

EDUARDO VINÍCIUS VIEIRA VAREJÃO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE FITOTÓXICA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS
PELO FUNGO *Alternaria euphorbiicola***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

V293i
2012

Varejão, Eduardo Vinícius Vieira, 1976-

Isolamento, caracterização química e avaliação da atividade
fitotóxica de metabólitos produzidos pelo fungo

Alternaria euphorbiicola / Eduardo Vinícius Vieira Varejão.

– Viçosa, MG, 2012.

xv, 159f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Texto em português e inglês.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais - Identificação. 2. Fitotoxicidade.
3. Herbicidas. 4. Fungos. 5. *Alternaria euphorbiicola*.
6. *Euphorbia heterophylla*. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 547.3

EDUARDO VINÍCIUS VIEIRA VAREJÃO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE FITOTÓXICA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS
PELO FUNGO *Alternaria euphorbiicola***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 02 de abril de 2012.

Antônio Flávio de Carvalho Alcântara

Alberto Oliveros-Bastidas

Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Coorientador)

Robert Weingart Barreto
(Coorientador)

Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

Dedico este trabalho à minha esposa Jodieh, ao meu irmão Juninho e a meus pais Claudeci e Maria, pelo incentivo, apoio, confiança e amor. A eles, toda minha gratidão e amor.

“Vanitas vanitatum et omnia vanitas”

•
• •

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica.

Aos meus orientadores, professores Antônio Jacinto Demuner, Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Robert Weingart Barreto, pela orientação e pela confiança.

Ao Químico José Luiz Pereira, técnico do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, pela disposição, auxílio, ensinamentos e amizade.

Aos Funcionários do Departamento de Química, em especial ao Jorge, à Marisa, à Onesina e ao Márcio, por todo o suporte oferecido.

Aos funcionários da Clínica de Doença de Plantas (Departamento de Fitopatologia) José Orlando, Célio, Henrique e Osvaldo pela amizade, pelos ensinamentos e pelo auxílio imprescindíveis para a realização do trabalho.

Ao Professor Dr. Bruno Sérgio Vieira, Centro Universitário Patos de Minas, pela importante colaboração.

Ao Dr. Davi Mesquita de Macedo, da Clínica de Doença de Plantas, pela colaboração.

Ao técnico Monteiro, do Departamento de Zootecnia, pela liofilização das amostras.

Aos colegas do LASA e da Clínica de Doença de Plantas, pelo convívio e pelas contribuições dadas ao bom andamento deste trabalho.

Ao técnico Leacir, Departamento de Engenharia Florestal, pelo auxílio e orientação quanto aos ensaios de inibição de germinação e de crescimento radicular.

A todos os professores que comigo compartilharam uma parcela de seus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

Aos meus pais, Claudeci e Maria, e ao meu irmão Juninho, pelo apoio, dedicação, incentivo e amor.

À minha esposa jodieh, pela cumplicidade, companheirismo, dedicação, tolerância, incentivo, ensinamentos e, principalmente, amor.

A Deus, o Grande Arquiteto do Universo, sobre tudo e sobre todos, por investir-me das faculdades necessárias para galgar mais um degrau na busca pelo conhecimento; pelo dom da vida, mais uma oportunidade para prosseguir na incansável e infinita senda do desenvolvimento moral e espiritual.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Herbicidas: panorama e perspectivas	1
2. Produtos naturais para o controle químico de plantas daninhas	6
3. Fitotoxinas fúngicas – mecanismos de ação e potencial herbicida	8
4. Justificativa do trabalho	13
5. Referências bibliográficas	16
CAPÍTULO 2	
Fitotoxinas Fúngicas: Diversidade Estrutural e Atividades Biológicas	22
1. Terpenóides	22
2. Compostos Fenólicos	26
3. Compostos Nitrogenados	29
4. Peptídeos	33
5. Compostos diversos	38
6. Referências bibliográficas	53
CAPÍTULO 3	
Avaliação da fitotoxicidade de filtrados de cultura de fungos fitopatogênicos	63
1. Introdução	63
2. Materiais e métodos	65
Cultivo dos fungos	65
Obtenção de filtrados de cultura	65

Fracionamentos	66
Inibição da germinação e crescimento radicular	66
Ensaio em câmara úmida	67
3. Resultados	68
4. Referências bibliográficas	75
CAPÍTULO 4	
Fitotoxicidade de Filtrados de Cultura e Constituintes Químicos de <i>Alternaria</i>	
<i>euphorbiicola</i>	77
Resumo	77
Abstract	78
Introdução	79
Material e Métodos	81
Procedimentos gerais	81
Cultivo do Fungo	82
Obtenção de extratos e frações cromatográficas	83
Ensaio Biológicos	83
Ensaio de inibição de germinação	84
Ensaio em câmara úmida	84
Ensaio com Punctura de Folhas	85
Ensaio em Folha Destacada	85
Resultados e Discussão	86
Literatura Citada	94
APÊNDICE – Fracionamento de micélio de <i>A. euphorbiicola</i> cultivado em	
meio de Czapek-Dox	98

CAPÍTULO 5

Phytotoxic activity of tyrosol from *Alternaria euphorbiicola* against the fungal host

plant <i>Euphorbia heterophylla</i>	101
ABSTRACT	101
INTRODUCTION	102
METHODS AND MATERIALS	103
General Experimental Procedures	103
Fungal Strain, Culture Media and Growth Conditions	104
Extraction, Purification and Chemical Characterization of tyrosol	105
Punctured-Leaf Assay	105
Leaf Spray Assay	107
Data analysis	107
RESULTS AND DISCUSSION	107
LITERATURE CITED	115
APÊNDICE 1. Espectros de massas, IV e RMN do tirosol	119
APÊNDICE 2. Análise da fase aquosa remanescente da extração do filtrado de cultura com acetato de etila	123

CAPÍTULO 6

Metabólitos Fitotóxicos Isolados de Filtrado de Cultura de *Alternaria euphorbiicola*

patógeno de <i>Euphorbia heterophylla</i>	126
Resumo	126
1. Introdução	127
2. Seção experimental	128
2.1. Procedimentos Gerais	128
2.2. Fungo, Meio de Cultura e Condições de Cultivo	128

2.3.	Extração, Fracionamento e Purificação de Metabólitos Fitotóxicos	129
2.4.	Síntese da anidromevalonolactona	132
2.5.	Síntese da cicloglicilprolina	133
2.6.	Ensaio com punctura de Folhas	134
2.7.	Ensaio por Aspersão	134
3.	Resultados e Discussão	135
	Referências Bibliográficas	141
	Apêndice 1 - Espectros de massas, IV e RMN da anidromevalonolactona	144
	Apêndice 2 - Espectros de massas, IV e RMN da (R)-(-)-mevalonolactona	148
	Apêndice 3 - Espectros de massas, IV e RMN da cicloglicilprolina	152
	CONCLUSÕES GERAIS	157

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	Acetolactato sintase
ATP	Adenosinatrifosfato
ATR	Attenuated Total Reflectance
Boc	Tert-butoxicarbonil
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia a gás
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
CV	Caldo de Vegetais
CVA	Caldo de Vegetais Ágar
Cz	Meio de cultura Czapek-Dox
COSY	Correlated spectroscopy
d	Dupleto
DCC	dicicloexilcarbodiimida
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
EM	Espectrometria de massas
EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase
Et ₃ N	Trietilamina
FT-IR	Fourier Transformed Infrared
Gly	Glicina
HETCOR	Heteronuclear correlation
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
JP	Meio de cultura de Jenkins-Prior
LSD	Least Significant Difference
m	Multiplete
MF	Meio de Fries
m/z	Relação massa/carga dos fragmentos do EM
NMR	Nuclear Resonance Spectroscopy

mp	Melting point
PII	Fotossistema II
PPO	Protoporfirionogênio oxidase
Pro	Prolina
PROTOX	Protoporfirinogênio oxidase
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de ¹³ C
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de ¹ H
s	Simpleto
s l	Simpleto largo
t	Tripleto
t l	Tripleto largo
T _f	Temperatura de fusão
TLC	Thin Layer Chromatography
GCMS	Gas chromatography coupled to mass spectrometry

RESUMO

VAREJÃO, Eduardo Vinícius Vieira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2012. **Isolamento, caracterização química e avaliação da atividade fitotóxica de metabólitos produzidos pelo fungo *Alternaria euphorbiicola***. Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientadores: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Robert Weingart Barreto.

A espécie fúngica *Alternaria euphorbiicola* foi isolada a partir de tecidos severamente infectados de *Euphorbia heterophylla*, uma das plantas daninhas mais nocivas à agricultura brasileira. A rapidez e a severidade dos sintomas produzidos pela inoculação de *A. euphorbiicola* em *E. heterophylla* levaram à suspeita de produção de compostos fitotóxicos pelo fungo, despertando o interesse pela identificação de tais compostos em busca de novas moléculas que possam ser utilizadas como modelos para o desenvolvimento de novos herbicidas. Em investigação preliminar, a atividade fitotóxica de filtrados de culturas em meio líquido do fungo foi evidenciada, bem como a influência de diferentes condições de cultivo sobre a fitotoxicidade de filtrados de cultura. As condições de cultivo que resultaram na produção de filtrados de cultura apresentando fitotoxicidade elevada foram utilizadas para fins de isolamento e identificação de metabólitos fitotóxicos. Filtrados de cultura formada em meio de Jenkis-Prior foram submetidos a isolamento guiado por bioensaios, levando à caracterização de fração cromatográfica composta por diferentes ácidos graxos com atividade fitotóxica comprovada e à identificação do composto fitotóxico tirosol. Através de ensaio com punctura de folhas, tirosol, foi capaz de causar despigmentação e necroses severas sobre folhas de *E. heterophylla* (ED_{50} 36,9 mM). O composto foi aplicado sobre folhas de soja, milho e de diferentes espécies daninhas. Mesmo em concentração elevada (100 mM), o composto apresentou baixa toxicidade contra as diferentes espécies, demonstrando, assim, atividade seletiva para a planta hospedeira do fungo. O potencial de tirosol como herbicida natural para o controle de *E. heterophylla* foi avaliado através de ensaio por aspersão. A concentração mínima de tirosol capaz de provocar a morte de 100% das plantas de *E. heterophylla* foi de 40 mM. Posteriormente, o fracionamento guiado por bioensaio de filtrados de cultura em meio de Fries levou ao isolamento dos compostos anidromevalonolactona, (R)-(-)-mevalonolactona e cicloglicilprolina.

Estes compostos foram capazes de produzir, em curtos intervalos de tempo, sintomas similares aos produzidos pela inoculação do fungo na planta hospedeira, o que sugere a participação destes compostos nos estágios iniciais da interação planta-patógeno. Os resultados obtidos no trabalho indicam que os metabólitos fitotóxicos isolados de culturas do fungo *Alternaria euphorbiicola* podem constituir-se em modelos promissores para a síntese de análogos com atividade herbicida para o manejo de *Euphorbia heterophylla*.

ABSTRACT

VAREJÃO, Eduardo Vinícius Vieira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2012. **Isolation, chemical characterization and evaluation of the phytotoxic activity of metabolites produced by the fungus *Alternaria euphorbiicola***. Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-advisers: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Robert Weingart Barreto.

The fungal specie *Alternaria euphorbiicola* was isolated from severely infected tissues of *Euphorbia heterophylla*, regarded as one of the most nocive weed in the Brazilian agriculture. The aggressiveness and rapid development of symptoms produced by inoculation of *A. euphorbiicola* on *E. heterophylla* sparked the interest in investigating the production of phytotoxins by this fungus in the search for new molecules that can be used as models for the development of new herbicides. In a preliminary investigation, the phytotoxicity of culture filtrates of the fungus and the influence of different growing conditions on the in vitro production of phytotoxic metabolites were proved. The growing conditions resulting in highly phytotoxic culture filtrates were selected to the isolation and identification of phytotoxic metabolites. Filtrates of cultures formed in Jenkins-Prior medium were subjected to bioassay-guided isolation procedures, leading to the characterization of a phytotoxic chromatographic fraction constituted mainly by middle chain fatty acids and to the isolation of the phytotoxin known as tyrosol. Through a puncture leaf assay, tyrosol was able to cause severe depigmentation and necrosis on leaves of *E. heterophylla* (ED₅₀ 36.9 mM). The compound was also applied on the leaves of soybean, corn and different weed species. Even at high concentration (100 mM), the compound showed low toxicity against these different species, thereby demonstrating selective activity for the fungal host plant. The potential of tyrosol as a natural herbicide for chemical control of *E. heterophylla* was assessed by a leaf spray assay. The minimum concentration of tyrosol capable of causing the death of 100% of the plants was 40 mM. Subsequently, a bioassay-guided fractionation of filtrates from cultures formed in Fries medium lead to the identification of the compounds anhydromevalonolactone, (R)-(-)-mevalonolactone and cycloglycilproline. All these compounds were able to produce symptoms similar to those produced by inoculation

of the fungus on the host plant, in short time intervals, suggesting the possible involvement of these compounds in the early stages of plant-pathogen interaction. The results obtained in this work indicate that the phytotoxic metabolites produced by *Alternaria euphorbiicola* may constitute promising start points to the synthesis of analogues with herbicide activity for the management of *Euphorbia heterophylla*.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Herbicidas: panorama e perspectivas

Dentre os diferentes tipos de pragas agrícolas, as plantas daninhas têm sido consideradas as que exercem maior impacto, sendo responsáveis por cerca de 10% das perdas anuais na produção agrícola mundial (OERKE, 2006; NEVE et al., 2009). No Brasil, LORENZI (2001) atribuiu às plantas daninhas uma redução em torno de 20 % a 30 % da produção agrícola.

A manutenção da produtividade agrícola depende, em grande parte, do uso de herbicidas para o controle químico de plantas daninhas (STETTER & LIEB, 2000; HALL et al., 2000) os quais representam, atualmente, cerca de 50% do mercado de agroquímicos (KRAEHMER & DREXLER, 2009).

A evolução do controle químico de plantas daninhas pode ser dividido em três períodos. O primeiro, antes de 1945, foi marcado pela utilização de compostos orgânicos e inorgânicos (ex: CuSO_4 e dinitroortocresol, “DN”) classificados como herbicidas de pós-emergência. O segundo período inicia-se em meados da década de 1940, com a descoberta aleatória da atividade biológica do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o que revolucionou as perspectivas de controle de plantas daninhas. Diversas classes químicas de herbicidas foram descobertas, como as sulfoniluréias, as triazinas, os bipiridílios e o glifosato, dentre outras. Estes herbicidas possibilitaram um controle mais seletivo de plantas daninhas, tendo a descoberta da atividade herbicida das sulfoniluréias dado início à era dos herbicidas de baixa dosagem ($2 - 75 \text{ g ha}^{-1}$) (MACÍAS, 1995; KUDSK & STREIBIG, 2003;

BROWN, 2006). O terceiro período se inicia na década de 1980, sendo caracterizado por uma drástica redução nas taxas de crescimento da indústria de herbicidas.

Desde a descoberta dos herbicidas auxínicos na década de 1940, a estratégia tradicional adotada pela indústria de agroquímicos na busca por novos compostos com atividade herbicida tem sido a síntese aleatória de grande variedade de compostos químicos seguida por triagem através de testes biológicos para avaliação da fitotoxicidade (DUKE & ABBAS, 1995). Esta estratégia possibilitou grande sucesso do setor de pesquisa e desenvolvimento de herbicidas. A quase totalidade dos herbicidas atualmente disponíveis no mercado foi descoberta pelo método tradicional, que ainda representa uma importante abordagem na busca por novas moléculas (KUDSK & STREIBIG, 2003; DAYAN et al., 2009).

Entretanto, a partir da década de 1980, o crescimento da indústria de herbicidas passou a ser afetado por diferentes fatores. Muitas classes de compostos químicos mais simples (a chamada “easy chemistry”) haviam sido testadas. Enquanto a duas ou três décadas atrás era suficiente sintetizar e avaliar cerca de 10.000 compostos para se obter um novo herbicida, atualmente são necessários centenas de milhares (STUEBLER et al., 2003).

Outro fator foi o rápido progresso na área de química analítica, que possibilitou a detecção de pequenas concentrações de resíduos de herbicidas em alimentos e amostras ambientais, atraindo a opinião pública e a preocupação por parte de pesquisadores e agências governamentais para os impactos de herbicidas no ambiente e na saúde humana. Regulamentação mais rigorosa quanto ao comportamento ambiental e toxicológico de novos herbicidas a serem disponibilizados comercialmente passou a exigir a incorporação de uma completa investigação de parâmetros ambientais, ecológicos e toxicológicos de compostos

candidatos, o que aumentou significativamente os investimentos necessários em pesquisa e desenvolvimento (KUDSK & STREIBIG, 2003; DAYAN et al., 2009).

Estimado em cerca de 23 milhões de dólares nos anos 70, os custos da descoberta e desenvolvimento de um novo produto alcançaram a cifra de US\$ 150 milhões na década de 1990 e, atualmente, giram em torno de US\$ 250 milhões (GAST, 2008; KRAEHMER & DREXLER, 2009). Os gastos envolvidos em estudos toxicológicos e ambientais passaram a representar cerca de 30% do total, desestimulando a manutenção de amplos programas de síntese por longos períodos e passando a representar um sério desafio à indústria de herbicidas. Como reflexo, o número de patentes na área e o lançamento de novos compostos no mercado diminuiu significativamente (KUDSK & STREIBIG, 2003; RÜEGG, 2007; GAST, 2008). Entre 1980 e 2001 uma média anual de seis novos produtos com atividades herbicidas foram lançados no mercado, enquanto entre os anos 2002 e 2006 a média foi de 2 por ano (GAST, 2008). Desde 1991, quando a sulcotriona (inibidor da HPPD) foi introduzida no mercado, nenhum composto com novo mecanismo de ação foi disponibilizado (RÜEGG, 2007).

Um terceiro fator que desestimulou a busca por novas moléculas com atividade herbicida foi a ampla adoção de culturas transgênicas resistentes a herbicidas não seletivos como o glifosato e o glufosinato (DILL, 2005; DAYAN et al., 2009; CERDEIRA et al. 2011). A ampla adoção destas culturas a partir da década de 1990 promoveu um grande aumento na aplicação do glifosato na agricultura. Como os direitos de patentes deste herbicida expiraram no ano 2000, o avanço do mercado genérico passou a disponibilizar diferentes marcas e formulações do composto, resultando em uma grande redução de preço e aumentando as

vantagens econômicas da adoção de culturas resistentes ao herbicida (DUKE et al., 2005).

Cerca de 400 herbicidas encontram-se disponíveis no mercado mundial, abrangendo 17 mecanismos de ação conhecidos (KRAEHMER & DREXLER, 2009). Destes, cerca da metade atua por um dos três mecanismos seguintes: inibição do fotossistema II (PII), inibição da acetolactato sintase (ALS) e inibição da protoporfirinogênio oxidase (PPO ou Protox), de modo que a diversidade de alternativas para controle químico de plantas daninhas é apenas aparente (COLE et al., 2000; KUDSK & STREIBIG, 2003; MACÍAS et al., 2007). Atualmente, 75% do mercado de herbicidas corresponde a herbicidas que atuam por apenas 6 mecanismos de ação diferentes (KRAEHMER & DREXLER, 2009).

A pouca diversidade de mecanismos de ação herbicida disponíveis, a ampla adoção de culturas resistentes a herbicidas não seletivos e a crescente demanda pelo uso de herbicidas (decorrente da necessidade de expandir a produtividade agrícola para atender as demandas da população em expansão), têm contribuído para o uso indiscriminado, repetitivo e contínuo de herbicidas com um mesmo mecanismo de ação numa mesma área cultivada. Tal prática tem levado a uma mudança no espectro de plantas daninhas em diversas áreas, em que biótipos de plantas daninhas resistentes vêm substituindo os biótipos efetivamente controlados (DUKE, 2005; DILL, 2005; TREZZI et al., 2005; VIDAL et al., 2007; CERDEIRA et al., 2011). O número de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas vem aumentando significativamente desde a década de 1980, havendo atualmente o registro de 381 biótipos de 207 espécies de plantas daninhas resistentes (HEAP, 2012).

A crescente demanda mundial por alimentos e a destinação de terras cultiváveis para a produção de biocombustíveis implicam em necessidade de

aumento na produção agrícola e do uso de pesticidas (STUEBLER et al., 2003). Culturas como o milho e a soja, que estão entre as que demandam a aplicação de maiores quantidades de herbicidas, são as que apresentam maiores taxas e expectativas de crescimento (CARVALHO et al., 2005). As mudanças em comunidades de plantas daninhas pela seleção de espécies e biótipos de resistentes a herbicidas, torna-se ainda mais urgente a descoberta de novos compostos (COLE et al., 2000; KUDSK & STREIBIG, 2003; GAST, 2008). Entretanto, com os elevados e crescentes investimentos necessários à manutenção de programas de síntese aleatória e avaliação em larga escala, poucas companhias agroquímicas tendem a manter os recursos críticos necessários ao lançamento regular de novos herbicidas. Uma das empresas líderes do setor (Monsanto), por exemplo, não realiza mais síntese e triagem aleatória (KRAEHMER & DREXLER, 2009).

Diante deste quadro, torna-se imperativa a busca por novas estratégias de pesquisa que envolvam menores investimentos e ainda possibilitem a descoberta de novos compostos capazes de atuar por novos mecanismos de ação e que apresentem comportamento ambiental seguro (COLE et al., 2000; KUDSK & STREIBIG, 2003; GAST, 2008). Esta tendência vem sendo adotada por muitas companhias agroquímicas, que tem direcionado maiores quantidades de recursos para pesquisas na área de biotecnologia (KRAEHMER & DREXLER, 2009).

2. Produtos naturais para o controle químico de plantas daninhas

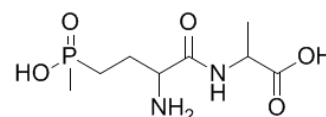
Uma estratégia alternativa ao método tradicional que tem despertado crescente interesse consiste na busca por compostos naturais fitotóxicos que possam ser usados como ou servir de modelo para o desenvolvimento de novos herbicidas

(DUKE et al., 2000a, 2002; MACÍAS et al., 2007; COPPING & DUKE, 2007). Diversas vantagens têm justificado a busca por produtos naturais para o controle químico de plantas daninhas. A diversidade estrutural e a pouca sobreposição entre os mecanismos de ação de produtos naturais e herbicidas sintéticos fazem dos metabólitos secundários prováveis candidatos para a descoberta de novos sítios de ação. De fato, os poucos herbicidas de origem natural disponíveis [tricotona (sulcotriona e mesotriona), cinmetilina, bialafós e glufosinato] atuam por mecanismos de ação diferentes dos mecanismos propostos para herbicidas sintéticos (DAYAN et al., 2000; DUKE et al., 2000b). Produtos naturais tendem a ser mais facilmente biodegradáveis, o que implica em menor meia-vida ambiental, menores efeitos residuais, menor risco de bioacumulação e menor potencial para contaminação de corpos aquáticos por meio de lixiviação (DUKE et al., 1995; SAXENA & PANDEY, 2001; LI et al., 2003). Entretanto, não podem ser considerados, de modo generalizado, como toxicologicamente benignos, uma vez que alguns destes compostos apresentam elevada toxicidade para organismos não-alvos, inclusive mamíferos (DUKE et al., 2000a). Em contrapartida às vantagens apresentadas, a complexidade estrutural de muitos metabólitos secundários e o fato de serem biossintetizados em pequenas quantidades são fatores apontados como desvantagens para o desenvolvimento de novos herbicidas a partir de produtos naturais, tornando a produção em larga escala potencialmente difícil e economicamente inviável, quer por fermentação ou por síntese química (MACÍAS, 1995). A busca por análogos sintéticos mais simples tem sido a principal alternativa. Por outro lado, a evolução da engenharia genética tem possibilitado a transferência de genes para a produção de metabólitos secundários de um organismo para outro, permitindo a obtenção de microorganismos transgênicos capazes de produzir tais

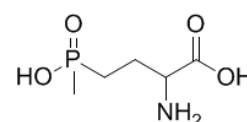
metabólitos em quantidades suficientes por meio de processos fermentativos. Além disso, avanços em biotecnologia têm aumentado o rendimento e a qualidade de tais processos (DUKE et al., 1995).

Dentre as diferentes fontes biológicas, os microorganismos têm sido considerados pela indústria de pesticidas a fonte de escolha na busca por produtos naturais com atividade herbicida (LI et al., 2003).

