



CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudo químico do fungo *Memnoniella levispora*: busca por metabólitos secundários inibidores da *Phytophthora nicotianae*.”

Alany Ingrid Ribeiro*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM QUÍMICA, ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA
ORGÂNICA

Orientadora: Maria Fátima da G. F. da Silva

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R484e Ribeiro, Alany Ingrid
 Estudo químico do fungo *Memnoniella levispora* :
busca por metabólitos secundários inibidores da
Phytophthora nicotianae / Alany Ingrid Ribeiro. --
São Carlos : UFSCar, 2015.
 145 p.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

 1. *Memnoniella levispora*. 2. Fungos sapróbios. 3.
Griseofulvina. 4. LC-SPE-NMR. I. Título.

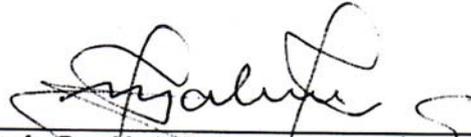


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Alany Ingrid Ribeiro, realizada em 19/03/2015:



Profa. Dra. Maria Fatima das Gracas Fernandes da Silva
UFSCar



Profa. Dra. Angela Regina Araujo
UNESP



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus grandes amores Romildo (pai) e Geanete (mãe) por todo o esforço que fizeram para tornar possível a conclusão de mais uma etapa importante na minha vida.

Às minhas irmãs, sobrinho e familiares, por todo amor e compreensão

“Nunca existiu uma grande inteligência sem uma veia de loucura”.

Aristóteles

Agradecimentos

Ao meu pai Romildo, à minha Geanete, às minhas irmãs Taissa, Deminy e ao meu sobrinho Pietro por todo amor e compreensão durante todos esses anos e principalmente pela ausência física em algumas datas comemorativas.

À minha orientadora Maria Fátima, por ter me concedido a honra de trabalhar com ela, uma das melhores pesquisadoras com quem tive contato e que me aceitou prontamente desde a iniciação científica.

Aos professores do grupo de Produtos Naturais, João Batista Fernandes, Paulo César e Moacir Forim, pela colaboração.

Aos profissionais: Dr. Leonardo Toffano por ter me dado uma grande suporte no isolamento do fungo.

Ao Dr. Ednilson Nicolau pela ajuda no GC/MS.

Ao Doutorando Bruno Perlatti pela grande ajuda no LC/MS e idéias ao decorrer do trabalho.

Ao Laboratório de RMN, principalmente à técnica Luciana e ao Dr. Sérgio Thomasi por ter me ajudado com os experimentos de RMN e com LC-SPE-NMR.

Ao professor Edinho, por ter me ajudado com idéias no projeto.

À rede SISBIOTA pelo fornecimento do fungo e por realizar reuniões em diversas partes do país.

A todos os meus amigos e colegas do laboratório de Produtos Naturais (PN) que conquistei durante minha pequena jornada por lá, em especial a Dra Barbara Sayuri que nunca mediu esforços para me ajudar, tanto em questões pessoais quanto profissionais desde a iniciação científica.

Ao CNPq pela bolsa concedida

É com imensa gratidão que lhes digo: Muito Obrigada!

Lista de Abreviaturas e siglas

ACN- Acetonitrila
AcOEt - Acetato de Etila
BD- Batata Dextrose
BDL- Batata Dextrose e Levedura
BDM- Batata dextrose e Malte
ButOH – Butanol
CLAE Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CM- Cenoura e Milho
COSY Correlation Spectroscopy Homonuclear
CZA- Czapeck
DAD- Arranjo de Diodo
DAD - Detector de Arranjo de Diodos
DCM- Diclorometano
ESI-EM - Espectrometria de massas (Ionização por electrospray)
Ext- Extrato
grad. Gradiente
HMBC- Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC- Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
MeOH - Metanol
MHz/Hz Mega hertz / Hertz
nm- nanômetro
PDA- Potato-Dextrose-Agar
RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
SPE - Extração em fase sólida
UV - Ultravioleta
Val Valina

Lista de Símbolos

δ - Deslocamento químico

λ Comprimento de onda

μ - Micro

$[M]^+$ Íon molecular

J- Constante de acoplamento

S - Singleto

d -Dubleto

dd - Duplo dubleto

m- Multipleteo

m/z- Relação massa-carga

Lista de tabelas

TABELA 1-2- Produção Mundial de Laranja (Milhões de toneladas)	22
TABELA 1-1 - Produção dos principais grupos de frutas	21
TABELA 3-1 Tabela dos nutrientes do meio de cultivo para o crescimento do fungo	41
TABELA 3.2: Sistema de eluição HPLC-UV.....	44
TABELA 3.3: Condições utilizadas para análises GC-MS.....	48
TABELA 3.4: Condições cromatográficas para análises LC-MS.....	48
TABELA 3.5 Condições cromatográficas para análises no LC-SPE-NMR	49
TABELA 4-1- Crescimento de <i>M. levispora</i> em diferentes meios.....	67
TABELA 4. 2 - Crescimento de <i>M. levispora</i> em diferentes meios	68
TABELA 4. 3 -Escala de Diferença entre meios sólidos e Líquidos.	68
TABELA 4.4: Extratos obtidos e suas respectivas massas (g).....	69
TABELA 4-0-5- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3)- Composto 1	80
TABELA 4. 6: -Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600MHz ;MeOH) do Composto 2	88
TABELA 4 .7 -Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600MHz, MeOH)- Composto 3	97
TABELA 4-8: Dados de RMN ^1H (600MHz ; MeOH)- Composto 4	105
TABELA 4.9: Dados de RMN ^1H (600MHz; MeOH)- Composto 5	113
TABELA 4.10- Dados de RMN 600MHz ^1H (MeOH)- Composto 6	119
TABELA 4.11- Dados de RMN ^1H - 600MHz (MeOH)- Composto 7	125
TABELA 4.12- Dados de RMN ^1H - 600 MHz (MeOH) Composto 8	131

Lista de Figuras

FIGURA 1-1 - Imagem representativa de uma hifa cenocítica	25
FIGURA 1-2:- (a) Zoósporo de phytophora (B) Zona de alongação das raízes infectados por zoósporos.	26
FIGURA 1-3- (a) Esxudação da goma na base do tronco (b) podridões do colo e raízes (c) Lesão no tronco - decorrente da destruição do floema (d) podridão parda	27
FIGURA 1-4: Imagem Ampliada dos conidóforos.....	32
FIGURA 3.1: Foto da região de recorte dos discos do fungo.	43
FIGURA 3.2: Fluxograma Procedimento Experimental	45
FIGURA 3.3: Ilustração das etapas de pré-tratamento em cartuchos de SPE	47
FIGURA 4.1- Cromatograma em gradiente exploratório do extrato de acetato de etila do <i>M. levispora</i> no meio de cenoura e milho em diferentes comprimentos de onda (HPLC-DAD).....	52
FIGURA 4 .2- a-) Fotos do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio de cultivo líquido de BD; b) foto do micélio seco de BD.....	53
FIGURA 4.3 Espectro de RMN ¹ H 400 MHz 1-) do extrato acetato de etila de <i>M.levispora</i> desenvolvido no meio BD 2-) do extrato acetato de etila do meio sem fungo	54
FIGURA 4.4- Foto do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio sólido BDAg.....	55
FIGURA 4.6- a-) Fotos do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio de cultivo líquido de BD; b) foto do micélio seco de BD.....	56
FIGURA 4.5- Sobreposição dos cromatogramas dos extratos de acetato de etilaa de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio de cultura BDAg (verde) e deste último sem a presença do fungo (azul) - HPLC-UV.....	55
FIGURA 4-7- -Espectro de RMN ¹ H 400 MHz 1-) de acetato de etila do meio BDL sem o fungo 2-) do extrato acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio BDL ..	57
FIGURA 4 8- Foto do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio sólido BLAG.	58
FIGURA 4.9- Sobreposição dos cromatogramas dos extratos de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio BDLAg (Verde) e deste último sem a presença do fungo (Azul) (HPLC-UV).....	58
FIGURA 4.10- Fotos do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio de cultivo líquido de BDM; b) foto do micélio seco de BDM.....	59
FIGURA 4.11- Espectro de RMN 1H 400 MHz 2-) do extrato acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio BDM 1-) do extrato acetato de etila do meio sem fungo	60
FIGURA 4.12- Foto do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio sólido BDMag.	61
FIGURA 4.13 sobreposição dos cromatogramas dos extratos de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio BDMag (verde) e deste último sem a presença do fungo (azul)	61
FIGURA 4.14- a-) Fotos do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio de cultivo líquido de CZA; b) Foto do micélio seco de CZA.	62
FIGURA 4.15- Espectro de RMN 1H 400 MHz 2-) do extrato de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio de CZA; 1-) do extrato de acetato de etila do meio sem o fungo.....	63

FIGURA 4.16- Foto do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio sólido CZAAG.....	63
FIGURA 4. 17 – Sobreposição dos cromatogramas dos extratos de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio CZAAG (verde) e deste último sem a presença do fungo (azul) - (HPLC-UV).....	64
FIGURA 4.18- a-) Fotos do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio de cultivo líquido de CM; b) foto do micélio.....	65
FIGURA 4.19 – Espectro de RMN ¹ H 400 MHz 2-) do extrato acetato de etila de <i>M.levispora</i> desenvolvido no meio de CM; 1-) do extrato acetato de etila do meio sem fungo.	65
FIGURA 4.20- Foto de crescimento do fungo em meio sólido CMAg.	66
FIGURA 4.21- Sobreposição dos cromatogramas de extratos de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio de CM (verde) e deste último sem a presença do fungo (azul)	66
FIGURA 4.22- Fotos do crescimento de <i>M. levispora</i> em meio líquido de cenoura e milho em escala ampliada.....	69
FIGURA 4-23- Inibição do crescimento do micélio da <i>Phytophthora nicotianae</i> frente aos extratos de <i>M. levispora</i> obtidos	70
FIGURA 4. 24- Fotos do crescimento da <i>Phytophthora nicotianae</i> em meio sólido de cenoura e milho (A) meio e <i>P. nicotianae</i> (B) meio com o patógeno e o extrato de acetato de etila de <i>M.levispora</i> (c) idem e extrato butanólico (d) idem e extrato hidroalcólico	70
FIGURA 4. 25- Espectro de RMN ¹ H 400 MHz do extrato de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio CM após o fracionamento em SPE C-18 1-) Extrato Acetato de etila obtido por SPE 2-) Extrato metanólico obtido por SPE 3-) Ampliação região de hidrogênio aromáticos	72
FIGURA 4.26: Sobreposição dos cromatogramas dos extratos acetato de etila de <i>M. levispora</i> , desenvolvido no meio de CM (verde) após tratamento por SPE (extrato acetato de etila) e do cultivo sem a presença do fungo (rosa) (HPLC-UV)	73
FIGURA 4. 27-Sobreposição dos cromatogramas dos extratos acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio CM (rosa) e do cultivo sem o fungo (preto)	74
FIGURA 4. 28 – Cromatograma por LC-MS do extrato de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio CM após o tratamento por SPE (c18).....	75
FIGURA 4.29 Cromatograma por LC-SPE-NMR do extrato de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio de CM.....	76
FIGURA 4.30 - Gráfico DAD 2D para o cromatograma do perfil químico do extrato de acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio de CM.....	77
FIGURA 4. 31- Cromatograma por HPLC-UV do extrato acetato de etila de <i>M. levispora</i> desenvolvido no meio CM.....	78
FIGURA 4.32: Estrutura química da Griseofulvina	79
FIGURA 4. 33 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃)- Composto 1	81
FIGURA 4.34 - Mapa de contorno COSY (400 MHz; CDCl ₃)- Composto 1	82
FIGURA 4.35 - Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl ₃)- Composto 1	83
FIGURA 4.36 - Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl ₃)- Composto 1	84
FIGURA 4. 37: Espectro de Massas do Composto 1 (LC-MS)	85

FIGURA 4.38- Espectro de Massas GC-MS- Composto 1	86
FIGURA 4.39 - Proposta de Fragmentação para o Composto 1	86
FIGURA 4. 40: Estrutura química da Declorogriseofulvina	87
FIGURA 4. -0-41- Espectro de RMN ¹ H (600 MHz , MeOH)- Composto 2	89
FIGURA 4-42- Ampliação da região dos aromáticos do espectro de RMN ¹ H 600 MHz- Composto 2	90
FIGURA 4.43- Ampliação da região alifático do espectro de RMN ¹ H 600 MHz- Composto 2	90
FIGURA 4.44- Ampliação da região das metilas do espectro de RMN ¹ H 600 MHz- Composto 2	90
FIGURA 4.45 Mapa de contorno COSY (600 MHz- MeOH)- Composto 2	91
FIGURA 4.46- Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- Composto 2	92
FIGURA 4.47- Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH)- Composto 2	93
FIGURA 4 .48: Espectro de Massas do Composto 2 (LC-MS).	94
FIGURA 4-49 Proposta de Fragmentação para o Composto 2	95
FIGURA 4-0-50- Espectro de massas do Composto 2 (GC-MS)	96
FIGURA 4.51- Estrutura química da Desidrogriseofulvina	96
FIGURA 4.52- Espectro de RMN ¹ H (600 MHz ; MeOH)- Composto 3	98
FIGURA 4.53- Mapa de contorno Cosy (600 MHz; MeOH)- Composto 3	99
FIGURA 4.54 - Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH) - Composto 3	100
FIGURA4.55- Mapa de contorno HMBC (600MHz)- Composto 3	101
FIGURA 4-56 Proposta de fragmentação 1 do Composto 3	102
FIGURA 4-57 Proposto de fragmentação 2 do Composto 3	102
FIGURA 4. 58 Espectro de Massas do Composto 3 (LC-MS).	103
FIGURA 4.59 - Espectro de Massas do Composto 3 (GC-MS)	103
FIGURA 4. 60: Estrutura química da Declorodehidrogriseofulvina	104
FIGURA 4.61- Espectro de RMN ¹ H (600MHz ; MeOH)- Composto 4	106
FIGURA 4.62- Ampliação na região dos aromáticos do espectro de RMN ¹ H (600MHz ; MeOH)- Composto 4	107
FIGURA 4.63- Mapa de contorno COSY (600MHz, MeOH)- Composto 4	107
FIGURA 4.64 - Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- Composto 4	108
FIGURA 4.65 -- Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH)- Composto 4	109
FIGURA 4.66- Espectro de massas do Composto 4 (LC-MS)	110
FIGURA 4.67 Proposta de Fragmentação para o Composto 4	111
FIGURA 4.68- Espectro de massas do Composto 4 - (CG-MS)	111
FIGURA 4.69: Estrutura química da Griseofenona I	112
FIGURA 4.70- Espectro de RMN ¹ H- 600 MHz (MeOH) Composto 5	114
FIGURA 4.71 - Mapa de contorno HSQC - 600 MHz (MeOH)- Composto 5	115
FIGURA 4.72 - Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH) com sua ampliação na região dos aromáticos - Composto 5	116
FIGURA 4.73- Espectro de Massas do Composto 5 (LC-MS)	117
FIGURA 4.74 Proposta de Fragmentação do Composto 5	117
FIGURA 4.75 –Estrutura química Grisefenona J.....	118
FIGURA 4.76- Espectro de RMN ¹ H - (600 MHz; MeOH)- Composto 6	120

FIGURA 4.77- Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- Composto 6	121
FIGURA 4.78 - Mapa de contorno HMBC- Composto 6	122
FIGURA 4.79 - Espectro de massas- Estrutura 6 (LC-MS)	123
FIGURA 4.80 Proposta de Fragmentos para o Composto 6	123
FIGURA 4.81 – Estrutura química Griseofenona K	124
FIGURA 4.82- Espectro de RMN ¹ H – (600 MHz ;MeOH) do Composto 7	126
FIGURA 4.83- Mapa de contorno COSY (600 MHz; MeOH)- Composto 7	127
FIGURA 4.84 -Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- Composto 7	128
FIGURA 4-85- Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH) e sua ampliação na região dos aromáticos - Composto 7	129
FIGURA 4.86 –Estrutura química da Griseofenona L	130
FIGURA 4.87- Espectro de RMN ¹ H – (600 MHz; MeOH) Composto 8	132
FIGURA 4.88- Mapa de contorno COSY (600MHz; MeOH)- Composto 8	133
FIGURA 4.89- Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- Composto 8	134
FIGURA 4.90- Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH) e sua ampliação na região dos aromáticos - Composto 8	135
FIGURA 4.91- Gráfico crescimento radial (cm ²) da Phytophthora versus dias.....	137
FIGURA 4.92 Fotos do crescimento da <i>Phytophthora nicotianae</i> em meio sólido de cenoura e milho (A) meio e <i>P. nicotianae</i> (B) meio com o patógeno e o extrato de acetato de etila de <i>M.levispora</i> (c) idem a griseofulvina.....	137

Resumo

“ESTUDO BIOGUIADO DO FUNGO MEMNONIELLA LEVISPORA: BUSCA POR METABÓLITOS SECUNDÁRIOS INIBIDORES DA PHYTOPHTORA NICOTIANAE.”:

Dentre as várias doenças que atacam os citros em todo o mundo, a gomose, causada por espécies do gênero *Phytophthora* se encontra entre as mais importantes. Dentre as espécies, a que se destaca é a *Phytophthora nicotianae*, mais severa aqui no Brasil. Devido ao fato do patógeno produzir estruturas resistentes no solo, a exclusão é o melhor método de controle. Existem outras maneiras preventivas, como é o exemplo do uso de fungicidas sintéticos que auxiliam nesse combate, no entanto, o uso indiscriminado do mesmo, pode favorecer o surgimento de linhagens resistentes ao princípio ativo, além de ser prejudicial ao meio ambiente. Neste contexto, um dos fungos sapróbios (*Memnoniella levispora*) encontrado no semi-árido brasileiro tem recebido atenção especial como agente de controle biológico que demonstra ser um método alternativo e eficaz. Sendo assim, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito do crescimento do fungo em meio sólido e líquido em cinco diferentes meios de cultivo, realizar isolamento e identificação de metabólitos provenientes do meio mais propício e posteriormente submetê-los a testes do crescimento micelial da *P. nicotianae*. Para isso, foi feito o crescimento de *M. levispora* no meios de Batata Dextrose (BD), BD suplementada com 1% de extrato de levedura (BDL), BD suplementado com 1% de extrato de malte (BDM), Czapeck (CZA), e cenoura e milho (CM). Após um comparativo por HPLC-DAD, HPLC-UV e RMN desses extratos, o CM demonstrou ser o mais produtivo. Por apresentar bons resultados este extrato foi reproduzido em escala ampliada em meio líquido. Após partição e fracionamento desse material, os extratos foram analisados e testados biologicamente frente ao crescimento micelial da *Phytophthora*, afim de se realizar um estudo biomonitorado. O fração acetato de etila do meio líquido de cenoura e milho, foi o que inibiu consideravelmente o crescimento do patógeno. Assim, através da técnica LC-SPE-NMR em conjunto com as demais técnicas citadas, foi possível identificar e isolar 8 metabólitos secundários dessa fração, sendo eles griseofulvina e análogos, dos quais 3 propõe-se ser inéditas. O teste de inibição do crescimento micelial da *Phytophthora nicotianae* foi refeito e a griseofulvina apresentou resultado satisfatório de 72% de inibição que nos leva à pesquisar sobre a atividade antifúngica desta e dos outros metabólitos secundários no combate à *P. nicotianae* e a outros patógenos.

Astract

"BIO-GUIDE STUDY OF THE FUNGUS *MEMNONIELLA LEVISPORA* : SEARCH FOR SECONDARY METABOLITES INHIBITORS OF *PHYTOPHTORA NICOTIANAE*" Among the various diseases which attack citrus worldwide, the gummosis is caused by species of the genus *Phytophthora*. The various species present in the literature, the most severe in Brazil is *P. nicotianae*. This pathogen produces resistance's structures in the soil, thus the best control method is the exclusion. There are other ways to preventive, as is the case of the use of synthetic fungicides which help in the combat, however , the widespread use thereof, can favor the emergence of resistant strains to the active ingredient , as well as being damaging to the environment. In this context, one of saprobes fungi (*Memnoniella levispora*) found in the Brazilian semi -arid region, has received special attention as a biological control agent that proves to be an alternative and effective method. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of the growth of this fungus in solid and liquid, through five different culture media (PD, PDY, PDM, CZA, CC), perform isolation and identification of metabolites from the most suitable means and then submit them to the mycelial growth tests of the *P. nicotianae*. After a comparative by HPLC-DAD, HPLC-UV and NMR of this media, the CC proved to be the most productive. For showing good results this medium was reproduced on a large scale in liquid medium. After partitioning and fragmentation of the material, the extracts were analyzed and biologically tested against mycelial growth of *P. nicotianae*, in order to realize a biomonitored study. The fraction of ethyl acetate liquid of the carrot and corn medium, was considerably inhibited the pathogen growth. Therefore, by the technique LC-SPE-NMR along with the other techniques mentioned, it was possible to identify and isolate eight structures of this fraction, which griseofulvina and analogues, 3 of which purports to be unpublished yet. The Griseofulvin was tested and showed about 72% of the inhibition of mycelial growth of *Phytophthora*, which leads us to research on the antifungal activity of this and other secondary metabolites in the fight against *P. nicotianae* and other pathogens

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Citricultura e sua importância econômica.....	21
1.2	Ameaças a citricultura	23
1.3	A Gomose	23
1.4	Patógeno – <i>Phytophthora</i>	24
1.5	Contaminação	25
1.6	Sintomas	27
1.7	Controle.....	28
1.7.1	Controle alternativo.....	29
1.7.1.1	Controle biológico	29
1.8	Fungos sapróbios.....	30
1.8.1	<i>Memnoniella levispora</i>	30
1.9	Justificativa.....	32
2	OBJETIVOS.....	34
3	Parte experimental.....	36
3.1	Materiais.....	36
3.1.1	Solventes.....	36
3.1.2	Cromatografia	36
3.1.3	Coluna para GC/MS	36
3.1.4	Detectores	36
3.1.5	Filtros.....	36
3.1.6	Papel de Filtro.....	37
3.1.7	Materiais utilizados para identificação, cultivo e conservação do micro-organismo	37
3.1.7.1	Cultivo do fungo	37
3.2	Equipamentos	37
3.2.1	Evaporadores rotativos.....	38
3.2.2	Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).....	38
3.2.3	Espectrômetro de Massas (LC-MS).....	38
3.2.4	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	38
3.2.5	Cromatógrafo gasoso (GC/MS)	39
3.2.6	HPLC-SPE-NMR	39
3.2.7	Ultra-turrax.....	39
3.2.8	Balança.....	39
3.2.9	Câmara de Fluxo Laminar	39
3.2.10	Autoclaves Verticais	40

3.2.11	Estufa Incubadora (B.O.D.)	40
3.2.12	Banho de Ultra-som:.....	40
3.3	Procedimento experimental.....	40
3.3.1	Isolados do fungo <i>Memnoniella levispora</i>	40
3.3.2	Avaliação do crescimento micelial de <i>M. levispora</i> em diferentes meios de cultura	40
3.3.2.1	Cultivo do fungo Meio líquido	40
3.3.2.2	Cultivo do fungo em meio sólido	42
3.3.3	Metodologia para micro extração.....	42
3.3.4	Metodologia para cromatografia líquida de alta eficiência- HPLC analítico.	43
3.3.4.1	Varredura em diferentes comprimentos de onda	43
3.3.4.2	Escolha do melhor comprimento de onda	43
3.3.5	Crescimento do fungo em escala ampliada para o estudo químico.....	44
3.3.5.1	Preparação dos extratos	45
3.3.6	Ensaio biológicos dos extratos frente ao crescimento micelial	45
3.3.7	Metodologia para extração em fase sólida (SPE)	46
3.3.8	Comparação do perfil químico por GC-MS.....	47
3.3.9	Análise do perfil químico LC-MS.....	48
3.3.10	Análise do perfil químico através da técnica LC- SPE-NMR	48
3.3.11	Separação Isolamento e identificação dos metabólitos.....	49
4	Resultados e Discussões.....	51
4.1	Avaliação da produção metabólica do fungo <i>Memnoniella levispora</i> em diferentes meios de cultura	51
4.2	Perfil cromatográfico para escolha do melhor comprimento de onda HPCL-DAD	51
4.3	Escolha do meio de cultivo.....	52
4.3.1	Análises do Meio de cultivo Batata Dextrose (BD)	52
4.3.1.1	Meio líquido.....	52
4.3.1.2	Meio sólido.....	54
4.3.2	Análises do Meio de cultivo Batata Dextrose suplementado com 1% de extrato levedura (BDL).....	56
4.3.2.1	Meio líquido.....	56
4.3.3	Meio Sólido.....	58
4.4	Análises do Meio de cultivo Batata Dextrose suplementado com 1% de malte (BDM).....	59
4.4.1	Meio líquido	59
4.4.2	Meio Sólido.....	60
4.4.3	Análises do Meio de cultivo Czapeck (CZA)	62

4.4.3.1	Meio líquido.....	62
4.4.3.2	Meio Sólido	63
4.4.4	Análises do Meio de cultivo Cenoura e Milho (CM)	64
4.4.4.1	Meio líquido.....	64
4.4.4.2	Meio Sólido	66
4.5	Comparação entre os meios sólidos e líquidos em diferentes meios de cultura 67	
4.6	Cultivo do fungo <i>Memnoniella levispora</i> em escala ampliada	68
4.6.1	Ensaio biológico dos extratos- Frente ao crescimento micelial.....	69
4.6.2	Preparo de amostra - Metodologia para extração fase sólida (SPE)	71
4.7	Perfil químico em diferentes técnicas espectroscópicas	72
4.7.1	Perfil químico HPLC-UV	73
4.7.2	Perfil químico GC-MS	73
4.7.3	Perfil químico LC-MS.....	74
4.7.4	Análise do perfil químico por LC-SPE-NMR	75
4.8	Separação e isolamento das substâncias	77
4.9	Identificação estrutural dos metabólitos isolados	78
4.9.1	Classe das Griseofulvinas	78
4.9.1.1	Elucidação estrutural da Substância 1	79
4.9.1.2	Identificação estrutural da substância 2	87
4.9.1.3	Identificação estrutural substância 3	96
4.9.1.4	Identificação estrutural da substância 4	104
4.9.1.5	Elucidação estrutural substância 5.....	112
4.9.1.6	Identificação estrutural substância 6	118
4.9.1.7	Identificação estrutural substância 7	124
4.9.1.1	Identificação estrutural substância 8.....	130
4.9.2	Ensaio biológico dos isolados - Frente ao crescimento micelial	136
5	Conclusão.....	139
6	Referencias Bibliográficas	141

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Citricultura e sua importância econômica

A citricultura ocupa uma posição bastante significativa na produção e cultivo de frutas no contexto mundial da agricultura (ZULIAN, 2013). Os citros são as espécies frutíferas mais plantadas em todo o planeta. Os maiores produtores de frutas cítricas são China (20,4%), Brasil (18,6%) e EUA (9%) (percentagens comparadas à produção global de cada país) (TURRA, et al., 2014). Durante a safra de 2011, a produção mundial de citros atingiu cerca de 104 milhões de toneladas (IBGE, 2013), superior à produção das principais frutíferas como uva (7,1t), banana (5,3), manga (5,1) e maçã (4,7) TABELA 1.1, que se originou da extensa área cultivada (7,4 milhões de ha) (FAOSTA, 2013).

TABELA 1-1 - Produção dos principais grupos de frutas

Frutas	2008		2009		2010		2011	
	Milhões t	%						
Citros	122,088	21,3	122,369	20,6	123,794	19,86	104,339	16,35
Bananas	90,705	15,8	97,378	16,4	102,114	16,38	106,542	16,70
Maçãs	69,604	12,2	71,287	12,0	69,569	11,16	75,638	11,86
Uvas	67,709	11,8	67,557	11,4	68,311	10,96	69,654	10,92
Outros	222,301	38,9	235,663	39,7	259,483	41,63	281,691	44,16
Total	572,407	100,0	594,254	100,0	623,271	100,0	637,864	100,0

Fonte: adaptado (FAO, 2013)

No âmbito nacional, em 2011 a área ocupada com frutas cítricas no Brasil foi de 919,5 mil ha (MAPA, 2007). A grande produção, principalmente de laranjas, garante ao nosso país o título de maior produtor de laranja e exportador mundial de suco de laranja, seguido dos países Estados Unidos e China como mostrado na

TABELA 1-2- Produção Mundial de Laranja (Milhões de toneladas)

	2007	2008	20091	2010	2011	2012
Brasil	18.685	18.538	17.618	18.503	19.811	18.155
Estados Unidos	6.917	9.140	8.280	7.477	8.079	7.955
China	3.689	4.191	4.864	5.003	6.213	6.600
Índia	4.267	4.860	5.201	5.996	5.319	-
México	4.248	4.297	4.193	4.051	4.079	3.600
Espanha	2.740	3.410	2.617	3.120	2.825	2.684
Egito	2.054	2.138	2.372	2.401	2.578	2.350

Fonte: adaptado (FAO, 2013)

O cultivo de laranja é realizado em quase todas as regiões do país em virtude das condições favoráveis de clima e solo necessárias para essa cultura. Destacam-se dentre essas regiões os seguintes estados: São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Sergipe (IBGE, 2013). Só o estado de São Paulo, o maior produtor do país, conta com 77,9% da participação na produção nacional, o que significa uma produção de 15.293.506 t (375,0 milhões de caixas de laranja) (NEVES, 2010).

A cultura dos citros é umas das mais importantes para nosso país sob ponto de vista econômico e social. No âmbito econômico, o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio nacional do setor em 2010, foi de cerca de US\$ 4 bilhões de dólares (IBGE 2012). Além da laranja e do suco da laranja, a pectina e os óleos essenciais também fazem parte dessa receita econômica, pois uma é utilizada na alimentação animal (principalmente de bovinos) e o outro é um subproduto da produção de suco (TAKITA, et al., 2007). Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDCI, 2012), o Brasil apresentou no ano de 2011 um volume total exportado de mais de 24 milhões de quilogramas de óleo essencial (valor maior que US\$ 128 milhões). O resultado desse montante é a criação de aproximadamente 5,6 milhões de empregos diretos e indiretos, o que corresponde a quase 1/3 da mão de obra agrícola nacional. Além da criação de empregos, este setor tem grande impacto na formação de capital, na geração de renda, na agregação de valor e também, no desenvolvimento regional, que reflete diretamente no âmbito social (ZULIAN, 2013). No entanto, conforme apresentado na TABELA 1.1 houve diminuição significativa de 8,4% na produção de laranja, desencadeados pelas ameaças que a citricultura nacional vem sofrendo (TURRA, et al., 2014).

1.2 Ameaças a citricultura

Devido à importância da citricultura para o setor agrícola nacional, questões envolvendo fatores que afetam a produção deste gênero se tornam muito relevantes. Além da fertilidade do solo, clima, irrigação, combinação copa/porta-enxerto e os problemas fitossanitários (MELO, et al., 2006) os citros também sofrem ameaças causadas por doenças e pragas. Atualmente existem descritas mais de 35 doenças de importância econômica, que além de gerar grandes perdas financeiras, comprometem a segurança alimentar e do ambiente. Em São Paulo a situação é crítica. Se analisado o período de janeiro a março de 2013, houve um decréscimo de 19% na produção e uma diminuição de 11,8% na área total ocupada por laranjas neste período no estado, em virtude desses problemas (IBGE 2013). Calcula-se que mais de 300 pragas e doenças estiveram e ainda ameaçam os pomares paulistas, gerando uma perda anual de cerca de 78 milhões de caixas de laranja (Neves 2012).

As doenças mais comuns nos citros são causadas por fungos (tais como verrugose, melanose, rubelose, mancha preta e mancha marrom de alternaria), por vírus e viróides (tristeza, leprose e exocorte) e bactérias (cancro cítrico, clorose variegada dos citros e huanglongbing - HLB, ex-greening). Além das doenças citadas há também a ocorrência da gomose dos citros causada por um oomiceto, que ataca as raízes e o tronco próximo ao solo e que representa um dos principais problemas enfrentados pelos citricultores nacionais (IAC, 2014) que será a doença foco dessa dissertação.

1.3 A Gomose

A gomose, ou podridão-do-pé como também é conhecida, é causada por várias espécies do gênero *Phytophthora*. Sendo considerada uma das doenças mais antigas dos citros. Historicamente, o surgimento da gomose incitadas por *Phytophthora* data-se do século X no sudoeste da Europa (península ibérica) (HERCULANO, et al., 2003). No entanto, foi nas ilhas Açores em 1835 onde ocorreu a primeira grande epidemia, que essa doença tomou proporções maiores alastrando-se por toda a Europa, passando para Portugal (1845), Espanha, sul da França (1851), norte da Itália (1855) e finalmente atingindo a Grécia. No continente

Americano, a doença foi relatada pela primeira vez na Califórnia, em 1875, porém foi na Florida que houve o surto de gomose. Chegou ao Brasil tardiamente em 1917 (SAVITA, et al., 2012). Nessa época, era comum a utilização do porta-enxerto laranja azeda (*Citrus aurantium*), resistente a *Phytophthora* spp (MEDINA FILHO, 2004). No entanto, devido à intolerância ao vírus causador da tristeza dos citros (doença bastante destruidora da época), substituiu-se o porta enxerto usado, pelo porta enxerto limão Cravo (*Citrus limonia Osbeck*), mais susceptível aos oomicetos. Tal substituição levou a um aumento na incidência e severidade dos danos causados por esse patógeno. Estes oomicetos causam perdas na produção em todas as regiões produtoras de frutas cítricas do mundo, isto é, atacam as plantas de regiões áridas até as tropicais (WHITESIDE, 1993). Os danos podem ocorrer em todas as fases de produção de citros, desde o viveiro, passando pelo pomar, em fase de pré-colheita e de pós-colheita. Atualmente a gomose é apontada com uma das doenças “fúngicas” mais importantes do nosso país, devido aos danos econômicos provocados por esse oomiceto. Estima-se que os prejuízos alcançam 10 a 30% na produção mundial de laranja, o que acarreta em perdas de milhões de dólares, visto que a doença ataca todas as fases do desenvolvimento da planta (BASSAN, et al., 2010). Além disso, é importante ressaltar, que as espécies de *Phytophthora* não se restringem apenas aos citros, podendo desenvolver gomose em plantações de soja, tomates, batatas, entre outras, apresentando-se como uma praga não só para os citricultores mais para os demais produtores agrícolas (COSTAMILAN, et al., 2013).

1.4 Patógeno – *Phytophthora*

De origem grega, o termo phyto (planta) phtora (destruição), significa “destruição da planta”, termo esse associado aos sintomas de “podridão” que desenvolve na planta após a infecção. Embora já tenham sido descritas cerca de 100 espécies desse patógeno na literatura (ÉRSEK, et al., 2010), no Brasil as principais são a *P. citrophthora* Smith & Smith e *P. nicotianae* Breda de Haan (*Syn P. parasitica*) Watherh, sendo esta última a mais severa em relação às perdas econômicas (BASSAN, et al., 2010). É muito comum encontrá-las na maioria dos viveiros e pomares comerciais, favorecidos pelas condições climáticas ideais para a

infecção e desenvolvimento da doença (FEICHTENBERGER E, 2001). Dentre os fatores que contribuem para o sucesso desses oomicetos em regiões tropicais estão: temperaturas quentes constantes, períodos extensos de alta umidade e pluviosidade freqüente (LUDOWICI, et al., 2013).

Utilizando parâmetros genotípicos e fenotípicos o gênero *Phytophthora* foi recentemente reclassificado como pertencente ao reino Stramaenopila (FEICHTENBERG, et al., 2005). Uma das características distintivas que levou para essa nova classificação é a parede celular constituída de celulose, deixando, portanto, de ser classificado como fungo. Além disso, esses oomicetos não são capazes de sintetizar esteróis, apresentam fase vegetativa diplóide e os micélios possuem formato cenocítico (sem septo) (FIGURA 1.2) e hialino (MARTIN, et al., 2012).



FIGURA 1-1 - Imagem representativa de uma hifa cenocítica

1.5 Contaminação

As espécies de *Phytophthora* patógenas às plantas cítricas são disseminadas pelo solo, geralmente em locais úmidos com problemas de drenagem e aeração. A infecção inicia-se quando os esporos assexuais (zoósporos) [FIGURA 1.3 (A)] produzidos pelos esporângios “nadam” em distâncias curtas pelo movimento flagelar, ou são levados pela chuva e até mesmo pela água de irrigação para a zona de alongação das raízes, conforme mostrado na figura FIGURA 1.3B (SAVITA, et al., 2012) (ATTARD, et al., 2007). Pode ocorrer também a atração desses zoósporos por

nutrientes exsudados produzidos pela planta, quando a mesma sofre algum tipo de ferimento, podendo estes ser de ocorrências naturais (ex. pragas e raios) ou causadas pelo homem (ex. ferramentas de trabalho e fungicidas). Em condições de alta umidade, aeração e temperatura entre 21° e 30°C, o zoósporo vai de encontro com a planta onde ocorre à germinação. Uma vez obstruído o córtex, penetram na ponta da raiz e as hifas formam estruturas de resistências que invadem os tecidos mais susceptíveis (SAVITA, et al., 2012). Podem ainda encistar e desta forma, permanecem viáveis no solo por longos períodos (TIMMER 2000; MENGE, 1986 apud MEDINA FILHO, 2004), provocando o aparecimento dos sintomas iniciais da doença.



(A)



(B)

FIGURA 1-2:- (a) Zoósporo de phytophthora (B) Zona de alongação das raízes infectados por zoósporos.

Fonte: ATTARD et al 2007

1.6 Sintomas

São vários os sintomas que os citros apresentam após a infecção, que podem variar dependendo da espécie, da idade da planta e dos órgãos onde ocorre o ataque (FEICHTENBERGER E, 2001). Entre esses sintomas estão: lesões nas raízes, galhos, coloração pardacenta, exsudação de goma (FIGURA 1.4A) (origem ao nome gomose), podridões do colo e raízes (FIGURA 1.4B), clorose uniforme, progressiva e baixo desenvolvimento das folhas (KAUR, et al., 2014). Quando a lesão domina toda a circunferência do tronco (FIGURA 1.4C) a planta rapidamente entra em declínio em decorrência da destruição do floema (tecido encarregado por transportar seiva elabora pelo caule até outros órgãos de reserva), levando à planta a morte (MEDINA FILHO, 2004). Esses oomicetos podem ainda infectar sementes e causar podridões antes mesmo da germinação, comprometendo o estande das sementeiras. Em plântulas recém germinadas, ocorre o “damping off” ou tombamento, pois a infecção ocorre nos tecidos localizados na base do caulículo, como consequência há aparecimento de lesões deprimidas de coloração escura (FEICHTENBERG, 1989a). Os frutos também podem ser afetados, desenvolvendo assim doença que é conhecida como “podridão parda dos frutos” (FIGURA 1.4D) (BELTRAME, 2010).

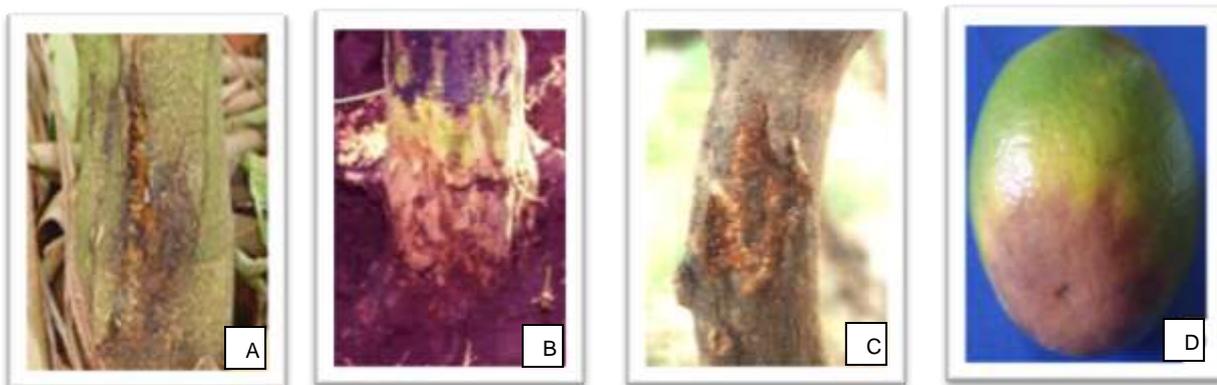


FIGURA 1-3- (a) Exsudação da goma na base do tronco (b) podridões do colo e raízes (c) Lesão no tronco - decorrente da destruição do floema (d) podridão parda

Fonte: Embrapa, 2008

1.7 Controle

O controle da *Phytophthora* é bastante difícil, pois esses oomicetos desenvolvem estruturas bastante resistentes, no entanto, podem ser realizadas algumas medidas preventivas e curativas (BASSAN et al., 2010), para tentar combater esse patógeno. Dentre as medidas fundamentais estão:

- Exclusão do patógeno e utilização de plantas saudáveis;
- Evitar o plantio em áreas de alta umidade ou que apresentem problemas de drenagem, devido à dependência de água na propagação da doença (IAC, 2014);
- Usar a resistência genética de porta-enxerto já existente ou obtida por programas de melhoramento, como por exemplo, *Poncirus trifoliata* cv *Rubidoux* e laranja azeda (XIAO, et al., 2013);
- Evitar ferimentos que possam servir como “porta de entrada” para os zoósporos; como os causados por pragas (larvas de *Naupactus*, cupins e cochonilhas de raiz e do tronco), implementos agrícolas (grades e enxadas,) e agroquímicos (fertilizantes nitrogenados) (IAC, 2014).

Apesar das medidas citadas, o método mais utilizado é o controle químico, que demonstra ser bastante eficiente no âmbito preventivo e curativo. Este é feito com fungicidas sistêmicos e específicos para oomicetos, como por exemplo, o oxiclóreto de cobre (Recop). Utiliza-se também os fosfitos, como fosetil-Al, e metalaxil (WANG, et al., 2013). No entanto, a aplicação indiscriminada de fungicidas nos pomares pode favorecer a seleção de linhagens resistentes do patógeno aos ingredientes ativos, aumentando o risco de contaminação ambiental e à saúde dos agricultores e consumidores (SCHWAN-ESTRADA, et al., 2010). Segundo relatório da Anvisa (2010), nossos alimentos estão com índices elevados de defensivos agrícolas e isto nos leva a pesquisar medidas menos agressivas de proteção das plantas contra as doenças, propiciando assim o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. Nesse contexto, as buscas por estratégias alternativas para a

redução e uso racional de defensivos se mostram urgentes, considerando os gastos e as perdas alcançadas pelos citricultores devido à gomose.

1.7.1 Controle alternativo

O controle alternativo engloba as medidas que não incluem o uso de fungicidas sintéticos clássicos, mas sim, o controle biológico. Nesse contexto, o controle biológico é uma alternativa viável para o combate de pragas, por apresentar vantagens em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, a especificidade e ao desenvolvimento de resistência.

1.7.1.1 Controle biológico

O conceito clássico de controle biológico é definido como “o controle de um microorganismo por outro microorganismo. Em outras palavras, é a manutenção do equilíbrio no ecossistema, com o auxílio da regulação de organismos vivos através de inimigos naturais, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema (SANTOS, et al., 2011).

A supressão de doenças mediadas por agentes de biocontrole é consequência das interações entre plantas, agentes patogênicos e a comunidade microbiana presente no ecossistema solo. Os princípios desse controle baseiam-se na relação antagônica entre microorganismos, como: predação, competição, amensalismo e parasitismos, outros competem por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos. Os fungos mais conhecidos que são usados no controle biológico pertencem ao gênero *Trichoderma*, que sugere o mecanismo de competição por nutrientes e amensalismo com a *Phytophthora*, porém outros já estão sendo relatados como os das espécies da ordem Sebaciales, *Piriformospora indica*, *Mucor ramosissimus*, *Penicillium oxalicum* e *Rhizopus sp.*, bem como os fungos promotores de crescimento como *Phoma sp.* e *Penicillium simplicissimum* (GARCES, et al., 200) (CHANDANIE, et al., 2006) (YANG, et al., 2008) (WALLER, et al., 2008).

Gusmão e colaboradores (2008) mostraram a presença de uma ampla diversidade de espécies na região do semi-árido nordestino e este conhecimento traz a possibilidade da identificação de fungos benéficos às plantas cultivadas no que se refere ao fenômeno de controle biológico. Dentre as espécies encontradas, os fungos sapróbios têm recebido uma atenção especial como indutores de resistência e agentes tradicionais de controle biológico (YEDIDIA et al., 2003).

1.8 Fungos sapróbios

Considerado o maior grupo dos fungos, os sapróbios, mais conhecidos como decompositores, crescem em meio de material orgânico morto e em decomposição, tais como árvores caídas, folhas, insetos e detritos de animais (WEIGUO, et al., 2013). Diferente dos fungos patogênicos, que causam doenças em plantas e animais, os fungos sapróbios, podem viver na natureza de forma inofensiva e benéfica, pois podem fornecer ao meio ambiente, minerais e nutrientes ao degradar o material orgânico. Vale ressaltar que se não ocorresse o processo de decomposição por esses fungos, os nutrientes demorariam muito tempo a retornar ao meio ambiente, o que impediria o desenvolvimento de novos organismos. Além disso, sem a ação desses microorganismos seria impossível habitar nosso planeta, pois estaríamos cobertos de lixo, corpos mortos, e com um solo extremamente pobre, no qual nenhum tipo de vegetação sobreviveria. Essa classe de fungos desempenha papel importante também no ciclo de nutrição, especialmente no ciclo de nitrogênio, excretando enzimas hidrolíticas, incluindo proteinases, celulase, laccase e assim por diante, necessários para a manutenção do equilíbrio do ecossistema (WEIGUO, et al., 2013). Um desses fungos sapróbios que está chamando a atenção dos pesquisadores, encontrado no semi-árido brasileiro pela Rede SISBIOTA, é o *Memnoniella levispora* o qual é objeto principal do estudo descrito nessa dissertação.

1.8.1 *Memnoniella levispora*

As espécies do gênero *Memnoniella spp.* apresentam similaridade morfológicas e fisiologias, com as espécies do gênero *Stachybotrys* (BARRON, 1968). Ambos vivem como sapróbios (SUBRAMANIAN, 1957), ou seja, alimentam-se de material orgânico em decomposição e são encontrados em habitats naturais

como solo ou lixo. No entanto, o gênero *Memnoniella* apresenta diferenciação; os conídios são formados em massas mucilaginosas, enquanto o *Stachybotrys* forma conídios em longas cadeias (LEÃO-FERREIRA, et al., 2013). Pinruan e colaboradores (2004) elaboraram uma chave para 52 espécies de *Stachybotrys*, incluindo também espécies de *Memnoniella*. As duas espécies mais estudadas desse gênero são: *M. echinata* e *S. chartarum*. Ambas possuem potencial para degradar celulose e usá-la como fonte de carbono para o crescimento. Segundo a classificação taxonômica a espécie pertence:

- **Reino:** fungi,
- **Filo:** ascomycota,
- **Classe:** Sordariomiceto,
- **Ordem:** hypocreales,
- **Gênero:** *Memnoniella* spp.

