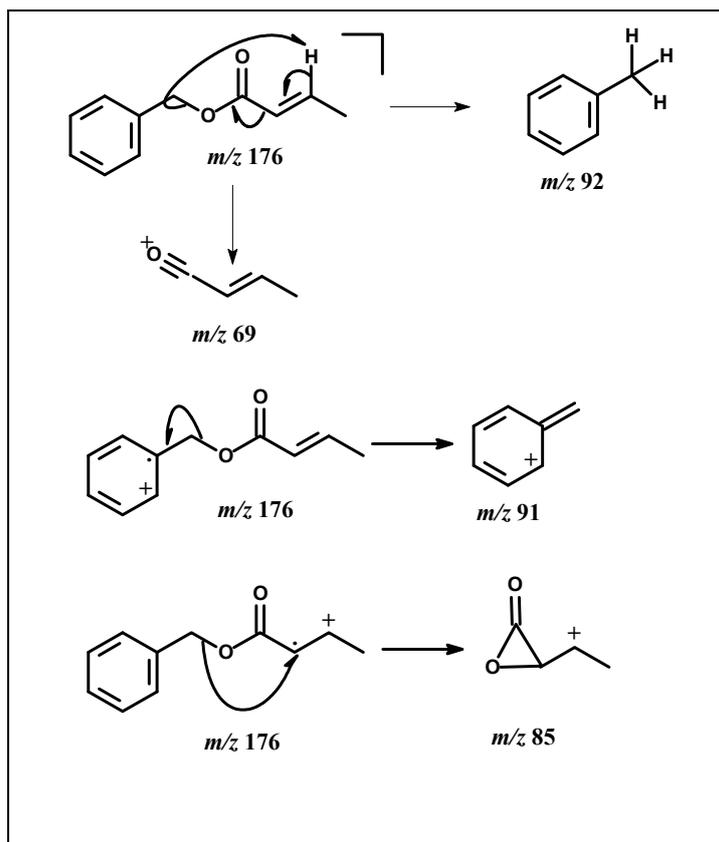


FIGURA 4.141- Proposta de fragmentação para o pico 13.

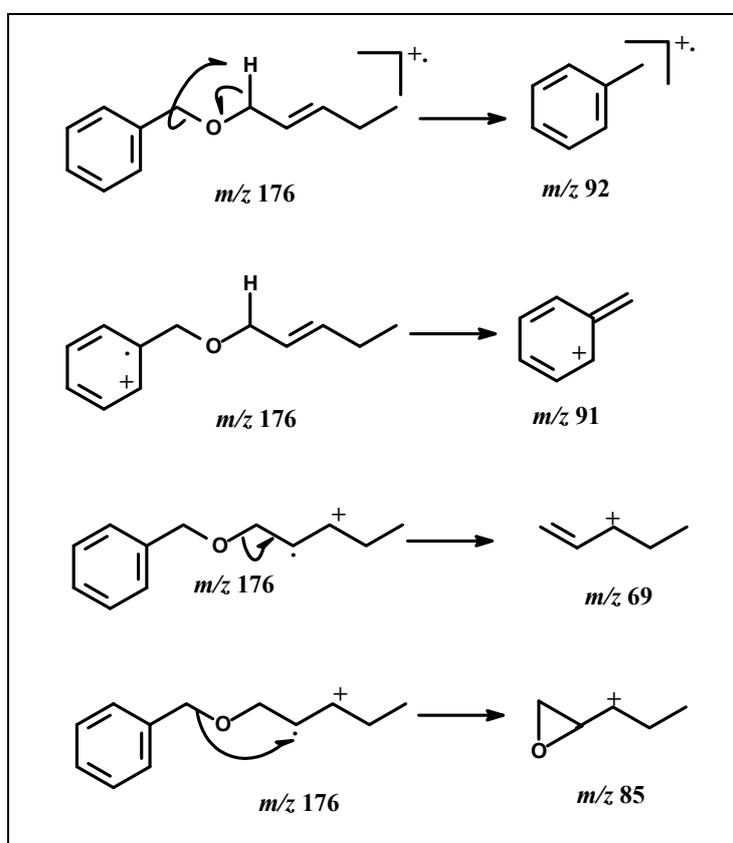


FIGURA 4.142- Proposta de fragmentação para o pico 13.

## Identificação do Pico 15

O espectro de massa referente ao pico 15, o qual apresenta um tempo de retenção de 19,16 minutos, também mostrou baixa similaridade quando comparado com a literatura. Desde modo, inicialmente foi analisado o cromatograma da FIGURA 4.143, o qual sugere um composto com pico do íon molecular de  $m/z$  164. Esse íon molecular ao ser fragmentado origina vários fragmentos, no entanto alguns de intensidades mais elevadas, podendo citar os de razão massa/carga de 164, 149, 91, 71 e 71 sendo que o  $m/z$  164 é o mais intenso no espectro. Esses dados podem ser confirmados pelo espectro de massa representado na FIGURA 4.143.

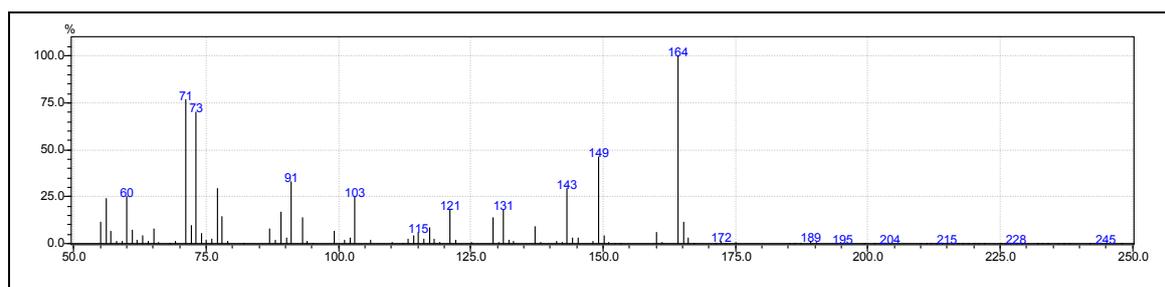


FIGURA 4.143- Espectro de massas obtido do pico 15 em t.r. 19,16 minutos.

Assim, pode-se sugerir uma proposta de fragmentação, sendo que esta se encontra ilustrada na FIGURA 4.144.

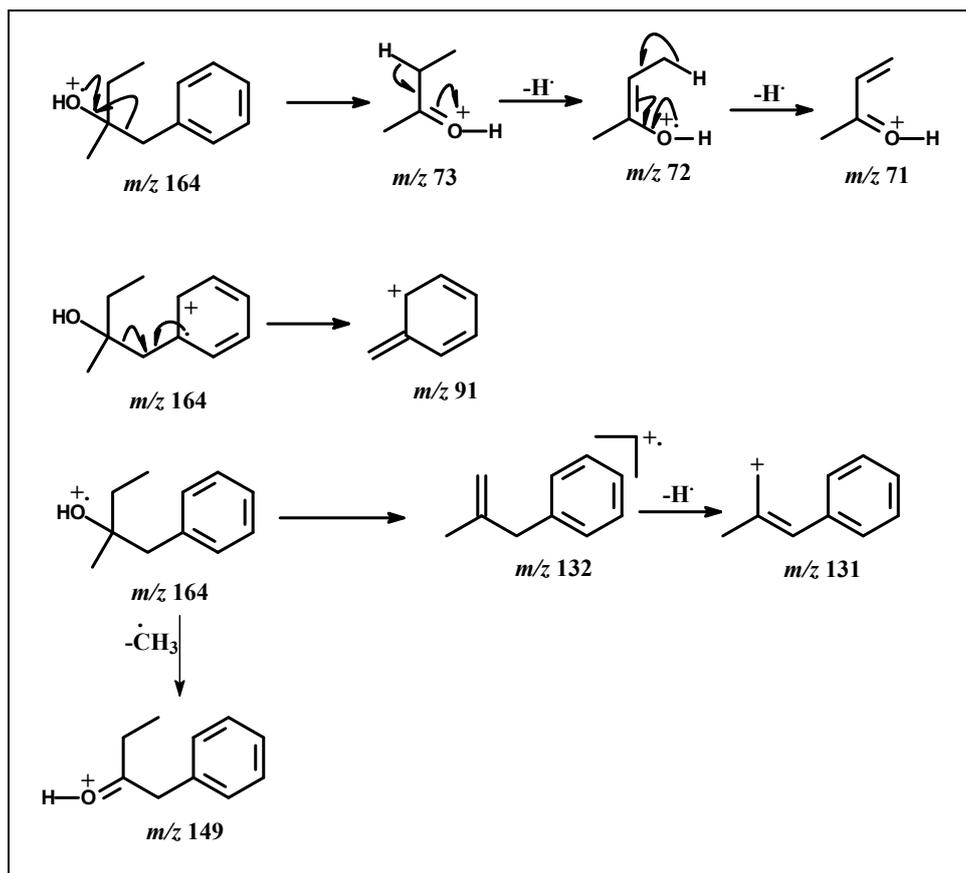


FIGURA 4.144- Proposta de fragmentação para o pico 15.

No entanto, ao observar o espectro de massas na FIGURA 4.143, observa-se um pequeno íon  $m/z\ 165$ . A presença desse íon sugere a molécula conter átomo de enxofre ( $M+1$  e  $M+2$ ) na molécula. Portanto, uma nova proposta de fragmentação pode ser sugerida, a qual está descrita na FIGURA 4.145.

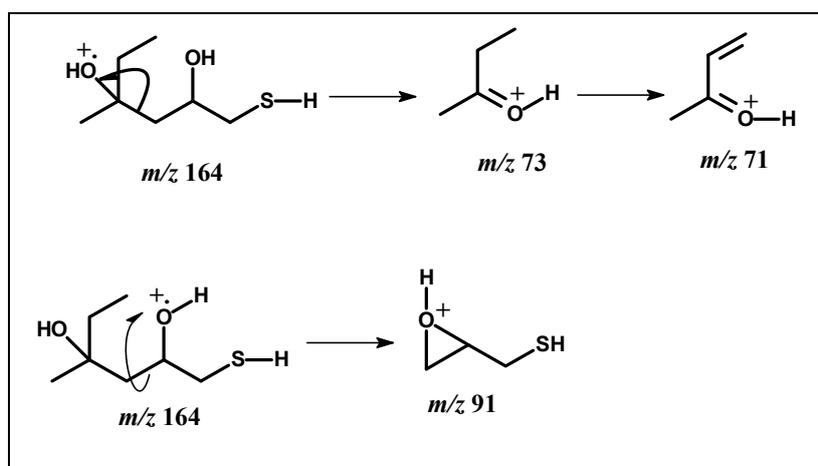


FIGURA 4.145- Proposta de fragmentação para o pico 15, sugerindo a presença de enxofre.

Essa proposta explica os fragmentos mais intensos,  $m/z$  73 e 71, através da quebra homolítica na cadeia. Um segundo caminho, leva a formação do fragmento  $m/z$  91. Ainda sugerindo a presença de enxofre na estrutura do composto, consegue também obter os fragmentos  $m/z$  149, 131 e 132, os quais estão ilustrados na FIGURA 4.146.

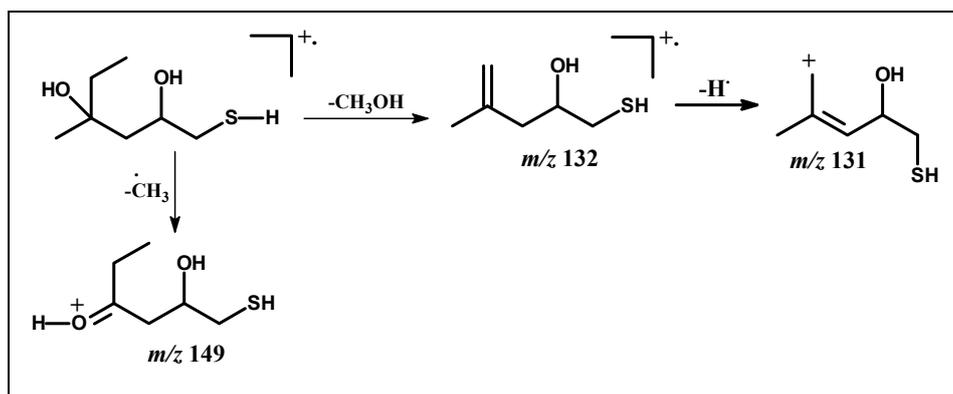


FIGURA 4.146- Proposta de fragmentação para o pico 15, sugerindo a presença de enxofre.

Concluindo, ficou difícil definir a que composto refere-se o espectro de massas do pico 15.

### Identificação do Pico 21

O espectro de massas do pico 21 que apresenta um tempo de retenção de 21,01 mostra como pico base  $m/z$  96. Além desse pico outros também apresentam alta intensidade como, por exemplo, os fragmentos de razão massa/carga 96 e 81, sendo que esses dados podem ser confirmados observando o espectro de massa ilustrado na FIGURA 4.147.

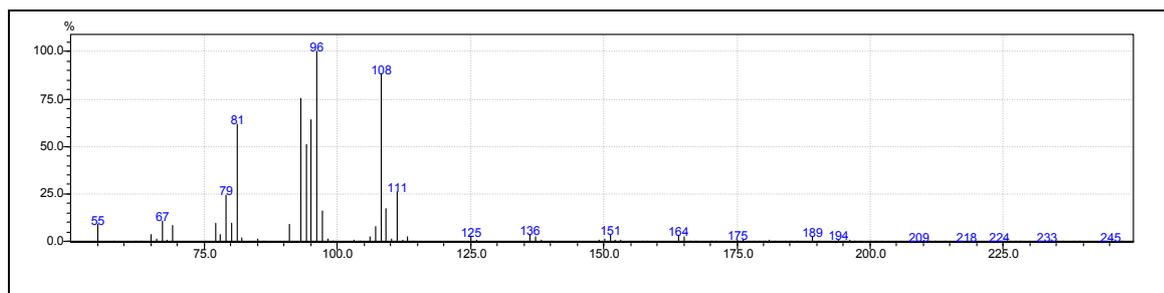


FIGURA 4.147- Espectro de massas obtido do pico 21 em t.r. 21,01 minutos.

Pelo perfil de fragmentação não foi possível encontrar padrão de comparação na literatura, uma vez que a similaridade encontrada foi na faixa de 82-87%. Portanto, mais uma vez foi proposta uma estrutura de fórmula molecular  $C_{14}H_{22}O$ , sendo que esta a ser fragmentada fornece fragmentos que estão de acordo com a razão massa/carga oferecida no espectro de massas da FIGURA 4.147. Em vista disso, na FIGURA 4.148 estão descritas duas propostas de fragmentação.

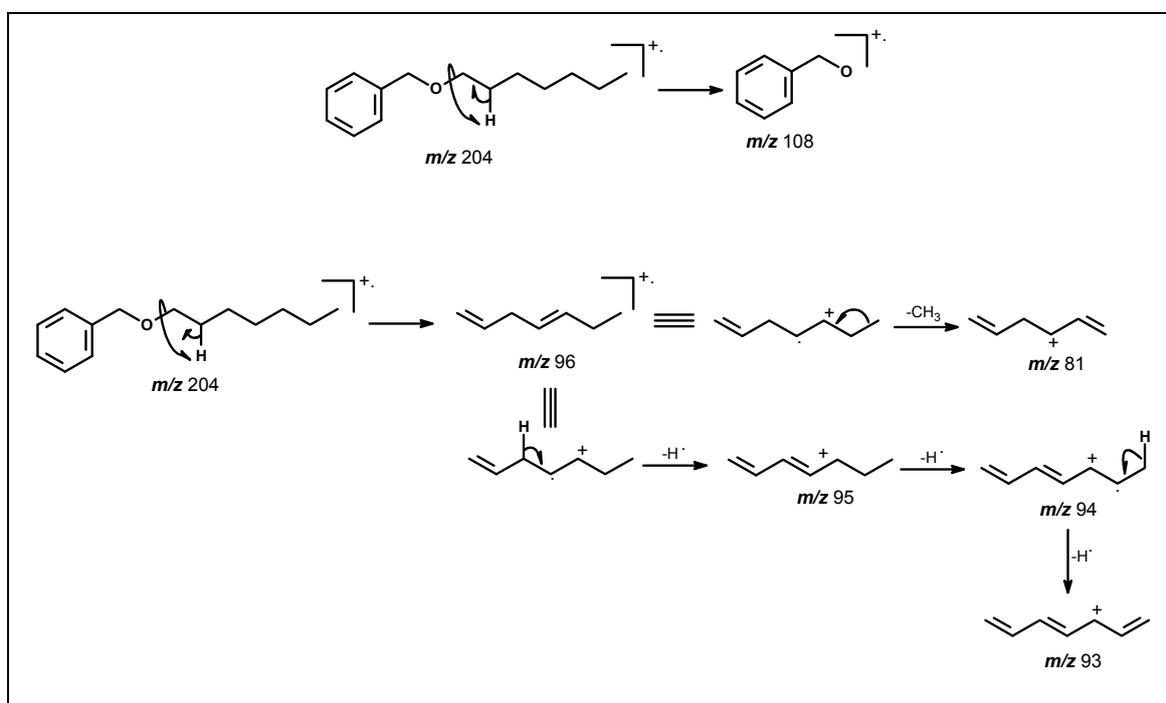


FIGURA 4.148- Proposta de fragmentação para o pico 21.

Com isso, pode-se confirmar a sugestão da fórmula molecular anteriormente mencionada e a estrutura proposta para o pico 21.

#### 4.5.2.2. Grupo 02- Compostos voláteis de *A. alternata*

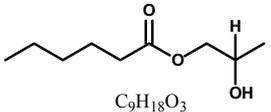
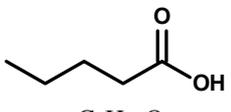
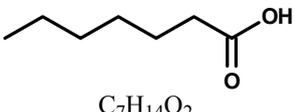
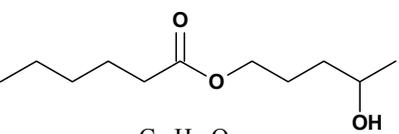
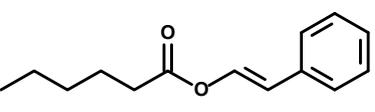
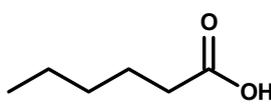
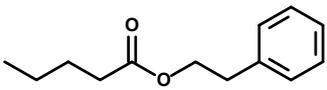
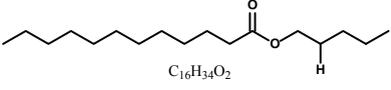
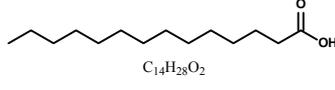
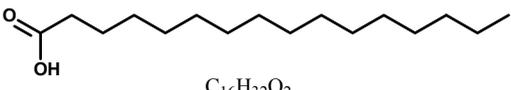
<p style="text-align: center;"><b>Pico 1</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_9H_{18}O_3</math></p>	<p style="text-align: center;"><b>Pico 4</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_5H_{10}O_2</math></p>	<p style="text-align: center;"><b>Pico 7</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_7H_{14}O_2</math></p>
<p style="text-align: center;"><b>Pico 8</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_{11}H_{22}O_3</math></p>	<p style="text-align: center;"><b>Pico 9</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_{14}H_{18}O_2</math></p>	<p style="text-align: center;"><b>Pico 10</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_6H_{12}O_2</math></p>
<p style="text-align: center;"><b>Pico 14</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_{13}H_{18}O_2</math></p>	<p style="text-align: center;"><b>Pico 29</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_{16}H_{34}O_2</math></p>	<p style="text-align: center;"><b>Pico 36</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_{14}H_{28}O_2</math></p>
<p><b>Pico 38</b></p>  <p style="text-align: center;"><math>C_{16}H_{32}O_2</math></p>		

FIGURA 4.149- Compostos voláteis identificados de *A. alternata*.

#### Identificação do Pico 1

O primeiro pico obtido via CG-EM, tem como características um tempo de retenção de 8,53 minutos, a área do pico de 7,68% e um índice de retenção de 970. Observando o espectro de massa, observa um fragmento de razão massa/carga 73, e também o fragmento  $m/z$  145. Esses dados podem ser comprovados analisando a o espectro de massas ilustrado na FIGURA 4.150.

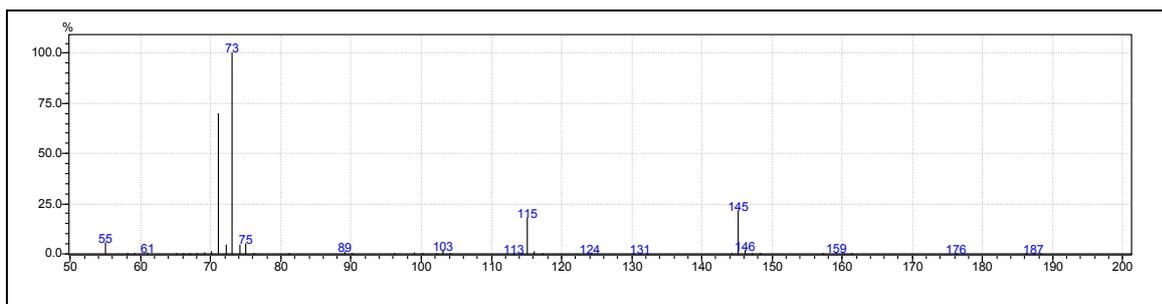


FIGURA 4.150- Espectro de massas obtido do pico 1 em t.r. 8,53 minutos.

De acordo com o espectro de massas, podem-se propor dois caminhos de fragmentação. Isso pode ser comprovado observando a FIGURA 4.151.

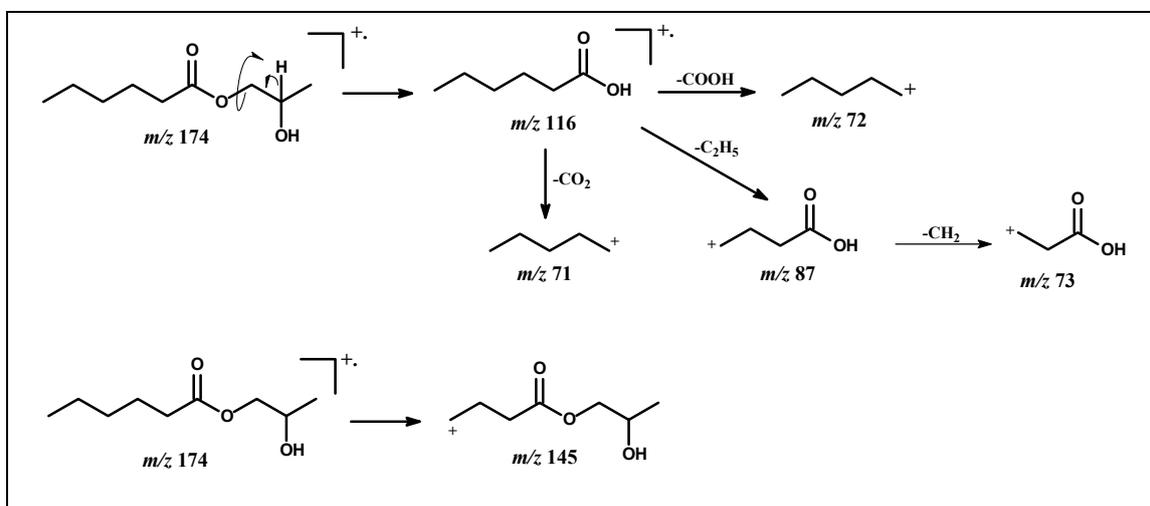


FIGURA 4.151- Proposta de fragmentação para o pico 01.

Com base nesses fragmentos pode sugerir um composto de fórmula estrutural  $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_3$ , diferente daquele proposto pela biblioteca NIST, cuja similaridade estava abaixo de 90%.

### Identificação do Pico 4

O pico 4 apresenta um tempo de retenção de 12,65 minutos. Quando comparado com a literatura, o espectro de massas obtido apresentou baixa similaridade. Na FIGURA 4.152 está ilustrado o espectro de massas, o qual apresenta  $m/z$  73 como sendo o fragmento mais intenso.

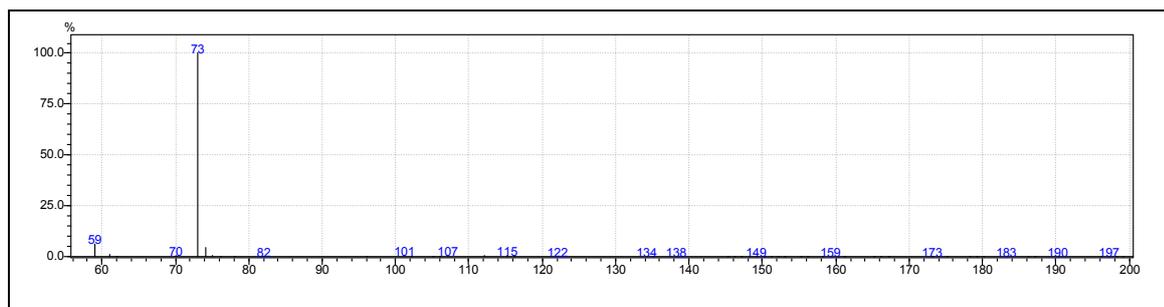


FIGURA 4.152- Espectro de massas obtido do pico 4 em t.r. 12,65 minutos.

Com poucas informações fornecidas pelo espectro de massas, pode-se apenas sugerir um ácido graxo de cadeia pequena,  $C_5H_{10}O_2$ . A FIGURA 4.153 ilustra uma proposta de fragmentação para esse possível ácido graxo.

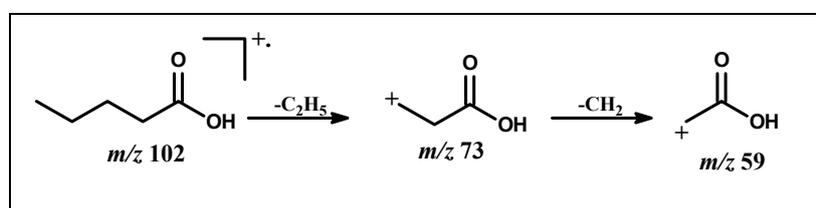


FIGURA 4.153- Proposta de fragmentação para o pico 04.

### Identificação do Pico 7

O pico 7 apresenta um tempo de retenção de 14,87 minutos e um espectro de massas onde os fragmentos de maior intensidades são  $m/z$  73 e 58. No entanto quando se compara com a literatura, a similaridade é aproximadamente de 78%. A FIGURA 4.154 apresenta o espectro de massas para esse pico.

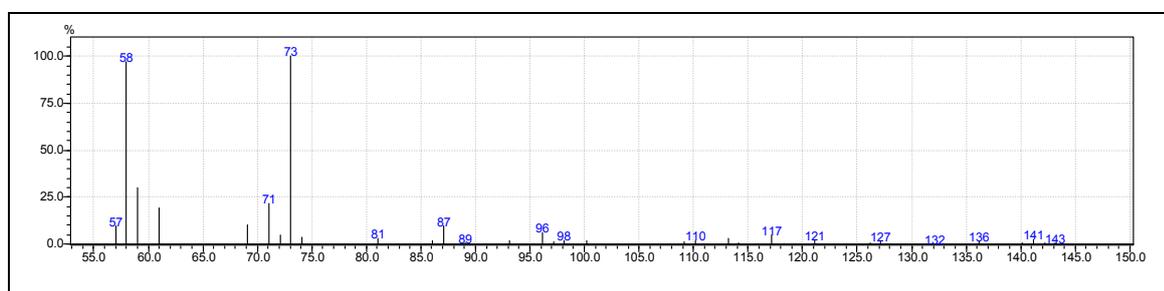


FIGURA 4.154- Espectro de massas obtido do pico 7 em t.r. 14,87 minutos.