Bialaphos e fosfinotricina são herbicidas comerciais de origem microbiana. Bialafós, produzido por *Streptomyces hygroscopicus*, é um pro-herbicida convertido metabolicamente in planta no composto ativo fosfinotricina, potente inibidor da glutamina sintase.



bialafós



fosfinotricina

Bialaphos é o único herbicida comercial produzido por fermentação. A (S)-(-)-fosfinotricina, metabólito de *Streptomyces viridochromogenes*, é comercializada como glufosinato, mistura racêmica sintética dos sais de amônio da fosfinotricina. Bialaphos e glufosinato apresentam pouca toxicidade para organismos não-alvo e baixa atividade no solo, sendo considerados herbicidas de baixo impacto ambiental (COPPING & DUKE, 2007). Segundo Li et al. (2008), os custos das pesquisas e desenvolvimento destes herbicidas foram significativamente menores que os necessários para desenvolvimento de herbicidas sintéticos.

Considera-se, portanto, que compostos naturais fitotóxicos apresentam-se como alternativa para descoberta de novos herbicidas ambientalmente seguros e capazes de atuar por novos mecanismos de ação. Mesmo que a fitotoxina natural, em si, seja inadequada ao uso direto como herbicida comercial, a identificação de novos

sítios de ação pode ser muito valiosa para o desenvolvimento de novos herbicidas sintéticos (DUKE et al., 2000b).

O Brasil é o centro de origem de muitas das mais nocivas plantas daninhas do planeta (LORENZI, 2001). Apesar de amplamente reconhecido como região prioritária para a busca de inimigos naturais para o controle biológico destas plantas, há poucos exemplos do aproveitamento do potencial destes fungos, tanto para o uso direto de espécies selecionadas como agentes de biocontrole clássico quanto para o desenvolvimento de bio-herbicidas (BARRETO & EVANS, 1995; NECHET et al., 2006; POMELLA et al., 2007; BARRETO & EVANS, 1998; SOARES & BARRETO, 2008). Da mesma forma, a investigação da biossíntese de novas fitotoxinas por tais microorganismos permanece praticamente inexplorada, embora constituindo-se em uma fonte promissora e valiosa para a descoberta de novas moléculas com atividade herbicida.

3. Fitotoxinas fúngicas – mecanismos de ação e potencial herbicida

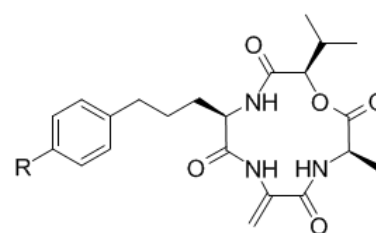
A busca por compostos naturais com potencial herbicida envolve duas abordagens distintas em relação à escolha de fontes de produtos naturais para fins de descoberta de novas moléculas. A primeira consiste em buscar novos compostos a partir de material biológico sem levar em consideração qualquer indício da produção de fitotoxinas por tais fontes, como a partir de organismos de habitats remotos e nichos ecológicos incomuns. A segunda baseia-se na química ecológica, especialmente nas interações planta-patógeno, e consiste na busca por fitotoxinas a partir de fontes naturais para as quais haja indícios de produção de tais compostos, em especial os fungos fitopatogênicos (DUKE et al., 2000a, 2000b). Como a

habilidade de fungos fitopatogênicos para causar doença em plantas envolve normalmente a produção de toxinas capazes de causar lesões em tecidos ou mesmo induzir a morte da planta, esses microorganismos constituem fontes promissoras de compostos com atividade herbicida (AMUSA, 2006; BERESTETSKIY, 2008).

Fitotoxinas são, em sua maioria, metabólitos secundários de baixo peso molecular cujos efeitos são caracterizados pelo aparecimento de sintomas específicos, sendo os mais comuns a murcha, supressão do crescimento, clorose, necrose e manchas foliares (STRANGE, 2007; BERESTETSKIY, 2008). Como a produção de fitotoxinas resulta da coevolução entre microorganismos produtores e plantas hospedeiras, atuando para vencer as resistências das plantas hospedeiras e resultando em vantagem competitiva para o organismo produtor, a relação estrutura-atividade destes metabólitos vem sendo otimizada naturalmente ao longo do processo evolutivo, o que normalmente confere às substâncias elevadas atividades biológicas em pequenas concentrações (MÖBIUS & HERTWECK, 2009).

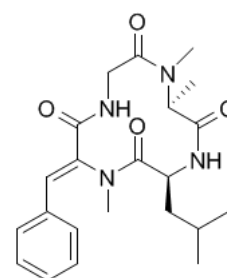
Fitotoxinas fúngicas podem ser categorizadas como hospedeiro-específicas, seletivas ou não seletivas. Fitotoxinas hospedeiro-específicas são produzidas por patógenos específicos de determinada espécie de planta e apresentam elevada atividade tóxica para a espécie hospedeira do fungo ou apenas para determinado genótipo da planta hospedeira (SAXENA & PANDEY, 2001; HOAGLAND & WILLIAMS, 2004).

Exemplos de toxinas hospedeiro-específicas são as toxinas AM produzidas por *Alternaria alternata* f. sp. *mali*, patógeno causador da mancha marrom em folhas de cultivares susceptíveis de maçã (UENO et al.,



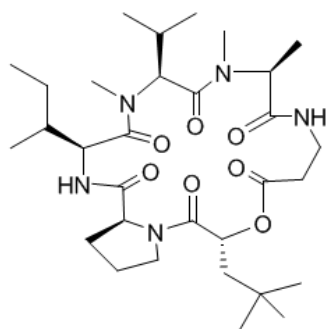
toxina AM I (R=OCH₃)
toxina AM II (R=H)
toxina AM III (R=OH)

1975). A tentoxina, por sua vez, é classificada como não-específica, capaz de induzir clorose em diversas espécies de mono e dicotiledôneas, não havendo relação taxonômica entre espécies sensíveis ou resistentes (HOAGLAND, 2001).



tentoxina

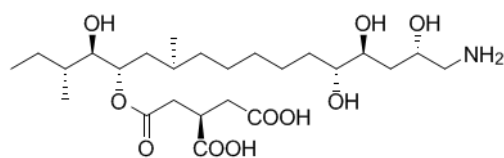
A seletividade de fitotoxinas depende de fatores relacionados às propriedades químicas da toxina, a características da planta e, também, à concentração da fitotoxina. Algumas toxinas não-específicas podem apresentar seletividade para determinado grupo de plantas taxonomicamente relacionadas.



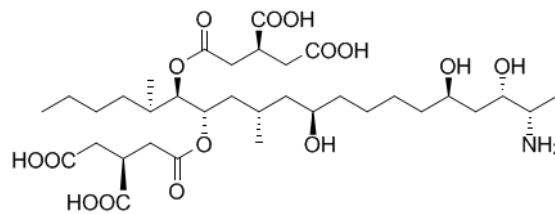
destruxina B

A destruxina B, por exemplo, é capaz de produzir sintomas em concentrações de 0,2 a 3,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em plantas do gênero Brassica e em concentrações entre 15 e 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em diversas outras plantas (BUCHWALDT & GREEN, 1992).

Os mecanismos primários de ação de fitotoxinas podem ser agrupados em três categorias: inibição enzimática, interferência em propriedades de membranas e interferência em respostas de defesa da planta (BERESTETSKIY, 2008). As toxinas AAL TA e a fumonisina B₁ são inibidores da ceramida sintase, enzima envolvida na síntese de esfingolípides (HENSENS et al., 1995; MANDALA et al., 1995).



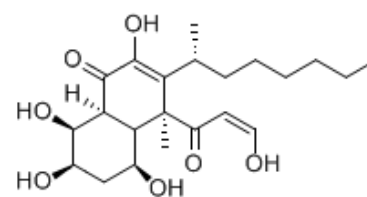
toxinas AAL TA₁



fumonisina B₁

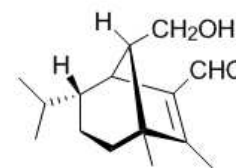
Análogos às bases esfingóides fitoesfingosina e esfinganina, substratos naturais da enzima ceramida sintase, estas toxinas atuam por inibição enzimática competitiva. As toxinas AAL têm sido objeto de renovado interesse e foram patenteadas como herbicidas. Ainda que a toxicidade contra mamíferos torne as toxinas AAL inapropriadas para o uso como herbicida, a descoberta do mecanismo de ação destas toxinas mostrou que a ceramida sintase se apresenta como um sítio de ação bastante promissor (DUKE et al., 2000b).

Australifungina é outra fitotoxina que atua por inibição da ceramida sintase (HENSENS et al., 1995). A enzima histona desacetilase foi identificada como sítio de ação da toxina HC (BROSCH et al., 1995).



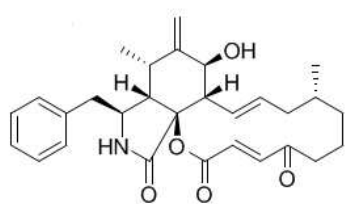
australifungina

Helmintosporol inibe a enzima β -1,3-glicana sintase responsável pela formação de calose, um mecanismo de resistência ao ataque pelo patógeno (BRIQUET et al., 1998).

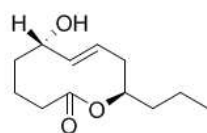


helmintosporol

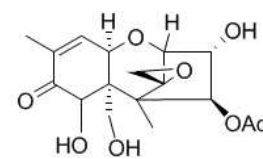
As fitotoxinas fúngicas citochalasin A, zearalenona, pinolidoxina, putaminoxina e fusarenona X suprimem a atividade da fenilalanina amônia liase, enzima chave em respostas de defesa de plantas (VURRO & ELLIS, 1997).



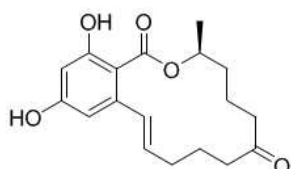
citochalasin A



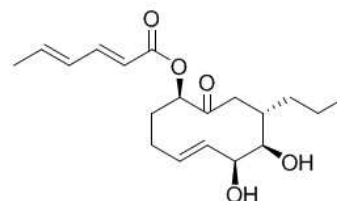
putaminoxina A



fusarenona X

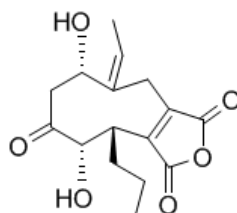


zaeraleona



pinolidoxina

A cornexistina atua pela inibição de uma ou mais isoenzimas da aspartato amino transferase e foi patenteada como herbicida (AMAGASA et al., 1994; FIELDS et al., 1996).



cornexistina

A tentoxina liga-se às subunidades α, β da F_1 -ATPase de cloroplastos (CF_1), bloqueando a hidrólise de ATP e causando clorose em plantas sensíveis (GROTH, 2002; MEISS et al., 2008).

Toda esta diversidade estrutural, as elevadas atividades biológicas em pequenas concentrações e a capacidade de atuar por mecanismos de ação diferentes dos herbicidas sintéticos tornam as toxinas fúngicas atraentes para o desenvolvimento de novos compostos com atividade herbicida (STRANGE, 2007; BERESTETSKIY, 2008).

4. Justificativa do trabalho

O amendoim-bravo ou leiteiro, *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae) (Figura 2), é uma planta daninha altamente competitiva, considerada como uma das principais plantas daninhas na agricultura brasileira, invadindo importantes culturas como a soja, o milho, a cana-de-açúcar e o feijão (RIZZARDI et al., 2004; CARVALHO et al., 2010; CURY et al. 2011). Constitui a principal planta daninha invasora da cultura da soja no Brasil, podendo levar a reduções de 30 a 50% na produtividade (BRIDGES et al., 1992; MESCHEDE et al., 2002).

O controle de infestações de *E. heterophylla* vem sendo exercido principalmente com o uso de herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). Entretanto, o uso repetitivo destes herbicidas levou à seleção de populações resistentes (Gazziero et al. 1998), como por exemplo a ocorrência de biótipos resistentes ao glifosato (Vidal et al., 2007; Cerdeira et al., 2011) e pelo surgimento de biótipos com múltipla resistência a herbicidas inibidores da ALS e inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (Trezzi et al. 2005).



Figura 2. Partes foliares e inflorescências de *Euphorbia heterophylla* L.

Durante trabalhos de levantamento de fungos fitopatogênicos associados a plantas daninhas relevantes no Brasil, a espécie identificada inicialmente como *Alternaria* sp (Barreto & Evans, 1998) e posteriormente reconhecida como *Alternaria euphorbiicola* foi isolada a partir de tecidos severamente infectados de *Euphorbia heterophylla*. Estudos sobre o potencial do fungo como agente de biocontrole de *E. heterophylla* levaram à observação de que a aplicação de suspensões de esporos do fungo sobre populações da planta hospedeira resulta em rápida produção de necrose de tecidos (24 a 48 horas) após aplicação. Esse período foi reconhecido como insuficiente para os processos de germinação de esporos, penetração de tecidos, colonização e desenvolvimento de sintomas resultantes da infecção. Estas observações levaram à conjectura de que o fungo produziria, antes mesmo da colonização da planta, fitotoxinas capazes de provocar necrose em *E. heterophylla*.

Os indícios da produção de metabólitos fitotóxicos pelo fungo *A. euphorbiicola* capazes de causar lesão em *E. heterophylla*, a importância desta planta daninha para a agricultura brasileira e as dificuldades no manejo desta espécie em função do surgimento de biótipos resistentes aos principais herbicidas utilizados justificam a realização de estudos voltados ao isolamento e caracterização de compostos fitotóxicos com potencial herbicida que possam atuar como substâncias inibitórias do crescimento e desenvolvimento de *E. heterophylla*.

Portanto, este trabalho teve como objetivo a investigação da produção *in vitro* de fitotoxinas por *A. euphorbiicola* que possam ser utilizadas como herbicidas naturais ou servir de modelo para a síntese de compostos análogos com atividade herbicida.

O presente trabalho encontra-se dividido em seis capítulos. Os Capítulos 1 e 2 são parte de um levantamento bibliográfico sobre fitotoxinas fúngicas como estratégia de pesquisa na busca por novos herbicidas. O Capítulo 3 consiste em um estudo preliminar sobre a fitotoxicidade de filtrados de culturas dos fungos fitopatogênicos *Alternaria euphorbiicola*, *Corynespora cassiicola* e *Nimbya alternantherae*. O Capítulo 4 trata da influência de diferentes condições de cultivo sobre a fitotoxicidade de filtrados de culturas de *Alternaria euphorbiicola* e da caracterização de fração cromatográfica constituída por ácidos graxos fitotóxicos. Os Capítulos 5 e 6 compreendem os estudos de isolamento, identificação e avaliação da atividade fitotóxica de constituintes químicos de *A. euphorbiicola*.

5. Referências Bibliográficas

AMAGASA, T.; PAUL, R. N.; HEITHOLT, J. J.; DUKE, S. O. Physiological Effects of Cornexistin on *Lemna pausicostata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 49, p. 37-52, 1994.

AMUSA, N. A. Microbially produced phytotoxins and plant disease management. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 405-414, 2006.

BARRETO, R. W.; EVANS, H. C. Fungal pathogens of weeds collected in the Brazilian tropics and subtropics and their biocontrol potential.. In: *Proceedings of the Eight International Symposium on Biological Control of Weeds*, 1995, p. 679-691.

BARRETO, R. W.; EVANS, H. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathologia*, v. 141, p. 21-36, 1998.

BERESTETSKIY, A. O. A review of fungal phytotoxins: From basic studies to practical use. *Applied Biochemistry & Microbiology*, v. 44, p. 501-514, 2008.

BRIQUET, M.; VILRET, D.; GOBLET, P.; MESA, M.; ELOY, M. C. Plant cell membranes as biochemical targets of the phytotoxin helminthosporol. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, v. 30, 285-295, 1998.

BROSCH, G.; RAMSOM, R.; LECHNER, T.; WALTON, J. D.; LOIDL, P. Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochilobolus carbonum*. *Plant Cell*, v. 7, p. 1941-1950, 1995.

BROWN, H. M. Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pest. Sci.*, v. 29, p. 263-281, 1990.

BUCHWALDT, L.; GREEN, H. Phytotoxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae*. *Plant Pathol.* v. 41, p. 55-63, 1992.

CARVALHO, M. A.; SILVA, C. R. L.; GHILARD, A. A. Competitividade da soja e a geração de divisas. *Revista de Economia e Agronegócio*, v. 3, p. 301-322, 2005.

CERDEIRA, A. L.; GAZZIERO, D. L.; DUKE, S. O.; MATALLO, M. B. Agricultural impacts of glyphosate-resistant soybean cultivation in South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 5799-5807, 2011.

COLE, D.; PALLET, K.; RODGERS, M. Discovering new modes of action for h and the impact of genomics. *Pesticide Outlook*, v. 11, p. 223-229, 2000.

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

CURY, J. P.; SANTOS, J. B.; SILVA, D. V.; CARVALHO, F. P.; BRAGA, R. R.; BYRRO, E. C. M., FERREIRA, E. A. Produção e partição de matéria seca de cultivares de feijão em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, v. 29, p. 149-158, 2011.

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

DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, p. 2079-2084, 2000.

DILL, G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science*, v. 61, p. 219-224, 2005.

DUKE, S. O. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. *Pest Management Science*, v. 61, p. 211-218, 2005.

DUKE, S. O.; ABBAS, H. K. Natural products with potential use as herbicides. In: *Allelopathy – Organisms, Process, and Applications*; Inderjit; Dakshini, K. M. M.; Einhellig, F. A., eds.; ACS Symposium Series 582: Washington, 1995, cap. 25.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; SCHRADER, K. K.; ALIOTTA, G.; OLIVA, A.; ROMAGNI, J. G. Chemicals from nature for weed management. *Weed Science*, v. 50, p. 138-151, 2002.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; RIMANDO, A. M. Natural Products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*, v. 40, p. 99-111, 2000a.

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, v.19, p. 583-589, 2000b.

FIELDS, S. C.; MIRELES-LO, L.; GERWICK, B. C. Hydroxycornexistin: A New Phytotoxin from *Paecilomyces variotii*. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 698-700, 1996.

GAST, R. E. Industry views of minor crop weed control. *Weed Technology*, v. 22, p. 385-388, 2008.

GROTH, G. Structure of spinach chloroplast F₁-ATPase complexed with the phytopathogenic inhibitor tentoxin. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.*, v. 99, p. 3465-3468, 2002.

HALL, J. C.; VAN EERD, L. L.; MILLER, S. D.; OWEN, M. D. K.; PRATHER, T.S.; SHANER, S. M.; SINGH, M.; VAUGHN, K. C.; WELLER, S. C. Future research directions for weed science. *Weed Technology*, v. 14, p. 647-658. 2000.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível online em < www.weedscience.com > Acessado em 03 de janeiro de 2012.

HENSENS, O. D.; HELMS, G. L.; JONES, E. T. T.; HARRIS, G. H. Structure elucidation of australifungin, a potent inhibitor of sphinganine N-acyltransferase in sphingolipid biosynthesis from *Sporomiella australis*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 60, p. 1772-1776, 1995.

HOAGLAND, R. E. Microbial allelochemicals and pathogens as bioherbicide agents. **Weed Technol.**, v. 15, p. 835-857, 2001.

HOAGLAND, R. E.; WILLIAMS, R. D. Bioassays: useful tools for the study of allelopathy. In: *Allelopathy – Chemistry and mode of action of allelochemicals*. Macías, F. A.; Galindo, J. C. G.; Molinillo, J. M. G.; Culter, H. G. eds.; CRC Press: Boca Raton, 2004. cap. 16.

KRAEHMER, H.; DREXLER, D. Global herbicide development – Opportunities and constraints. *Prairie Soils & Crop Journal*, v. 2, p. 12-16, 2009.

KUDSK, P.; STREIBIG, J. C. Herbicides – a two-edged sword. *Weed Research*, v. 43, p. 90-102, 2003.

LI, Y.; SUN, Z., ZHUANG, X.; XU, L.; CHEN, S.; LI, M. Research progress on microbial herbicides. *Crop Protection*, v.22, p. 247-252, 2003.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. ed.2. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2001.

MACÍAS, F. A. Allelopathy in the search for natural herbicides model: Current status and future goals. In: *Allelopathy – Organisms, Process, and Applications*; Inderjit; Dakshini, K. M. M.; Einhellig, F. A., eds.; ACS Symposium Series 582: Washington, 1995, cap. 23.

MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; GALINDO, J. C. G. Allelopathy – a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, v. 63, p. 327-348, 2007.

MANDALA, S. M.; THORNTON, B. R.; FROMMER, J. E.; CUROTTO, J. E.; ROZDILSKY, W.; KURTZ, M. B.; GIACOBBE, R. A.; BILLS, G. F.; CABELLO, M. A.; MARTIN, I.; PELAEZ, F.; HARRIS, G. H. The discovery of australifungin, a novel inhibitor of sphinganine N-acyltransferase from *Sporomiella australis*. *Journal of Antibiotics*, v. 48, p. 349-353, 1995.

MEISS, E.; KONNO, H.; GROTH, G.; HISABORI, T. Molecular processes of inhibition and stimulation of ATP synthase caused by the phytotoxin tentoxin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 24594-24599, 2008.

MESCHEDE, D. K.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTINI, J.; SCAPIM, C.A. Período crítico de interferência de *Euphorbia heterophylla* na cultura da soja sob baixa densidade de semeadura. *Planta Daninha*, v. 20, p. 381-387, 2002.

MÖBIUS, N.; HERTWECK, C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 12, p. 390-398, 2009.

NECHET, K. L.; BARRETO, R. W.; MIZOBUTI, E. S. *Bipolaris euphorbiae* as a biological control agent for wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-

specificity and variability in pathogen and host populations. *BioControl*, v. 51, n. 2, p. 259-275, 2006.

NEVE, P.; VILA-AIUB, M.; ROUX, F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytologist*, v. 184, p. 783-793, 2009.

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

POMELLA, A. W.; BARRETO, R. W.; CHARUDATTAN, R. *Nimbya alternantherae* a potential biocontrol agent for alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*. *BioControl*, v. 52, p. 271-288, 2007.

RIZZARDI, M. A.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. Interference of populations of *Euphorbia Heterophylla* and *Ipomoea ramosissima* isolated or in mixture in soybean crop. *Planta Daninha*, v. 22, p. 29-34, 2004.

RÜEGG, W. T.; QUADRANTI, M.; ZOSCHKE, A. Herbicide research and development: challenges and opportunities. *Weed Research*, v. 47, p. 271-275, 2007.

SAXENA, S.; PANDEY, A. K. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals fro the next millennium. *Applied Microbiology & Biotechnology*, v. 55, p. 395-403, 2001.

SOARES, D. J.; BARRETO, R. W. Fungal survey for biocontrol agents of *Ipomoea carnea* from Brazil. In: XII International Symposium on Biological Control of Weeds, 2008, La Grande Motte. Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford : CAB International, 2008. p. 206-210.

STETTER, J.; LIEB, F. Innovation in crop protection: trends in research. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 39, p. 1724-1744, 2000.

STRANGE, R.N. Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Natural Products Report*, v. 24, p. 127-144, 2007.

STUEBLER, H.; KRAEHMER, H-J.; HESS, M.; SCHULZ, A.; ROSINGER. C. Global changes in crop production and impact trends on innovation in weed

management, an industry view. Proceedings of the V International Weed Science Congress, Vancouver, 2003. p. 312.

TREZZI, M. M.; FELIPPI, C. L.; MATTEI, D.; SILVA, H. L.; NUNES, A. L., DEBASTIANI, C.; VIDAL, R. A. MARQUES, A. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. *Journal of Environmental Science and Health*, v.40, n.1, p. 101-109, 2005.

UENO, T.; HAYASHI, Y.; NAKASHIMA, T.; FUKAMI, H.; NISHIMURA, S. Isolation of AM-Toxin I, a new phytotoxic metabolite from *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, v. 65, p. 82-83, 1975.

VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M.; PRADO, R.; RUIZ-SANTAELLA, J. P.; VILA-AIUB, M. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 5, p. 265-269, 2007.

VURRO, M.; ELLIS, B. E. Effect of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar. *Plant Science*, v. 126, 29-38, 1997.

CAPÍTULO 1

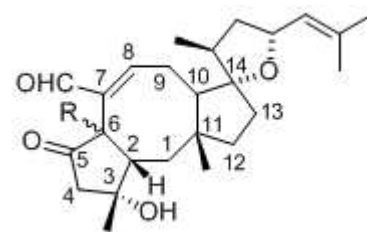
FITOTOXINAS FÚNGICAS: DIVERSIDADE ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Fitotoxinas são, em sua maioria, metabólitos secundários de baixa massa molar que incluem ácidos orgânicos, terpenóides, policetídeos, polipeptídeos, polissacarídeos, glicosídeos, glicopeptídeos e proteínas (BERESTETSKIY, 2008; BARBOSA et al., 2009). Devido à grande diversidade estrutural, agrupar metabólitos fitotóxicos com base em classes químicas é uma tarefa difícil. Nesta revisão, os compostos serão agrupados nas seguintes categorias: terpenóides, fenólicos, nitrogenados, peptídeos e compostos diversos.