Os conidióforos de *M. levispora* são de coloração castanha, 30–85 × 5–12,5 µm. Os conídios são solitários, constituídos por um corpo central com 1–2 células, com 3–7 ramificações; ramificações retas, divergentes, verrucosas, septadas, cilíndricas, ápices arredondados a truncados, de coloração castanha na base e, castanho clara no ápice, 27,5–95 × 7,5–10 µm (FIGURA 1.5) (A. GOND, 2013) . Sua cultura apresenta uma coloração verde escuro à negra com colônias exsudada dispersas, pulverulentas, com abundante esporulação. A espécie *Memnoniella levispora* foi reportado pela primeira vez em 1957 por Subramanian (SUBRAMANIAN, 1957) pela universidade de Madras na Índia, no entanto não há citações de estudos químicos. Esta espécie faz parte da coleção de fungos sapróbios isolados do semi-árido nordestino, os quais estão depositados na CCMB (Coleção de Microrganismos da Bahia – www.uefs.br/ccmb/) situada na Universidade Estadual de Feira de Santana – BA, sendo uma coleção fiel depositária certificada pelo CGEN.



FIGURA 1-4: Imagem Ampliada dos conidóforos

Fonte: ATTARD, et al. 2007

1.9 Justificativa

A rede SISBIOTA, com que temos parceria, verificou através de testes qualitativos de cruz de malta e antagonismo direto que o fungo sapróbio *Memnoniella levispora* apresentou-se como promissor no controle biológico e combate à gomose.

Esses experimentos foram feitos testando 12 fungos sapróbios encontrados no semi-árido brasileiro frente ao crescimento micelial da *Phytophthora nicotianae*. Com os dados obtidos, o *Memnoniella levispora* destacou-se dentre todos, apresentando maior capacidade inibitória frente a esse patógeno (causador de grandes danos financeiros ao nosso país). Desta forma, por se tratar de um fungo nunca estudado, principalmente sob o ponto de vista químico, surge a necessidade de se entender melhor sobre seu metabolismo e a ação de seus isolados contra esse e outros fungos patógenos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste em realizar o estudo químico do fungo *M. levispora* e utilizar os metabólitos isolados no controle de *P. nicotianae* em citros.

Nesse sentido, os objetivos específicos envolvem:

- Cultivar em pequena escala o fungo *Memnoniella levispora* em meios líquido e sólido em cinco diferentes meios de cultura, para obtenção dos extratos brutos
- Cultivar o fungo *Memnoniella levispora* em escala ampliada, no meio que apresentar ser mais produtivo na produção de metabólitos secundários
- Avaliar sob o ponto de vista químico e biológico os extratos obtidos
- Realizar separação, isolamento e determinação estrutural dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo, através de técnicas cromatográficas e espectrométricas
- Submeter os metabólitos isolados aos ensaios de avaliação da atividade inibitória do crescimento micelial da *P. nicotianae*

Parte Experimental

3 Parte experimental

A parte experimental foi toda desenvolvida no laboratório de Produtos Naturais dentro do Departamento de química da - UFSCAr

3.1 Materiais

3.1.1 Solventes

- Solventes Grau HPLC: (Merck, Tedia, HoneyWell, J. T. Baker, Panreac)
- Solventes Deuterados para RMN: (Merck e Aldrich)
- Água ultrapura - Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka)

3.1.2 Cromatografia

-ZORBAX XDB - C18 - 4,6 x 150 mm, com partículas de 5 μ , da marca Agilent, acoplado com uma coluna de segurança C18 (4x3 mm)

3.1.3 Coluna para GC/MS

- Coluna DBX-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m)

3.1.4 Detectores

- UV-Vis Shimadzu SPD-10AV

3.1.5 Filtros

- Filtro de Seringa (PVDF), não estéril, 20 mm x 0,25 µm (Millipore®)

3.1.6 Papel de Filtro

- INLAB Tipo, porosidade 3,0 µm

3.1.7 Materiais utilizados para identificação, cultivo e conservação do micro-organismo

- Álcool 70%
- Água destilada
- Alça de platina
- Alça de Drigalski
- Bico de Bunsen
- Lâminas de bisturi
- Pinça;
- Funil analítico;
- Placas de Petri;
- Erlenmeyers

3.1.7.1 Cultivo do fungo

3.1.7.1.1 Meios de cultivo

- Czapeck (Himedia®)
- Batata Dextrose (Himedia®)
- Extrato de malte (Himedia®)
- Extrato de Levedura (Himedia®)
- Ágar (Himedia®)
- Cenoura e milho: orgânicos

3.2 Equipamentos

3.2.1 Evaporadores rotativos

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

3.2.2 Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)

Analítico

- Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Amostrador automático G1329A, e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A. Software: EZCromElite
- Shimadzu- modelo SPD – M10A com detector de arranjo de diodo (DAD)- Software:Class VP

3.2.3 Espectrômetro de Massas (LC-MS)

- API (Applied Biosystems) 2000 com analisador “triplo quadrupolo”, fonte de ionização por elétron-spray (ESI).

3.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

- Bruker DRX - 9,8 T (400 MHz para RMN 1H), equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®)
- Bruker Avance III - 14,1 T (600 MHz para RMN 1H), equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI (1H/13C/15N) de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching) sonda BBI de 5 mm com ATMA®

3.2.5 Cromatógrafo gasoso (GC/MS)

- Shimadzu GC-17a com Software para processamento dos dados: GC/MS Real Time Analysis

3.2.6 HPLC-SPE-NMR

- Agilent modelo 1200 equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A, detector: DAD, acoplado a uma unidade Pospeck 2 constituída de :
 - ✓ Bomba extra (K120 Knaeur Smartline Pump Control 100, Bruker Daltonik),
 - ✓ Organizador no qual os frascos usados nos cartuchos de SPE com solventes deuterados e não deuterados são alocados,
 - ✓ Unidade trocadora automática de cartuchos (ACE- automatic Cartridges EXchanger. Bruker Biospin GmbH ©),
 - ✓ Unidade de Stopped-flow (BSFU-HP- Bruker Stopped Flow Unit- High performance Bruker Biospin GmbH ©
 - ✓ Válvulas Valco
- Software: HyStar 2.3 (Bruker)

3.2.7 Ultra-turrax

- T 25 ULTRA-TURRAX® (IKA)

3.2.8 Balança

- Balança Analítica - Sartorius modelo BP 210S

3.2.9 Câmara de Fluxo Laminar

- Veco VL FS-12M

3.2.10 Autoclaves Verticais

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

3.2.11 Estufa Incubadora (B.O.D.)

- Fanem – 347 CD

3.2.12 Banho de Ultra-som:

- Branson 1510, Danburcy, CT

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Isolados do fungo *Memnoniella levispora*

Os fungos sapróbios preservados em método de Castellani foram nos cedido, pelo CCMB (Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia- www.uefs.br/ccmb/), situada na Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

3.3.2 Avaliação do crescimento micelial de *M. levispora* em diferentes meios de cultura

3.3.2.1 Cultivo do fungo Meio líquido

Para avaliar a influência do meio de cultura líquido sobre os isolados de *M. levispora*, foram utilizados os meios listados na TABELA 3.1;

TABELA 3-1 Tabela dos nutrientes do meio de cultivo para o crescimento do fungo

Meios de cultivo
Batata Dextrose (BD)
Batata Dextrose suplementado com 1% de levedura (BDL)
Batata Dextrose suplementado com 1% de malte (BDM)
Czapeck (CZA)
Cenoura e Milho (CM); 30 g L-1 de milho, 30 g L-1 de cenoura

Os fungos que estavam preservados em Castellani foram reativados em placas de petri contendo o meio de BDA (esterilizados). Para isso um disco de 5mm desse fungo foi inoculado no centro da placa e este foi repicado, foram feitas triplicadas e um delas foi submetido à análise em microscópio, afim de certificar que apresentava estrutura idêntica ao esperado para a espécie.

Uma vez certificado que as colônias estavam puras, continuou-se o repique e crescimento da mesma, ainda em placas de contendo meio BDA. Após 21 dias de incubação a 25°C, foi realizado o inóculo do fungo em meio líquido. Para isso, dois discos de 5 mm de diâmetro da colônia foram transferidos assepticamente para 3 erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL de água destilada e os meios de cultura BD, BDL, BDM, CZAPECK pesados separadamente. Para o preparo do meio de cenoura, esses vegetais frescos foram obtidos e ralados manualmente em ralador de metal convencional, e em seguida pesados. Um erlenmeyer para o branco também foi preparado, contendo apenas o meio de cultura sem o fungo. Todos os meios de cultivo corretamente pesados e misturados à água, foram previamente autoclavados antes da transferência dos discos do fungo aos erlenmeyers. Após 21 dias de incubação, foi realizada a separação do micélio da parte líquida, através da filtração a vácuo, utilizando-se papel de filtro. O micélio foi seco em capelas de exaustão e pesados em balanças analíticas. O meio líquido fermentado foi submetido à partição líquido-líquido, 3x com acetato de etila e posteriormente butanol. Os solventes orgânicos foram evaporados em rotaevaporadores, fornecendo os extratos de acetato de etila, butanólico e hidroalcolico e seus respectivos brancos. O solvente foi

devidamente rotulado e enviado para descarte. Após serem concentrados, os extratos foram analisados por HPLC e RMN.

3.3.2.2 Cultivo do fungo em meio sólido

Paralelamente ao crescimento do fungo em meio líquido, foi realizado o mesmo experimento para meio sólido, adicionando-se o ingrediente ágar. Um disco de aproximadamente 5 mm do isolado (previamente reativado) foi transferido assepticamente para 3 placas de petri contendo 20ml do respectivo meio (BD, BDL, BDM, CZAPECK, CM) e ágar, previamente autoclavados e deixados sob temperatura de 25°C. Para o branco, foi vertido apenas o meio de cultura e ágar, sem adição do fungo. Em seguida foi realizado o processo de micro extração descrito abaixo

3.3.3 Metodologia para micro extração

Após 21 dias de incubação, foram retirados 3 discos de 5 mm de cada meio. transferidos para eppendorfs. Para representar uma variabilidade da análise, foi retirado um disco do centro da colônia, outro da parte intermediária e por fim um entre a zona de intersecção entre o fim da colônia e o meio de cultivo (FIGURA 3.1). Em seguida, foi adicionado 500 µL de uma mistura de 1:2:3 metanol/diclorometano/acetato de etila, agitou-se por aproximadamente 90s em vortex e posteriormente testou-se duas maneiras diferentes de extração, uma com 90s de ultraturrax, e outra com 60 minutos de ultrassom. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, separou a parte líquida remanescente e filtrou-se com membrana PVDF (filtro 15 mm e poro de 0,20 µm). As amostras foram secas em capelas de exaustão e ressuspensas em 500 µL de uma mistura 1:9 H₂O/ACN e analisadas por HPLC e RMN.

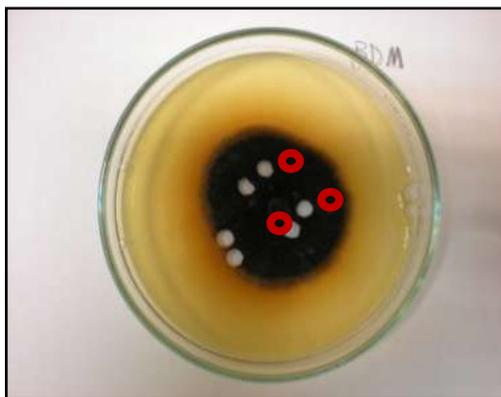


FIGURA 3.1: Foto da região de recorte dos discos do fungo.

3.3.4 Metodologia para cromatografia líquida de alta eficiência- HPLC analítico.

3.3.4.1 Varredura em diferentes comprimentos de onda

O screening do perfil cromatográfico do fungo foi feito inicialmente em um cromatógrafo líquido Shimadzu- modelo SPD – M10A com detector de arranjo de diodo (DAD) no modo reverso de eluição e sistema de gradiente exploratório. A corrida cromatográfica iniciava-se com 5% de solvente orgânico (ACN) e 95% de H₂O e após 40 minutos, 100% de solvente orgânico. Utilizou-se para esta análise uma coluna analítica C18- zorbax eclipse e XDB- analítica 4.6 X 150 mm, 5 microm.

Realizou-se uma varredura de comprimentos de onda que se iniciava em 200nm e atingia o máximo em 800nm. Três comprimentos de ondas neste intervalo foram selecionados (253, 284, 325), para análises posteriores no HPLC-UV.

3.3.4.2 Escolha do melhor comprimento de onda

A análise do perfil cromatográfico do fungo foi feita, comparando-se o perfil do meio da cultura com o fungo com aquele mesmo meio no qual não foi adicionado o microorganismo. Essa análise foi feita utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência 1260 – Agilent Technologie, no modo reverso de eluição, cujo princípio da retenção baseia-se na hidrofobia e na interação entre a parte não polar do soluto e a

fase estacionária (CASS, et al., 2009). Para a análise utilizou-se uma com coluna C18- zorbax eclipse e XDB- analytical 4.6 X 150 mm 5 microm e fase móvel uma mistura de água (A) Acetonitrila (B), conforme mostrado na TABELA 3.2 abaixo, acidificado com 0.1% de ácido fórmico e fluxo de 0,5/min. O volume de injeção dos extratos foi de 20µl e concentração de 1mg/ml. DETECTOR DE UV: comprimento de onda ajustado para 254nm

TABELA 3.2: Sistema de eluição HPLC-UV.

Tempo (min)	0	5	15	20	30	35	37	50
Porcentagem (%) A	95	95	70	55	40	0	95	95
Porcentagem (%) B	5	5	30	45	60	100	5	5

3.3.5 Crescimento do fungo em escala ampliada para o estudo químico.

O fungo *M. levispora* foi cultivado em meio líquido de cenoura e milho em escala ampliada para a obtenção do extrato bruto. O cultivo foi feito em Erlenmeyers de 1000 ml, os quais foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C, sob pressão de 1 atm por aproximadamente 20 minutos com o meio de cultura. Para o preparo do meio de cenoura e milho, seguiu-se o mesmo procedimento discutido na seção 3.3.2.1. Em seguida foram adicionados aos frascos 3 discos de 5 mm de diâmetro das extremidades da colônia. A escolha da retirada do disco da extremidade foi baseada na atividade que esta zona apresenta quando comparada com as zonas mais ao centro (antigas), isso se deve ao fato do crescimento das hifas ocorrerem apenas nas extremidades, podendo as zonas mais antigas estarem livres do conteúdo citoplasmático. Esse material permaneceu estático, sob temperatura controlada de 25°C. Após o período de crescimento (21 dias) foi realizada a extração do fungo conforme descrito abaixo no procedimento 3.3.5.1 preparação dos extratos.

3.3.5.1 Preparação dos extratos

Conforme ilustrado na FIGURA 3.2, os extratos foram obtidos através da filtração à vácuo e posterior partição líquido-líquido da amostra resultante em 3.3.5.

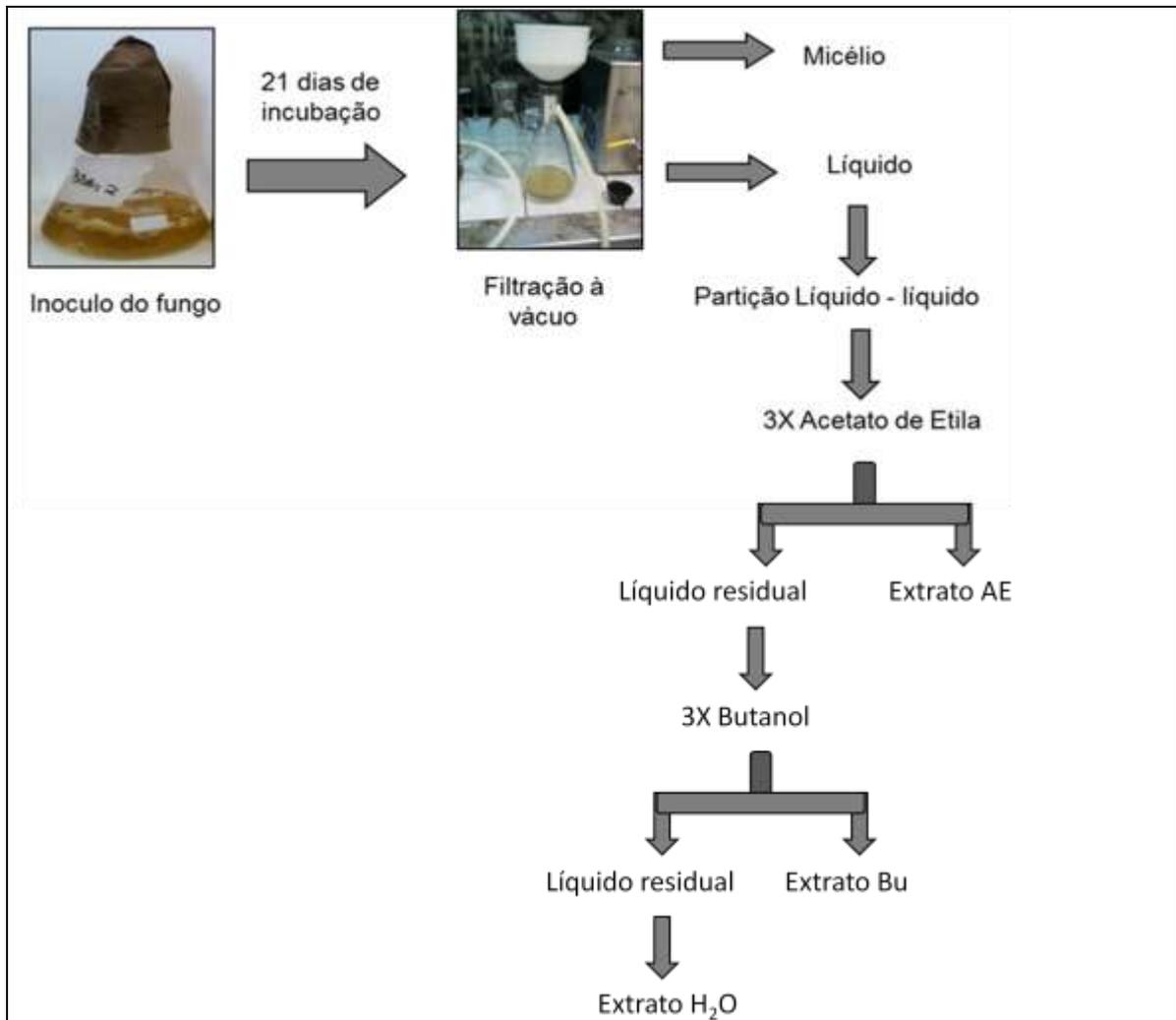


FIGURA 3.2: Fluxograma Procedimento Experimental

Foi obtido um total de 6 extratos, sendo eles: Extrato Acetato de Etila (AE): + Branco AE, Extrato Butanólico (BU): + Branco BU, Extrato Hidroalcolico (HOH):+ Branco HOH, que foram submetidos a ensaios biológicos e analisados através das técnicas espectroscópicas.

3.3.6 Ensaios biológicos dos extratos frente ao crescimento micelial

Foi realizado o teste dos extratos obtidos anteriormente frente ao crescimento micelial da *Phytophthora nicotianae* em placas de Petri. Pesou-se aproximadamente 60 mg de cada extrato (Ext. AcOEt, AE, Ext. BU, e) e solubilizados em 1 ml de DMSO. Em seguida foram adicionados a 60 ml de meio de cultura composto de cenoura, milho e Ágar. Verteu-se a mistura em 3 placas de Petri, e após alguns minutos, foi inoculado no centro da placa o fungo *Phytophthora nicotianae*. Paralelamente foi feito o branco procedendo da mesma forma, no entanto, sem adição dos extratos. Após 7 dias de incubação sob temperatura de 25°C, sem agitação, foram feitas medidas radiais para verificar qual o extrato que mais havia inibido o crescimento do patógeno.

3.3.7 Metodologia para extração em fase sólida (SPE)

O processo de extração em fase sólida, foi realizada com o auxílio de cartuchos C18-ml/500mg - octadecil - marca Chromabond, seguindo o procedimento estabelecido para pré tratamento de amostra (CALDAS, et al., 2011), descrito nas etapas abaixo (FIGURA 3.3).

Etapa 1- Condicionamento do sorvente: Destina-se a ativação do sorvente, além de eluir alguma impureza residual do cartucho. (O solvente utilizado nessa etapa depende principalmente do tipo de sorvente que esta sendo utilizado)

Etapa 2- Aplicação da amostra: Retêm os compostos de interesse e descarta os possíveis interferentes na eluição.

Etapa 3- Limpeza ou clean up: Elimina os interferentes menos retidos, provenientes da matriz que possam causar interferência no método analítico (o solvente utilizado nessa etapa, tem força para a retirada do interferente sem remover o analíto de interesse.

Etapa 4- Eluição: Eluição do analíto de interesse retido no cartucho (é importante a escolha do eluente, pois ele deve romper a afinidade entre o analíto e a fase estacionária, sem que haja a eluição de interferentes que ficaram muito retidos.)

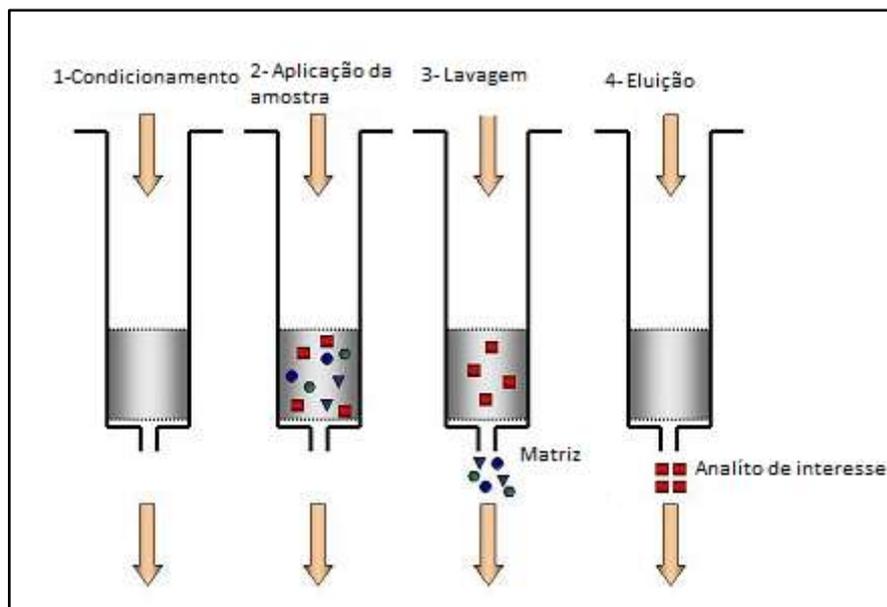


FIGURA 3.3: Ilustração das etapas de pré-tratamento em cartuchos de SPE

Os cartuchos utilizados no processo de extração em fase sólida foram ativados com 3 volumes de metanol (6 ml por volume), condicionados com 1 volume de água. O fluxo foi regulado para 1 gota por segundo. Em seguida aplicou-se aproximadamente 50mg (10% da capacidade máxima do cartucho) de amostra solubilizada em 6 ml de água e acetonitrila na proporção de 9:1, sendo aplicada de 2 em 2ml, com a finalidade de melhorar a retenção. Para a limpeza, utilizaram-se os seguintes sistemas de solvente: 6ml de água 100%, 6ml de 50% água 50% metanol e 6ml 100% metanol para a eluição dos analitos de interesse. A retirada do analito residual foi feita utilizando-se 6 ml de diclorometano.

3.3.8 Comparação do perfil químico por GC-MS

Para o estudo de espectrometria de massas e perfil de fragmentação dos metabólitos secundários mais voláteis, foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplada a um espectrômetro de massas. As condições utilizadas para essa análise foram: Temperatura de injeção: 250°C, modo de controle de fluxo: velocidade linear, pressão 93 kpa, fluxo da coluna 1.36 ml/min, faixa de detecção de massas 50-500 DA, modo de ionização: EI⁺ volume de injeção= 1µl concentração da amostra = 0,5 µg/ml. As condições utilizadas para elaboração da rampa, estão descritas na TABELA (3.3) abaixo

TABELA 3.3: Condições utilizadas para análises GC-MS.

Taxa	0	20	5
Temperatura final (°C)	80	180	310
Tempo de espera (min)	3	0	2

3.3.9 Análise do perfil químico LC-MS

O extrato de acetato de etila obtido (procedimento 3.3.5.1 pág. 45) foi submetido ao tratamento da amostra (procedimento 3.3.7 pág. 46) e analisados através da técnica de separação por cromatografia líquida, acoplado a um detector de espectrometria de massas. As condições estabelecidas para o método cromatográfico estão representadas na TABELA 3.3. Os solventes de arraste utilizados foram água (A)/ Acetonitrila (B), acidificado com 0,1% de ácido fórmico. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C-18 - 10 cm x 2.1 – com tamanho de partícula de 3 μ (Zorbax), volume de injeção: V. inj. = 5.00 μ l, concentração da amostra: 500 μ g/ml. Para a espectrometria de massa, utilizou-se uma fonte de ionização química por eletron spray (ESI), no modo positivo de eluição.

TABELA 3.4: Condições cromatográficas para análises LC-MS.

Tempo (min)	0	6	10	12	30	32	35	40	50
% A	90	90	70	65	35	0	0	75	25
% B	10	10	30	35	65	100	100	75	25

3.3.10 Análise do perfil químico através da técnica LC- SPE-NMR

Realizou-se a análise do perfil químico da fração de acetato de etila (já tratado) utilizando a técnica de HPLC hifenada a RMN. Esse tipo de técnica permite uma separação eficiente (HPLC-UV), posterior concentração dos analitos de interesse (SPE) e rápida identificação (RMN) desses metabólitos, proveniente de uma mistura complexa (EXARCHOU, et al., 2005).

Utilizou-se um volume de injeção de 15 µl da amostra que se encontrava em uma concentração de 60 mg/ml. As condições cromatográficas utilizadas em 3.3.4.2 pág 44 foram novamente otimizadas conforme demonstradas na tabela abaixo. As fases móveis foram acidificadas com 0,1% de TFA e sob uma vazão de 1 ml/min.

TABELA 3.5 Condições cromatográficas para análises no LC-SPE-NMR

Tempo (min)	0	5	40	41	51	52	57	61
Porcentagem (%) A	80	80	32	16	0	0	80	80
Porcentagem (%) B	20	20	68	84	100	100	20	20

Os cartuchos de SPE utilizados para trapear as bandas de interesse são constituídos da fase polivinil benzeno. Para o condicionamento utilizou-se ACN e em seguida água. Após o processo anterior, a secagem dos cartuchos foi feita com gás nitrogênio. O aprisionamento foi realizado no modo de operação de “threshold”, no qual foi ajustado para coletar a partir do comprimento de onda de 200 nm. Ao final destes procedimentos, os analitos foram ressuspensos em solvente deuterados e analisados no RMN 600 MHz.

3.3.11 Separação Isolamento e identificação dos metabólitos.

Para que houvesse a possibilidade de isolamento dos metabólitos com um grau de pureza considerável em um HPLC analítico, foram realizados testes da capacidade da coluna partindo-se das condições cromatográficas otimizadas no procedimento 3.3.4.2 pág 44. As concentrações testadas foram: 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml e 40mg/ml.

Resultados e discussões

4 Resultados e Discussões

4.1 Avaliação da produção metabólica do fungo *Memnoniella levispora* em diferentes meios de cultura

Os microorganismos necessitam de nutrientes para manterem-se vivos, promover o crescimento, substituir os constituintes celulares, suprir a demanda energética necessária para as reações metabólicas e promover o movimento celular.

Como são seres heterotróficos, ou seja, não produzem seu próprio alimento, torna-se necessário que o substrato forneça substâncias já elaboradas para sua alimentação. Sendo assim, retiram essas demandas nutricionais do próprio meio de cultura. No entanto, ao variar a composição do mesmo, um fungo pode comportar-se de maneira diferente. A mudança nesse fator pode influenciar no crescimento, esporulação e até mesmo na pigmentação do fungo.

Visando à produção de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Memnoniella levispora* em meios sólido e líquido, selecionou-se cinco diferentes meios de cultura diferentes, BD, BDL, BDM, CZAPECK, CM. Para certificar que os metabólitos encontrados em cada meio eram produzidos pelo fungo e não pelo meio de cultivo, foi feito um comparativo entre os extratos e seus respectivos brancos. As análises foram feitas comparando-se sinais nos espectros de RMN e o perfil cromatográfico do tempo de retenção de cada banda de absorção de UV (obtidos via HPLC-DAD e HPLC-UV).

4.2 Perfil cromatográfico para escolha do melhor comprimento de onda HPCL-DAD

Inicialmente não havia um comprimento de onda pré-determinado, pois por se tratar de uma espécie ainda não estudada e, assim, não se conhecida a classe de substâncias que o fungo produzia. Sendo necessário, portanto, a utilização de um detector de arranjo de diodo, para fazer uma varredura de comprimentos. Após testes realizados com todos os extratos, encontraram-se três comprimentos de onda que abrangiam uma quantidade maior de banda, sendo em 254 nm, 282 nm, 324nm. Conforme mostrado na FIGURA 4.1, o comprimento que apresentava o perfil mais

interessante foi o de 254nm e o escolhido para dar continuidade nas análises cromatográficas no HPLC-UV.

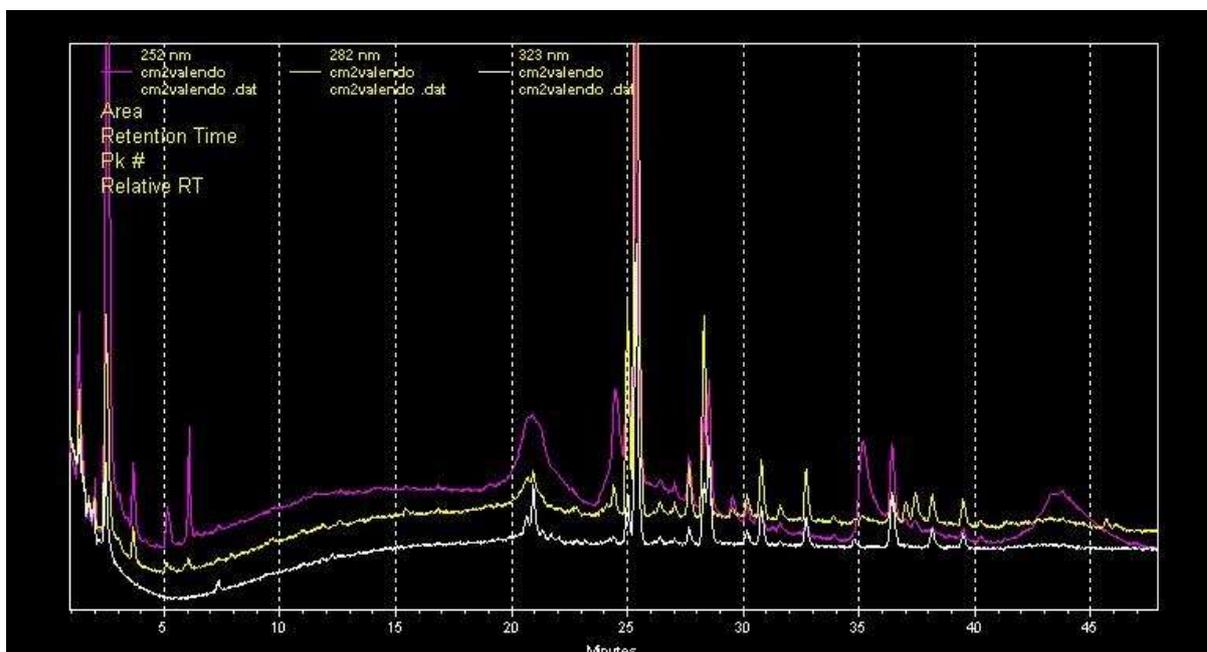


FIGURA 4.1- Cromatograma em gradiente exploratório do extrato de acetato de etila do *M. levispora* no meio de cenoura e milho em diferentes comprimentos de onda (HPLC-DAD).

4.3 Escolha do meio de cultivo

4.3.1 Análises do Meio de cultivo Batata Dextrose (BD)

4.3.1.1 Meio líquido

Conhecido por sua composição bem definida, o meio líquido de BD (FIGURA 4.2A) é normalmente utilizado para o isolamento e o crescimento de uma vasta gama de fungos em laboratórios. É feito basicamente de nutrientes proveniente da batata (carboidratos) e açúcar simples (dextrose). Com essa composição é possível fornecer ao fungo uma fonte de carbono. Observa-se na FIGURA 4.2B, que não houve um crescimento muito significativo do fungo neste meio. O micélio seco, separado anteriormente da parte líquida (FIGURA 4.3) apresentou massa de 0,34g.

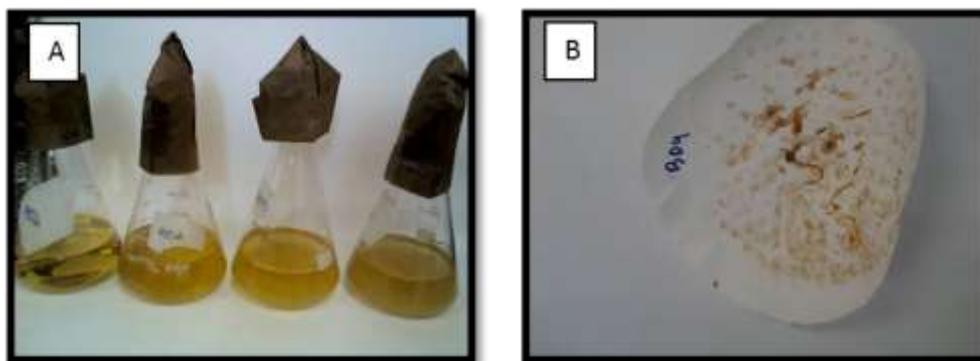


FIGURA 4 .2- a-) Fotos do crescimento de *M. levispora* em meio de cultivo líquido de BD; b) foto do micélio seco de BD.

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.3) dos extratos de BD obtidos apresentou, pequena diferenciação entre o Branco (meio sem fungo) e o meio com fungo. Conforme mostrado abaixo, há uma pequena diferenciação entre ambos, nota-se o desaparecimento do sinal próximo de δ_{H} 1,25, sugerindo assim o consumo pelo fungo de supostas estruturas metiladas, além de uma intensificação dos sinais próximos a δ_{H} 3,0 e em δ_{H} 4,5.

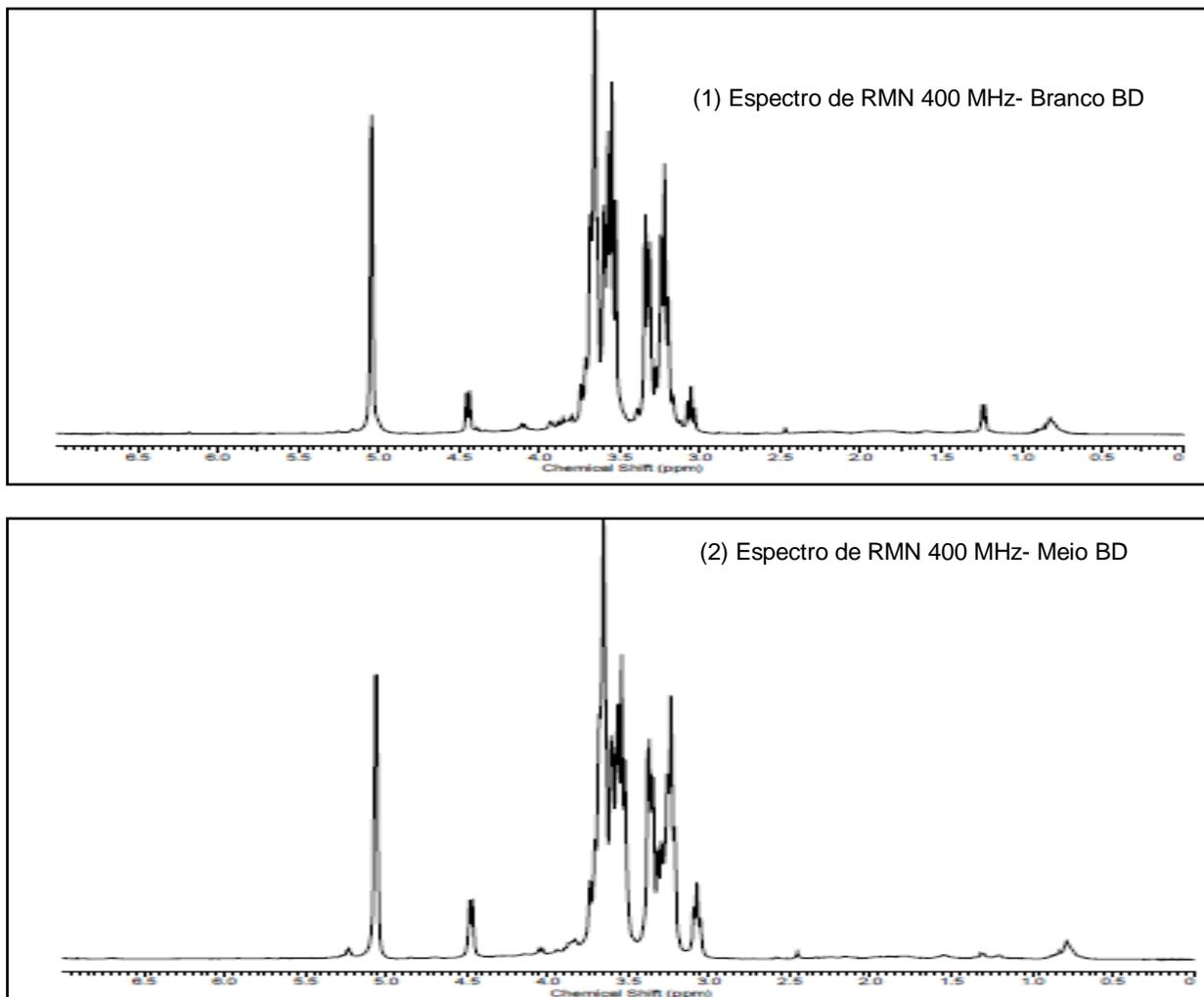


FIGURA 4.3 Espectro de RMN ^1H 400 MHz 1-) do extrato acetato de etila de *M.levispora* desenvolvido no meio BD 2-) do extrato acetato de etila do meio sem fungo

4.3.1.2 Meio sólido

Os meios sólidos foram preparados da mesma maneira que os meio líquidos, porém com a adição de Ágar (Ag). O Ágar é constituído por um carboidrato complexo extraído de algas marinhas que se solidifica em temperaturas abaixo de 45°C , ou seja, ingrediente responsável pelo aspecto “sólido” do meio.

Podemos notar através FIGURA 4.4 que a área do crescimento radial do micélio neste meio foi de aproximadamente 9.9 cm^2 , sugerindo baixo desenvolvimento do fungo.



FIGURA 4.4- Foto do crescimento de *M. levispora* em meio sólido BDAg.

O cromatograma em gradiente exploratório FIGURA 4.5 da sobreposição do extrato bruto em BDAg e o branco após o processo de micro extração, apresentou resultado similar ao crescimento em meio líquido, pequena diferenciação. Apenas três picos com diferentes absorbâncias e tempos de retenção (TR) variados, sugerindo uma polaridade de media à alta para os metabolitos produzidos pelo fungo e a ocorrência de diversidade metabólica para o fungo.

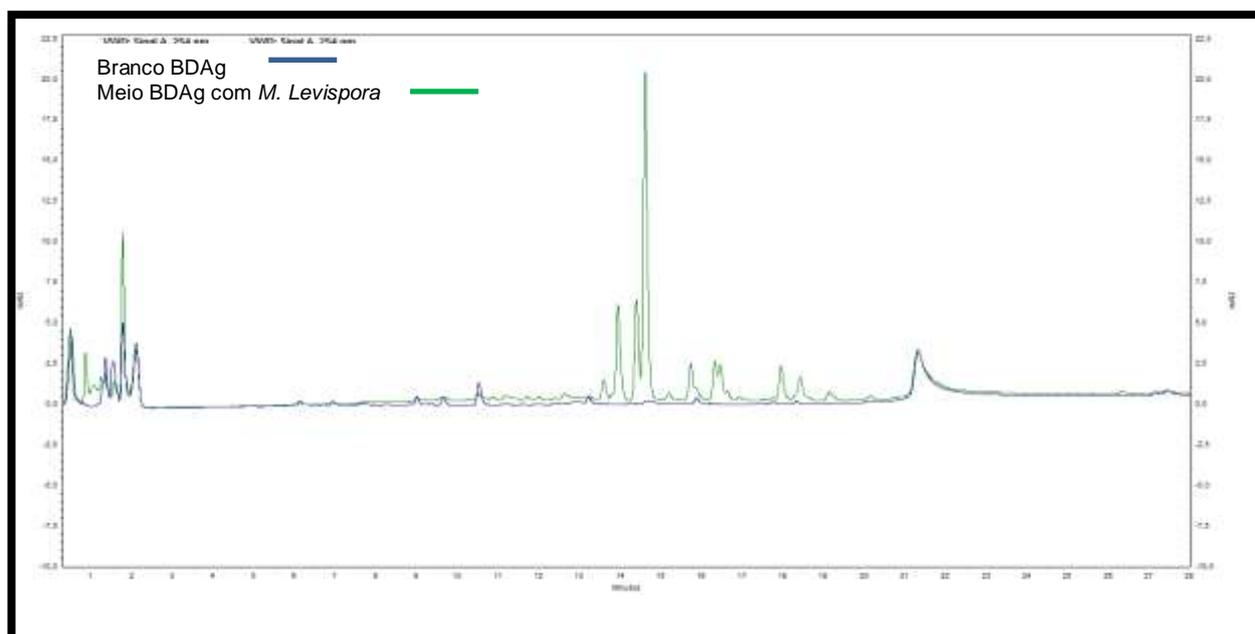


FIGURA 4.5- Sobreposição dos cromatogramas dos extratos de acetato de etilaa de *M. levispora* desenvolvido no meio de cultura BDAg (verde) e deste último sem a presença do fungo (azul) - HPLC-UV.

4.3.2 Análises do Meio de cultivo Batata Dextrose suplementado com 1% de extrato levedura (BDL)

4.3.2.1 Meio líquido

Por não ter os componentes químicos muito bem definidos, o meio líquido de BDL (FIGURA 4.6A) é considerado um meio complexo. Além de ser uma fonte de carbono provenientes dos nutrientes BD, este meio fornece ao fungo minerais, vitaminas B e nitrogênio orgânico, devido à suplementação com extrato de levedura.

Podemos notar uma mudança da coloração no meio na presença do fungo. A massa seca (FIGURA 4.6B) apresentou valor de 0,60 g (bem mais produtivo do que no meio apenas com Batata-Dextrose).

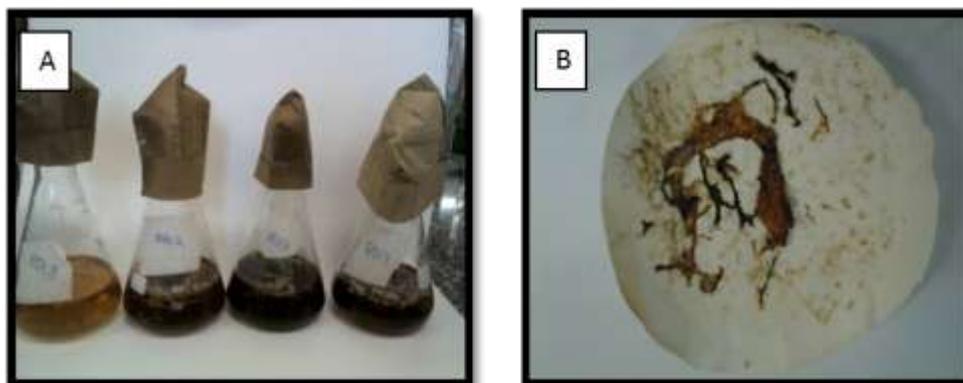


FIGURA 4.6- a-) Fotos do crescimento de *M. levispora* em meio de cultivo líquido de BD; b) foto do micélio seco de BD.

Nota-se através do espectro de RMN ^1H (BFIGURA 4.7) dos extratos de BDL, que o fungo consumiu uma quantidade significativa dos nutrientes presentes no meio, pois houve o desaparecimento de alguns sinais, tais como dubletos intenso na região de δ_{H} 1,3, diminuição no sinal em δ_{H} 1,6 e δ_{H} 5,7. Ao realizar a ampliação na região dos aromáticos a observação se repete com a diminuição na intensidade dos sinais em δ_{H} 7,5 e δ_{H} 8,0.

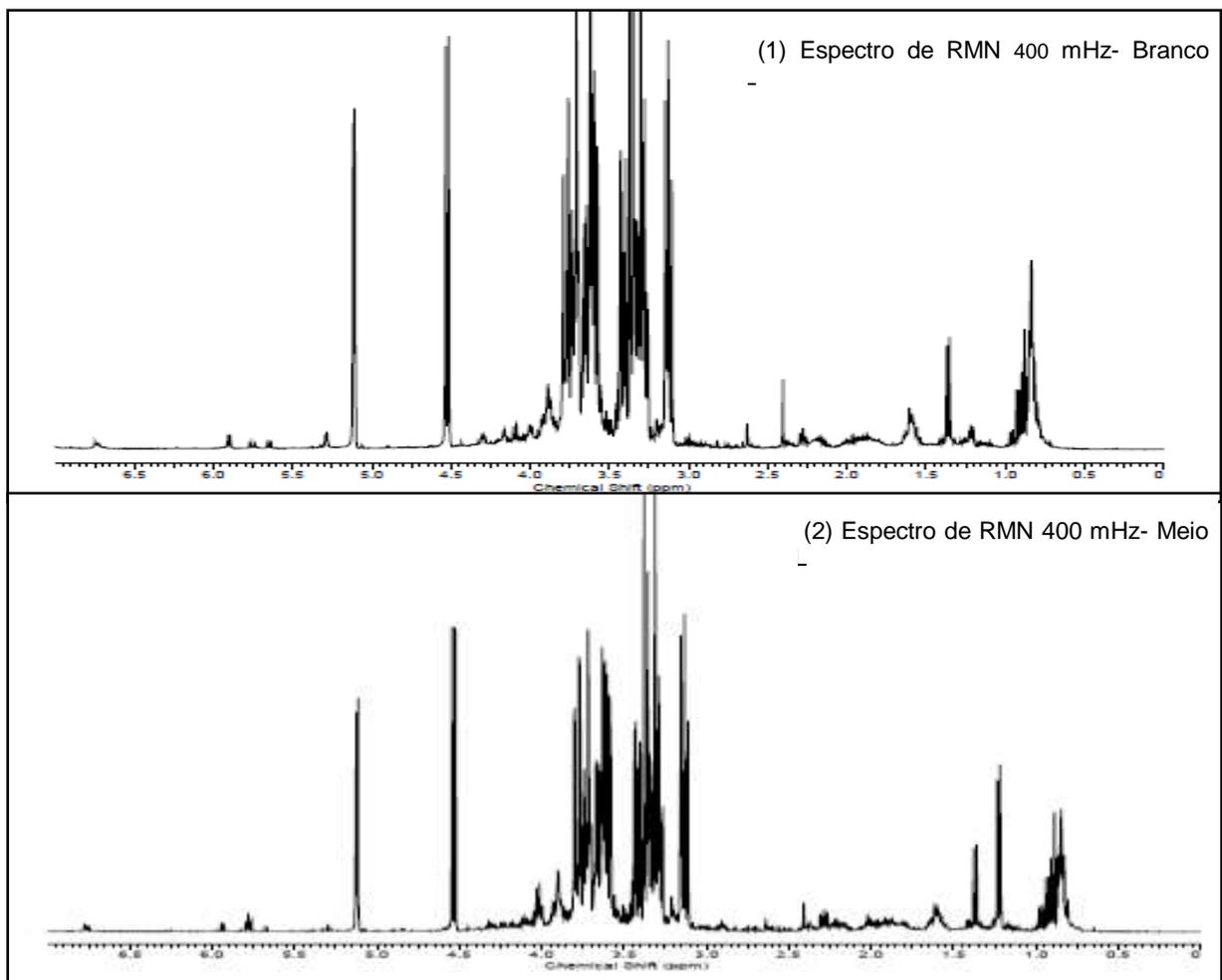


FIGURA 4-7- -Espectro de RMN ^1H 400 MHz 1-) de acetato de etila do meio BDL sem o fungo 2-) do extrato acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio BDL

4.3.3 Meio Sólido

Apesar de se obter um rendimento bom de massa micelial em meio líquido, o meio sólido suplementado com levedura não levou a um crescimento muito satisfatório, apresentando área de 9,8 cm², inferior ao obtido em BDLag.(FIGURA 4.8)



FIGURA 4 8- Foto do crescimento de *M. levispora* em meio sólido BLAG.