Como para o pico 4, o qual também apresenta fragmento de razão massa/carga 73, pode sugerir para esse o pico 7 um ácido graxo contendo dois

átomos de carbono a mais em relação ao composto referente ao pico 4. Com isso o perfil de fragmentação segue o mesmo anterior, como pode ser demonstrado na FIGURA 4.155, a qual traz propostas de fragmentação.

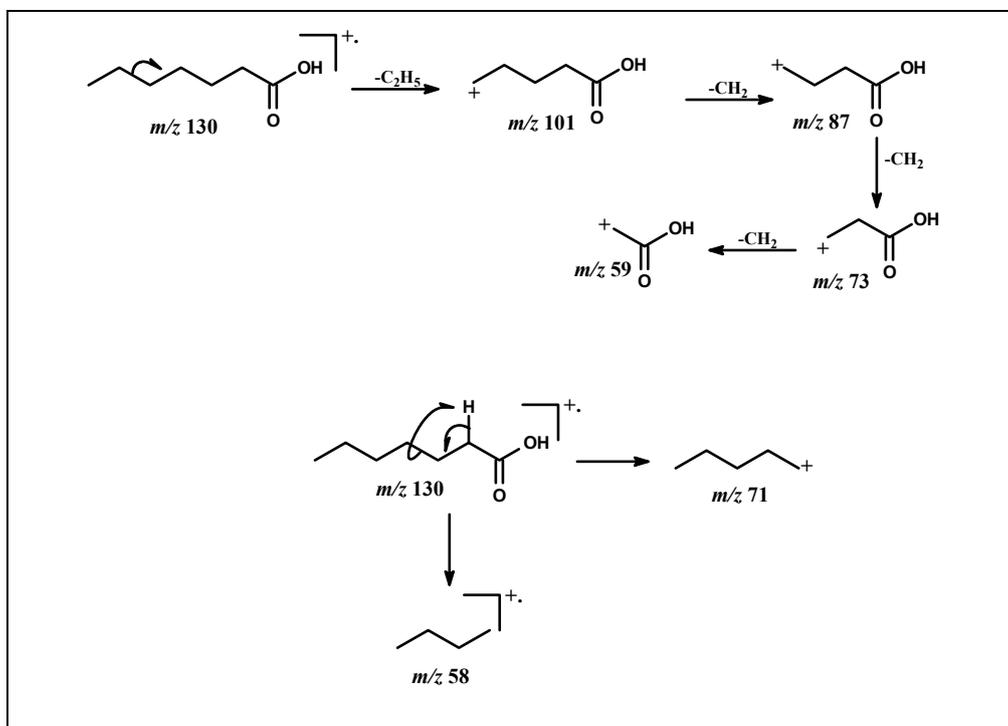


FIGURA 4.155- Proposta de fragmentação para o pico 07.

Com essas informações pode-se sugerir que o composto 7 é um ácido graxo, com 7 carbonos.

### Identificação do Pico 8

O pico 8 apresenta um tempo de retenção de 15,19 minutos e um espectro de massas onde o fragmento mais intenso é  $m/z$  71. Entretanto ao comparar o espectro de massas com a biblioteca NIST e com artigos existentes na literatura foi possível obter uma similaridade de 80%. A FIGURA 4.156 apresenta o espectro de massas, o qual pode concluir que além de  $m/z$  71 outros fragmentos menos intensos estão presentes.

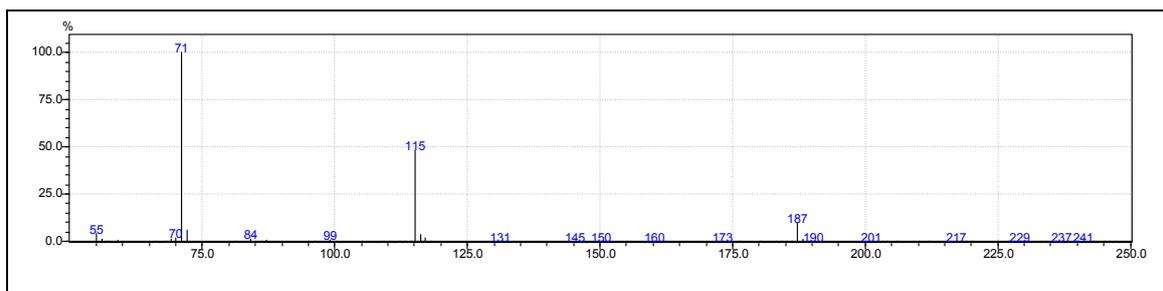


FIGURA 4.156- Espectro de massas obtido do pico 8 em t.r. 15,19 minutos.

Analisando o espectro mais uma vez pode-se sugerir uma molécula de ácido graxo com 11 átomos de carbono o qual pode ser fragmentado por dois caminhos, como pode ser observado na FIGURA 4.157.

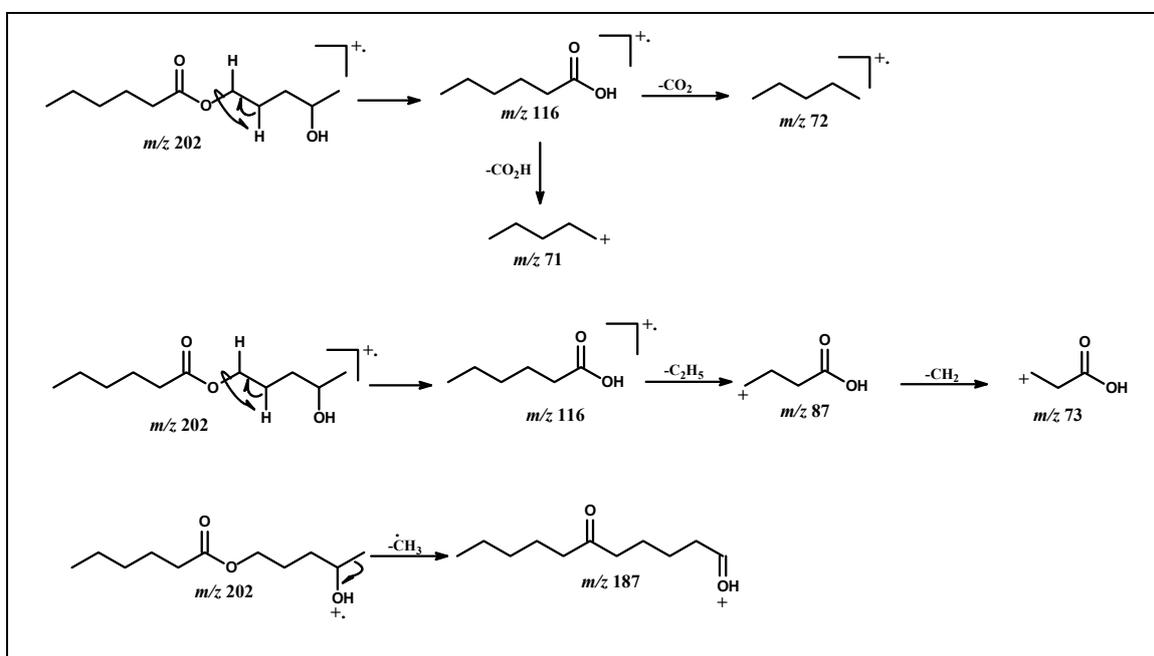


FIGURA 4.157- Proposta de fragmentação para o pico 08.

Com isso, pode-se sugerir um ácido graxo com a fórmula estrutural de  $C_{11}H_{23}O_3$ , entretanto esse composto não foi encontrado na literatura.

### Identificação do Pico 9

O pico 9 apresenta um tempo de retenção de 15,67 minutos e um espectro de massas onde o fragmento mais intenso é  $m/z$  71. Essa mesma similaridade pode ser observada no espectro de massas para o pico 8, ilustrado na FIGURA

4.156. Igualmente ao pico anterior, ao comparar o espectro de massas com a biblioteca NIST e com artigos existentes na literatura foi possível obter uma similaridade de 87%. A FIGURA 4.158 apresenta o espectro de massas com todos os fragmentos, no entanto nota-se que alguns deles apresentam baixa intensidade.

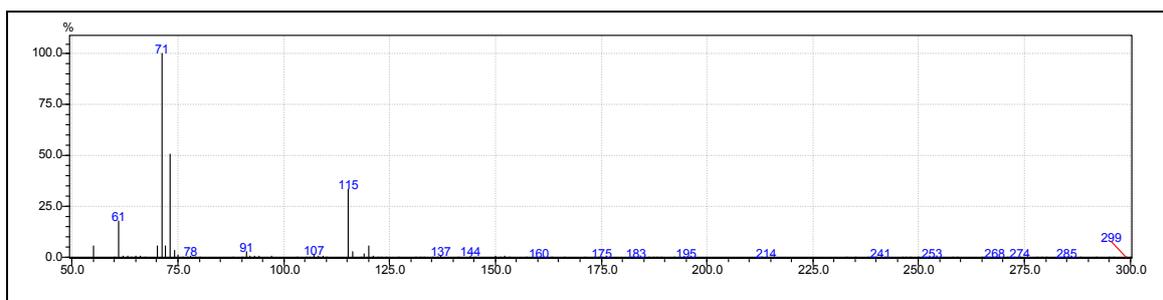


FIGURA 4.158- Espectro de massas obtido do pico 9 em t.r. 15,67 minutos.

Analisando a FIGURA 4.159, podem ocorrer três propostas de fragmentação.

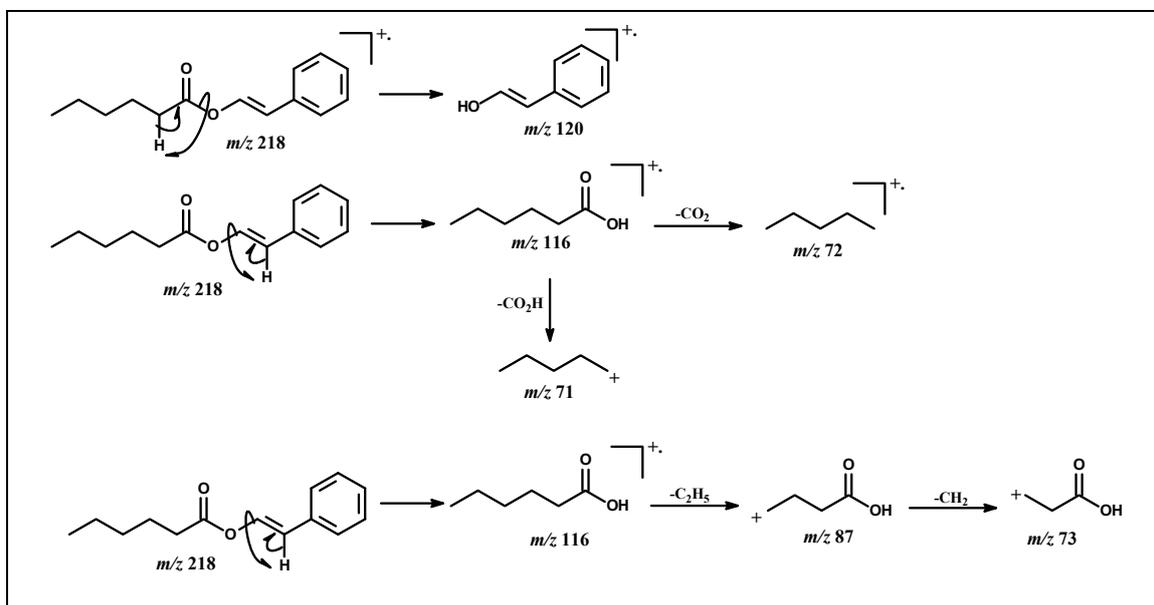


FIGURA 4.159- Proposta de fragmentação para o pico 09.

As propostas de fragmentações para esse pico são semelhantes às propostas já explicadas para o pico 8.

Com base nesse perfil de fragmentação, embora a molécula apresenta um anel aromático na sua estrutura, o seu perfil de fragmentação observado pelos fragmentos obtidos estão de acordo com as propostas sugeridas para ácidos graxos de cadeia alifática. Entretanto esse composto não foi encontrado na literatura.

### Identificação do Pico 10

O pico 10 apresenta um tempo de retenção de 16,03 minutos e um espectro de massas onde o fragmento mais intenso novamente é  $m/z$  71. Novamente, ao comparar o espectro de massas com a biblioteca NIST e com artigos existentes na literatura foi possível obter uma similaridade de apenas 88%. A FIGURA 4.160 apresenta o espectro de massas para esse pico.

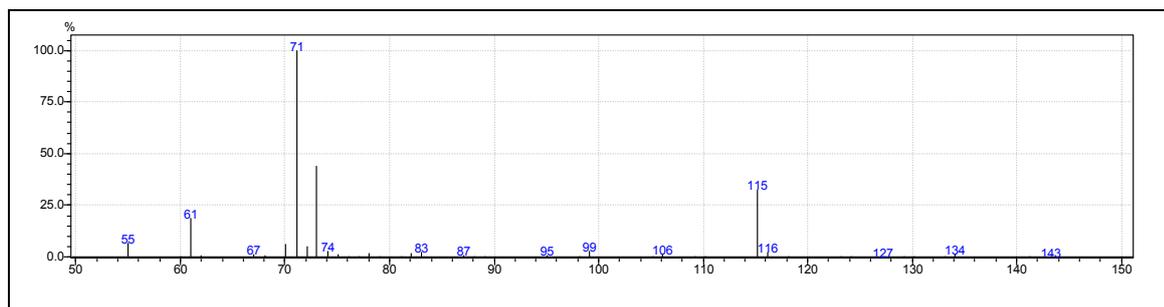


FIGURA 4.160- Espectro de massas obtido do pico 10 em t.r. 16,03 minutos.

Analisando o espectro confirma a presença do fragmento  $m/z$  71 sugerindo assim uma molécula de ácido graxo com o pico do íon molecular de  $m/z$  116, propondo assim uma estrutura  $C_6H_{12}O_2$ . Essa molécula pode se fragmentar por três caminhos diferentes como pode ser observado na FIGURA 4.161.

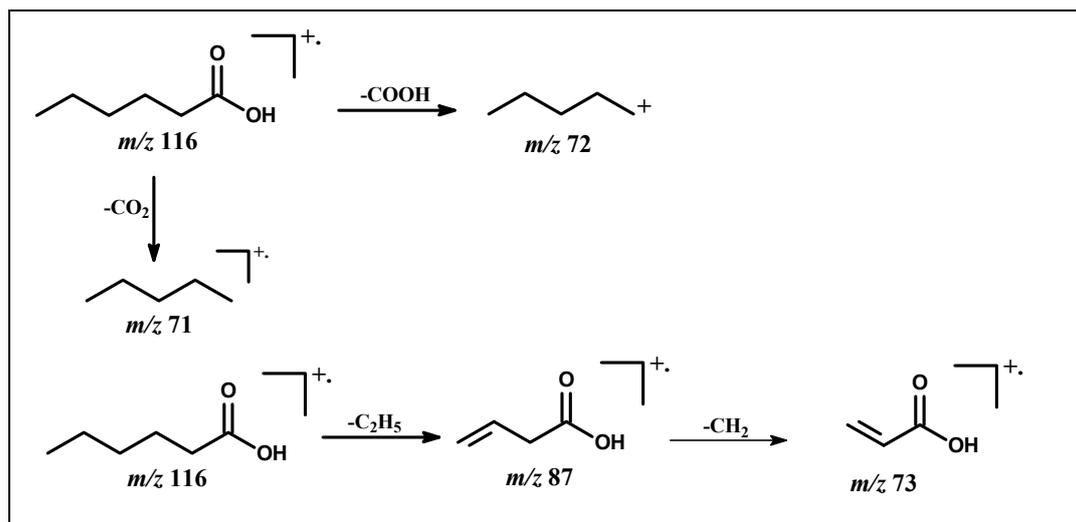


FIGURA 4.161- Proposta de fragmentação para o pico 10.

Com base nessas informações pode-se sugerir novamente um composto pertencente à classe dos ácidos graxos, ou seja, o ácido n-hexanóico. Proposta diferente daquela sugerida pela biblioteca NIST, cuja similaridade estava abaixo de 90%.

### Identificação do Pico 14

O pico 14 apresenta um tempo de retenção de 18,78 minutos e um espectro de massas onde o fragmento mais intenso é  $m/z\ 73$ . Igualmente aos demais compostos, ao comparar o espectro de massas com a biblioteca NIST foi possível obter uma similaridade de 80%. A FIGURA 4.162 apresenta o espectro de massas que contém todos os fragmentos, inclusive os de menor intensidade.

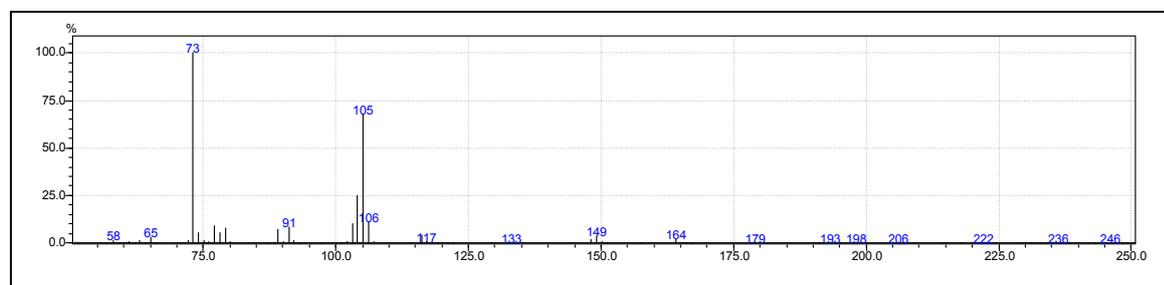


FIGURA 4.162- Espectro de massas obtido do pico 14 em t.r. 18,78 minutos.

Como pode ser observado na FIGURA 4.162, o espectro apresenta poucas informações, no entanto é possível constatar mais uma vez a presença do íon  $m/z$  73, sendo este o mais intenso, e também o íon  $m/z$  105. Fazendo uma pequena ampliação no espectro de massas, concluiu que o pico do íon molecular é 206, indicando, portanto um composto de fórmula molecular  $C_{13}H_{18}O_2$ .

A FIGURA 4.163 ilustra uma proposta de fragmentação para esse composto, um possível éster de ácido graxo.

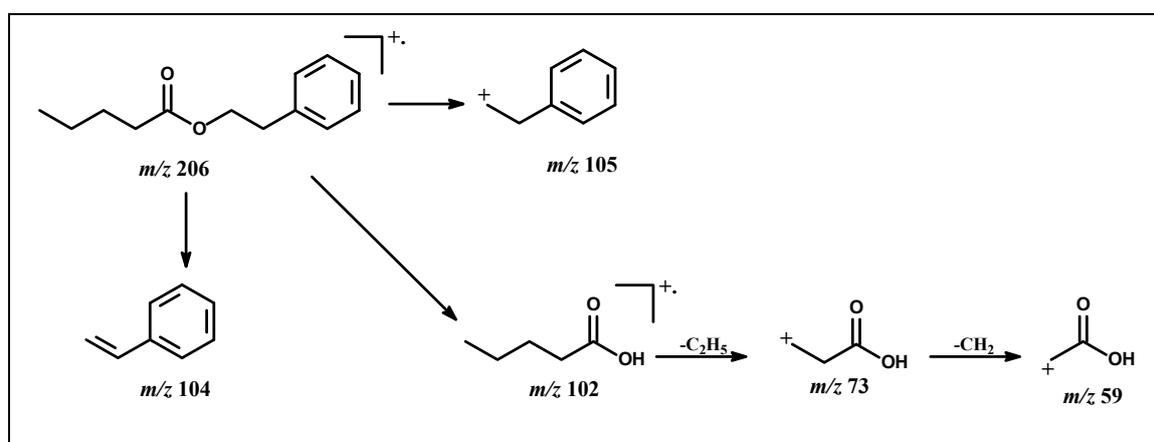


FIGURA 4.163- Proposta de fragmentação para o pico 14.

Pelo perfil de fragmentação apresentado inicialmente pode-se sugerir que o composto também pertence à classe de ácidos graxos, entretanto com a presença de anel aromático uma vez que o fragmento  $m/z$  105 é detectado e também pelo pequeno fragmento  $m/z$  91.

### Identificação do Pico 29

O pico 29 apresenta um tempo de retenção de 23,30 minutos e um espectro de massas onde o fragmento mais intenso é  $m/z$  69. Igualmente aos demais compostos, ao comparar o espectro de massas com a biblioteca NIST foi possível obter uma similaridade de 78%. A FIGURA 4.164 apresenta o espectro de massas que contém todos os fragmentos.

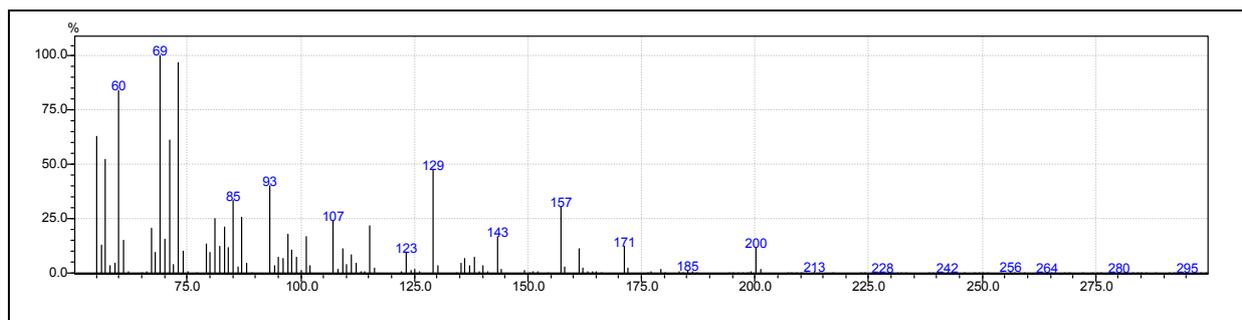


FIGURA 4.164- Espectro de massas obtido do pico 29 em t.r. 23,29 minutos.

É possível constatar ao observar a FIGURA 4.164 que o pico base é o íon  $m/z$  69, no entanto existem outros picos com alta intensidade. Para esse composto foi sugerido a razão massa/carga de 282, de fórmula molecular  $C_{16}H_{34}O_2$ . Na FIGURA 4.165 está descrito o perfil de fragmentação. Esse composto não foi encontrado na literatura.

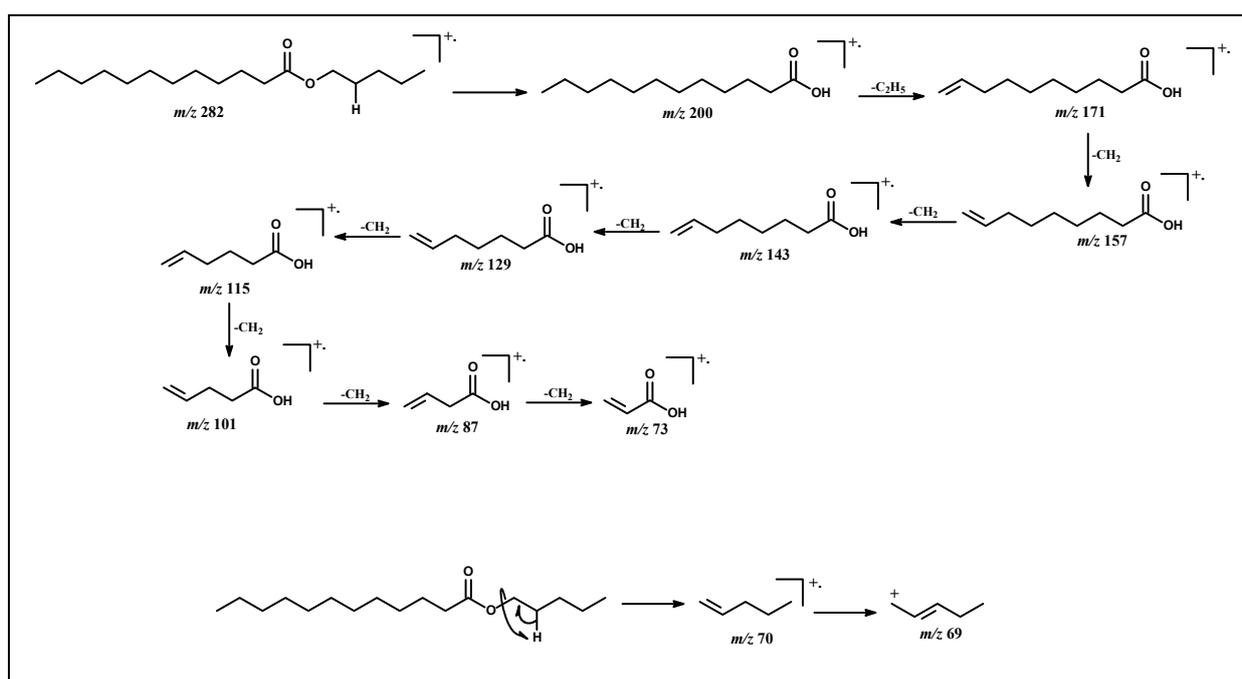


FIGURA 4.165- Proposta de fragmentação para o pico 29.

## Identificação do Pico 36

O pico 36 apresenta um tempo de retenção de 27,13 minutos e um espectro de massas onde o fragmento mais intenso é  $m/z$  73. Igualmente aos demais compostos, ao comparar o espectro de massas com a biblioteca NIST foi possível obter uma similaridade de 85%. A FIGURA 4.166 apresenta o espectro de massas referente ao pico 36.

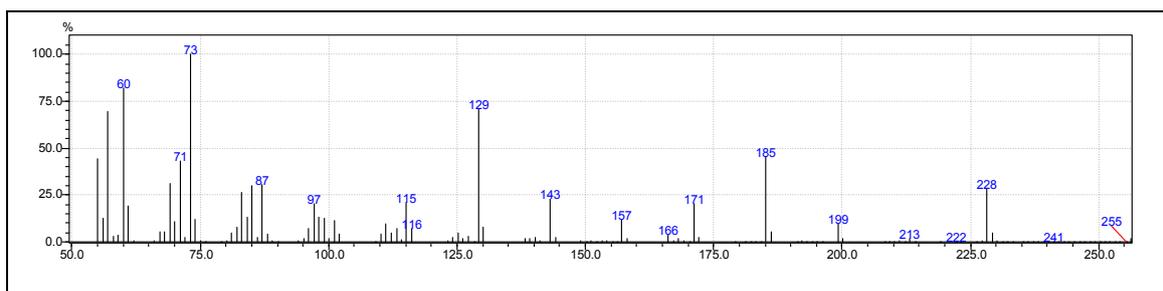


FIGURA 4.166- Espectro de massas obtido do pico 36 em t.r. 27,13 minutos.

É possível constatar ao observar a FIGURA 4.166 que o pico base é o íon  $m/z$  73, e o pico do íon molécula é  $m/z$  228. Para esse composto, portanto, foi à fórmula molecular  $C_{16}H_{34}O_2$ . Na FIGURA 4.167 está descrito o perfil de fragmentação.