1. Terpenóides

Os terpenos constituem um vasto e estruturalmente diverso grupo de metabólitos secundários biossintetizados pela via do mevalonato, cujos esqueletos carbônicos são constituídos por subunidades de cinco carbonos (C₅) derivadas do isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) (Mann, 2005; Breitmaier 2006). Diversos terpenóides com atividade fitotóxica têm sido isolados de culturas de fungos patógenos de plantas.

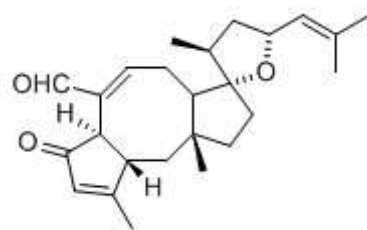
As ophiobolinas são um grupo de metabólitos sesterterpenóides policíclicos divididas em 12 subgrupos (ophiobolinas A–M) de acordo com a ordem de descoberta e com características estruturais. São produzidas por diferentes espécies do gênero *Bipolaris* e apresentam atividades biológicas diversas, como inibição de germinação, do crescimento de raízes e coleótilos, diminuição da fixação de CO₂, alterações na permeabilidade de membranas e inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Muromtsev et al., 1994; Au et al., 2000). A espécie fitopatogênica *Drechslera gigantea*, isolada de *Digitaria sanguinalis* naturalmente infectada, foi capaz de produzir em meio líquido as fitotoxinas ophiobolina A (1), 6-*epi*-ophiobolina A (2),



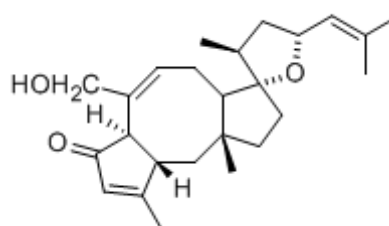
(1) Ophiobolina A (R = \downarrow H)

(2) 6-*epi*-ophiobolina A (R = \uparrow H)

3-anidro-6-*epi*-ophiobolina A (3) e ophiobolina I (4). A atividade biológica destes compostos (concentrações entre 0,13 e 0,63 μ M) foi avaliada em diversas espécies de plantas e alguns aspectos relacionados à correlação estrutura-atividade foram considerados. Ophiobolina A apresentou elevada fitotoxicidade para todas as espécies de plantas testadas a uma concentração de 0,13 μ M. O metabólito 6-*epi*-ophiobolina mostrou o mesmo espectro de ação, mas atividade fitotóxica inferior. O composto 3-anidro-6-*epi*-ophiobolina foi inativo para quase todas as espécies de plantas, enquanto ophiobolina I foi totalmente inativa mesmo na maior concentração



(3) 3-anidro-6-*epi*-ophiobolina A



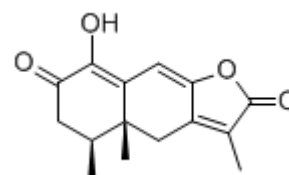
(4) Ophiobolina I

de plantas, enquanto ophiobolina I foi totalmente inativa mesmo na maior concentração

testada. Os resultados sugerem a importância de algumas características estruturais para a atividade biológica, como o grupo hidroxila em C₃, a estereoquímica em C₆ e o grupo aldeído em C₇ (Evidente et al., 2006a).

O sesquiterpeno fitotóxico caracterizado como 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olídeo (**5**) foi isolado do extrato em acetato de etila de cultura (micélio e meio líquido) do fungo

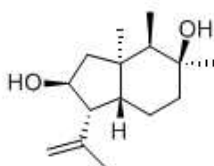
Malbranchea aurantiaca. Este composto inibiu significativamente o crescimento radicular de plântulas de *Amaranthus hypocondriacus* (IC₅₀ = 6,57 μmol L⁻¹). Ensaio fitotóxico mostraram que o composto inibiu a ativação da adenosina monofosfato



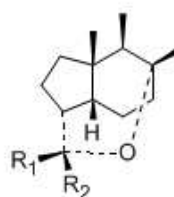
(5) 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-olídeo

cíclico fosfodiesterase dependente da calmodulina (proteína envolvida na ativação de diversas enzimas importantes para eventos bioquímicos relacionados ao crescimento das plantas), com IC₅₀ = 10,2 μmol L⁻¹ (Martínez-Luis et al., 2005).

Os filtrados de cultura dos fungos *Seiridium cardinale*, *S. cupressi* e *S. unicornis* (patógenos de *Cupressus sempervirens* L.) forneceram sete compostos fitotóxicos, entre eles os três sesquiterpenos seiricardinas A, B e C (**6-8**). Na concentração de 0,1 mg mL⁻¹, as toxinas induziram sintomas em plantas hospedeiras (*C. sempervirens*, *C. macrocarpa* e *C. arizonica*) muito similares aos observados na infecção pelos fungos. Em plantas não hospedeiras (*Lycopersicon esculentum* e *Ocimum basilicum*) as toxinas produziram clorose e necrose (Ballio et al., 1991).



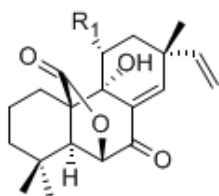
(6) Seiricardina A



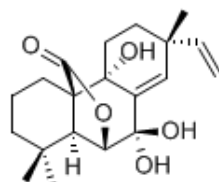
(7) Seiricardina B (R₁ = CH₃, R₂ = CH₂OH)

(8) Seiricardina C (R₁ = CH₂OH, R₂ = CH₃)

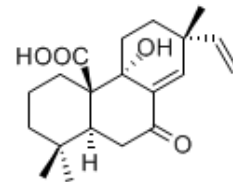
Sphaeropsidinas A–F são diterpenos do tipo primarano produzidos por *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi*, patógeno de espécies do gênero *Cupressus*. A fitotoxicidade dos compostos (10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi avaliada contra diferentes espécies hospedeiras (*C. sempervirens*, *C. macrocarpa* e *C. arizonica*) e não hospedeiras (*L. esculentum* e *Phaseolus vulgaris*). Sphaeropsidina A (**9**), sphaeropsidina B (**10**) e sphaeropsidina C (**11**) apresentaram as maiores atividades para todas as espécies. Sphaeropsidina D (**12**) foi tóxica apenas para *C. macrocarpa*, *L. esculentum* e *P. vulgaris*, sphaeropsidina E (**13**) não afetou nenhuma das espécies e sphaeropsidina F (**14**) apresentou fitotoxicidade apenas para *C. sempervirens*. Para fins de estudo da relação estrutura-atividade, oito análogos foram sintetizados e suas atividades fitotóxicas avaliadas. Os resultados obtidos permitiram aos autores inferir sobre a importância da preservação do anel primarano tricíclico, da dupla ligação C₈-C₁₄, do grupo hidroxila em C₁₃, do grupo carboxílico em C₁₀ e da integridade do anel A para seletividade fitotóxica dos compostos (Sparapano et al., 2004).



(9) Sphaeropsidina A (R1 = H)

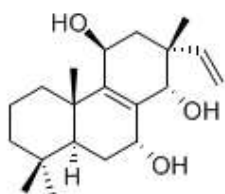


(10) Sphaeropsidina B

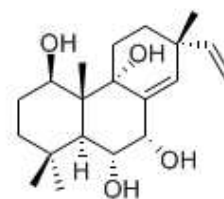


(11) Sphaeropsidina C

(12) Sphaeropsidina D (R1 = OH)



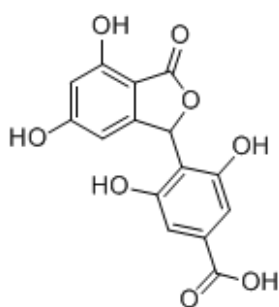
(13) Sphaeropsidina E



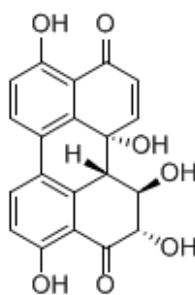
(14) Sphaeropsidina F

2. Compostos Fenólicos

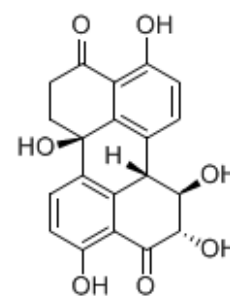
O composto denominado ácido cryphonérico (**15**) foi isolado do fungo *Cryphonectria parasitica*, causador de queimeira em *Castanea sativa*. Este composto, na concentração de 100 μM , foi capaz de inibir completamente o desenvolvimento de plântulas de *Solanum sculentum* (tomate) (ARNONE et al., 2002). Os metabólitos alterlosinas I e II (**16** e **17**) foram isolados de *Alternaria alternata*, patógeno da planta daninha *Centaurea maculosa*. A 100 μM , as toxinas apresentaram atividade fitotóxica contra a planta hospedeira, tendo a alterlosina II induzido lesões necróticas significativamente maiores que a alterlosina I (STIERLE & CARDELLINA, 1989).



(**15**) ácido cryphonérico



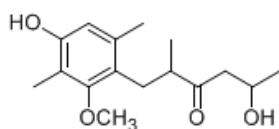
(**16**) alterlosina I



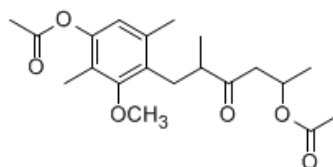
(**17**) alterlosina II

Os policetídeos fitotóxicos tagetolona (**18**) e tagetenolona (**19**) foram isolados de filtrado de cultura do fungo *Alternaria tagetica*, causador de manchas necróticas em folhas e caule da planta *Tagetes erecta*. Tagetolona (0,05 mg/aplicação) e tagetenolona (0,1 mg/aplicação) produziram lesões necróticas (0,22 e 0,92 mm^2 , respectivamente) em folhas da planta hospedeira (GAMBOA-ANGULO et al., 2001). O fungo forneceu também o composto fitotóxico conhecido como tirosol (**20**). Este metabólito é biossintetizado a partir da tirosina, através de desaminação oxidativa seguida por descarboxilação e redução do aldeído formado e tem sido

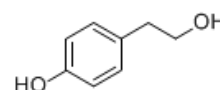
isolado de diversas outras espécies fitopatogênicas, incluindo *Ceratocystis* spp. (AYER et al., 1986; GREMAUD & TABACCHI, 1996; Guzmán-López et al., 2007), *Gleosporium laeticolor* (KIMURA & TAMURA, 1973), *Botryosphaeria obtusa* (VENKATASUBBAIAH & CHILTON, 1991), *Alternaria tagetica* (GAMBOA-ANGULO et al., 2001) e *Neofusicoccum parvum* (EVIDENTE et al., 2010).



(18) tagetolona

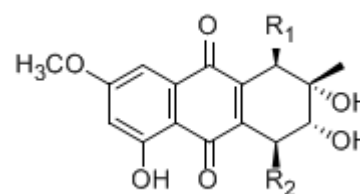


(19) tagetenolona



(20) tirosol

Altersolanóis A–H constituem um grupo de antraquinonas produzidas por diferentes espécies de fungos (SUEMITSU & NAKAMURA, 1981; SUEMITSU et al., 1990; YIAGI et al., 1993; ANDERSEN et al., 2008). Os altersolanóis A–F estimulam a oxidação do NADH, atuando como aceptores de elétrons na cadeia respiratória, tendo o altersolanol A (**21**) apresentado a maior atividade (Suemitsu et al., 1982, 1983). Na concentração de 30 μ M, altersolanol A inibiu em 95% o crescimento de células de *N. rustica* (Haraguchi et al., 1996). Além dos compostos altersolanol A (**21**) e B (**22**), o extrato em acetato de etila do filtrado de cultura do fungo fitopatogênico *Alternaria*



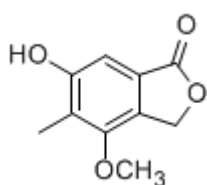
(21) altersolanol A ($R_1=R_2=OH$)

(22) altersolanol B ($R_1=R_2=H$)

(23) dactylariol ($R_1=OH$; $R_2=H$)

porri forneceu outra antraquinona denominada dactylariol (**23**) (SUEMITSU & NAKAMURA, 1981). Altersolanol A e B e dactylariol foram capazes de inibir o

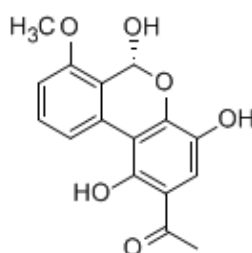
crescimento radicular de alface em 100 %, 61,2 % e 22,3 % e de cebolinha em 86,9 %, 63,4 % e 42,6 %, respectivamente.



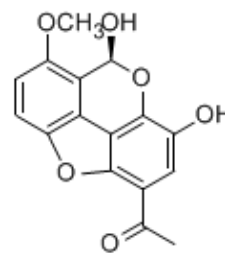
(24) porriolídeo

Extração líquido-sólido do filtrado do meio de cultura de *A. porri* forneceu também o composto fenólico porriolídeo **(24)**, que na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu o crescimento radicular de plântulas de cebolinha e alface em 48,5 % e 53,3%, respectivamente (SUEMITSU et al., 1993).

As toxinas alternethanoxinas A e B **(25 e 26)** foram isoladas da espécie *Alternaria sonchi*, patógeno da planta daninha *Sonchus arvensis*. A 4 mg mL^{-1} , alternethanoxina A e B produziram lesões necróticas com diâmetros de 4 e 2 mm, respectivamente, sobre folhas da planta hospedeira do fungo. As toxinas não mostram seletividade, tendo produzido necrose em folhas de diversas espécies (EVIDENTE et al., 2009).



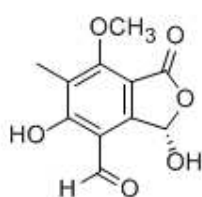
(25) alternethantoxina A



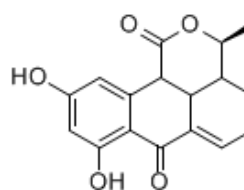
(26) alternethantoxina B

O filtrado de cultura do fungo *Seiridium cupressi*, patógeno do cipreste (*Cupressus* spp.), forneceu ácido ciclopáldico **(27)**. Em concentrações de 10 a 100 mg mL^{-1} , o metabólito produziu clorose e necrose em diferentes espécies avaliadas. A germinação de sementes e o crescimento radicular de aveia foram reduzidos em 50% pela aplicação do composto nas concentrações de 75 e 100 mg mL^{-1} , respectivamente (GRANITI et al., 1992).

O composto policetídeo α,β -desidrocurvularina (**28**) foi isolado de diversas espécies de fungos (ROBESON & STROBEL, 1985; VURRO et al., 1998; GUTIÉRREZ et al., 2005). A aplicação de 10 μg da toxina sobre folhas de algodão produziu lesões que se tornaram aparentes após 4 horas. Nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{disco}$, α,β -desidrocurvularina produziu inibição significativa do crescimento de raiz e epicótilo de *Lactuca sativa* L. (alface), respectivamente (GUTIÉRREZ et al., 2005).



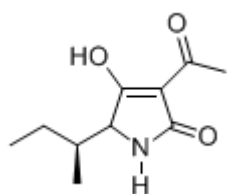
(27) ácido ciclopáldico



(28) α,β -desidrocurvularina

3. Compostos Nitrogenados

O ácido tenuazônico (**29**) é uma potente fitotoxina produzida por diversas espécies dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Phoma* e *Pyricularia*, sendo capaz de produzir lesões necróticas em folhas de várias plantas (MARSHALL, 1996; STIERLE & CARDELLINA, 1989; MERONUCK et al., 1972; NISHIMURA & KOHMOTO, 1983; UMETSU et al., 1972). Solução da toxina a 25 μM



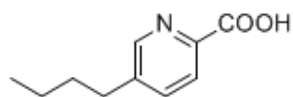
(29) ácido tenuazônico

foi capaz de inibir totalmente o crescimento de plântulas de arroz. Na concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} a toxina inibiu em 70% o crescimento de *Vigna radiata* (feijão-mungo) e em 90% o crescimento de *Brassica rapa* (nabo) (UMETSU et

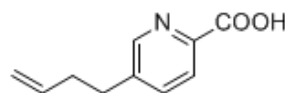
al., 1974). O ácido tenuazônico a $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ produziu a murcha de plântulas de *Datura innoxia* Miller, reduzindo em 64% o teor de clorofila após 72 h e em 40% o conteúdo protéico após 24 h de aplicação. Na concentração de $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, a toxina produziu clorose e necrose foliar e completa inibição do crescimento radicular de diversas mono e dicotiledôneas (Janardhanan & Husain, 1984). O composto foi capaz de inibir a atividade do fotosistema II (PSII) de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Spinacea oleracea* através do bloqueio do fluxo de elétrons de Q_A para Q_B , apresentado uma I_{50} de 41,5 e $48 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os estudos mostraram ainda que o ácido tenuazônico liga-se a um sítio de ligação em Q_B diferente de outros inibidores já conhecidos, representando portanto uma nova classe de inibidores do PSII (CHEN et al., 2007, 2008). A germinação de sementes de *Hordeum vulgare* (cevada), *Sorghum vulgare* (sorgo) e *Triticum aestivum* (trigo) foi reduzida em 50% pelo ácido tenuazônico nas concentrações de $79 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $316 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $550 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (HASAN, 1999). Ainda, o ácido tenuazônico ($100 \text{ } \mu\text{M}$) inibiu a germinação de sementes da planta daninha *Striga hermonthica* em 52,9 % (ZONNO & VURRO, 1999). A concentração mínima necessária para produzir efeitos tóxicos em sementes de diversas espécies do gênero *Nicotiana* foi de $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (KODAMA et al., 1999). Experimento utilizando folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mostrou que o ácido tenuazônico é capaz de induzir morte programada de células, com importante participação de proteases e espécies reativas de oxigênio (YAKIMOVA et al., 2009).

Os ácidos fusárico (**30**) e dehidrofusárico (**31**) são fitotoxinas produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*. Quando aplicados sobre folhas ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e sementes ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) de tomate, estes compostos foram capazes de induzir

clorose e necrose foliar e promover uma forte alongação radicular (CURRIR et al., 2000; EVIDENTE et al., 2001).

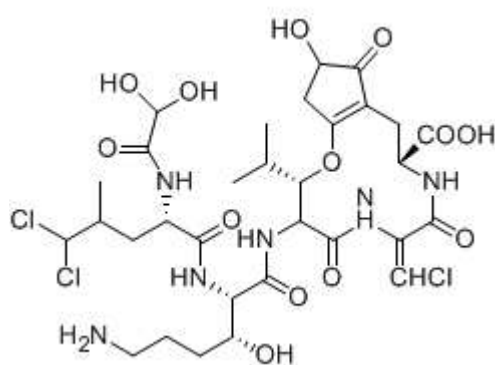


(30) ácido fusárico



(31) ácido deidrofusárico

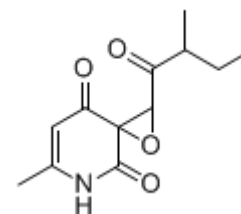
Victorina C (32) é o principal metabólito fitotóxico produzido pelo fungo *Cochiliobolus vitoriae*, agente causal de helminthosporiose em aveia (*Avena sativa*). É uma toxina hospedeiro-seletiva, capaz de reproduzir os sintomas causados pelo fungo. Inibição do crescimento radicular de *A. sativa* foi produzida pela aplicação da toxina na concentração de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Constituída por ácido glioxálico, 5,5-dicloroleucina, eritro- β -hidroxileucina, victalanina, treo- β -hidroxilisina e ácido α -amino- β -hidroxicloroacético (PEDRAS et al., 2006), a toxina induz despolarização de membranas, perda de eletrólitos e lise de protoplastos em células de *A. sativa*. Acredita-se que a toxina atue por meio de ligação a enzimas do



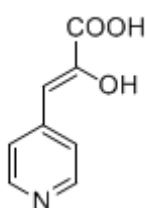
(32) Victorina C

complexo glicina descarboxilase nas mitocôndrias, cujo substrato, o ácido glioxálico, constitui parte da estrutura da toxina. Análogos sintéticos sem o resíduo de ácido glioxálico mostraram-se inativos (BERESTETSKIY, 2008).

Uma 2,4-piridiona trissubstituída denominada sapinopiridiona (**33**) foi obtida de cultura líquida do fungo *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi*, patógeno de coníferas isolado de tecidos corticais infectados de duas espécies de cipreste, *Cupressus macrocarpa* e *C. sempervirens*. Na concentração de 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sapinopiridiona foi capaz de induzir sintomas em três espécies hospedeiras (*Cupressus sempervirens*, *C. macrocarpa* e *C. arizonica*) (EVIDENTE et al., 2006b).

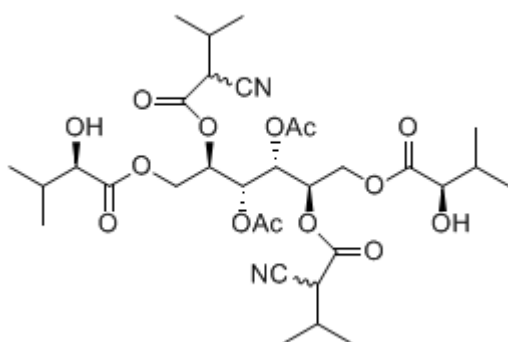


(33) sapinopiridiona



(34) ascosonchic acid

A fitotoxina ascosonchic acid (**34**) foi purificada a partir de filtrado de cultura de *Ascochyta sonchii*, patógeno isolado de lesões necróticas foliares da planta daninha *Sonchus arvensis*. Ensaída em folhas de diversas espécies de plantas (15 $\mu\text{g/gota}$), ascosonchic acid apresentou comportamento fitotóxico variado, tendo se apresentado inativa para diversas espécies, fracamente tóxica para outras (lesões necróticas entre 1 e 2 mm) e altamente fitotóxico para algumas espécies, nas quais foram produzidas lesões necróticas de até 1 cm de diâmetro (EVIDENTE et al., 2004).

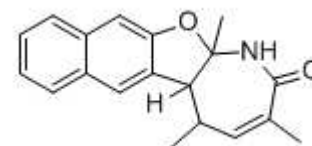


(35) brassicicolin A

O metabólito fitotóxico brassicicolin A (**35**) foi reportado como sendo produzido pelo fungo *Alternaria brassicicola*, agente causal da mancha de alternaria em folhas de espécies de Brassica, doença responsável por grandes prejuízos econômicos. Brassicicolin A mostrou

toxicidade seletiva. Na concentração de 0,5 mM, a toxina produziu clorose e necrose em folhas de *Brassica juncea* (espécie hospedeira de *A. brassicicola*), mas não produziu danos detectáveis em folhas da espécie não hospedeira *Sinapis alba* (PEDRAS et al., 2009).

O composto fitotóxico denominado drazepinona (**36**) foi isolado a partir de filtrado de cultura líquida do fungo *Drechslera siccans*, patógeno de sementes de *Lolium perenne*. Drazepinona, a 2 mg mL⁻¹, foi capaz de causar necrose em diversas espécies de plantas daninhas (EVIDENTE et al., 2005).