O cromatograma em gradiente exploratório FIGURA 4.9 da sobreposição do extrato BDLAg e o branco, apresentou diferenciação, com 4 bandas no UV bastante intensas e outras de baixa intensidade.

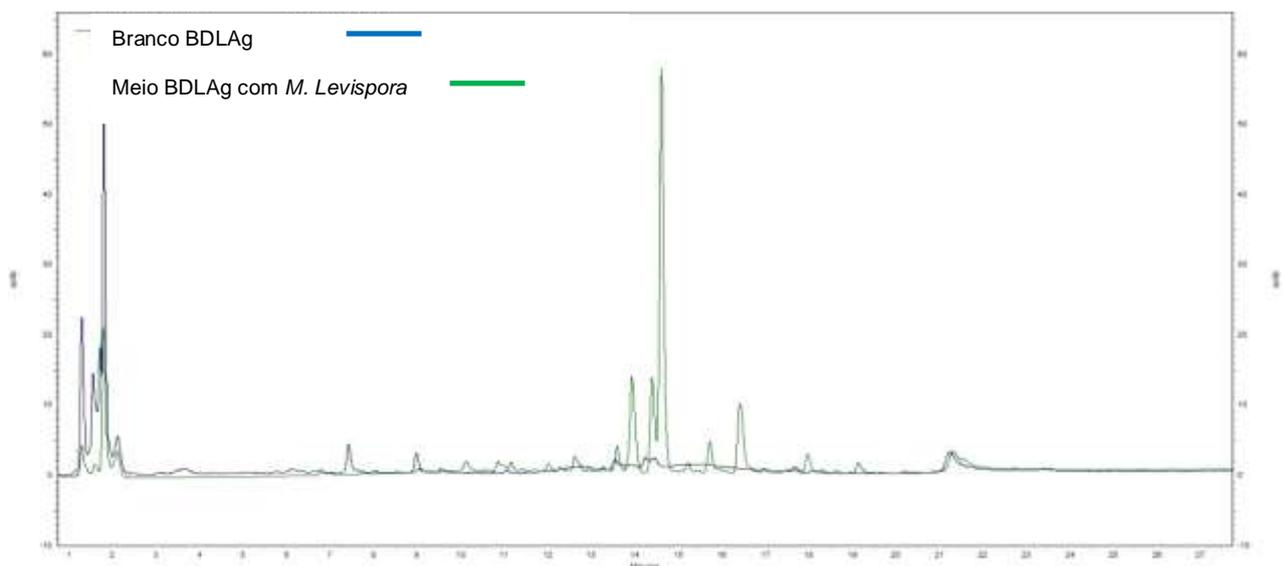


FIGURA 4.9- Sobreposição dos cromatogramas dos extratos de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio BDLAg (Verde) e deste último sem a presença do fungo (Azul) (HPLC-UV).

4.4 Análises do Meio de cultivo Batata Dextrose suplementado com 1% de malte (BDM)

4.4.1 Meio líquido

A parte líquida do meio de BDM (FIGURA 4.10A) suplementado com 1% de malte, também é considerado complexo, cuja composição é rica em carboidratos, peptonas e substâncias nitrogenadas, fornecendo ao fungo fontes de carbono e nitrogênio orgânico, além de outras vitaminas. O fungo desenvolveu-se bem neste meio, apresentando massa seca de micélio (após separação do meio líquido) á igual 0,53g (FIGURA 4.10B)

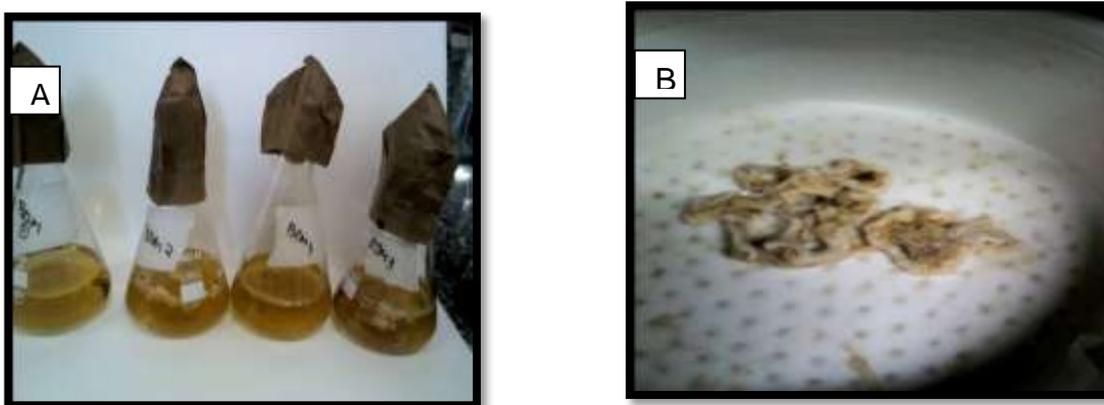


FIGURA 4.10- Fotos do crescimento de *M. levispora* em meio de cultivo líquido de BDM; b) foto do micélio seco de BDM.

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.11) dos extratos de BDM apresenta uma diminuição no sinal de dubletos na região de δ_{H} 1,25, e o surgimento de um sinal de baixa intensidade próximo a δ_{H} 5,0. Há também uma intensificação no singlete presente na região de δ_{H} 5,5

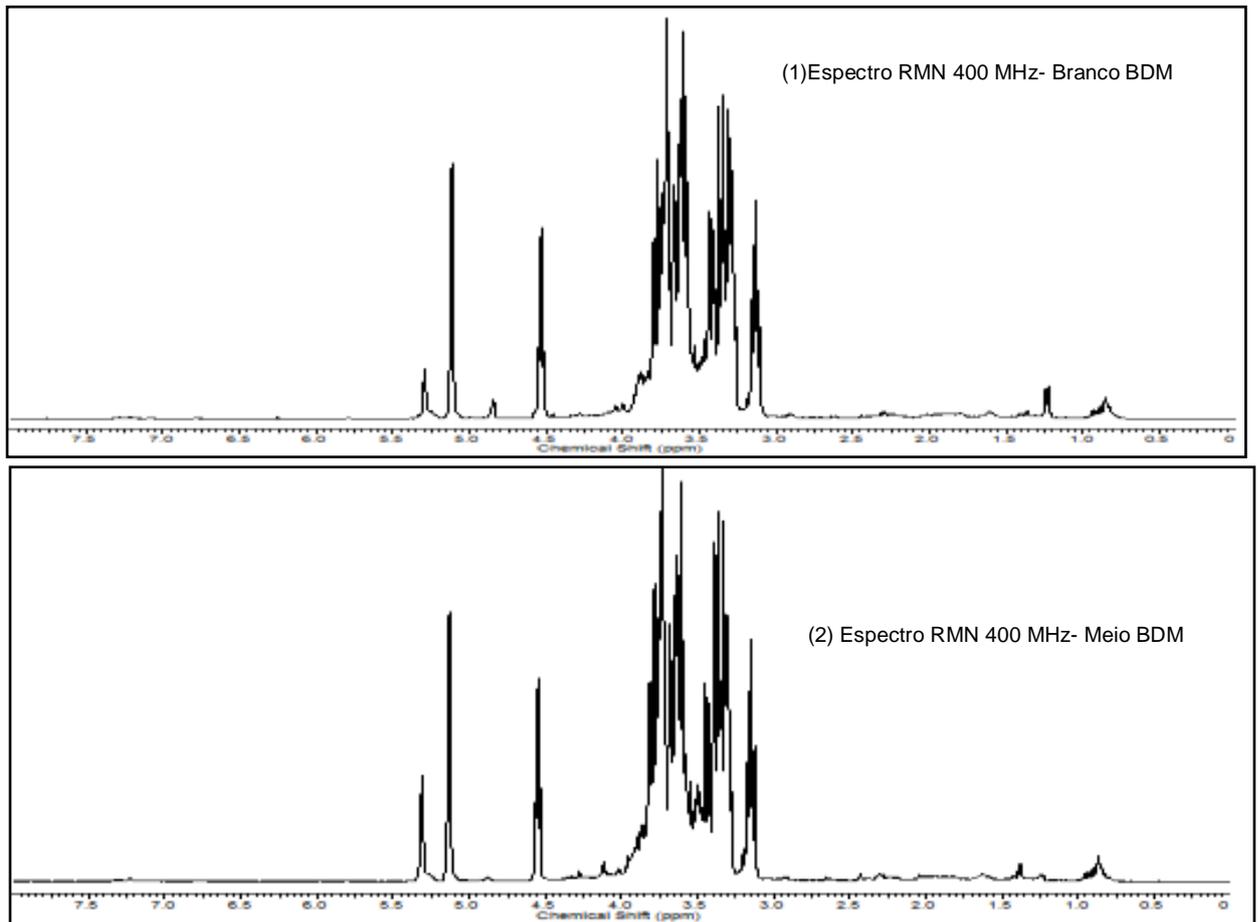


FIGURA 4.11- Espectro de RMN ¹H 400 MHz 2-) do extrato acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio BDM 1-) do extrato acetato de etila do meio sem fungo

4.4.2 Meio Sólido

O crescimento em meio sólido do fungo *M. levispora* em meio de BDMAg, apresentou área de crescimento micelial de 11,5 cm². Como é possível verificar na FIGURA 4.12, o micélio ainda exibe uma coloração escura, que sugere a possível produção de melanina pelo fungo. (FIGURA 4.12)

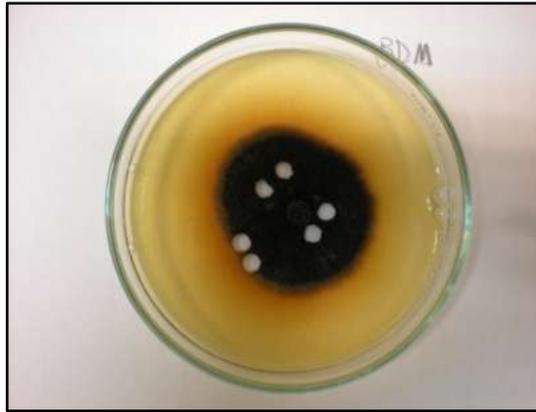


FIGURA 4.12- Foto do crescimento de *M. levispora* em meio sólido BDMag.

O cromatograma em gradiente exploratório (FIGURA 4.13) da sobreposição do extrato de BDM e o branco, apresentou pequena diferenciação, com três bandas de absorção no UV intensas e outras 4 bandas mais moderadas.

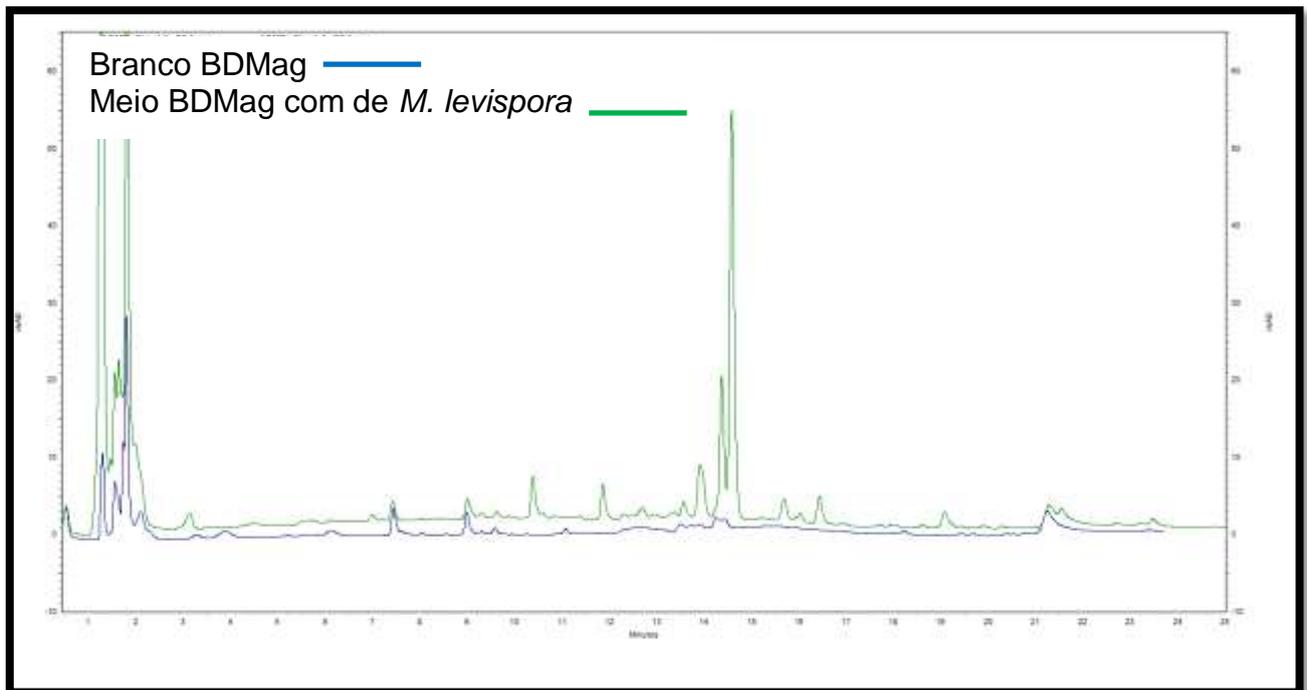


FIGURA 4.13 sobreposição dos cromatogramas dos extratos de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio BDMag (verde) e deste último sem a presença do fungo (azul)

4.4.3 Análises do Meio de cultivo Czapeck (CZA)

4.4.3.1 Meio líquido

A parte líquida do meio de CZA (FIGURA 4.14A), conhecido como um meio “bastante definido do ponto de vista químico, apresenta em sua composição nitrato de sódio, que atuam como fonte de nitrogênio orgânico. Apesar desses constituintes, nesse meio, o fungo apresentou o mais baixo rendimento de micélio seco dentre todos os testados (m= 0,15g) (FIGURA 4.14B).

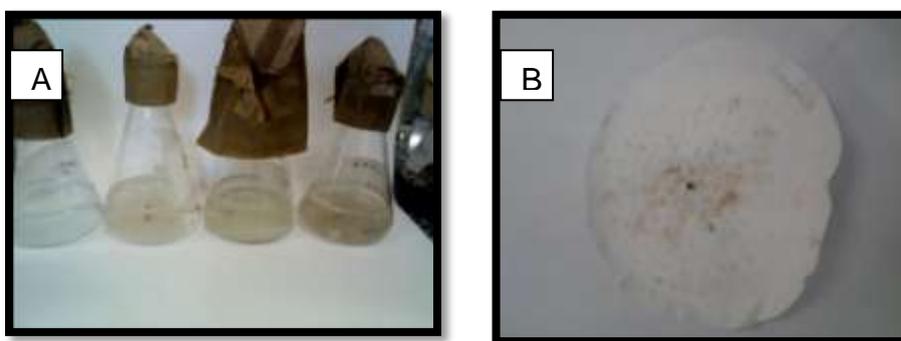


FIGURA 4.14- a-) Fotos do crescimento de *M. levispora* em meio de cultivo líquido de CZA; b) Foto do micélio seco de CZA.

Como esperado o meio Czapeck trata-se de um meio pobre se comparado aos demais, o espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.15) dos extratos não apresentou variação muito significativa. O fungo fez o consumo do meio, e assim o espectro do meio apresentou sinais ausentes.

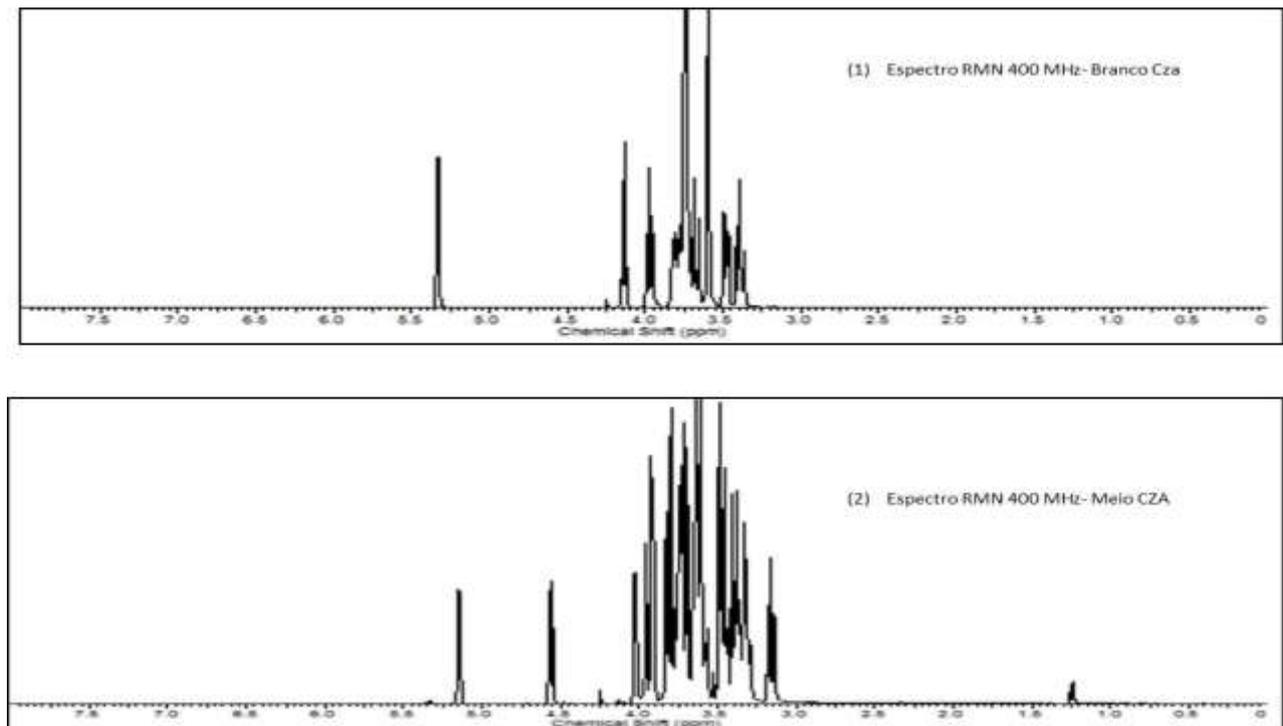


FIGURA 4.15- Espectro de RMN ^1H 400 MHz 2-) do extrato de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio de CZA; 1-) do extrato de acetato de etila do meio sem o fungo

4.4.3.2 Meio Sólido

o meio sólido levou a um rendimento baixo, apresentando crescimento em área de $8,3 \text{ cm}^2$ similar ao meio líquido (FIGURA 4.16)

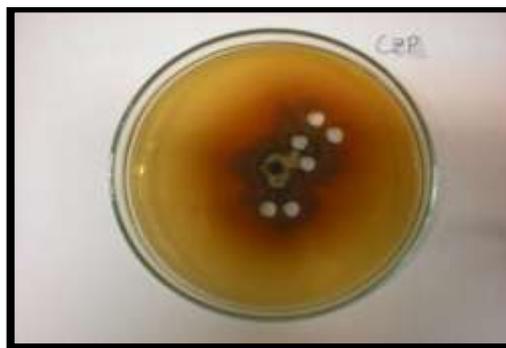


FIGURA 4.16- Foto do crescimento de *M. levispora* em meio sólido CZAa.

Mesmo com o resultado apresentado, o cromatograma em gradiente exploratório (FIGURA 4.17) da sobreposição do extrato bruto em CZA e o branco, apresentou diferenciação, com pelo menos 4 bandas no UV bastante intensas e outras de baixa absorção.

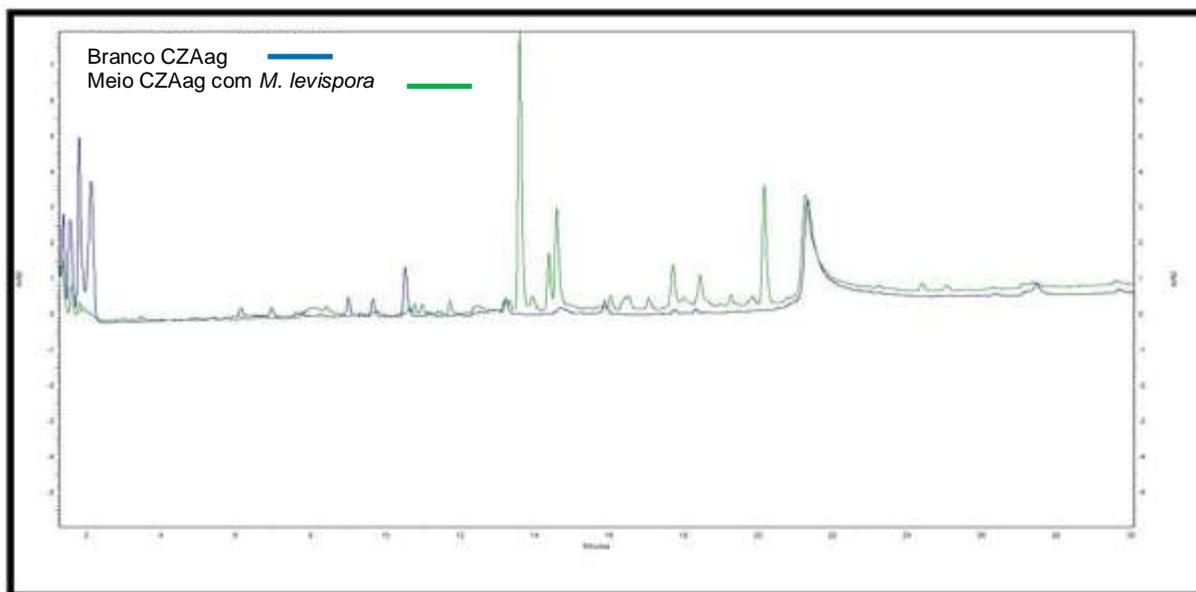


FIGURA 4. 17 – Sobreposição dos cromatogramas dos extratos de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio CZAag (verde) e deste último sem a presença do fungo (azul) - (HPLC-UV).

4.4.4 Análises do Meio de cultivo Cenoura e Milho (CM)

4.4.4.1 Meio líquido

O meio líquido de CM (FIGURA 4.18), rico em nutrientes e betacaroteno, foi visualmente o mais eficiente no crescimento e produção de metabólitos do fungo *M. levispora*. O desenvolvimento do micélio neste meio foi bastante significativo, apresentando um rendimento de massa seca de micélio de 0,89g (3X a mais que os demais meios) (FIGURA 4.18B), isto infere que este meio é o qual o fungo desenvolve melhor sua massa micelial



FIGURA 4.18- a-) Fotos do crescimento de *M. levispora* em meio de cultivo líquido de CM; b) foto do micélio.

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.19) do meio e cenoura milho com o fungo apresentou sinais em ampla região espectral (δ_{H} 0,5 a δ_{H} 8 ppm), apontando para a presença de substâncias aromáticas, além de hidrogênios olefinicos, carbinólicos e metílicos. A comparação entre os espectros do meio (branco) e este com o fungo mostra um perfil químico interessante de *M. levispora*.

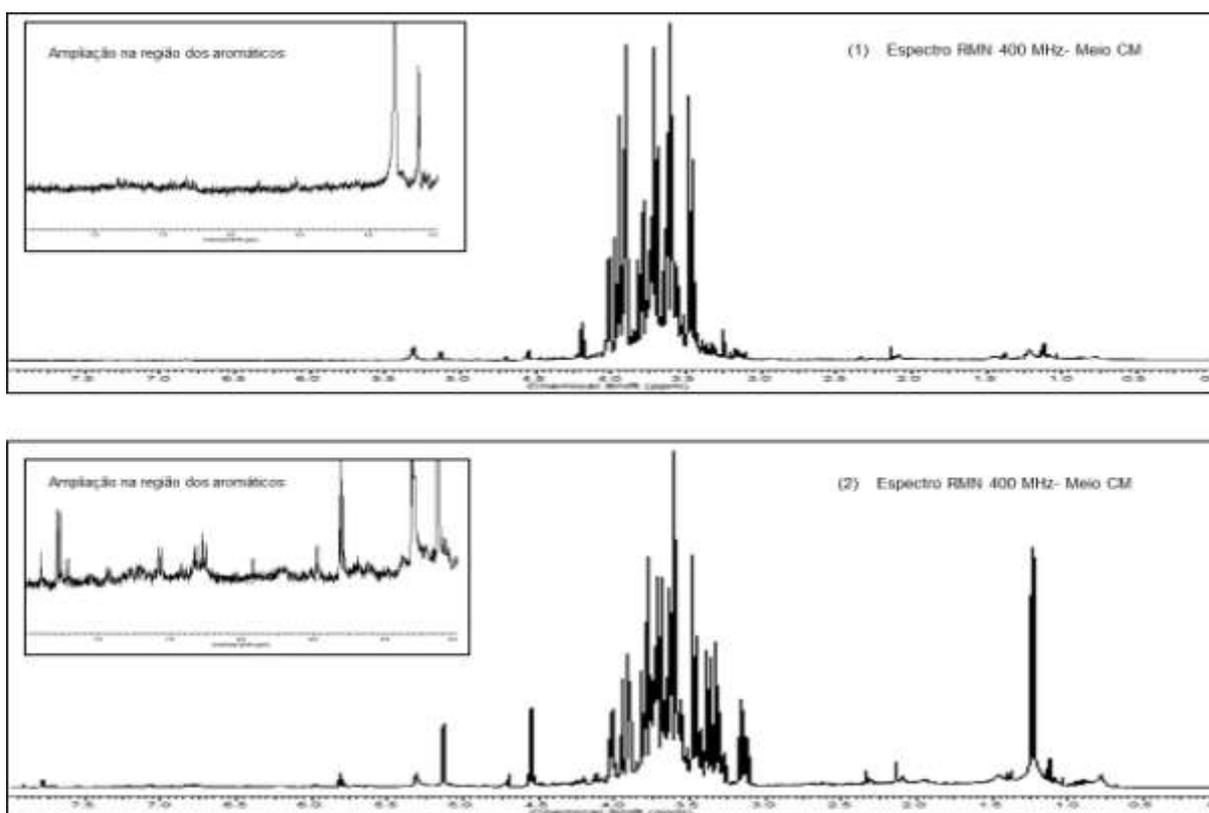


FIGURA 4.19 – Espectro de RMN ^1H 400 MHz 2-) do extrato acetato de etila de *M.levispora* desenvolvido no meio de CM; 1-) do extrato acetato de etila do meio sem fungo.

4.4.4.2 Meio Sólido

O meio de cenoura e milho Agar (CMAg) apresenta um coloração escura no crescimento do micélio, sugerindo a presença da produção de melanina . Este apresentou o melhor desenvolvimento do fungo dentre todos os meios sólidos testados, a área de micélio obtido para crescimento neste meio 41,11 cm², (recobrando quase que toda a área da placa de petri). (FIGURA 4.20)

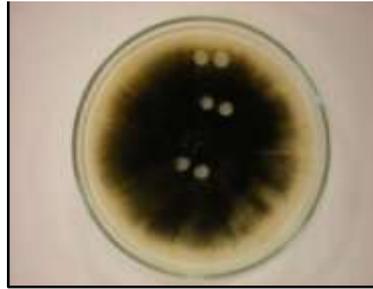


FIGURA 4.20- Foto de crescimento do fungo em meio sólido CMAg.

A sobreposição dos cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos de acetato de etila e *M. levispora* desenvolvido no meio de CM e deste sem o fungo, mostraram no primeiro 6 bandas no UV bastante intensas e outras com absorção mais baixas, indicando um perfil químico interessante

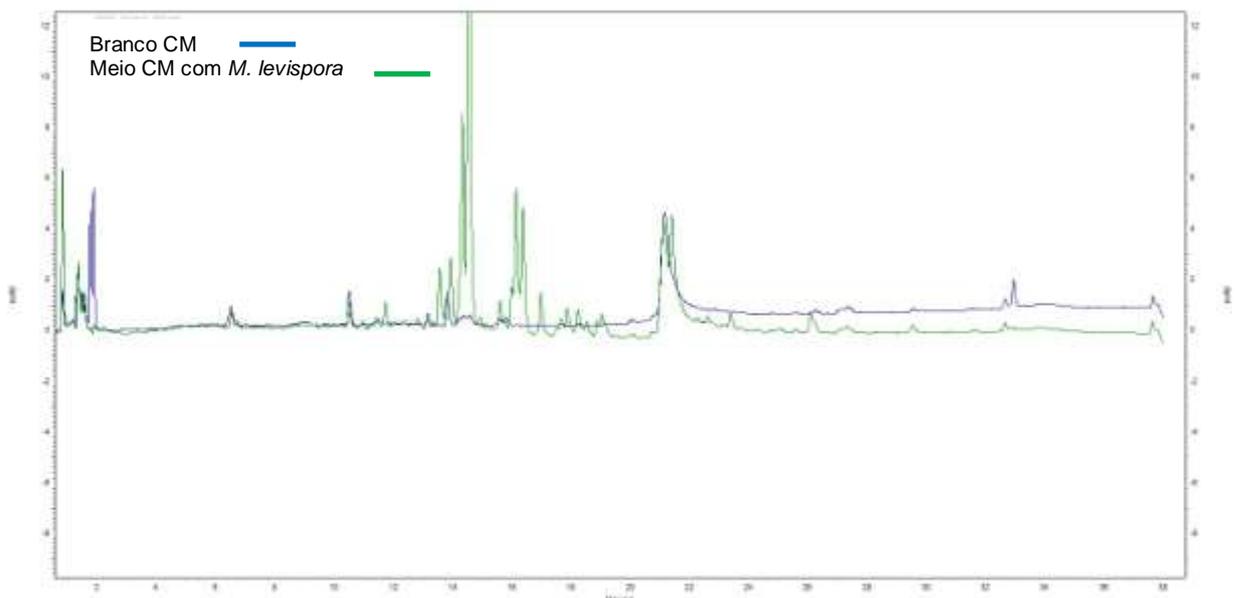


FIGURA 4.21- Sobreposição dos cromatogramas de extratos de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio de CM (verde) e deste último sem a presença do fungo (azul)

4.5 Comparação entre os meios sólidos e líquidos em diferentes meios de cultura

Para dar continuidade ao estudo e realizar o crescimento do fungo em escala ampliada, foi necessário testar o desempenho do fungo nos meios sólidos e líquidos em diferentes meios de cultura, Para isso foi feito uma análise comparativa entre os resultados obtidos anteriormente, a fim de analisar qual a melhor condição para o isolamento e identificação dos metabólitos secundários. Conforme mostrado nas tabelas abaixo, ambos os meios sólidos TABELA 4.1. e líquido TABELA 4.2, apresentam como melhor nutrição aquele de cenoura e milho na escala da TABELA 4.3. Este apresentou bandas significativas de absorção de UV através dos cromatogramas e espectros de RMN ^1H com sinais por uma larga faixa espectral evidenciando uma alta e diversa produção metabólica. Sendo, portanto, o meio CM escolhido para desenvolver o estudo em escala ampliada.

Os microorganismos podem ser cultivados em meio líquido ou sólido. O meio líquido (caldo), geralmente é indicado quando se pretende cultivar um grande número de organismos para estudo de ensaio fisiológico e ou químico/bioquímico.

Por outro lado, o meio sólido é utilizado para análises qualitativas de observação das características da colônia e para isolamento de culturas puras. No entanto, utiliza-se esse meio também para extração de metabólitos. Ao levar em consideração, o tipo de trabalho e a maior quantidade de metabólitos que o meio líquido poderia oferecer se comparado ao meio sólido, optou-se por dar continuidade no estudo com o experimento em escala ampliada no meio líquido de cenoura e milho.

TABELA 4-1- Crescimento de *M. levispora* em diferentes meios.

CRESCIMENTO MEIO LÍQUIDO					
Meios	CM	BD	BDL	BDM	CZA
Massa	0,89	0,34	0,60	0,53	0,15
Micelial (g)					
HPLC	A	B	B	M	B

TABELA 4. 2 - Crescimento de *M. levispora* em diferentes meios

CRESCIMENTO MEIO SÓLIDO					
Meios	CMA	BDA	BDLA	BDMA	CZAA
Área Micélio (cm ²)	41,11	9,971	9,819	11,485	8,3554
RMN	A	B	A	M	A

TABELA 4. 3 -Escala de Diferença entre meios sólidos e Líquidos.

ESCALA DE DIFERENÇA ENTRE OS SINAIS BRANCOS E O MEIO COM FUNGO		
BAIXA (B)	MÉDIA (M)	ALTA (A)
0 < 3	3 < 7	7 < MAIS

4.6 Cultivo do fungo *Memnoniella levispora* em escala ampliada

O processo de crescimento do fungo em escala ampliada foi o realizado como descrito no procedimento 3.7.1, pág 43. O meio escolhido foi o de cenoura e milho por apresentar condições mais favoráveis para o desenvolvimento e produção de metabólitos secundários. Produziu-se cerca de 50 Erlenmeyers de 500 ml com o meio de cultivo líquido escolhido na presença do fungo e além disso como forma de controle 10 Erlenmeyers para o com Branco sem o fungo também foram feitos. (FIGURA 4.22).



FIGURA 4.22- Fotos do crescimento de *M. levispora* em meio líquido de cenoura e milho em escala ampliada.

Após o processo de separação e partição mostrado na FIGURA 3.2 (pág. 46), obtiveram-se, como mostrado na TABELA 4.4, os seguintes extratos e suas respectivas massas. Esses extratos foram submetidos ao ensaio biológico.

TABELA 4.4: Extratos obtidos e suas respectivas massas (g).

Extrato	Peso (g)
Extrato AcOEt	3,2g
Branco AcOEt	0,8g
Extrato ButOH	5,0g
Branco ButOH	1,2g
Extrato H ₂ O/OH	7,2g
Extrato branco H ₂ O/OH	2,7g

4.6.1 Ensaio biológico dos extratos- Frente ao crescimento micelial

Com o intuito de realizar um estudo biomonitorado da atividade inibitória dos extratos para a escolha do extrato mais ativo frente ao crescimento micelial da *Phytophthora nicotianae*, acompanhou-se o desenvolvimento do micélio do patógeno em meio de BDA porém enriquecidos com 3 extratos diferentes: 1 - extratos de acetato de etila, 2-) butanólico e for fim 3-) hidroalcolico.

Conforme apresentado na FIGURA 4.23, a área de crescimento radial do micélio em 2 dias para o extrato butanólico e hidroalcolico foi normal em

comparação com o crescimento do controle, somente o extrato acetato de etila apresentou crescimento inferior nesse período. Em 4 e 6 dias podemos notar uma diferenciação maior nos resultados. Os extratos butanólico e hidroalcolico inibiram cerca de 10%, e 20% respectivamente, enquanto que o extrato de acetato de etila apresentou ótima atividade, inibindo cerca de 60% (quando comparado ao controle).

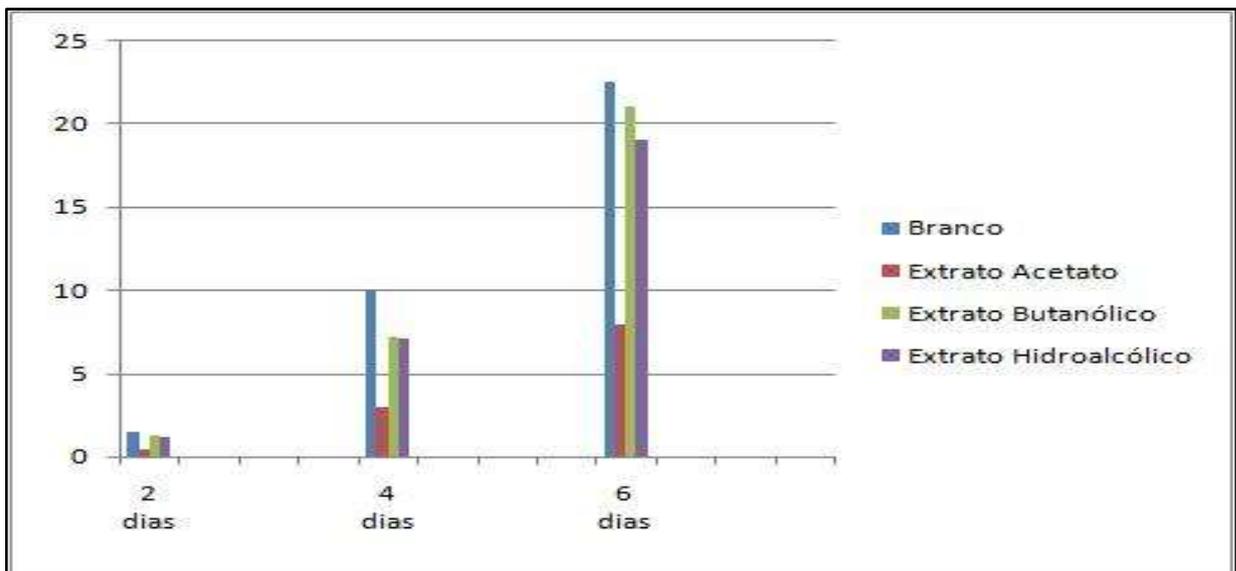


FIGURA 4-23- Inibição do crescimento do micélio da *Phytophthora nicotianae* frente aos extratos de *M. levispora* obtidos

Esse resultado pode ser verificado visualmente na FIGURA 4.24. Diante desses dados, infere-se que o extrato mais ativo é de acetato de etila, supondo, portanto, que algum metabólito presente nessa fração é o responsável pela ação inibitória (de forma isolada ou em sinergismo com os demais). Sendo assim, por apresentar resultados interessantes, optou-se por buscar os metabólitos presente nessa fração

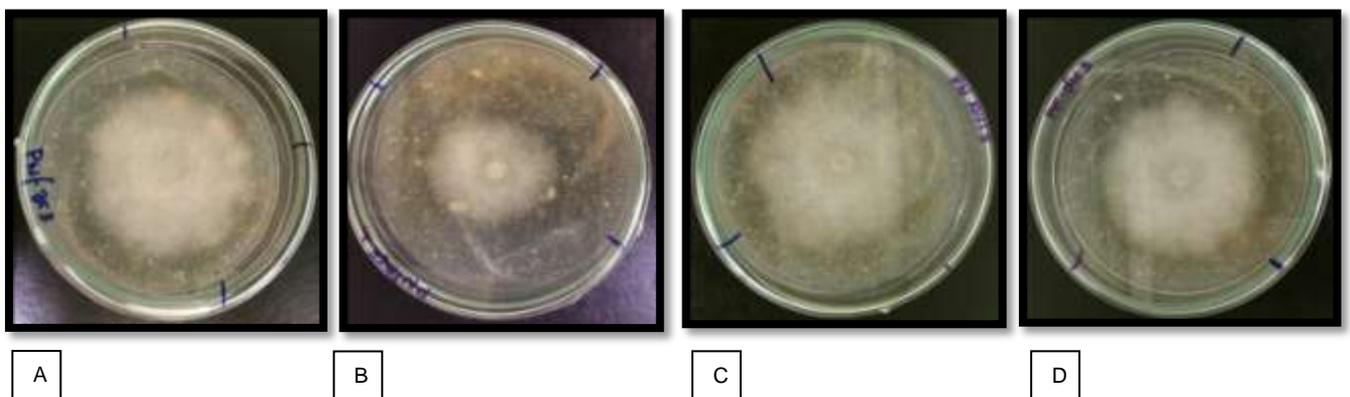


FIGURA 4. 24- Fotos do crescimento da *Phytophthora nicotianae* em meio sólido de cenoura e milho (A) meio e *P. nicotianae* (B) meio com o patógeno e o extrato de acetato de etila de *M.levispora* (c) idem e extrato butanólico (d) idem e extrato hidroalcolico

4.6.2 Preparo de amostra - Metodologia para extração fase sólida (SPE)

“A extração de fase sólida é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão e é usualmente empregada com o propósito de isolar analitos presentes em uma matriz complexa” (LANÇAS, 2003).

Conforme discutido no tópico acima, o extrato de acetato de etila mostrou ser promissor no combate à *Phytophthora nicotianae*. Contudo, mesmo com o solvente de extração (acetato de etila) sendo de baixa/média polaridade, ao analisá-lo via ressonância magnética nuclear de hidrogênio, notou-se a presença de sinais intensos e pouco definidos nas regiões entre δ_H 3 à δ_H 4,5, indicando a possível presença de possíveis açúcares livres (substância de alta polaridade). Objetivando-se a retirada dessas substâncias, para o aparecimento de sinais importantes suprimidos pela presença das mesmas, optou-se por realizar um preparo de amostra aonde esses açúcares saíam na fase de limpeza e os análitos de interesse (de mais baixa polaridade) teoricamente ficariam retidos na coluna C-18, sendo eluídos posteriormente com metanol. Através dos espectros de RMN 1H abaixo, verificamos a eficiência da extração. A FIGURA 4.25.1 representa o extrato antes do tratamento enquanto que a FIGURA 4.25 2, este após a eluição dos analitos retidos no cartucho. Neste último, podemos notar, quando ampliamos a região dos aromáticos (FIGURA 4.25 3), a presença de dubletos bem definidos e intensos, além dos sinais com a multiplicidade de singletos definidos na região de δ_H 3,5 - 4,0 esses sinais em conjunto sugerem supostamente a presença de substâncias aromáticas, metoxiladas.

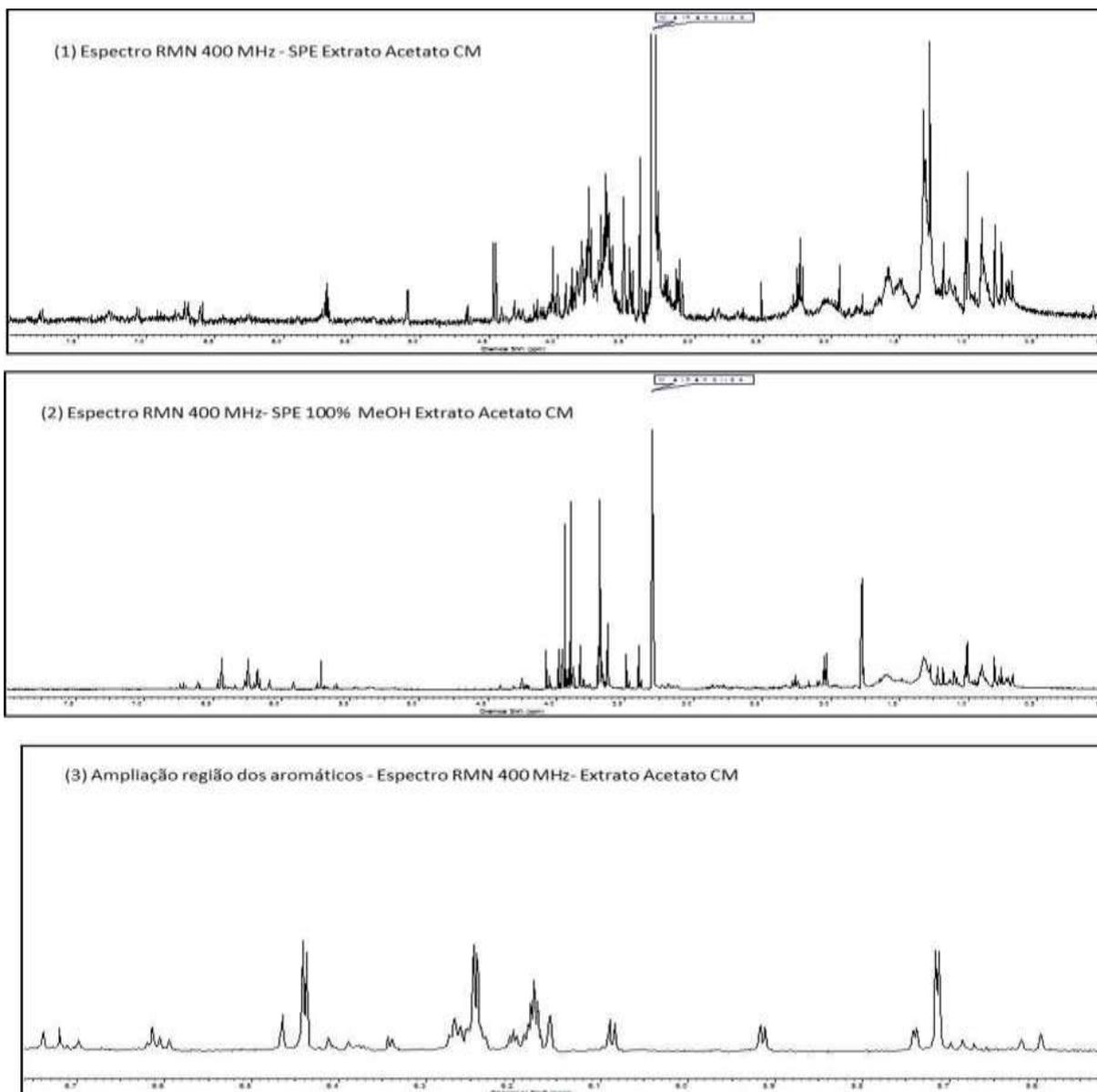


FIGURA 4. 25- Espectro de RMN ^1H 400 MHz do extrato de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio CM após o fracionamento em SPE C-18 1-) Extrato Acetato de etila obtido por SPE 2-) Extrato metanólico obtido por SPE 3-) Ampliação região de hidrogênio aromáticos

4.7 Perfil químico em diferentes técnicas espectroscópicas

Após definir o meio de cultivo ideal (meio líquido de cenoura e milho), o extrato ativo (extrato acetato de etila) e posteriormente realizar o pré-tratamento desse material traçou-se o perfil químico dessa fração por diferentes técnicas cromatográficas e espectroscópicas. As substâncias que foram identificadas por essas técnicas serão discutidas no tópico 4.9 (pág 76).

4.7.1 Perfil químico HPLC-UV

A FIGURA 4.26 exibe a sobreposição dos cromatogramas do extrato acetato de etila de *M. levispora* após o tratamento por SPE (c18), em comparação com aquele do meio sem o a presença do fungo, analisado por HPLC-UV

Podemos notar que são poucas as bandas de absorção de UV que se assemelham, sugerindo que o fungo consome todo o meio de cultivo (rosa), para produzir pelo menos 9 novas substâncias (Verde), as quais serão discutidas em capítulos mais a frente.