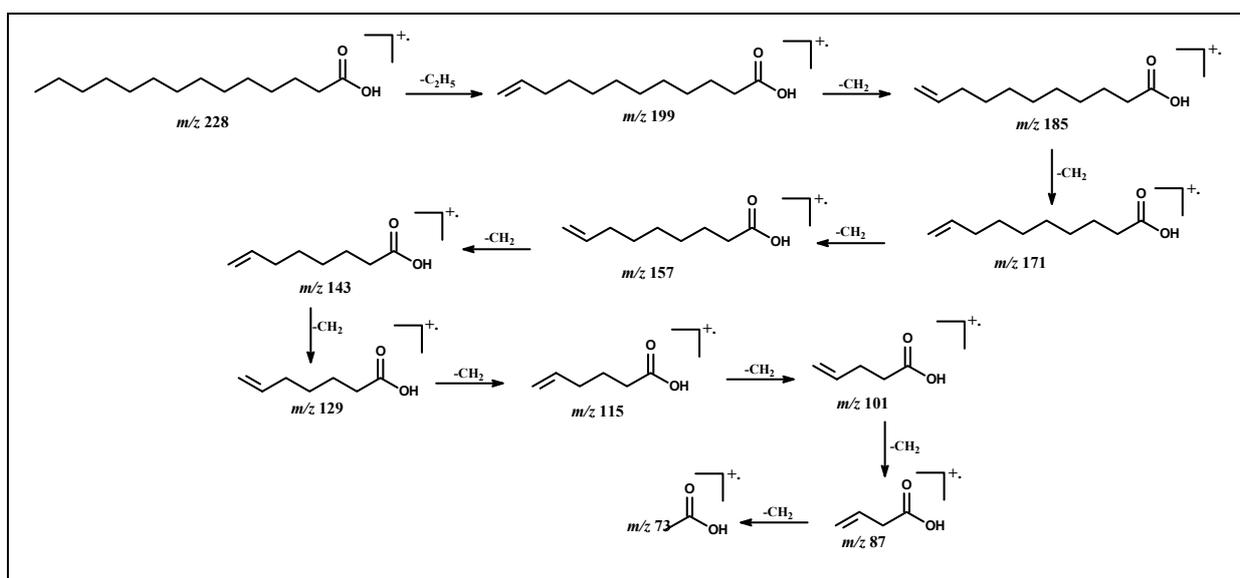


FIGURA 4.167- Proposta de fragmentação para o pico 36.

## Identificação do Pico 38

O pico 38 apresenta um tempo de retenção de 30,63 minutos e um espectro de massas onde o fragmento mais intenso é  $m/z$  73, assemelhando-se ao pico 36. Igualmente aos demais compostos, ao comparar o espectro de massas com a biblioteca NIST foi possível obter uma similaridade de 87%. A FIGURA 4.168 apresenta o espectro de massas referente ao pico 38.

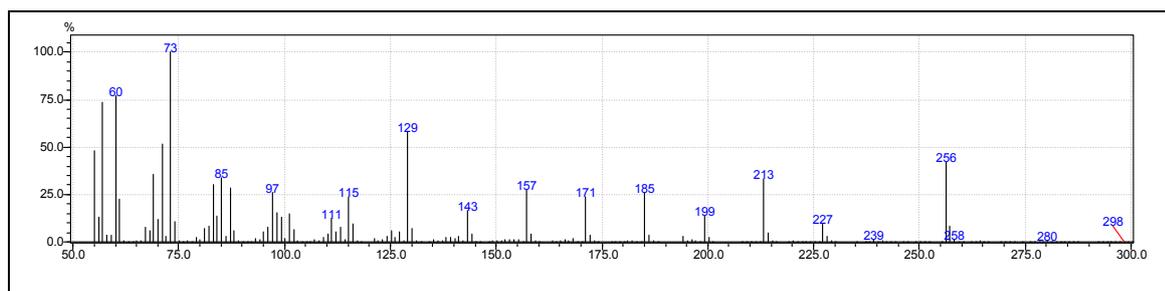


FIGURA 4.168- Espectro de massas obtido do pico 38 em t.r. 30,63 minutos.

É possível constatar ao observar a FIGURA 4.168 que o pico base é o íon  $m/z$  73, e o pico do íon molécula é  $m/z$  256. Para esse composto, portanto, foi a fórmula molecular  $C_{16}H_{34}O_2$ . Na FIGURA 4.169 está descrito o perfil de fragmentação, o qual é o mesmo do pico 36.

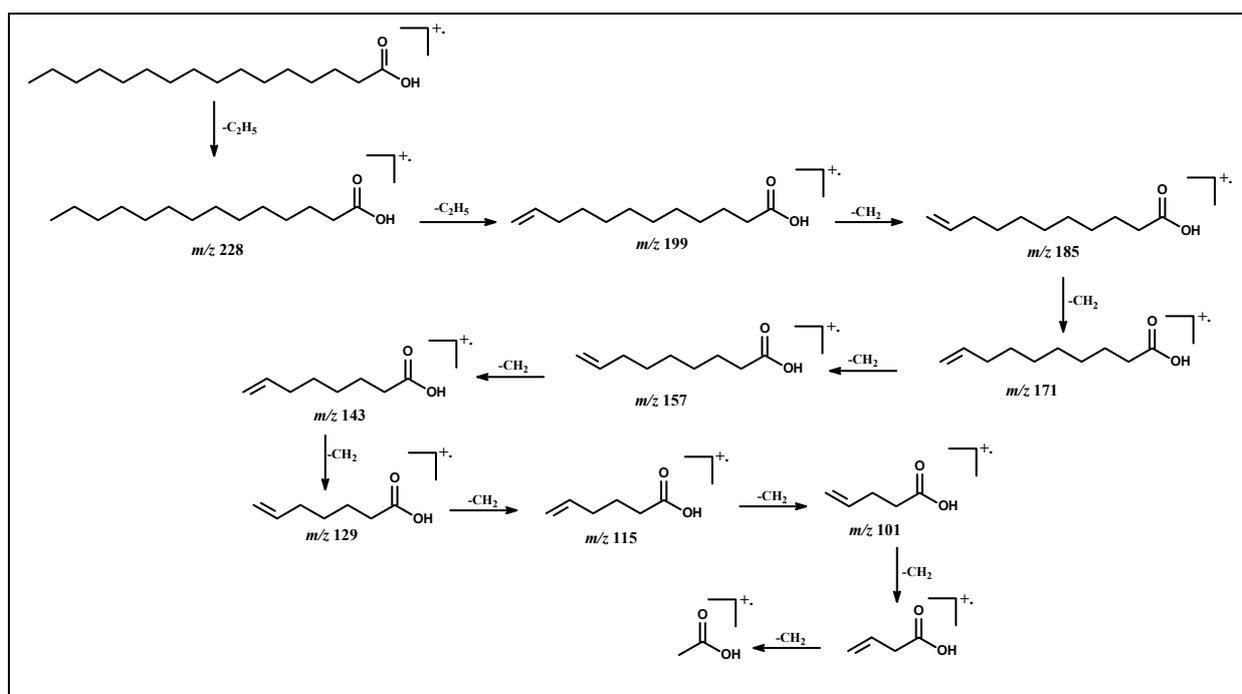


FIGURA 4.169- Proposta de fragmentação para o pico 38.

### 4.5.2.3. Grupo 03- Outros Compostos

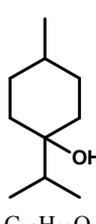
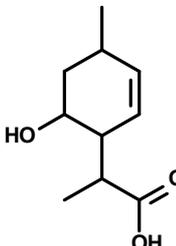
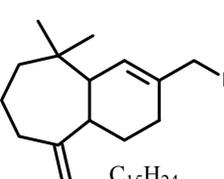
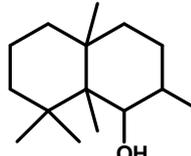
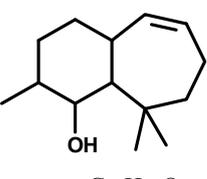
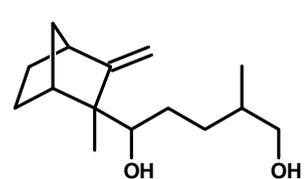
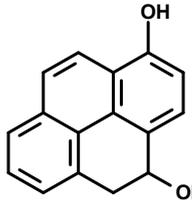
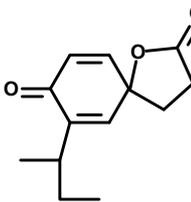
<p><b>Pico 2</b></p>  <p><math>C_{10}H_{20}O</math></p>	<p><b>Pico 11</b></p>  <p><math>C_{10}H_{16}O_3</math></p>	<p><b>Pico 16</b></p>  <p><math>C_{15}H_{24}</math></p>	<p><b>Pico 27</b></p>  <p><math>C_{15}H_{27}O</math></p>
<p><b>Pico 31</b></p>  <p><math>C_{15}H_{26}O</math></p>	<p><b>Pico 33</b></p>  <p><math>C_{16}H_{24}O_2</math></p>	<p><b>Pico 34</b></p>  <p><math>C_{16}H_{12}O_2</math></p>	<p><b>Pico 37</b></p>  <p><math>C_{17}H_{24}O_3</math></p>

FIGURA 4.170- Compostos voláteis identificados de *A. alternata*.

#### Identificação do Pico 02

Este pico apresenta um tempo de retenção de 9,09 minutos. Ao analisar o espectro de massas, observa-se que o pico base possui uma relação massa/carga 69. Ao pesquisar o perfil de fragmentação desse composto não foi possível obter uma similaridade acima de 90% para a obtenção da possível estrutura. A FIGURA 4.171 apresenta o espectro de massas que contém todos os possíveis fragmentos.

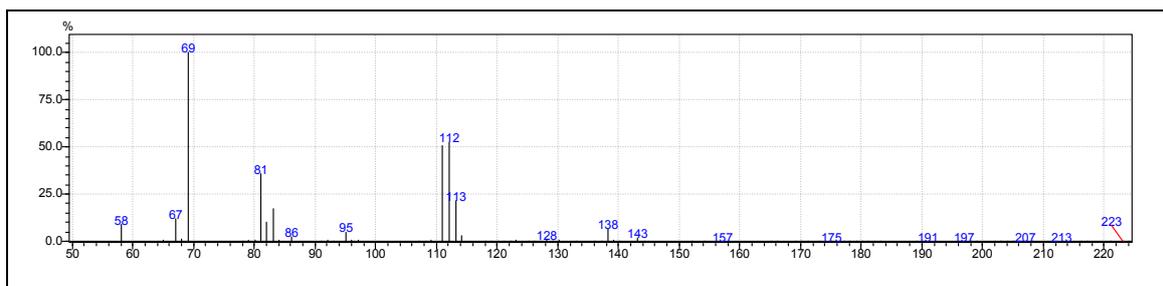


FIGURA 4.171- Espectro de massas obtido do pico 2 em t.r. 9,09 minutos.

Observando o espectro foi possível propor uma estrutura de um monoterpene hidroxilado com uma fórmula molecular  $C_{10}H_{20}O$  ( $m/z$  156). Com isso, foi possível sugerir uma proposta de fragmentação, com três possíveis caminhos, a qual segue ilustrada na FIGURA 4.172.

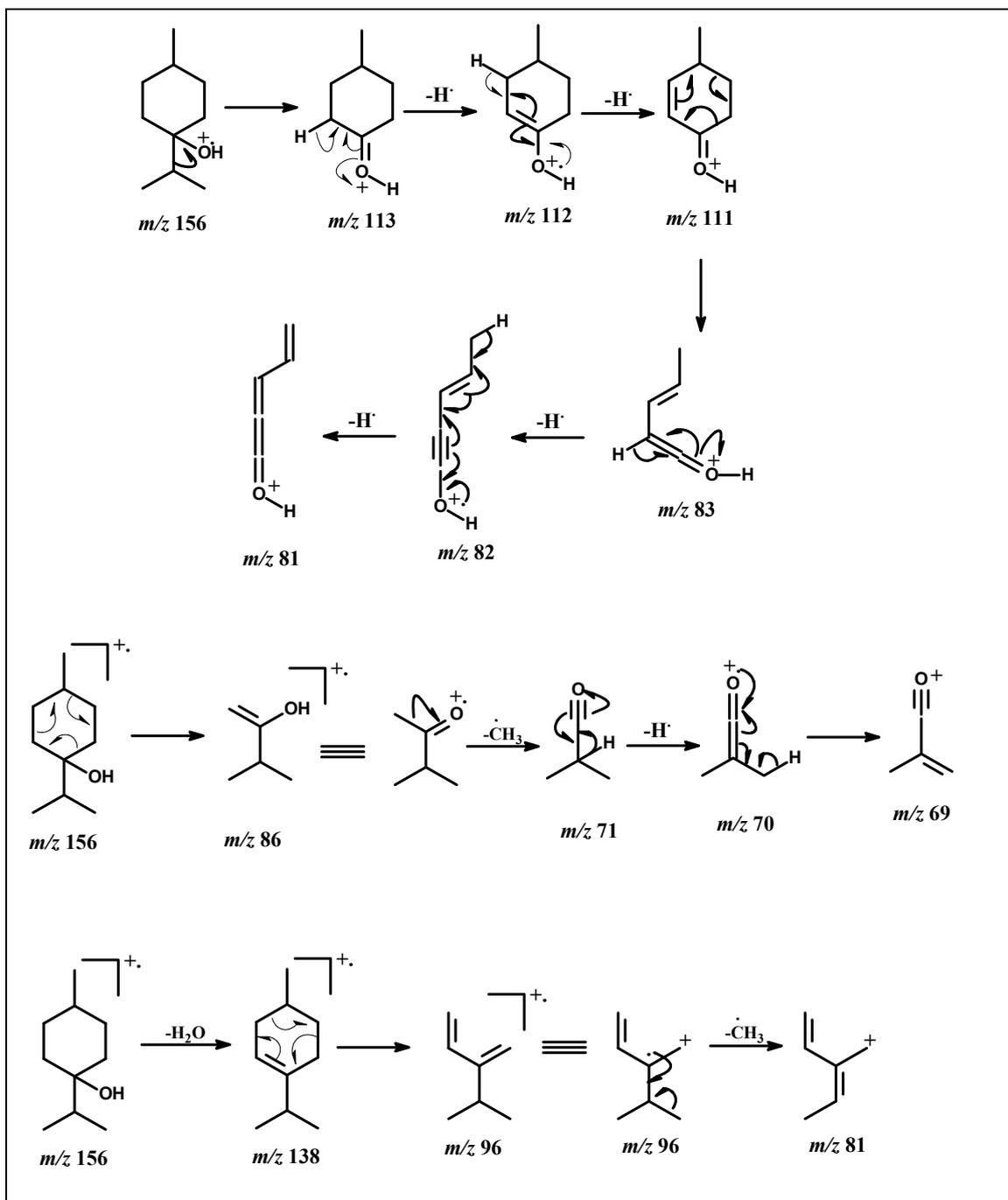


FIGURA 4.172- Proposta de fragmentação para o pico 02.

O composto ciclo hexanol,4-metil-1-(1-metil-etil) já foi identificado em bactéria *Clostridium difficile*, presente em pacientes com doenças gastrointestinais (GARNER, *et al.*, 2007).

## Identificação do Pico 11

O pico 11 apresenta um tempo de retenção de 16,27 minutos. Na FIGURA 4.173 pode ser observado o espectro de massas o qual tem como íon base  $m/z$  82 com uma intensidade de 100%. Outros fragmentos são observados, no entanto com intensidades menores. Entretanto, ao pesquisar compostos com perfil de fragmentação similar a esse identificado, não foi possível obter uma similaridade superior a 80%.

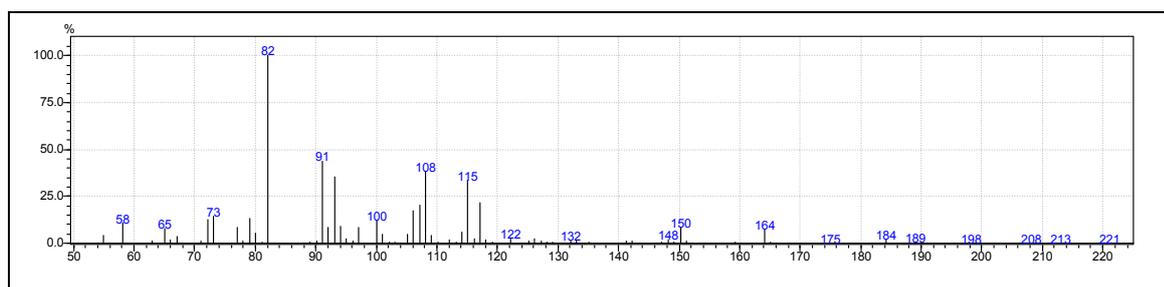


FIGURA 4.173- Espectro de massas obtido do pico 11 em t.r. 16,27 minutos.

Portanto, com base na FIGURA 4.173 foi proposta um perfil de fragmentação (FIGURA 4.174) sugerindo um monoterpreno de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$  e pico do íon molecular de razão massa/carga 184.

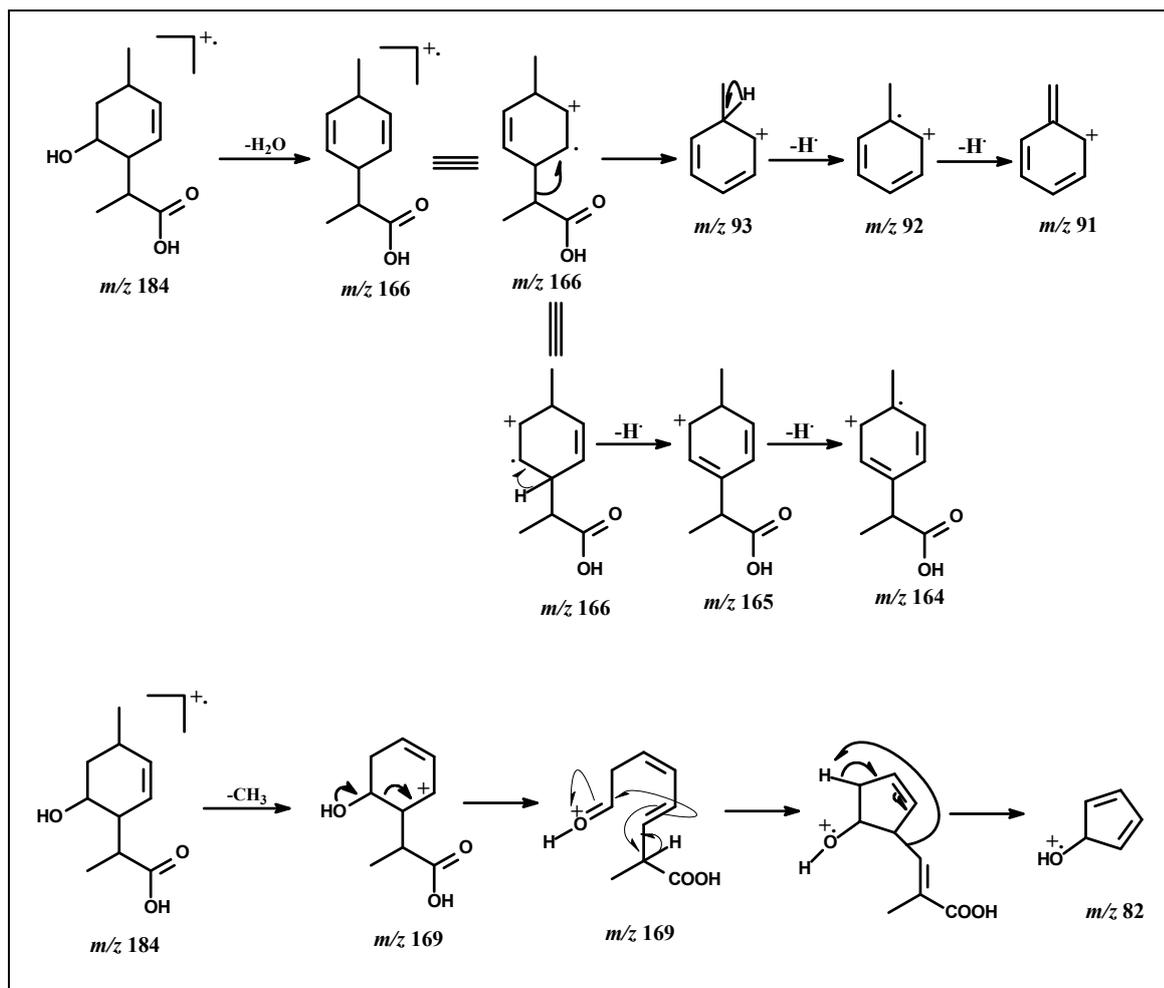


FIGURA 4.174- Proposta de fragmentação para o pico 11.

A estrutura referente ao pico 11 não foi encontrada na literatura.

### Identificação do Pico 16

O pico 16 apresenta um tempo de retenção de 19,97 minutos. Analisando o espectro de massas ilustrado na FIGURA 4.175 pode-se concluir que o pico íon base é m/z 119 e o pico do íon molécula é m/z 204. Outros fragmentos também são observados, no entanto com intensidades menores. Ao comparar esse perfil de fragmentação com a biblioteca NIST, obteve-se uma similaridade de 85%.

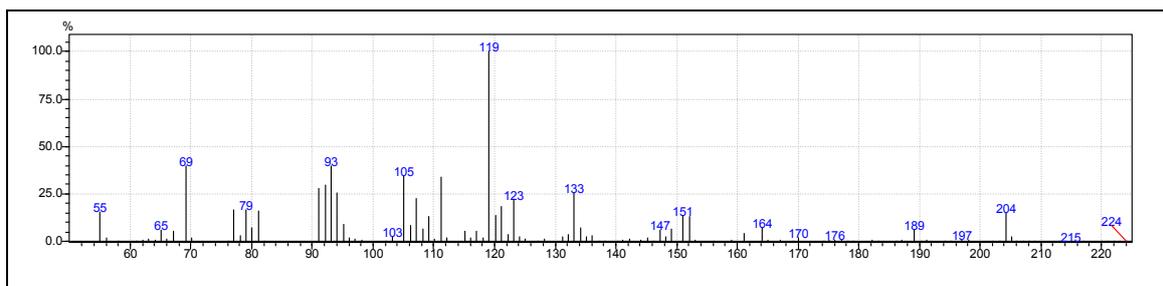


FIGURA 4.175- Espectro de massas obtido do pico 16 em t.r. 19,97 minutos.

Com isso, pode-se propor uma fragmentação a qual pode seguir dois caminhos distintos, como pode ser observado na FIGURA 4.176.

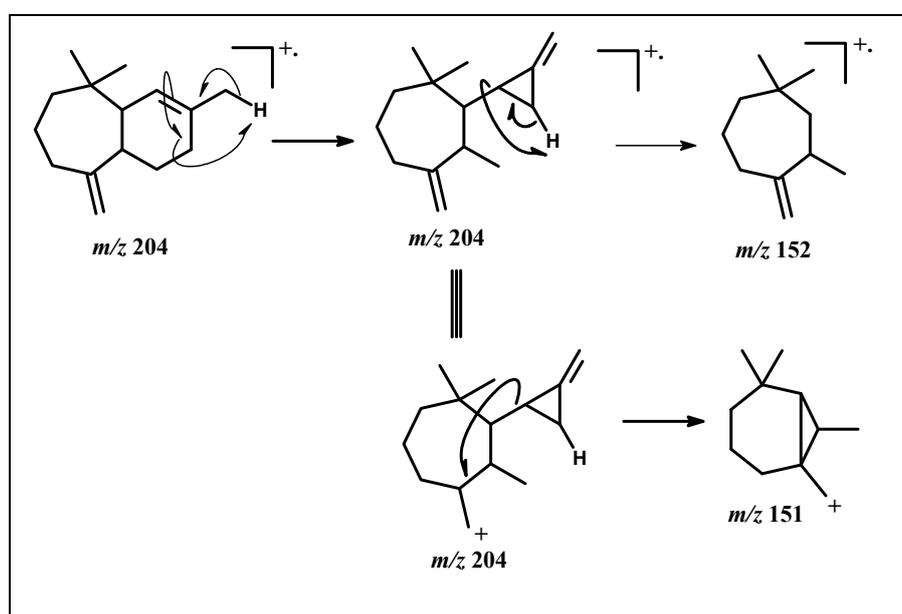


FIGURA 4.176- Proposta de fragmentação para o pico 16.

O primeiro caminho leva a formação de  $m/z$  152 a partir do pico do íon molecular  $m/z$  204. O outro caminho leva a formação de  $m/z$  151.

Esse composto é um sesquiterpeno, porém não corresponde com nenhum citado pela biblioteca NIST.

Segundo a literatura, o volátil já foi identificado em *Hypericum perforatum L.*, *Hypericum tetrapterum Fries* e *Hypericum olympicum L.* (PAVLOVIC, *et al.*, 2006).

## Identificação do Pico 27

Com um tempo de retenção de 22,47 minutos o pico 27, apresenta um espectro de massas com um pico de íon base  $m/z$  121 além de outros fragmentos que são observados, com menor intensidade tais como  $m/z$  168 e 83. Ao pesquisar compostos com perfil de fragmentação similar a esse identificado, não foi possível obter uma similaridade superior a 69%. A FIGURA 4.177 ilustra o espectro de massas para esse composto.

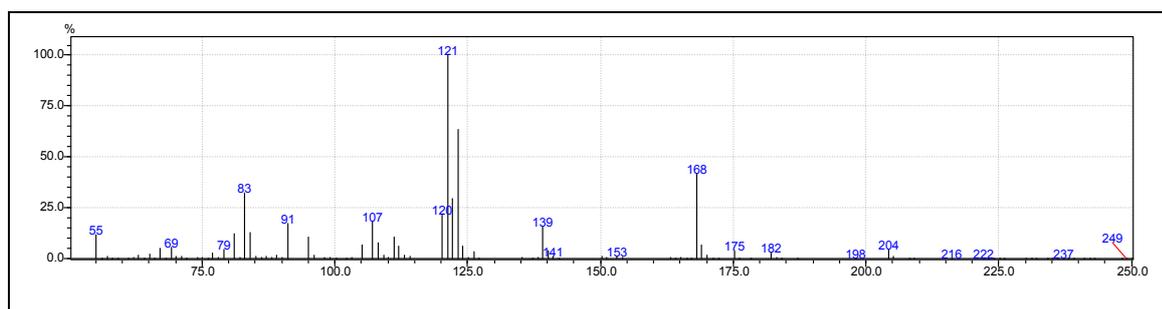


FIGURA 4.177- Espectro de massas obtido do pico 27 em t.r. 22,47 minutos.

Sendo assim, com base na FIGURA 4.177 pode ser proposta um perfil de fragmentação sugerindo um sesquiterpeno de fórmula molecular  $C_{15}H_{27}O$  e pico do íon molecular de razão massa/carga 223, a qual esta descrita na FIGURA 4.178.

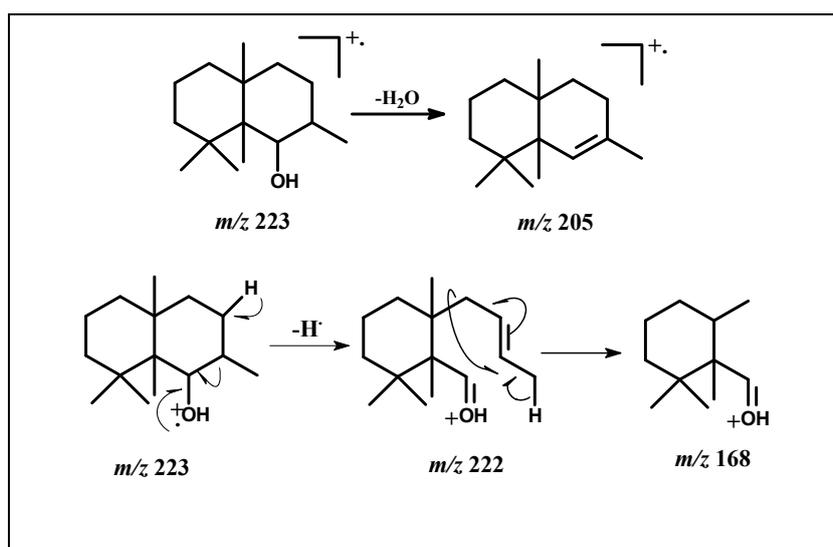


FIGURA 4.178- Proposta de fragmentação para o pico 27.

Esse sesquiterpeno, porém não corresponde com nenhum citado pela biblioteca NIST.

### Identificação do Pico 31

O pico 31 apresenta um tempo de retenção de 24,67. A partir do espectro de massa ilustrado na FIGURA 4.179, apresenta um pico de íon base  $m/z$  132. Quando comparado com a literatura esse perfil de fragmentação apresentou uma similaridade de 75%. A FIGURA 4.179 ilustra o espectro de massas para esse composto.