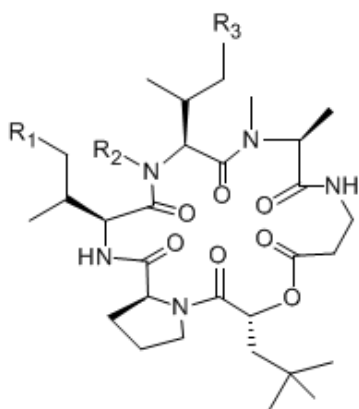


(**36**) drazepinona

4. Peptídeos

Fitotoxinas peptídicas são, em sua maioria, compostos cíclicos contendo grupos hidroxiácidos e resíduos de aminoácidos incomuns. Diferentes ciclodipeptídeos pertencentes ao grupo das destruxinas foram isoladas do fungo *Alternaria brassicae*, causador da doença da mancha negra em espécies do gênero *Brassica*. O fungo, isolado de plantas de canola (*Brassica campestris*) infectadas, foi capaz de produzir os compostos destruxina B (**37**), homodestruixina B (**38**), desmetildestruixina B (**39**) e destruxina B₂ (**40**) (AYER & PEÑA-RODRIGUES, 1987; BUCHWALDT & JENSEN, 1991). As destruxinas constituem uma classe de hexadepsipeptídeos cíclicos formados por um α -hidroxiácido e cinco resíduos de aminoácidos. As diferenças entre as destruxinas baseiam-se no grupo hidroxiácido, na N-metilação e no grupo R dos resíduos de aminoácidos (PEDRAS et al., 2002). A fitotoxicidade das destruxinas produzidas por *Alternaria brassicae* foi avaliada

contra 30 espécies de plantas, produzindo clorose e necrose foliar, sintomas similares aos produzidos na infecção pelo fungo. A destruxina B foi capaz de induzir sintomas



(37) destruxina B ($R_1=R_2=CH_3$; $R_3=H$)

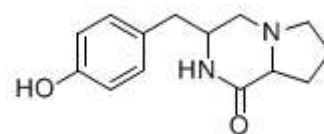
(38) homodestruixina ($R_1=R_2=R_3=CH_3$)

(39) desmetildestruixina B ($R_1=CH_3$; $R_2=R_3=H$)

(40) destruxina B2 ($R_1=H$; $R_2=CH_3$; $R_3=H$)

em concentrações de 0,2 a 3,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para plantas hospedeiras e de 15 a 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para plantas não hospedeiras, sugerindo que a toxina é seletiva para espécies do gênero *Brassica* (BUCHWALDT & GREEN, 1992). Um bioensaio quantitativo utilizando cultura de células da planta *Sinapis alba* foi desenvolvido para estabelecer a correlação entre a estrutura e a atividade fitotóxica da destruxina B, homodestruixina B e desmetildestruixina B. Os resultados indicaram que homodestruixina B apresentou maior fitotoxicidade ($EC_{50} = 30 \text{ mM}$), seguida por destruxina B ($EC_{50} = 50 \text{ mM}$) e desmetildestruixina B ($EC_{50} \gg 50 \text{ mM}$), sendo EC_{50} definido como a concentração na qual a viabilidade das células tratadas com a toxina é igual a 50% da viabilidade das células controle, após 6 dias de incubação (PEDRAS et al., 2000).

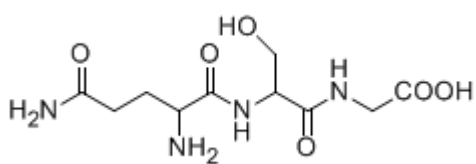
A dicetopiperazina ciclo(-L-Pro-L-Tyr-) denominada maculosina **(41)**, foi obtida como metabólito fitotóxico de *Alternaria alternata*, agente causal da queima negra das folhas em *Centaurea maculosa*. Na



(41) maculosina

concentração de 10 μM , o composto produziu lesões em folhas e tecidos de hipocótilo da planta hospedeira. Avaliada contra 19 espécies de plantas, maculosina

mostrou-se seletiva para a planta hospedeira. Outras dicetopiperazinas isoladas desse fungo mostraram atividade biológica significativamente inferior ou foram inativas, o que permite inferir sobre a importância do grupo fenólico para a atividade fitotóxica (BAINS & TEWARI, 1987; STIERLE & CARDELLINA, 1988, 1989). Um peptídeo fitotóxico constituído por três aminoácidos na sequência glicina-serina-glutamina (42) foi isolado de filtrado de cultura do fungo *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose. A toxina foi capaz de inibir em 25% a síntese de clorofila em

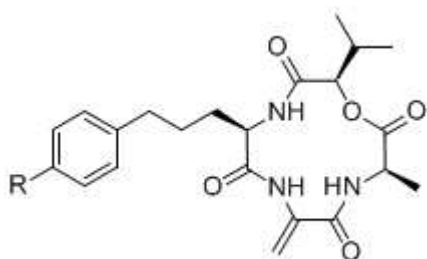


(42) glutamina-serina-glicina

plantas de milho susceptíveis, na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a síntese de clorofila foi inibida em até 75%, tanto em cultivares sensíveis quanto genótipos

resistentes. Quando do tratamento com solução da toxina na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o crescimento radicular foi totalmente inibido (BASHAN et al., 1995).

As toxinas AM I–III são fitotoxinas hospedeiro-específicas produzidas pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *mali*, patógeno causador da mancha marrom em folhas de cultivares susceptíveis de maçã. As toxinas são tetradepsipeptídeos cíclicos



(43) toxina AM I (R=OCH₃)

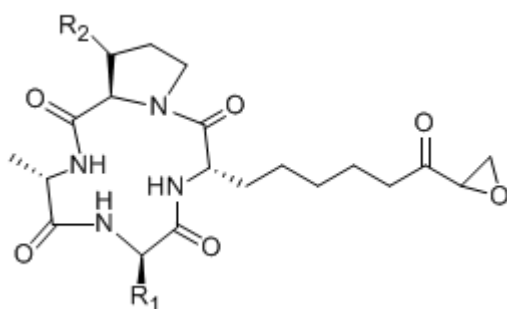
(44) toxina AM II (R=H)

(45) toxina AM III (R=OH)

contendo aminoácidos incomuns. A toxina AM I (43), denominada também alternariolídeo, apresenta o resíduo ácido L-2-hidroxi-3-metilbutanóico (L-Hmb) e resíduos de dois aminoácidos incomuns, a α,β -dehidroalanina (Δ Ala) e o ácido L-2-amino-5-(p-metoxifenil) pentanóico (L-Amp). Nas Toxinas AM II (44)

e AM III (45), o resíduo L-Amp é substituído pelo ácido L-2-amino-5-fenilpentanóico (L-App) e pelo ácido L-2-amino-5-(p-hidroxifenil)pentanóico, respectivamente. A toxina AM I (10 nM) produziu necrose de folhas em cultivares susceptíveis, sendo capaz de produzir perda imediata de eletrólitos (OKUNO et al., 1974; UENO et al., 1975a; NISHIMURA & KOHMOTO, 1983).

Cochliobolus carbonum é causador da mancha foliar do milho. Trata-se de um patógeno altamente virulento, podendo colonizar todas as partes da planta. O fungo é capaz de produzir tetraciclopeptídeos fitotóxicos altamente seletivos chamados toxinas HC (de *Helminthosporium carbonum*, um dos sinônimos para a forma assexuada deste fungo). A principal delas, a toxina HC I (46) apresenta a estrutura ciclo(D-Pro- corresponde ao ácido L-2-amino-9,10-epoxi-8-oxodecanóico (UENO et al., 1975b; UENO, 1990; POPE et al., 1983). Estruturalmente, A Toxina HC II (47) difere da HC I pela substituição da glicina adjacente ao Aeo por resíduo de alanina. Tal substituição não altera a especificidade, mas reduz a potência da toxina (STROBEL, 1982). A toxina HC III (48) difere da HC I pela presença de trans-3-hidroxiprolina em lugar de prolina (UENO, 1990; NISHIMURA & KOHMOTO, 1983). Os valores de ED₅₀, baseados na inibição do crescimento radicular de plantas susceptíveis, foram de 0,2 µg mL⁻¹ para HC I, 0,4 µg mL⁻¹ para HC II e 2,0 µg mL⁻¹ para HC III. Genótipos resistentes tiveram o crescimento radicular inibido pela HC I apenas na concentração de 100 µg mL⁻¹, o que mostra a alta seletividade. Atuam por inibição da histona desacetilase e as funções cetona e epóxido da unidade L-Aeo são essenciais para a atividade biológica (UENO, 1990; NISHIMURA & KOHMOTO, 1983; RAMUSSEN & SCHEFFER, 1988).



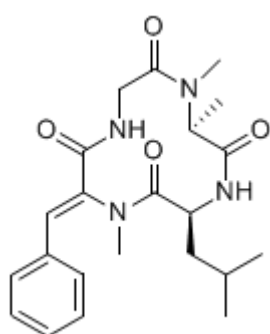
(46) toxina HC I ($R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$)

(47) toxina HC II ($R_1 = R_2 = \text{H}$)

(48) toxina HC III ($R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{OH}$)

É interessante ressaltar que toxinas HC são capazes de causar reversão morfológica de células oncogênicas de mamíferos e inibir a divisão celular em concentrações entre 10 e 100 ng mL⁻¹. Tais efeitos, além da baixa citotoxicidade, são consistentes com seu mecanismo de ação e compostos similares vêm sendo desenvolvidos como agentes quimioterápicos (KIM et al., 1985; RAMUSSEN & SCHEFFER, 1988).

O tetrapeptídeo cíclico tentoxina (49) é um composto fitotóxico isolado de diversas outras espécies do gênero *Alternaria* (MEYER et al., 1974; SUEMITSU et al., 1992; YOSHIDA et al., 1990; FUMARAI et al., 2001). A toxina é constituída



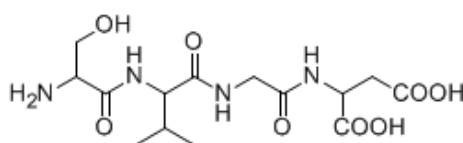
(49) tentoxina

por unidades de glicina, L-leucina, L-N-metilalanina e N-metildehidrofenilalanina, tendo sido capaz de induzir clorose em diversas espécies de mono e dicotiledôneas, não havendo relação taxonômica entre espécies sensíveis ou resistentes (SUEMITSU et al., 1992; DURBIN & UCHYTIL, 1977). A tentoxina liga-se às subunidades

α, β da F_1 -ATPase de cloroplastos (CF_1), bloqueando a hidrólise de ATP e causando clorose em plantas sensíveis (BROSH et al., 1995; WALTON, 2006; BLAND et al., 1993). A presença da porção estireno no resíduo desidrofenilalanil é determinante para a atividade clorótica, visto que a

dihidrotentoxina, precursor biossintético da tentoxina, praticamente não produz tal efeito (GROSH, 2002; MEISS et al., 2008).

Exemplo de peptídeo não ciclizado é a denominada toxina AS-I (**50**) produzida por *Alternaria alternata* f. sp. *helianthina*, patótipo de girassol (*Helianthus annuus* L.). Caracterizada como o tetrapeptídeo Ser-Val-Gly-Clu, a toxina (10^{-2} mol L⁻¹) foi capaz de desenvolver necrose em folhas de girassol, mas não apresentou toxicidade contra folhas de tabaco (LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES et al., 1997).



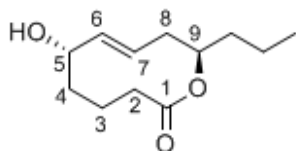
(**50**) toxina AS I

A proteína cerato-platanin foi identificada em filtrado de cultura de *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, patógeno de *Platanus acerifolia*. A quantidade mínima capaz de induzir necrose foliar em folhas de tabaco foi de 0,8 nmol (PAZZAGLI et al., 1999; CARRESI et al., 2006). Outra proteína fitotóxica, a cassicolina foi isolada do fungo *Corynespora cassicola*, patógeno causador de manchas necróticas em folhas, caule, raízes e frutos de mais de 70 espécies de plantas. Avaliada na concentração de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra várias espécies de plantas, a proteína mostrou seletividade contra plantas hospedeiras do fungo (LAMOTTE et al., 2007; BARTHE et al., 2007).

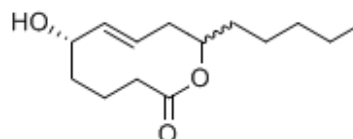
5. Compostos diversos

O nonenólídeo dissustituído denominado putaminoxina A (**51**) foi obtido do fungo *Phoma putaminum*, isolado de folhas da planta daninha *Erigeron annuus*. Na

concentração de $2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, a toxina produziu sintomas similares à doença causada pelo fungo (necrose e clorose) (EVIDENTE et al., 1995). Investigações posteriores levaram ao isolamento de quatro outros metabólitos estruturalmente relacionados: as putaminoxinas B, C, D e E (52-55) (EVIDENTE et al., 1997). Putaminoxina C mostrou toxicidade similar à putaminoxina A, enquanto putaminoxina B, D e E não apresentaram fitotoxicidade. Os resultados indicaram que o tipo de cadeia lateral em C₉, a ligação dupla em C₆ e o grupo hidroxila em C₅ são importantes para a atividade biológica (EVIDENTE et al., 1995, 1997). Apenas recentemente a putaminoxina A teve a estereoquímica em C₉ definida (SABITHA et al., 2009).

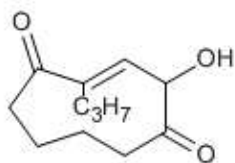


(51) putaminoxina A

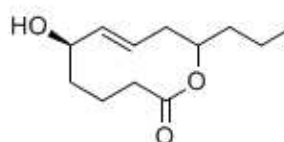


(52) putaminoxina B

(53) putaminoxina D



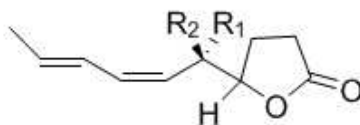
(54) putaminoxina C



(55) putaminoxina E

Duas diidrofuranonas 5-substituídas denominadas sapinofuranonas A e B (56 e 57) foram obtidas de cultura líquida de três isolados do fungo *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi* isolados de tecidos corticais infectados de *Cupressus macrocarpa* e *C. sempervirens*. Sapinofuranonas A e B apresentaram atividades fitotóxicas para plantas não-hospedeiras (*Solanum esculentum*) em concentrações de 0,05 a 0,1

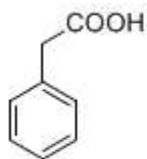
$\mu\text{g mL}^{-1}$ e para plantas hospedeiras (*C. sempervirens*, *C. macrocarpa*, *C. arizonica*, *Pinus halepensis* e *P. radiata*) em concentrações de 0,1 a 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (EVIDENTE et al., 1999).



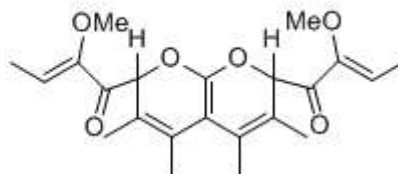
(56) sapinofuranona A ($R_1=\text{OH}$; $R_2=\text{H}$)

(57) sapinofuranona B ($R_1=\text{H}$; $R_2=\text{OH}$)

Biscogniauxia mediterranea, patógeno de *Quercus suber*, produz o ácido fenilacético (**58**) e o biscopiran (**59**), capazes de produzir lesões necróticas em *Q. suber* nas concentrações 130 e 26 μM , respectivamente (EVIDENTE et al., 2005b).

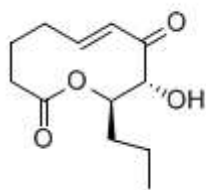


(58) ácido fenilacético

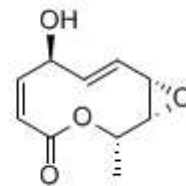


(59) biscopiran

Cultura em meio líquido do fungo *Stagnospora cirsi* Davis, patógeno foliar da planta daninha *Cirsium arvense*, forneceu um nonenolídeo estruturalmente relacionado às putaminoxinas, denominado stagonolídeo (**60**). A concentração mínima capaz de causar necrose foliar em *C. arvense* foi de 0,1 mM, tendo produzido halos necróticos de até 5 mm na concentração de 0,5 mM, em 48 h de tratamento. A toxina foi capaz de produzir sintomas em discos de folhas de diferentes espécies de plantas, não tendo demonstrado especificidade.



(60) stagonolídeo

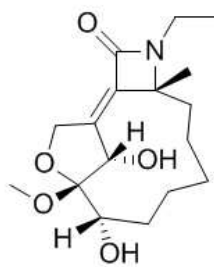


(61) stagonolídeo H

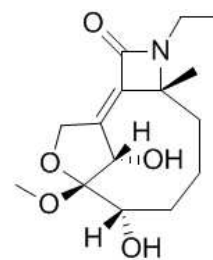
Em 1 μM , stagonolídeo inibiu em 30% o crescimento radicular de sementes da planta hospedeira. Quando ensaiada na concentração de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a toxina mostrou seletividade para espécies da família Asteraceae, inibindo o crescimento radicular de plantas desta família em até 70% (YUZIKHIN et al., 2008). Outros oito nonenolídeos, Stagonolídeo B–F (EVIDENTE et al., 2008a) e G–I (EVIDENTE et al., 2008b) foram posteriormente isolados. Apenas stagonolídeo H (**61**) apresentou atividade fitotóxica significativa. A concentração mínima capaz de produzir lesões foliares em *C. arvense* foi de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\sim 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), que representa um nível de toxicidade similar ao do stagonolídeo (EVIDENTE et al., 2005b).

Quatro oxazatricicloalquenonas denominadas phyllostictinas A–D (**62–65**) foram isoladas do fungo *Phyllosticta cirsii*, patógeno da espécie *Cirsium arvense*. Ensaçadas na concentração de 6 mM sobre folhas de *C. arvense*, phyllostictina A (**62**) apresentou a maior atividade fitotóxica, tendo produzido manchas necróticas de 6 a 7 mm de diâmetro. Phyllostictina B (**63**) e D (**65**) apresentaram atividade intermediária e phyllostictina C (**64**) foi inativa. Os resultados mostraram correlação entre características estruturais e atividade fitotóxica. A toxicidade tornou-se menor com a diminuição das dimensões e da liberdade conformacional do anel macrocíclico. A integridade do Sistema oxazatricicloalquenona mostrou-se importante para a preservação da atividade biológica (EVIDENTE et al., 2008c). Phyllostictina A na

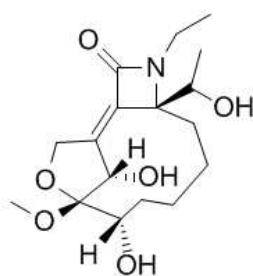
concentração de 1 mM foi capaz de provocar a morte da totalidade dos protoplastos de *C. arvensis* e *Nicotiana tabacum* após 1 h de tratamento (ZONNO et al., 2008).



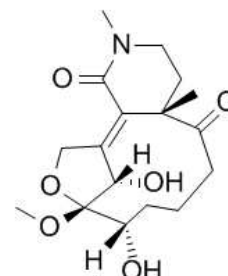
(62) Phylostictina A



(63) Phylostictina B



(64) Phylostictina C

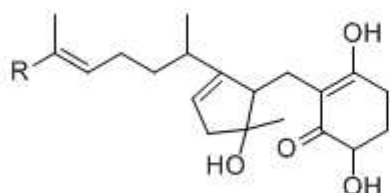


(65) Phylostictina D

O fungo filamentosso *Alternaria alternata* apresenta diversas variantes que causam doenças em plantas distintas e produzem toxinas específicas contra seus hospedeiros. Como *A. alternata* é uma espécie cosmopolita e geralmente saprofítica, estas variantes hospedeiro-específicas foram designadas como patótipos de *A. alternata* (NISHIMURA & KOHMOTO, 1983; ITO et al., 2004). As toxinas produzidas pelos diferentes patótipos de *A. alternata* apresentam grande diversidade estrutural. As Toxinas AM I–III (46-48) são produzidas pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *mali*, patótipo de cultivares de maçã, e a toxina AS-I (50) produzida por *Alternaria alternata* f. sp. *helianthina*, patótipo de girassol. Dois outros patótipos da espécie *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (anteriormente *Alternaria citri*) são conhecidos por causarem a mancha marrom em citros. São isolados hospedeiro-

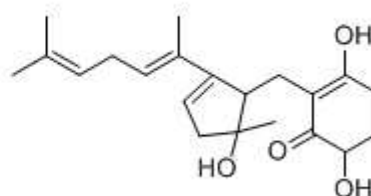
específicos, um deles tendo sido encontrado em tangerina (*Citrus reticulata*) e outro encontrado causando manchas foliares em limão rugoso (*Citrus jambhiri*). Filtrados de cultura dos diferentes patótipos apresentaram toxicidade seletiva para os tecidos dos respectivos hospedeiros (KOHMOTO et al., 1979, 1993). Dois grupos de fitotoxinas produzidas pelo patógeno de tangerinas são conhecidos como Toxinas ACTG (KONO et al., 1986a, 1986b, 1989) e Toxinas ACT (KOHMOTO et al., 1983, 1990). As características estruturais comuns às toxinas ACTG são a presença de um anel de 6 membros ligado via metileno a um anel de cinco membros apresentando substituinte alquenil (KONO et al., 1986a, 1986b, 1989). As atividades biológicas foram avaliadas através de ensaios em folhas da planta hospedeira. As toxinas ACTG A (66) e B (67) produziram sintomas a $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, ACTG C (68) não apresentou atividade significativa e ACTG D, E e F (69-71) mostraram atividade intermediária (KONO et al., 1986a, 1986b). Dois outros componentes minoritários foram isolados do mesmo fungo, tendo sido identificados como toxinas ACTG G (72) e H (73). Suas estruturas foram determinadas como correspondentes à anidro-ACTG A e anidro-ACTG F, respectivamente (KONO et al., 1989). As toxinas ACT I (74) e ACT II (75) apresentam como parte de suas estruturas o grupo ácido 9,10-epoxi-9-metildecatrienóico. São compostos fitotóxicos com seletividades distintas: apenas ACT I apresentou atividade tóxica seletiva para espécies de citros enquanto ACT II apresentou fitotoxicidade para determinados cultivares de pêra japonesa (*Pyrus serotina*), similarmente à da toxina AK produzida por *A. alternata* patótipo da pêra japonesa (KOHMOTO et al., 1990). Diferentes diastereoisômeros são possíveis para as toxinas ACT. As toxinas ACT diastereoisoméricas diferem entre si com relação à estereoquímica das ligações duplas da porção ácido decatrienóico. A toxina ACT I_b foi obtida como principal

componente fitotóxico do grupo, tendo sido capaz de induzir necrose foliar em cultivares susceptíveis a uma concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (KOHMOTO et al, 1983, 1991).

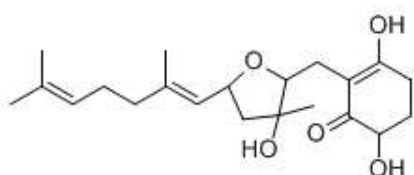


(66) toxina ACTG A (R=CH₃)

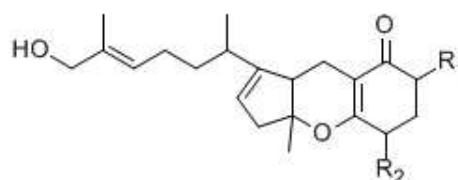
(71) toxina ACTG F (R=CHO)



(67) toxina ACTG B

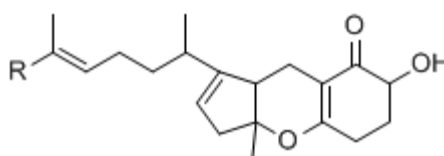


(68) toxina ACTG C



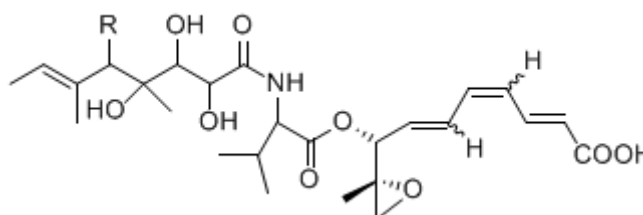
(69) toxina ACTG D (R₁=OH; R₂=H)

(70) toxina ACTG E (R₁=H; R₂=OH)



(72) toxina ACTG G (R=CH₃)

(73) toxina ACTG H (R=CHO)

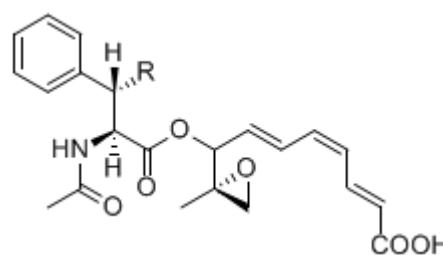


(74) toxina ACT I (R=CH₃)

(75) toxina ACT II (R=H)

As toxinas AK e as toxinas AF, produzidas por outras duas variantes de *A. alternata*, também apresentam em suas estruturas o grupo ácido 9,10-epoxi-9-metildecatrienóico presente nas toxinas ACT. As toxinas AK I (**76**) e AK II (**77**) foram isoladas de cultura líquida de *Alternaria alternata* f. sp. *kikuchiana* patótipo da pêra japonesa e causador da mancha negra em cultivares de *Pyrus serotina*. A Toxina AK I apresentou elevada toxicidade, causando necrose em folhas de cultivares susceptíveis na concentração de 10 ng mL^{-1} (NAKASHIMA et al., 1982, 1985). As toxinas produziram efeitos

drásticos nas membranas celulares, causando perda de eletrólitos e material orgânico em células susceptíveis com poucos minutos de exposição. As menores concentrações em que as toxinas AK I e



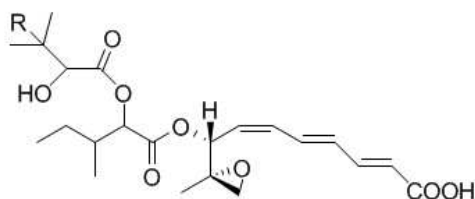
(76) toxina AK I (R=CH₃)

(77) toxina AK II (R=H)

AK II produziram necrose em cultivares sensíveis foi de $5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (NAKASHIMA et al., 1982, 198; UENO, 1990).