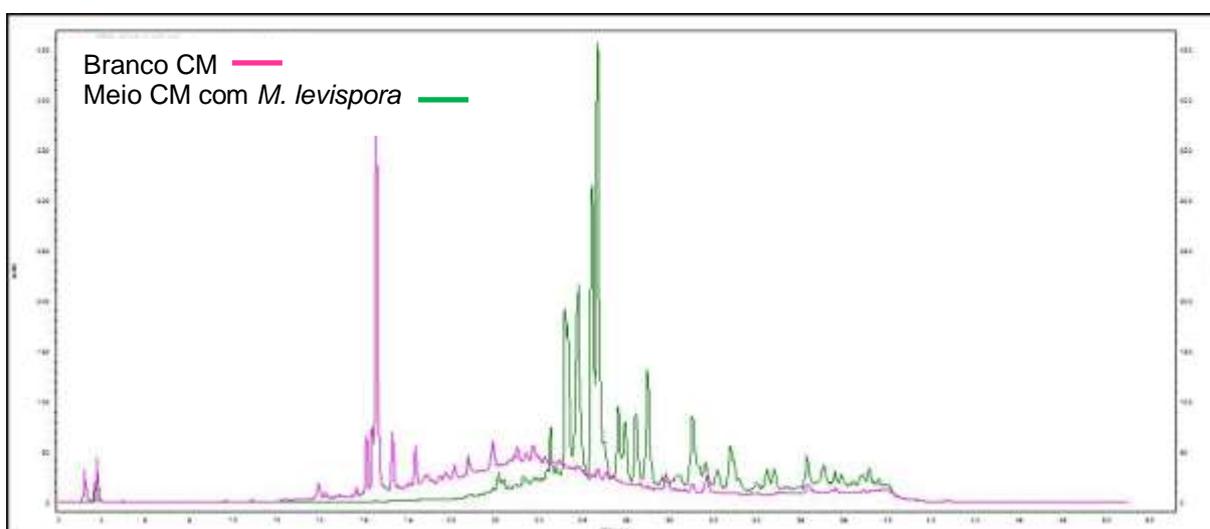


FIGURA 4.26: Sobreposição dos cromatogramas dos extratos acetato de etila de *M. levispora*, desenvolvido no meio de CM (verde) após tratamento por SPE (extrato acetato de etila) e do cultivo sem a presença do fungo (rosa) (HPLC-UV)

4.7.2 Perfil químico GC-MS

O mesmo extrato discutido no item anterior foi avaliado por GC-MS e comparado com o meio de cultura sem o fungo. Na FIGURA 4.27 pode-se verificar seis bandas, as quais parecem estar ausentes no meio de cultura, sugerindo que estas foram biossintetizadas pelo fungo

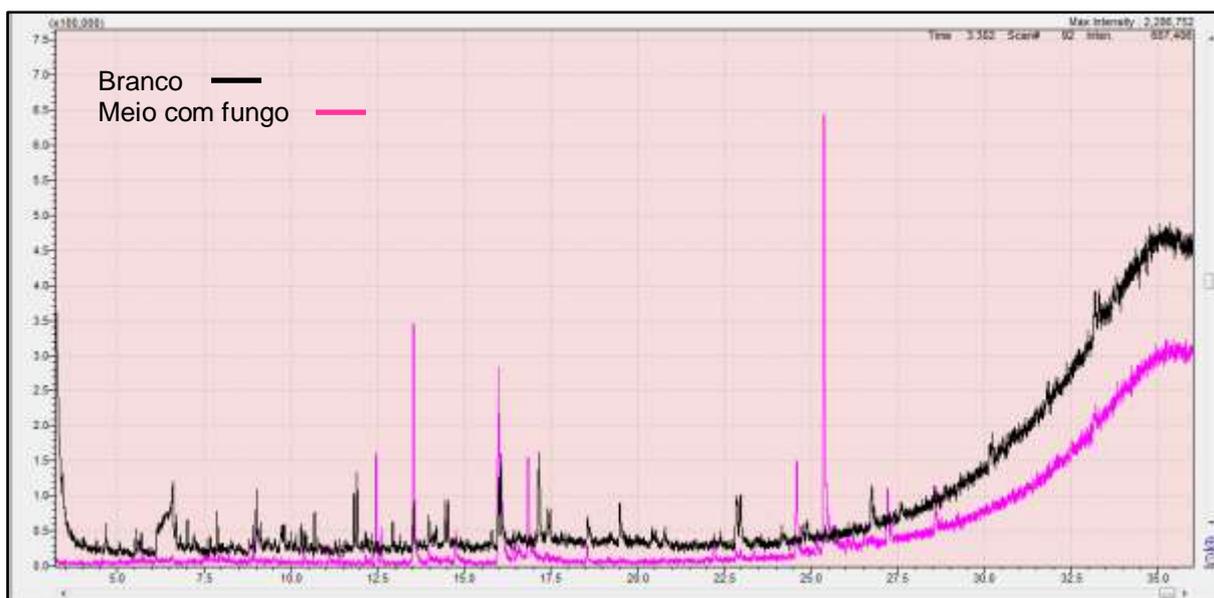


FIGURA 4. 27-Sobreposição dos cromatogramas dos extratos acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio CM (rosa) e do cultivo sem o fungo (preto)

4.7.3 Perfil químico LC-MS

Considerando que o extrato de acetato de etila de *M. levispora* discutido anteriormente mostrou-se com um perfil químico interessante para estudo, este foi avaliado rapidamente por LC-MS, para confirmar os resultados obtidos com as outras técnicas. O cromatograma abaixo (FIGURA 4.28) mostra mais uma vez a presença de vários constituintes, entre eles ao menos 6 com intensidades e separação ideais para o estudo.

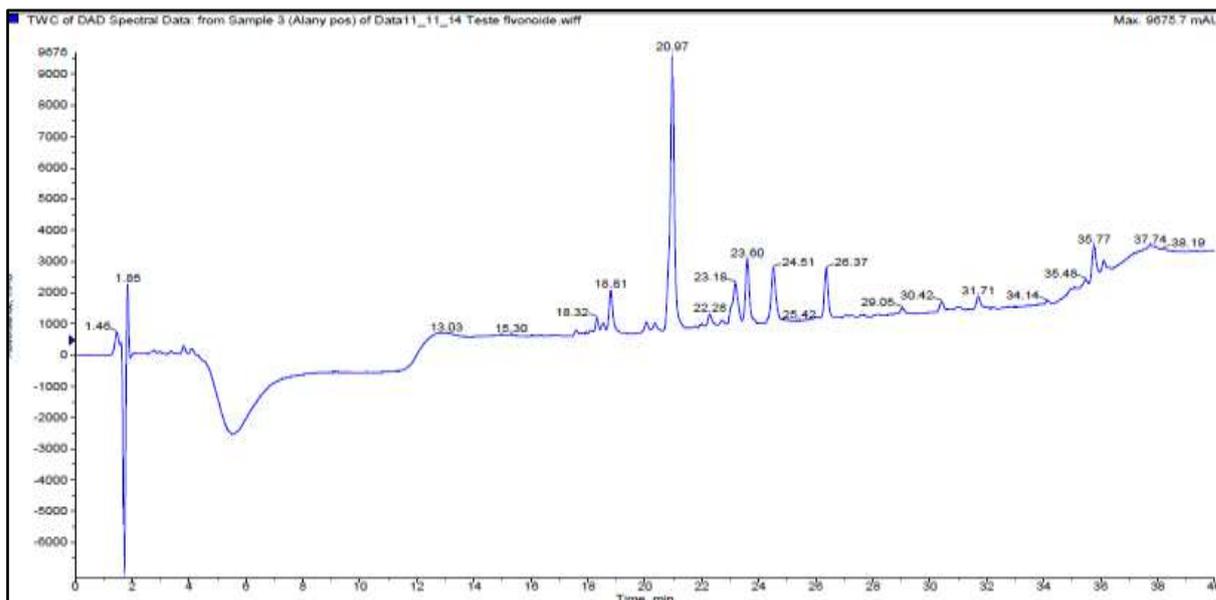


FIGURA 4. 28 – Cromatograma por LC-MS do extrato de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio CM após o tratamento por SPE (c18)

4.7.4 Análise do perfil químico por LC-SPE-NMR

A otimização do método cromatográfico para a fração acetato de etila levou a obtenção do cromatograma abaixo (FIGURA 4.29). À medida que os metabólitos presentes nessa fração apresentaram boa separação, resolução e absorção, eles foram aprisionados no cartucho de SPE com facilidade. Como podemos notar no cromatograma DAD (Figura 4.30), através dessa técnica foi possível aprisionar 10 bandas. Com a finalidade de se obter uma quantidade de amostra suficiente para proceder com a identificação, foi necessário realizar cerca de 35 corridas. Em seguida, essas 10 amostras foram encaminhadas para análises de RMN das quais 8 foram elucidadas e estão discutidas na seção 4.9 (pág 76).

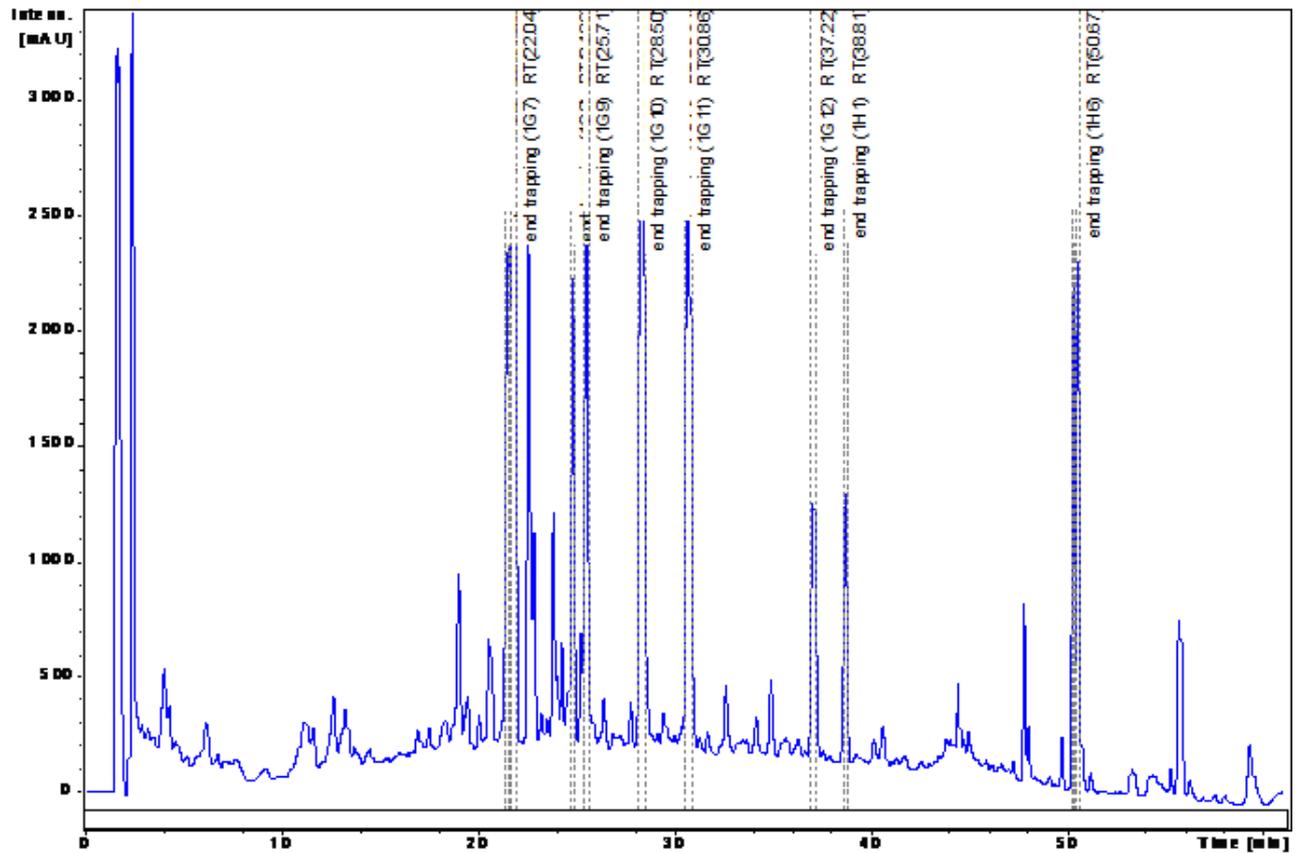


FIGURA 4.29 Cromatograma por LC-SPE-NMR do extrato de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio de CM.

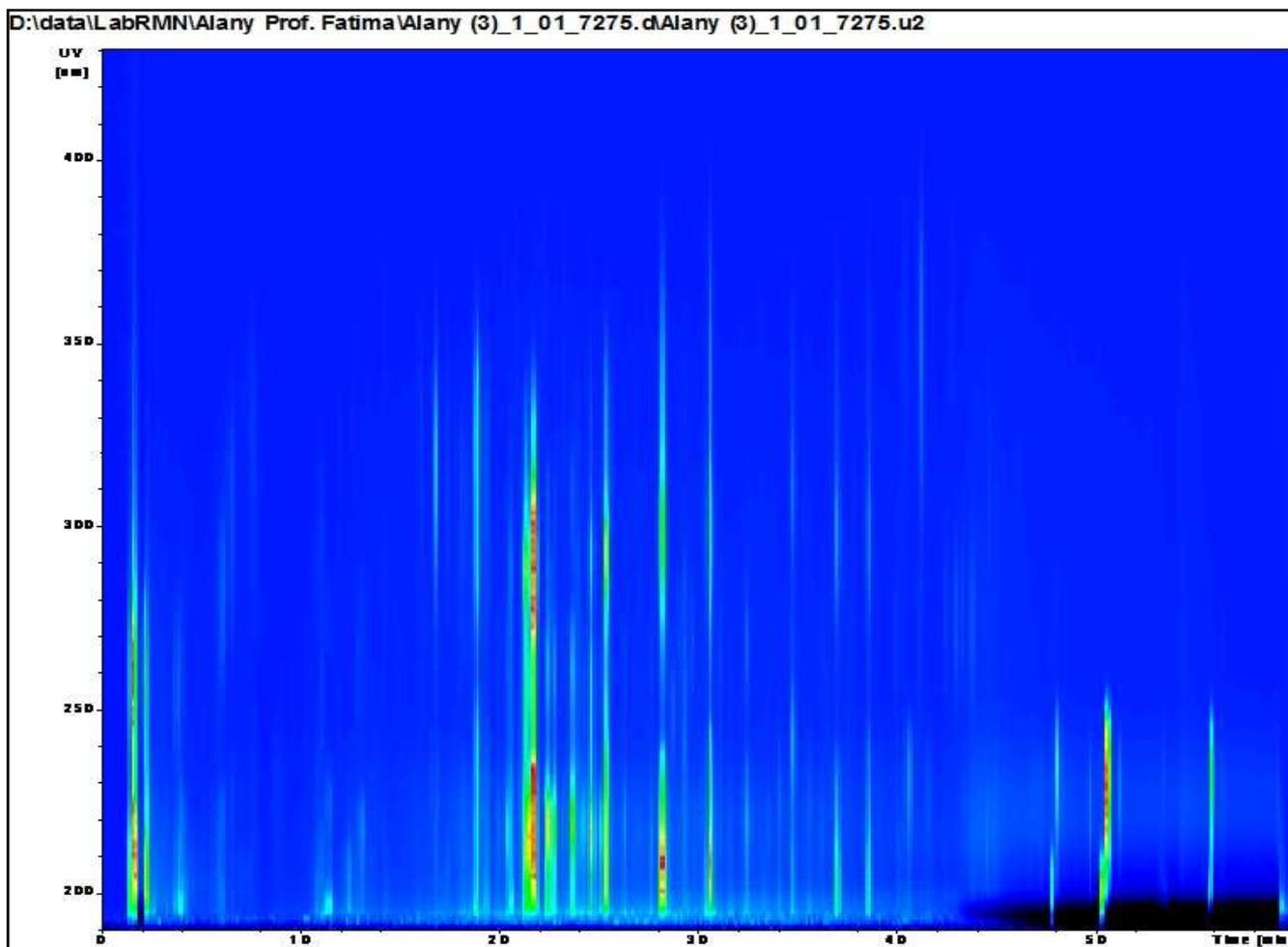


FIGURA 4.30 - Gráfico DAD 2D para o cromatograma do perfil químico do extrato de acetato de etila de *M. levispora* desenvolvido no meio de CM

4.8 Separação e isolamento das substâncias

Como descrito nos objetivos, um dos intuitos do trabalho, consiste em encontrar metabólitos ativos que inibam a *Phytophthora nicotianae*. Sendo necessário, não só a identificação dos mesmos, como separação e isolamento para testes biológicos posteriores. Desta maneira, considerando que as técnicas LC-MS e GC-MS são destrutivas, decidiu-se por utilizar o HPLC-UV e o LC-SPE-NMR. Contudo, as análises por HPLC-UV uma vez otimizadas mostrou cromatograma com boa separação, indicando facilidade na obtenção dos constituintes em uma escala para ensaios biológicos. Assim optou-se por esta técnica. Porém o LC-SPE-NMR foi explorado em um análise rápida somente para se obter constituintes não isolados por HPLC-UV. Três compostos com espectros de RMN complexos estão em análises e estes indicam ser de uma segunda classe de substância.

Nas análises por HPLC-U, aperfeiçoamos as condições obtidas em 3.3.4.2 (pág 44) e após testes da capacidade da coluna, chegou-se em uma concentração ideal de 30mg/ml de extrato sem perder resolução e reprodutibilidade das análises. Para obter uma quantidade de massas suficiente para elucidação estrutural do isolados, foi necessário realizar cerca de 45 corridas cromatográficas, aonde cada banda (as mais intensas) do cromatograma abaixo foi coletada e concentrada. Foi obtido um total de 15 bandas conforme enumerado na FIGURA 4.31.

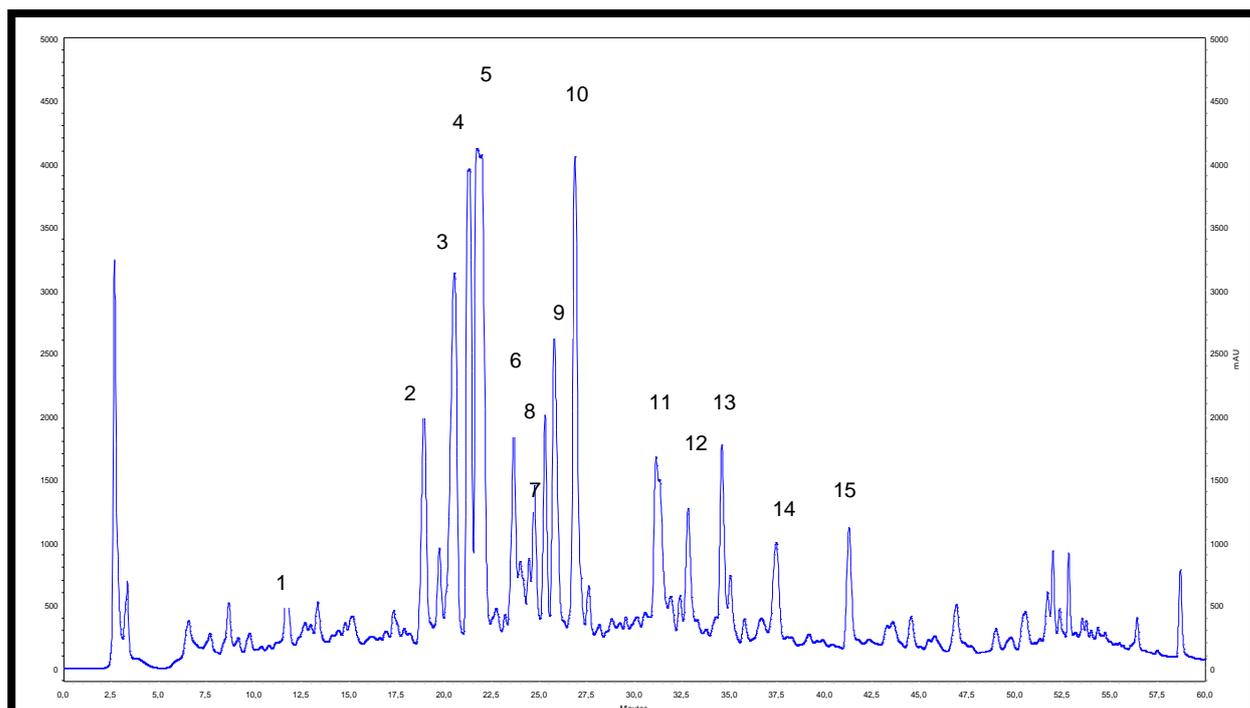


FIGURA 4. 31- Cromatograma por HPLC-UV do extrato acetato de etila de *M. levispor* desenvolvido no meio CM

4.9 Identificação estrutural dos metabólitos isolados

4.9.1 Classe das Griseofulvinas

A griseofulvina (2S, 6'R)-7-cloro-4,6-dimetoxibenzofurano-3-ona-2-spiro-1'-(2'-metoxi-6'-metilciclohex-2'-en-4'-ona), foi o primeiro produto natural antifúngico isolado a partir de fungos filamentosos (PETERSEN, et al., 2009) Trata-se de um agente conhecido à décadas, produzidos por culturas de *P. griseofuvim* e um número de outras espécies de *Penicillium* incluindo *P. janczewski*, *P. nigrum* and *P. patulum* (DEWICK, 2009). Comercialmente, este metabólito está presente em alguns

medicamentos clínicos utilizados para o tratamento de micose em animais e seres humanos. Seu uso está associado ao mecanismo de ação que acontece pela inibição da mitose celular fúngica, impedindo a divisão celular (PANDA, et al., 2015).

Estudos recentes apresentam dados que revelam que além da ação antifúngica, as griseofulvinas possuem bioatividade complementar em sistemas mamários, incluindo efeitos anti-virais e anti-cancerígeno.

4.9.1.1 Elucidação estrutural da Substância 1

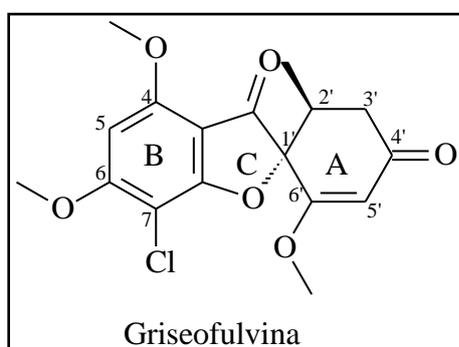


FIGURA 4.32: Estrutura química da **Griseofulvina**.

A substância 1 (FIGURA 4-32) foi obtida através do trapeamento em SPE e apresentou tempo de retenção (TR) de 24.71 min, representada pela banda 3 no cromatograma de LC-SPE-NMR. No cromatograma por HPLC-UV a substância 1 corresponde a banda 9. Esse metabólito foi isolado em mistura porém de forma majoritária. Experimentos de espectrometria de massas e RMN de 1 e 2 dimensões permitiram a sua identificação. Os dados obtidos através desses experimentos foram comparados com aqueles encontrados na literatura (WUBSHET, et al., 2013), O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4-33) apresentou um sinal de singlete δ_{H} 6,13 (1H) região característica de hidrogênios aromáticos. Desta forma, por apresentar esse deslocamento e tal multiplicidade propõe-se a presença de um anel aromático pentassubstituído. Ao analisar as regiões mais blindadas do espectro, nota-se um sinal de hidrogênio com deslocamento químico de δ_{H} 5,55, representado por um singlete característico de hidrogênios olefínicos (H-5'). Também observa-se a presença de 3 singletos bem definidos em δ_{H} 4,03, 3,98 e 3,63 cuja integração ($\int 3\text{H}$) aponta para a presença de 3 metoxilas na estrutura, sendo esta última (mais

blindado) ligada ao carbono C-6' . No deslocamento em δ_H 2,85 (H-2', 1H) nota-se um multiplete, que apontam para um hidrogênio metínico, o qual realiza acoplamento com outros hidrogênios. No espectro 1H - 1H – COSY (FIGURA 4.34) pode-se confirmar essa proposta. É possível verificar através deste espectro que H-2', acopla com os hidrogênios metilênicos vizinhos, H-3' (δ_H 3,04, dd, J=13,5; 16,8 e δ_H 2,44, dd, J= 4,7; 16,8) e com os hidrogênios metílicos da Me-2' δ_H 0,97, d= 6,5, 3H). Ainda pelo COSY, verificamos o acoplamento entre si dos hidrogênios H-3' com constante de acoplamento de 16,1.

Através dos experimentos 1H - ^{13}C HSQC (FIGURA 4.35) e HMBC (Figura 4.36), foi possível atribuir os valores de hidrogênio e carbonos ligados diretamente, e/ou a uma, duas e até três ligações de distância conforme apresentados na TABELA 4.5.

TABELA 4-0-5- Dados de RMN 1H e ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$)- **Composto 1**

Posição	1H (ppm), J(Hz)	^{13}C
4		168,0
5	6.13 (s, 1H)	92,3
6		160,0
7		100,2
8		
9		107,5
1'		93,3
2'	2.85 (m)	39,2
3'	3,04 (dd, J = 16,1 13,5) 2.44 (dd, J= 16,1, 4,7)	42,2;
4'		
5'	5.55 (s, 1H)	107,9
6'		
3 (C=O)		200,0
4(OCH3)	4,03 (s, 3H)	59,5
6(OCH3)	3.98 (s, 3H)	59,3
6'(OCH3)	3.63(s, 3H)	59.5
2'(CH3)	0.97 (d, J=6.5, 1H)	17,4

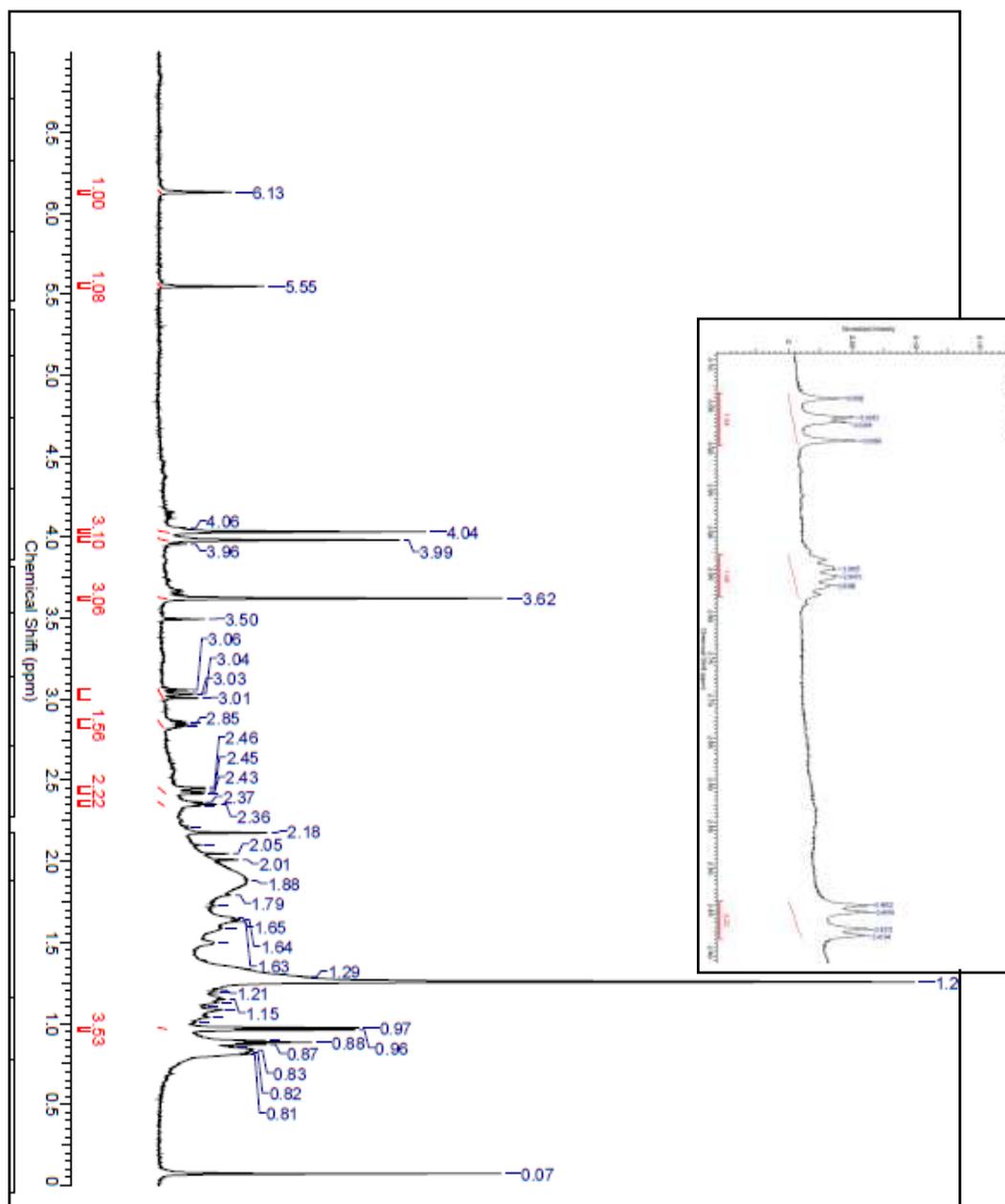


FIGURA 4. 33 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)- **Composto 1**

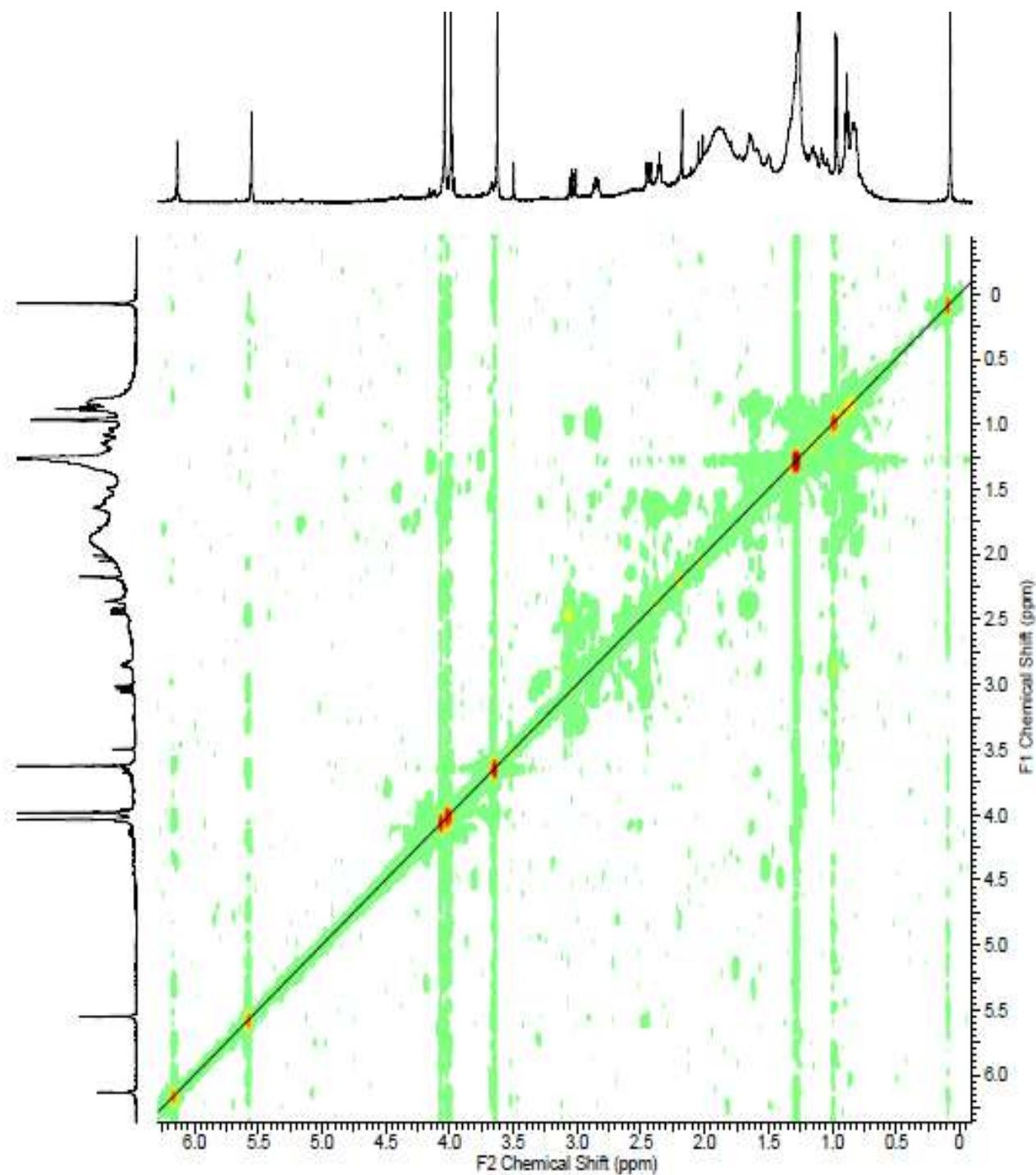


FIGURA 4.34 - Mapa de contorno COSY (400 MHz; CDCl₃)-**Composto 1**

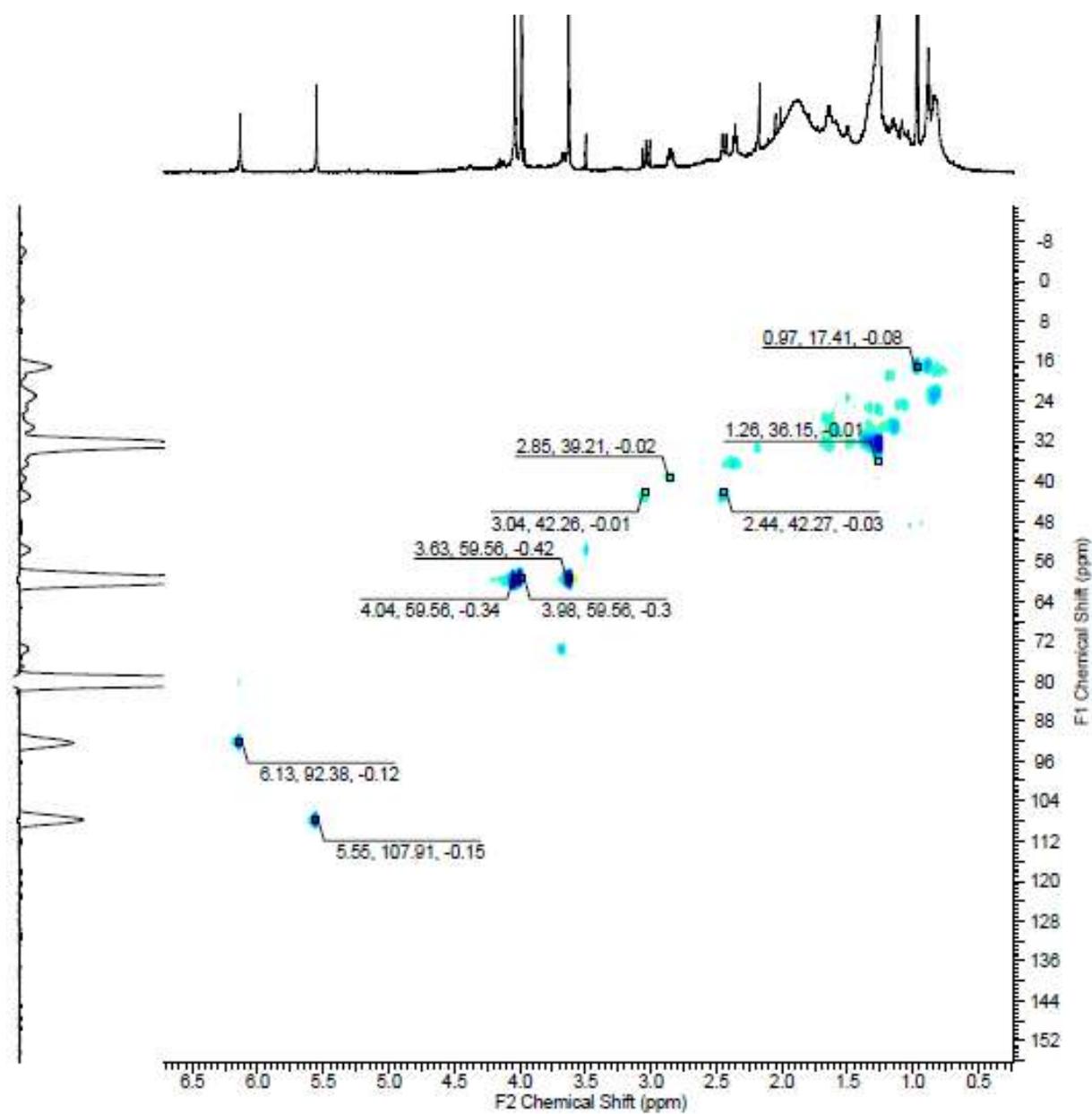


FIGURA 4.35 - Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl_3)- **Composto 1**

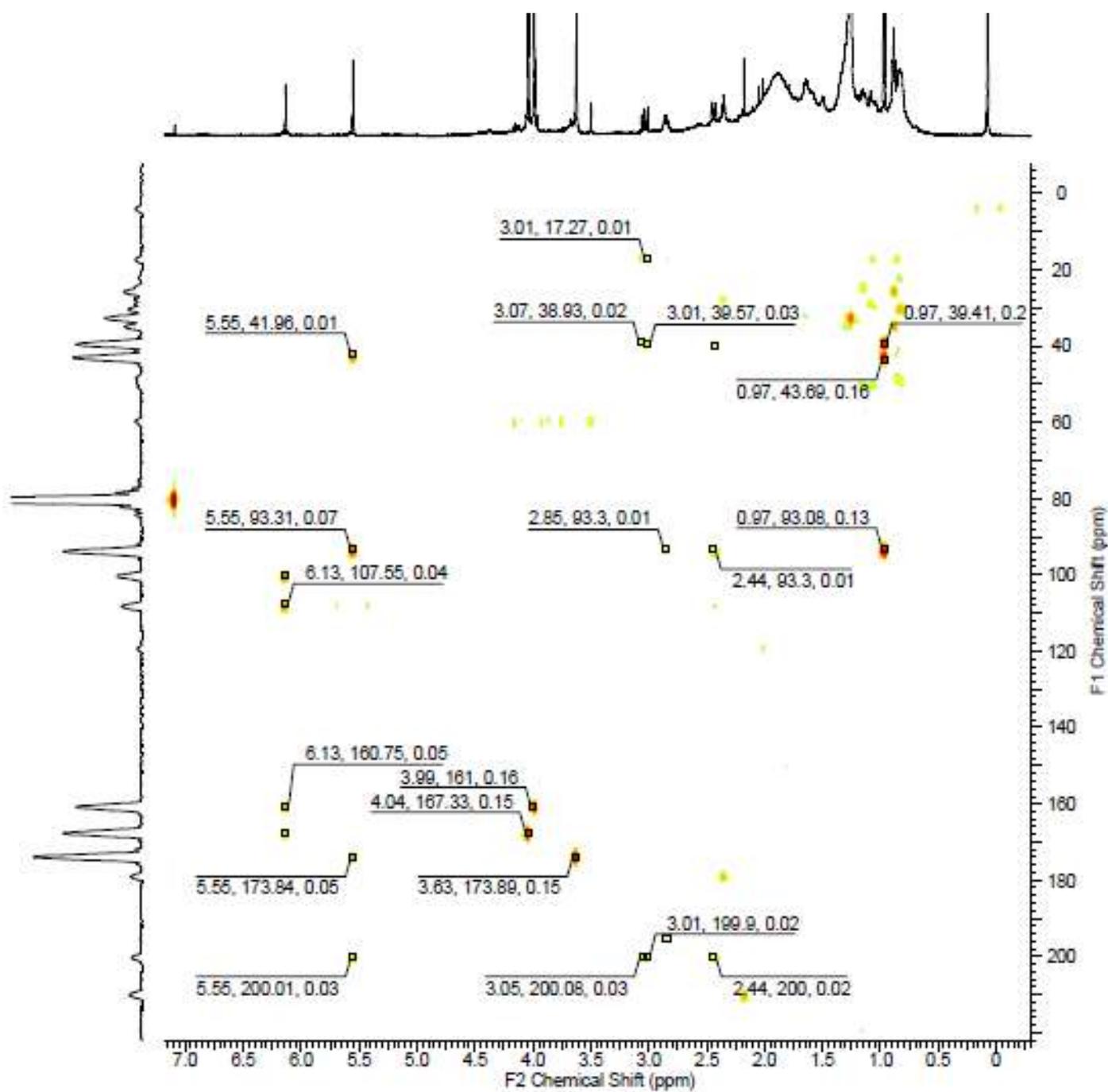


FIGURA 4.36 - Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl₃)- **Composto 1**

O do espectro de massas obtidos por ESI-MS no modo (+) (FIGURA 4. 37) apresentou sinal de m/z 353, indicando a presença da molécula (P.M = 352) protonada $[M+H]^+$. Verificou-se também um sinal do íon m/z 355, que corresponde ao padrão isotópico do cloro $[M+2]^+$. Esse padrão isotópico se repete para íon fragmento m/z 215 e condiz com a proposta de fragmentação sugerida (FIGURA 4.38). O tempo de retenção (TR) dessa substância por LC-MS foi de 23.83 Min. A presença do íon m/z 375 indica a presença da formação de aduto com o sódio $[M+Na]^+$.

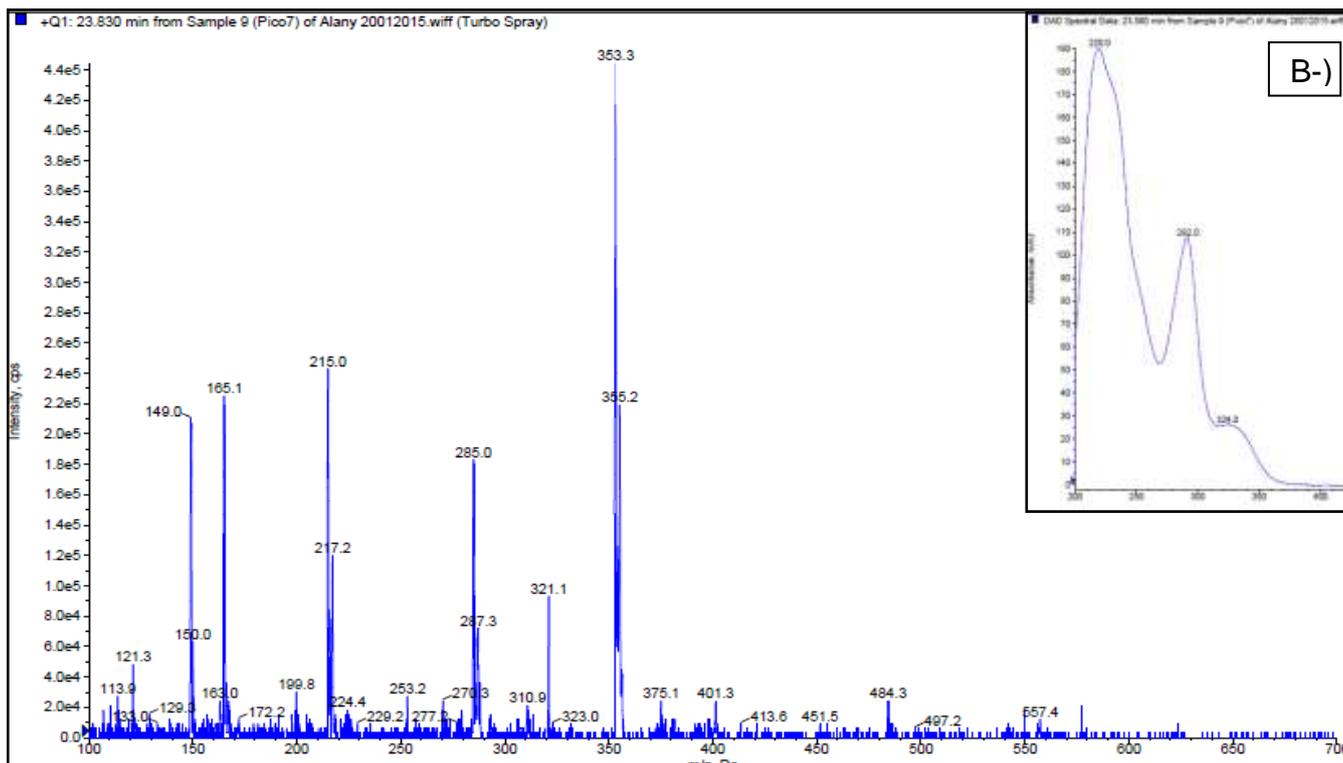


FIGURA 4. 37: Espectro de Massas do **Composto 1** (LC-MS)

O espectro de massa obtido por CG-MS (FIGURA 4.38), mostrou o íon m/z 352, assim como, devido à presença do cloro, o íon m/z 354 do perfil isotópico deste (35%). O (TR) da substância por essa técnica foi de 20.49 min. Estes dados bem como sua fragmentação foram comparados com a biblioteca do software e com a literatura (RATHOD, et al., 2014) que reforçaram os dados obtidos anteriormente. Desta forma, juntamente com a proposta de fragmentação (FIGURA 4.39) sugerida foi possível identificar a substância 1 como sendo a griseofulvina.