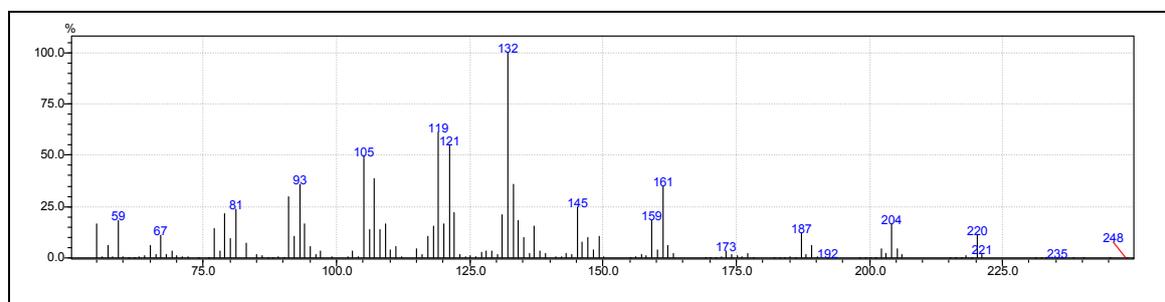


FIGURA 4.179- Espectro de massas obtido do pico 31 em t.r. 24,67 minutos.

A partir do perfil de fragmentação, pode-se supor que o composto seja um sesquiterpeno. A proposta oferecida pela literatura sugere um composto de  $m/z$  204. Assim, foi proposto um segundo sesquiterpeno com  $m/z$  202. A proposta de fragmentação (FIGURA 4.180) reforça a presença deste composto.

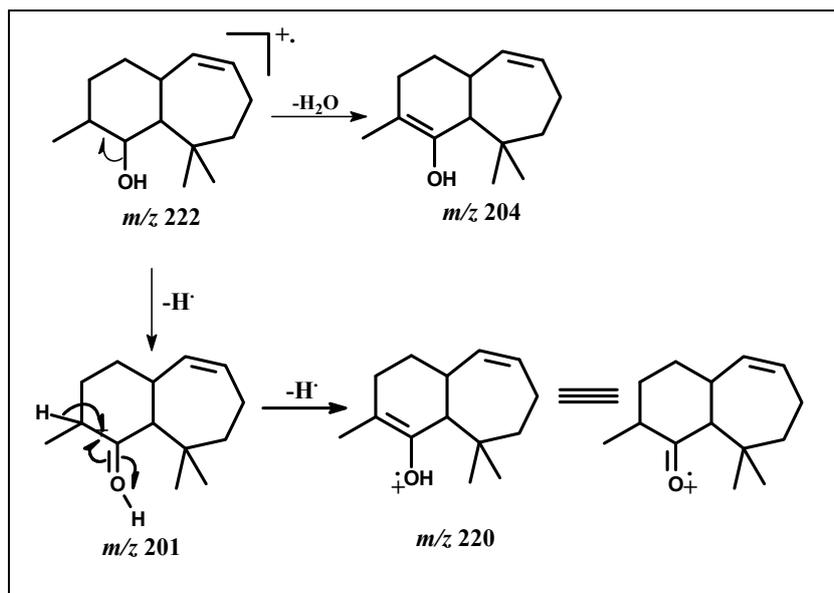


FIGURA 4.180- Proposta de fragmentação para o pico 31.

Com isso, pode sugerir um sesquiterpeno de fórmula molecular  $C_{15}H_{26}O$ , sendo que esse composto não foi encontrado na literatura.

### Identificação do Pico 33

O pico 33 apresenta um tempo de retenção de 25,41. Para essa substância observa-se o pico de íon base  $m/z$  132 e um pico do íon molecular de  $m/z$  202. O perfil de fragmentação para esse composto ao ser comparado com a literatura apresentou uma similaridade de 74%. Na FIGURA 4.181 ilustra o espectro de massa para esse composto volátil.

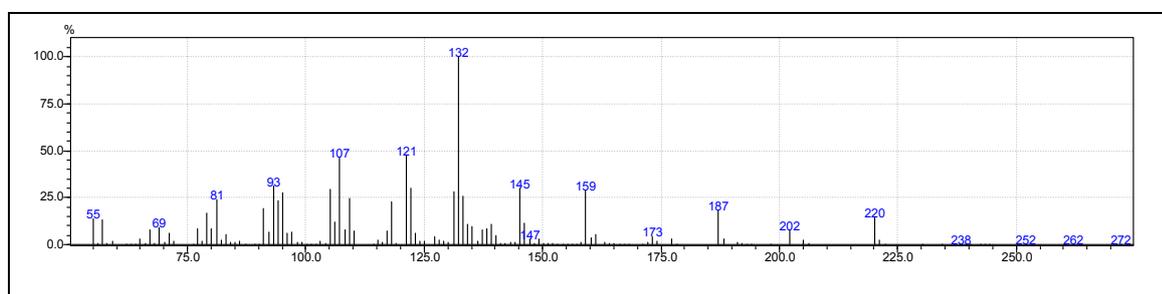


FIGURA 4.181- Espectro de massas obtido do pico 33 em t.r. 25,41 minutos.

Ao analisar o espectro de massas pode-se sugerir um perfil de fragmentação (FIGURA 4.182), sugerindo um sesquiterpeno, no entanto este não foi encontrado na literatura.

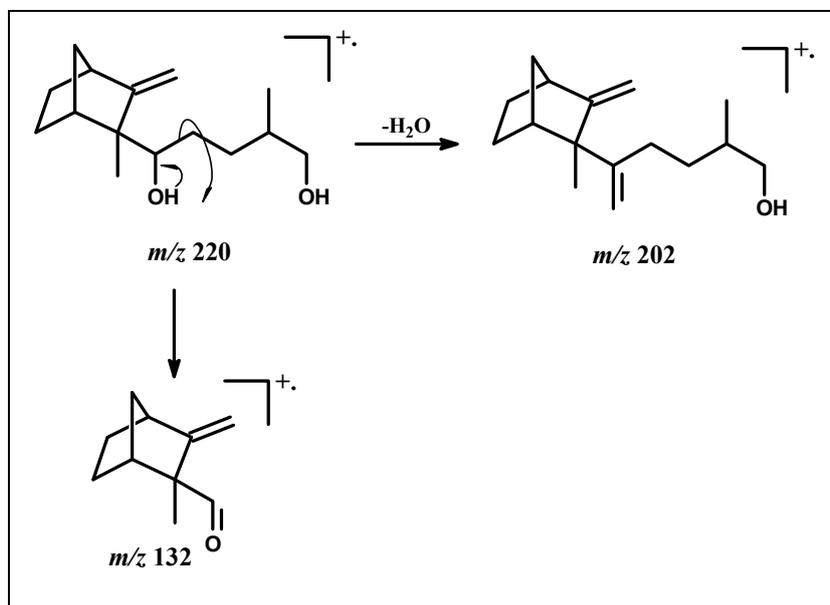


FIGURA 4.182- Proposta de fragmentação para o pico 33.

Com a fragmentação e com base do modelo indicado pela NIST pode-se concluir que o composto trata-se de um sesquiterpeno.

### Identificação do Pico 34

Com um tempo de retenção de 27,02 minutos o pico 34, apresenta um espectro de massas com um pico de íon base  $m/z$  218. Ao pesquisar compostos com perfil de fragmentação similar a esse identificado, não foi possível obter uma similaridade superior a 85%. A FIGURA 4.183 ilustra o espectro de massas para esse composto.

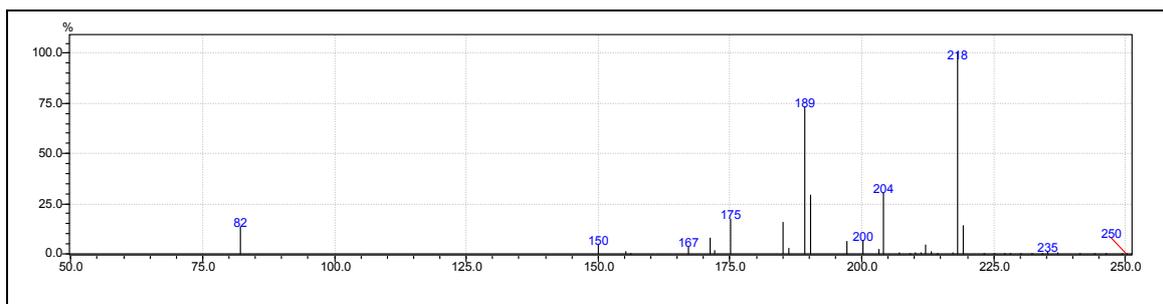


FIGURA 4.183- Espectro de massas obtido do pico 34 em t.r. 27,02 minutos.

Ao analisar o espectro de massas a partir dos fragmentos obtidos, e levando em consideração o modelo proposto pela biblioteca do equipamento, pode-se sugerir uma estrutura com o pico do íon molecular de  $m/z$  236 e o pico do íon base de 218 (FIGURA 4.183 e 4.184). Vale ressaltar que a estrutura referente à  $m/z$  218 é a estrutura que condiz com o modelo indicado pela biblioteca NIST, no entanto essa estrutura não foi encontrada em artigos relacionados ao tema.

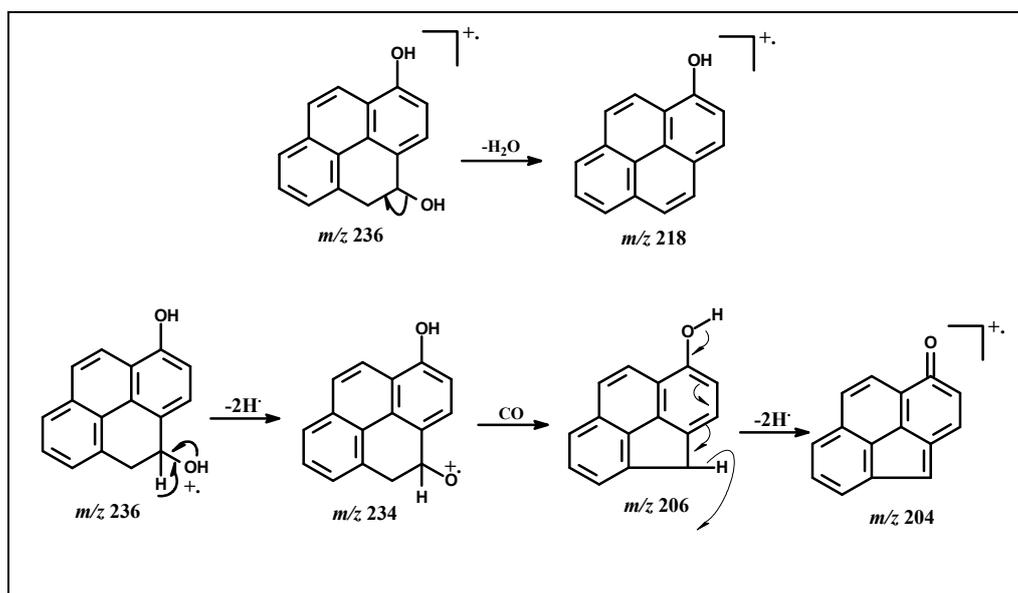


FIGURA 4.184- Proposta de fragmentação para o pico 34.

Tendo em vista uma proposta de biossintética, pode-se concluir que o composto sugerido pode ser natural, ou seja, biossintetizado pelo fungo. Essa proposta está descrita na FIGURA 4.185.

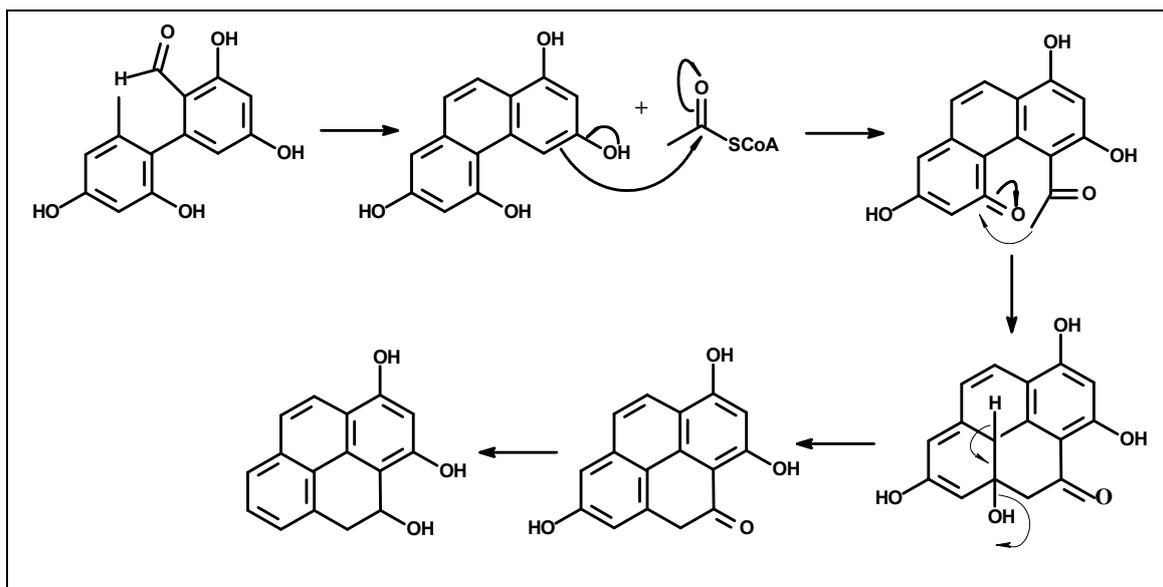


FIGURA 4.185- Proposta de biossíntese para o composto referente ao pico 34.

### Identificação do Pico 37

Com um tempo de retenção de 29,82 minutos o pico 37, apresenta um espectro de massas com um pico de íon base  $m/z$  205. Ao pesquisar compostos com perfil de fragmentação similar a esse identificado, não foi possível obter uma similaridade superior a 67%. A FIGURA 4.186 ilustra o espectro de massas para esse composto.

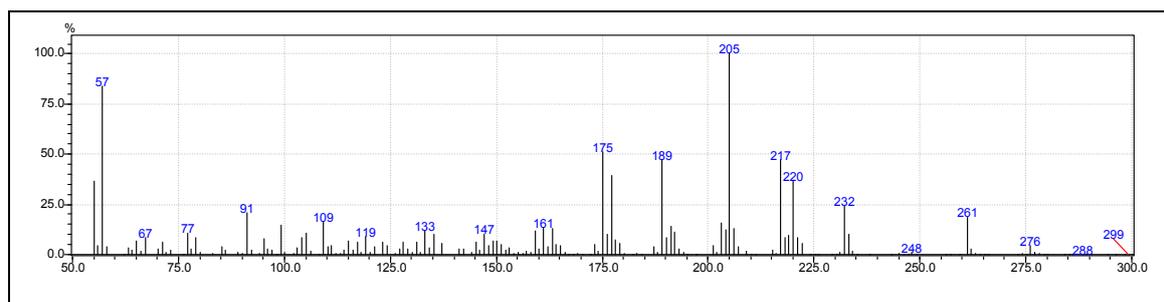


FIGURA 4.186- Espectro de massas obtido do pico 37 em t.r. 29,82 minutos.

Ao analisar o espectro de massas a partir dos fragmentos obtidos, e levando em consideração o modelo proposto pela biblioteca do equipamento, pode-se sugerir uma estrutura com o pico do íon molecular de  $m/z$  276 e o pico do íon base de 205 (FIGURA 4.186). Vale ressaltar que a estrutura proposta

(FIGURA 4.187) condiz com o modelo indicado pela biblioteca NIST do equipamento, no entanto na literatura não foi encontrada em artigos sobre a mesma.

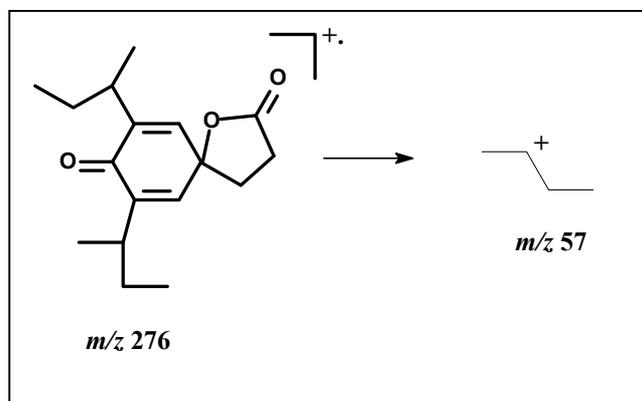


FIGURA 4.187- Proposta de fragmentação para o pico 37.

#### 4.5.2.4. Grupo 04- Compostos encontrados na literatura

Nesse grupo estão descritos todos os compostos que ao serem comparados pela biblioteca NIST apresentaram uma similaridade superior a 93%.

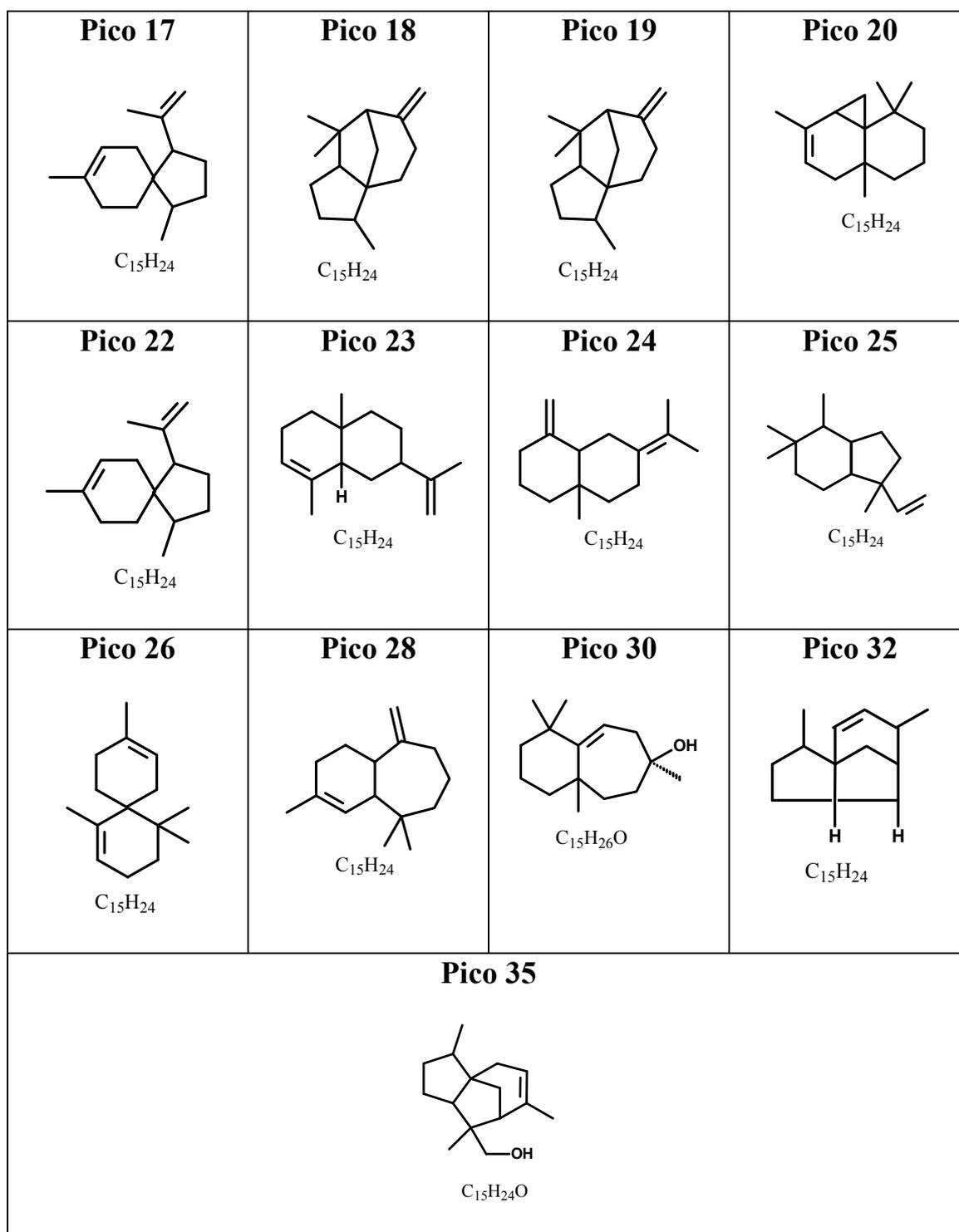


FIGURA 4.188- Compostos voláteis identificados de *A. alternata*.

As FIGURAS 4.189 á 4.201 contém os espectro de massas de cada um dessas substâncias ilustradas na FIGURA 4.188.

### Pico 17

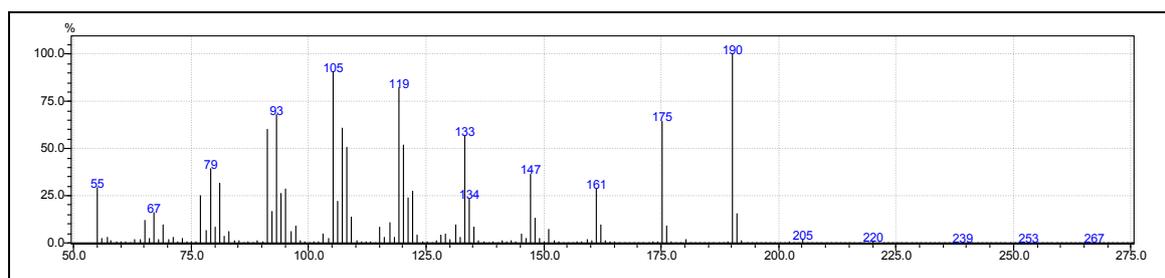


FIGURA 4.189- Espectro de massas obtido do pico 17 em t.r. 20,19 minutos.

### Pico 18

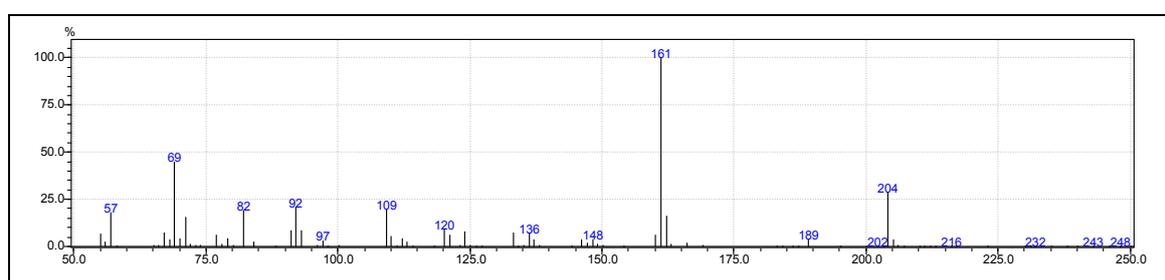


FIGURA 4.190- Espectro de massas obtido do pico 18 em t.r. 20,35 minutos.

### Pico 19

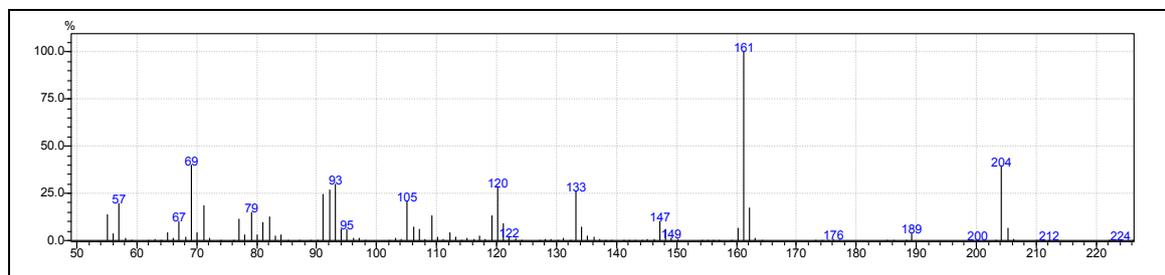


FIGURA 4.191- Espectro de massas obtido do pico 19 em t.r. 20,50 minutos.

### Pico 20

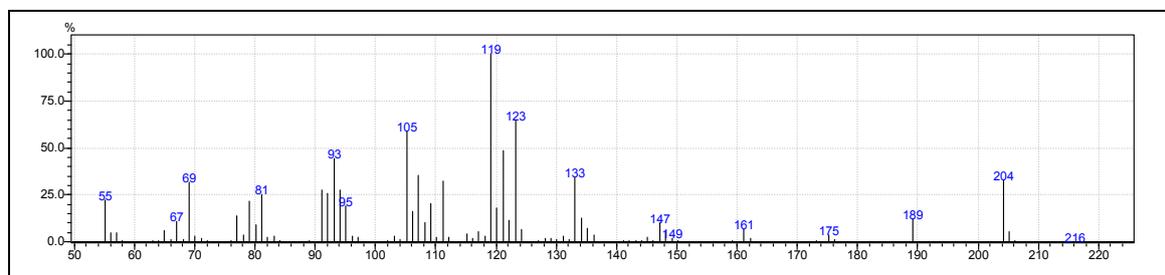


FIGURA 4.192- Espectro de massas obtido do pico 20 em t.r. 20,73 minutos.

### Pico 22

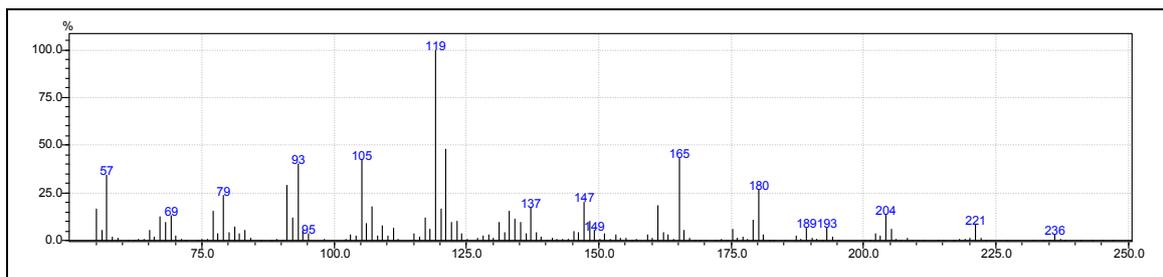


FIGURA 4.193- Espectro de massas obtido do pico 22 em t.r. 21,44 minutos.

### Pico 23

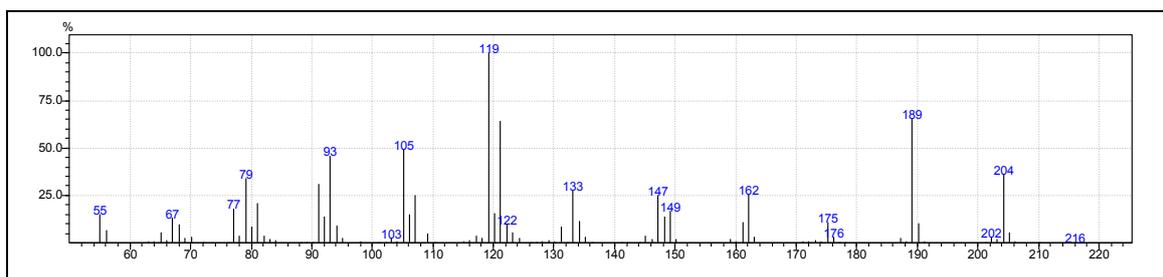


FIGURA 4.194- Espectro de massas obtido do pico 23 em t.r. 21,60 minutos.