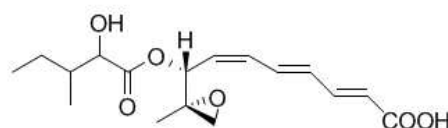
O patótipo de morango, *Alternaria alternata* f. sp. *fragariae* (antes *Alternaria fragariae*) afeta apenas o cultivar de morango Morioka-16. Entretanto, este patótipo é também patogênico para certos cultivares de pera susceptíveis ao patótipo da pera japonesa (MAEKAWA et al., 1984). Tal comportamento fitopatogênico pode ser explicado pela produção das toxinas AF I, II e III (**78-80**), que embora possuam estruturas muito similares, apresentam comportamentos biológicos distintos. A toxina AF I ($0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) é tóxica tanto para o morango cv. Morioka-16 quanto para o cultivar de pera cv. Nijisseiki. AF II ($0,02 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) é tóxica apenas para o cultivar de pera e AF III ($1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) é tóxica apenas para cultivar de morango. As diferenças entre as toxinas AF encontram-se na porção ácido 2-hidroxi-3-metilpentanóico

presente nas três toxinas. Na toxina AF I o grupo 2-hidroxi encontra-se livre e nas toxinas I e III encontra-se esterificado com o ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutírico e 2-hidroxi-2-metilbutírico, respectivamente (NISHIMURA & KOHMOTO, 1983; UENO, 1990).



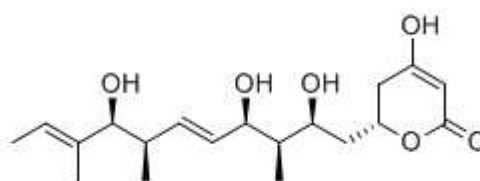
(78) toxina AF I (R=OH)

(80) toxina AF III (R=H)



(79) toxina AF II

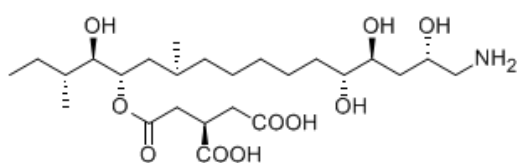
Do patótipo de *A. alternata* f. sp. *Citri*, patógeno do limão rugoso (*Citrus jambhiri*), foi também isolada a toxina ACLR I **(81)** (GARDNER et al., 1985). A atividade desse metabólito foi avaliada contra 67 cultivares de citros. A toxina mostrou-se altamente seletiva, tendo produzido necrose foliar ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) apenas em limão rugoso e limão cravo (*Citrus limonia*) (NAKASHIMA et al., 1983, 1985). A $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a toxina produziu desacoplamento da fosforilação oxidativa e alterações do potencial de membrana em mitocôndrias da planta hospedeira susceptível *C. jambhiri* (AKIMITSU et al., 1989).



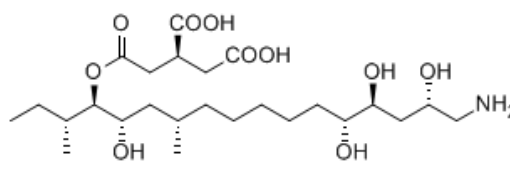
(81) toxina ACLR I

As toxinas AAL compõem um grupo de compostos estruturalmente relacionados que apresentam elevada fitotoxicidade. Foram originalmente isoladas como pares isoméricos TA₁ **(82)**, TA₂ **(83)** e TB₁, TB₂ a partir do filtrado de cultura

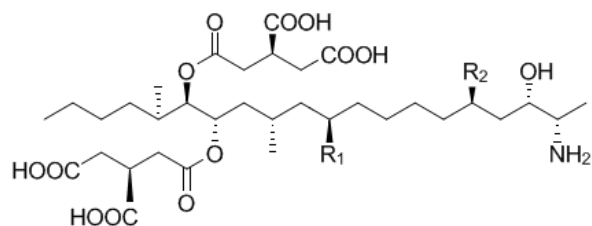
do fungo *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, causador de lesões graves nas hastes do tomateiro (BOTTINI & GILCHRIST, 1981; BOTTINI et al., 1981). Três outros pares de toxinas regioisoméricas TC₁ e TC₂, TD₁ e TD₂ e TE₁ e TE₂ foram isolados de cultura líquida do fungo (CALDAS et al., 1994). Embora tenham sido inicialmente consideradas como específicas para certas variedades de tomate (CLOUSE & GILCHRIST, 1987), foi mostrado que as toxinas AAL apresentam elevada toxicidade para diversas espécies de plantas (ABBAS et al., 1994). As toxinas AAL inibem uma forma de ceramida sintase encontrada em plantas de forma similar à inibição da ceramida sintase de mamíferos pela fumonisina B₁ (84) produzida por espécies do gênero *Fusarium* (ABBAS et al., 1994). Discos de folha de *Solanum nigrum* L. expostos a solução de toxinas AAL TA a 200 μmol L⁻¹ apresentaram perda de clorofila, de eletrólitos e autólise observáveis após 12 horas de exposição. Em concentrações entre 0,01 e 50 μmol L⁻¹ os efeitos foram observados em 24 horas (ABBAS et al., 1998a). As toxinas AAL foram patenteadas como herbicidas naturais, mas a toxicidade para mamíferos torna proibitivo o uso direto como herbicidas e os esforços na busca por análogos que sejam tóxicos apenas para plantas não tem logrado êxito (ABBAS et al., 1995, 1998a).



(82) toxina AAL TA₁



(83) toxina AAL TA₂



(84) Fumonisina B1 (R₁=OH; R₂=OH)

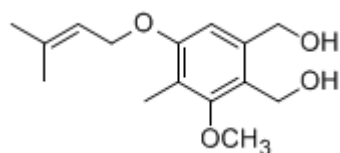
Fumonisina B2 (R₁=OH; R₂=H)

Fumonisina B3 (R₁=H; R₂=OH)

Fumonisina B4 (R₁=H; R₂=H)

As fumonisinas são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*. Inicialmente identificadas devido à elevada toxicidade contra mamíferos, formam um grupo de compostos constituído por diversas séries de análogos estruturais, sendo a série B (fumonisinas B₁ a B₄) as mais tóxicas para plantas e animais e as mais abundantes na natureza (ABBAS et al., 1998b). Suas estruturas **(84)** baseiam-se em uma longa cadeia carbônica hidroxilada contendo grupos metila substituintes e duas hidroxilas esterificadas cada uma com um grupo ácido propano-1,2,3-tricarboxílico. As toxinas da série B são as mais tóxicas para plantas e animais. Fumonisina B₁ e toxinas AAL são análogos à esfingosina e atuam por inibição da ceramida sintase (importante enzima da rota biossintética de esfingolípídeos), causando rápido e massivo acúmulo de fitoesfingosina e esfinganina, substratos da ceramida sintase. Como tais precursores produzem sintomas muito similares aos provocados pelas toxinas, tem sido proposto que o acúmulo destas bases esfingóides é responsável, ao menos em parte, pela fitotoxicidade (ABBAS et al., 1994, 1998b; SHIER et al., 1995). Várias plantas se mostraram sensíveis à toxina e a quantidade mínima necessária para produzir danos foliares foi de 0,05 µg. A toxina foi capaz de produzir clorose, necrose, atrofia de ramos e desfolhamento (DUTTON, 1996). Os compostos FB₁ e FB₂ apresentam grupo amino e FB₂ difere de FB₁ por apresentar uma hidroxila em C₁₀. FB₃ e FB₄ diferem das demais quanto à posição das hidroxilas na cadeia carbônica (DUTTON, 1996; BOYLE & KISHI, 1995).

Zinniol (**85**) é um policetídeo fitotóxico originalmente isolado de *Alternaria zinniae* (STARRATT, 1968) e posteriormente detectado em filtrados de cultura de *Phoma macdonaldii* (SUGAWARA & STROBEL, 1986) e de várias outras

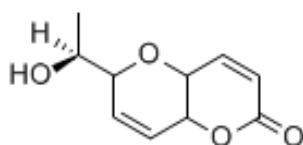


(85) zinniol

espécies de *Alternaria* (BARASCH et al., 1981; COTTY & MISAGHI, 1983; YU et al., 1983; STIERLLE et al., 1993). Isolado de cultura do fungo fitopatogênico *Alternaria porri*, zinniol a 5 mmol L^{-1}

apresentou fitotoxicidade nas folhas da planta hospedeira (*Allium fistulosum*) (COTTY & MISAGHI, 1983; YU et al., 1983). Estudos de correlação estrutura-atividade utilizando o zinniol e diversos análogos naturais e sintéticos sugerem que os grupos hidroximetil presentes na estrutura do zinniol são essenciais para a atividade fitotóxica (SUEMITSU et al., 1992; GAMBOA-ÂNGULO et al., 1997, 2000, 2002).

O fungo endofítico *Diplodia mutila* (Fr.) apud Mont. (estágio anamórfico de *Botryosphaeria stevensii*), patógeno da espécie *Quercus suber*, forneceu o



(86) diplopirona

composto fitotóxico diplopirona (**86**), que foi capaz de induzir lesões necróticas em *Q. suber* a uma concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$. Na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ a toxina causou colapso do tecido interno de plântulas de tomate, apresentando portanto

atividade fitotóxica não seletiva (EVIDENTE et al., 2003).

Além dos compostos fenólicos fitotóxicos altersolanol A, B, dactylariol e porriolídeo (**21-24**), o filtrado de meio de cultura do fungo fitopatogênico *Alternaria porri* forneceu outro composto denominado porritoxina (**87**), cuja concentração mínima capaz de produzir inibição do crescimento radicular de alface foi $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

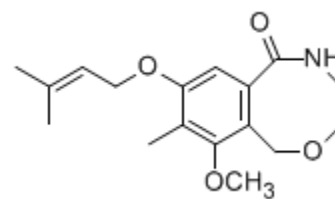
A 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porritoxina inibiu em 100% a germinação de alface (SUEMITSU et al., 1992a).

O fungo produziu ainda um metabólito **(88)** que não apresentou atividade fitotóxica em testes utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*) e

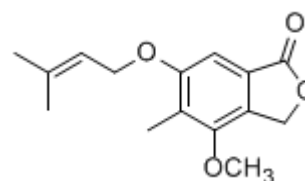
e cebolinha (*Allium fistulosum*) (SUEMITSU et al., 1992b). O mesmo metabólito foi reportado como sendo produzido pelo fungo *Nimbya alternanthera*, patógeno da espécie daninha *Alternanthera philoxeroides*. Neste trabalho, a atividade fitotóxica do composto foi verificada pela inibição da síntese de ATP (IC_{50} 66 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em cloroplastos isolados de espinafre

(*S. oleracea*). Os resultados mostraram que a toxina atua ao mesmo tempo como inibidora da reação de Hill e como desacopladora do transporte de elétrons na fosforilação oxidativa (DEMUNER et al., 2006).

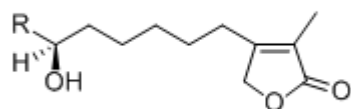
De filtrados de cultura dos fungos *Seiridium cardinale*, *S. cupressi* and *S. unicornis*, patógenos de *Cupressus sempervirens*, foram isolados o composto denominado Seiricuprolídeo **(89)** e os $\Delta^{\alpha,\beta}$ -butenolídeos seiridina **(90)** e isoseiridina **(91)**. Seiridina e isoseiridina a 0,3 mg mL^{-1} produziram clorose e necrose foliar em plantas hospedeiras (*Cupressus sempervirens*, *C. macrocarpa* e *C. arizonica*) e não-hospedeiras (*Lycopersicon esculentum* e *Ocimum basilicum*) (EVIDENTE et al., 1986; SPARAPANO et al., 1986). Seiricuprolídeo apresentou toxicidade para plantas hospedeiras (0,4 mg mL^{-1}) e não-hospedeiras (0,5 mg mL^{-1}), produzindo sintomas cloróticos e necróticos (EVIDENTE et al., 1994; BALLIO et al., 1988).



(87) porritoxina

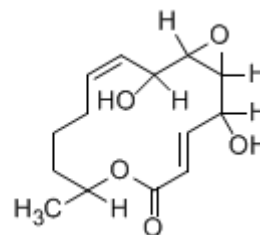


(88) 6-(3,3'-dimetilaloxi-4-metoxi-5-metilfitalídeo



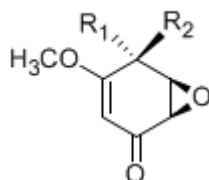
(89) seiridina (R = CH₃)

(91) isoseiridina (R = CH₂CH₃)



(90) seiricuprolídeo

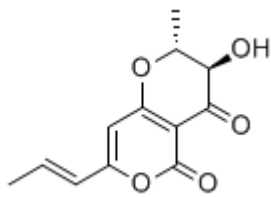
O filtrado de cultura de *S. sapinea* f. sp. *cupressi* forneceu, além das sphaeropsidinas (terpenóides), duas outras substâncias fitotóxicas denominadas sphaeropsidona (**92**) e episphaeropsidona (**93**). Ensaaiadas a 0,2 mg mL⁻¹, as toxinas causaram clorose, escurecimento e necrose em ramos de plantas hospedeiras (*Cupressus macrocarpa*, *C. arizonica* e *C. sempervivens*) e induziram murcha em tomate (EVIDENTE et al., 1998).



(92) sphaeropsidona

(93) episphaeropsidona

A radicinina (**94**) é um metabólito produzido por diversas espécies de fungos (GROVE, 1964; SHERIDAN & CANNING, 1999; NAKAJIMA et al., 1997; SOLFRIZZO et al., 2004). Ensaio fitotóxicos mostraram que a radicinina foi capaz

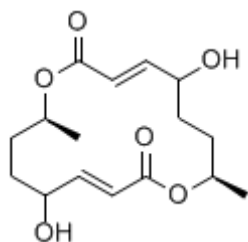


(94) radicinin

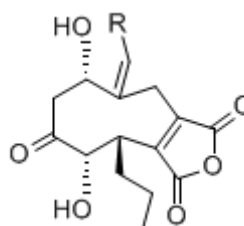
de causar lesões necróticas em folhas de *Coix lachrym-jobi* (0,3 $\mu\text{g}/\text{folha}$) (NAKAJIMA et al., 1997). A radicinin (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inibiu em 25% o crescimento radicular de plântulas de cenoura (*Daucus carota*) (SOLFRIZZO et al., 2004).

O macrolídeo denominado pirenophorol (**95**) foi isolado do fungo *Drechslera avenae* (Eidam) Schafir, patógeno de *Avena sterilis* L. Quando parcialmente imersas em solução do composto na concentração de 320 $\mu\text{mol L}^{-1}$, plântulas de *A. sterilis* L., *A. fatua* L. e *L. esculentum* L. apresentaram necrose foliar. Diversas outras espécies de mono e dicotiledôneas mostraram resistência (KASTANIAS et al., 2000).

Os metabólitos fitotóxicos cornexistina (**96**) e hidrocornexistina (**97**), isolados do fungo não patogênico *Paecilomyces variotii* Bainier, apresentam atividade tóxica para diversas espécies de plantas. Atuam pela inibição da asparagina aminotransferase e foram patenteados como herbicidas naturais (ABBAS et al., 1998; FIELDS et al., 1996; AMAGASA et al., 1994).



(95) pirenophorol



(96) cornexistina (R = CH₃)

(97) hidrocornexistina (R = CH₂CH₃)

6. Referências Bibliográficas

- Abbas, H. K.; Duke, S. O.; Merrill, A. H.; Wang, A. H.; Wang, E.; Shier, W. T.;
Phytochemistry **1998**, 47, 1509.
- Abbas, H. K.; Paul, R. N.; Riley, R. T.; Tanaka, T.; Shier, W. T.; Toxicon **1998**, 36,
1821.
- Abbas, H. K.; Shier, W. T.; Seo, J. A.; Lee, Y. W.; Musser, S. M.; Toxicon **1998**, 36,
2033.
- Abbas, H. K.; Tanaka, T.; Duke, S. O.; Porter, J. K.; Wray, E. M.; Hodges, L.;
Sessions, A. E.; Wang, E.; Merrill, A. H.; Riley, R. T.; Plant Physiol. **1994**, 106,
1085.
- Abbas, H. K.; Tanaka, T.; Shier, W. T.; Phytochemistry **1995**, 35, 1681.
- Akimitsu, K.; Kohmoto, k.; Otani, H.; Nishimura, S.; Plant Physiol. **1989**, 89, 925.
- Amagasa, T.; Paul, R. N.; Heitholt, J. J.; Duke, S. O.; Pestic. Biochem. Physiol.
1994, 49, 37.
- Andersen, B.; Dongo, A.; Pryor, B. M.; Mycol. Res. **2008**, 112, 241.
- Arnone, A.; Assante, G.; Nasini, G.; Strada, S.; Vercesi, A.; J. Nat. Prod. **2002**, 65,
48.
- Au, T. K.; Chick, W. S. H.; Leung, P. C.; Life Sci. **2000**, 67, 733.
- Ayer, W. A.; Browne, L. M.; Feng, M-C.; Orszanska, H.; SAeedi-Ghomi, H.; Can. J.
Chem. 1986, 64, 904.
- Ayer, W. A.; Peña-Rodrigues, L. M.; J. Nat. Prod. **1987**, 50, 400.
- Ballio, A.; Evidente, A.; Grantii, A.; Randazzo, G.; Sparapano, L.; Phytochemistry
1988, 27, 2117.
- Ballio, A.; Morelli, A. C.; Evidente, A.; Graniti, A.; Randazzo, G.; Sparapano, L.;
Phytochemistry **1991**, 30, 131.

- Barasch, I.; Mor, H.; Netzer, D.; Kashman, Y.; *Physiol. Plant Pathol.* **1981**, 19, 7.
- Barbosa, L. C. A.; Teixeira, R. R.; Montanari, R. M. Em *Current Trends in Phytochemistry*; Epifano, F., ed.; Kerala: Research Singpost, 2009, v. 1, p. 21-59.
- Barthe, P.; Pujade-Renaud, V.; Breton, F.; Gargani, D.; Thai, R.; Roumestand, C.; Lamotte, F.; *J. Mol. Biol.* **2007**, 367, 89.
- Bashan, B.; Levy, R. S.; Cojocaru, M.; Levy, Y.; *Physiol. Mol. Plant Physiol.* **1995**, 47, 225.
- Berestetskiy, A. O.; *App. Biochem. Microbiol.* **2008**, 44, 453.
- Bland, J. M.; Edwards, J. V.; Eaton, S. R.; Lax, A. R.; *Pestic. Sci.* **1993**, 39, 331.
- Bottini, A. T.; Bowen, J. R.; Gilchrist, D. G.; *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 2723.
- Bottini, A. T.; Gilchrist, D. G.; *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 2719.
- Boyle, C. D.; Kishi, Y.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4579.
- Breitmaier, E. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Wiley-VHC, 2006. 214 p. Cap. 1.
- Brosch, G.; Ramsom, R.; Lechner, T.; Walton, J. D.; Loidl, P.; *Plant Cell* **1995**, 7, 1941.
- Buchwaldt, L.; Green, H.; *Plant Pathol.* **1992**, 41, 55.
- Buchwaldt, L.; Jensen, J. S.; *Phytochemistry* **1991**, 30, 2311.
- Caldas, E. D.; Jones, A. D.; Ward, B.; Winter, C. K.; Gilchrist, D. G.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 327.
- Carresi, L.; Pantera, B.; Zoppi, C.; Cappugi, G.; Oliveira, A. L. Pertinhez, T. A.; Spisni, A.; Scala, A.; Pazzagli, L.; *Protein Exp. Pur.* **2006**, 49, 159.
- Chen, S.; Xu, X.; Dai, X.; Yang, C.; Qiang, S.; *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1767, 306;

- Chen, S.; Yin, C.; Dai, X.; Qiang, S.; Xu, X.; Environ. Exp. Bot. **2008**, 62, 279.
- Clouse, S. D.; Gilchrist, D. C.; Phytopathol. **1987**, 77, 80.
- Cotty, P. J.; Misaghi, I. J.; Hine, R. B.; Phytopathol. **1983**, 73, 1326.
- Cotty, P. J.; Mishagi, I.; Phytopathol. **1984**, 74, 785.
- Curir, P.; Guglieri, L.; Dolci, M.; Capponi, A.; Aurino, G.; Eur. J. Plant Pathol. **2000**, 106, 849.
- De Maio, P.; Spencer, E. Y.; White, R. W.; Can. J. Chem. **1961**, 39, 1608.
- Demuner, A. J.; Barbosa, L. C. A.; Veiga, T. A. M.; Barreto, R. W.; King-Diaz, B.; Lotina-Hennsen, B.; Biochem. System. Ecol. **2006**, 34, 790.
- Durbin, R. D.; Uchytel, T. F.; Phytopathol. **1977**, 67, 602.
- Dutton, M. E.; Pharmacol. Ther. **1996**, 70, 137.
- Evidente, A.; Punzo, B.; Andolfi, A.; Cimmino, A.; Melck, D.; Luque, J.; Phytopat. Medit. **2010**, 49, 74.
- Evidente, A.; Andolfi, A.; Abouzeid, M. A.; Vurro, M.; Zonno, M. C.; Motta, A.; Phytochemistry **2004**, 65, 475.
- Evidente, A.; Andolfi, A.; Cimmino, A.; Vurro, M.; Fracchiolla, M.; Charudattan, R.; J. Agric. Food Chem. **2006a**, 54, 1779.
- Evidente, A.; Andolfi, A.; Maddaru, O.; Franceschini, A.; Marras, F.; J. Nat. Prod. **2005b**, 68, 568.
- Evidente, A.; Andolfi, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C.; Motta, A.; Phytochemistry **2005**, 66, 715.
- Evidente, A.; Capasso, R.; Andolfi, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C.; Phytochemistry **1997**, 44, 1041.
- Evidente, A.; Capasso, R.; Andolfi, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C.; Phytochemistry **1998**, 48, 941.

- Evidente, A.; Cimmino, A.; Andolfi, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C.; Cantrell, C. L.; Motta, A.; *Tetrahedron* **2008c**, 64, 1612.
- Evidente, A.; Cimmino, A.; Berestetskiy, A.; Andolfi, A.; Motta, A.; *J. Nat. Prod.* **2008b**, 71, 1897.
- Evidente, A.; Cimmino, A.; Berestetskiy, A.; Mitina, G.; Andolfi, A.; Motta, A.; *J. Nat. Prod.* **2008a**, 71, 31.
- Evidente, A.; Fiore, M.; Bruno, G.; Sparapano, L.; Motta, A.; *Phytochemistry* **2006b**, 67, 1019.
- Evidente, A.; Lanzeta, R.; Capasso, R.; Andolfi, A.; Bottalico, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C.; *Phytochemistry* **1995**, 40, 1637.
- Evidente, A.; Maddau, L.; Spanu, E.; Franceschini, A.; Lazzaroni, S.; Motta, A.; *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 313.
- Evidente, A.; Mota, A. *Em Bioactive Coumpounds from Natural Sources: Isolation, Characterization and Biological Properties*; Tringali, C., ed.; Taylor & Francis: London, 2001, cap. 12.
- Evidente, A.; Punzo, B.; Andolfi, A.; Berestetskiy, A.; Motta, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 6656.
- Evidente, A.; Randazzo, G.; Ballio, A.; *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 593.
- Evidente, A.; Sparapano, L.; Fierro, O.; Bruno, G.; Giordani, F.; Motta, A.; *Phytochemistry* **1998**, 48, 1139.
- Evidente, A.; Sparapano, L.; Fierro, O.; Bruno, G.; Motta, A.; *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 253.
- Evidente, A.; Sparapano, L.; *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1720.
- Fields, S. C.; Mireles-Lo, L.; Gerwick, B. C.; *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 698.
- Fumurai, R.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Yoshida, M.; Horiuchi, S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 887

- Gamboa-Angulo, M. M.; Alejos-Gonzales, F.; Peña-Rodriguez, L. M.; J. Agric. Food Chem. **1997**, 45, 282; 119.
- Gamboa-Ângulo, M. M.; Alejos-González, F.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Delgado-Lamas, G.; Peña-Rodriguez, L. M.; J. Nat. Prod. **2000**, 63, 1117; 120.
- Gamboa-Angulo, M. M.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Alejos-Gonzales, F.; Delgado-Lamas, G.; Peña-Rodriguez, L. M.; J. Agric. Food Chem. **2002**, 50, 1053.
- Gamboa-Angulo, M. M.; García-Sosa, K.; Alejos-Gonzales, F.; Escalante-Erosa, F.; Delgado-Lamas, G.; Peña-Rodriguez, L. M.; J. Agric. Food Chem. **2001**, 49, 1228.
- Gardner, M.; Kono, Y.; Tatum, J. H.; Suzuki, Y.; Takeuchi, S.; Agric. Biol. Chem. **1985**, 49, 1235.
- Graniti, A.; Sparapano, L.; Evidente, A; Plant Pathol. **1992**, 41, 563.
- Gremaud, G.; Tabacchi, R.; Phytochemistry **1996**, 42,1547.
- Grosh, G.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2002**, 99, 3465.
- Grove, J. F.; J. Chem. Soc. **1964**, 3234;
- Gutiérrez, M.; Theoduloz, C.; Rodríguez, J.; Lolas, M.; Schemeda-Hirschmann, G.; J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 7701.
- Guzmán-López, O.; Trigos, A.; Fernández, F. J.; Yañez-Morales, M. J.; Saucedo-Castañeda, G. T.; World J. Microbiol. Biotechnol. **2007**, 23, 1473.
- Haraguchi, H.; Abo, T.; Fukuda, A.; Okamura, N.; Yagi, A.; Phytochemistry **1996**, 43, 989.
- Hasan, H. A. H.; Mycopathologia **1999**, 148, 149.
- Ito, K.; Tanaka, T.; Hatta, R.; Yamamoto, M.; Akimitsu, K.; Tsuge, T.; Mol. Microbiol. **2004**, 52, 339.
- Janardhanan, K. K.; Husain, A.; J. Phytopathol. **1984**, 111, 305.