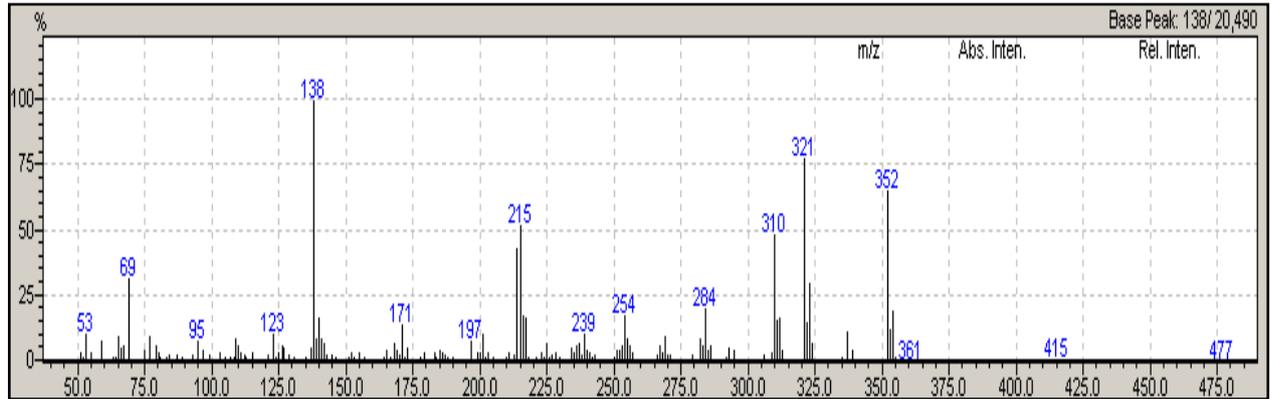


FIGURA 4.38- Espectro de Massas GC-MS- **Composto 1**

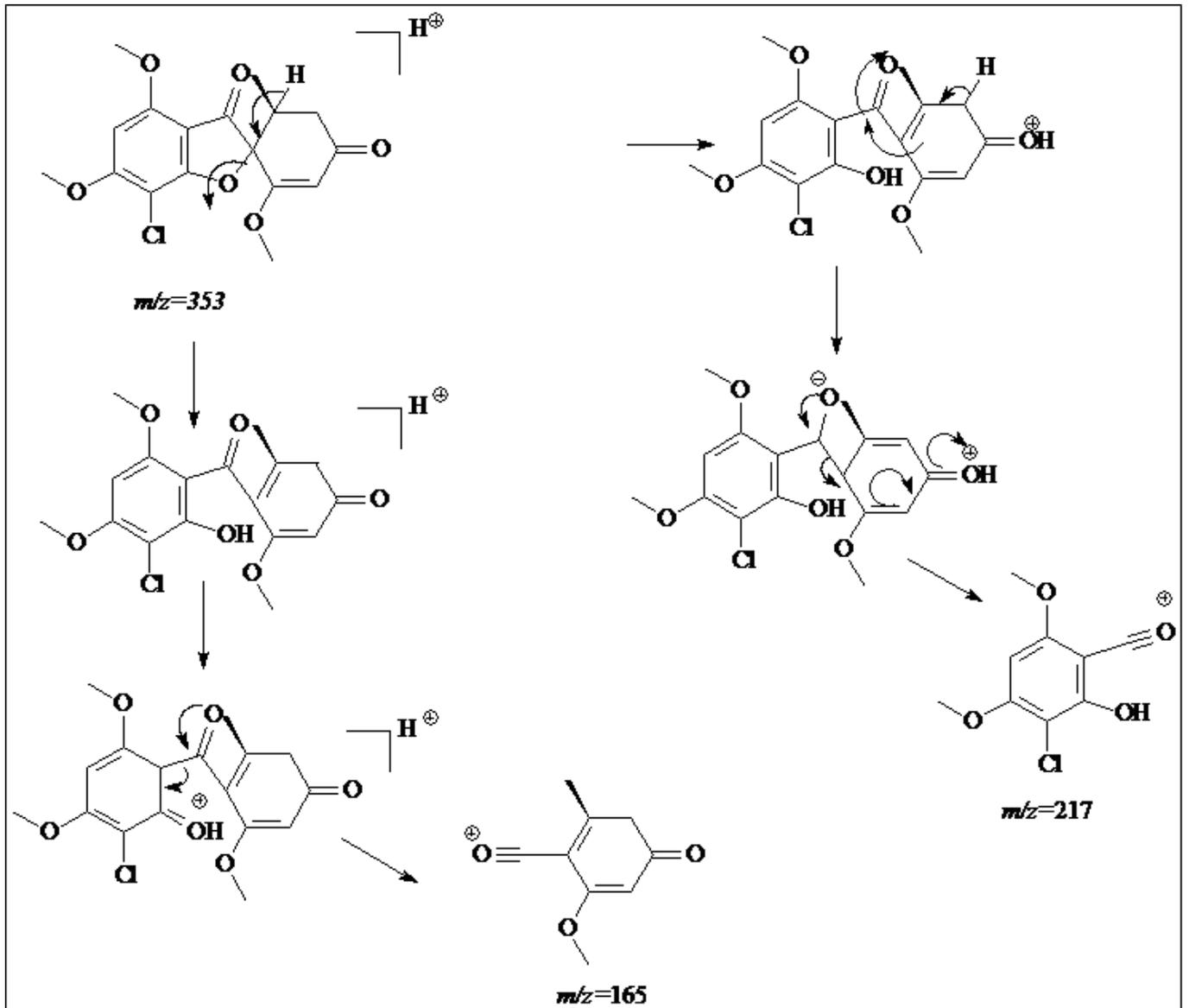


FIGURA 4.39 - Proposta de Fragmentação para o **Composto 1**

4.9.1.2 Identificação estrutural da substância 2

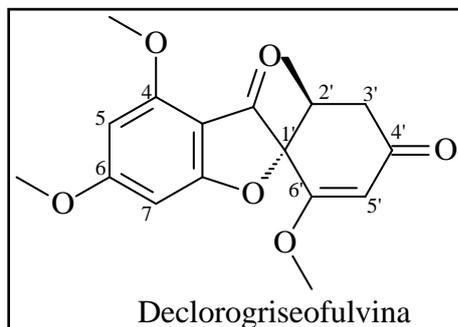


FIGURA 4. 40: Estrutura química da **Declorogriseofulvina**

A substância 2 (FIGURA 4.40) apresentou tempo de retenção de (TR) 21.90 min representada pela banda 1 no cromatograma de LC-SPE-NMR. No cromatograma de HPLC-UV a substância 2 corresponde a banda 5. A determinação estrutural foi realizada comparando-se os dados obtidos por experimentos de RMN e espectrometria de massas com a literatura (WUBSHET, et al., 2013)

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.41) apresentou forte semelhança com a substância 1. No entanto, diferem em alguns sinais principalmente os presentes no anel B. Estes sinais são dois dubletos em δ_{H} 6,37 e 6,22 na região de aromáticos, cuja constante de acoplamento entre si é de meta igual a $J = 2,0$ Hz (ampliação na região dos aromáticos, FIGURA 4.42). Esse padrão de substituição sugere a presença de um anel aromático tetra substituído. As correlações do hidrogênio H-2' (δ_{H} 2,80, m, 1H), com os hidrogênios H-3' (δ_{H} 2,42, dd, $J = 4,6; 16,7$ e 2,92, dd, $J = 13; 16,7$) e os hidrogênios da metila (δ_{H} 0,96 d, $J = 6,5$), podem ser visualizadas no espectro de COSY (FIGURA 4.45). O hidrogênio olefínico H-5' está representado pelo sinal de singlete com deslocamento químico de δ_{H} 5,62 (1H). Identificou-se também, a presença das metoxilas, sendo elas duas pertencentes ao sistema aromático e uma ligada a um carbono insaturado C-6' cujos respectivos sinais são; δ_{H} 3,91 (s, 3H), δ_{H} 3,93 (s, 3H) e δ_{H} 3,69 (s, 3H) (TABELA 4.6)

TABELA 4. 6: -Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600MHz ;MeOH) do **Composto 2**

Posição	^1H (ppm),J (Hz)	^{13}C
4		161
5	6,22 (d, J = 2,0)	95,8
6		173,8
7	6,37 (d, J= 2,0)	91,4
8		
9		106,8
1'		92,9
2'	2,80 (m)	
3'	2,42 (dd, J= 16,7, 4,6) 2.92 (dd, J=16,7; 13)	40,2
4'		200,8
5'	5.62 (s)	105,1
6'		176,8
3 (C=O)		
4(OCH3)	3.93 (s)	57,5
6(OCH3)	3.95(s)	57,9
6'(OCH3)	3.69 (s)	59,42
2'(CH3)	0,96 (d, J=6.5)	15,0

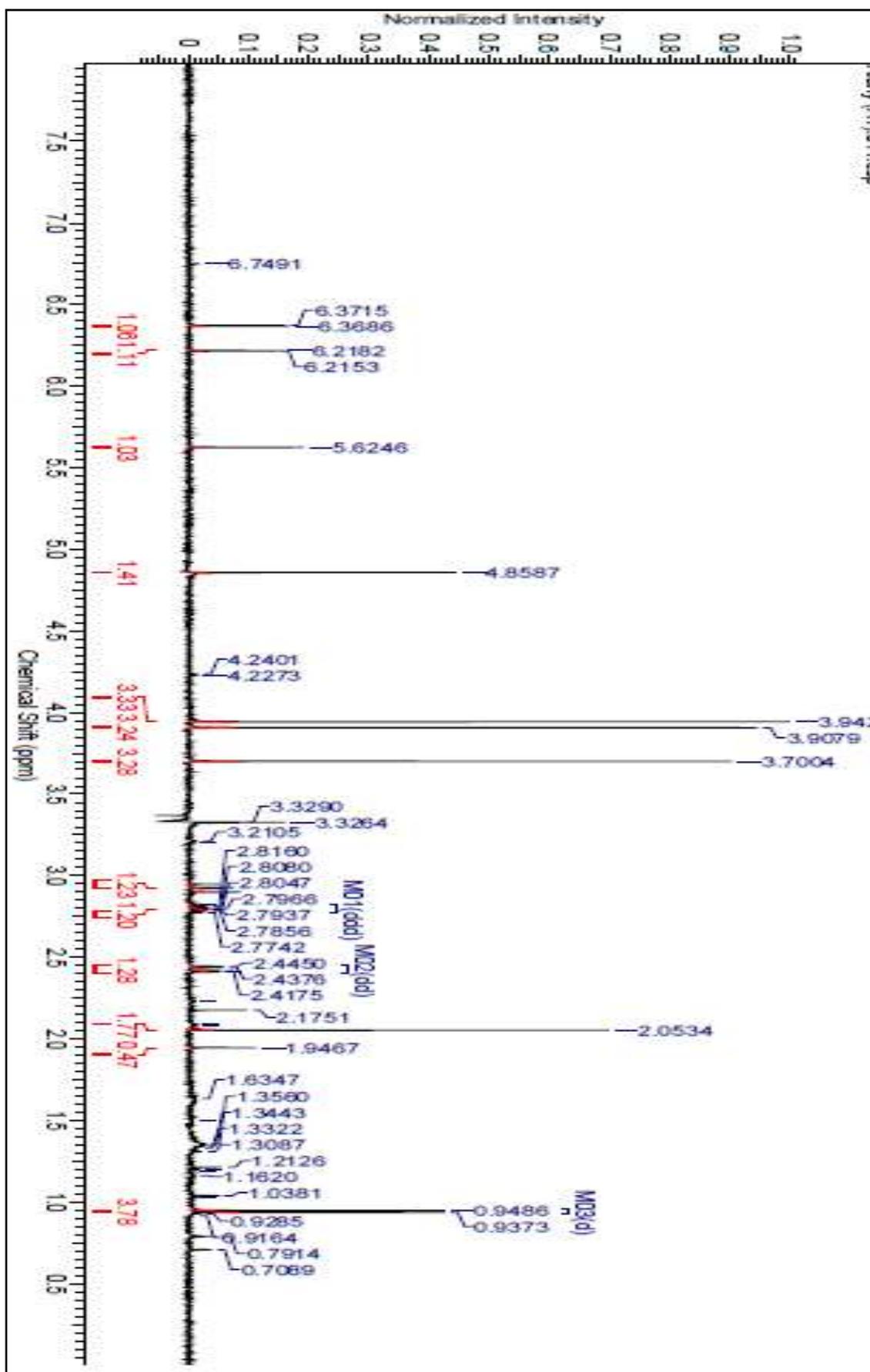


FIGURA 4. -0-41- Espectro de RMN ^1H (600 MHz , MeOH)- **Composto 2**

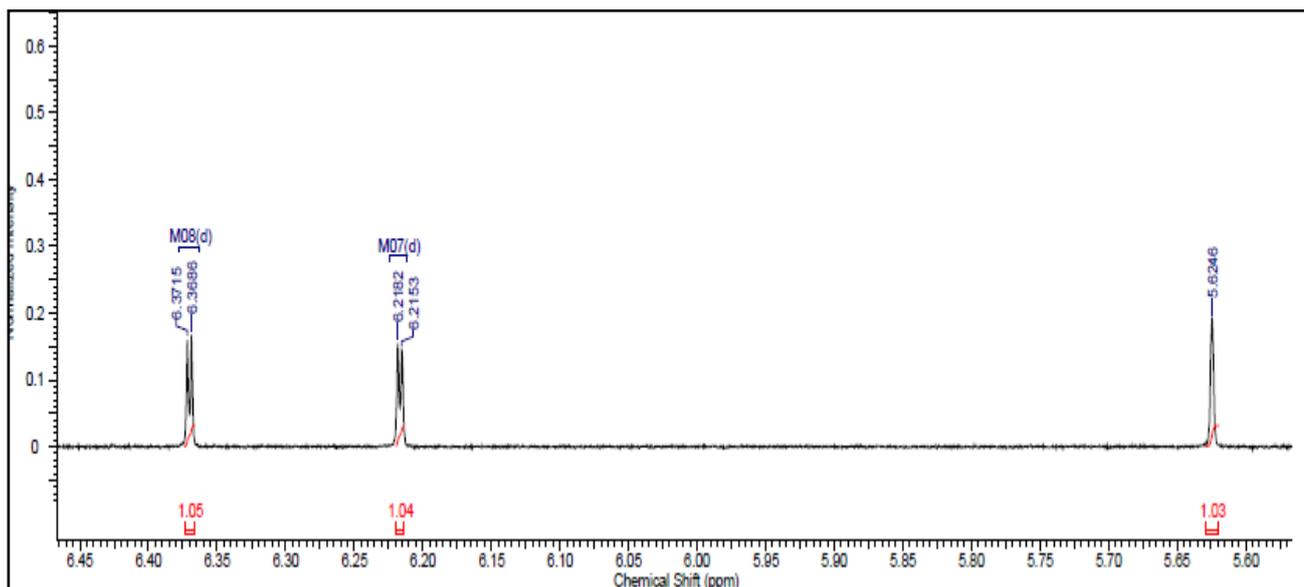


FIGURA 4-42- Ampliação da região dos aromáticos do espectro de RMN ^1H 600 MHz- **Composto 2**

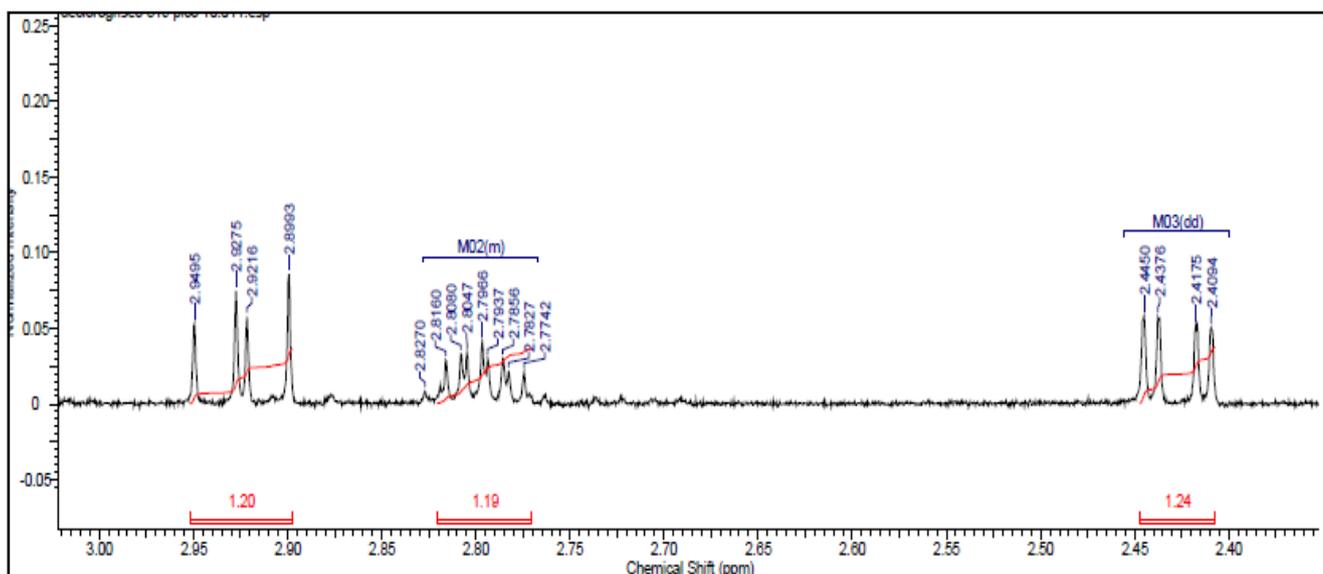


FIGURA 4.43- Ampliação da região alifático do espectro de RMN ^1H 600 MHz- **Composto 2**

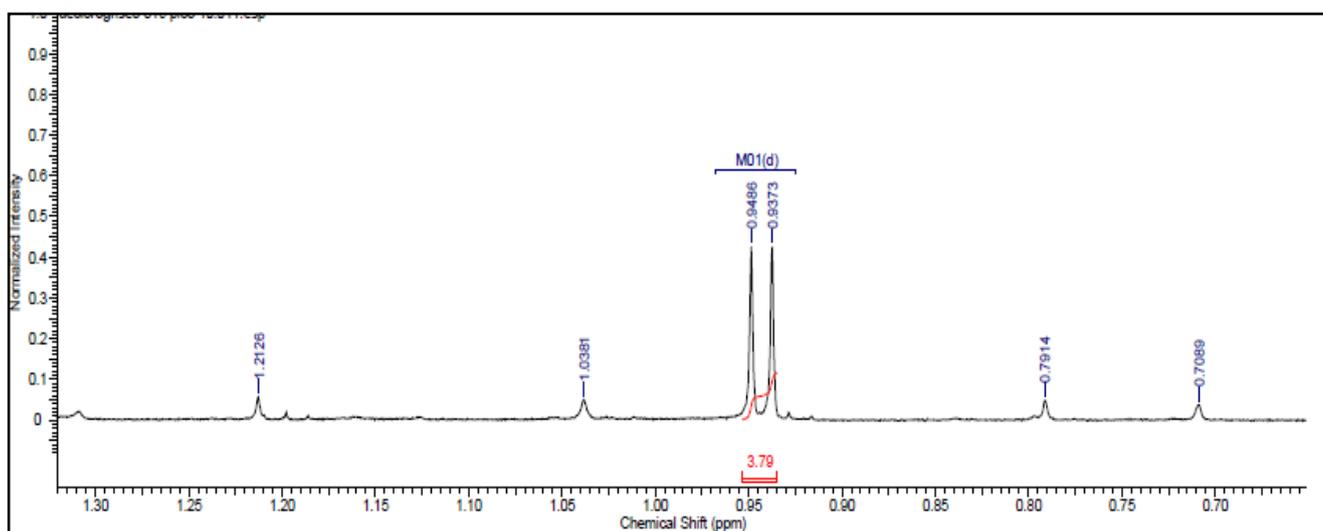


FIGURA 4.44- Ampliação da região das metilas do espectro de RMN ^1H 600 MHz- **Composto 2**

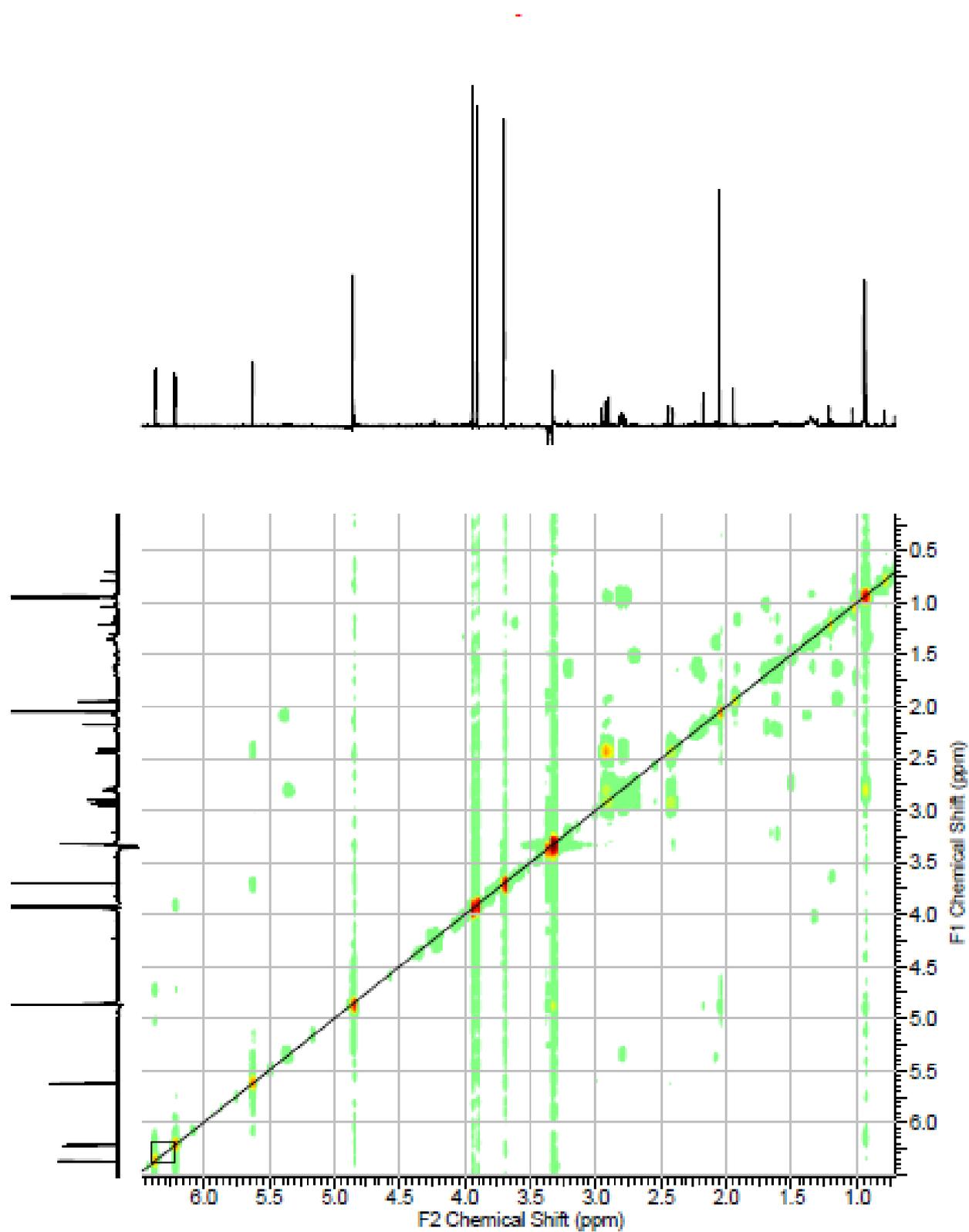
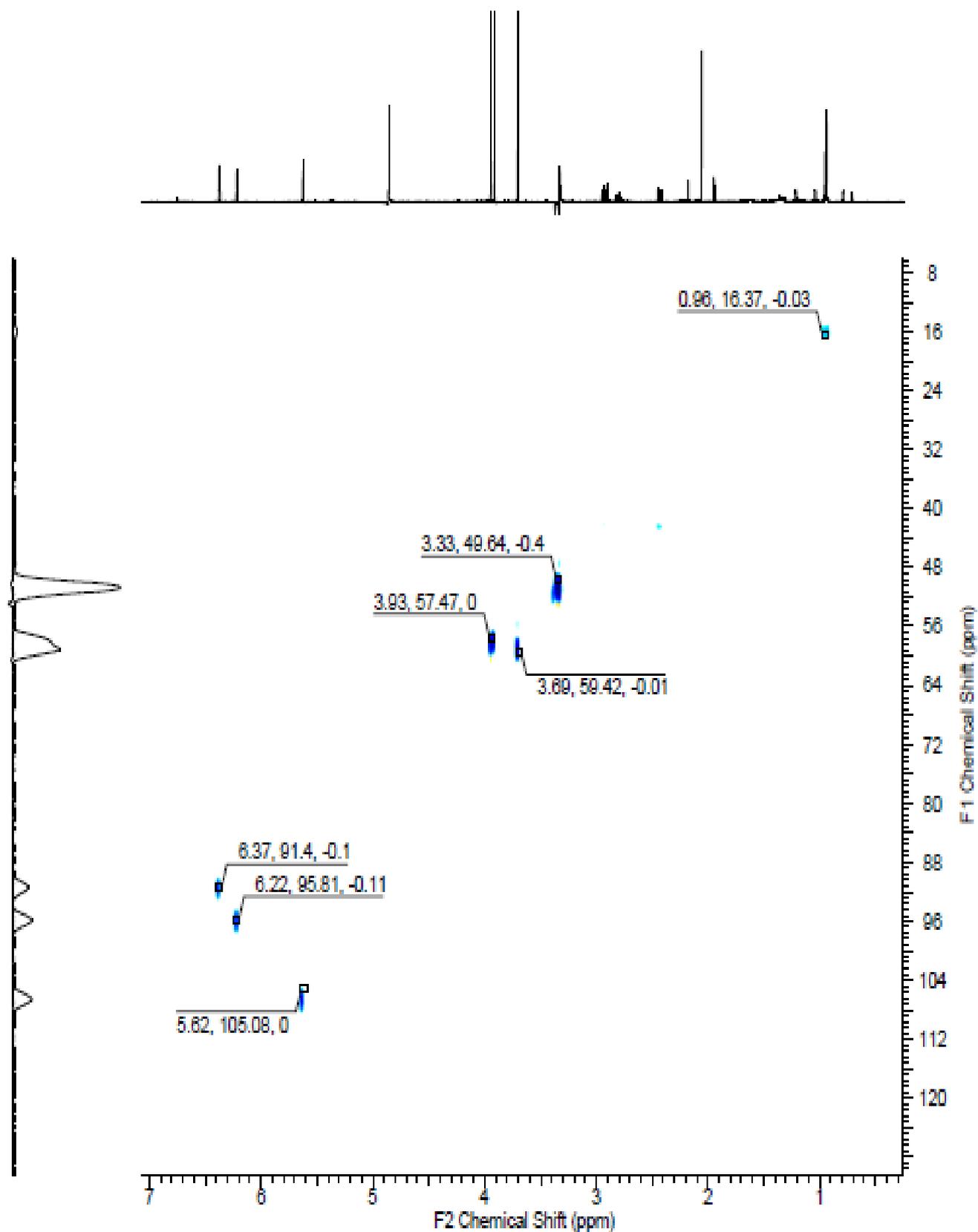


FIGURA 4.45 Mapa de contorno COSY (600 MHz- MeOH)-**Composto 2**

FIGURA 4.46- Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- **Composto 2**

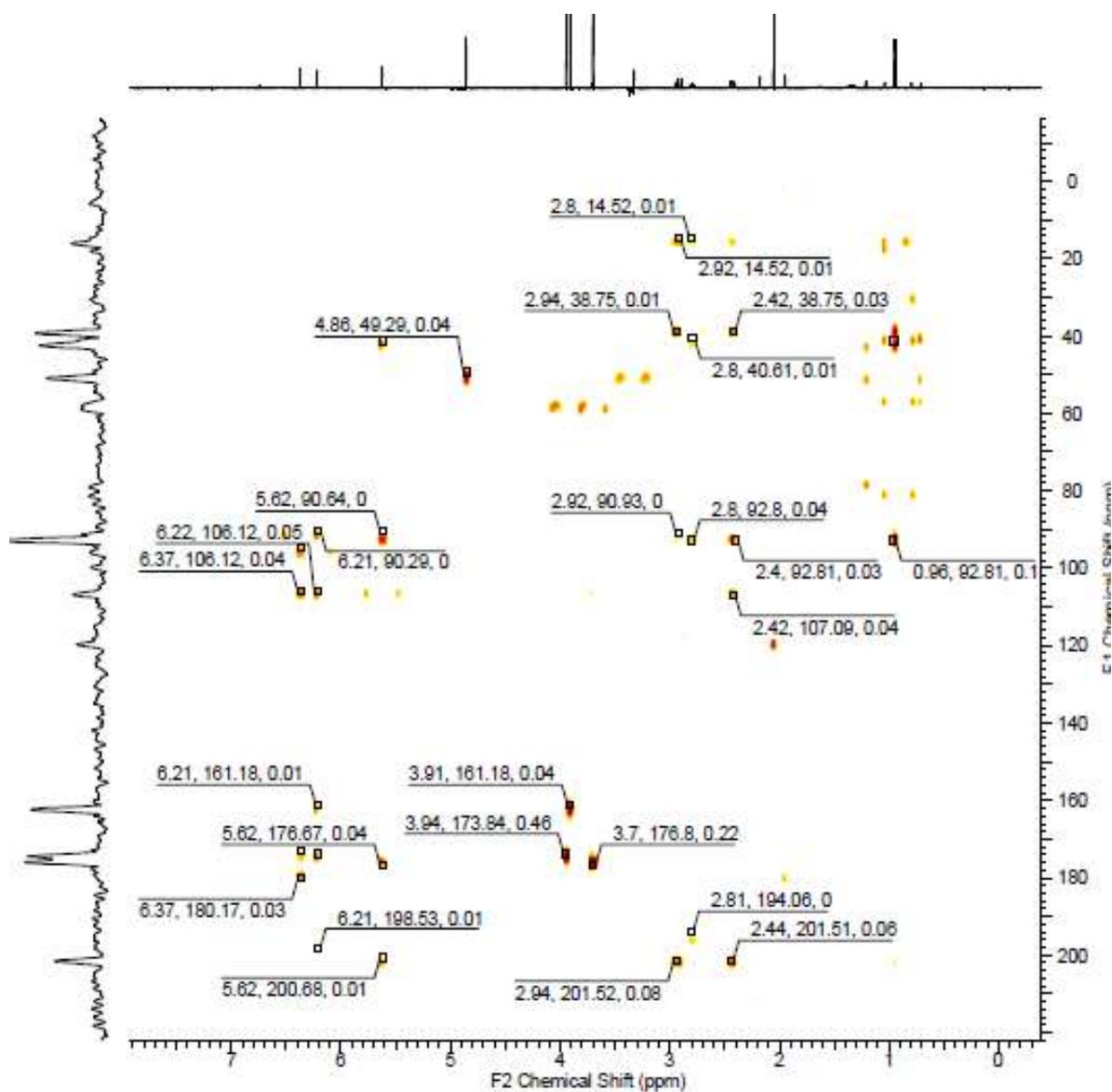


FIGURA 4.47- Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH)- **Composto 2**

Em ambos os espectro de massas obtidos por ESI-MS (FIGURA 4.48) e GC-MS (FIGURA 4.50), indicam a substância 2 com peso molecular de 318U. No espectro obtido por ESI-MS verifica-se o sinal m/z 319, sugerindo que a molécula apresenta-se protonada $[M+H]^+$. Observa-se também a formação de um aduto $[M+Na]^+$, representado pelo íon m/z 341. Os tempos de retenção encontrados para a substância ao serem analisados pelas duas técnicas foram 21.65 min (LC-MS) e 25.41(CG-MS). Os dados obtidos, assim como o perfil de fragmentação em conjunto com os dados de RMN e a literatura, apontam para substância 2 como sendo a declorogriseofulvina. As bandas de absorção no DAD 214nm e 290 correspondem respectivamente à conjugação A as conjugações do anel B.

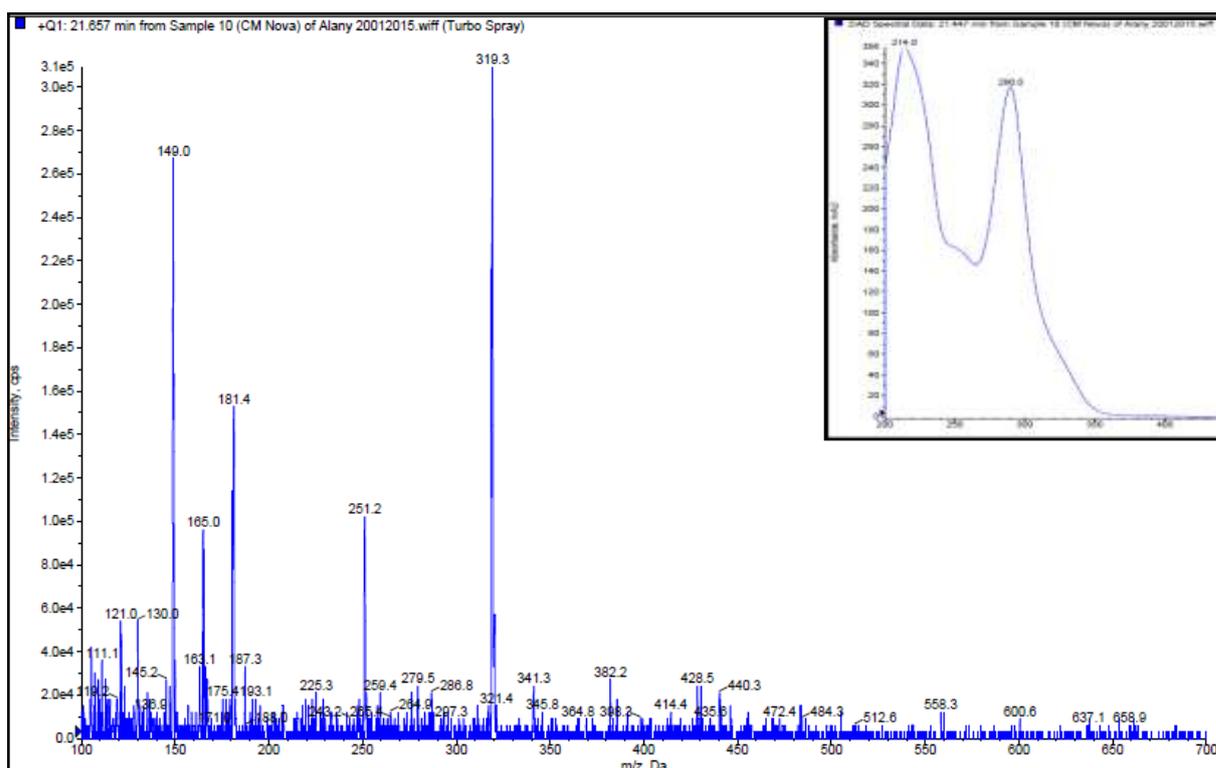


FIGURA 4 .48: Espectro de Massas do **Composto 2** (LC-MS).

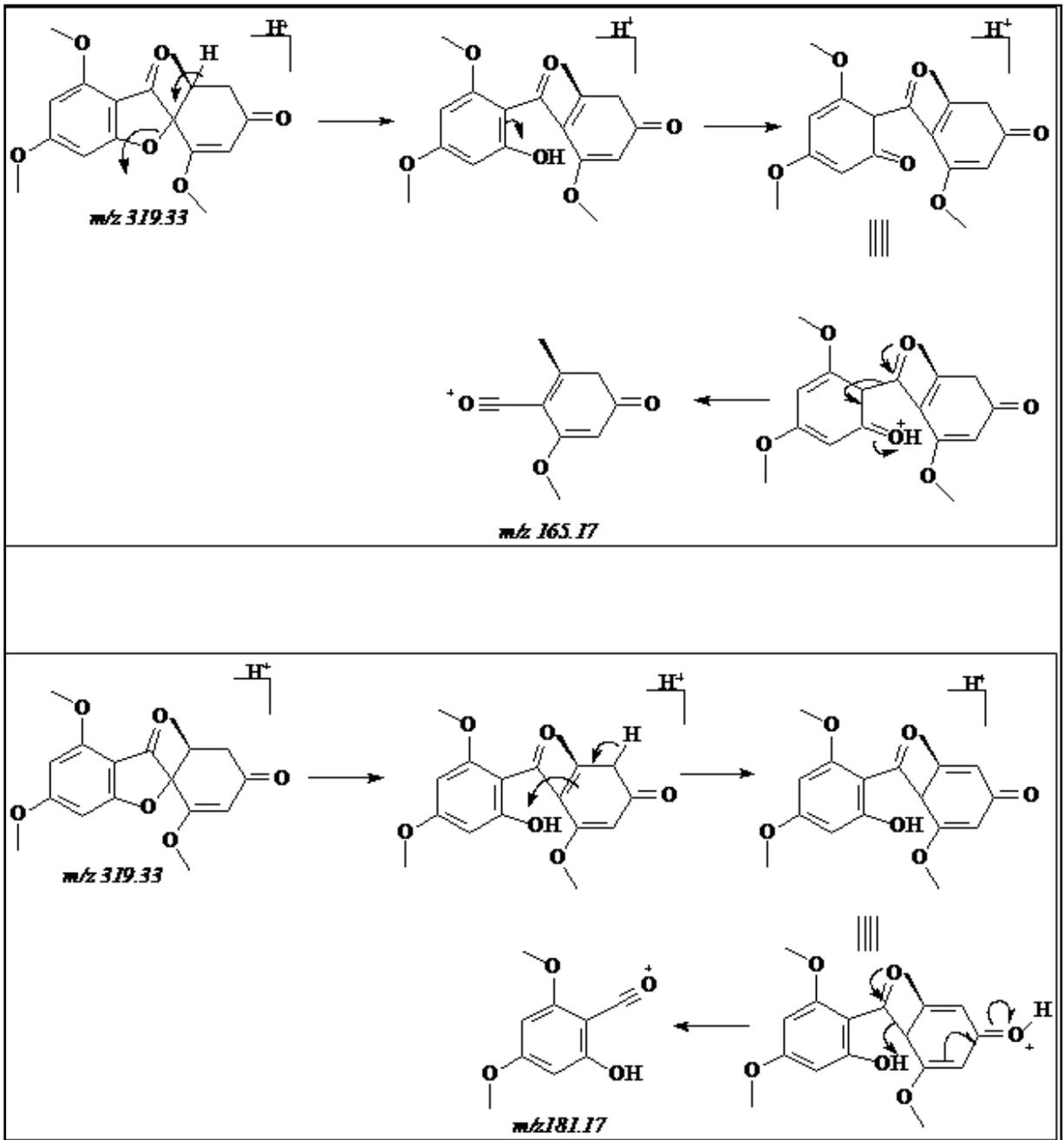


FIGURA 4-49 Proposta de Fragmentação para o **Composto 2**

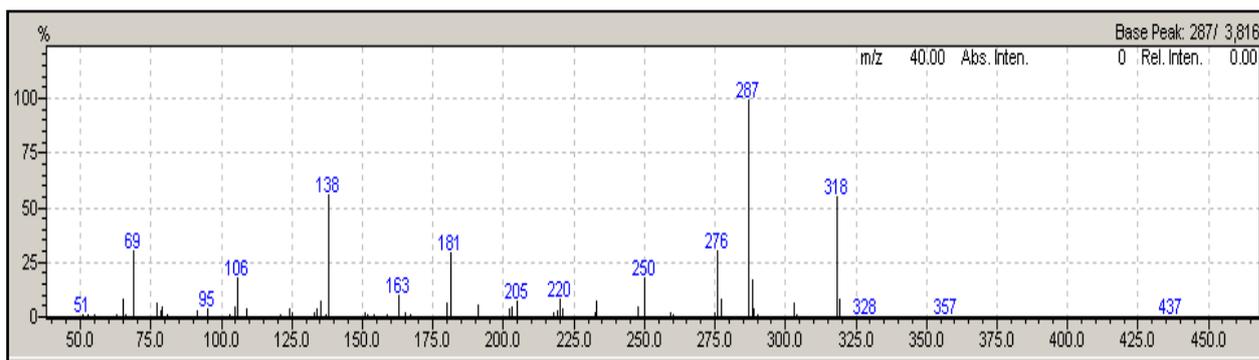


FIGURA 4-0-50- Espectro de massas do **Composto 2** (GC-MS)

4.9.1.3 Identificação estrutural substância 3

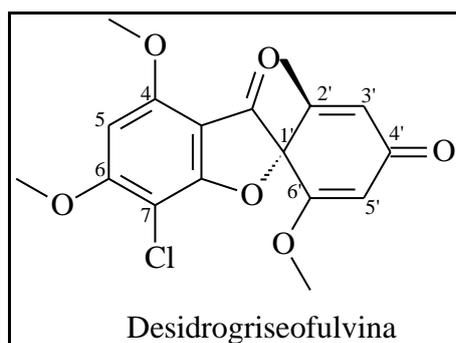


FIGURA 4.51- Estrutura química da **Desidrogriseofulvina**.

A substância 3 (FIGURA 4.51) isolada da fração acetato, apresentou tempo de retenção de (TR) 24.89 min correspondente à banda cromatográfica 4, obtido através da técnica LC-SPE-NMR. No cromatograma por HPLC-UV a substância 3 corresponde à banda 10. Esse metabólito foi identificado através da análise dos experimentos RMN de uma 1D e 2D (em MeOH), LC-MS e GC-MS. A determinação estrutural foi realizada comparando-se os dados obtidos com aqueles da literatura (WUBSHET, et al., 2013).

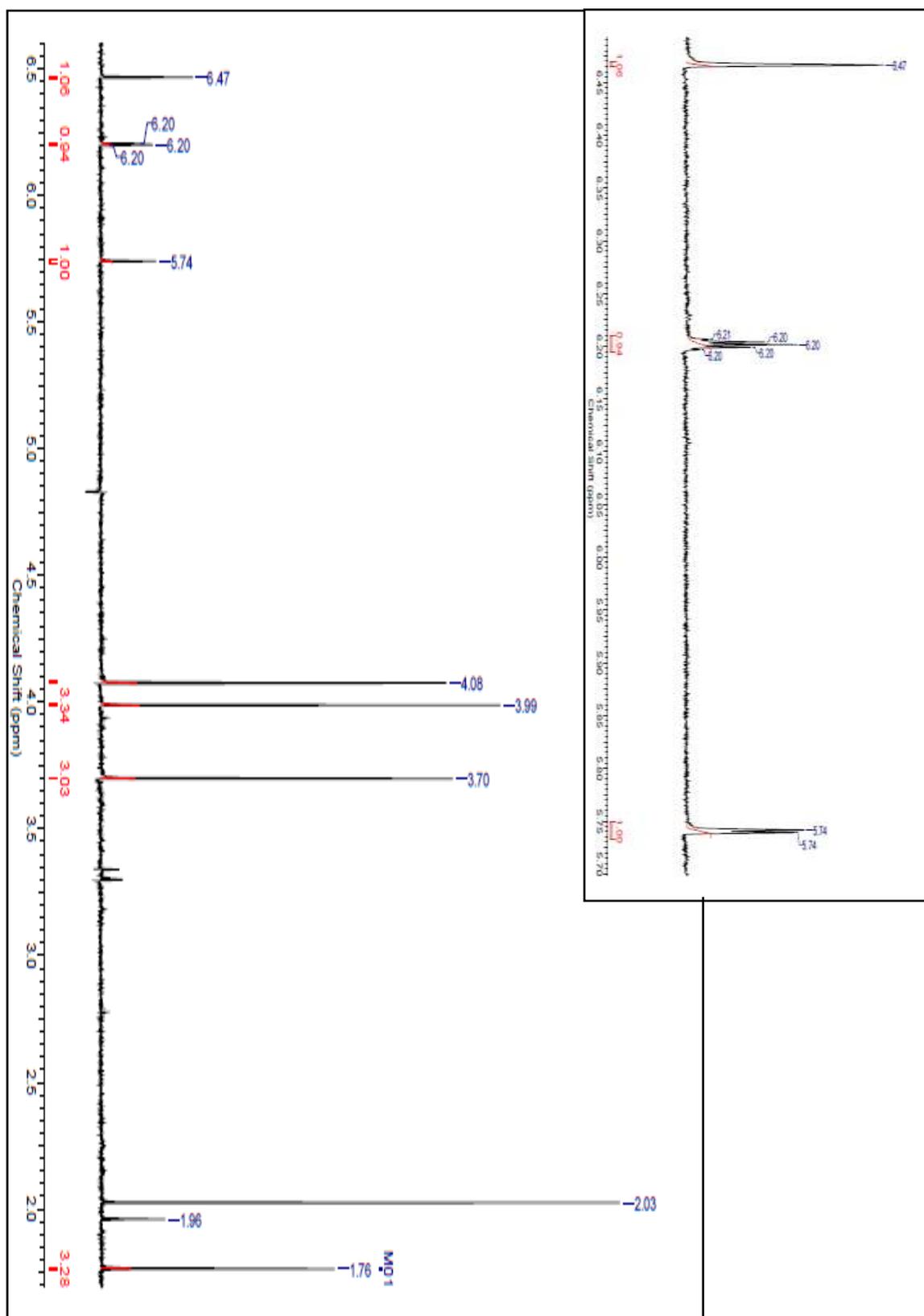
O espectro de RMN ^1H da substância 3 (FIGURA 4.52) apresentou sinais característicos para griseofulvina. O sinal de duplete em δ_{H} 5,74 (d, 1H) e o multiplete em δ_{H} 6,20 (d, 1H), acoplam entre si como pode ser visto no espectro de COSY (FIGURA 4.53), e este último (δ_{H} 6,20) também mostra correlação com a

metila (δ_{H} 1,76) vinílica em C-2'. Esta última correlação permite atribuir o sinal em δ_{H} 6,20 ao H-3' e sugere o anel A como sistema quinônico

Um sinal de singlete na região de aromático δ_{H} 6,47 (s, 1H) indica a presença de um anel aromático pentassubstituído, semelhante ao da estrutura 1. Assim como para a griseofulvina, verificamos a presença de três metoxilas, cujos deslocamentos químicos são: δ_{H} 4,05 (s, 3H), 3,97 (s, 3H) e 3,64 (s, 3H). Os valores dos carbonos mostrados na TABELA 4.7, foram atribuídos através dos espectros de HSQC (FIGURA 4.54) e HMBC (FIGURA 4.55). Esses dados em comparação com a literatura permitiu definir a substância 3 como a desidrogriseofulvina

TABELA 4.7 -Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600MHz, MeOH)- **Composto 3**

Posição	^1H (ppm), j(Hz)	^{13}C
4		165,0
5	6,46 (s)	92,0
6		160,0
7		96,0
8		190,0
9		106,0
1'		91,9
2'		148,0
3'	6,21 (m, J=1,5)	131,1
4'		190,0
5'	5,76 (d, J= 1,5)	105,0
6'		172,0
3 (C=O)		
4(OCH3)	4,08 (s)	59,4
6(OCH3)	3,98 (s)	59,4
6'(OCH3)	3,71 (s)	59,4
2'(CH3)	1,74 (d, J=1,5)	17,0