### Pico 24

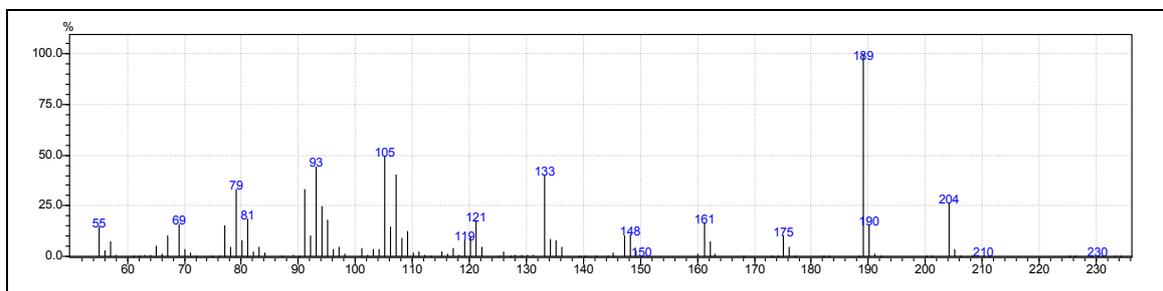


FIGURA 4.195- Espectro de massas obtido do pico 24 em t.r. 21,72 minutos.

### Pico 25

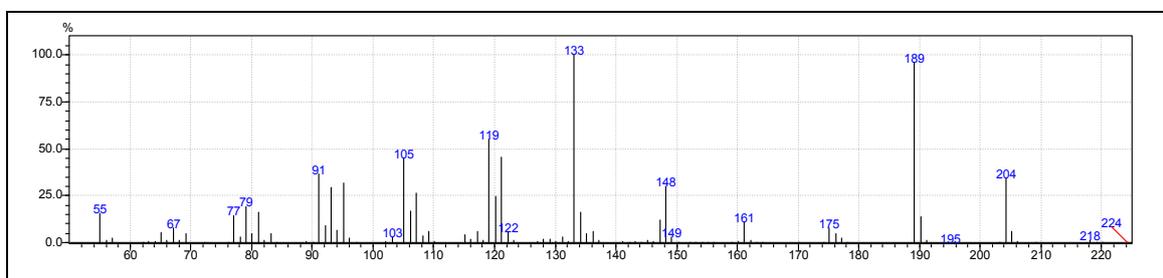


FIGURA 4.196- Espectro de massas obtido do pico 25 em t.r. 29,82 minutos.

### Pico 26

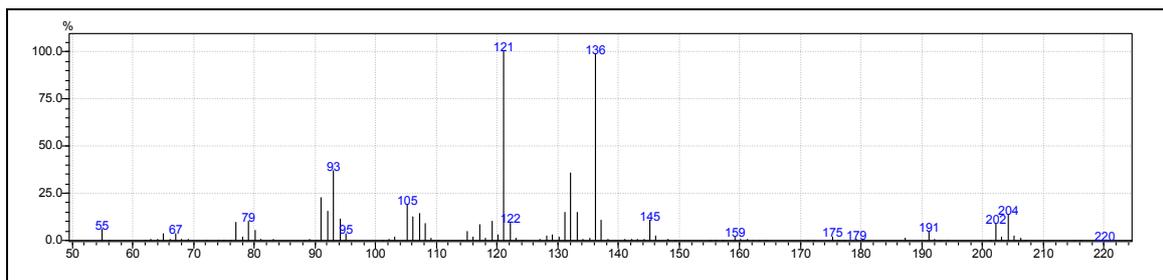


FIGURA 4.197- Espectro de massas obtido do pico 26 em t.r. 29,82 minutos.

### Pico 28

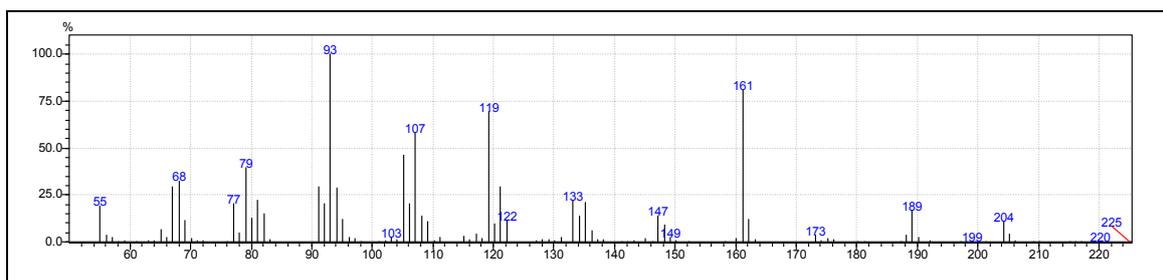


FIGURA 4.198- Espectro de massas obtido do pico 28 em t.r. 22,84 minutos.

### Pico 30

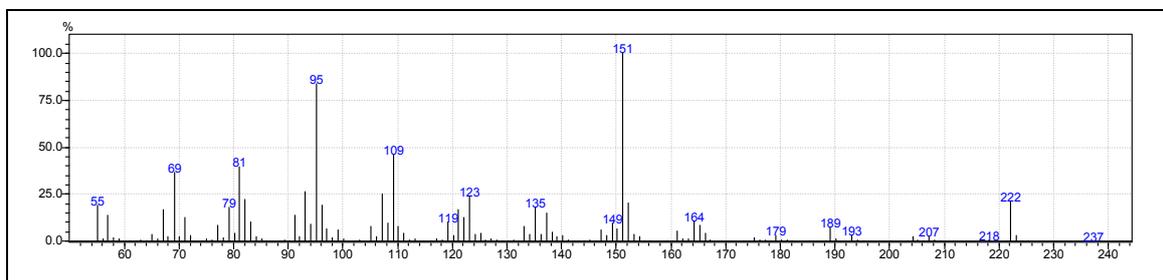


FIGURA 4.199- Espectro de massas obtido do pico 30 em t.r. 24,26 minutos.

### Pico 32

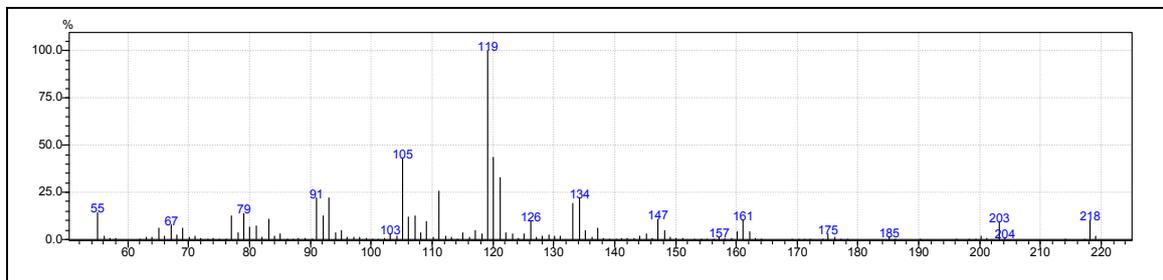


FIGURA 4.200- Espectro de massas obtido do pico 32 em t.r. 25,09 minutos.

## Pico 35

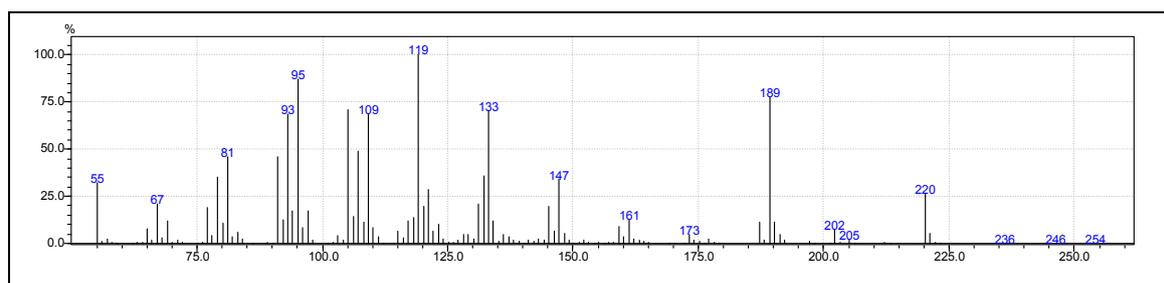


FIGURA 4.201- Espectro de massas obtido do pico 35 em t.r. 26,39 minutos.

Alguns desses compostos identificados apresentam alguns estudos na literatura, como por exemplo, o composto referente ao pico 17 já foi identificado *Hoslundia opposita Vahl.* na cidade de Zimbabwe na África (CHAGONDA *et al.*, 2005). O composto volátil correspondente ao pico 18, já foi identificado em *Aristolochia mollissima* (YU, *et al.*, 2007). O pico 23, o composto naftaleno, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metil-etil)-, [2R (2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,8 $\beta$ )]-, foi identificado em *Inula viscosa* e também em *Inula graveolens* (MARONGIU, *et al.*, 2003). O composto referente ao pico 24, já foi identificado em doze cultivares de manjeriço na Colômbia (basil -*Ocimum spp*) (VIÑA, *et al.*, 2003). O pico 30, o composto identificado como 1H-Benzociclohepten-7-ol, 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-1,1,4a,7-tetrametil-, cis-, já foi encontrado em *Microbiota decussate*, um arbusto endêmico das montanhas da Sibéria (KRAUZE-BARANOWSKA, *et al.*, 2002).

### 4.6. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

#### 4.6.1. MEV de tecido vegetal – Folha Tangor ‘Murcot’

Após 16 horas de o micro-organismo ter sido aspergido sobre as plantas, pode-se observar que nas folhas mais jovens estava ocorrendo à formação de

pequenas manchas de coloração marrom próximo a nervura da folha (FIGURA 4.202-A). Após 48 os sintomas tornam-se mais evidentes observando que as lesões se estenderam da nervura para toda a parte da folha (FIGURA 4.202-B). Esse fato esta de acordo com a suscetibilidade de espécies de citros para *A. alternata*. A suscetibilidade tem sido estudada por vários pesquisadores, pois a mancha marrom de alternaria afeta principalmente as tangerinas, sobretudo a variedade ‘Dancy’ (*C. reticulada* Blanco), seus híbridos (tangelos ‘Minneola’ e ‘Orlando’ e as tangerinas ‘Sunburst’, ‘Fortuna’, ‘Lee’ e ‘Osceola’), alguns tangores, como ‘Murcott’ (REIS *et al.*, 2007; BASTIAENL *et al.*, 2009).

No entanto, a variedade de tangerinas ‘Clementina’ e seus híbridos, bem como a tangerina ‘Cleópatra’, limas, limões, laranja-azedo e laranja-doces são resistentes à doença em condições normais de cultivo (BASTIAENL, *et al.*, 2009, AZEVEDO, *et al.*, 2010).



FIGURA 4.202 - Imagem das lesões provocadas por *A. alternata* em tangor ‘Murcot’ visualizadas em esteremicroscópio (Lupa, Leica). (a) Lesão em 16 horas após a inoculação do fungo (b) Lesão em 48 horas após a inoculação do fungo.

Uma vez observado a manifestação da doença nas folhas de tangor ‘Murcott’, o outro passo foi a observação da folha posicionada sobre o porta

amostra o qual foi conduzido para a análise através da microscopia eletrônica de varredura sob pressão ambiental (MEV – modo ESEM). Foram observados os tecidos de folhas com a evolução da doença até 48 horas.

Na folha utilizada como controle (FIGURA 4.203), ou seja, aquela onde não foi aspergida a suspensão de esporos observa-se que a nervura permanece inalterada tanto na face inferior como na face superior, isso também pode ser observado analisando um corte vertical na folha. Nota-se que todas as estruturas internas, ou seja, a epiderme superior e inferior, o parênquima paliçádico e o lacunoso, os feixes lacunosos (xilema e floema) e até mesmo os estômatos permaneceram intactos.

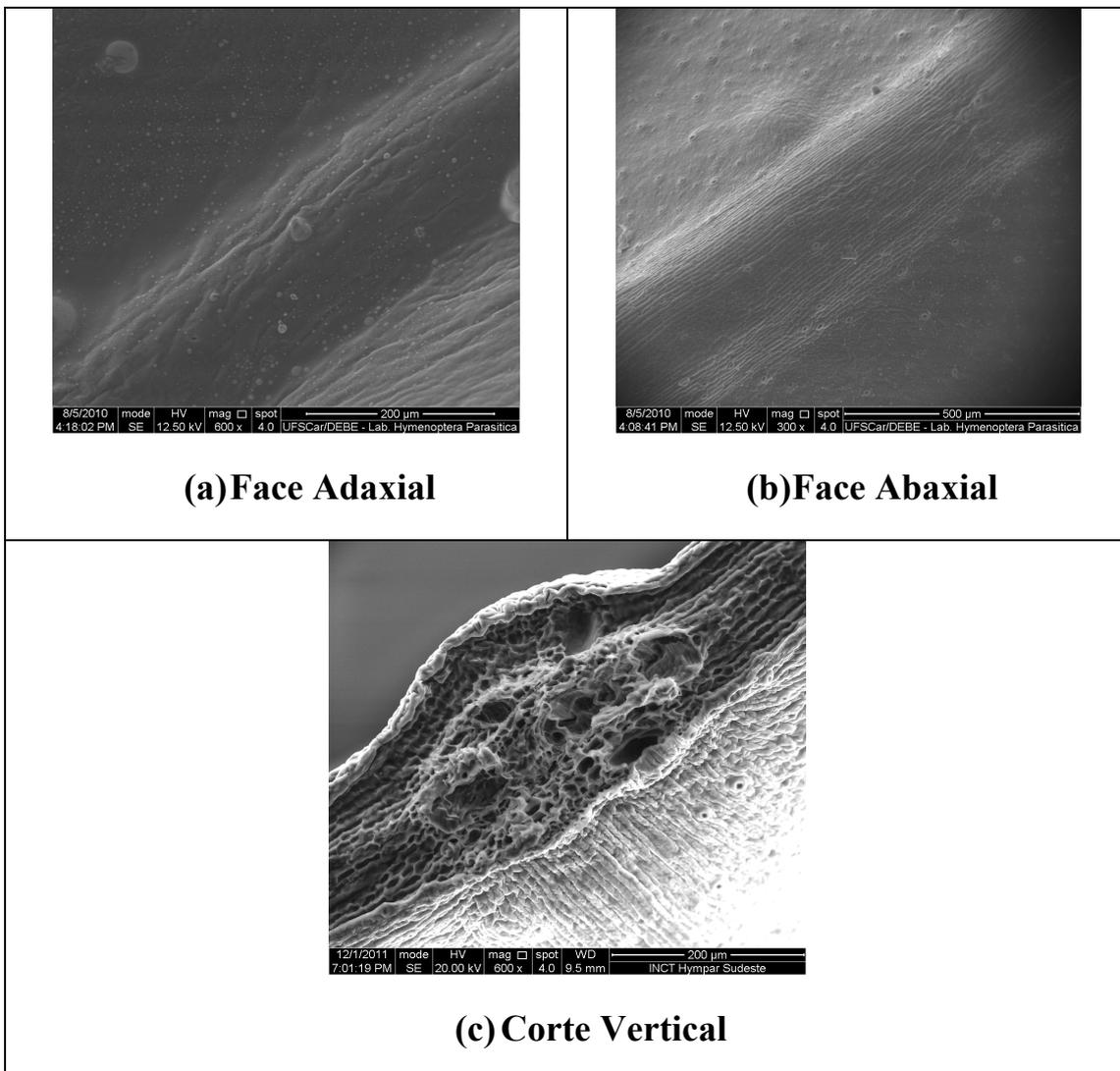


FIGURA 4.203- Imagens obtidas por MEV da folha controle de Tangor ‘Murcott’.

No entanto, após 16 horas de inoculação do fungo exatamente numa pequena área de transição entre a lesão e o tecido sadio, pode-se observar uma pequena colonização de conídios na face superior da folha (FIGURA 4.204-A), no entanto sem a formação de apressórios (FIGURA 4.204-C). Observa-se também que nesse período de evolução da doença há a formação do tubo germinativo e em alguns casos o seu prolongamento como pode ser observado na FIGURA 4.204-B.

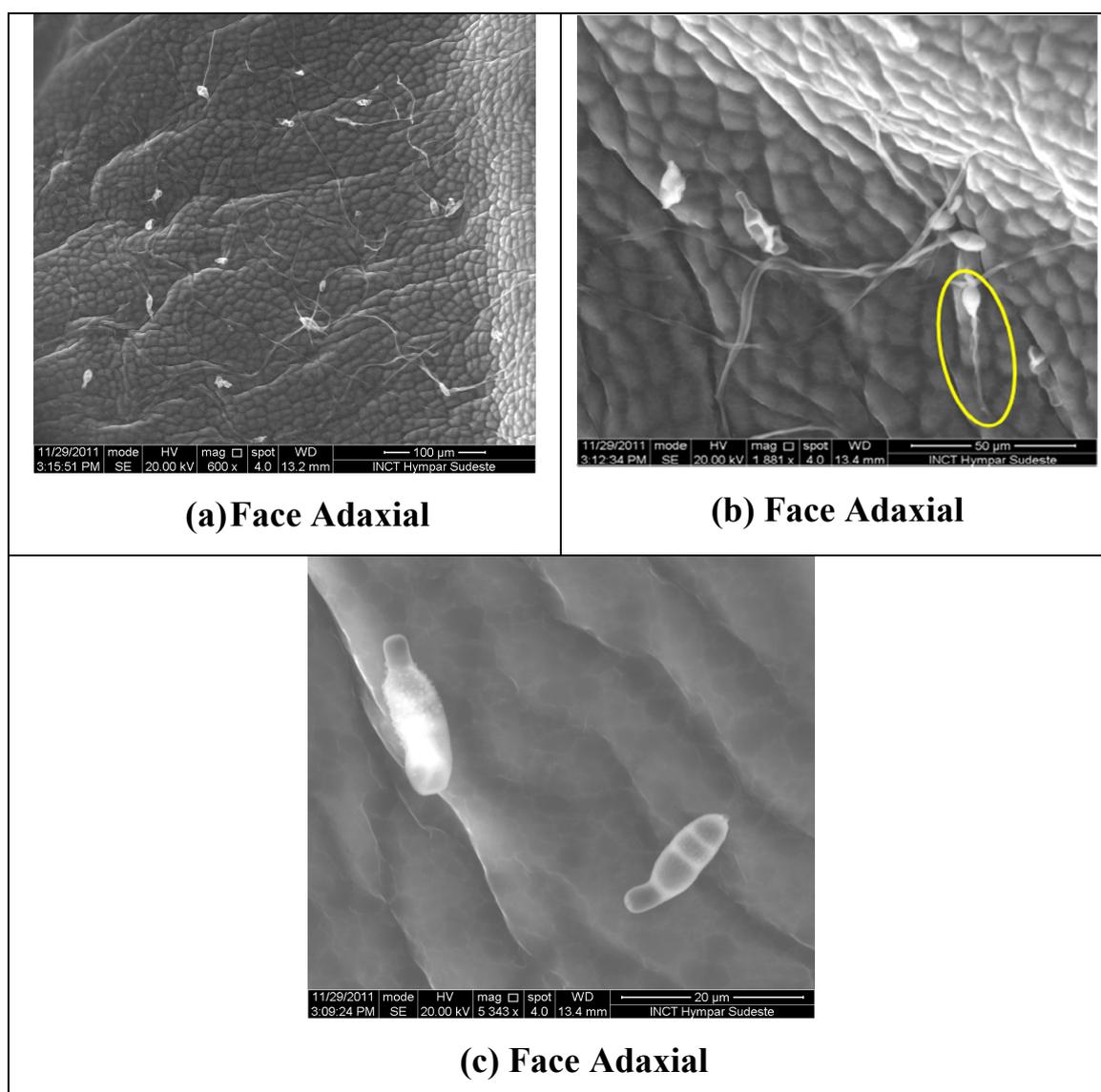


FIGURA 4.204 - Eletrofotomicrografias de varredura obtidas da folha com 16 horas sintomáticas de Tangor ‘Murcott’: A) Superfície foliar com a presença de

alguns conídios; B) Aumento de 1800 vezes em um conídio; C) Aumento de 5343 vezes em conídios.

Após 24 horas de inoculação de *A. alternata* verificou-se uma maior formação de hifas e um aumento do número de conídios, ocasionando assim um aumento na infecção. Nesse estágio da doença observa-se que as hifas estão envolvidas por um tipo de substância com aspecto de gel. Constata-se também nessa imagem a formação de apressórios, os quais estão indicados na FIGURA 4.205-A.

Na FIGURA 4.205-B observa-se a penetração de uma estrutura denominada apressório, a qual é utilizada em fixação, pela abertura estômatal, localizada na face inferior da folha. Segundo AKIMITSU *et al.* (2003) foi verificado a penetração pelo estômato sem a formação de apressório enquanto SOLEL e KIMCHI, 1997, observaram a penetração apenas através da formação de apressório. Isso difere do que foi possível observar na FIGURA 4.205-B.

Na FIGURA 4.205-C tem-se um corte vertical da folha. Uma amostra desse tecido próxima à nervura foi observada no MEV. Devido ao fato do fungo ter sido aplicado na parte superior da folha e a sua penetração ter ocorrido pelo estômato que se situa na parte inferior, observa-se que após 24 horas de infecção, a folha começa a apresentar um pequeno desarranjo em relação as suas estruturas internas, sendo que uma das estruturas mais afetadas são os parênquimas, sugerindo assim a transição do micro-organismo pela folha.

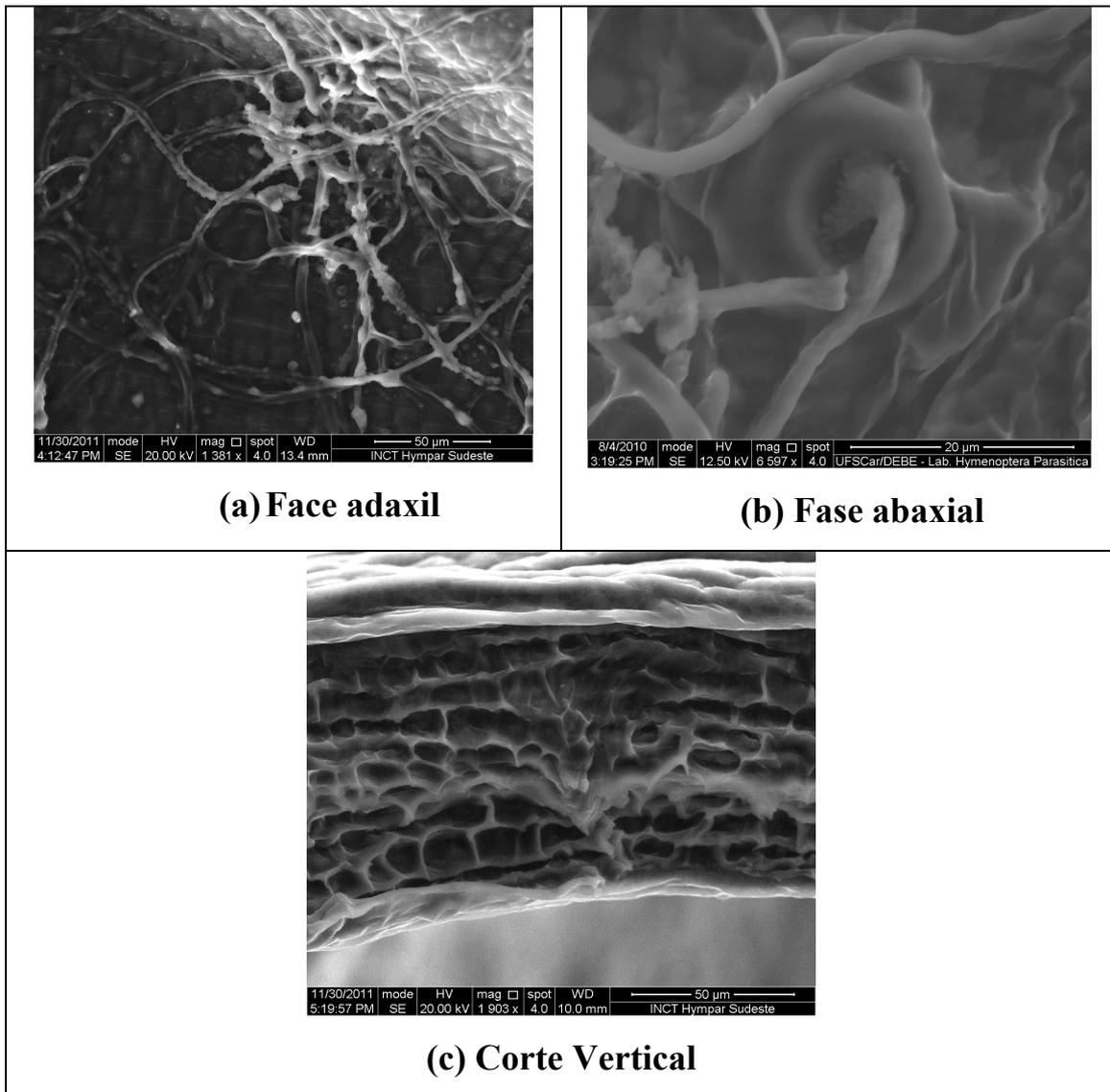


FIGURA 4.205 - Eletrofotomicrografias de varredura obtidas da folha de Tangor ‘Murcott’ com 24 horas após apresentarem lesões: A) Evolução da doença e formação de apressórios; B) Penetração do micro-organismo pelo estômato da folha; C) Corte vertical na folha de tangor ‘Murcot’.

Com 48 horas de infecção, na parte superior da folha, observa-se a um grande aumento na colonização (FIGURA 4.206-A) sendo que ao aumentar a imagem depara-se um grande número de conídios, os quais apresentam-se interligados, ou seja, na forma de cadeia, alguns ovóides outros obclavados com os septos transversais evidenciados, como pode-se observar na FIGURA 4.26-B.

As FIGURAS 4.206-C e 4.206-D, as quais representam a face inferior da folha, mostra-se totalmente congestionada, com uma ampla colonização por conídios impedindo a visualização de tecido sadio da epiderme. Observa-se que na FIGURA 4.206-D os estômatos sugerem estar preenchidos por apressórios, estruturas de fixação do micro-organismo.

De pose da FIGURA 4.206-E, conclui-se que toda a estrutura interna da folha foi alterada devido à colonização do fungo, ocasionando assim rompimentos nas células dos parênquimas.