- Kastanias, M. A.; Chrysayi-Tokousbalides, M.; *Pest Manag. Sci.* **2000**, 56, 227
- Kim, S-D.; Knoche, H. W.; Dunkle, L. D.; Mccrery, D. A.; Tomer, K. B.; *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 969.
- Kimura, Y.; Tamura, S.; *Agric. Biol. Chem.* **1973**, 37, 2925.
- Kodama, M.; Suzuki, T.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S.; *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **1999**, 56, 628.
- Kohmoto, K.; Akimitsu, K.; Otani, H.; *Phytopathol.* **1991**, 81, 719.
- Kohmoto, K.; Ioth, Y.; Kodama, M.; Otani, H.; Nakatsuka, S.; *Phytopathol.* **1990**, 80, 1067.
- Kohmoto, K.; Itoh, Y.; Shimomura, N.; Kondoh, Y.; Otani, H.; Kodama, M.; Sishimura, S.; Nakatsuka, S.; *Phytopathol.* **1993**, 83, 495.
- Kohmoto, K.; Scheffer, R. P.; Whiteside, J. O.; *Phytopathol.* **1979**, 69, 667.
- Kono, Y.; Gardner, J. M.; Suzuki, Kondo, H.; Y. Takeuchi, S.; *J. Pest. Sci.* **1989**, 14, 223.
- Kono, Y.; Gardner, J. M.; Suzuki, Y.; Takeuchi, S.; *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 1597.
- Kono, Y.; Gardner, J. M.; Takeuchi, S.; *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 801.
- Lamotte, F.; Duviau, M-P.; Sanier, C.; Thai, R.; Poncet, J.; Bieysse, D.; Breton, F.; Pujade-Renud, V.; *J. Chromatogr., A* **2007**, 849, 357.
- Liakopoulou-Kyriakides, M.; Lagopodi, A. L.; Thanassoulopoulos, C. C.; Stavropoulos, G. S.; Magara, V.; *Phytochemistry* **1997**, 45, 37.
- Liebermann, B.; Ellinger, R.; Pine, E.; *Phytochemistry* **1996**, 42, 1537.
- Maekawa, N.; Yamamoto, M.; Nishimura, S.; Kohmoto, K.; Kuwata, M.; Watanabe, Y.; *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **1984**, 50, 600.
- Mann, J. *Secondary metabolism*. ed.2. Oxford University Press, 2005. 374p.

- Marshall, G.; *Ann. Appl. Biol.* **1996**, 129, 415.
- Martínez-Luis, S.; González, M. C.; Ulloa, M.; Mata, R.; *Phytochemistry* **2005**, 66, 1012.
- Meiss, E.; Konno, H.; Groth, G.; Hisabori, T.; *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 24594.
- Meronuck, R. A.; Steele, J. A.; Mirocha, C. J.; Christensen, C. M.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1972**, 23, 613
- Meyer, W. L.; Kuyper, L. F.; Phelps, D. W.; Cordes, A. W.; *Chem. Comm.* **1974**, 339.
- Muromtsev, G. S.; Voblikova, V. D.; Kobrina, N. S.; Koreneva, V. M.; Krasnopolkaya, L. M.; Sadovskaya, V. L.; *J. Plant Regul.* **1994**, 13, 39.
- Nakajima, H.; Ishida, T.; Otsuka, Y.; Hamasaki, T.; Ichione, M.; *Phytochemistry* **1997**, 45, 41.
- Nakashima, T.; Ueno, T.; Fukami, H.; Taga, T.; Masuda, H.; Osaki, K.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S.; *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 815.
- Nakashima, T.; Ueno, T.; Fukami, H.; *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4469.
- Nishimura, S.; Kohmoto, K.; *Ann. Rev. Phytopathol.* **1983**, 21, 87.
- Okuno, T.; Ishita, Y.; Sawai, K.; Matsumoto, T.; *Chem. Lett.* **1974**, 635;
- Pazzagli, L.; Cappugi, G.; Manao, G.; Camici, G.; Santini, A.; Scala, A.; *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 24959.
- Pedras, M. S. C.; Biesenthal, C. J.; Zaharia, I. L.; *Plant Sci.* **2000**, 156, 185.
- Pedras, M. S. C.; Chumala, P. B. *Em Handbook of Biologically Active Peptides*; Kastin, A. J., ed.; Academic Press: New York, 2006, cap. 23.
- Pedras, M. S. C.; Chumala, P. B.; Jin, W.; Islam, M.; Hauck, D. W.; *Phytochemistry* **2009**, 70, 394.
- Pedras, M. S. C.; Zaharia, L. I.; Ward, D. E.; *Phytochemistry* **2002** 59, 579.

Ramm, K.; Ramm, M.; Lieberman, B.; Reuter, G.; *Microbiology* **1994**, 140, 3257.

Ramussen, J. B.; Scheffer, R. P.; *Plant Physiol.* **1988**, 86, 187.

Robeson, D. J.; Strobel, G. A.; *J. Nat. Prod.* **1985**, 48, 139.

Sabitha, G.; Yadagiri, K.; Swapna, R.; Yadav, J. S.; *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 5428.

Sheridan, H.; Canning, A-M.; *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1568.

Shier, W. T.; Abbas, H. K.; Badria, F. A.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1571.

Solfrizzo, M.; Vitti, C.; De Girolamo, A.; Visconti, A.; Logrieco, A.; Fanizzi, F. P.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3655.

Sparapano, L.; Bruno, G.; Fierro, O.; Evidente, A.; *Phytochemistry* **2004**, 65, 189.

Sparapano, L.; Evidente, A.; Ballio, A.; Graniti, A.; Randazzo, G.; *Experientia* **1986**, 42, 627.

Starratt, A. N.; *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 767.

Stierle, A. C.; Cardellina II, J. H.; Strobel, G. A.; *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 42.

Stierle, A. C.; Cardellina II, J. H.; Strobel, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 8008.

Stierle, A.; Hershenhorn, J.; Strobel, G.; *Phytochemistry* **1993**, 32, 1145.

Strobel, G. A.; *Ann. Rev. Biochem.* **1982**, 51, 309.

Suemitsu, R.; Horiuchi, K.; Horiuchi, M.; Hanabata, M.; *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, 56, 139.

Suemitsu, R.; Horiuchi, K.; Kubota, M.; Okamatsu, T.; *Phytochemistry* **1990**, 29, 1509.

Suemitsu, R.; Nakamura, A.; *Agric. Biol. Chem.* **1981**, 45, 2363.

Suemitsu, R.; Nakamura, A.; Isono, F.; Sano, T.; *Agric. Biol. Chem.* **1982**, 46, 1694.

- Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Kitaguchi, A.; Odamura, K.;
Phytochemistry **1992a**, 31, 2325.
- Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Morikawa, Y.; Biosci. Biotech. Biochem.
1992b, 56, 986.
- Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Horiuchi, M.; Morikawa, Y.; Sakaki, Y.; Matsumoto, Y.;
Biosci. Biotech. Biochem. **1993**, 57, 335.
- Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Kobuhara, T.; Horiuchi, M.; Horiuchi, K.; Agric. Biol.
Chem. **1990**, 54, 2449.
- Suemitsu, R.; Yamada, Y.; Sano, T.; Yamashita, K.; Agric. Biol. Chem. **1984**, 48,
2383.
- Sugawara, F.; Strobel, G.; Plant Sci. **1986**, 43, 19.
- Tamura, S.; Sakurai, A.; Agric. Biol. Chem. **1964**, 337.
- Ueno, T.; Hayashi, Y.; Nakashima, T.; Fukami, H.; Nishimura, S.; Phytopathol.
1975a, 65, 82.
- Ueno, T.; Nakashima, T.; Hayashi, Y.; Fukami, H.; Agric. Biol. Chem. **1975b**, 39,
1115.
- Ueno, T.; Pure & Appl. Chem. **1990**, 62, 1347.
- Umetsu, N.; Kaji, J.; Tamari, K.; Agric. Biol. Chem. **1972**, 37, 451.
- Umetsu, N.; Muramatsu, T.; Honda, H.; Tamari, K.; Agric. Biol. Chem. **1974**, 38,
791.
- Venkatasubbaiah, P.; Chilton, W. S. J. Nat. Prod. **1990**, 53, 1628.
- Vurro, M.; Evidente, A.; Andolfi, A.; Zonno, M. C.; Giordano, F.; Motta, A.; Plant
Sci. **1998**, 138, 67.
- Walton, J. D.; Earle, E. D. Stahelin, H.; Grieder, A.; Hirota, A.; Suzuki, A.;
Experientia **1985**, 15, 348.

- Walton, J. D.; *Phytochemistry* **2006**, 67, 1406.
- Yakimova, E. T.; Yordanova, Z. P.; Slavov, S.; Kapchina-Toteva, V. M.; Woltering, E. J.; *J. Phytopathol.* **2009**, 157, 592.
- Yiagi, A.; Okamura, N.; Haraguchi, H.; Abo, T.; Hasimoto, K.; *Phytochemistry* **1993**
- Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T.; *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 17174
- Yu, S. H.; Nishimura, S.; Furuichi, N.; *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **1983**, 49, 746.
- Yuzikhin, O.; Mitina, G.; Berestetskiy, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 7707.
- Zonno, M. C.; Vurro, M.; Lucretti, S.; Andolfi, A.; Perrone, C.; Evidente, A.; *Plant Sci.* **2008**, 175, 818.
- Zonno, M. C.; Vurro, M.; *Weed Res.* **1999**, 39, 15.

CAPÍTULO 3

Avaliação da fitotoxicidade de filtrados de cultura de fungos fitopatogênicos

Introdução

Durante trabalhos de levantamento e isolamento de fungos patógenos de plantas daninhas incidentes no Brasil com o propósito de selecionar potenciais candidatos para o uso como agentes controle biológico, suspeitou-se de que isolados de três espécies (*Nimbya alternantherae*, *Corynespora cassiicola* e *Alternaria euphorbiicola*) seriam capazes de produzir compostos fitotóxicos nas etapas iniciais do processo infeccioso.

Nimbya alternantherae foi isolado de tecidos necrosados da planta daninha *Alternanthera philoxeroides* (BARRETO e TORRES, 1999). Nativa da América do Sul e conhecida popularmente no Brasil como tripa-de-sapo ou erva-de-jacaré, *A. philoxeroides* tornou-se uma planta invasora muito agressiva em diversas regiões do mundo, tendo, por exemplo, sido listada entre as 20 plantas invasoras mais significantes na Austrália (THORP e LYNCH, 1999). *Nimbya alternanthera* apresentou elevada patogenicidade tanto contra biótipos brasileiros quanto australianos de *A. philoxeroides* (BARRETO e TORRES, 1999). Trabalhos posteriores mostraram que o fungo apresenta potencial para utilização como micro-herbicida eficiente contra *A. philoxeroides* (POMELLA et al. 2007).

O isolado de *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae* foi identificado como agente causal da mancha alvo (Target Spot) em *Lantana camara* (PEREIRA e BARRETO, 2000). Embora o fungo seja considerado patógeno “inespecífico” capaz de causar lesões foliares em mais de 70 espécies de plantas hospedeiras em regiões tropicais e subtropicais (SILVA et al., 1998). PEREIRA et al. (2003) mostraram através de testes de seletividade que *C. cassiicola* isolado de *L. camara* por PEREIRA e BARRETO (2000) tem especificidade para a planta hospedeira, sendo, ainda, restrito a certos biótipos de lantana.

Alternaria euphorbiicola foi isolado de severamente infectados da planta daninha *Euphorbia heterophylla* (BARRETO e EVANS, 1998), principal planta invasora da cultura de soja no Brasil. Popularmente conhecida como amendoim-bravo ou leiteiro, *E. heterophylla* é uma euforbiácea nativa da América tropical e subtropical (LORENZI, 2001; MESCHÉDE et al., 2002) e tem sido relatada em pelo menos 65 países (PARSONS e CUTHBERTSON, 1992).

Durante estudos com *N. alternantherae*, *C. cassiicola* f. sp. *lantanae* e *A. euphorbiicola*, observou-se que após a aplicação de suspensão de esporos sobre as respectivas plantas hospedeiras, ocorria necrose generalizada em intervalo de tempo que varia entre algumas horas a 1-2 dias, tempo considerado insuficiente para que ocorram os processos de germinação de esporos, penetração de tecido, colonização e manifestação de sintomas na interação fungo patogênico-planta, o que levou à conjectura de que estas três taxa fossem capazes de produzir micotoxinas com potencial interesse para a descoberta de novos herbicidas (BARRETO, comunicação pessoal)

Este trabalho teve como objetivo a investigação dos isolados de *N. alternanthera*, *C. cassiicola* f. sp. *lantanae* e *A. euphorbiicola* quanto à produção in

vitro de fitotoxinas que poderiam ser utilizadas como herbicidas naturais ou servir de modelo para a síntese de compostos análogos com atividade herbicida.

Material e Métodos

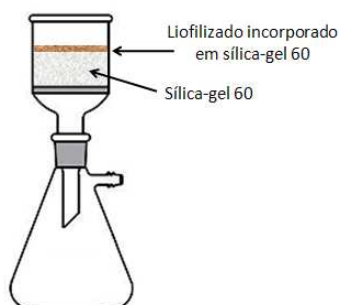
Cultivo dos fungos. Os isolados CP 17 (*Nympha alternantherae*), JMP 217 (*Corynespora cassiicola*) e KLN 06 (*Alternaria euphorbiicola*) encontram-se depositados na Coleção Octávio de Almeida Drumond da Universidade Federal de Viçosa. Os fungos foram inicialmente cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura CVA (Caldo de Vegetais-Ágar) (PEREIRA et al., 2003), incubadas a 25 °C por sete dias. Para a investigação da produção de fitotoxinas, discos de micélio ($\varnothing=10$ mm) provenientes da periferia de culturas em crescimento foram assepticamente repicados para erlenmeyers com capacidade para 4 L, contendo cada um 2 L de meio de cultura Caldo de Vegetais (PEREIRA et al., 2003) ou Jenkins-Prior modificado (FARGUES et al., 2001), previamente autoclavados por 20 min a 121 °C. As culturas foram mantidas em agitador orbital (150 rpm) com temperatura controlada (28 °C), em ausência de iluminação por 15 dias.

Obtenção de filtrados de cultura. Após período de incubação, as culturas foram submetidas a filtração em membrana de náilon para remoção do micélio, seguida por filtração em papel de filtro para remoção dos esporos. Os filtrados obtidos seguem identificados pelas iniciais de cada fungo e do meio de cultura utilizado. Desta forma, para *Nympha alternantherae* (CP 17) foram produzidos os filtrados NA/CV (1,83 L) e NA/JP (1,88 L). Para *Corynespora cassiicola* (JMP 217) foram produzidos os filtrados CC/CV (1,55 L) e CC/JP (1,80 L) e para *Alternaria euphorbiicola* foram

produzidos os filtrados AE/CV (1,86 L) e AA/JP (1,90 L). Para a avaliação da fitotoxicidade, os filtrados de cultura foram submetidos testes de inibição de germinação e crescimento radicular e ensaios em câmara úmida.

Fracionamentos. O filtrado da cultura de *A. euphorbiicola* em meio de Jenkins-Prior foi liofilizado (64,8 g) e submetido a fracionamento inicial utilizando-se duas metodologias. Na primeira, parte do filtrado (48,0 g) foi incorporado em sílica-gel 60 (70-230 mesh) e aplicado sobre coluna de sílica-gel (500 g) empacotada em funil de vidro sinterizado (13,5 cm de diâmetro e 10,5 cm de altura). O material foi fracionado com hexano, acetato de etila e metanol, 1 L cada (esquema 1).

No segundo método de extração, o restante do material liofilizado (16,8 g) foi dissolvido em água destilada (200 mL) e extraído em funil de separação utilizando-se hexano, diclorometano e acetato de etila (3 x 200 mL cada).



Esquema 1. Fracionamento inicial do liofilizado de filtrado de cultura de *A. euphorbiicola* em meio de Jenkins-Prior modificado.

Inibição da germinação e crescimento radicular. A atividade dos filtrados de cultura foi avaliada contra sementes de pepino (*Cucumis sativus*) e sorgo (*Sorghum bicolor*). Cinco mililitros de cada filtrado de cultura, contendo Tween 80 a 0,5% (v/v), foram transferidos para placas de Petri (Ø 90 mm) contendo 25 sementes acondicionadas sobre papel de germinação Germitest[®]. Filtrados de cultura sem crescimento fúngico e solução aquosa de Tween 80 foram utilizados como

testemunhas. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara climática a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 72 h as sementes germinadas foram contadas e as raízes medidas. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância ao nível de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Ensaio em câmara úmida. Filtrados de cultura contendo Tween 80 a 0,5 % (v/v) foram aspergidos sobre folhas saudias (superfície adaxial) de plântulas cultivadas em casa de vegetação. Os filtrados das culturas de cada fungo foram testados contra as respectivas plantas hospedeiras e contra uma segunda planta taxonomicamente relacionada. Desta forma, os filtrados de cultura de *N. althernantherae* foram aspergidos sobre folhas de *Alternanthera philoxeroides* e *Amaranthus viridis* (família *Amaranthaceae*), os filtrados de cultura de *C. cassicola* foram aspergidos sobre *Lantana camara* e *Verbena litoralis* (família *Verbenaceae*) e os filtrados de cultura de *A. euphorbiicola* foram aspergidos sobre *Euphorbia heterophylla* e *Chamaesyce hirta* (família *Euphorbiaceae*). Filtrados de meios de cultura sem crescimento fúngico e solução aquosa de Tween 80 a 0,5% (v/v) foram utilizados como testemunhas. As plântulas foram mantidas em câmara úmida a 25 °C e o desenvolvimento de sintomas foi observado diariamente por 72 h. Os sintomas foram convertidos em grau de lesão com o uso de escala arbitrária de intensidade, com base em inspeção visual: (–), ausência de sintomas; (+) amarelecimento; (++) , necrose < 50% da área foliar; (+++) , necrose > 50% da área foliar; (++++), necrose > 50% da área foliar acompanhada de desfolha.

Resultados

Os resultados obtidos em ensaios de inibição de germinação e crescimento radicular mostraram que os filtrados de cultura dos três fungos, em ambos os meios de cultura utilizados, apresentaram efeitos tóxicos sobre sementes de pepino e sorgo. O filtrado de cultura de *A. euphorbiicola* em meio de Jenkins-Prior modificado produziu maior inibição da germinação e do crescimento radicular de sorgo e maior efeito inibitório sobre a germinação de pepino (Tabela 1).

O filtrado de cultura de *Corynespora cassiicola* em meio de Jenkins-Prior modificado apresentou maior fitotoxicidade contra sementes de ambas as espécies de plantas, tendo inibido em 100% a germinação das duas espécies utilizadas (Tabela 2).

Os filtrados de cultura de *Nyctelia alternanthera* produziram inibição de germinação e crescimento radicular em ambas as plantas. O filtrado de cultura em meio de Jenkins-Prior modificado apresentou maiores efeitos tóxicos sobre sementes de pepino, enquanto o filtrado de cultura em meio Caldo de Vegetais apresentou maior fitotoxicidade contra sementes de sorgo (Tabela 3).

Tabela 1: Efeito dos filtrados de cultura de *Alternaria euphorbiicola* sobre germinação e crescimento radicular de *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Cucumis sativum* (pepino).

Espécie	Tratamento	Nº de sementes germinadas	Germinação* (%)	Comprimento radicular médio cm (x ± SD)	Crescimento radicular* (%)
Pepino	Água destilada	19 ± 1 a		2,3 ± 0,2 a	
	Controle JP	19 ± 1 a		2,2 ± 0,2 a	
	Controle CV	19 ± 2 a		2,1 ± 0,3 a	
	AE/JP	14 ± 1 c	73,4 ± 5,2	0,4 ± 0,06 c	18,2 ± 2,7
	AE/CV	17 ± 1 b	89,5 ± 5,2	0,6 ± 0,05 b	
Sorgo	Água destilada	10 ± 2 a		1,0 ± 0,1 a	
	Controle JP	9 ± 1 a		1,0 ± 0,2 a	
	Controle CV	9 ± 1 a		1,0 ± 0,1 a	
	AE/JP	8 ± 2 a		0,6 ± 0,08 b	60,0 ± 8,0
	AE/CV	4 ± 1 b	44,5 ± 11,1	0,3 ± 0,05 c	30,0 ± 5,0

AE/JP, filtrado de cultura de *A. euphorbiicola* em meio de Jenkins-Prior modificado; AE/CV, filtrado de cultura de *A. euphorbiicola* em meio Caldo de Vegetais. Controles CV e JP: filtrados de culturas sem crescimento fúngico. *Porcentagem de inibição e crescimento radicular em relação aos meios de cultura sem crescimento fúngico. Para cada espécie, médias seguidas por letras iguais, em cada ensaio, não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2: Efeito dos filtrados de cultura de *Corynespora cassiicola* sobre germinação e crescimento radicular de *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Cucumis sativum* (pepino).

Espécie	Tratamento	Nº de sementes germinadas	Germinação* (%)	Comprimento radicular médio cm (x ± SD)	Crescimento radicular* (%)
Pepino	Água destilada	19 ± 1 a		2,3 ± 0,2 a	
	Controle JP	19 ± 2 a		2,2 ± 0,2 a	
	Controle CV	19 ± 2 a		2,1 ± 0,3 a	
	CC/JP	0 c	0	0 c	0
	CC/CV	17 ± 2 b		0,9 ± 0,07 b	42,8 ± 3,3
Sorgo	Água destilada	10 ± 2 a		1,0 ± 0,2 a	
	Controle JP	9 ± 1 a		1,0 ± 0,2 a	
	Controle CV	9 ± 1 a		1,0 ± 0,1 a	
	CC/JP	0 b	0	0 c	0
	CC/CV	10 ± 1 c		0,7 ± 0,04 b	70,0 ± 4,0

AE/JP, filtrado de cultura de *C. cassiicola* em meio de Jenkins-Prior modificado; AE/CV, filtrado de cultura *C. cassiicola* de em meio Caldo de Vegetais. Controles CV e JP: filtrados de culturas sem crescimento fúngico. *Porcentagem de inibição e crescimento radicular em relação aos meios de cultura sem crescimento fúngico. Para cada espécie, médias seguidas por letras iguais, em cada ensaio, não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3: Efeito dos filtrados de cultura de *Nympha alternantherae* sobre germinação e crescimento radicular de *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Cucumis sativum* (pepino).