FIGURA 4.52- Espectro de RMN ^1H (600 MHz ; MeOH)- **Composto 3**

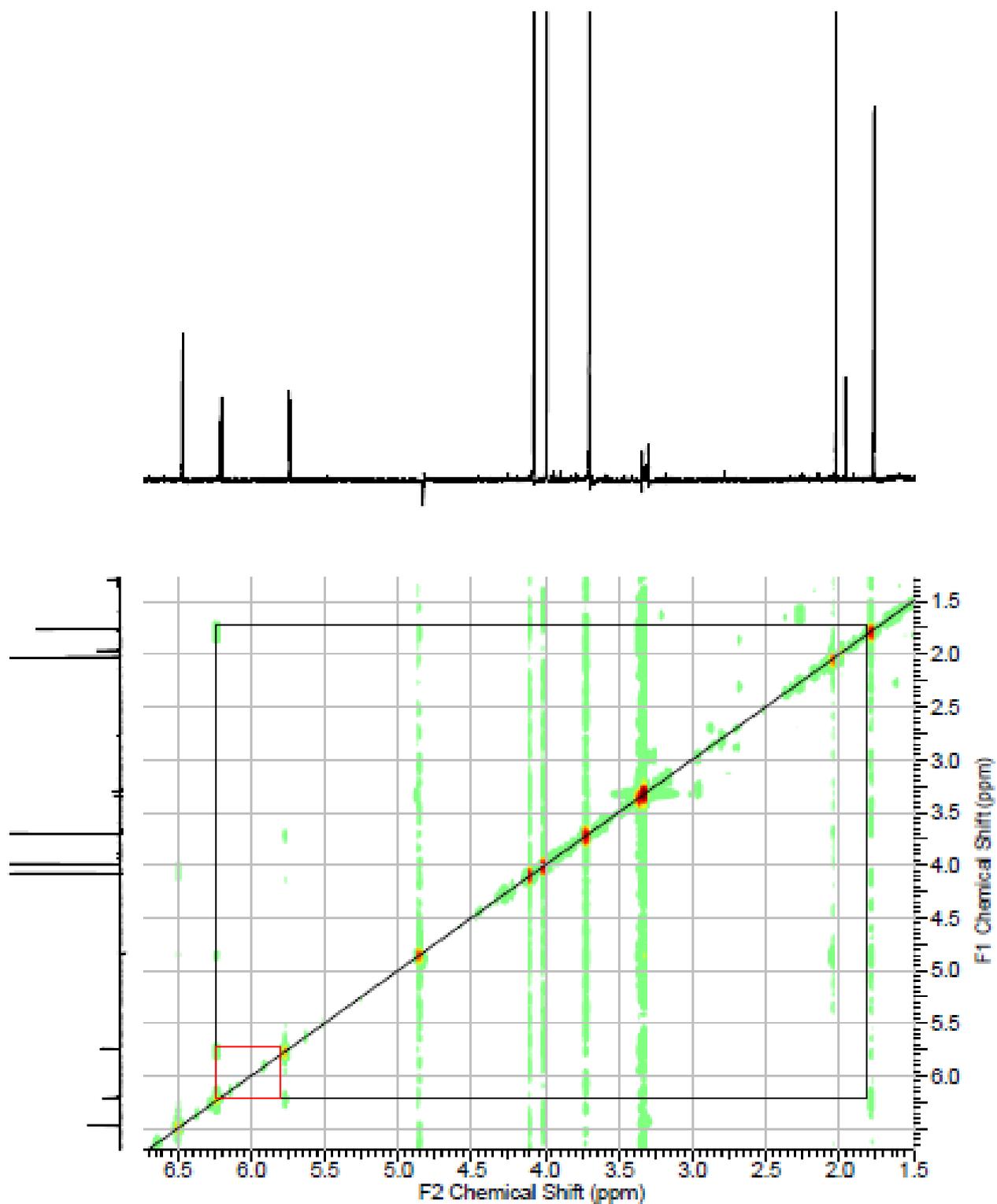
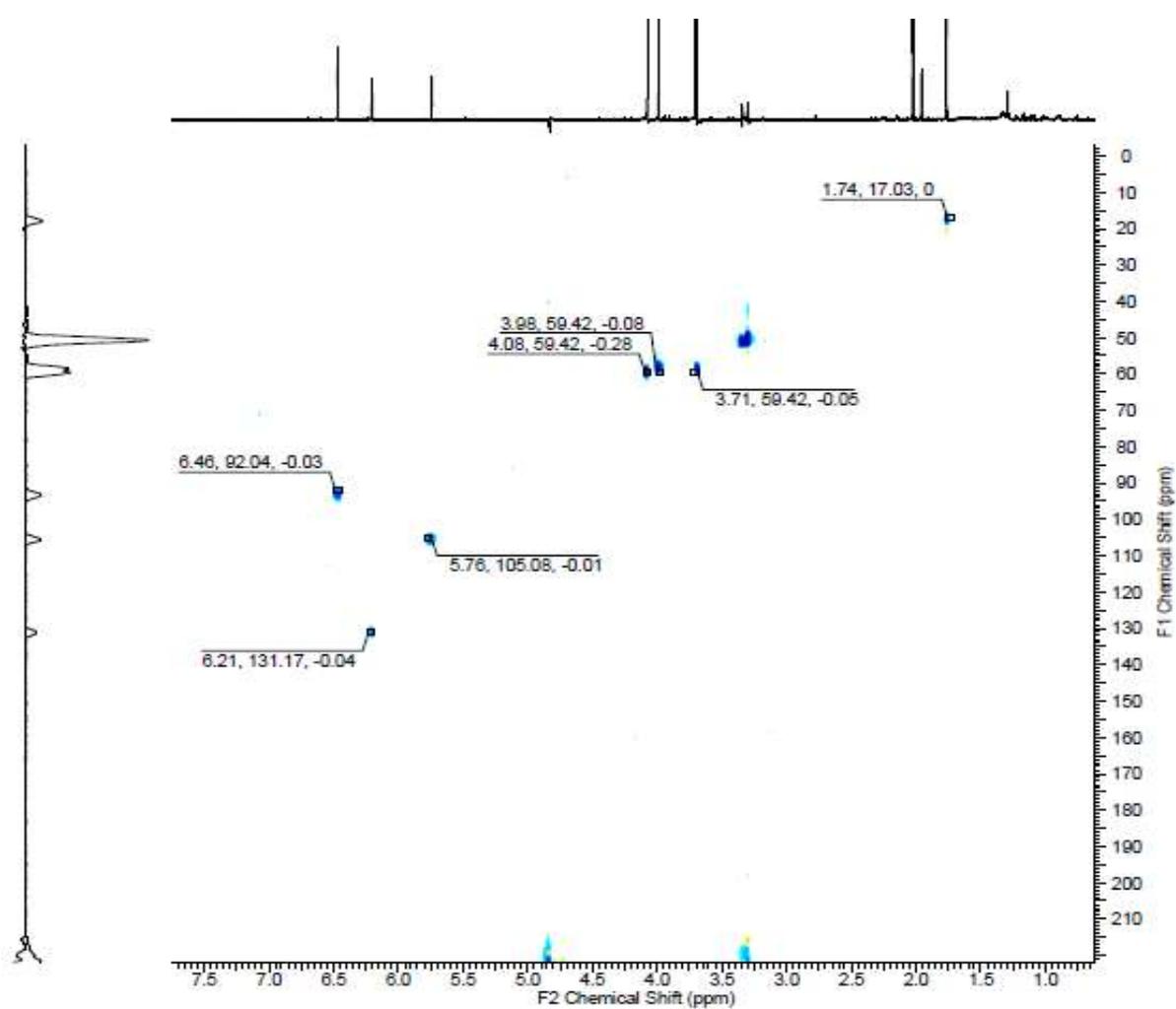


FIGURA 4.53- Mapa de contorno Cosy (600 MHz; MeoH)- **Composto 3**

FIGURA 4.54 - Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH) - **Composto 3**

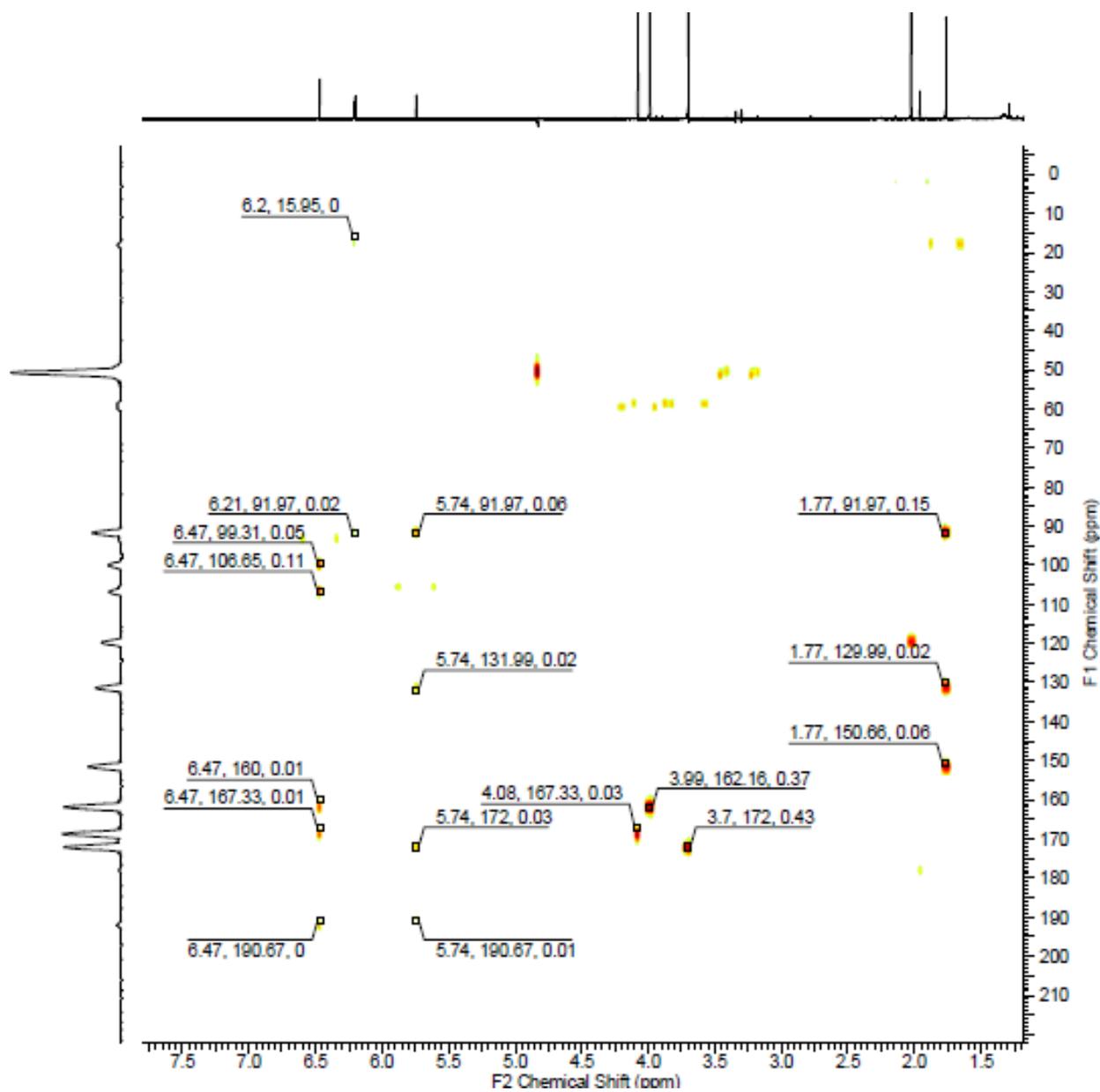


FIGURA4.55- Mapa de contorno HMBC (600MHz)- **Composto 3**

O espectro de massas obtido por ESI-MS (FIGURA 4.58) apresentou a molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 351,2, assim como o padrão isotópico do cloro $[M+2]^+$, m/z =353. Os fragmentos apresentados foram comparados com literatura (KAHSAYA, et al., 2013) e o fragmento m/z 217 confirma o anel B igual ao do composto 1 (pág 83). Contudo o composto 3 possui o anel A quinônico com maior estabilidade e dificuldade à fragmentação a qual segue um caminho um pouco diferente

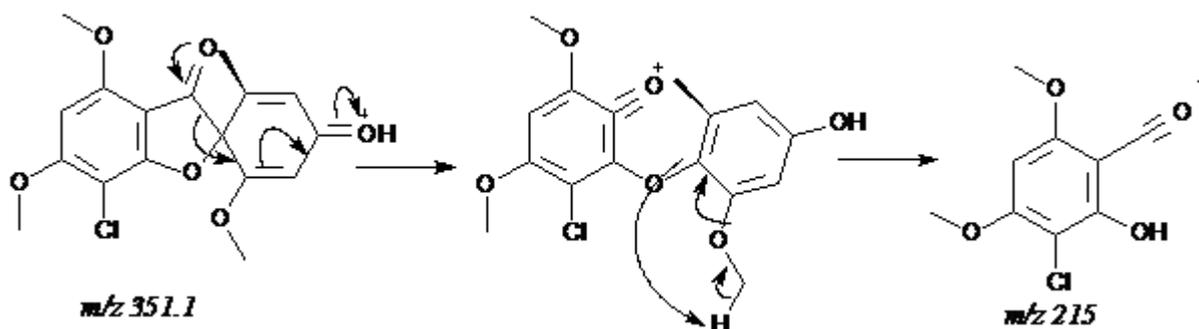


FIGURA 4-56 Proposta de fragmentação 1 do **Composto 3**

O sistema quinônico leva a uma estabilidade à molécula, dificultando a ruptura da ligação entre os anéis A e C. A perda de metoxila e metila ocorreram em maior intensidade como mostrado na proposta de fragmentação 2

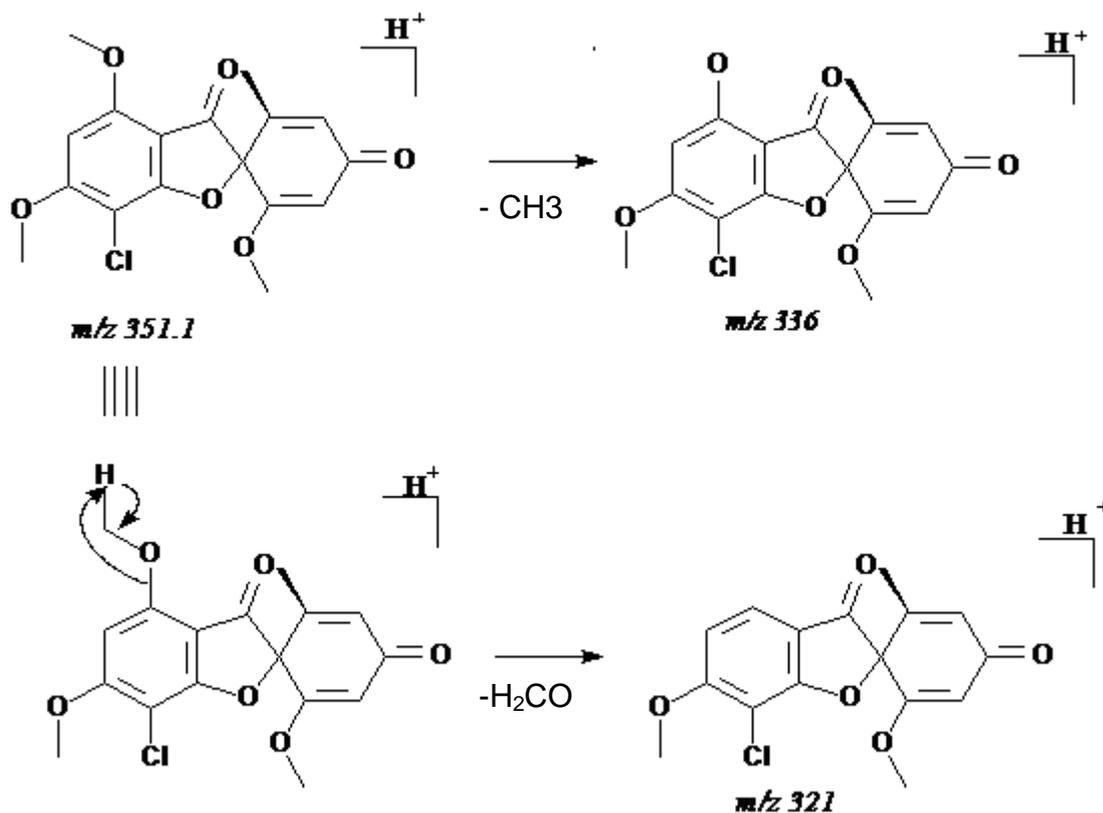


FIGURA 4-57 Proposta de fragmentação 2 do **Composto 3**

O composto 3 foi confirmado pelo espectro de massas obtido por GC-MS (FIGURA 4.59). A junção de todos os dados experimentais obtidos e a comparação com os dados fornecidos pela literatura chegou-se a identificação estrutural da molécula 3 com a desidrogriseofulvina,

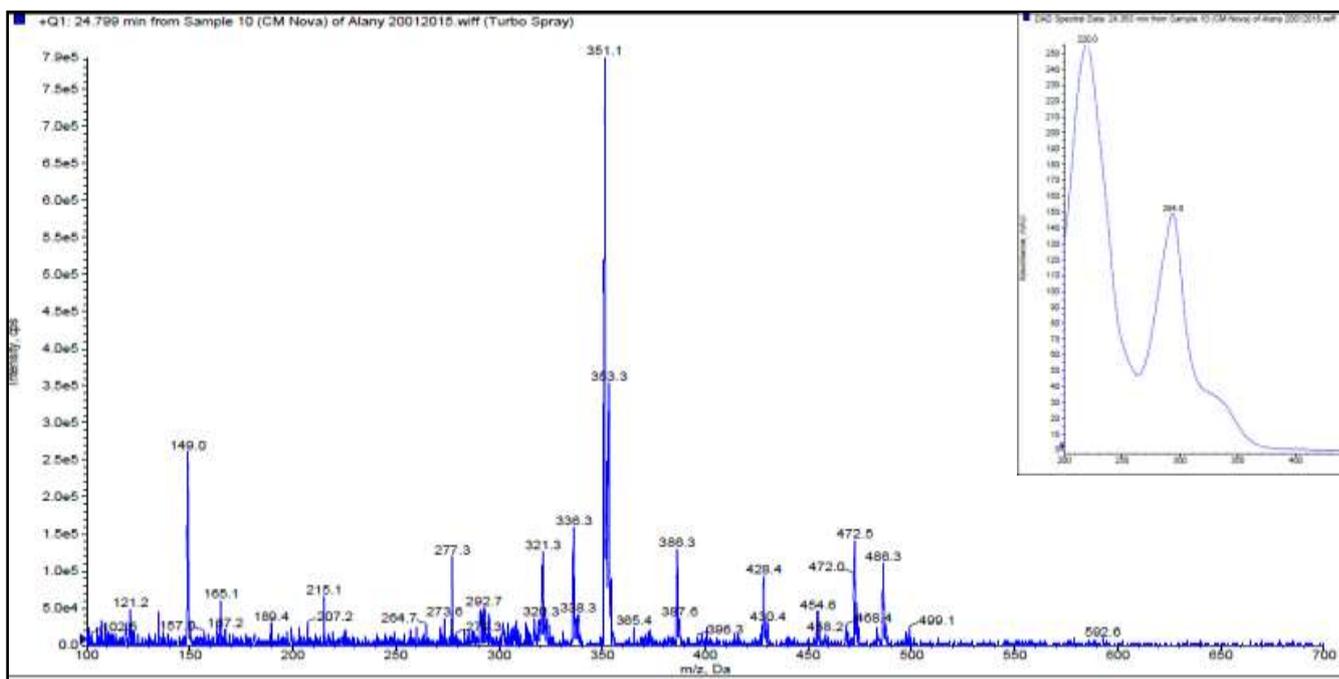


FIGURA 4. 58 Espectro de Massas do **Composto 3** (LC-MS).

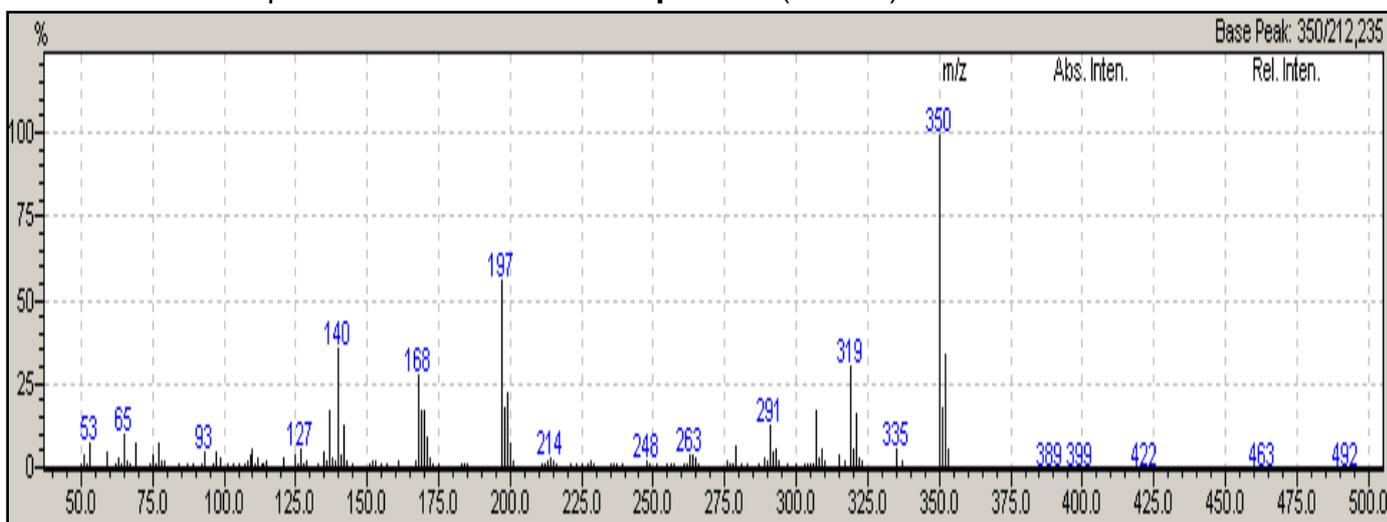


FIGURA 4.59 - Espectro de Massas do **Composto 3** (GC-MS)

4.9.1.4 Identificação estrutural da substância 4

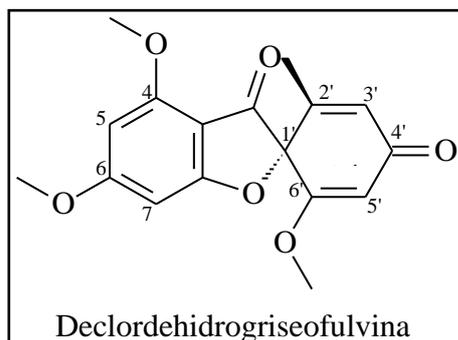


FIGURA 4. 60: Estrutura química da **Declorodehidrogriseofulvina**.

A substância 4 (FIGURA 4.60) foi isolada da fração acetato de etila do fungo *M. levispora*, como um sólido amarelado. No cromatograma obtido por LC-SPE-NMR, podemos notar que esse metabólito corresponde a banda 2, cujo tempo de retenção é TR= 22.04 min. No cromatograma de HPLC-UV, a substância 4 corresponde à banda 4. A identificação desse composto como pertencente à classe das griseofulvina foi possível pela análise dos espectros de RMN de em 1D e 2D (em MeOH) e comparados com os dados encontrados na literatura (WUBSHET, et al., 2013).

No espectro de RMN ^1H da substância 4 (FIGURA 4.61 ;TABELA 4.8), observa-se dois dubletos com valores de deslocamentos químicos de δ_{H} 6,40 (d, 1H) e 6,27 (d, 1H) que acoplam entre si com valor de constante de acoplamento $J = 1,81$, sugerindo uma correlação *meta*, sugerindo a presença de um anel aromático tetrasubstituído. Os sinais em δ_{H} 5,75 (d, 1H) e 6,20 (m, 1H) indicaram o anel A igual ao da substância 3. O acoplamento entre esses sinais podem ser vistos no espectro de Cosy (FIGURA 4.63), assim como pode ser vista a correlação entre o sinal de H-3' (6,20, m) e os hidrogênios da metila (1,80, d, $J=1,65$, 3H). Em relação às metoxilas, o padrão para griseofulvina se repete, exibindo valores três metoxilas na regiões de δ_{H} 3,97 (s, 3H), 3,93 (s, 3H) e 3,69 (s, 3H). Essa estrutura é bastante semelhante a estrutura 3, diferindo apenas pela presença do cloro em 3 e ausência em 4. Os valores atribuídos aos carbonos foram obtidos através dos espectro de HSQC (FIGURA 4.64) e HMBC (FIGURA 4.65)

TABELA 4-8: Dados de RMN ^1H (600MHz ; MeOH)- **Composto 4**

Posição	^1H (ppm), J(Hz)	^{13}C
4		161,0
5	6,27 (d, J=1,65)	95,1
6		174,0
7	6,40 (d, J=1,93)	89,8
8		180,0
9		105,0
1'		91,3
2'		149,0
3'	6,20 (m)	130,5
4'		180,0
5'	5,75 (d, J=1,4)	105,5
6'		173,0
3 (C=O)		
4(OCH3)	3,97 (s)	56,6
6(OCH3)	3,93 (s)	59,1
6'(OCH3)	3,71 (s)	59,1
2'(CH3)	1,81 (d, J= 1,65)	17,3

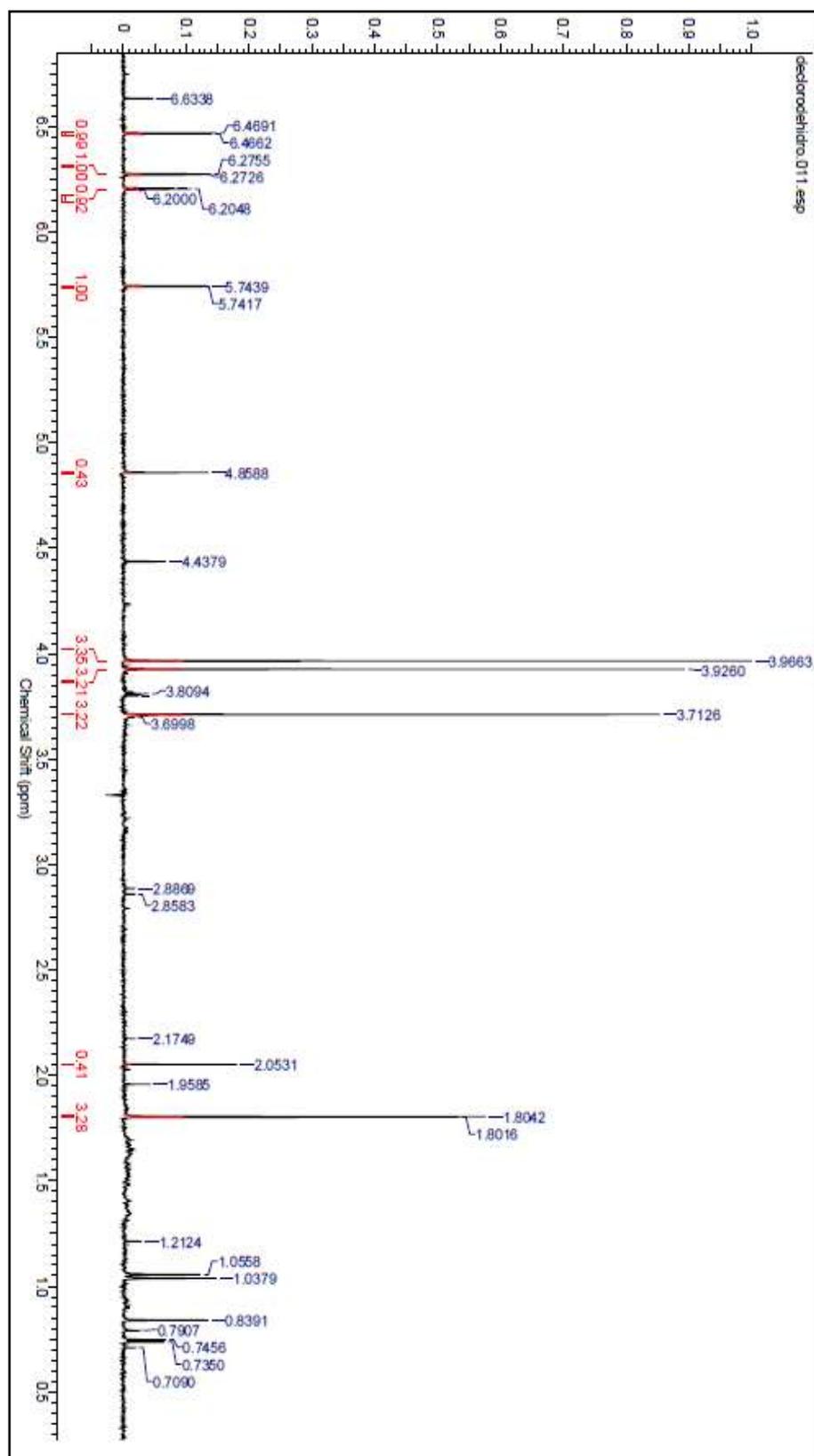


FIGURA 4.61- Espectro de RMN ^1H (600MHz ; MeOH)- **Composto 4**

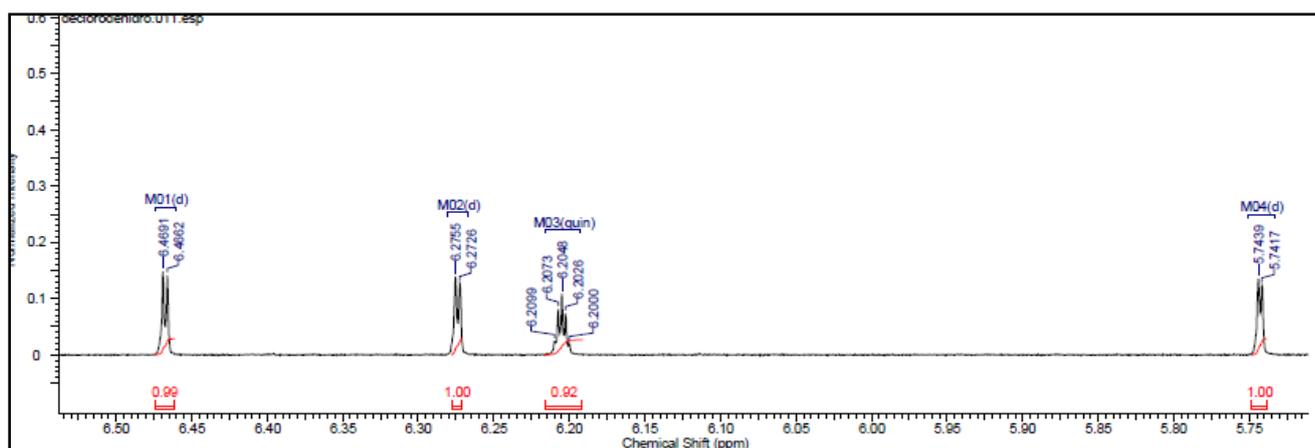


FIGURA 4.62- Ampliação na região dos aromáticos do espectro de RMN ^1H (600MHz ; MeOH)- **Composto 4**

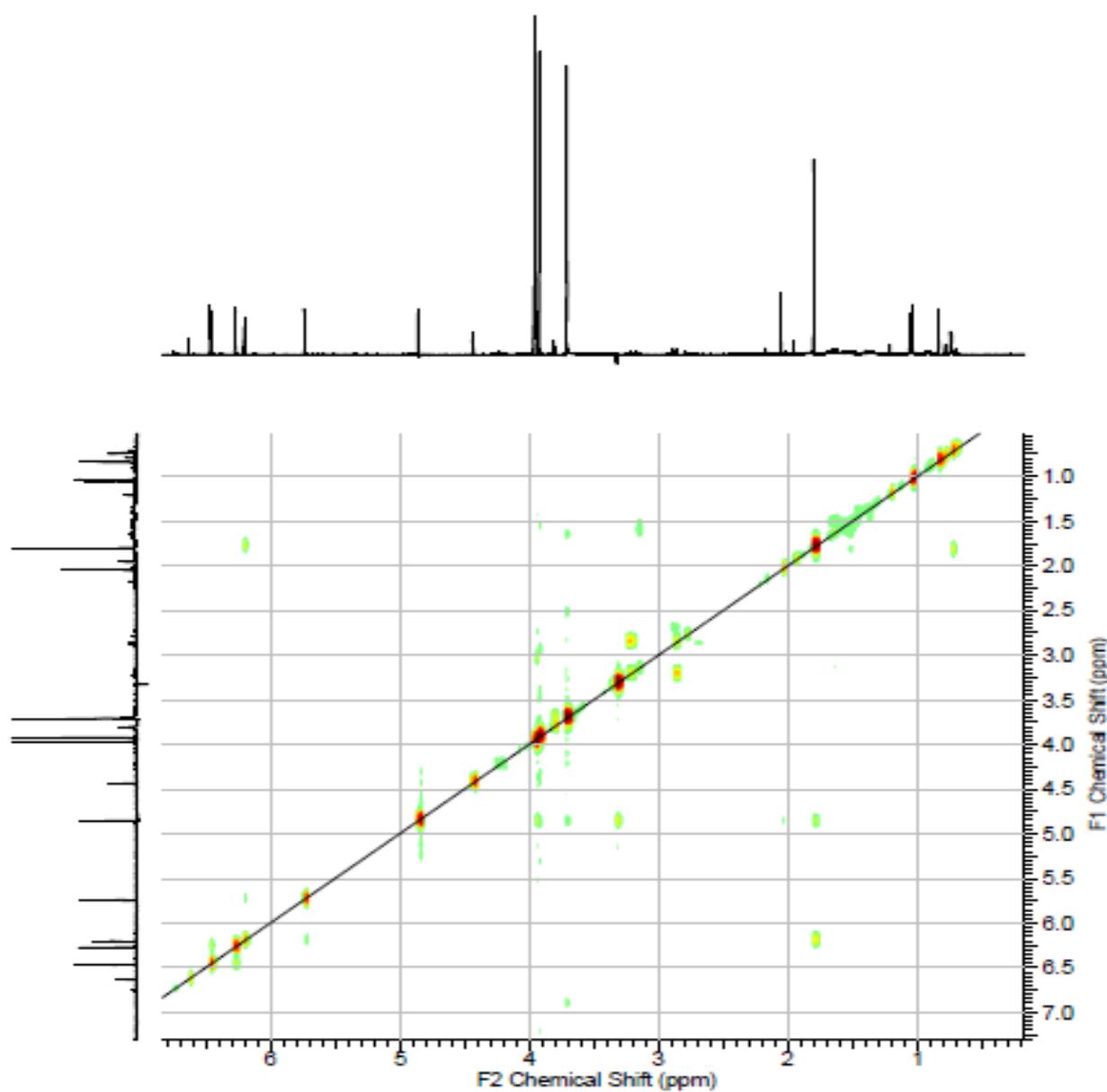


FIGURA 4.63- Mapa de contorno COSY (600MHz, MeOH)- **Composto 4**

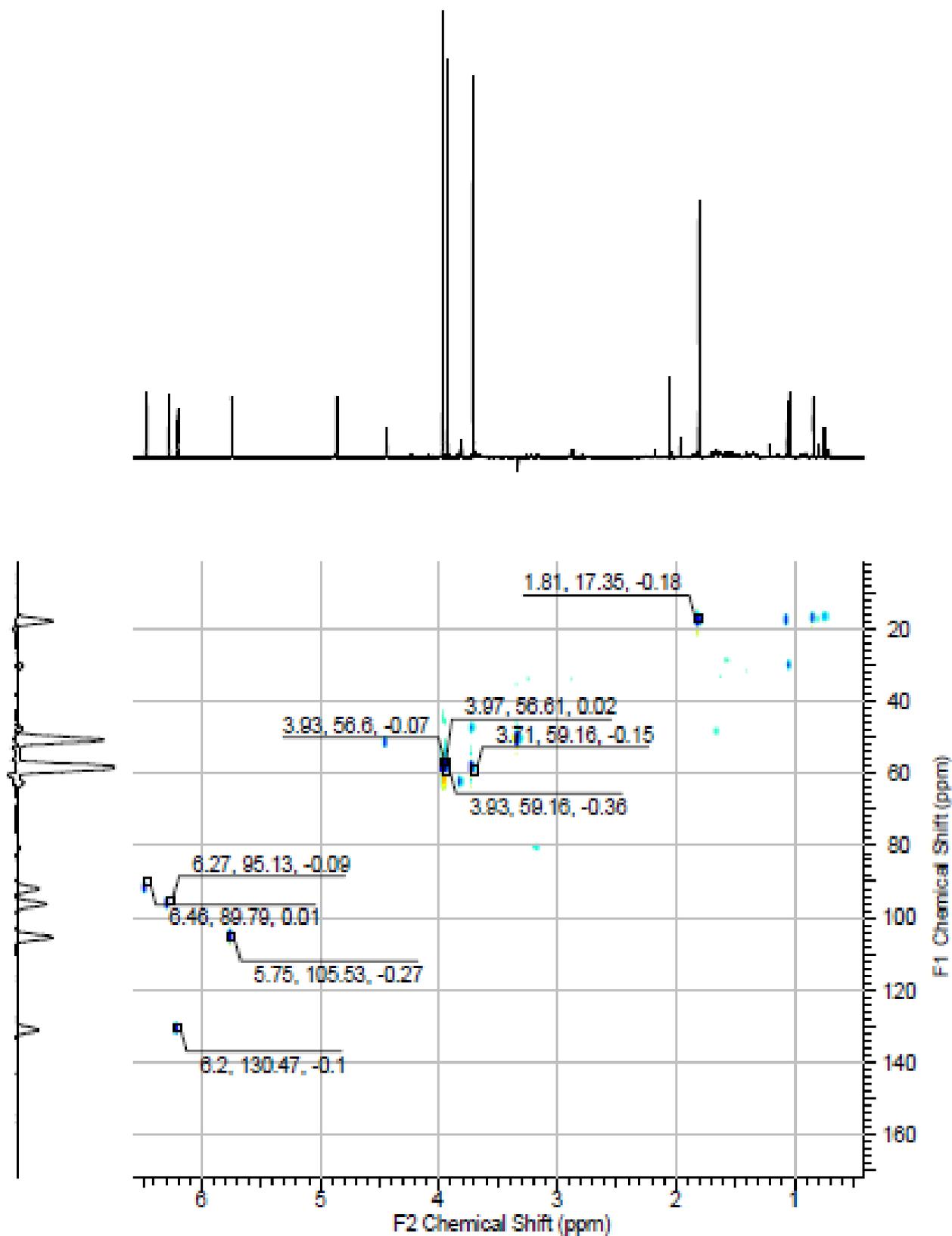


FIGURA 4.64 - Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- **Composto 4**

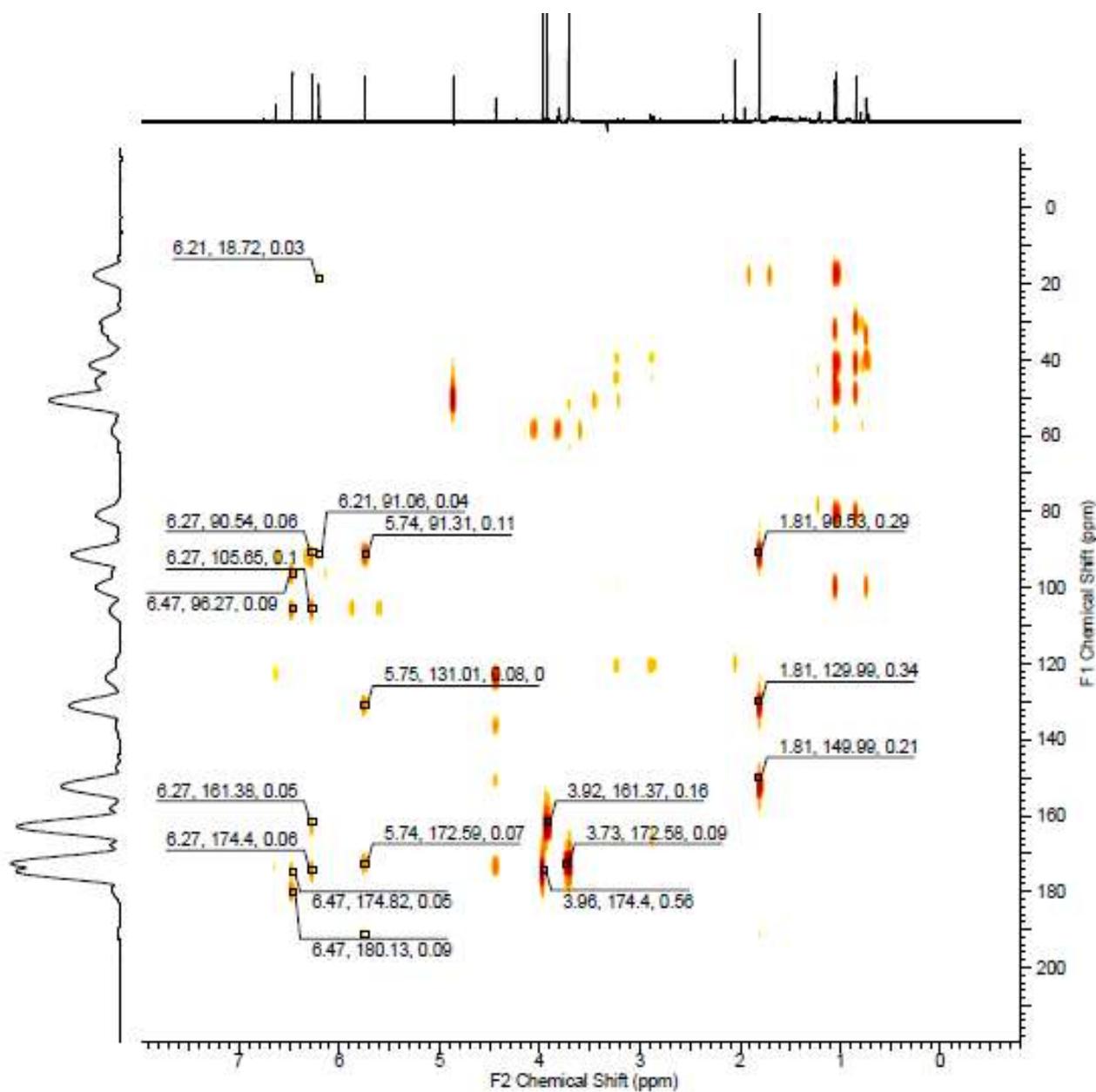


FIGURA 4.65 -- Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH)- **Composto 4**

O sinal do íon molecular m/z 317, apresentado no espectro de massas obtido por LC-MS (FIGURA 4.64), corresponde à molécula protonada $[M+H]^+$. Nota-se também através do íon m/z 339, a presença da formação do aduto $[M+Na]^+$. O TR dessa amostra por essa técnica foi de 22.12 min. As duas bandas de absorção no DAD com valores de $\lambda_{\text{Max}} = 214$ e $\lambda = 290$ encontradas, correspondentes ao anel B e A para a estrutura 4, foram confirmadas com as da literatura (CACHO, et al., 2013).

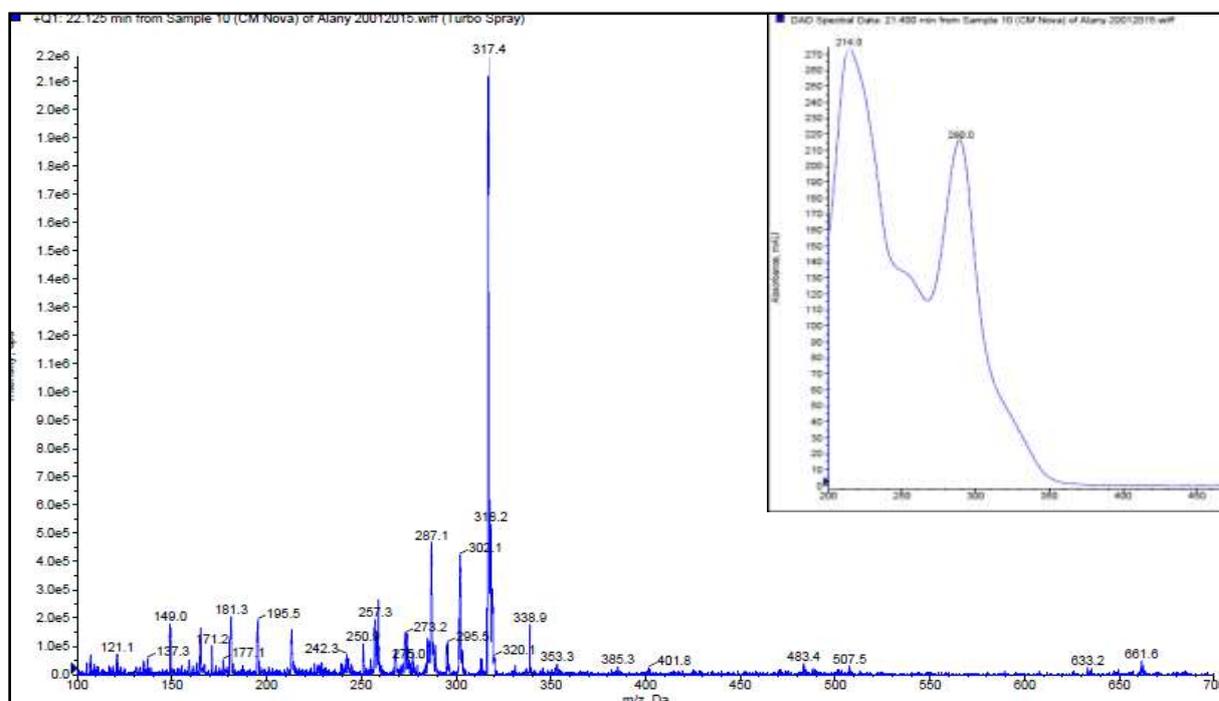


FIGURA 4.66- Espectro de massas do **Composto 4** (LC-MS)

O espectro de massa obtido por GC-MS (FIGURA 4.65) também apontou o íon m/z 316 que confirma a estrutura 4. O (TR) da substância por essa técnica foi de 25.56 min. Novamente devida à estabilidade da molécula com o anel A quinônico, a fragmentação observada no espectro de massas por LC-MS mostra íons envolvendo a ruptura com baixa intensidade. Os fragmentos mais intensos envolvem a perda da metoxila e metila como mostra a proposta de fragmentação abaixo (FIGURA 4.67)

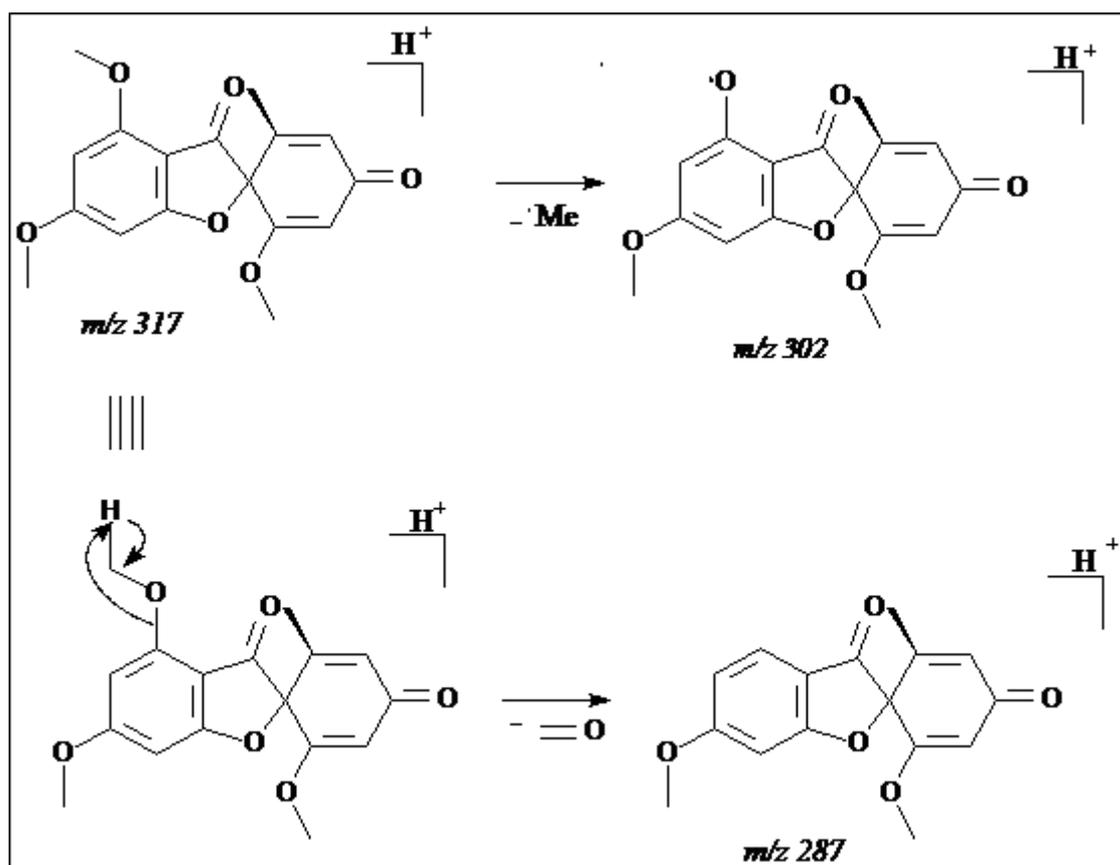


FIGURA 4.67 Proposta de Fragmentação para o **Composto 4**

Estes dados bem como sua fragmentação foram comparados com a biblioteca do software e com a literatura (KAHSAYA, et al., 2013) que reforçaram os dados obtidos anteriormente e levaram a identificação da substância 4 como sendo a declorodehidrogriseofulvina.