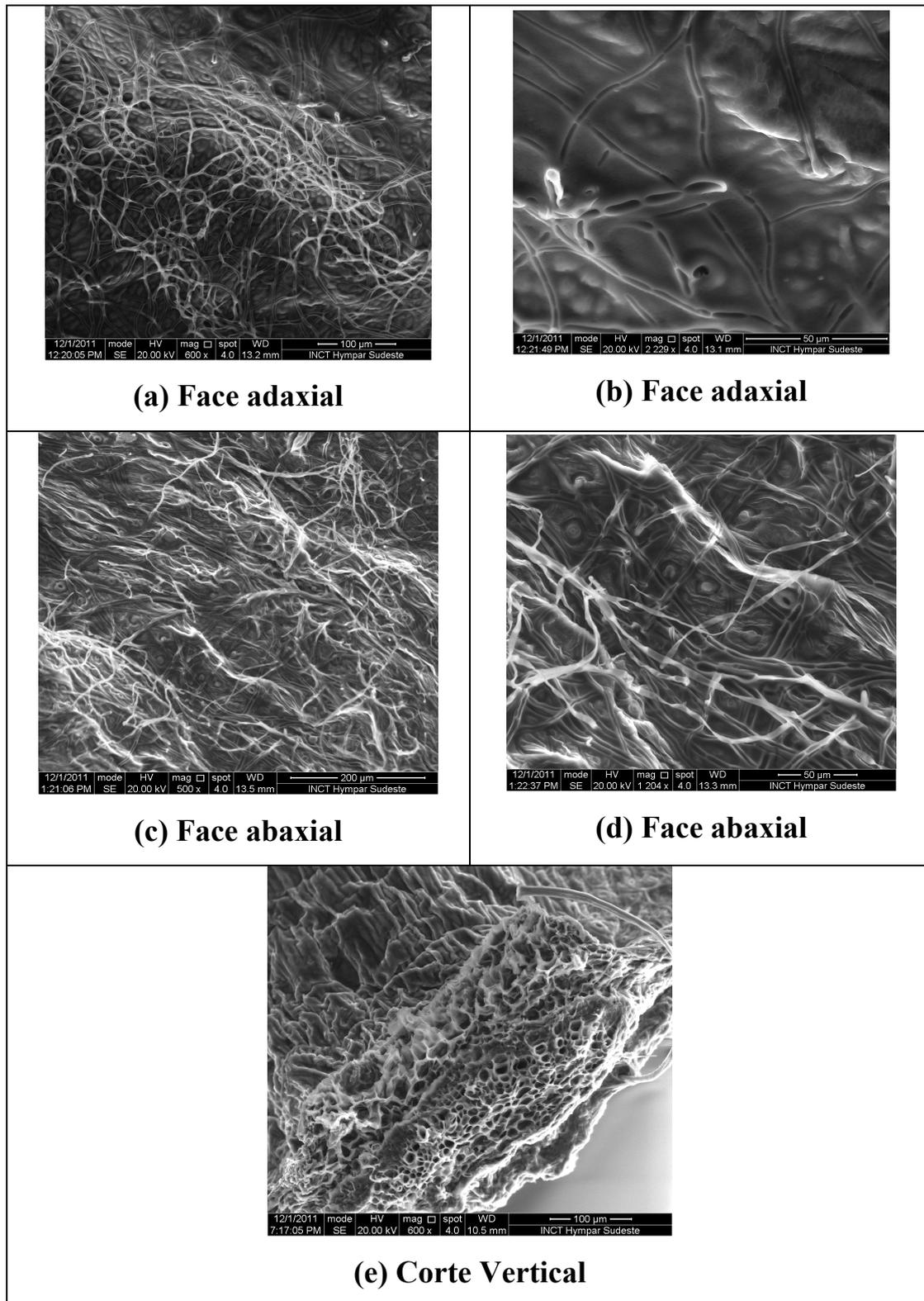


FIGURA 4.206 - Eletrofotomicrografias de varredura obtidas da folha de Tangor ‘Murcott’ com 48 horas após a inoculação de *A. alternata*: A) Aumento de conídios na folha; B) Conídios interligados; C) Face inferior da folha; D) Suposta presença de apressórios nas cavidades dos estômatos; E) Corte vertical na folha de tangor ‘Murcot’.

Como já foi mencionado, em relação à penetração do micro-organismo na superfície da folha existem relatos na literatura defendendo duas vertentes. Alguns pesquisadores relatam que o fungo pode penetrar diretamente na epiderme ou através dos estômatos, porém sempre associado com a formação de apressório para facilitar a penetração (SOLEL *et. al*, 1998). RENAUD (2005) relata que a penetração do patógeno no hospedeiro ocorre, em sua grande maioria, através da superfície da folha, após a formação de apressórios. Outros estudos indicam que a penetração ocorre através dos estômatos sem a formação de apressório (BHATIA *et. al*, 2002). A não ocorrência da formação do apressório também foi verificada por PEGG (1966) e sempre a penetração do fungo foi através das áreas necróticas.

#### 4.6.2. MEV do Patógeno *Alternaria alternata*

A fim de compreender melhor os conídios formados pelo fungo foram feitas imagens através de uma lupa e do microscópio eletrônico de varredura.

A FIGURA 4.207 exibe uma foto obtida com a Lupa com uma escala de 5 mm e de 10 mm. Essa foto foi obtida colocando a placa de Petri sob a LUPA com o fungo com 20 dias de crescimento, onde foi possível observar uma grande massa micelial.

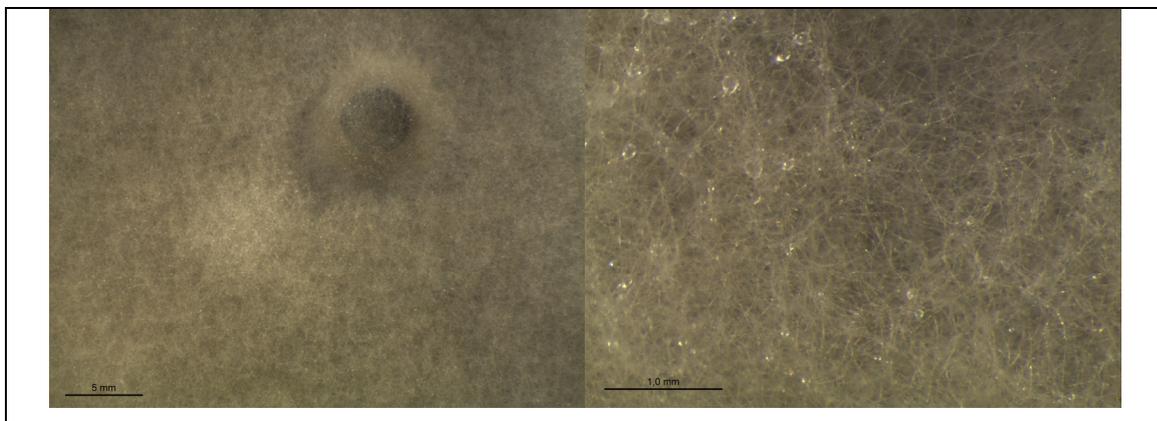


FIGURA 4.207- Foto obtida na LUPA de um cultivo de *A. alternata*.

Para as imagens no microscópio um fragmento com 0,3 cm de diâmetro foi depositado sobre o porta amostra.

Em um primeiro momento foi observado com um aumento de 300 vezes uma grande quantidade de hifas dificultando a observação de conídios, como mostrado na FIGURA 4.208-A. No entanto com um aumento de aproximadamente 3000 vezes a imagem da FIGURA 4.208-B exhibe os conídios interligados em forma de cadeia, como já havia sido observado em análise do tecido vegetal demonstrado na FIGURA 4.206-B. Os conídios de *A. alternata* são grandes e apresentam septos transversais e são frequentemente oblíquos ou longitudinais, sendo que em relação às fotos demonstradas nas FIGURAS 4.208-B e 4.208-C os septos se apresentam na forma longitudinal. Os conídios podem apresentar-se sem cauda, quando elipsóides, ou com cauda cilíndrica, sendo que as duas formas podem ser observadas nas imagens das FIGURAS 4.208-B e 4.208-C.

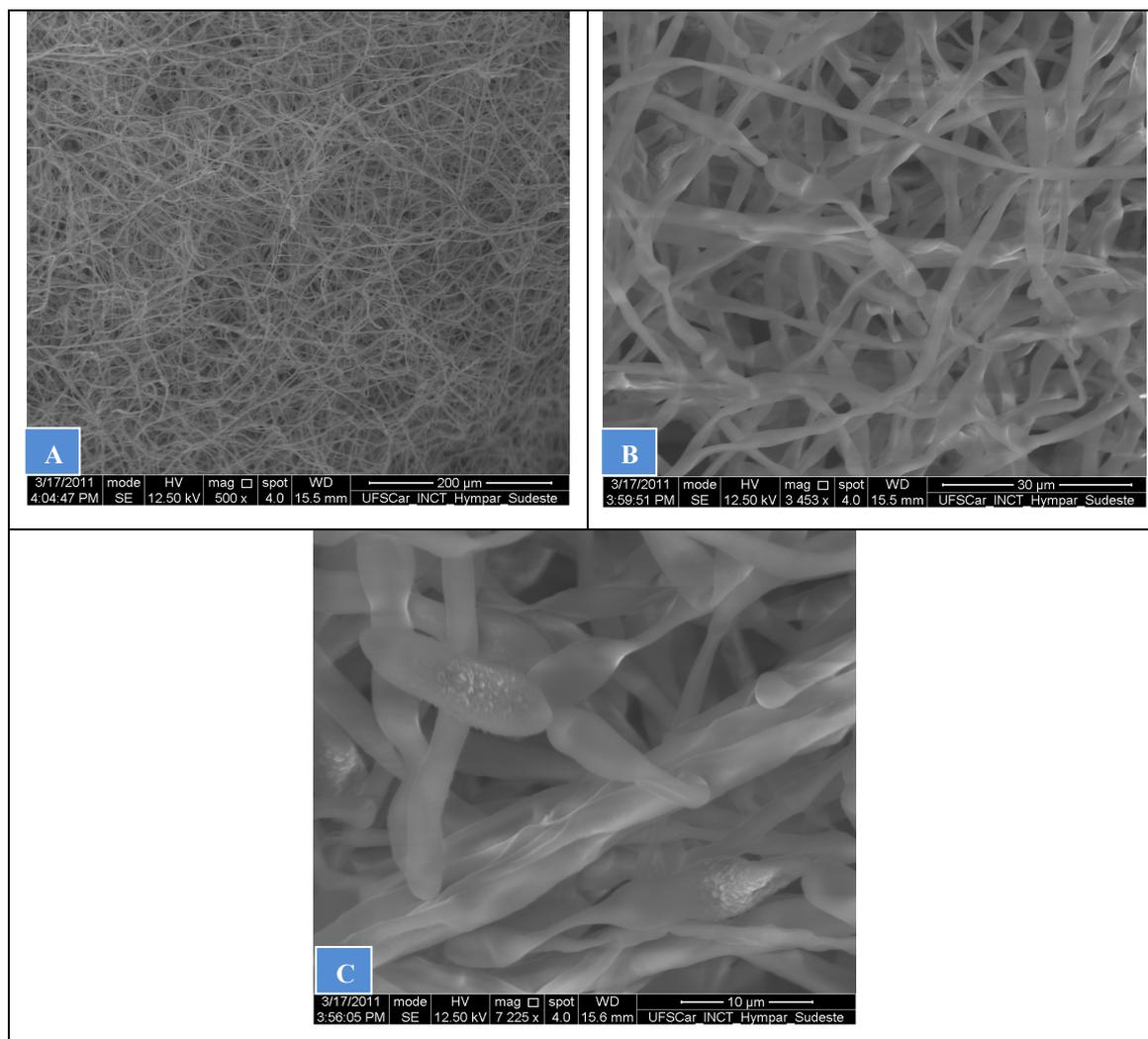


FIGURA 4.208- Imagens obtidas no Microscópio eletrônico de varredura de *A. alternata*, crecido em placa de Petri em meio BDA.

Já é de conhecimento na literatura que os conídios de *Alternaria* são catenulados, ou seja, formados em cadeias, ou solitários, tipicamente ovóides ou oblavados, que freqüentemente são rostrados, de coloração marrom claro a escuro e muticelulados, com septos transversais e freqüentemente oblíquos ou longitudinais (ELLIS *et al.*, 1970). As espécies também podem ser segregadas dentro de vários grupos, de acordo com a catenulação (número de esporos na cadeia). No entanto, a catenulação é bastante variável e algumas espécies podem divergir dentro do padrão da espécie, como por exemplo, *A. alternata* de citros,

pode produzir esporos solitários ou em cadeia, revelando grande polimorfismo da espécie (SOLEL, 1991).

Essas informações estão de acordo com as imagens obtidas por MEV, comprovando o gênero *Alternaria*.

#### **4.7. Ensaio Biológico Frente a *Alternaria alternata***

##### **4.7.1. Efeito das substâncias naturais frente ao crescimento micelial de *A. alternata***

Substâncias naturais isoladas pelo grupo de Produtos Naturais foram gentilmente cedidas e avaliadas frente ao crescimento micelial de *A. alternata*. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada dois dias, tendo como referência o centro de cada placa de Petri onde foi inoculado o disco de micélio com  $\phi$  5 cm. As medidas para as avaliações foram feitas sob a placa na vertical e na horizontal em centímetros, a partir do disco de micélio inoculado, realizando assim a média de crescimento micelial para cada placa analisada. O crescimento micelial foi avaliado em comparação ao controle, onde continha apenas o agente solubilizante DMSO. As substâncias testadas que apresentassem apenas um pequeno crescimento foram consideradas como um composto fungistático e as que apresentassem inibição total foram considerados como um composto fungitóxico.

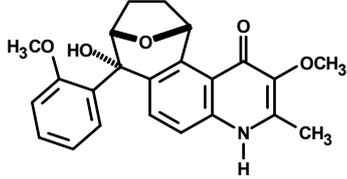
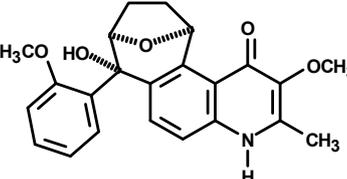
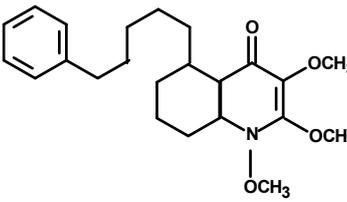
Essa metodologia de avaliação foi utilizada em todos os ensaios de crescimento micelial frente ao micro-organismo.

#### 4.7.1.1. Ensaio 01: substâncias isoladas de *Waltheria brachypetala*

*Waltheria brachypetala* Turks, popularmente conhecida como malva branca, é um arbusto de fácil adaptação ao clima semi-árido. Esta espécie pertence à família Sterculiaceae muito comum nos trópicos do globo, principalmente África e Ásia. A família Sterculiaceae é representada no Brasil por 11 gêneros e 65 espécies, dentre estas, os gêneros *Melochia* e *Waltheria* pertencentes à tribo Hermannieae. Essa planta tem despertado interesse devido ao seu uso na medicina tradicional, bem como pela presença de alcalóides em todos os estudos fitoquímicos realizados com as espécies desta tribo.

Nesse ensaio foram avaliados frente ao crescimento micelial os alcalóides isolados de *Waltheria brachypetala* cedidos pelo doutorando do departamento de Química da UFSCar, Murilo Marinho de Castro Lima. Os alcalóides ensaiados estão descritos na TABELA 4.18.

TABELA 4.18 – Susbtâncias isoladas de raiz de *Waltheria brachypetala*

	Waltheriona A Isolamento: Raiz
	Waltheriona B Isolamento: Raiz
	Brachytelona Isolamento: Raiz

Nesse ensaio, as avaliações para o crescimento micelial foram realizadas a cada dois dias, totalizando 10 dias de experimento, onde se baseou no centro de aplicação do inóculo como referencial para as medidas. No total para cada substância foram feitas cinco repetições.

Analisando o gráfico representado na FIGURA 4.209, todos os compostos ensaiados apresentaram uma inibição frente ao crescimento micelial. Entretanto a substância que merece destaque nesse ensaio é a brachytelona que apresentou mais de 50% de inibição, seguido dos alcalóides waltheriona A e waltheriona B.

Na literatura não existe publicações envolvendo ensaios biológicos de atividade antifúngica para a substância brachytelona. Contudo o alcalóide waltheriona A exibiu atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae* (EMILE, et al., 2007)

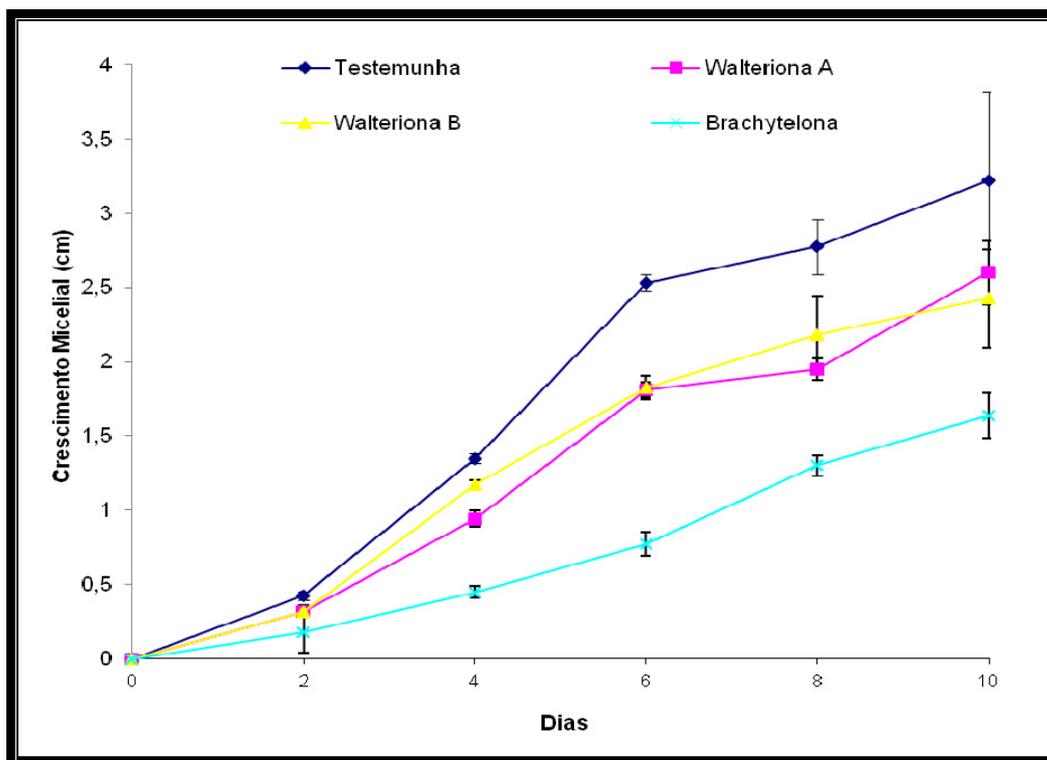
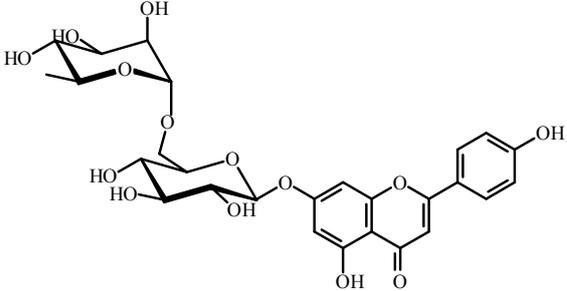
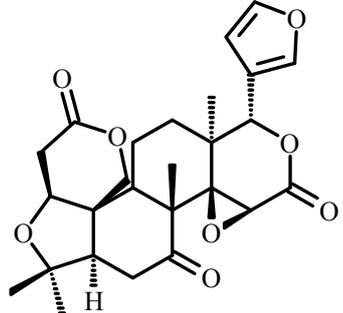
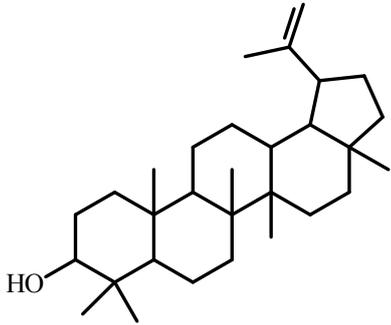
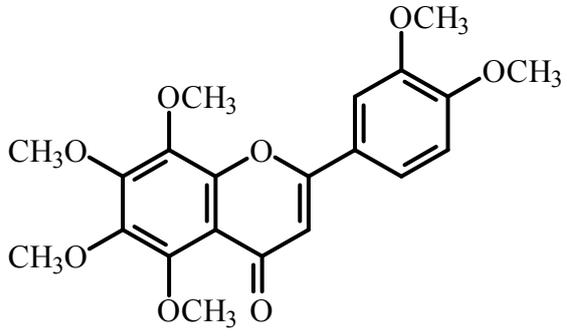


FIGURA 4.209- Efeito dos compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial de *Alternaria alternata*.

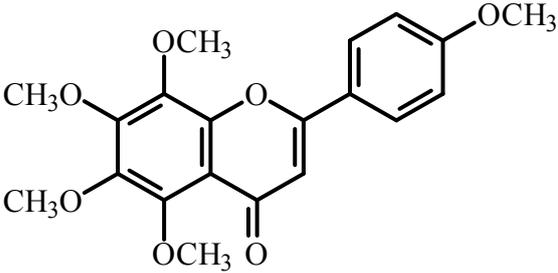
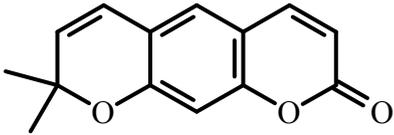
#### 4.7.1.2. Ensaio 2: Substâncias isoladas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco (tangor ‘Murcott’)

A mancha marrom de *Alternaria* (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri* patótipo tangerina, afeta frutos, folhas e ramos de tangerinas, tangores e tangelos e provoca queda de folhas, seca de ramos e queda prematura de frutos, comprometendo a produtividade das plantas. As lesões da doença em frutos reduzem também o seu valor quando comercializados *in natura* (SASSERON, 2008). Testes de patogenicidade mostraram a susceptibilidade das tangerinas frente ao patógeno *Alternaria alternata*. Perante essa informação vem sendo desenvolvido no laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela doutoranda Marsele Machado Isidoro, o estudo químico para isolar e identificar metabólitos existentes no tangor ‘Murcott’. Nesse trabalho foram isolados alguns metabólitos de diferentes partes da planta e ensaiados frente ao fitopatógeno, os quais estão descritos na TABELA 4.19.

TABELA 4.19 - Substâncias ensaiadas frente ao *A. alternata* isoladas de diferentes partes de tangor ‘Murcott’

	<p><b>Apigenina 7-rutinosídeo</b>  <b>Isoladas das folhas</b>  <b>flavonóide</b></p>
	<p><b>Limonina</b>  <b>Isoladas das folhas e raiz</b>  <b>limonóide</b></p>
	<p><b>Lupeol</b>  <b>Isolada das folhas</b>  <b>triterpeno</b></p>
	<p><b>Nobiletina</b>  <b>Isolada das folhas</b>  <b>flavonóide</b></p>

Continuação da TABELA 4.19

	<p><b>Tangeretina</b>  <b>Isolada das folhas</b>  <b>flavonóide</b></p>
	<p><b>Xantiletina</b>  <b>Isolada da raiz</b>  <b>cumarina</b></p>

Nesse ensaio, as avaliações para o crescimento micelial foram realizadas a cada dois dias, totalizando 10 dias de experimento, onde se baseou no centro de aplicação do inóculo como referencial para as medidas.

Através do gráfico crescimento micelial (cm) x Dias ilustrado na FIGURA 4.210, que representa a média do crescimento micelial calculada para cada amostra, obtida a partir da média das cinco repetições, em relação à testemunha, todos os compostos ensaiados, com exceção do limonóide limonia apresentaram inibição frente ao crescimento micelial de *A. alternata*. O triterpeno lupeol e o flavonóide nobiletina obtiveram uma inibição quase que insignificante quando comparados com a testemunha.

Observando os demais compostos, é possível observar que um deles merece atenção, a cumarina xantiletina. Esse composto de acordo com o gráfico da FIGURA 4.210 inibiu aproximadamente 50% o crescimento micelial do micro-organismo quando comparado com a testemunha, sendo que isso pode começar a ser observado a partir do segundo dia de experimento.

A cumarina xantiletina é uma substância majoritária na raiz de tangor ‘Murcot’, e vale salientar que o estudo da atividade antifúngica dessa substância já é de conhecimento no grupo de Produtos Naturais da UFSCar (DE MELO *et*

*al.*, 2009; RIBEIRO, 2006) e uma busca na literatura comprova sua ação anti-cancerígena (ANAYA *et al.*, 2005; GUNATILAKA, *et al.*, 1994), contra pragas agrícolas (LUTHRIA, *et al.*, 1989) e sua ação anti-fúngica (SARDARI *et al.* 2000; e KHAN *et al.* 1985). Visto que ainda não há relatos na literatura de ensaios *in vitro* desta cumarina frente a *Alternaria alternata* esse resultado é de extrema relevância. Os flavonóides apigenina 7-rutinosídeo e tangeritina, os quais inibiram aproximadamente 30% em relação à testemunha, mostraram fraca atividade frente ao fungo. Vale ressaltar que esse ensaio avalia apenas o crescimento micelial, e não está envolvido diretamente com o processo de infecção nas plantas, porém está relacionado ao processo de colonização. Desta forma, é de extrema relevância a avaliação das amostras também frente à germinação de esporos e formação de apressórios de *A. alternata*, o qual será descrito no item 4.7.2.

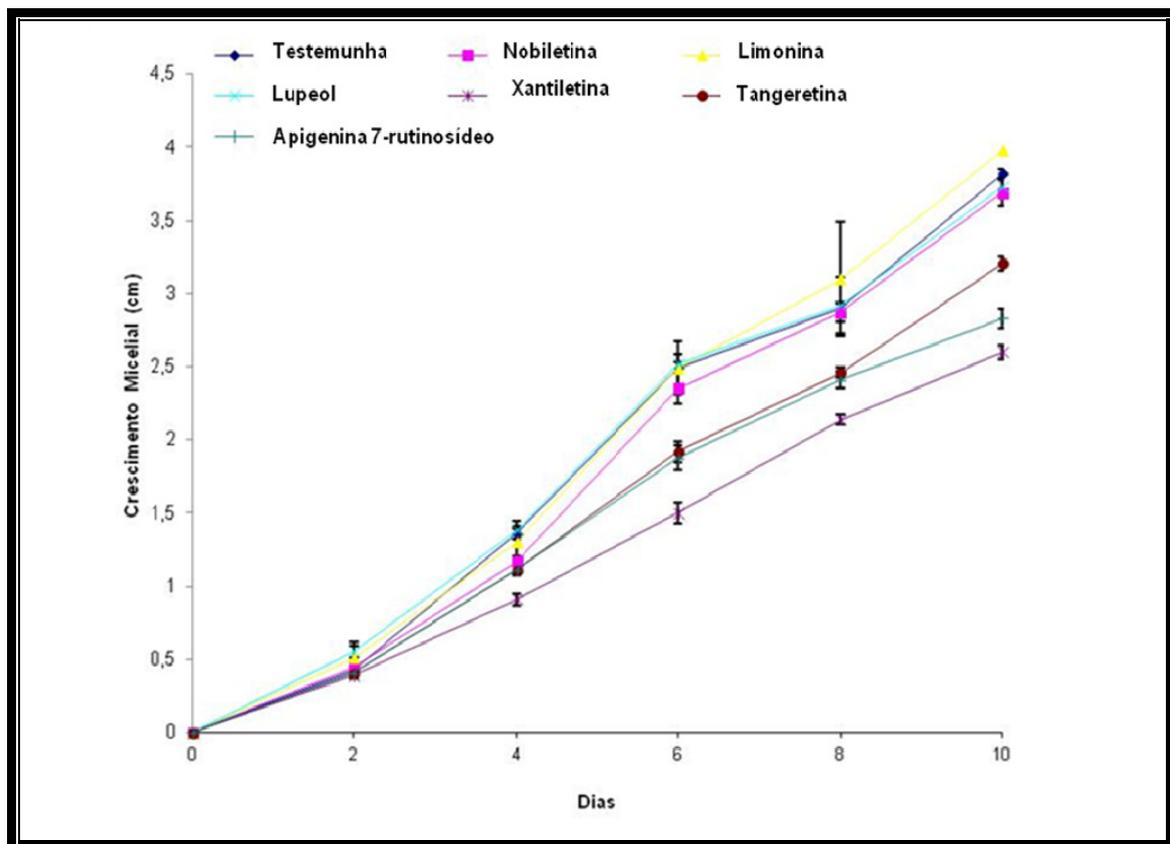
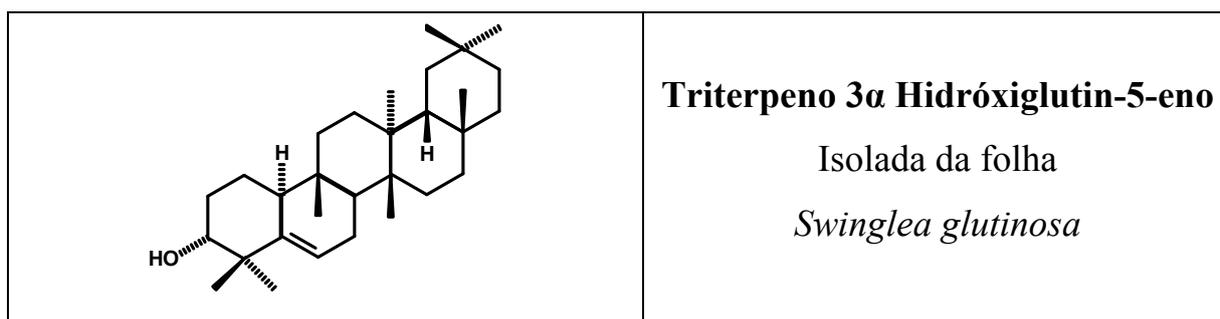


FIGURA 4.210- Efeito dos compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial de *Alternaria alternata*.