Espécie	Tratamento	Nº de sementes germinadas	Germinação* (%)	Comprimento radicular médio cm (x ± SD)	Crescimento radicular* (%)
Pepino	Água destilada	19 ± 1 a		2,3 ± 0,2 a	
	Controle JP	19 ± 2 a		2,2 ± 0,2 a	
	Controle CV	19 ± 2 a		2,1 ± 0,3 a	
	NA/JP	0 c	0	0 c	0
	NA/CV	16 ± 2 a		0,9 ± 0,07 b	42,8 ± 3,3
Sorgo	Água destilada	10 ± 2 a		1,0 ± 0,1 a	
	Controle JP	9 ± 1 a		1,0 ± 0,2 a	
	Controle CV	9 ± 1 a		1,0 ± 0,1 a	
	NA/JP	0 b	0	0 c	0
	NA/CV	7 ± 1 a		0,6 ± 0,02 b	60,0 ± 2,0

AE/JP, filtrado de cultura de *N. alternantherae* em meio de Jenkins-Prior modificado; AE/CV, filtrado de cultura de *N. alternantherae* em meio Caldo de Vegetais. Controles CV e JP: filtrados de culturas sem crescimento fúngico. *Porcentagem de inibição e crescimento radicular em relação aos meios de cultura sem crescimento fúngico. Para cada espécie, médias seguidas por letras iguais, em cada ensaio, não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

Nos ensaios em câmara úmida, ambos os filtrados de cultura de *A. euphorbiicola* apresentaram atividade fitotóxica contra a planta hospedeira *E. heterophylla*, tendo o filtrado de cultura em meio Jenkins-Prior apresentado maior fitotoxicidade (Tabela 4). Contra a planta *E. hirta*, nenhum dos filtrados produziu sintomas, o que pode sugerir uma seletividade da(s) toxina(s) presente(s) nos filtrados.

Os filtrados de cultura de *C. cassicola* em ambos os meios de cultivo apresentaram atividades fitotóxicas discretas e similares contra *Lantana camara*. Contra *Verbena litoralis*, o filtrado de meio Jenkins-Prior apresentou atividade fitotóxica acentuada, enquanto o filtrado da cultura em Caldo de Vegetais não produziu sintomas.

Avaliados contra a espécie *Amaranthus viridis*, os filtrados de cultura de *Nympha alternantherae* em ambos os meios utilizados apresentaram pequena atividade fitotóxica. Entretanto, o filtrado em meio de Jenkins-Prior induziu sintomas mais severos em *Alternanthera philoxeroides*, espécie hospedeira do fungo. Os filtrados dos meios de cultura sem crescimento fúngico não produziram sintomas sobre folhas das plantas testadas.

Estes estudos mostraram que os três fungos estudados são capazes de produzir e secretar toxinas em meio líquido. De um modo geral, os filtrados das culturas formadas em meio de Jenkins-Prior modificado apresentaram maiores efeitos fitotóxicos.

Tabela 4: Efeitos dos filtrados de cultura sobre diferentes plantas daninhas em ensaios em câmara úmida.

Alternaria euphorbiicola (AE)		
Planta	Filtrado	Sintomas*
Euphorbia heterophylla	AE/CV	(+++)
	AE/JP	(++++)
Chamaesyce hirta	AE/CV	(-)
	AE/JP	(-)
Corynespora cassicola (CC)		
Planta	Filtrado	Sintomas
Lantana camara	CC/CV	(+)
	CC/JP	(+)
Verbena litoralis	CC/CV	(-)
	CC/JP	(+++)
Nympha alternantherae (NA)		
Planta	Filtrado	Sintomas
Alternanthera philoxeroides	NA/CV	(+)
	NA/JP	(++)
Amaranthus viridis	NA/CV	(+)
	NA/JP	(+)

* (-), ausência de sintomas; (+) amarelecimento; (++) necrose < 50% da área foliar; (+++), necrose > 50% da área foliar; (++++), necrose > 50% da área foliar acompanhada de desfolha. CV, Caldo de Vegetais. JP, Jenkins-Prior.

O fungo *A. euphorbiicola* foi selecionado para os trabalhos subsequentes de estudo da produção de compostos fitotóxicos, dada a agressividade do fungo contra a planta hospedeira e a importância desta planta para a agricultura brasileira. O filtrado

da cultura do fungo em meio de Jenkins-Prior foi liofilizado e submetido a dois métodos de extração, conforme descrito anteriormente. A tentativa de fracionamento utilizando coluna de sílica não foi bem sucedida, uma vez que hexano e acetato de etila não foram eficientes na extração. A extração com metanol levou à obtenção de extrato com massa de 29,4 g, grande parte do material liofilizado (massa total de 48,0 g) permanecendo retida na coluna de sílica. Solução aquosa do extrato em metanol (5 mg mL⁻¹) foi testada contra folhas de *E. heterophylla* e não causou sintomas.

Parte do liofilizado foi dissolvida em água e submetida a extração líquido-líquido com hexano, diclorometano e acetato de etila. Nenhuma massa foi extraída com hexano. As extrações com diclorometano e acetato de etila produziram extratos sólidos com 72 e 193 mg, respectivamente. Os extratos foram testados a 5 mg mL⁻¹ contra folhas de *E. heterophylla* e apenas o extrato em acetato de etila produziu sintomas observáveis após 72 h de aplicação.

Diante destes resultados, os trabalhos subsequentes utilizaram acetato de etila como solvente para a extração dos filtrados de cultura.

Referências Bibliográficas

BARRETO, R. W.; TORRES, A. N. L. *Nimbya alternantherae* and *Cercospora alternantherae*: two new records of fungal pathogens on *Alternanthera philoxeroides* (alligatorweed) in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, v. 28, n. 2, p. 103-107, 1999.

BARRETO, R. W.; EVANS, H. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathologia*, v. 141, n. 1, p. 31-26, 1998.

FARGUES, J.; SMITS, N.; VIDAL, C.; VEY, A.; VEJA, F.; MERCADIER, G.; QUIMBY, P. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*, v. 15, p. 127-137, 2001.

LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*. ed.2. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2001.

MESCHEDE, D. K.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTINI, J.; SCAPIM, C.A. Período crítico de interferência de *Euphorbia heterophylla* na cultura da soja sob baixa densidade de semeadura. *Planta Daninha*, v. 20, p. 381-387, 2002.

PARSONS, W.T.; CUTHBERTSON, E.G. *Noxious Weeds of Australia*. Sydney: Inkata Press, 1992.

PEREIRA, J. M.; BARRETO, R. W. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in Southeastern Brazil. *Mycopathologia*, v. 151, p. 71-80, 2000.

PEREIRA, J. M.; BARRETO, R. W.; ELLISON, C.; MAFFIA, L. A. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biological Control*, v. 26, p. 21-31, 2003.

POMELLA, A. W. V.; BARRETO, R. W.; CHARUDATTAN, R. *Nimbya alternantherae* a potential biocontrol agent for alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*. *BioControl*, v. 52, p.271-288, 2007.

SILVA, W. P. K.; DEVERAÇÇ, B. J.; LYON. B. R. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantation in Sri Lanka. *Plant Pathology*, v. 47, p. 267-277, 1998.

THORP, J.; LYNCH, R. The impact of the national weeds strategy on weed management within Australia. In: *Proceedings of the Twelfth Australian Weeds Conference*. Hobart: Tasmanian Weed Society, 1999. p. 490-495.

CAPÍTULO 4

Fitotoxicidade de Filtrados de Cultura e Constituintes

Químicos de *Alternaria euphorbiicola* ¹

RESUMO – A espécie fúngica *Alternaria euphorbiicola* é agente causal de severas necroses de inflorescência, queimas de folhas e cancos da haste em *Euphorbia heterophylla* (leiteiro ou amendoim-bravo), importante planta daninha responsável por grandes prejuízos à agricultura brasileira. A aplicação de suspensões de esporos do fungo sobre populações da planta hospedeira resulta em rápida produção de necrose dos tecidos das plantas (24 a 48 horas após aplicação). Estas observações levaram à conjectura de que o fungo possa produzir fitotoxinas in vitro capazes de causar lesão nas plantas. O objetivo do presente trabalho foi investigar preliminarmente a produção in vitro de fitotoxinas por *A. euphorbiicola* sob diferentes condições de cultivo. Os resultados mostraram que a composição do meio de cultura e as condições de cultivo influenciaram a fitotoxicidade de filtrados de cultura, tendo o cultivo sob agitação e na ausência de luz favorecido a produção de metabólitos fitotóxicos pelo fungo. O filtrado da cultura em meio de Jenkins-Prior modificado, crescida sob agitação, no escuro e a 28 °C apresentou a maior atividade fitotóxica, tendo produzido extensas necroses foliares e desfolha em plantas de *E. heterophylla*. Este filtrado de cultura foi então submetido a extração seguida por

¹ artigo aceito para publicação pela revista Planta Daninha.

fracionamento guiado por bioensaios. Uma fração cromatográfica constituída majoritariamente por ácidos graxos de cadeia longa produziu halos cloróticos e necrose de folhas, assim como observado após a inoculação do leiteiro com o fungo. Estes resultados sugerem a participação de ácidos graxos no processo infeccioso na associação *A. euphorbiicola* x *E. heterophylla*.

Palavras chave: Ascomycota, fungo, amendoim-bravo, *Euphorbia heterophylla*, fitotoxinas, isolamento guiado por bioensaio.

PHYTOTOXICITY OF CULTURE FILTRATES AND CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *Alternaria euphorbiicola*

ABSTRACT – The fungal species *Alternaria euphorbiicola* was identified as causal agent of inflorescence necrosis, leaf blight and stem cancer in *Euphorbia heterophylla* (wild poinsettia), a major invasive weed responsible for great losses to Brazilian agriculture. The application of spore suspensions of the fungus on specimens of the host plant resulted in production of disseminated necrosis in short time intervals (24 to 48 hours) after application. These observations led to the conjecture that the fungus could produce phytotoxins capable of causing damage to the plant. The objective of this study was to investigate the *in vitro* production of phytotoxins by *A. euphorbiicola* under different growth conditions. The results showed that the culture medium and growth conditions influenced the phytotoxicity of culture filtrates. Growing the fungus under agitation in the dark resulted in higher production of phytotoxic metabolites. The filtrate from the culture formed in

modified Jenkins-Prior medium, under agitation, at 28 °C in the dark showed the highest phytotoxic activity. This filtrate produced foliar necrosis and defoliation on *E. heterophylla* and was subjected to extraction followed by bioassay-guided fractionation. A chromatographic fraction consisting mainly by long-chain fatty acids produced bleached lesions and necrosis of leaves, same symptoms observed after inoculation of the fungus in the host plant. These results suggest the involvement of these phytotoxic fatty acids in the process of tissue invasion of *E. heterophylla* by *A. euphorbiicola*.

Keywords: Ascomycota, fungi, wild poinsettia, *Euphorbia heterophylla*, phytotoxins, bioassay-guided fractionation.

INTRODUÇÃO

O leiteiro ou amendoim-bravo, *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae), é uma planta daninha altamente competitiva, considerada uma das principais invasoras nas culturas da soja e o feijão (Rizzardi et al., 2004; Carvalho et al., 2010; Cury et al. 2011).

O controle de infestações de *E. heterophylla* vem sendo exercido principalmente com o uso de herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). Entretanto, o uso repetitivo destes herbicidas levou à seleção de populações resistentes (Gazziero et al. 1998), como por exemplo a ocorrência de biótipos resistentes ao glifosato (Vidal et al., 2007; Cerdeira et al., 2011) e pelo surgimento de biótipos com múltipla resistência a herbicidas inibidores da ALS e inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (Trezzi et al. 2005). Diante deste quadro,

torna-se de grande interesse a busca por novos compostos químicos para o manejo de *E. heterophylla*.

Durante trabalhos de levantamento de fungos fitopatogênicos associados a plantas daninhas relevantes no Brasil, a espécie *Alternaria euphorbiicola* foi isolada a partir de tecidos severamente infectados de *Euphorbia heterophylla* (Barreto & Evans, 1998). Durante estudos sobre o potencial de *A. euphorbiicola* como agente para o controle biológico de *E. heterophylla*, foi observado que a aplicação de suspensões de esporos do fungo sobre populações da planta hospedeira resulta em rápida produção de necrose de tecidos (24 a 48 horas) após aplicação. Este período seria insuficiente para os processos de germinação de esporos, penetração de tecidos, colonização e desenvolvimento de sintomas resultantes da infecção. Estas observações levaram à conjectura de que o fungo produz, antes mesmo da colonização da planta, fitotoxinas capazes de provocar necroses em *E. heterophylla*.

A produção de metabólitos fitotóxicos por fungos fitopatogênicos e a capacidade destes compostos de causarem lesões em tecidos da planta hospedeira encontram-se amplamente descritas na literatura (Demuner et al., 2006; Strange, 2007; Möbius & Hertweck 2009). Fatores como a diversidade estrutural, elevadas atividades biológicas em pequenas concentrações e a capacidade de atuar por novos mecanismos de ação fazem com que fitotoxinas fúngicas sejam consideradas uma fonte promissora para a produção de novos herbicidas naturais (Hoagland, 2001; Duke et al., 2002). Ainda que não apresentem propriedades adequadas para o uso direto, tais compostos apresentam grande potencial como modelos para a síntese de novos herbicidas (Barbosa et al., 2003; Chaves et al., 2006; Barbosa et al., 2009).

A investigação da produção de fitotoxinas por fungos fitopatogênicos normalmente se inicia com a avaliação da fitotoxicidade de filtrados de cultura livres

de células. Após o período de incubação, o meio de cultura é submetido à filtração e o filtrado é avaliado em ensaios para demonstração de fitotoxicidade (Chen & Swart, 2002; Souza Filho & Duarte, 2007). Estudos sobre a possível relação entre as condições de crescimento e fitotoxicidade de filtrados de cultura podem ser conduzidos, permitindo o uso das condições mais favoráveis para a produção de fitotoxinas para fins de produção, extração, fracionamento e caracterização de compostos químicos fitotóxicos (Berestetskyi, 2008).

A agressividade e rapidez no desenvolvimento de sintomas por *A. euphorbiicola* contra *E. heterophylla* despertou o interesse pelo isolamento, identificação e avaliação de compostos fitotóxicos produzidos pelo fungo como candidatos a agentes naturais para controle químico de *E. heterophylla*. No presente trabalho foi investigada a fitotoxicidade de filtrados de cultura de *A. euphorbiicola* produzidos sob diferentes condições de cultivo e identificar metabólitos do fungo com atividade fitotóxica contra *E. heterophylla*.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos gerais: Extrações e procedimentos cromatográficos foram realizados utilizando-se solventes de grau analítico. As separações cromatográficas em coluna foram realizadas utilizando-se sílica-gel 60 (70-230 mesh). Para cromatografia em camada delgada analítica foram utilizadas placas de sílica-gel 60 G F₂₅₄ com 0,25 mm de espessura e revelação com luz ultravioleta (254 e 366 nm) seguida por nebulização com solução alcoólica de ácido fosfomolibdico. Os espectros na região do Infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Varian FT-IR 660-IR equipado com acessório Pike GladiATR. As análises por cromatografia a gás

acoplada a espectrometria de massas foram realizadas em equipamento Shimadzu GCMS-QP5050A, nas seguintes condições operacionais: método por impacto de elétrons (70 eV); modo scan, m/z 30,00 a 700,00; coluna capilar RTx5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m); fluxo do gás de arraste (He) 1 mL min⁻¹; razão de split 1:5. Programação de temperatura, T₁= 40 °C por 5 min., gradiente de 4 °C min⁻¹ até T₂= 80 °C, gradiente de 10 °C min⁻¹ até T₃= 285 °C; temperatura do injetor 290 °C; temperatura do detector 290 °C. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos espectros de massas com aqueles existentes no banco de dados do equipamento e pelo índice de kovat's (Linstrom & Mallard, 2005).

Cultivo do fungo: *Alternaria euphorbiicola* (isolado KLN 06), originalmente isolado de tecidos infectados de *E. heterophylla*, foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura caldo de vegetais-ágar (Pereira et al., 2003) a 25 °C por sete dias. Discos de micélio (\varnothing =10 mm) provenientes da periferia de culturas em crescimento ativo foram assepticamente repicados para frascos erlenmeyers de 2 L contendo, cada um, 300 mL de diferentes meios de cultura líquidos: Caldo de Vegetais (Pereira et al., 2003); meio de Jenkins-Prior modificado (Fargues et al., 2001); Czapek-Dox e meio de Fries (Beadle & Tatum, 1941). Para investigação da possível interferência das condições de cultivo na produção de compostos fitotóxicos pelo fungo, foram utilizadas as seguintes condições: **A**, cultivo sob agitação a 150 rpm, no escuro, a 28 °C; **B**, cultivo estático, no escuro, a 28 °C; **C**, cultivo estático, fotoperíodo de 12 h, a 28 °C. Os períodos de incubação para as culturas formadas sob agitação e sob cultivo estático foram de 14 e 21 dias, respectivamente.

Obtenção de extratos e frações cromatográficas: Levando-se em consideração os resultados obtidos no estudo sobre o efeito de condições de cultivo sobre a produção de fitotoxinas adotou-se o cultivo do fungo em meio de Jenkins-Prior modificado (Fargues et al., 2001) sob as condições de cultivo A, reconhecidas como apropriadas para a produção de fitotoxinas. Após o período de incubação, as culturas foram filtradas em membrana de náilon e papel de filtro Whatman N° 1 para remoção de micélio e esporos. O filtrado da cultura foi liofilizado fornecendo material sólido (67,68 g) que foi posteriormente ressuspensão em água destilada para um volume final de 1 L. O pH da suspensão foi ajustado para 4,5 por adição de HCl 2 mol L⁻¹ e a suspensão extraída com acetato de etila (3 x 1 L). O extrato em acetato de etila foi submetido à secagem sobre MgSO₄, filtrado e concentrado em evaporador rotatório a 40 °C. O extrato bruto assim obtido (2,307 g) foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica-gel 60 com eluição por gradiente, utilizando hexano-acetato de etila 9:1 (v/v) a 0:1 (v/v). Frações de cerca de 7 mL foram coletadas em tubos de ensaio e agrupadas de acordo com o perfil em cromatografia em camada delgada, obtendo-se 8 frações homogêneas. A fração 2 (31 mg), eluída com hexano:acetato de etila 9:1 (v/v) foi submetida a análises por IV e CG-EM.

Ensaio biológico

Foram realizados diferentes ensaios biológicos utilizando plântulas e sementes de *E. heterophylla*. Para investigação preliminar da produção in vitro de fitotoxinas pelos fungos, os filtrados de cultura foram submetidos a ensaios em câmara úmida (Pedras & Ahiahonu, 2004) e testes de inibição de germinação e crescimento radicular (Macias et al., 2000). Para o fracionamento guiado por

bioensaio, foram avaliados os ensaios com punctura de folha (Pedras & Ahiahonu, 2004) e em folha destacada (Evidente et al., 2008).

Ensaio de inibição de germinação: a fitotoxicidade de filtrados de cultura fúngica contra sementes sadias de amendoim-bravo (*E. heterophylla*) foi avaliada segundo metodologia proposta por Macias et al. (2000). Para tal, 25 sementes foram transferidas para placas de Petri (Ø 90 mm) contendo papel de germinação (Germitest[®]) embebido em 5 mL de filtrado de cultura contendo Tween 80 a 0,05% (m/v). Filtrados de meios de cultura sem crescimento fúngico contendo Tween 80 a 0,05% (m/v) e água destilada foram utilizados como testemunhas. As placas foram mantidas em câmara climática a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Após 72 h, determinaram-se o número de sementes germinadas e o comprimento das radículas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Ensaio em câmara úmida: filtrados de cultura contendo Tween 80 a 0,05% (m/v) foram uniformemente aspergidos sobre folhas sadias de plantas jovens (2 a 3 semanas) de *E. heterophylla* cultivadas em casa de vegetação. Filtrados de meios de cultura sem crescimento fúngico contendo Tween 80 a 0,05% (m/v) e solução aquosa de Tween 80 a 0,05% (m/v) foram utilizados como controles. Após aspersão das soluções, as plantas foram mantidas em câmara úmida a 25 °C e o desenvolvimento dos sintomas foi monitorado, diariamente, por 72 h. Os sintomas foram convertidos em grau de lesão com o uso de escala arbitrária de intensidade com base em inspeção visual: (-), ausência de sintomas; (+) amarelecimento; (++) necrose < 50% da área

foliar; (+++), necrose > 50% da área foliar; (++++), necrose > 50% da área foliar acompanhada de desfolha.

Ensaio com punctura de folha: Soluções das frações cromatográficas (1 mg mL^{-1}) preparadas em MeOH a 20% (m/v) foram aplicadas sobre puncturas produzidas com auxílio de agulha na superfície adaxial de folhas saudas (duas puncturas por folha) de plântulas jovens (2 a 3 semanas) de *E. heterophylla* cultivadas em casa de vegetação. Solução metanólica a 20% (v/v) foi utilizada como controle. Os testes foram realizados em triplicata. As plântulas foram mantidas em câmara úmida a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O aparecimento de sintomas foi monitorado a cada 12 h e o diâmetro das lesões foi medido após 72 horas.

Ensaio em folha destacada: folhas saudas de plântulas jovens de *E. heterophylla* foram destacadas com auxílio de estilete e pinça e depositadas em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada (três folhas por placa). Com auxílio de agulha, foram produzidas puncturas sobre a superfície adaxial de cada folha (duas puncturas por folha). Sobre cada lesão, foram depositados $10 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de extratos e frações a 1 mg mL^{-1} (m/v), preparadas em MeOH a 20% (v/v). As placas foram vedadas e acondicionadas em câmara climática a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h, por 72 horas. O desenvolvimento de sintomas foi observado a cada 12 h, medindo-se o diâmetro das lesões produzidas após 72 h. Solução aquosa de MeOH a 20% (v/v) foi utilizada como controle. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente causalizado, com três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a investigação preliminar da capacidade de *A. euphorbiicola* produzir metabólitos fitotóxicos, o fungo foi cultivado em meio de Jenkins-Prior modificado e meio Caldo de Vegetais, incubados nas condições de cultivo A. A escolha destas condições como ponto de partida para as investigações se fundamenta em observações realizadas durante estudos sobre o potencial do fungo como bio-herbicida. Nestes estudos, foi observado que a máxima produção de clamidósporos por *A. euphorbiicola* ocorreu após seis a nove dias de cultivo nestas mesmas condições. Após o nono dia, grande quantidade de clamidósporos iniciou a germinação. Diversos trabalhos relatam que a produção de fitotoxinas por diferentes espécies do gênero *Alternaria* ocorre principalmente durante a germinação de esporos (Slavov et al., 2004; Oka et al., 2005; Parada et al., 2008).

Os filtrados das culturas em meio Jenkins-Prior modificado e Caldo de Vegetais inibiram a germinação e crescimento radicular de sementes de *E. heterophylla* (Tabela 1), tendo o filtrado do meio Jenkins-Prior apresentado maior atividade. Avaliados em ensaios em câmara úmida, os filtrados de ambos os meios de cultura apresentaram atividade fitotóxica contra folhas de *E. heterophylla* (Tabela 2). Os filtrados das testemunhas (meios de cultura sem crescimento fúngico) não produziram sintomas.

Tabela 1: Efeito dos filtrados de cultura de *Alternaria euphorbiicola* sobre germinação e crescimento radicular de *Euphorbia heterophylla* (leiteiro).

Tratamento	Nº de sementes germinadas	Germinação* (%)	Comprimento radicular médio cm (x ± SD)	Crescimento radicular * (%)
Água destilada	10 ± 2 a		4,5 ± 0,5 a	
Controle JP	9 ± 2 a		4,4 ± 0,3 a	
Controle CV	10 ± 3 a		4,4 ± 0,5 a	
AE/JP	0 c	0	0 c	0
AE/CV	5 ± 1 b	50,0 ± 10,0	0,7 ± 0,06 b	15,9 ± 1,4

AE/JP, filtrado de cultura de *A. euphorbiicola* em meio de Jenkins-Prior modificado; AE/CV, filtrado de cultura de *A. euphorbiicola* em meio Caldo de Vegetais. Controles CV e JP: filtrados de culturas sem crescimento fúngico. *Porcentagem de inibição e crescimento radicular em relação aos meios de cultura sem crescimento fúngico. Para cada espécie, médias seguidas por letras iguais, em cada ensaio, não diferem pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Efeitos de filtrados de culturas de *A. euphorbiicola* sobre folhas de *E. heterophylla* em ensaio em câmara úmida.

Filtrado	Condições de cultivo		
	A	B	C
CV	+++	nt	nt
JP	++++	+++	-
Cz	-	-	-
MF	++	++	-

CV, Caldo de Vegetais; JP, Jenkins-Prior modificado; Cz, Czapek-Dox; MF, meio de Fries. Sintomas convertidos em grau de lesão por meio de escala arbitrária, com base em inspeção visual: (-) ausência de sintomas; (+) amarelecimento; (++) necrose < 50% da área foliar; (+++), necrose > 50% da área foliar; (++++), necrose > 50% da área foliar e desfolha. nt, não testado. **A**, agitação, ausência de luz. **B**, estático, ausência de luz; **C**, estático, fotoperíodo.