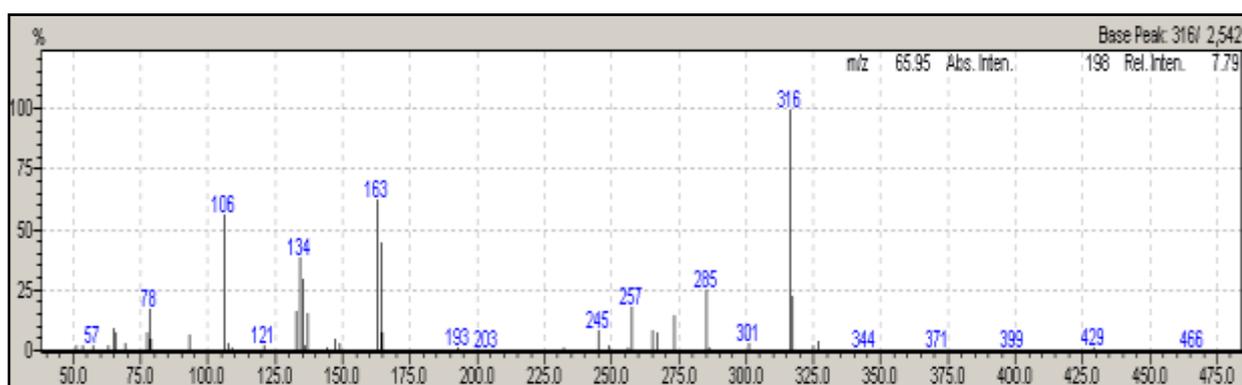


FIGURA 4.68- Espectro de massas do **Composto 4-** (CG-MS)

4.9.1.5 Elucidação estrutural substância 5

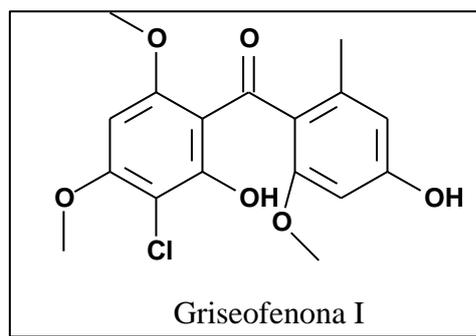


FIGURA 4.69: Estrutura química da Griseofenona I

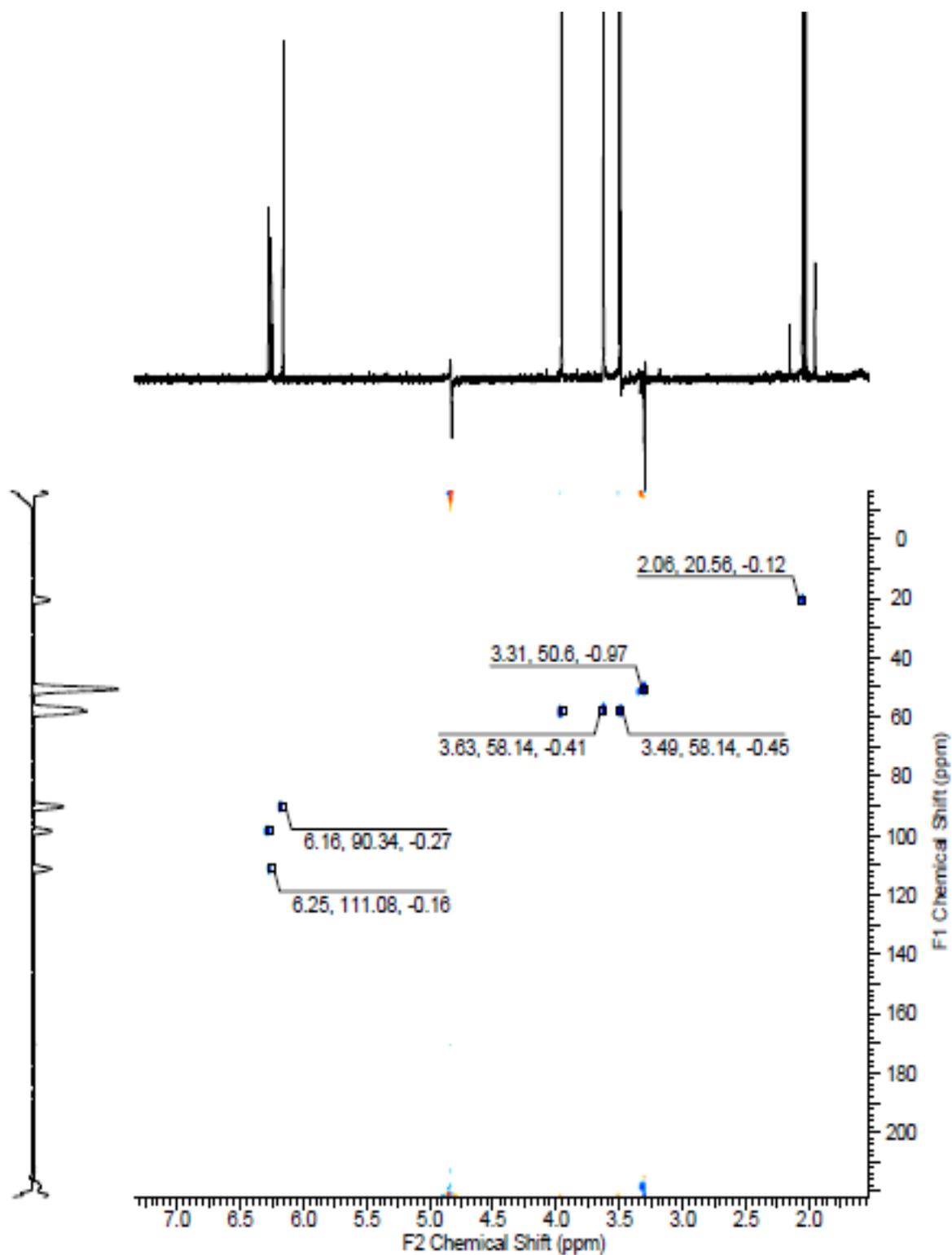
A substância 5 (FIGURA 4.69) isolada da fração acetato, apresentou tempo de retenção de (TR) 30.61 min representada pela banda cromatográfica 6 coletada no LC-SPE-NMR. No cromatograma de HPLC-UV a substância 5 corresponde à banda 12. Esse metabólito foi isolado com uma pureza considerável e identificado pela análise dos espectros de RMN e LC-MS e comparando-a com os dados de estruturas parecidas presentes na literatura (WUBSHET, et al., 2013).

O espectro de RMN ^1H da substância 5 (FIGURA 4.70; TABELA 4.9) apresentou sinal de singlete $\delta_{\text{H}}6,16$ (1H) na região de aromático característico do H-5 do anel B das griseofulvinas. Os dubletos em $\delta_{\text{H}}6,26$ (d, 1H) e 6,28 (d, 1H), com constante de acoplamento $J= 1,5$, sugerem o anel A também aromático e estes foram atribuídos aos hidrogênios H-5' e H-3' do anel aromático A do esqueleto. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 3,96$ (3H), 3,63 (3H) e 3,50 (3H) foram atribuídos às metoxilas. O sinal de singlete em $\delta_{\text{H}} 2,06$ (3H) foi atribuído ao hidrogênio da metila ligada ao C-2'. O experimento de NOESY (FIGURA 4.73A) 1D ao irradiar o sinal em $\delta_{\text{H}} 6,16$, verificou-se o efeito NOE nas metoxilas em $\delta_{\text{H}} 3,96$ (s, 3H) e 3,50 (s, 3H), permitindo atribuí-los respectivamente ao 4-OMe e 6-OMe. A irradiação do sinal $\delta_{\text{H}}6,26$ (FIGURA 4.73B) mostrou o efeito NOE somente em uma metoxila a $\delta_{\text{H}} 3,63$ (s, 3H). Estes dados confirmam não haver total simetria no anel A, ou seja, os sinais para H-3' e H-5' possuem pequena diferença.

Os sinais de carbono, foram atribuídos através dos experimentos espectros de 2D HMBC (FIGURA 4.72) e HSQC (FIGURA 4.71).

TABELA 4.9: Dados de RMN ^1H (600MHz; MeOH)- **Composto 5**

Posição	^1H(ppm), j (Hz)	^{13}C
4		159
5	6,16 (s, 1H)	86,9
6		162,0
7		97,1
8		
9		107,4
1'		124,5
2'		135,2
3'	6,26 (d= 2,0, 1H)	108,3
4'		160,0
5'	6,30 (d = 2,0, 1H)	97,8
6'		156
3 (C=O)		200,9
4(OCH3)	3,9 (s, 3H)	55,2
6(OCH3)	3,5 (s, 3H)	56,0
6'(OCH3)	3,9 (s, 3H)	55,2
2'(CH3)	2,06 (s, 3H)	20,5

FIGURA 4.71 - Mapa de contorno HSQC - 600 MHz (MeOH)- **Composto 5**

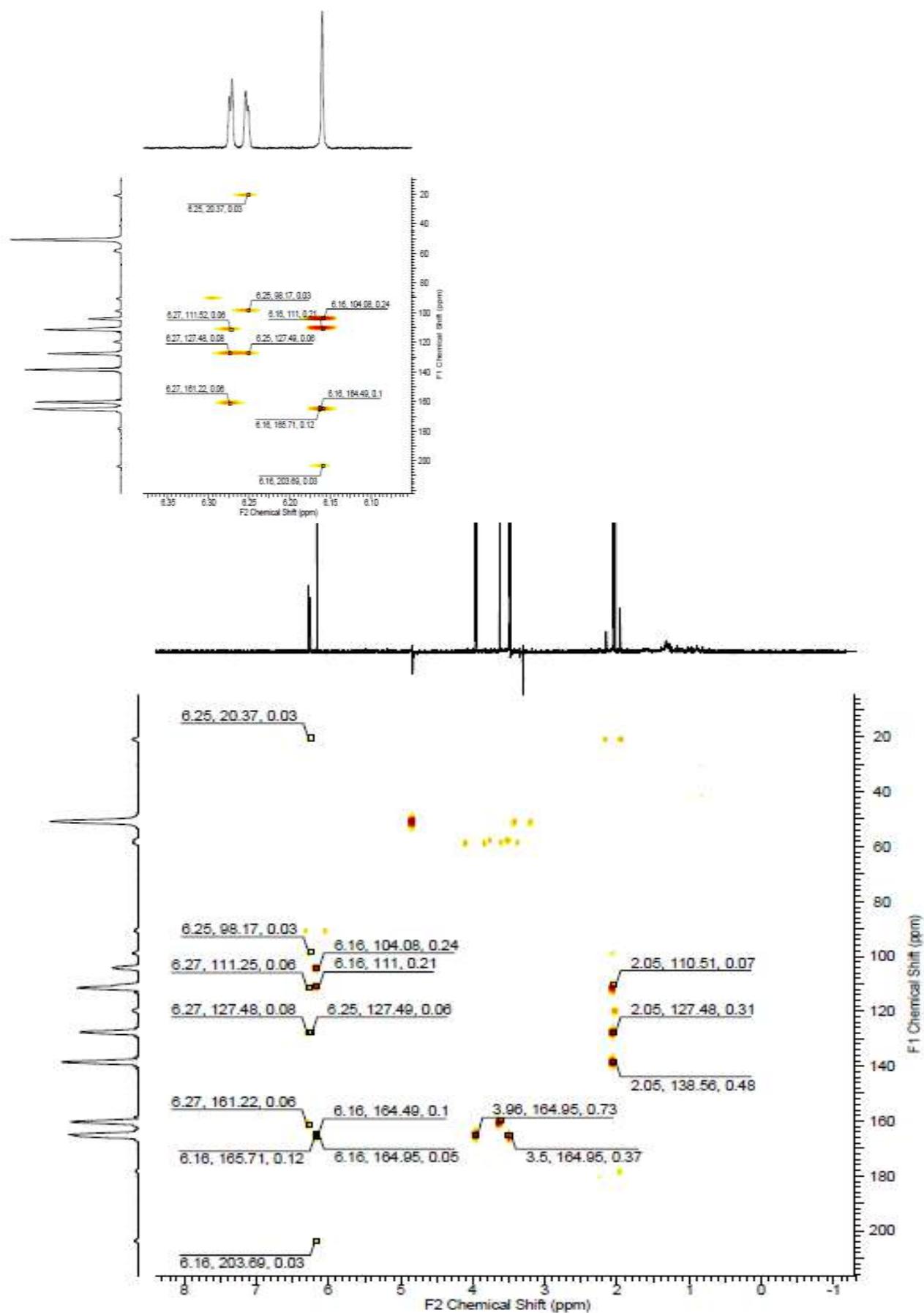


FIGURA 4.72 - Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH) com sua ampliação na região dos aromáticos - **Composto 5**

O espectro de massas (FIGURA 4.75) apresentou a molécula protonada $[M+H]^+$ cujo íon apresenta razão m/z 353. A presença de cloro pode ser confirmada através do padrão isotópico $[M+2]^+$ representado pelo íon m/z 355. O fragmento m/z 215, confirma o anel B, igual ao composto 1. A grande intensidade do íon m/z 165 reforça o anel C estar aberto, facilitando a fragmentação, como mostrado na proposta de fragmentação abaixo (FIGURA 4.74)

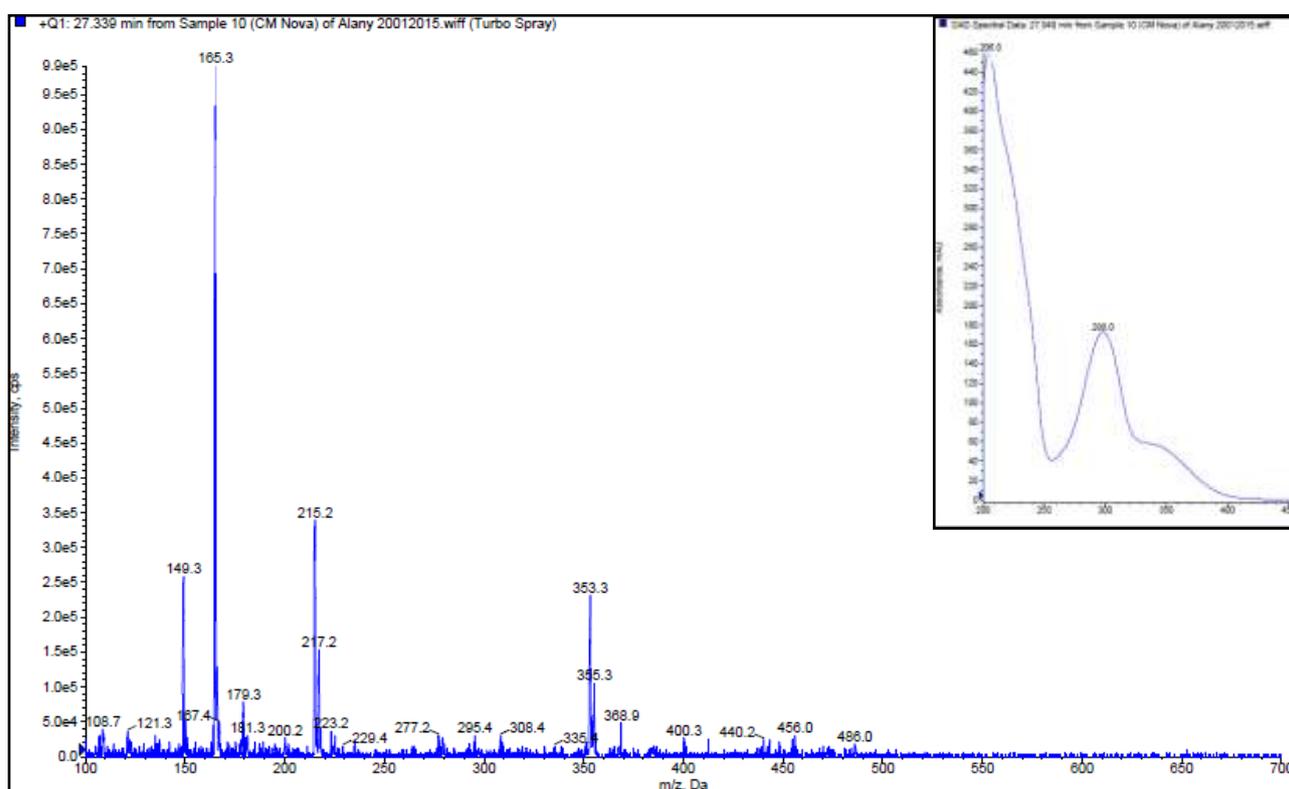


FIGURA 4.73- Espectro de Massas do **Composto 5** (LC-MS)

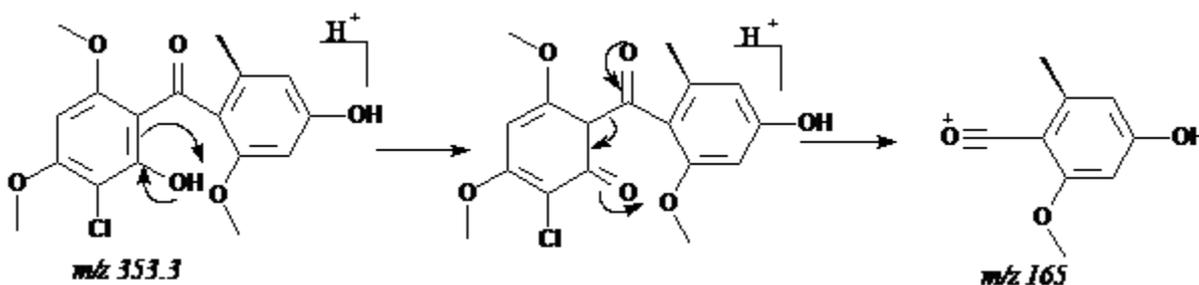


FIGURA 4.74 Proposta de Fragmentação do **Composto 5**

A junção de todos os dados experimentais e a comparação com estruturas similares descrita na literatura levaram a identificação Griseofenona I (3-chloro-2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)(2-hydroxy-4-methoxy-6-methylphenyl)methanone. Esse metabólito é inédito na literatura.

Por não possuí um nome usual e facilitar a identificação para esta e as outras estruturas à seguir, chamaremos de Griseofenonas, o esqueleto das griseofulvinas aberto como é encontrado na literatura, para isso daremos continuidades a seqüência já existente de A-H.

4.9.1.6 Identificação estrutural substância 6

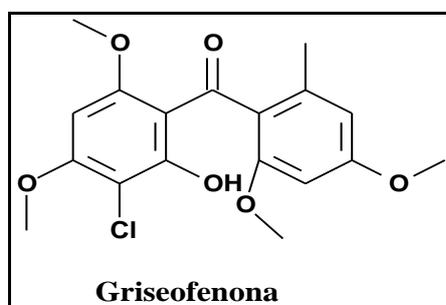


FIGURA 4.75 –Estrutura química Grisefenona J

A substância 6 (FIGURA 4.76) também foi isolada com uma pureza considerável. O tempo de retenção (TR) no LC-SPE-NMR é de 38,81 min correspondente à banda de número 8. No cromatograma de HPLC-UV a substância 6 corresponde à banda 11.

No espectro de RMN ^1H da substância 6 (FIGURA 4.77; TABELA 4.10), verifica-se a presença de um sinal a mais de metoxila e um singleto em $\delta_{\text{H}}6,41$ com integral para 2 hidrogênios. Esses dados indicam a presença de metoxila em c-4', o que leva à uma certa simetria no anel A, justificando o singleto em $\delta_{\text{H}}6,41$, o qual corresponde aos hidrogênios H-3' e H-5'. Através do experimento d HSQC (FIGURA 4.79) podemos confirmar a sobreposição dos hidrogênios, pois o sinal em $\delta_{\text{H}}6,41$ correlaciona com 2 carbonos diferentes ($\delta_{\text{C}} 108,5 ; 97,8$)

Um sinal de singleto na região de aromático $\delta_{\text{H}} 6,19$ (s, 1H) indica a presença de um anel aromático pentassubstituído, semelhante ao da estrutura 1. Assim como

para a griseofulvina, verificamos a presença de três metoxilas, cujos deslocamentos químicos são: δ_{H} 3,99 (s, 3H), 3,84 (s, 3H) 3,50 (s, 3H), além do sinal adicional da metoxila em δ_{H} 3,64 (s, 3H) correspondente à posição H-4'. O sinal de singlete em δ_{H} 2,15 (3H) foi atribuído ao hidrogênio da metila ligada ao C-2'.

TABELA 4.10- Dados de RMN 600MHz ^1H (MeOH)- **Estrutura 6**

Posição	^1H (ppm), j (Hz)	^{13}C
4		162,0
5	6,19 (s, 1H)	89
6		162,0
7		100,5
8		
9		107,4
1'		124,5
2'		130
3' e 5'	6,41 (s, 2H)	108,5; 97,8
4'	3,9(s, 1H)	196
6'		164
3 (C=O)		204
4(OCH3)	3,9 (s, 3H)	55,2
6(OCH3)	3,8 (s, 3H)	56,0
6'(OCH3)	3,9 (s, 3H)	55,2
2'(CH3)	2,15 (s, 3H)	17,9

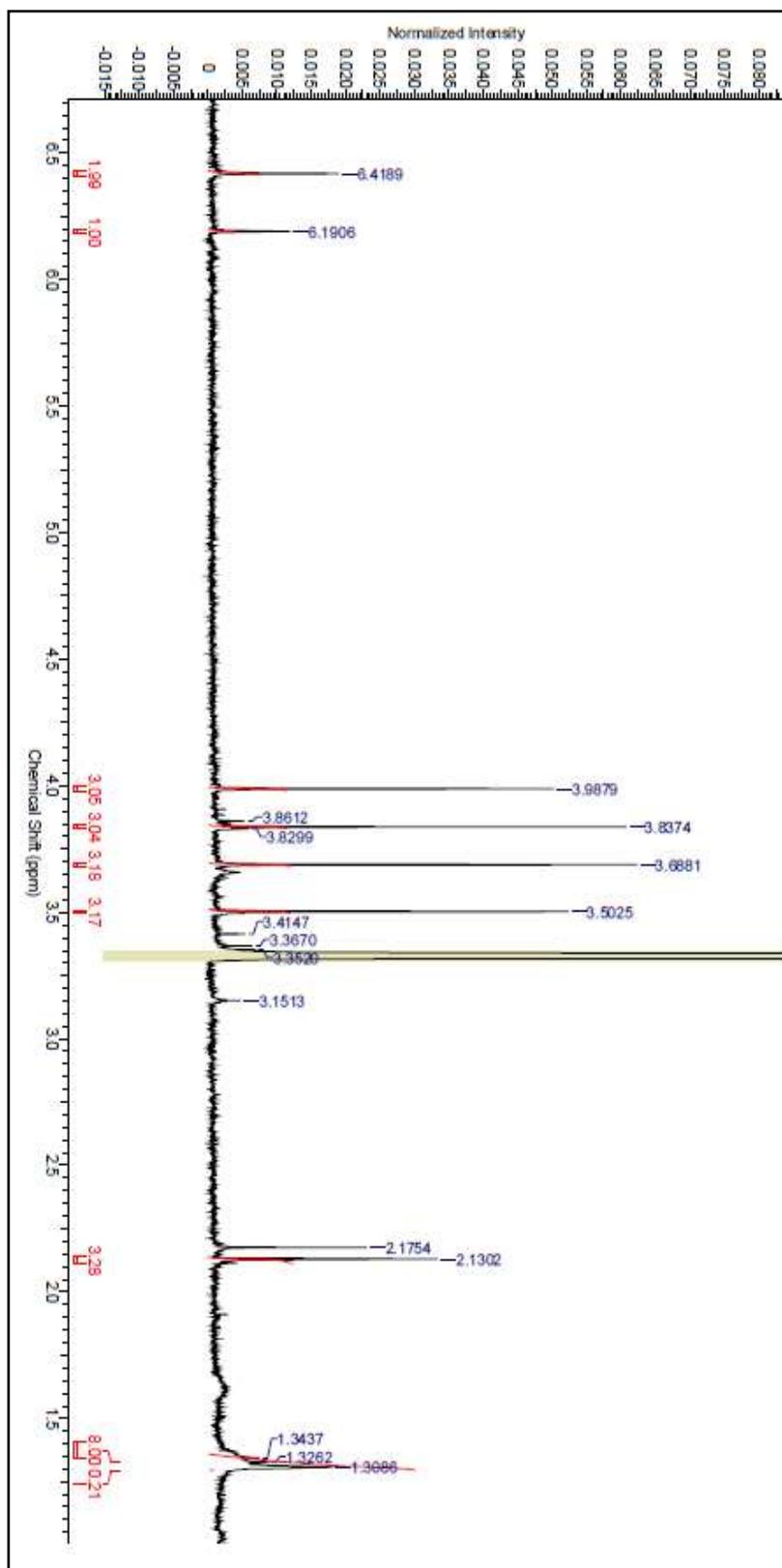
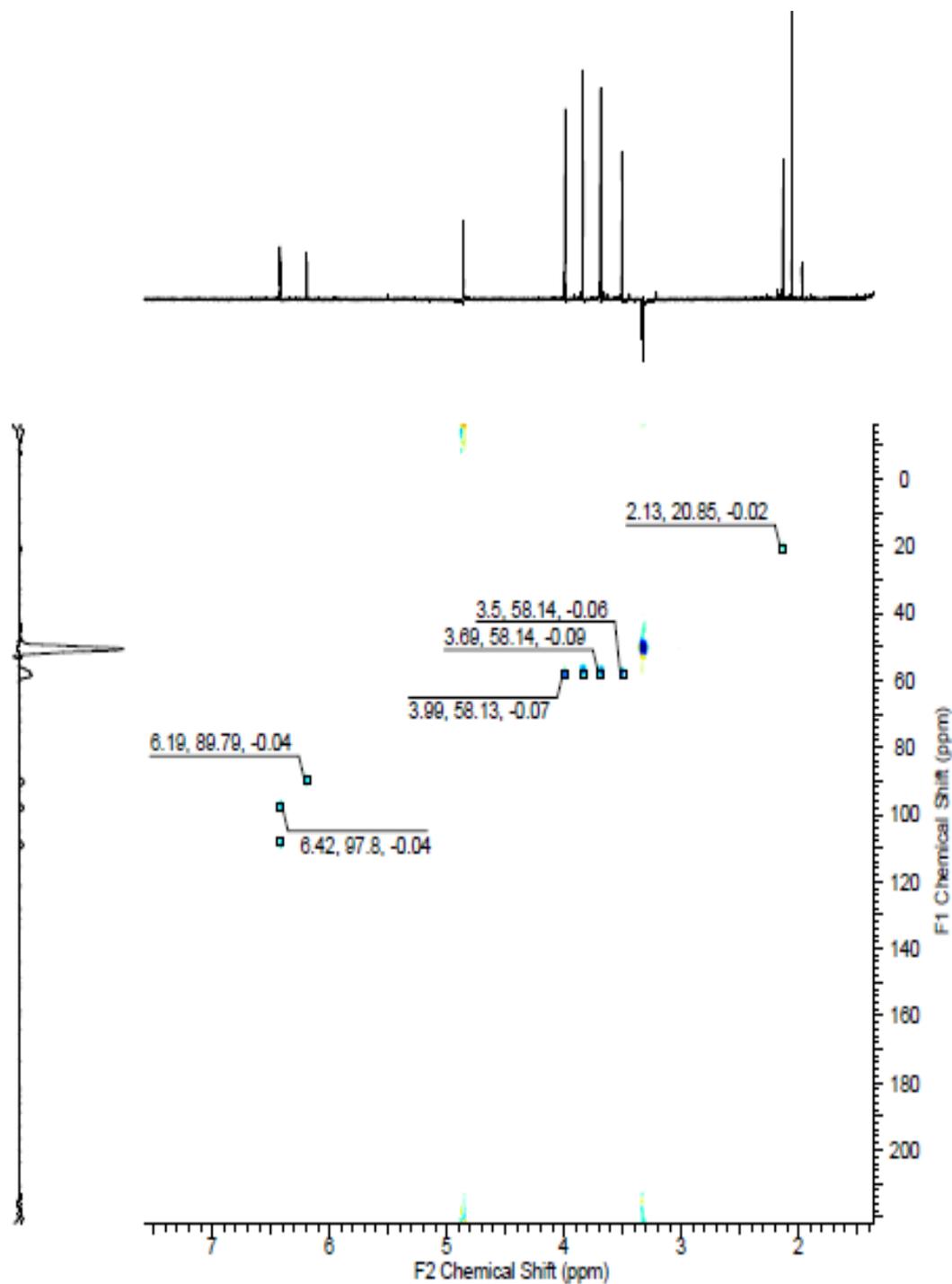


FIGURA 4.76- Espectro de RMN ^1H - (600 MHz; MeOH)- **Composto 6**

FIGURA 4.77- Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- **Composto 6**

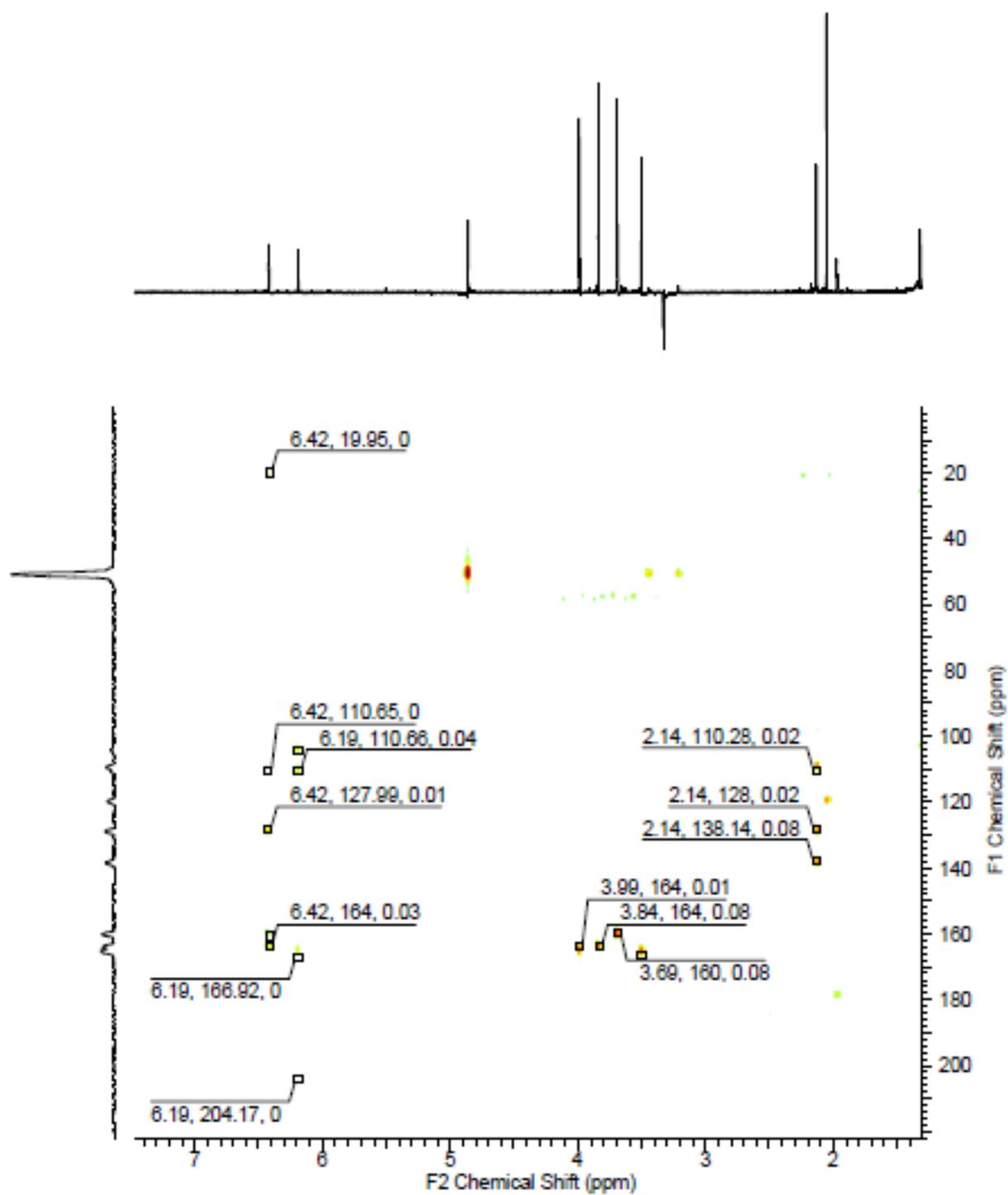


FIGURA 4.78 - Mapa de contorno HMBC- **Composto 6**

O espectro de LC-MS (FIGURA 4.81) mostra íon m/z 367.1, como sendo o pico do íon molecular. Sabe-se também, através do íon m/z 369.1 ($[M+2]^+$) que a estrutura apresenta um cloro, devido ao padrão isotópico existente (35%). Os fragmentos m/z 215 e m/z 179 confirmam a proposta para o composto 6.

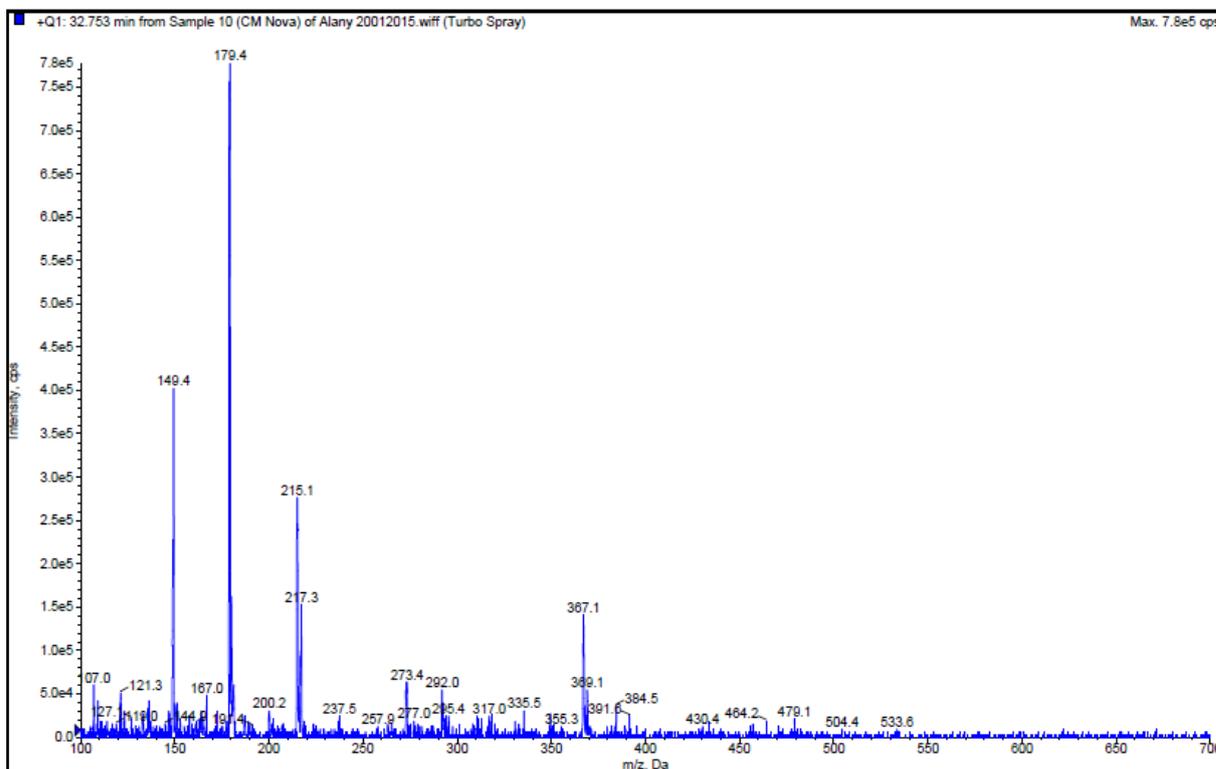


FIGURA 4.79 - Espectro de massas- Estrutura 6 (LC-MS)

A junção de todos os dados experimentais, assim como a proposta de fragmentação sugerida, levou a elucidação da Griseofenona J (3-chloro-2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)(2-hydroxy-4-methoxy-6-methylphenyl)methanone, o qual é inédito na literatura.

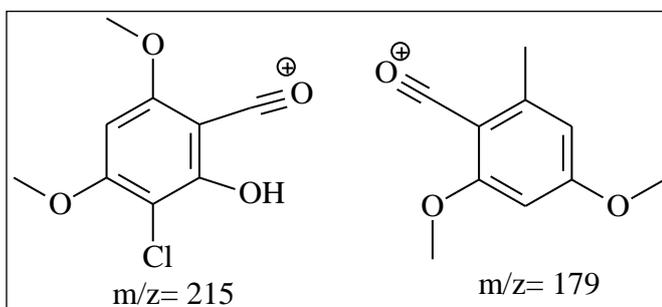


FIGURA 4.80 Proposta de Fragmentos para o **Composto 6**

4.9.1.7 Identificação estrutural substância 7

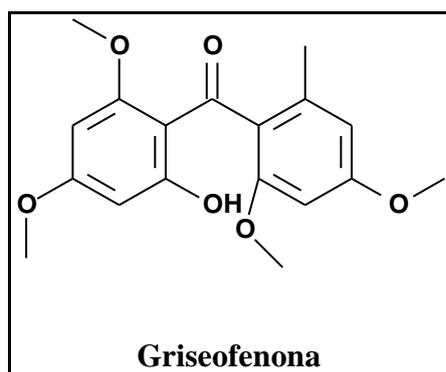


FIGURA 4. 81 – Estrutura química Griseofenona K

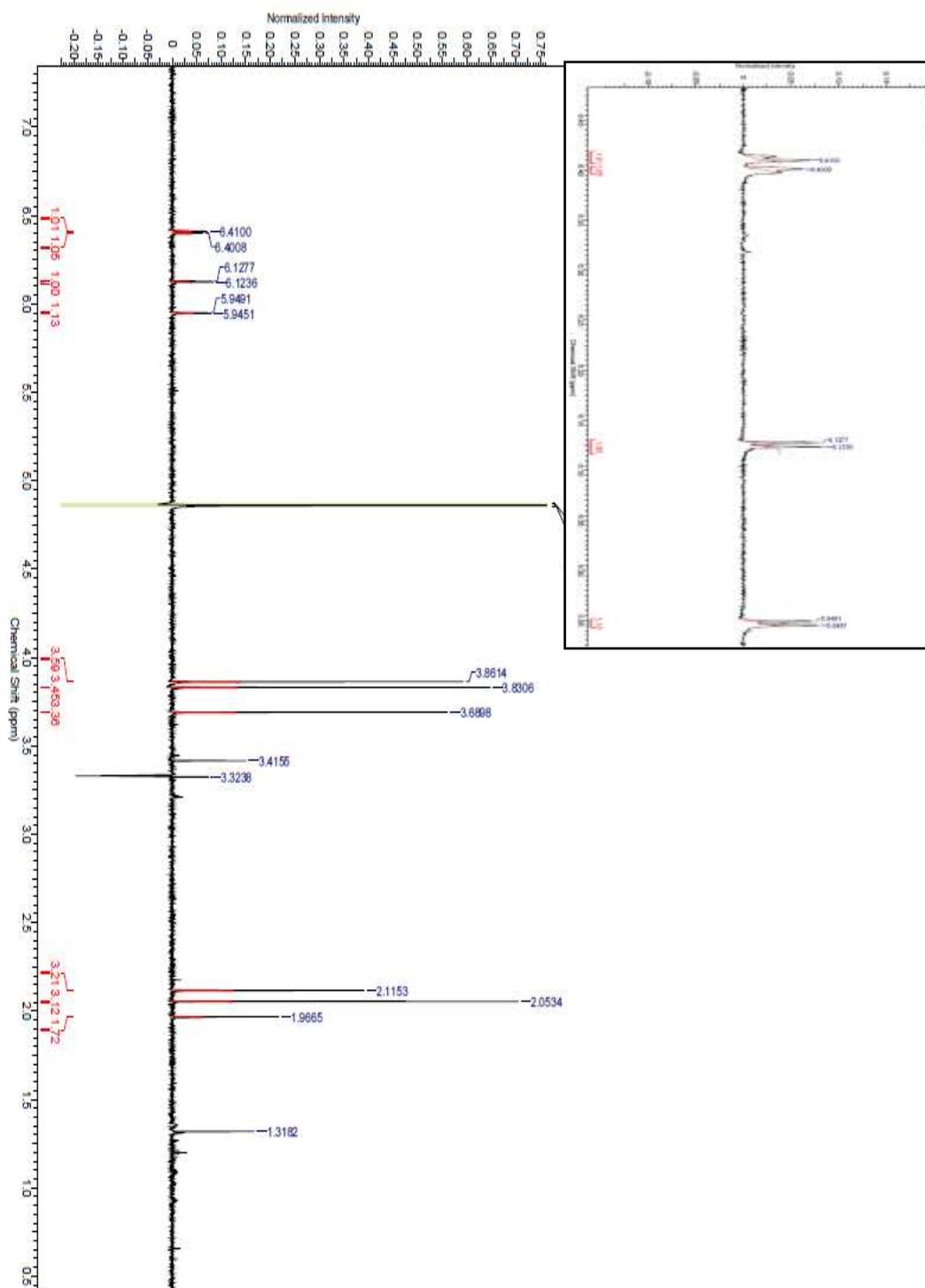
A substância 7 (FIGURA 4.83) foi obtida através do experimento LC-SPE-NMR com uma pureza considerável. O TR foi de 38.81 min correspondendo à banda 7 no cromatograma (FIGURA 4.19). No cromatograma de HPLC-UV, a substância 7 corresponde à banda 14. Os experimentos de RMN em 1D e 2D auxiliaram na proposta sugerida para a elucidação da substância 7

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.84, TABELA 4.11) apresenta 4 dubletos aromáticos, sendo 2 atribuídos ao anel B, δ_{H} 5,91 (d, $J = 2$, 1H); δ_{H} 6,12 (d, $J = 2$, 1H) e os outros 2 ao anel C, δ_{H} 6,40 (d, $J=1,9$, 1H); δ_{H} 6,41(d, $J=1,9$, 1H). Esses sinais indicam dois anéis aromáticos, sugerindo que o esqueleto da griseofulvina apresenta-se aberto, ou seja, ao invés de existir um spiro no anel C, este se abre e dá origem a 2 anéis aromáticos com rotação livre e tetrassubstituídos. Com estes dados sugerem, a ausência de cloro na estrutura. As correlações entre os hidrogênios de cada anel podem ser verificadas no espectro de COSY (FIGURA 4.85). O padrão para as metoxilas são similares aos da estrutura 6, apresentado os valores de deslocamento em δ_{H} 3,87 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,69 (s, 3H) e 3,42 (s, 3H). Para o sinal da metila ligada ao carbono C-2' (δ_{C} 20,0), foi atribuído o singlete em δ_{H} 2,11. O experimento de HMBC (FIGURA 4.87) permite propor a estrutura Griseofenona K (2,4-dimethoxy-6-methylphenyl)(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)methanone para o composto 7. O sinal em 51,96 (em RMN ^1H em δ_{H} 2,0) mostra correlação com um sinal de ^{13}C em δ_{C} 178,8 sugerindo uma impureza na amostra. A obtenção do espectro de massas será realizado para reforçar a elucidação estrutural do composto 7, o qual encontra-se na literatura como uma

benzofenona intermediária na síntese da griseofulvina, ou seja, é a primeira vez isolada na natureza.