Continuação da Tabela 4.20



Observando o gráfico ilustrado na FIGURA 4.211 observa-se que a substância que apresentou uma maior inibição no crescimento micelial, aproximadamente de 70%, foi a curcumina.

Já a substância da classe dos compostos fenólicos, o galato de metila estimulou o crescimento do micro-organismo.

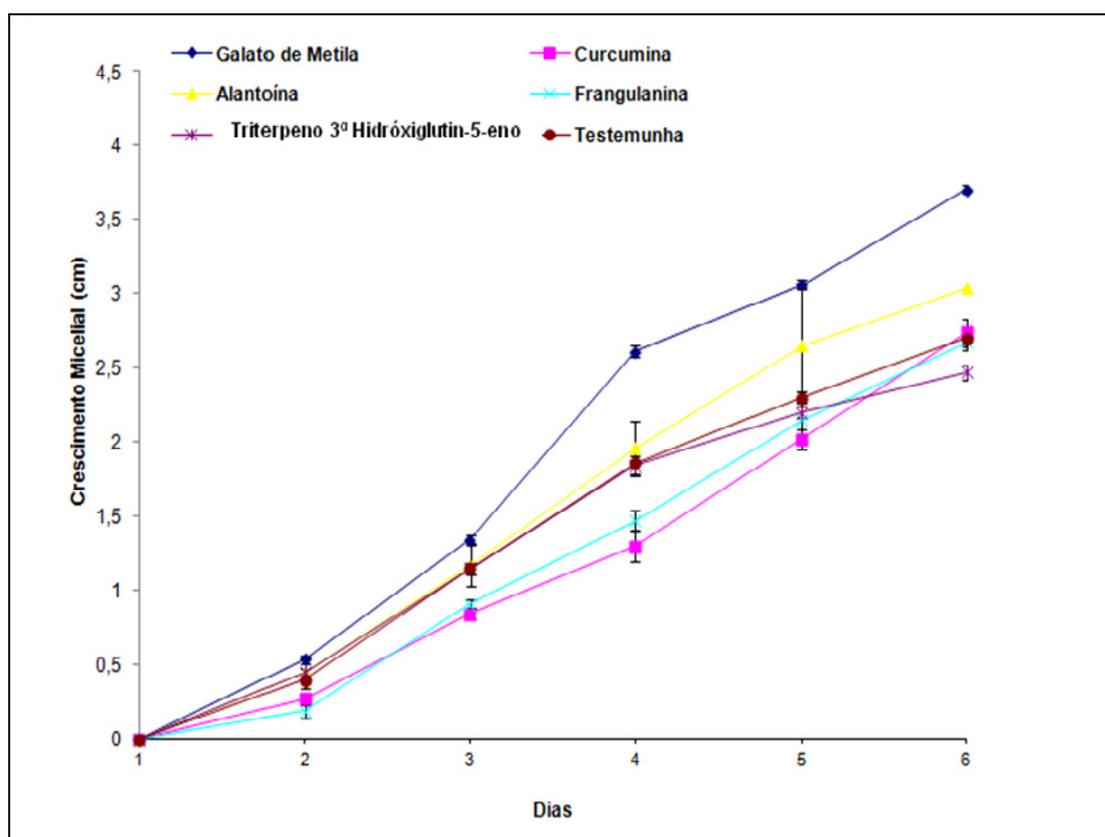


FIGURA 4.211- Efeito dos compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial de *Alternaria alternata*.

#### **4.7.2. Efeito das substâncias naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressório de *A. alternata***

As mesmas substâncias utilizadas no ensaio de crescimento micelial foram utilizadas também no ensaio de germinação de esporos e formação de apressórios.

A avaliação do efeito das substâncias naturais frente à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios foi realizada comparando-se os resultados obtidos para cada substâncias em relação ao controle, que continha apenas DMSO e água destilada. Foram considerados esporos germinados os que apresentaram tubos germinativos maiores em relação ao próprio esporo num intervalo de 24 horas. Nos ensaios em que a germinação de esporos não foi observada no período de 24 horas, o composto testado foi o considerado como um possível agente fungitóxico.

##### **4.7.2.1. Ensaio 01: substâncias isoladas de *Waltheria brachypetala***

Para esse ensaio foram utilizadas as mesmas substâncias descritas na TABELA 4.18.

Toda a avaliação foi comparada com a testemunha, que continha apenas DMSO e água destilada previamente autoclavada. Dentre as amostras analisadas, as três substâncias ensaiadas apresentaram resultados promissores, todas elas na concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Nessa concentração as substâncias walteriona B, walteriona A e brachytelona inibiram em aproximadamente 90%, 80% e 95% a germinação de esporos. As mesmas substâncias foram avaliadas em relação à formação de apressórios, e os alcaloides walteriona B, walteriona A e brachytelona inibiram em respectivamente 87%, 90% e 97%. Esses dados podem ser observados ao analisar o gráfico representado na FIGURA 4.212.

Novamente nesse ensaio, embora os três alcalóides tiveram uma atividade antifúngica de destaque, a brachytelona A também apresentou resultados promissores em relação a germinação de esporos e formação de apressórios. Como já foi mencionado no item 4.7.1.1, não há relatos na literatura de ensaios biológicos relatando atividade antifúngica para esse composto.

Já é sabido que existe um grande interesse no estudo dos alcalóides devido à sua múltipla atividade farmacológicas. No sistema nervoso central os alcalóides podem ter atividade depressiva (morfina, escopolamina) e estimulante (estricnina, cafeína); no sistema autônomo parassimpático (pilocarpina), simpático (efedrina), anticolinérgico (atropina, hiosciamina) e o ganglionar (nicotina). Os alcalóides também têm atividade anestésica (cocaína), antitumoral (vimblastina, vincristina), antimalárica (quinina), antibacteriana (berberina) e muitas outras (RINALDI, 2007).

Ensaio de atividade antibacteriana relatada na literatura mostraram que alcalóides inibiram o crescimento de micro-organismo do gênero *Staphylococcus*, sendo que os mais susceptíveis foram *S. aureus* e *S. aureus penicillianase*. (STEFANELLO *et al.*, 2009).

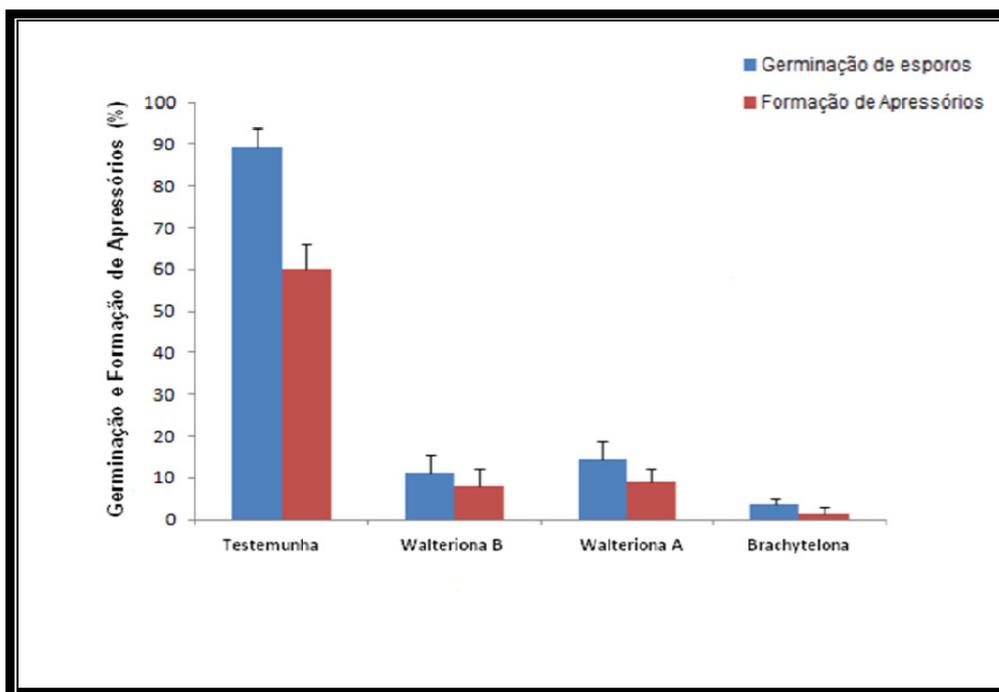


FIGURA 4.212- Efeito dos compostos naturais isolados de *Waltheria brachypetala* ensaiados frente a germinação de esporos e formação de apressórios de *A. alternata*.

#### 4.7.2.2. Ensaio 2: Substâncias isoladas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco (tangor ‘Murcott’).

A partir dos dados quantitativos obtidos para os compostos naturais ensaiados frente ao crescimento micelial, pretendia-se ter uma resposta mais direcionada para as estruturas reprodutivas do micro-organismo em que se dá a infecção nas plantas. Sendo assim, foi realizado o ensaio de inibição frente à germinação de esporos e formação de apressórios. As substâncias ensaiadas foram às mesmas utilizadas no ensaio de inibição do crescimento micelial (TABELA 4.19), com o intuito de se ter um resultado complementar e mais preciso. Assim, observou-se a partir do gráfico representado na FIGURA 4.213, que a xantiletina, na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (a mesma concentração utilizada no ensaio de crescimento micelial) foi a substância que apresentou o

melhor resultado, a qual inibiu 87,4% a germinação de esporos e 87,1 % a formação de apressórios, um resultado bastante promissor. A literatura mostra inúmeros trabalhos, onde frutos cítricos têm mecanismos de resistência ativados, como as fitoalexinas (escoparona e escopoletina), em resposta a diferentes tipos de indutores bióticos e abióticos (ARRAS, 1996; RODOV *et al.*, 1994; ALI *et al.*, 1991), levando a uma redução nos sintomas das doenças, e assim esta cumarina se torna uma substância promissora, uma vez que ela impede a formação de tubos germinativos, e conseqüentemente a formação de apressórios que são unidades responsáveis pelo início do processo de infecção, os quais provocam os sintomas da mancha preta dos citros.

O flavonóide apigenina 7-rutinosídeo ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) também apresentou uma atividade considerável, uma vez que inibiu cerca de 80,1% à germinação de esporos e cerca de 79,7% a formação de apressórios, demonstrando ser uma substância ativa frente ao desenvolvimento germinativo de *A. alternata*. Já as substâncias como o lupeol, tangeritina, limonina e nobiletina não mostraram nenhum efeito sob o desenvolvimento germinativo de *A. alternata*, quando comparados com a testemunha.

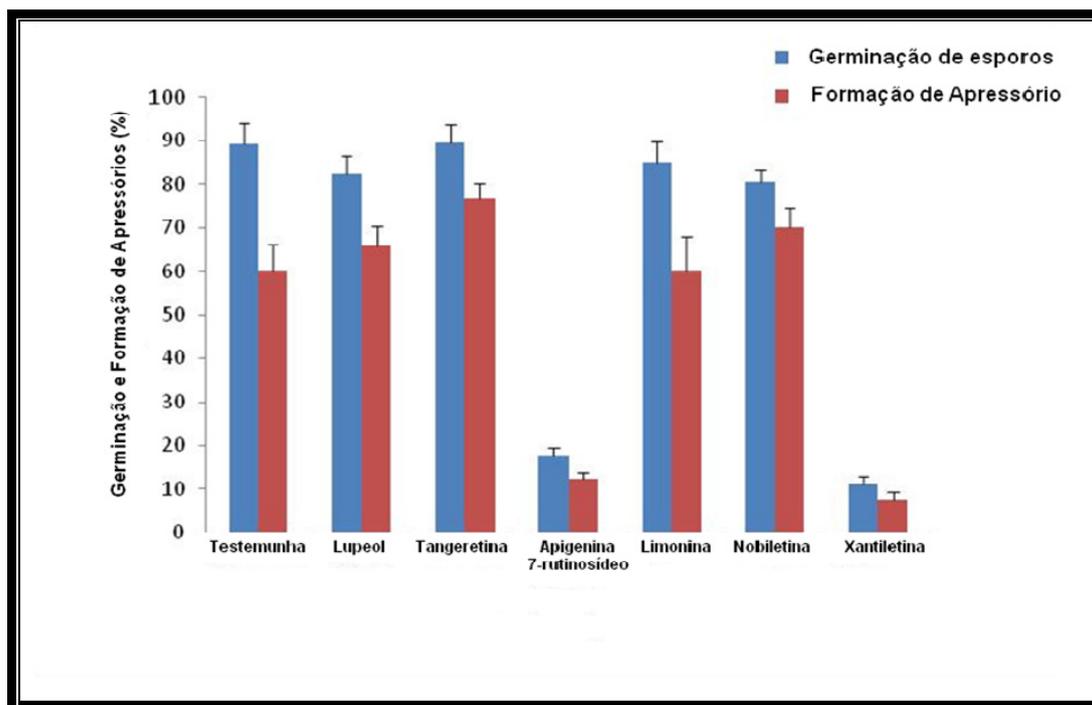


FIGURA 4.213 - Efeito dos compostos naturais isolados de *C. sinensis* Osbeck x *C. reticulata* Blanco ensaiados frente a germinação de esporos e formação de apossórios de *A. alternata*.

#### 4.7.2.3. Ensaio 3 – Substâncias isoladas de diversas plantas

Na realização do ensaio biológico envolvendo a germinação de esporos e a formação de apossórios, estruturas responsáveis pela penetração do micro-organismo para a sua colonização, foram utilizadas as mesmas substâncias descritas na TABELA 4.20.

Todas as substâncias ensaiadas (FIGURA 4.214) mostraram perfil fungistático, isto é, apenas diminuíram o crescimento do micro-organismo. Apenas três das cinco substâncias ensaiadas apresentaram uma inibição de aproximadamente 45% na germinação de esporos os quais são responsáveis pela dispersão do organismo na natureza, sendo elas a curcumina, o alcalóide frangulanina e o triterpeno 3 $\alpha$  hidróxiglutin-5-eno, inibindo respectivamente, 44%, 46 e 47%, em relação a testemunha.

Em relação á formação de apressórios, comparando com a tetemunha, a curcumina apresentou uma inibição de 46%, sendo seguida pela frangulanina (53%) e do triterpeno 3 $\alpha$  hidróxiglutin-5-eno (57%).

Ao observar a atividade exibida do triterpeno 3 $\alpha$  hidróxiglutin-5-eno, pode sugerir que o micro-organismo não consegue degradar terpenos. Em relação ao alcalóide ciclo peptídico frangulanina está apresentou uma atividade moderada em relação ao fungo *A. alternata*, uma vez que existe na literatura relato de moderada inibição frente aos organismos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae* (EMILE *et al.*, 2007) . Já a curcumina há relatos na literatura de atividade antifúngica frente à *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* e *Rhizoctonia solani* (NAGHETINI, 2006).

Uma substância que chamou a atenção foi o composto fenólico galato de metila, o qual em todos os ensaios realizados estimulou o crescimento micelial, geminação de esporos e formação de apressórios quando comparados com a testemunha. Analisando esse dado, pode-se propor a hipótese de que o fungo *A. alternata* possui um sistema enzimático capaz de degradar compostos fenólicos biotransformando-os em um metabólito menos nocivo ou até favorável ao seu crescimento. É de conhecimento que vários ácidos aromáticos fenólicos, compostos heterocíclicos e hidrocarbonetos podem ser utilizados como nutrientes, fonte de carbono, para o crescimento de micro-organismos. No entanto há relatos de bactérias capazes de degradar vários compostos aromáticos e que não conseguem fazer o mesmo com á ácido gálico (BEVERIDGE, 1964).

Na literatura existem relatos envolvendo este composto com atividade somente antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* (PENNA *et al.*, 2001).

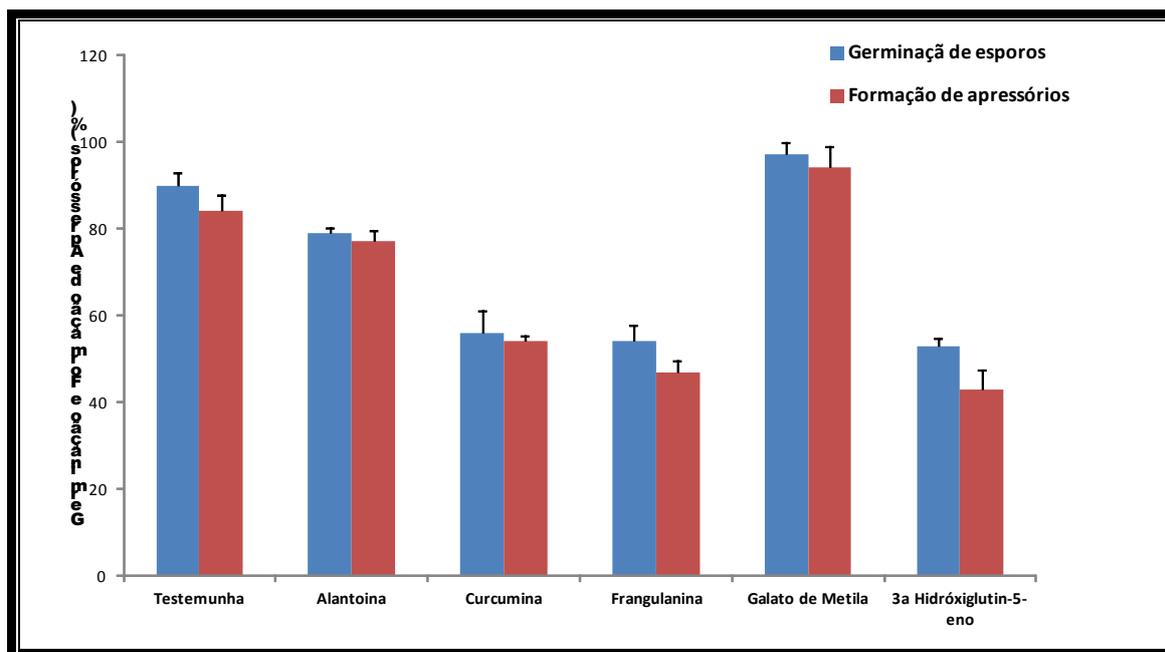


FIGURA 4.214- Efeito dos compostos naturais de diversas classes ensaiados frente a germinação de esporos e formação de apressórios de *A. alternata*.

#### 4.7.3. Ensaios envolvendo o micro-organismo *Guignardia citricarpa*

O gênero *Guignardia* foi descrito em 1982 por Viala e Ravaz. O fungo *Guignardia citricarpa* Kiely [anamorfo: *Phyllosticta citricarpa* (McALP.) Van Der Aa] é um Ascomiceto da ordem Dothideales, família Dothideaceae.

O fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, possuiu uma forma anamórfica a qual corresponde a *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alp.). A forma imperfeita do fungo foi inicialmente descrita como *Phoma citricarpa* Mc Alpine. Pseudotécios são encontrados apenas em folhas de citros caídas em decomposição no solo. Os pseudotécios são isolados ou agregados, globosos, imersos, de coloração castanho escuro a preto, com 95-125  $\mu\text{m}$  de diâmetro, ostíolo não papilado, circular, com 10-17,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e pseudoparáfises ausentes. Os ascos são cilíndrico-clavados (40-64 x 12-15  $\mu\text{m}$ ), de parede bitunicada, contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com o centro

dilatado (12,5-16 x 4,5-6,5  $\mu\text{m}$ ) e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (BALDASSARI *et al.*, 2001).

A fase assexual, representada por *P. citricarpa*, produz picnídios em lesões nos ramos, frutos e folhas e em folhas em decomposição. Os picnídios são solitários, às vezes agregados, globosos, com 115-190  $\mu\text{m}$  de diâmetro, coloração marrom escura para preta, ostíolo levemente papilado, circular e com 12-14,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os conídios possuem formato obovóide para elíptico, hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice hialino em uma das extremidades, base truncada e medem 8-10,5 x 5,5-7  $\mu\text{m}$ . O conidióforo é cilíndrico e alongado com 9  $\mu\text{m}$  de comprimento (TOFFANO, 2010).

*Guignardia citricarpa* é o agente causal de uma doença denominada pinta preta dos citros. Essa doença afeta todas as variedades de laranjas doces, limões verdadeiros, tangerinas e híbridos e é disseminada por meio de mudas, restos de material vegetal, água da chuva e vento. O principal sintoma são lesões nos frutos, que causam a sua depreciação no mercado pela perda do interesse na comercialização desse fruto *in natura*. Ainda, as lesões impedem a exportação dos frutos, tanto pela aparência quanto pela possibilidade de contaminação das plantações dos países importadores onde a doença pinta preta não ocorre (MAGNANI, 2007).

Visando a busca por possíveis fungicidas proveniente de produtos naturais frente ao *G. citricarpa*, foram realizados ensaios de inibição do crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios utilizando substâncias isoladas do micro-organismo *A. alternata*.

#### 4.7.3.1. Ensaio de Crescimento Micelial, Germinação de Esporos e Formação de Apressórios

Foi realizado o ensaio de crescimento micelial de *Guignardia citricarpa* utilizando substâncias isoladas de *A. alternata*. As avaliações de crescimento micelial foram realizadas a cada dois dias, e como o crescimento do fungo *G. citricarpa* não é uniforme as medidas foram baseadas no centro de aplicação do inóculo como referencial. Desta maneira, realizou-se a medida vertical e horizontal em centímetros e dessas medidas foram feitas médias para cada placa analisada.

Os compostos ensaiados são provenientes do crescimento do fungo em meio sólido de arroz, sendo que ácido palmítico, ácido octadecadienóico e peróxido de ergosterol, isolados do subextrato hexânico, alternariol, alternariol monometil éter e altenueno.

Analisando o gráfico de crescimento micelial *versus* dias na FIGURA 4.215, em comparação com a testemunha, todos os compostos ensaiados apresentaram atividade fungistática em relação ao micro-organismo *G. citricarpa*. No entanto dentre os compostos ensaiados o alternariol e alternariol monometil éter apresentaram uma inibição no crescimento micelial de aproximadamente 30% em relação à testemunha.

Observando o gráfico de germinação de esporos e formação de apressórios na FIGURA 4.216, os quais fornecem uma resposta mais direcionada às estruturas reprodutivas do micro-organismo para a infecção nos citros, o composto que apresentou um resultado um pouco mais satisfatório foi o alternariol monometil éter, o qual exibiu uma inibição de 59% em relação à germinação de esporos e 63% na formação de apressórios. Todos os demais compostos no que diz respeito germinação e formação de apressórios ficaram na faixa de 55% e 57% de inibição respectivamente.

Na literatura há relatos de alternariol monometil éter, em ensaios frente a outro fungo, o qual não inibiu o crescimento micelial de *Magnaporthe grisea* mas inibiu a formação de apressórios numa concentração de 10,6 µg/mL. (GU, 2009).

Outros compostos que há relatos na literatura sobre suas atividades biológicas são o alternariol e o peróxido de ergosterol. FREEMAN em 1965 constatou que o composto alternariol apresenta atividade biológica frente à *Staphylococcus*, *Corynebacterium betae* e *Escherichia coli*. O peróxido de ergosterol, o qual apresentou atividade alelopática de esteróides sobre ervas daninhas (DEMBITSKY, 2008).

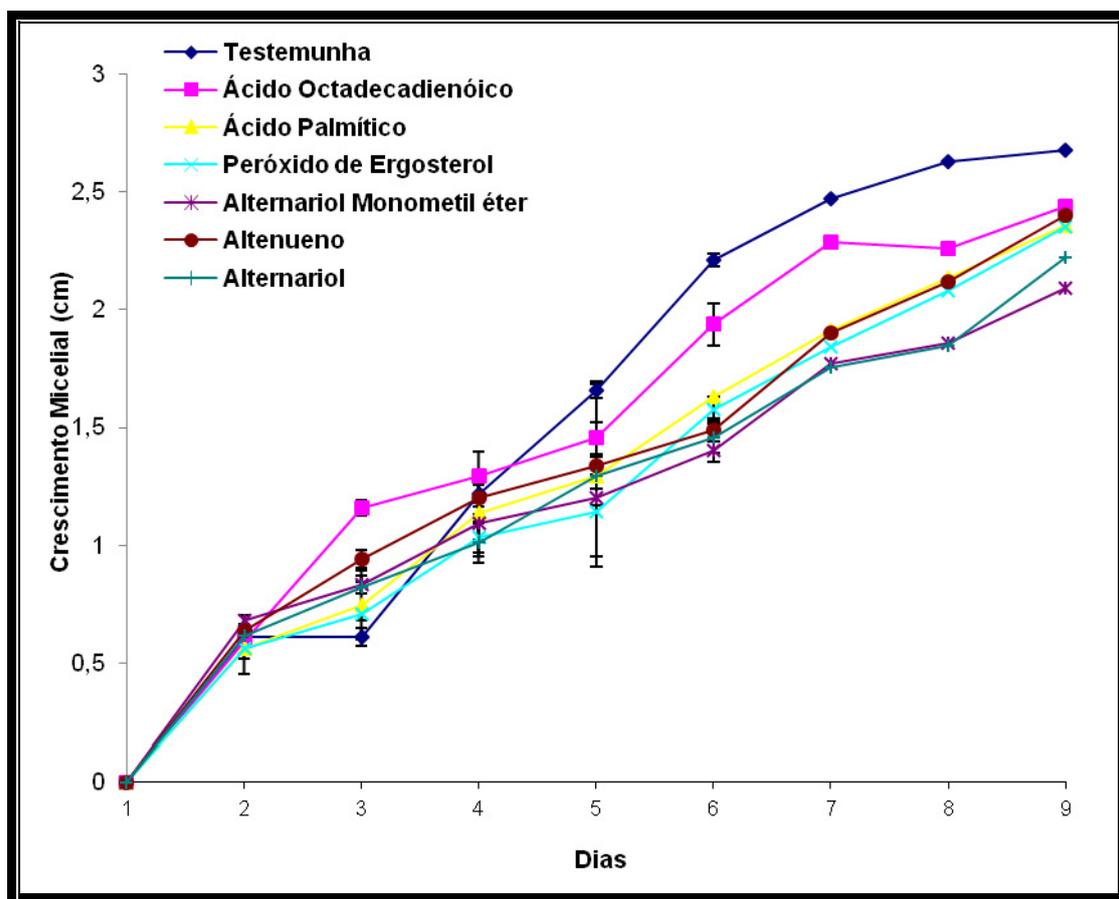


FIGURA 4.215- Efeito dos compostos naturais isolados de *A. alternata* ensaiados frente ao crescimento micelial de *Alternaria alternata*.