TABELA 4.11- Dados de RMN ^1H - 600MHz (MeOH)- **Composto 7**

Posição	^1H (ppm), J (Hz)	^{13}C
4		170
5	5,91 (d, J=1,9, 1H)	93,7
6		159
7	6,12 (d, J=1,9, 1H)	96,2
8		
9		110
1'		129
2'		135,2
3'	6,40 (d, J= 2,0, 1H)	108,9
4'		165
5'	6,41 (d , J=2,0, 1H)	97,4
6'		163,3
3 (C=O)		
4(OCH3)	3,87 (s, 3H)	57,2
4'(OCH3)	3,42 (s,3H)	58,0
6(OCH3)	3,69 (s, 3H)	57,2
6'(OCH3)	3,83 (s, 3H)	57,2
2'(CH3)	2,11 (s, 3H)	20,0

FIGURA 4.82- Espectro de RMN ^1H – (600 MHz ;MeOH) do **Composto 7**

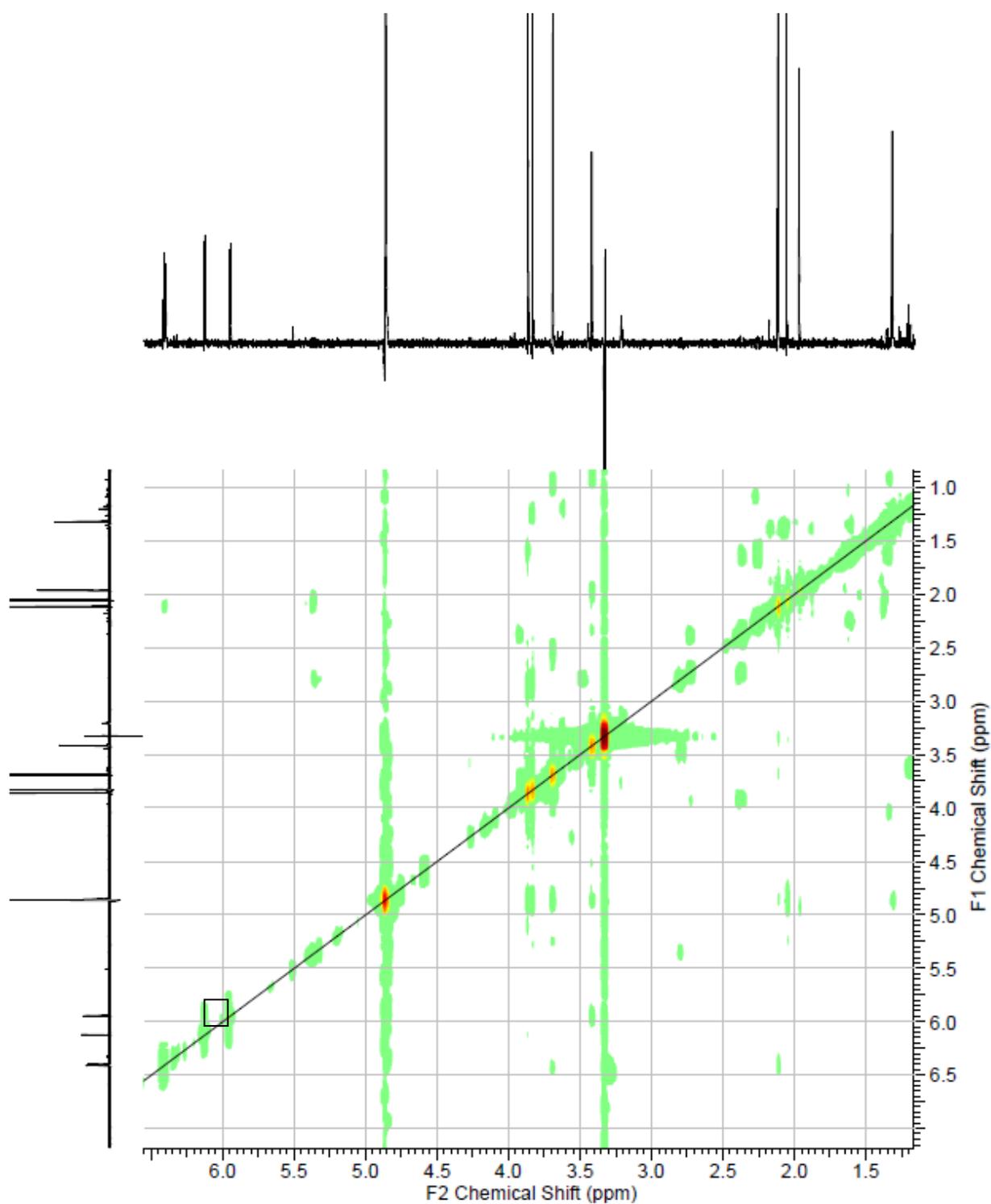
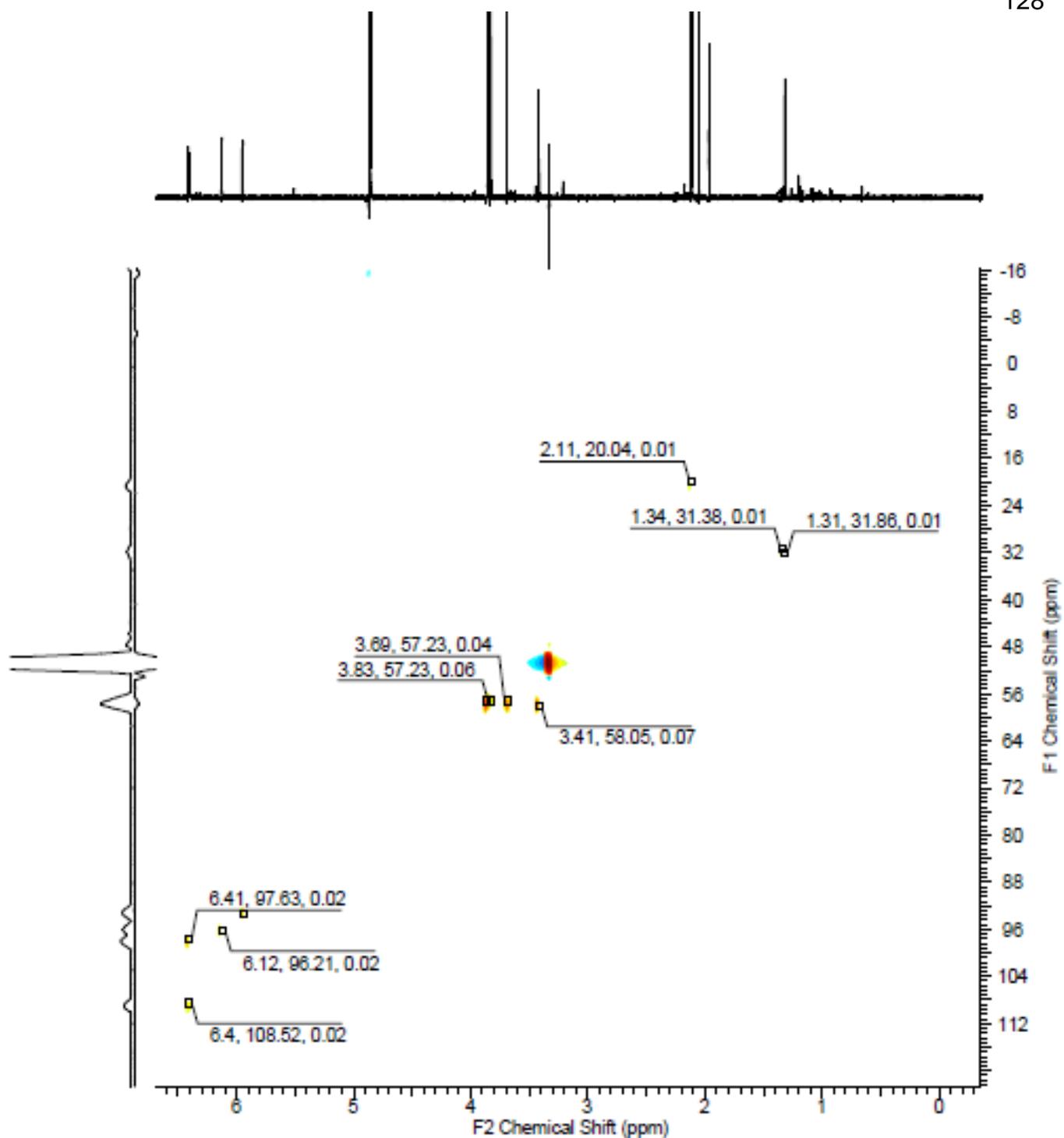


FIGURA 4.83- Mapa de contorno COSY (600 MHz; MeOH)- **Composto 7**

FIGURA 4. 84 -Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- **Composto 7**

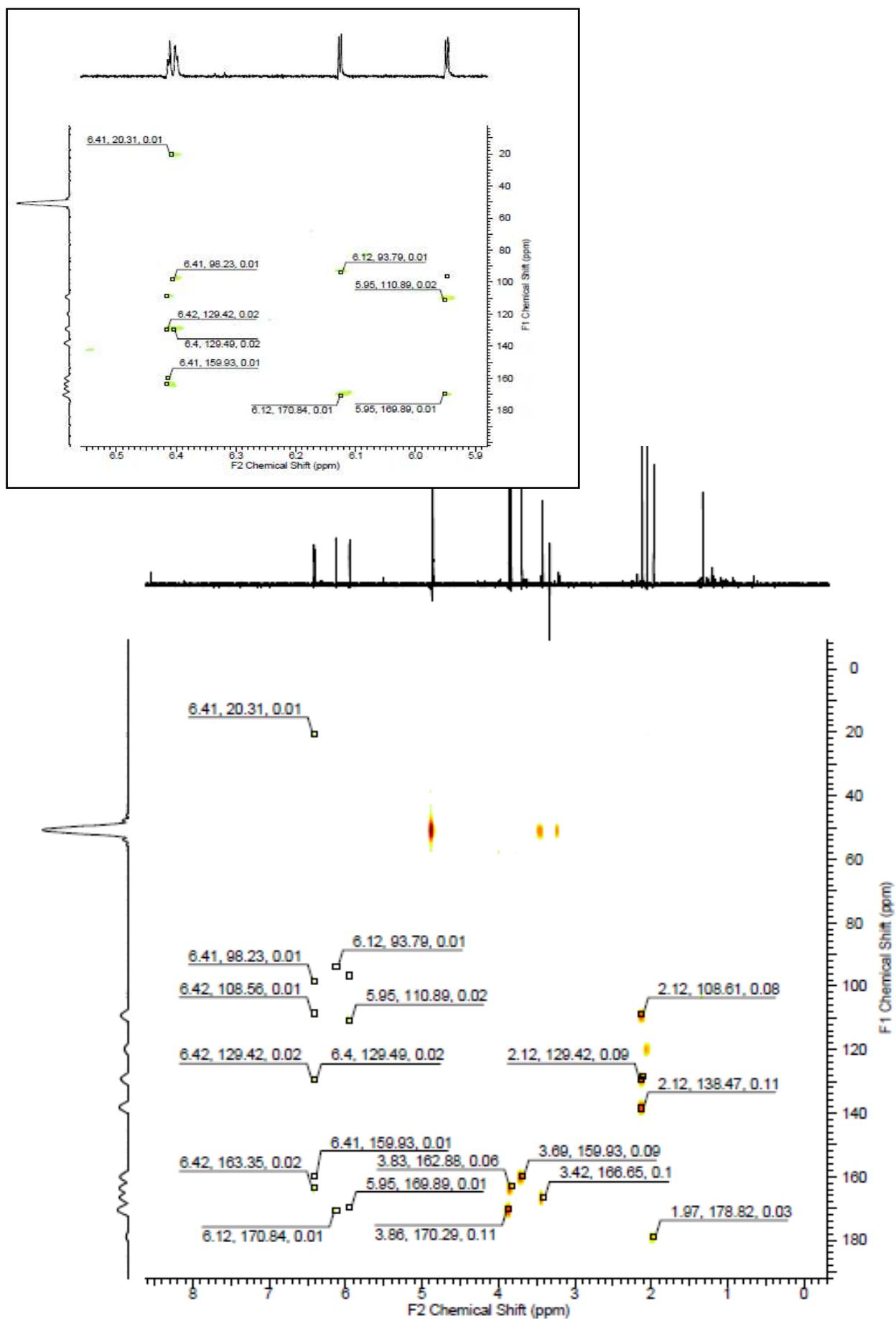


FIGURA 4-85- Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH) e sua ampliação na região dos aromáticos - **Composto 7**

4.9.1.1 Identificação estrutural substância 8

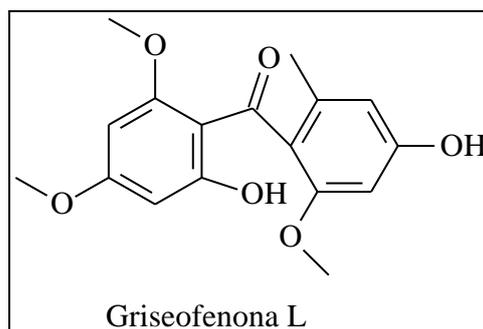


FIGURA 4.86 –Estrutura química da Griseofenona L

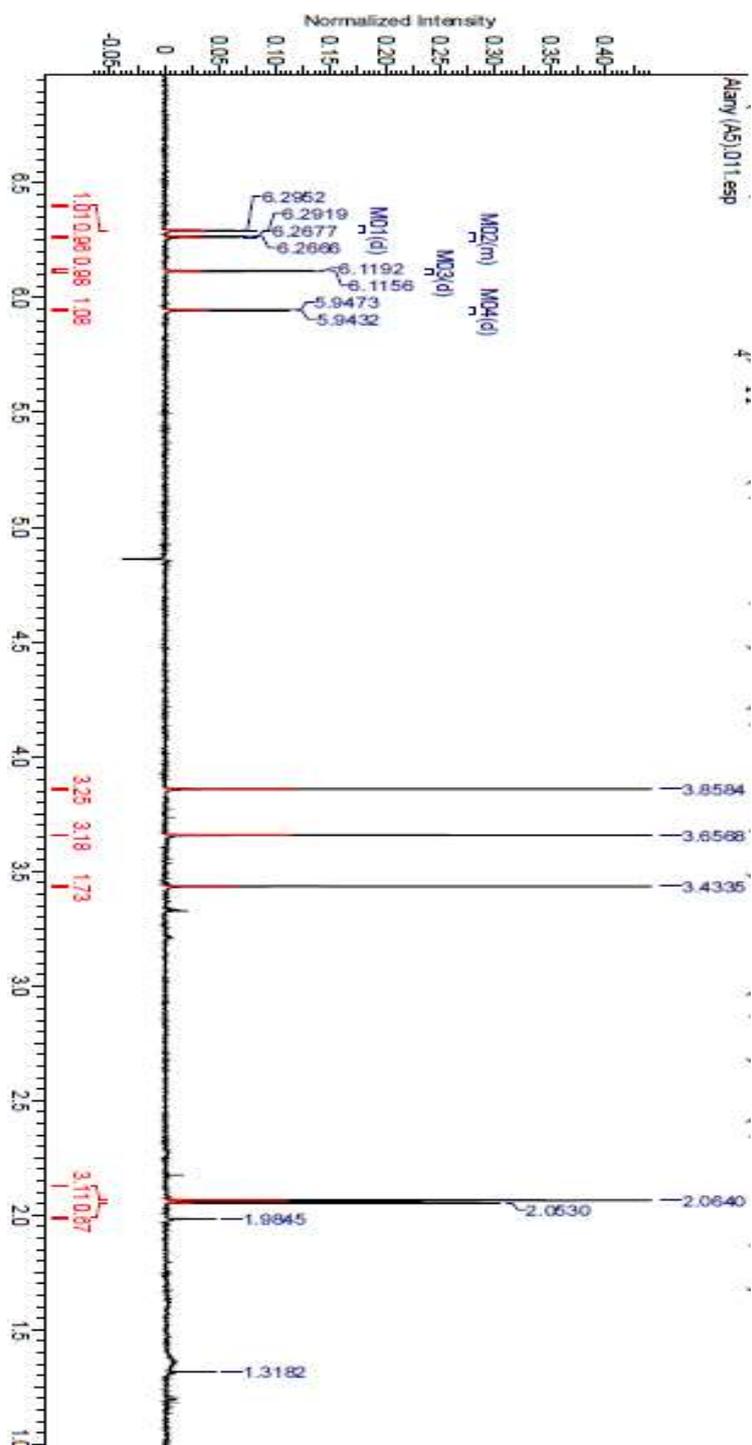
A substância 8 (FIGURA 4.88) foi isolada com uma pureza considerável. Apresentou-se com tempo de retenção (TR) de 26.4 min no LC-SPE-NMR, correspondente à banda 5. Este metabólito foi identificado através da análise dos experimentos RMN em 1D e 2D (em MeOH). A determinação estrutural foi realizada comparando-se os dados obtidos por experimentos com estruturas análogas encontrada na literatura (WUBSHET, et al., 2013).

O espectro de RMN ^1H da substância 8 (FIGURA 4.89; TABELA 4.12) apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,12 (d, 1H) e 6,5,93 (d, 1H) acoplando entre si com uma constante meta ($J=1,90$) e foram atribuídos respectivamente ao H-7 e H-5 do anel B das griseofulvinas. Outros dois dubletos, em δ_{H} 6,29 (d, 1H) e 6,26 (d, 1H) também com constante meta ($J= 1,7$) foram atribuídos ao anel A. Esses dados indicam, o esqueleto da griseofulvina encontra-se aberto. Atribuiu-se os singletos em δ_{H} 3,86 (s, 3H), δ_{H} 3,43 (s, 3H) e 3,65 (s, 3H) às metoxilas, sendo as duas primeiras pertencentes ao anel B e última ao C-4' do anel A.

O singlete em δ_{H} 2,06 (s, 3H) ligado á metila em C-3'. Os sinais de carbono ^{13}C , foram atribuídos através dos espectros de HMBC (FIGURA 4.92) e HSQC (FIGURA 4.91). Logo acredita-se que a proposta está correta e a obtenção do espectro de massas será realizado para reforçar a elucidação estrutural do composto 8, Griseofenona L (2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)(2-hydroxy-4-methoxy-6-methylphenyl)methanone), o qual é inédito na literatura

TABELA 4.12- Dados de RMN ^1H - 600 MHz (MeOH) **Composto 8**

Posição	^1H (ppm), J (Hz)	^{13}C
4		166
5	5,93 (d, J = 1,9)	93.1
6		169.8
7	6,12 (d, J =1,9)	98.5
8		
9		
1'		129.0
2'		136.4
3'	6,26 (d, J=1,7)	111.3
4'		160
5'	6,29 (d, J=1,7)	98.1
6'		160
3 (C=O)		203
4' (OCH ₃)	3,43 (s, 3H)	57,3
6' (OCH ₃)	3,65 (s,3H)	57.3
6(OCH ₃)	3,86 (s,3H)	57.3
2'(CH ₃)	2,06 (s, 3H)	19.5

FIGURA 4.87- Espectro de RMN ^1H – (600 MHz; MeOH) **Composto 8**

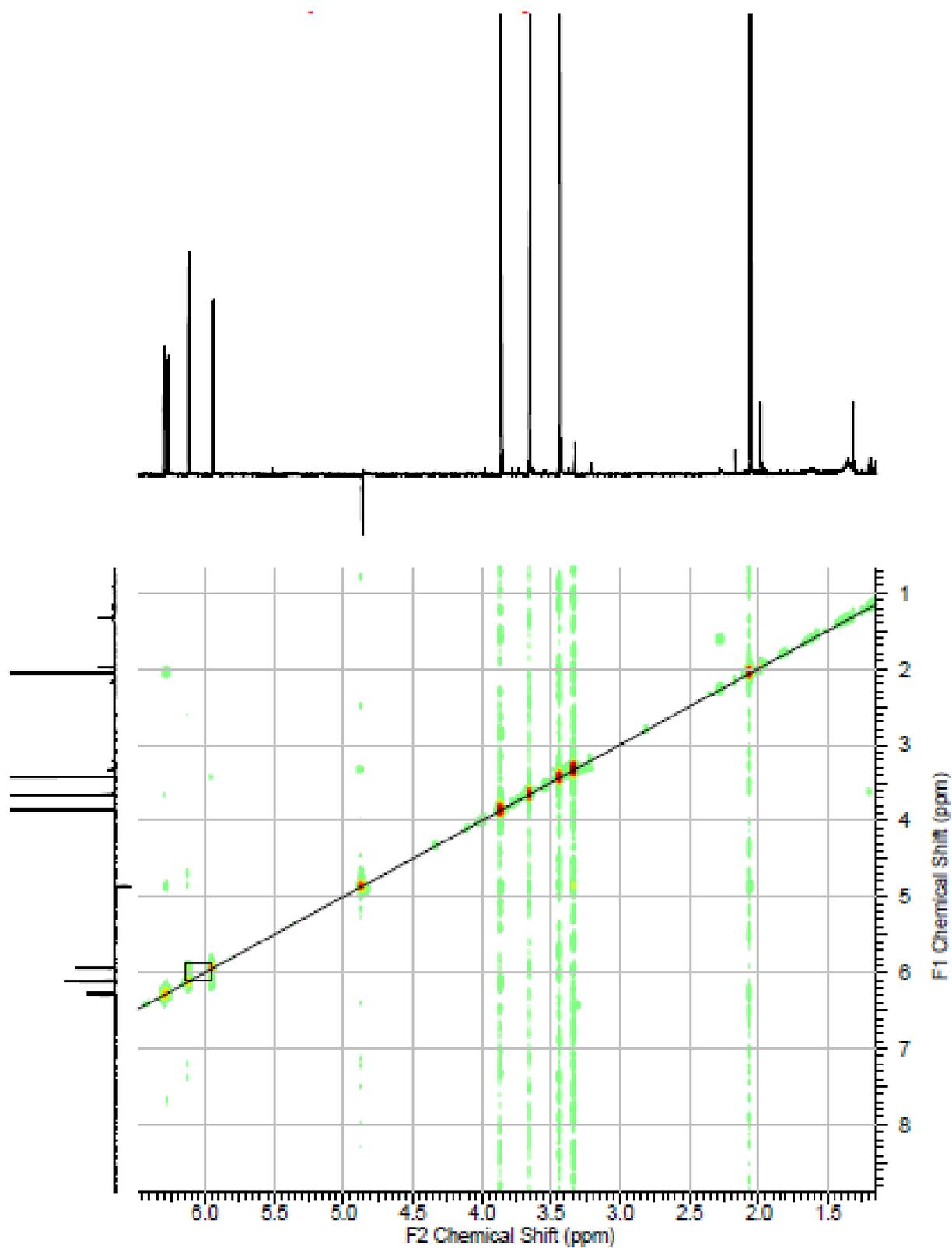
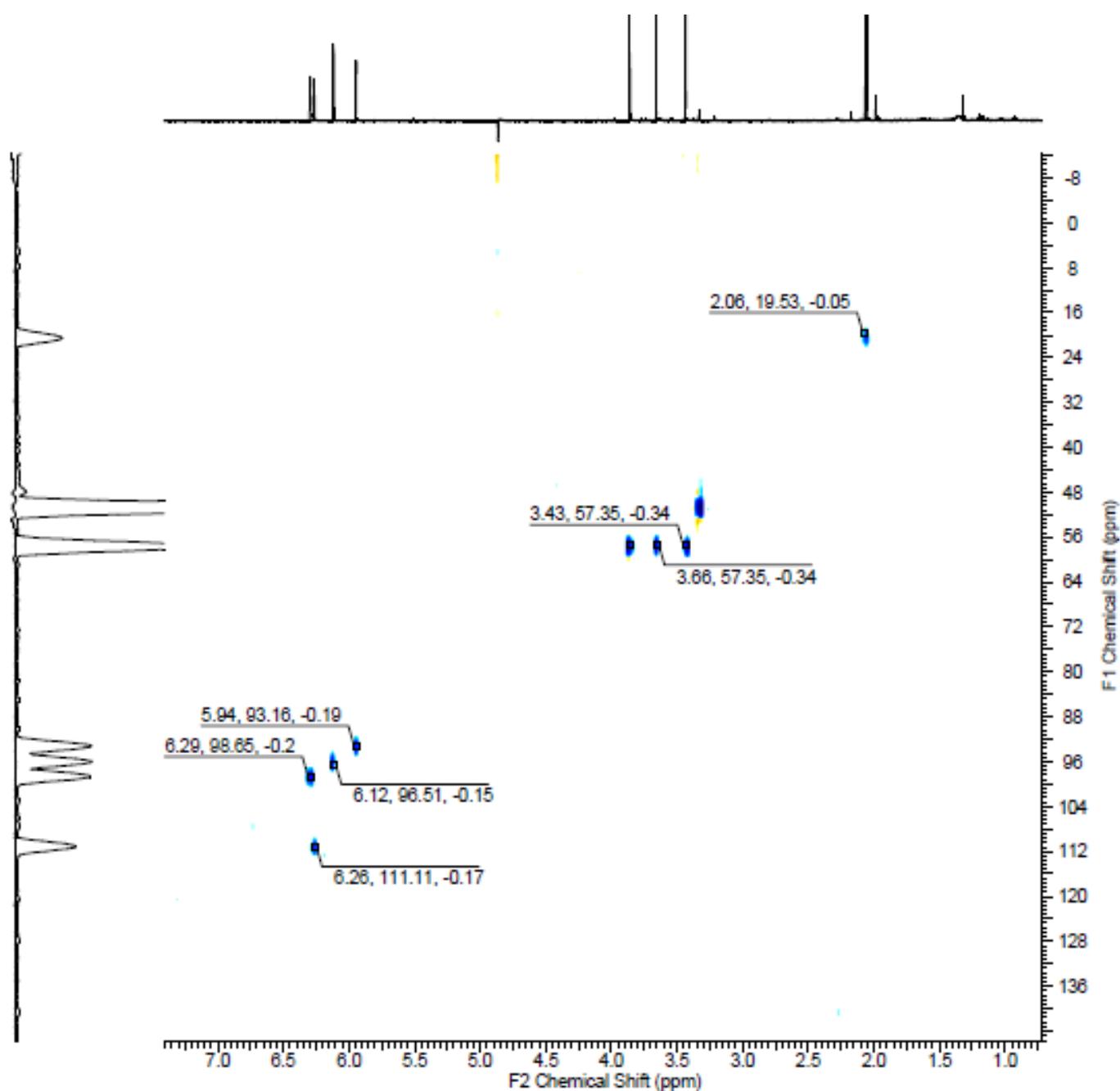


FIGURA 4.88- Mapa de contorno COSY (600MHz; MeOH)- **Composto 8**

FIGURA 4.89- Mapa de contorno HSQC (600 MHz; MeOH)- **Composto 8**

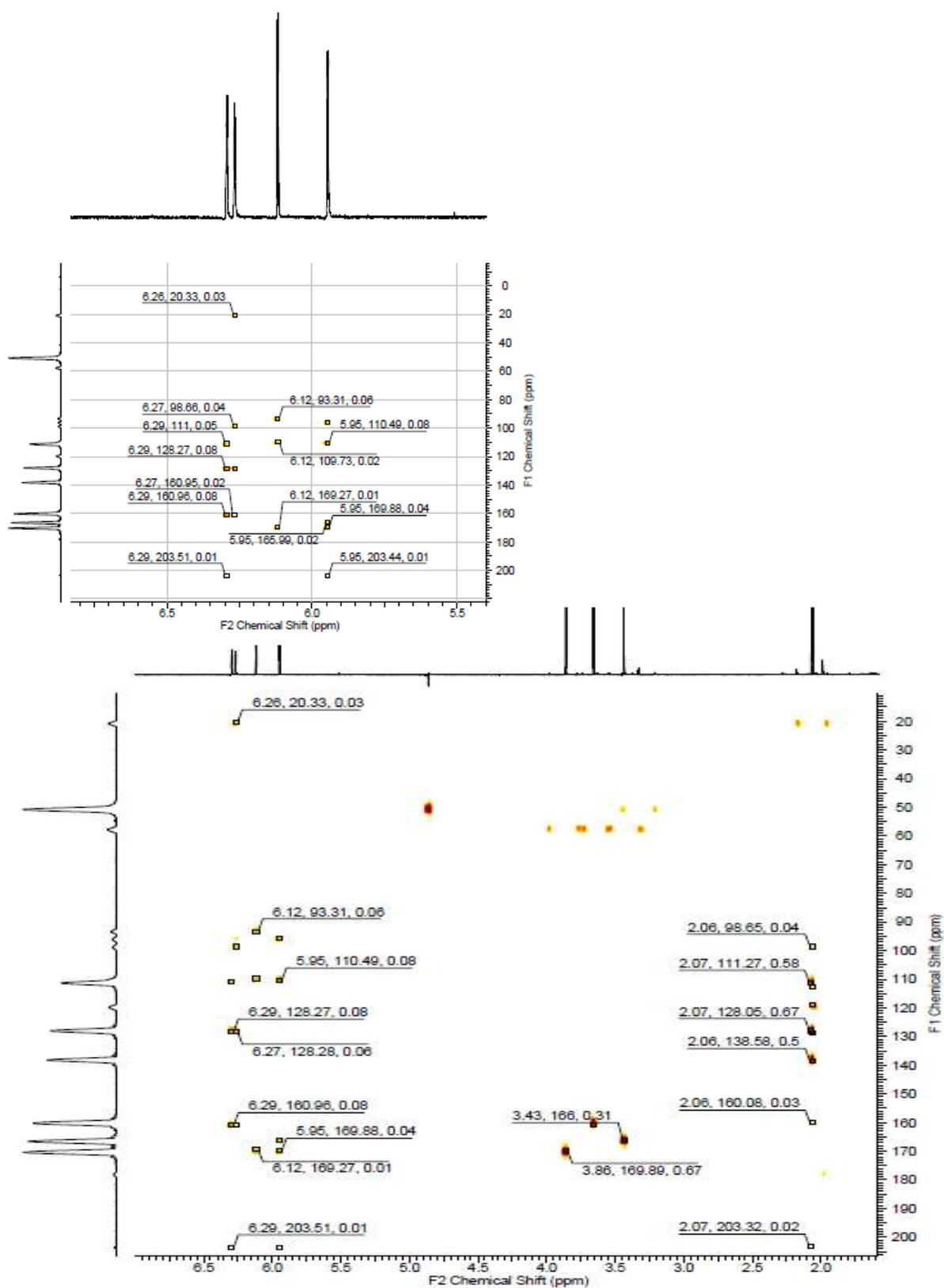


FIGURA 4.90- Mapa de contorno HMBC (600 MHz; MeOH) e sua ampliação na região dos aromáticos - **Composto 8**

4.9.2 Ensaio biológico dos isolados - Frente ao crescimento micelial

Como citado no item 4.9 (pág 75), foi necessário otimizar as condições cromatográficas para a obtenção de material de cada isolado e então proceder com os testes frente ao crescimento da *Phytophthora nicotianae*. No entanto, ao realizar esse experimento foi obtido uma quantidade de massa extremamente baixa (cerca de 0,02 mg de cada metabólito). Além disso, a *Phytophthora nicotianae* como comentado anteriormente não se trata de um fungo verdadeiro que produz esporos e sim de um oomiceto que produz zoósporos e este possui mobilidade, o que dificulta realizar experimentos com suspensão e contagem dos mesmos. Desta forma, optou-se por tentar seguir o procedimento realizado por ALI (2000), aonde o abaixamento da temperatura (4° C) por aproximadamente 25 min, e posterior retorno a temperatura ambiente (25 °C) induzem a clivagem citoplasmática do esporângio e subsequente liberação dos zoósporos. O novo resfriamento, agora com os zoósporos livre diminuí a mobilidade do mesmo, sendo possível realizar sua contagem e prosseguir com os testes utilizando uma pequena quantidade de isolado. Todo o procedimento foi seguido, com a tentativa de suspensão de zoósporos em placas de 7, 15 e 21 dias, porém em nenhum desses dias foi possível quantificar, pois por mais que a solução apresentasse aspecto turvo, ao analisar com o auxílio hemacitômetro, não se encontrava nenhum resquício do material necessário. Sendo assim, optou-se por repetir o procedimento citado em 3.3.4 (pág 46), testando novamente o extrato acetato e o padrão comercial da griseofulvina. Porém, como padrão é apenas uma substância, concentração utilizada foi menor 6mg/ml.

Como podemos analisar no gráfico abaixo (FIGURA 4.93), a inibição do crescimento do micélio do patógeno, tanto na presença do extrato quanto frente ao isolado puro, foi bastante eficiente. Quantitativamente essa inibição representa 67,1 % para o extrato acetato de etila 72,75% para a griseofulvina. Esse resultado pode ser visualizado na FIGURA 4.94 e sugere que parte da ação inibitória do extrato acetato está na presença da griseofulvina. No entanto, existem estruturas que foram isoladas que possuem esqueleto similar e com a presença de cloro, o que nos leva a pensar que possa ter ação semelhante a ela, sendo necessário realizar experimentos futuros que comprovem tal proposição.

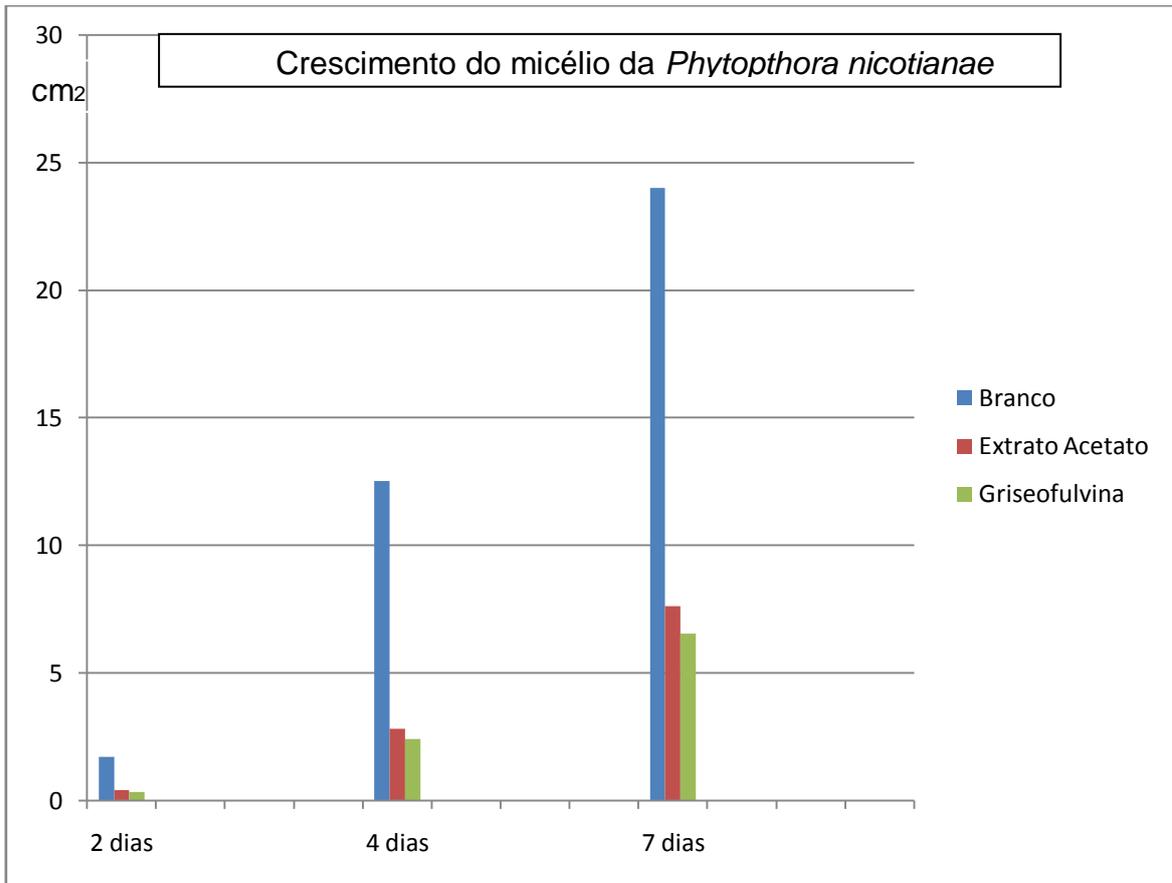


FIGURA 4.91- Gráfico crescimento radial (cm²) da *Phytophthora* versus dias

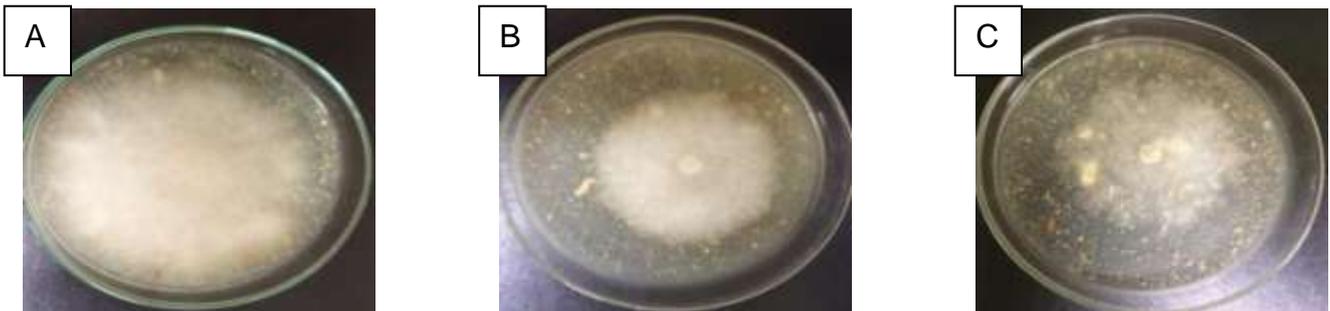


FIGURA 4.92 Fotos do crescimento da *Phytophthora nicotianae* em meio sólido de cenoura e milho (A) meio e *P. nicotianae* (B) meio com o patógeno e o extrato de acetato de etila de *M. levispora* (c) idem a griseofulvina

Conclusão

5 Conclusão

Este trabalho permitiu estudar o fungo *Memnoniella levispora*, um sapróbio inédito isolado do semi-árido brasileiro. Através dos dados químicos e de testes biológicos obtidos deste fungo em pequena escala, evidenciou-se que o mesmo funciona como uma fonte promissora de metabólitos com atividade antifúngica e/ou inibidoras do crescimento micelial da *Phytophthora nicotianae*. A obtenção dos extratos brutos nos diferentes meios de cultivo e pela análise dos espectros de RMN e dos cromatogramas por CLAE-DAD/UV, notou-se que estes obtidos em meios líquidos apresentaram um rendimento maior que os sólidos em cenoura e milho. Neste meio, a fração acetato de etila obtida e através do estudo biomonitorado da atividade inibitória do crescimento micelial da *Phytophthora nicotianae*, mostrou ser mais ativo, sendo portado possível isolar os metabólitos secundários os quais dever ter atividade antifúngica. O estudo de isolamento dos metabólitos secundários produzidos por *M. levispora* na fração acetato de etila, conduziu ao isolamento/identificação de 8 substâncias, através do experimento de LC-SPE-NMR.

As substâncias identificadas pertencem à classe de griseofulvinas e griseofenonas. Algumas dessas substâncias, ainda necessitam de experimentos para obter com exatidão sua elucidação completa, porém tudo indica que se tratam de estruturas isoladas pela primeira vez na natureza. Uma das substâncias isoladas (griseofulvina) foi testada frente ao crescimento micelial da *Phytophthora nicotianae* e apresentou uma inibição de cerca de 72% quando comparado ao controle. Esse resultado assim como a identificação estrutural dos metabólitos obtidos nos leva a experimentos futuros, para verificar se outros compostos também agem da mesma forma que a griseofulvina. Sendo assim, com o estudo desenvolvido foi possível traçar o perfil químico de uma espécie nunca estudada sob o ponto de vista químico, isolar e identificar estruturas também inéditas e que possivelmente sejam promissoras no combate a *P. nicotianae* e outros fungos patógenos.

Referências Bibliográficas

6 Referencias Bibliográficas

A. GOND R. PATEL, S PATEL, J and A.K. PANDY New record of *Memnoniella levispora* Subram on *Ficus carica* L from India. - Jabalpur : Journal on New Biological Reports, 2013. - 3 : Vol. 2. - pp. 272-274.

AGUAIR A.T.E. e al et Instruções Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas. - Campinas : Instituto Agrônômico (IAC), 2014.

ALI G. S e REDDY A. S. N. Inhibition of Fungal and Bacterial Plant Pathogens by Synthetic Peptides: In Vitro Growth Inhibition Interaction Between Peptides and Inhibition of Disease Progressio. - Colorado : The American Phytopathological Society, 2000. - 8 : Vol. 13.

ANVISA Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. - Governo Federal, 2010. Disponível em - http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicologia!/ut/p/c5/rY_LkqJAEW_xQ8Yq6CkgCWovCkaLFDYEKDAUIhgg4J8fRsq1IMz6bvWWZGnrwgAW9u2bOusrHubtkVnECC062uGBvRgRBidQtNXSBY8D2oIwyo4AQ36YG9enNploDBiSeLSqjJT-5OcW6LRtzPyByamdDwMZOdCw80Xg Acesso em 09/03/2015.

ATTARD A [et al.] Strategies of attack and defense for *Phytophthora parasitica* Dastur - França : ELSEVIER, 2007. - 165. - pp. 83-94.

BARRON G. L. The genera of Hyphomycetes from soil: Baltimore: Williams &, 1968.

BASSAN M. M. [et al.] Reação de Híbridos Comáticos de Citros. Rev. Bras. Frutic. - Jaboticabal : 2010. - 2 : Vol. 32.

BASTOS D. C. [et al.] Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. Informe Agropecuário. - Belo Horizonte : Jul/Ago de 2014. - 281 : Vol. 35.

BODE H. B., BETHE B. e HOF S. R ZEECK A Big effects from small changes: Possible, ChemBioChem . - 2002. - Vol. 3. - pp. 619–627.

CACHO R. A. [et al.] Complexity generation in fungal polyketide biosynthesis: a spirocycle-forming P450 in the concise pathway to the antifungal drug griseofulvin. ACS Chemical and Biology. - Los Angeles : American Chemical Society, Agosto de 2013. - Vol. 8. - pp. 2322-2330.

CALDAS S. S. [et al.] Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry, Química Nova. - São Paulo : Setembro de 2011. - 9 : Vol. 34.

CASS Q.B e DEGANI A. L. G Desenvolvimento de métodos por HPLC - São Carlos : EdUFSCar, 2009.

CHANDANIE W.A., KUBOTA M. e HYAKUMACHII M Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of

systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. - Plant soil : 2006. - Vol. 286. - pp. 209-217.

CitrusBR Mundo: Exportações totais de suco de laranja em toneladas de FCOJ // CitrusBR. - 2014. - 08 de fevereiro de 2015. - <http://www.citrusbr.com/>.

CORAZZA-NUNES et al MARIA JÚLIA AURANTIOIDEAE: UMA REVISÃO DA TAXONOMIA E FILOGENIA, COM CONTRIBUIÇÕES DAS SISTEMÁTICA BIOMOLECULAR , LARANJA. - 2005. - pp. 359-374.

COSTAMILAN L. M. [et al.] Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* pathotypes. - Rio Grande do Sul : Springer, 2013. - 135. - pp. 845–853.

DEWICK P.M. Medicinal natural products : John Wiley & Sons, 2009. - Vol. 3.

ÉRSEK T. e Ribeiro O Mini review article: an annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996, *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* . - 2010. - Vol. 45. - pp. 251-266.

EXARCHOU V., KRUKCER M. e BEEK T. A. VERVOORT J. LC–NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis, *Magn. Reson. Chem.*. - Grécia : John Wiley & Sons, 2005. - Vol. 43. - pp. 681-687.

FACHINELLO J. C. e NACHTIGAL J. C, *Fruticultura: Fundamentos e práticas*. CPACT. - Embrapa, 2008. - 26 de Fevereiro de 2015. - <http://www.cpacr.br/publicacoes/livros/fundamentos-fruticultura/11.3.htm>.

FAOSTAT Food and Agriculture Organization Of United Nations. - 2013. - 06 de Fevereiro de 2015. - <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

FEICHTENBERG Doenças induzidas por fungos do gênero *Phytophthora* em - Cordeirópolis : Laranja, 1989a. - 2 : Vol. 10. - pp. 359-378.

FEICHTENBERG E e BASSANEZI R.M SPÓSITO. BELASQUE J. *Manual de Fitopatologia* - São Paulo : Agronômica Ceres, 2005. - Vol. 2. - pp. 239-269.

FEICHTENBERGER E E.D.M.N MATSUOLA, K. SANTOS, A.F.BEZERRA Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil - Campinas : Livraria Rural, 2001. - pp. 283-342.

GARCES W.S. [et al.] Effect of spores of saprophytic fungi on phytoalexin accumulation in seeds of frog-eye leaf spot and stem canker resistant and –susceptible soybeans (*Glycine max* L.) cultivars, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. - 200. - Vol. 48. - pp. 3662-3665.

HERCULANO P. M. F. [et al.] Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. - Brasília : Fitopatologia Brasileira, 2003. - 23 : Vol. 8.

IAC Instruções Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas - Campinas : Boletim IAC, 2014.

IBGE Indicadores do IBGE: Estatística da Produção Agrícola . - 2013.

KAHSAYA G. [et al.] Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of griseofulvin and impurities, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - : Elsevier, 2013. - Vol. 80. - pp. 9-17.

KAUR S. [et al.] " Relative performance of citrus rootstocks to phytophthora nicotianae var. parasitica causing root rot" - Ludhiana : HortFlora Research Spectrum, Setembro de 2014. - 3 : Vol. 3. - pp. 271-273.

LANÇAS F. M The hole of the separations science in the 21th century, Journal of the Brazilian Chemical Society. - 2003. - 2 : Vol. 24. - pp. 183-197.

LEÃO-FERREIRA S M., P. GUSMÃO L. F. e RUIZ R. F. C Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil - Estugarda : Nova Hedwigia, 2013. - 3-4 : Vol. 36. - pp. 479-494.

LOPES J.M.S, DÉO T.F.G e ANDRADE B.J.M Importância Econômica do Citros no Brasil, Revista Científica eletrônica de Agronomia. - Garça : 2011. - 20.

LUDOWICI V. A [et al.] Phytophthora Nicotianae, Phytophthora: A Global Perspective / A. do livro LAMOUR K. - Knoxville : Cabi, 2013. - Vol. 2.

MAPA Cadeia Produtiva // Série Agronegócio / A. do livro Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. - Janeiro : 2007. - Vol. 7.

MARTIN F. N. [et al.] "Identification and Detection of Phyttophthora: Reviewing Our Progress, Identifying our Needs - Salinas : Plant disease, 2012. - 8 : Vol. 96. - pp. 1080-1103.

MDCI Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. - Governo Federal, 2012. - 8 de Fevereiro de 2015. - <http://www.mdic.gov.br//sitio/>.

MEDINA FILHO H.P., BORDIGNON, R., SIQUEIRA, W.J., FEICHTENBERGER, E. & CARVALHO, M.R.T. Tolerância de Híbridos e de Clones de Porta-Enxertos de Citros à infecção de raízes por Phytophthora nicotianae. - Campinas : Fitopatologia Brasileira, 2004. - Vol. 29. - pp. 169-178.

MELO M. B. e SILVA L. M. S. da Aspectos Técnicos dos Citros em Sergipe - Aracaju : EMBRAPA, 2006. - Vol. 1.

NEVES M. F. O Retrato da Citricultura Brasileira [Relatório]. - Ribeirão Preto : 2010.

NEVES M. e JANK, M Perspectivas da Cadeia Produtiva da Laranja no Brasil: Agenda 2015 // Fundace.org. - Novembro de 2006. - 06 de Fevereiro de 2015. - http://www.fundace.org.br/arquivos_diversos/agenda_estrategica/Agenda_Citrus_2015_P_ENSAICONE.pdf.

PANDA D., RATHINASAMY K. e SANTRA M.K, WILSON L. Kinect suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer // Proc Natl Acad Sci. - USA : PNAS, Jul de 2015. - 28 : Vol. 102.

PETERSEN A.B [et al.] The Chemistry of Griseofulvin // American Chemical Society Review. - : 3, 2009.

RATHOD D.P. [et al.] Griseofulvin Producing Endophytic *Nigrospora oryzae* from Indian *Emblca officinalis* Gaertn: a New Report // Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering. - India : Austin, 2014. - 3 : Vol. 1.

SANTOS T. T. S. e VARAVALLO MAURILIO ANTONIO Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico // Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. - Londrina :, 2011. - 2 : Vol. 32. - pp. 199-212.

SAVITA G. S. V. e NAGPAL A. Citrus diseases caused by *Phytophthora* species // GERF Bulletin of Biosciences. - Amritsa : 2012. - 1. - Vol. 3. - pp. 18-27.

SCHWAN-ESTRADA K.R.F. [et al.] Extratos de plantas medicinais na indução de resistência] // Anais do X Simpósio de controle de doenças de plantas. - LAVRAS , 2010.

SUBRAMANIAN C. V. Madras : Fungi imperfecti from Madras IV, 1957. - J. Indian Bot Soc : Vol. 33. - pp. 36-42.

SWINGLE W.T The botany of Citrus and its relatives. Revisão de Philip C. Reece // The citrus Industry. - California : Berkeley, 1967. - Vol. Vol.1.

TAKITA M. A. [et al.] Terpene production in the peel of sweet orange fruits - São Paulo : Genetics and Molecular Biology, 2007.- Vol. 30.

TURRA C [et al.] Overview of the Brazilian Citriculture Certification // J Agric Environ Ethics. - Piracicaba : Springer, 2014. - Vol. 27.

WALLER F. [et al.] Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species] // Journal of Plant Physiology. - 2008. - Vol. 165. - pp. 60-70.

WANG H.-C. [et al.] Race distribution and distribution of sensitivities to mefenoxam among isolates of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in Guizhou province of China // Crop Protection. - China : Elsevier, 2013. - Vol. 52. - pp. 136-140.

WEIGUO H [et al.] Distinguishing ectomycorrhizal and saprophytic fungi using carbon and nitrogen isotopic compositions // Geoscience Frontiers. - Beijing : Elsevier, 2013. - 3 : Vol. 3. - pp. 351-356.

WHITESIDE J.O., GARNSEY, S.M & TIMMER, L.W Compendium of Citrus Diseases:- Saint Paul, 1993. - 2.

WIJERATNE E.M., BASHYALI, B.P., GUNATILAKA, M.K., ARNOLD, A.E., GUNATILAKA, A.A. Maximizing chemical diversity of fungal metabolites: biogenetically related // J. Nat. Prod.. - 2010. - Vol. 73. - pp. 1156–1159.

WUBSHET S. G.. [et al.] Targeting high-performance liquid chromatography–high-resolutionmass spectrometry–solid-phase extraction–nuclear magneticresonance analysis

with high-resolution radical scavenging profiles—Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicilli*: Elsevier, 2013. - Vol. 1302. - pp. 34-39.

XIAO B [et al.] Location of Genomic Regions Contributing to *Phytophthora nicotianae* Resistance in Tobacco Cultivar Florida 301 - Madsion : Crop Science Society of America], 2013. - Vol. 53.

YANG L., XIE, J. [et al.] Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1 – potential antibiotic against plant pathogenic fungi // World Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2008. - Vol. 24. - pp. 909-915.

ZULIAN DÖRR, ALMEIDA Citricultura e Agronegócio Cooperativos no Brasil - Cascavel : 2013. - Vol. vol.11.