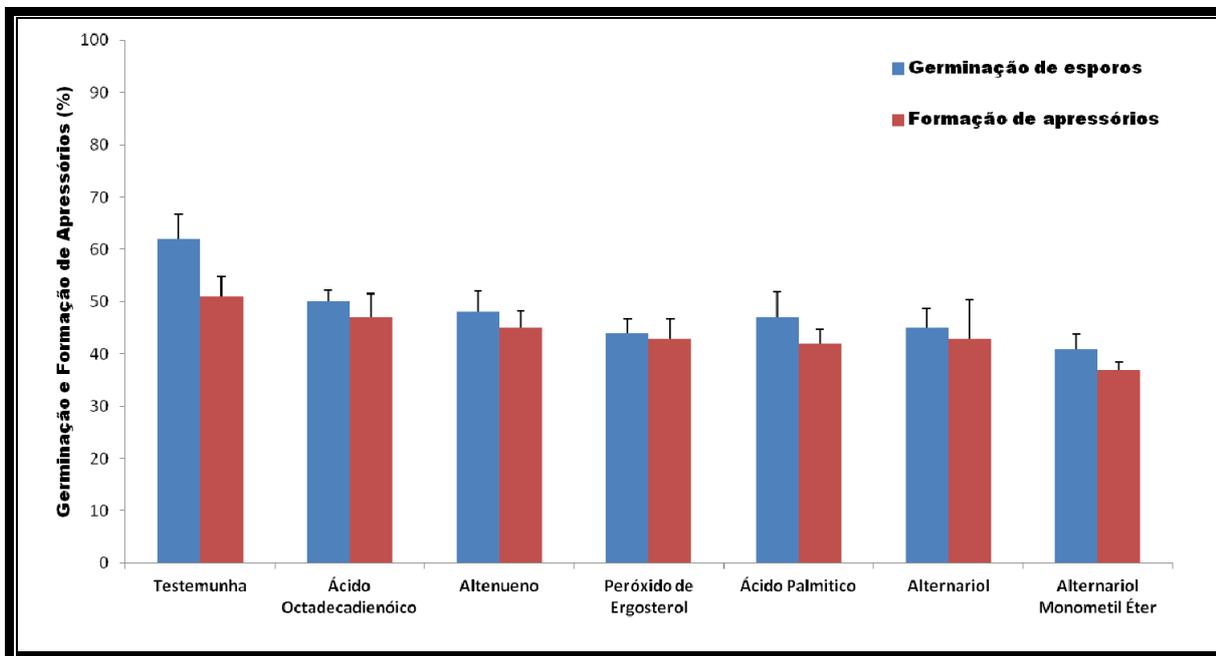


FIGURA 4.216- Efeito dos compostos naturais isolados de *A. alternata* ensaiados frente à germinação de esporos e formação de apressórios de *A. alternata*.





## *CONCLUSÕES*



## 5. Conclusões

Inicialmente foi feita a identificação do micro-organismo via PCR a qual pode confirmar o gênero e a espécie trabalhada.

O fitopatógeno agente causal da Mancha Marrom de *Alternaria*, foi cultivado em meio sólido de arroz sob modo estático e temperatura em aproximadamente 26°C por 26 dias. Após a extração e fracionamento com diversos solventes com distintas polaridades, os subextratos foram analisados via RMN 1H e três deles escolhidos para o estudo químico. Esses foram fracionados pelas diversas técnicas cromatográficas foi possível obter 11 substâncias: alternariol monometil éter, alternariol, altertoxina, altenueno, altenusina, uridina, uracila, 5'-inosil, ergosterol, peróxido de ergosterol e triglicerídeo o qual foi identificado após uma reação de transesterificação.

O estudo via LC-MS dos extratos obtidos de *A. alternata* quando cultivado em placas de Petri pode-se detectar a presença de quatro toxinas produzidas por esse micro-organismo quando esta colonizando o citros, sendo que uma delas antes somente foi identificada em morango.

A rota biossintética do micro-organismo também pode ser avaliada quando *A. alternata* é cultivado com outro fitopatógeno, o *Guignardia citricarpa*. Nesse estudo resultados revelaram que a biossíntese de *A. alternata* é desviada para a síntese de policetídeos, ou seja, aumentando a produção de alternariol e alternariol monometil éter e diminuindo a produção de ácido tenuazônico, impedindo assim o crescimento de *G. citricarpa*.

A identificação de compostos voláteis produzidos pelo micro-organismo em dois meios distintos forneceu resultados que contribuirão muito para o enriquecimento de *A. alternata*, uma vez que na literatura não existe trabalhos

envolvendo esse micro-organismo. Foi possível identificar mais de 35 compostos alguns deles já identificados em algumas bactérias.

Com a finalidade de entender a colonização do fungo em folhas jovens de tangor ‘Murcot’, foi realizado o estudo de Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, no Departamento de Biologia Evolutiva, na UFSCar, sendo que os resultados mostraram que a penetração do micro-organismo ocorre através dos estômatos, cavidades responsáveis pelas trocas gasosas. Além desse estudo foram obtidas também imagens do micro-organismo *A. alternata* comprovando a espécie.

Os ensaios biológicos frente ao fitopatógeno *A. alternata*, permitiu a avaliação da inibição do mesmo *in vitro* frente ao crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios a partir de substâncias naturais isoladas pelo Grupo de Produtos Naturais da UFScar. Dentre as classes testadas, as que apresentaram melhores resultados foram os alcaloides isolados de *Waltheria brachypeta* e a cumarina xantiletina e o flavonoide Apigenina 7-rutinosideo isolados de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco (tangor ‘Murcott’). O alcaloide brachytelona inibiu em 95% a germinação de esporos e 97% a formação de apressórios, a cumarina xantiletina inibiu em aproximadamente 85% a germinação de esporos e a formação de apressórios e o flavonoide inibiu em aproximadamente 80% à germinação de esporos e formação de apressórios.

Outros ensaios realizados visando à busca de possíveis fungicidas de produtos naturais foi frente ao fitopatógeno *G. citricarpa*. Nesse ensaio foram utilizadas substâncias produzidas pelo *A. alternata* com a finalidade de inibir *G. citricarpa*. Dentre as substâncias testadas as que apresentaram uma maior inibição foi o alternariol monometil éter e alternariol as quais inibiram em média 60% a germinação de esporos e a formação de apressórios.

Tendo em vista que esses micro-organismos são agentes causais de doenças de citros, os ensaios biológicos mostraram que pode haver controle dessas fitopatonias.

Vale ressaltar que a busca por compostos naturais é uma área ainda em ascensão a qual merece atenção para o isolamento e identificação de possíveis protótipos a fungicidas.



## *REFERÊNCIAS*



## 6. Referências

- ABENA, A. A.; DIATEWAA, M.; GAKOSSOA, G.; GBEASSORC, M.; HONDI-ASSAHA, TH.; OUAMBA, J. M. “Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*”. *Fitoterapia*, **74**(3): 231, 2003.
- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. *Allured Publishing Corporation*, 4ª Edição, 2007.
- AKAMATSU, H.; TAGA, M.; KODAMA, M.; JOHNSON, R. D.; OTANI, H. & KOHMOTO, K. “Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens know to produce host-specific toxins”. *Current Genetic*, **35**: 647-656, 1999.
- AKIMITSU, K.; PEELVER, T.L.; TIMMER, L.W. “Molecular, ecological and evolutionary approaches to undertanding *Alternaria* diseases of citrus”. *Molecular Plant Pathology*, **4** (6): 435-436, 2003.
- AKIMITSU, K.; PEEVER, T.L. & TIMMER, L.W. “Molecular, ecological and evolutionary approaches to undertanding *Alternaria* diseases of citrus”. *Molecular Plant Pathology*, **4** (6): 435-436, 2003.
- ALI, M. K.; LEPOIVRE, P.; SEMAL, J. Fosetyl. “Al treatment of *Phytophthora citrophthora* releases a higher scoparone elicitor activity from fosetyl-Al sensitive strain mutant than from an insensitive mutant”. *Fruits, Parc d’activites de Courtaboeuf*, **46**:51-55, 1991.
- ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; INDRIANI, I. D.; WRAY, V.; MUELLER, W. E. G.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHAECHTELE, C.; KUBBUTAT, M. H. G.; LIN, W. H.; PROKSCH, P.; EBEL, R. “Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*”. *Journal of Natural Products*, **71** (6): 972-980, 2008.
- ANAYA A.L., MACI’AS-RUBALCAVA, M., CRUZ-ORTEGA R., GARCÍ A.SANTANA C., SANCHEZ-MONTEERRUBIO P.N., HERNÁNDEZ-BAUTISTA B.E., MATA, R. (2005) “Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico”. *Phytochemistry* **66**:487–494, 2005.

ARNONE, A., NASINI, G., MERLINI, L., ASSANTE, G. "Secondary mould metabolites. part 16.' stemphytoxins, new reduced perylenequinone metabolites from *stemphylium botryosum* var. *Lactucum*". *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1996.

ARRAS, G. "Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits". *Postharvest Biology and Technology*, **8**: 191-198, 1996.

AZEVEDO, F.A., POLYDORO, D.A., BASTIANEL, M., KUPPER, K. C., STUART R.M., COSTA, F.P., PIO, R.M. "Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*." *Revista Brasileira de Fruticultura*, **32**(3):944-951, 2010.

BALDASSARI, R.B.; GOES, A.; SANTOS, J.M.; TIMOSSI, A.J. "Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas". *Summa Phytopathologica*, **27** (1): 88-92, 2001.

BARKAI-GOLAN, R. "An Annotated Check-List of Post-Harvest Fungal Diseases of Fruits and Vegetables in Israel", 2nd ed. In Department of Postharvest Science of Fresh Produce. Bet Dagan, Israel: ARO, the Volcani Center, 2002.

BARKAI-GOLAN, R. "Post-Harvest Diseases of Fruits and Vegetables", Development and Control. Amsterdam: Elsevier, 2001.

BASTIANEL, M., de AZEVEDO, F.A., CRISTOFANI, M., MACHADO, M.A. "Mancha marrom de alternária: uma interação fungo, toxina e tangerina". *Laranja*, **26** (2): 323-336, 2005.

BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F. A., CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. "Mancha marrom de alternária: uma interação fungo, toxina e tangerina". *Laranja*, **26** (2): 323-336, 2005.

BETINA, V. "Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification". Amsterdam: Elsevier, 528 p., 1984.

BEVERIDGE, E. G, Huao, W. E. "The resistance of gallic acid and its alkyl esters to attack by bacteria able to degrade aromatic ring structures". *Journal of Applied Bacteriology* **27** (2): 304-311, 1964.

BHATIA, A.; PEEVER, T. L.; AKIMITSU, K.; CARPENTER-BOGGS,

- L.; TIMMER, L. W. "Ecology of *Alternaria alternata* on citrus". *Phytopathology*, **92**(6): 7, 2002.
- BRADBURN, N., COKER, R.D., BLUNDEN, G., TURNER, C.H., CRABB, T.A. "5'-epialtenuene and neoaltenuene, dibenzo- $\alpha$ -pyrones from *Alternaria alternata* cultured on rice". *Phytochemistry*, **35** (3): 665-669, 1994.
- CAMARGO, R.F. Tratamentos alternativos na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de espécies florestais. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2007. Dissertação de Mestrado, 75p.
- CAMPBELL, M. K. & FARRELL, S. O. Bioquímica. São Paulo. Editora Thomsom Learning, 2007, p. 835.
- CASSEL, M.A.A.P. Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica. Porto Alegre, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2010. Dissertação de Mestrado, 60p.
- CHAGONDA, L.S.; CHALCHAT, J.C., "The essential oil of wild and cultivated *Hoslundia opposita* Vahl. from Zimbabwe", *Flavour Fragr. J.*, **20**: 193-195, 2005.
- COSTA, C. M. G. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA, P. F. M. e FARIAS, M. A. A. "Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*". *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, **2**(2): 11, 2008.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L. SANTOS, N. K. A.; CARDOS, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Rev. "Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*". *Revista Brasileira Farmacognosia*, **15**(4): 304, 2005.
- CURSINO-SANTOS, J. R.; DEFINA, T. P. A. & MARTINEZ-ROSSI, N. M. "Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular" – Ribeirão Preto, 2003, 45p.
- DE CASTRO, L.M. D., JIMÉNEZ-CARMONA, M. M. "Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **18**(11): 708-716, 1999.

DE MELO C. C., DOMINGUES V.C., BATALHÃO J.R., BUENO O.C., FILHO E.R., FERNANDES DA SILVA M.F.G., VIEIRA P.C., FERNANDES J.B. “Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants’ symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography”. *Journal of Chromatography A* **1216**:4307-4312, 2009.

de SOUZA, G. D. “Toxinas produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*: aspectos analíticos e químico-ecológicos” São Carlos. UFSCar, 2009. Tese de doutorado, 253p.

DEETAE, P., BONNARME, P., SPINNLER, H.E., HELINCK, S. “Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**: 1161–1171, 2007.

DEMBITSKY, V.M. “Bioactive peroxides as potential therapeutic agents”. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **43**: 223, 2008.

EDWARDS, S. G., O’CALLAGHAN, J., DOBSON, A. D. W. “PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi”. *Mycological Research*, **106**: 1005-1025, 2002.

ELLIS, M. B.; HOLLIDAY, P. *Alternaria citri*. Commonwealth Mycological Institute, 242, Kew: Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 1970.

EMILE, A., WAIKEDRE, J., HERRENKNECHT, C., FOURNEAU, C., GANTIER, J.C., HNAWIA, E., CABALION, P., HOCQUEMILLER, R., FOURNET, A. “Bioassay-guided isolation of antifungal alkaloids from *Melochia odorata*”. *Phytotherapy Research*, **21**: 398-400, 2007.

FEICHTENBERGER, E., SPÓSITO, M B., PIO, R. M, CASTRO, J.L. “Seleção de tangerinas e híbridos de citros para a tolerância à mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* Keissler)”. *Citricultura atual*, **45** (8): 08-10, 2005.

FERREIRA, C. S.; DA ROCHA, I. C. M.; NETO, R. L. M.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. “Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of SbV-ribonucleoside complexes”. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **21**(7):

1258, 2010.

FREEMAN, G.G. “Isolation of alternariol and alternariol monomethyl ether from *Alternaria dauci* (Kühn) groves and skolko”. *Phytochemistry*, **5**: 719, 1965.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. “Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production”. In: ARORA, D.K., MUKERJII, K.G., MARTH, E.H. (Ed.). *Food and Feeds*. New York: Marcel Dekker, (Handbook of applied mycology, 3), 1992.

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura:  
<http://www.fundecitrus.com.br>

GARLET, T.M.B. Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha* L. (Lamiaceae) cultivadas em hidroponia com variação de potássio. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2007. Tese de Doutorado, 112p.

GARNER, C.E., SMITH, S., COSTELLO, B.L., WHITE, P., SPENCER, R., PROBERT, C. J., RATCLIFFE, N.M. “Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease”. *The FASEB Journal - Research Communication*, **21**:1675-1688, 2007.

GOES, A. de; MONTES de OCA, A. G.; REIS, R. F. “Ocorrência de la mancha de *Alternaria* en mandarina ‘Dancy’ en el estado de Rio de Janeiro”. *Fitopatologia Brasileira*, **26**: 386, 2001.

GU, W. “Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**: 1677, 2009.

GUNATILAKA, A. A.; KINGSTON, D. G.; WIJERATNE, E. M.; BANDARA, B. M.; HOFMANN, G. A.; JOHNSON, R. K. “Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae”. *Journal of Natural Products*, **57**: 518-520, 1994.

HEJAZIAN, S. H. “Analgesic Effect of Essential Oil (EO) from *Carum Copticum* in Mice”. *World Journal of Medical Sciences*, **1**(2): 95, 2006.  
HOLLEY, R.A; PATEL, D. “Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials”. *Food*

*Microbiology*, **22**: 273, 2005.

<http://webbook.nist.gov/chemistry/>.

ISSHIKI, A.; OHTANI, K.; KYO, M.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. "Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus". *Phytopathology*, **93**: 768-773, 2003.

JANSSENS, L.; DePOOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. "Production of flavours by microorganisms". *Process in Biochemistry*, **27**:195-215, 1992.

KEMPLER, G. M. "Production of flavor compounds by microorganisms". *Advances in Applied Microbiology*, **29**:29-51, 1983.

KHAN, A. J.; KUNESCH, G.; CHUILON, S.; RAVISE, A. "Structure and biological activity of xanthyletin, a new phytoalexin of citrus". *Fruits*, **40**: 807-811, 1985.

KOCH, K.; PODLECH, J.; PFEIFFER, E.; METZLER, M. "Total Synthesis of Alternariol". *Journal of Organic Chemistry*, **70** (8): 3275-3276, 2005.

KONO, Y., GARDNER, J.M., SUZUKI, Y., TAKEUCHI, S. "Studies on host-selective toxins produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins". *Agricultural and Biological Chemistry*, **50** (6):1597, 1986.

KONO, Y., GARDNER, J.M., TAKEUCHI, S. "Structure of the host-selective toxins produced by pathopyte of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins". *Agricultural and Biological Chemistry*, **50** (3): 801, 1986.

KRAUZE-BARANOWSKA, M.; MARDAROWICZ, M.; WIWART, M., "The chemical composition of *Microbiota decussate*". *Z. Naturforsch. C*, **57**(c): 998-1003, 2002.

LI, X.L., KANG L., HU J.J, LI X.F., SHEN, X. "Aroma volatile compound analysis of SPME Headspace and extract samples from crabapple (*Malus sp.*) fruit using GC-MS". *Agricultural Sciences in China*, **7**(12): 1451-1457, 2008.

- LIEBERMANN, B., NUSSBAUM, R.P., GÜNTHER, W.  
“Bicycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*”. *Phytochemistry*, **55**: 987-992, 2000.
- LUTHRIA, D. L.; RAMAKRISHNAN, V; VERMA, G. S.; PRABHU, B. R.; BANERJI, A. “Insect Antifeedants from *Atalantia racemosa*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**: 1435-1437, 1989.
- MAGNANI, R.F. Aspectos químicos envolvidos nas interações de *citrus* com fitopatógenos. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2007. Tese de doutorado, 145p.
- MAGNOLI, C., VIOLANTE, M., COMBINA, M. “Mycoflora and ochratoxinproducing strains of *Aspergillus* section Nigri in wine grapes in Argentina”. *Letters in Applied Microbiology*, **37**: 179–84, 2003.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E.  
“Constituintes químicos de *Penicillium sp*, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae)”. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, **9**(2): 189, 2007.
- MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PANI, F.; PORCEDDA, S.; BALLERO, M., “Extraction, separation and isolation of essential oils from natural matrices by supercritical CO<sub>2</sub>”, *Flavour and Fragrance Journal*, **18**: 505-509, 2003.
- MASUNAKA, A., OHTANI, K., PEEVER, T. L., TIMMER, L. W., TSUGE, T., YAMAMOTO, M., YAMAMOTO, H., AND AKIMITSU, K.  
“An Isolate of *Alternaria alternata* That is Pathogenic to Both Tangerines and Rough Lemon and Produces Two Host-Selective Toxins, ACT- and ACR-Toxins”. *Phytopathology*, **95** (3): 241-247, 2005.
- MASUNAKA, A., TANAKA, A., TSUGE, T., PEEVER, T. L., TIMMER, L. W., YAMAMOTO, M., YAMAMOTO, H., AND AKIMITSU, K.  
“Distribution and Characterization of *AKT* Homologs in the Tangerine Pathotype of *Alternaria alternata*”. *Phytopathology*, **90** (7): 762-768, 2000.
- MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. “Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology”. *Biochemical Engineering Journal*, **6**: 33-39, 2000.
- MONTEIRO, O. S. Caracterização do óleo essencial da Pimenta dioica

lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas euglossina. João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 2008. Tese de Doutorado, 126p.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. “Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil”. *Química Nova*, **29**(5): 907, 2006.

NAGHETINI, C.da C. Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006. Dissertação de Mestrado, 61p.

NAKANISHI, S., TOKI, S., SAITOH, Y., TSUKUDA, E., KAWAHARA, K., ANDO, K., MATSUDA, Y. “Isolation of myosin light chain kinase inhibitors from microorganisms: dehydroaltenusin, altenusin, atrovenetinone, and cyclooctasulfur”. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **59** (7), 1333-1335, 1995.

NICKAVAR, B., SALEHI-SORMAGI, M.H., AMIN, GH., DANESHTALAB, M. “Steam Volatiles of *Vaccinium arctostaphylos*” *Pharmaceutical Biology*, **40** (6): 448-449, 2002.

NICULAU, E.dos S. Contribuição à química dos compostos voláteis de *Lippia Alba* (Mill) N.E. Brow e *Pelargonium graveolens* L’Herit e atividade inseticida frente à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). São Cristovão, Universidade Federal de Sergipe, 2011. Dissertação de Mestrado, 130p.

OMELIANSKI, V. L. “Aroma-Producing Microorganisms”. *Journal of Bacteriology*, **8**(4):393, 1923.

OXENHAM, S. K.; SVOBODA, K. P.; WALTERS, D. R. “Antifungal Activity of the Essencial Oil of Basil (*Ocimum basilium*).” *J. Phytoapathology*, **53**: 174, 2005.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIN, L. (Ed). *Manual de Fitopatologia*, 3.ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 1:365-392, 1995.

PASCHOLATI.S.F., LEITE, B., STANGARLIN, J. R., CIA,P. “Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular”. FEALQ-2008.

- PAVLOVIC, M.; TZAKOU, O.; PETRAKIS, P.V.; COULADIS, M., “The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* Fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece”. *Flavour and Fragrance Journal*, **21**:84-87, 2006.
- PEGG, K. G. “Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal agent of brown spot of Emperor mandarin”. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, **23** (1): 15-28, 1966.
- PENNA,C; MARINO,S; VIVOT, E; CRUANES,MC; MUNOZ,J.D.; CRUANES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. “Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*”. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**: 37-40, 2001.
- REDDY, M. C., BILLS, D. D., LINDSAY, R. C. “Ester production by *Pseudomonas fragi*- II. Factors influencing ester levels in milk cultures”. *Applied Microbiology*, **17**(6):779-782, 1969.
- REIS, R.F, de ALMEIDA, T.F, STUCHI, E.S, de GOES, A. “Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the *Alternaria* brown spot”. *Scientia Horticulturae*, **113**: 336–342, 2007.
- RENAUD, M. S.; LOURENÇO, S. A.; FEICHTENBERGER, E.; AMORIM, L. “Efeito da temperatura e do período de molhamento foliar na germinação de conídios de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*”. *Fitopatologia Brasileira*, **30**: 102, 2005.
- RIBEIRO, A. B. Fitoquímica do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* e da espécie *Nycticalanthus speciosus* (RUTACEAE) e biossíntese de cumarinas preniladas. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2006. Tese de Doutorado. 219p.
- RINALDI, M.V.N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. São Paulo, Universidade de São Paulo, 2007, Dissertação, 125p.
- RODOV, S.; BEN-YEHOSHUA,D.; D’HALLEWIN,G.; CASTIA,T. “Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments”. *Acta Horticulturae*, **1**(381):

517-523, 1994.

SANTOS FILHO, F.C. Análise dos constituintes fixos e voláteis de fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e de suas plantas hospedeiras. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2010. Dissertação de Mestrado, 180p.

SANTOS, A. S.; BIZZO, H. R.; ANTUNES, A. M. S.; D'AVILA, I. A. “Aproteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial”. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **8**(4): 14, 2006.

SARDARI, S.; NISHIBE, S.; DANESHTALAB, M. “Coumarins the bioactive structures with antifungal property”. *Studies in Natural Products Chemistry*, **23**: 335-393, 2000.

SASSERON, G. R. Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros, Campinas, INSTITUTO AGRONÔMICO, 2008. Dissertação de Mestrado, 71p.

SILVA, S. C. *Estudo Químico de Microorganismos Associados a Khaya ivorensis (Meliaceae)*. São Carlos. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 242 p.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª Edição, 387 p., 1994.

SOLEL, Z. “*Alternaria* brown spot on *Minneola* tangelos in Israel”. *Plant Pathology*, **40** (1): 145-147, 1991.

SOLEL, Z.; KIMCHI, M. “Histopathology of infection of *Minneola* tangelo by *Alternaria alternata* pv. *citri* and effect of and environmental factors on lesion development”. *Journal of Phytopathology*, **146**: 557-561, 1998.

SOLEL, Z.; OREN, Y. & KIMCHI, M. “Control of *Alternaria* brown spot of *Minneola* tangelo with fungicides”. *Crop Protection*, **16** (7):659-664, 1997.

SOUZA, K. S.; CHAAR, J. S.; OLIVEIRA, K. M. T.; GOMES, E. O.; PORTELA, C. N.; POHLIT, A. M.; QUIGNARD, E. L. J.; NUNOMURAS, S. M.; TADEI, W. P.; MOUCHREK FILHO, V. E.; SILVA, D. D.; GALHIANE, M. S.; CHIERICE, G. O. “Atividade

biológica de extratos, hidrolatos e óleo voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas”. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **9**(2): 1, 2007.

SPÓSITO, M. B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R. M.; CASTRO, J. L.; RENAUD, M. S. “Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul”. *Fitopatologia Brasileira*, **28**: 152, 2003.

STEFANELLO, M.É.A. , SALVADOR, M. J., ITO, I. Y., MONTOIA , A., SILVA, C. J. F., BARROS, L. F.L. “Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *Talauma ovata* (Magnoliaceae)”. *Latin American Journal of Pharmacy*, **28** (2): 270, 2009.

STICKINGS, C. E., TOWNSEND, AD R. J. “Studies in the biochemistry of micro-organisms- Metabolites of *alternaria tenuis* auct.: the biosynthesis of tenuazonic acid”. *Biochemical Journal*, **78**: 412-418, 1961.

STINSON, E.E, OSMAN, S. F., PFEFFER, P. E. “Structure of altertoxin I, a mycotoxin from *Alternaria*”. *The Journal of Organic Chemistry*, **47** (21): 4110-4113, 1982.

STINSON, E.E., BILLS, D.D., OSMAN, S.F. “Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes and blueberries”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **28**: 960–963, 1980.

STINSON, E.E., OSMAN, S.F., HEISLER, E.J. “Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **29**, 790–792, 1981.

STUART, R.M., BASTIANEL, M., AZEVEDO de, F.A., MACHADO, M.A. “*Alternaria* brown spot”. *Laranja*, **30** (1-2): 29-44, 2009.

SUBBIAH, M. T.; ABPLANALP, W. “Ergosterol (major sterol of baker’s and brewer’s yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products”. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **73**: 19-23, 2003.

TELES, R. M. Caracterização química, avaliação térmica e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans. João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 2009. Tese de Doutorado, 120p.

- THOMMA, B. P. H. J. “*Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite”. *Plant Pathology*, **4** (4): 225-236, 2003.
- TIMMER, L. W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T. R.; IBAÑEZ, A. M.; ZITKO; S. E. “Environmental Factors Affecting Production, Release, and Field Populations of Conidia of *Alternaria alternata*, the Cause of Brown Spot of Citrus”. *Phytopathology*, **88** (11), 1218-1223, 1998.
- TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L.; SOLEIL, Z.; AZUYA, K. & KIMITSU, A. “*Alternaria* diseases of citrus-novel pathosystems”. *Phytopathologia Mediterranea*, **42**: 99-112, 2003.
- TOFFANO, L. Efeito dos extratos do albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros. Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” 2010. Tese de Doutorado, 79p.
- TÖFOLI, J.G., DOMINGUES, R.J. “Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo intregado”. *Biológico*, **66** (1/2): 23-33, 2004.
- VINÑA, A.; MURILLO, E. “Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum spp*) grown in Columbia”. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **14** (5): 744-749, 2003.
- VISCONTI, A., LOGRIECO, A., BOTTALICO, A. “Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives – Their production and possible transfer into the oil”. *Food Additives and Contaminants*, **3**: 323–330, 1986.
- WALTON, J.D. “Host-Selective Toxins: Agents of Compatibility”. *The Plant Cell*, **8**:1723-1733, 1996.
- WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; THEFELD, K.; SUBBA, G. C. “Constituents of the essential oil from the rhizomes of *Hedychium gardnerianum* Roscoe”. *Flavour and Fragrance Journal*, **13**(6): 377, 1999.
- YU, J.Q.; LIAO, Z.X.; CAI, X.Q.; LEI, J.C.; ZOU, G.L., “Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **23**: 162-167, 2007.

ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. "The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation". *Process Biochemistry*, **38**: 319-324, 2002.