Uma vez comprovada a capacidade de produção *in vitro* de fitotoxinas por *A. euphorbiicola*, o fungo foi cultivado nos meios Czapek-Dox, meio de Fries e meio Jenkins-Prior, e as culturas foram incubadas sob diferentes condições de temperatura, iluminação e cultivo estático ou sob agitação (condições A, B e C), conforme descrito na seção Material e métodos. O meio de cultura Caldo de Vegetais foi desconsiderado para este propósito devido à sua complexa composição química, o que poderia dificultar os trabalhos de isolamento de fitotoxinas. A atividade fitotóxica dos filtrados de culturas obtidos foi avaliada em experimento em câmara úmida (Tabela 2). Os filtrados das culturas formadas em meio Czapek-Dox não produziram sintomas sobre folhas de *E. heterophylla*. Os filtrados das culturas

formadas em meio de Fries produzidas no escuro, tanto sob cultivo estático quanto sob agitação (condições **A** e **B**), produziram amarelecimento e necrose em folhas da planta, enquanto o filtrado da cultura crescida neste meio sob fotoperíodo de 12 h (condição **C**) não produziu sintomas observáveis até 72 horas após aplicação. Da mesma forma, o filtrado da cultura formada em meio Jenkins-Prior modificado sob fotoperíodo (condição **C**) não produziu sintomas. A maior atividade fitotóxica foi observada para os filtrados de culturas formadas no meio Jenkins-Prior modificado e mantidas sob agitação (condição **A**). Entre os meios de cultura testados, o Czapek-Dox é o que apresenta composição mais simples, enquanto o meio de Jenkins-Prior modificado é o mais complexo e rico em nutrientes. Como os filtrados das culturas em Czapek-Dox não apresentaram fitotoxicidade e os filtrados do meio de Jenkins-Prior foram os mais ativos, pode-se concluir que a produção de fitotoxinas pelo fungo está diretamente condicionada por fatores nutricionais. Ainda, os resultados permitiram observar que o cultivo na ausência de luz e sob agitação favorece a produção de fitotoxinas por *A. euphorbiicola*.

Vários estudos demonstraram a influência das condições de cultivo sobre a biossíntese *in vitro* de compostos fitotóxicos por fungos fitopatogênicos. Foi observada influência do meio de cultura na produção de ácido fusárico por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. Cultivado em quatro meios distintos, a 23 °C e sob agitação (100 rpm), o fungo produziu maiores quantidades da toxina em meio Czapek Dox (Löffler & Mouris, 1992). O cultivo estacionário ou sob agitação pode influenciar a produção de toxinas. Brzonkalik et al. (2011) demonstraram que o cultivo estático de *Alternaria alternata* levou à produção de maiores quantidades das toxinas alternariol, alternariol metil éster e ácido tenuazônico quando comparado ao cultivo sob agitação. A investigação da influência das condições de cultivo sobre a produção da

fitotoxina cercosporina por diferentes espécies do gênero *Cercospora* mostrou que a composição do meio de cultura, a temperatura e o cultivo sob iluminação ou no escuro exerceram influência na produção da toxina por todas as espécies avaliadas (Jenns et al., 1989).

Diante dos resultados obtidos, para fins de produção, isolamento e identificação de toxinas, o fungo foi cultivado em meio de Jenkins-Prior modificado, sob a condição de cultivo **A**. Os filtrados de cultura obtidos foram liofilizados e ressuspensos em água destilada para volume final de 1 L. A suspensão foi extraída com acetato de etila e o extrato bruto, assim obtido, foi submetido a ensaios com punctura de folha e em folha destacada. Estes ensaios foram considerados para o direcionamento dos trabalhos de fracionamento do extrato por requererem pequenas quantidades de extratos e frações, além de permitirem avaliações quantitativas mais precisas quando comparados à aspersão de soluções sobre folhas. Quando aplicado sobre puncturas produzidas na superfície de folhas destacadas, o extrato orgânico bruto produziu halos de clorose e necrose com 1,4 mm de diâmetro, em média. Os sintomas necróticos tornaram-se visíveis após 48 h. Quando aplicados sobre folhas na planta (ensaio com punctura de folhas), halos necróticos com 2,8 mm de diâmetro, em média, foram observados em menos de 24 h após aplicação. Dada a maior sensibilidade e rapidez no desenvolvimento de sintomas nos ensaios em plantas vivas, o ensaio com punctura de folhas foi selecionado para guiar o fracionamento do extrato. A solução metanólica a 20% (v/v), utilizada como controle, não produziu lesão. O extrato orgânico bruto foi submetido a cromatografia em coluna de sílica fornecendo uma fração (fração 3) capaz de produzir, a 1 mg mL⁻¹, halos cloróticos com bordas necrosadas com 3,5 mm de diâmetro em média (Figura 1).



Figura 1 – Halos de despigmentação produzidos pela aplicação de solução da fração cromatográfica 3 (1 mg mL^{-1}) sobre folhas de *E. heterophylla*.

A análise da fração 3 por espectroscopia no infravermelho mostrou um espectro de absorção (Figura 2) característico de ácidos carboxílicos de cadeia longa, com bandas de absorção em $2923 \text{ (v}_{\text{as}} \text{ CH}_3)$, $2853 \text{ (v}_s \text{ CH}_2)$, 1707 (v C=O) , $1462 \text{ (}\delta_s \text{ CH}_2 \text{ e } \delta_{\text{as}} \text{ CH}_3)$, $1414 \text{ (combinação de v C-O e } \delta \text{ OH)}$, $1264 \text{ (}\delta_s \text{ CH}_3)$, 1229 (v C-O) e $738 \text{ cm}^{-1} \text{ (}\rho \text{ CH}_2)$ (Figura 1). A análise por CG-EM (Figura 3) resultou na caracterização dos ácidos graxos mirístico (2,6 %), palmitoleico (2,1 %), palmítico (38,5 %), oléico (37,5 %), esteárico (3,2 %), erucico (4,2 %) e do álcool graxo octadec-9-en-1-ol (10,5 %).

A atividade fitotóxica de ácidos graxos de cadeia longa tem sido demonstrada em diferentes estudos. O fracionamento de extrato em acetato de etila de cultura do fungo *Corynespora cassiicola* em meio sólido forneceu frações cromatográficas capazes de produzir inibição da síntese de ATP em cloroplastos isolados de espinafre. Análises por IV e CG-EM levaram à caracterização dos ácidos mirístico,

palmítico, palmitoleico, linoléico, esteárico, linolênico e aracnídico (Passos et al., 2010).

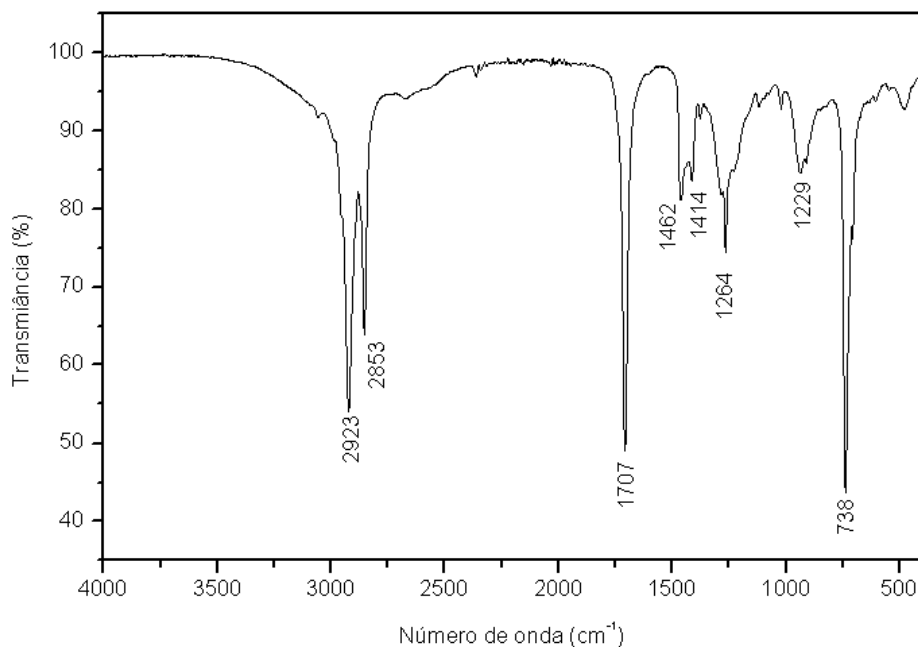


Figura 2 – Espectro no infravermelho (sólido) da fração 3.

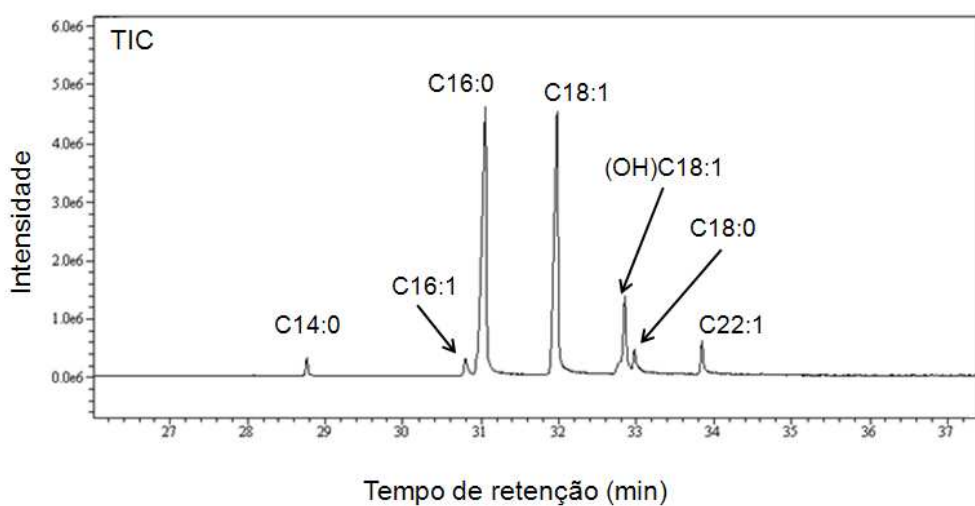


Figura 3 - Cromatograma de íons totais da fração 3. C14:0 (ácido mirístico); C16:1 (ácido palmitoleico); C16:0 (ácido palmítico); C18:1 (ácido oléico); (OH)C18:1 (octadec-9-en-1-ol); C18:0 (ácido esteárico); C22:1 (ácido erucico).

Diversos ácidos graxos de cadeia longa, entre eles o palmítico, o esteárico, o mirístico e o oléico, são capazes de inibir a germinação de sementes de diferentes espécies (Lynch, 1980; Marambe et al., 1993). Estes ácidos foram capazes de produzir diminuição da atividade da α -amilase e redução de ATP em sementes de sorgo (Marambe et al., 1993). Ainda, estudos demonstraram que vários ácidos graxos de cadeia média (C8 a C14) foram capazes de causar descoloração de folhas, murcha e morte de diferentes espécies de plantas, dentro de 1 a 2 dias após aplicação (Fukuda et al., 2004). O estudo demonstrou ainda que os ácidos graxos, especialmente C9, C10 e C11, foram capazes de produzir dano a membranas celulares, induzir perda de eletrólitos e causar decréscimo da quantidade de clorofila. Segundo Lederer et al. (2004), a atividade fitotóxica destes ácidos graxos também se deve à capacidade de induzir peroxidação lipídica.

Os estudos sobre a atividade de filtrados de cultura de *A. euphorbiicola* contra *E. heterophylla* resultaram na caracterização de uma fração cromatográfica fitotóxica constituída principalmente por ácidos graxos, cujas atividades fitotóxicas já foram relatadas em diferentes trabalhos. A capacidade de inibir a síntese de ATP, de provocar diminuição do teor de clorofila e de induzir peroxidação lipídica, observadas em trabalhos anteriores, são mecanismos de ação que podem justificar o amarelecimento produzido sobre folhas de *E. heterophylla* pelos ácidos graxos identificados na fração. Como o amarelecimento de folhas constitui o primeiro sintoma observado após a inoculação do fungo na planta hospedeira, os resultados do presente trabalho sugerem a participação destes ácidos graxos no processo de invasão de tecidos da planta pelo fungo e justificam estudos adicionais sobre estas substâncias visando a sua avaliação para o desenvolvimento de herbicidas naturais para *E. heterophylla*.

LITERATURA CITADA

BARBOSA, L.C.A. et al. Synthesis and phytotoxic activity evaluation of new oxygenated analogues of helminthosporic acid. **Quím. Nova**, v. 26, n. 5, p. 655-660, 2003.

BARBOSA, L.C.A. et al. Synthesis and phytogrowth properties of oxabicyclic analogues related to helminthosporin. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 160-173, 2009.

BARRETO, R. W.; EVANS, H. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 31-26, 1998.

BEADLE, G.W.; TATUM, E.L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 27, p. 499-506, 1941.

BERESTETSKYI, O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 453–465, 2008.

BRZONKALIK, K. et al. The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 147, n. 2, p. 120–126, 2011.

CARVALHO, L.B. et al. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. **Planta Daninha**, v. 28, p. 33-39, 2010.

CERDEIRA, A.L. et al., Agricultural impacts of glyphosate-resistant soybean cultivation in South America. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 5799-5807, 2011.

CHAVES, F. C. et al. New helminthosporal analogues with plant-growth regulatory properties synthesized via oxallyl cation. **Z. Naturforsch B**, v. 61, n. 10, p. 1287-1294, 2006.

CHEN, W-Q.; SWART, W. J. The in vitro phytotoxicity of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* to five genotypes of *Amaranthus hybridus*. **Euphytica**, v. 127, p. 61-67, n. 1, 2002.

CURY, J.P. et al. Produção e partição de matéria seca de cultivares de feijão em competição com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 29, n. 1; p. 149-158, 2011.

DEMUNER, A.J. et al. Phytotoxic constituents from *Nimbya alternantherae*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 34, n. 11, p. 790-795, 2006.

DUKE, S.O. et al. Chemicals from nature for weed management. **Weed Sci.**, v. 50, n. 2, p. 138-151, 2002.

EVIDENTE, A. et al. Phyllostictines A - D, Oxazatricycloalkenones produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. **Tetrahedron**, v. 64, n. 8, p. 1612-1619, 2008.

FUKUDA, M. et al. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids I: effects on cell constituents. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 80, n. 3, p. 143-150, 2004.

GAZZIERO, D.L.P. et al. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**. v.16, n.2, p. 117-125, 1998.

HOAGLAND, R.E. Microbial allelochemicals and pathogens as bioherbicial agents. **Weed Technol.**, v. 15, p. 835-857, 2001.

JENNS, A.E. et al. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Physiol Biochem.**, v. 79, n. 2, p. 213-219, 1989.

LEDERER, B. et al. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 80, n. 3, p. 151-156, 2004.

LÖFFLER, H.J.M.; MOURIS, J.R. Fusaric acid: phytotoxicity and in vitro production by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lili*, the causal agent of basal rot in lilies. **Neth. J. Plant Pathol.**, v. 98, n. 2, p. 107-115, 1992.

LINSTROM, P.J. MALLARD, W.G. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 2005, <http://webbook.nist.gov/chemistry>.

LYNCH, J.M. Effects of organic acids on the germination of seeds and growth of seedlings. **Plant Cell Environ.**, v. 3, n. 4, p. 255-259, 1980.

MACÍAS, F.A. et al. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MARAMBE, B. et al. Identification and biological activity of germination-inhibiting long-chain fatty acids in animal-waste composts. **Plant Cell Physiol.**, v. 34, n. 4, p. 605-612, 1993.

MÖBIUS, N.; HERTWECK, C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. **Cur. Op. Plant Biol.**, v. 12, n. 4, p. 390-398, 2009.

OKA, K. et al. Host-specific AB-toxin production by germinating spores of *Alternaria brassicicola* is induced by a host-derived oligosaccharide. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 66, p. 12-19, 2005.

PARADA, R.Y. et al. *Alternaria brassicae* Produces a Host-Specific Protein Toxin from Germinating Spores on Host Leaves. **Biochem. Cell Biol.**, v. 98, n. 4, p. 258-263, 2008.

PASSOS, J.L. et al. Efeitos de *Corynespora cassiicola* sobre *Lantana camara*. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 229-237, 2010.

PEDRAS, M. S. C.; AHIAHONU, P. W. K. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **J. Chem. Ecol.**, v. 30, n. 11, p. 2163-2179, 2004.

PEREIRA, J.M. et al. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. **Biol. Control**, v. 26, n. 1, p. 21-31, 2003.

RIZZARDI, M.A. et al. Interferência de populações de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea ramosissima* isoladas ou em misturas sobre a cultura de soja. **Planta Daninha**, v.22, n.1, p.29-34, 2004.

SLAVOV, S. et al. Toxin production of *Alternaria alternata* tobacco pathotype. **Biotechnol. Biotechnol Equip.**, v. 18, n. 3, p. 90-95, 2004.

SOUZA FILHO, A.P.S.; DUARTE, M.L.R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 227-230, 2007.

STRANGE, R.N. Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, n. 1, p. 127-144, 2007.

TREZZI, M.M et al. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **J. Environ. Sci. Health**, v.40, n.1, p.101-109, 2005.

VIDAL, R.A. et al. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* (L.)) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **J. Food Agric. Environ.**, v. 5, n. 2, p. 265-269, 2007.

APÊNDICE

Fracionamento do micélio de *A. euphorbiicola* cultivado em meio de Czapek-Dox

Embora os filtrados das culturas de *A. euphorbiicola* em meio Czapek-Dox não tenham produzido fitotoxicidade em folhas de *E. heterophylla*, quando cultivado neste meio em condições estáticas, o fungo produziu massa micelial substancialmente maior do que quando cultivado nos outros meios de cultura (Figura 1). Desta forma, o micélio do fungo crescido em Czapek-Dox foi considerado para fins de fracionamento e isolamento de compostos fitotóxicos. O micélio foi separado do caldo da cultura por filtração em membrana de náilon e secado em estufa a 40 °C, obtendo-se material seco com 32,5 g.

Os trabalhos com isolamento e identificação de fitotoxinas a partir de micélios reportam a utilização de material seco com massas da ordem de quilograma (Evidente et al., 2008a, 2008b). Embora apresentando massa muito inferior ao comumente utilizado, micélio obtido neste trabalho foi submetido a procedimentos de extração (Evidente et al., 2008a, 2008b) e fracionamento. O material foi extraído com 200 mL de mistura acetona-água 1:1 (v/v). Após remoção da acetona em rotavap a 40 °C, NaCl (300 g/L) foi adicionado à fase aquosa e a solução foi extraída com acetato de etila (3 x 200 mL). Os extratos orgânicos foram combinados, secados sobre MgSO₄ e evaporados sob pressão reduzida a 40 °C, fornecendo extrato seco com 171 mg. O extrato, a 5 mg mL⁻¹, apresentou atividade fitotóxica contra folhas da planta *E. heterophylla* e foi submetido a fracionamento em coluna de sílica-gel 60

(70-230 mesh) utilizando hexano-acetato de etila 19:1 (v/v) a 0:1 (v/v). As frações foram agrupadas de acordo com os perfis em CCD analítica, obtendo-se 7 frações.

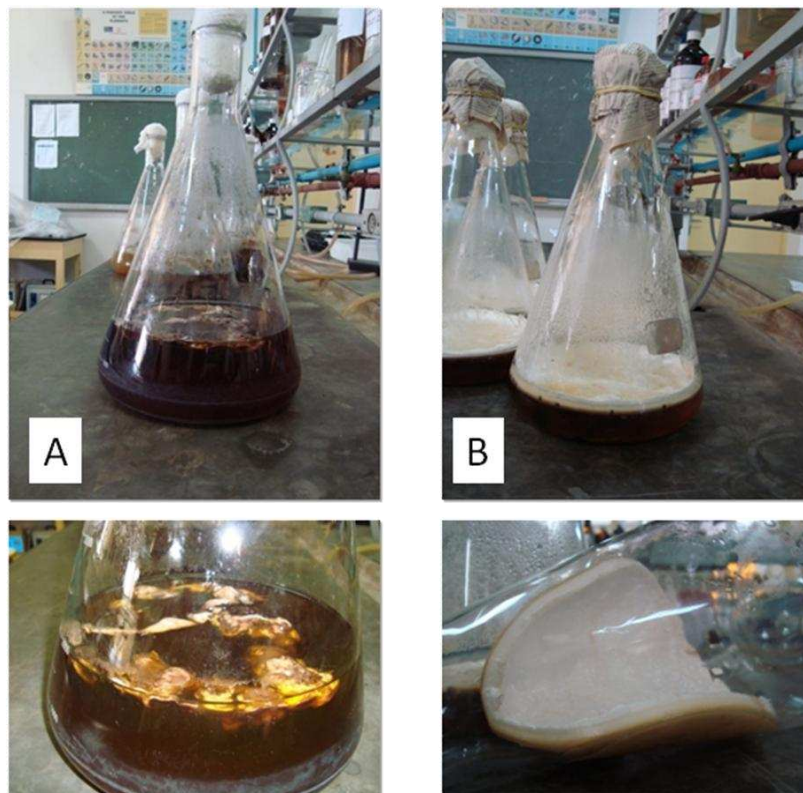


Figura 1. Massa micelial de *A. euphorbiicola* produzida em: **A**, Jenkins-Prior modificado; **B**, Czapek-Dox.

As frações foram submetidas a ensaios com punctura de folhas e apenas a fração 5 (22 mg) produziu lesões caracterizadas como halos de amarelecimento discreto. A análise da fração por CG-EM indicou que a amostra se constituía em uma mistura de grande variedade de compostos (Figura 2). Devido à complexa composição e à pequena massa da amostra, trabalhos subsequentes de isolamento e caracterização espectroscópica de constituintes fitotóxicos se mostraram inviáveis.

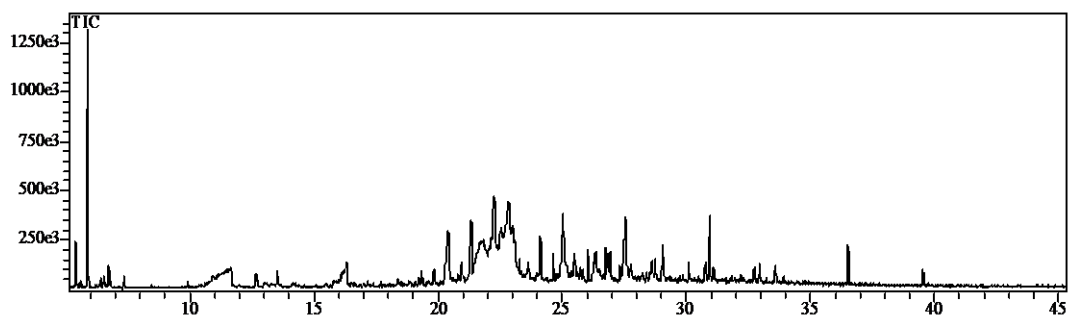


Figura 2. Análise por CG-EM da fração 5.

Referências

EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; BERESTETSKIY, A.; MITINA, G.; ANDOLFI, A.; MOTTA, A. Stagonolides B-F, Nonenolides Produced by *Stagonospora cirsi*, a Potential Mycoherbicide of *Cirsium arvense*. *J. Nat. Prod.* , 71, 31-34, 2008a.

EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; BERESTETSKIY, A.; ANDOLFI, A.; MOTTA, A. Stagonolides G-I and Modiolide A, Nonenolides Produced by *Stagonospora cirsi*, a Potential Mycoherbicide for *Cirsium arvense*. *J. Nat. Prod.*, 71, 1897-1901, 2008b.

CAPÍTULO 5

PHYTOTOXIC ACTIVITY OF TYROSOL FROM *Alternaria euphorbiicola* AGAINST THE FUNGAL HOST PLANT *Euphorbia heterophylla*

ABSTRACT: *Alternaria euphorbiicola* is a fungus which was isolated in Brazil in the late 1980s in association with severe inflorescence necrosis, foliage blight and stem canker on wild poinsettia, one of the worst weeds in Brazilian agriculture. An investigation of the metabolites produced by *A. euphorbiicola* led to the detection of tyrosol, a phytotoxic substance known to be produced by other fungi. Punctured-leaf assays showed that tyrosol is capable of causing severe blight on leaves of wild poinsettia and Dixie ticktrefoil. Minimal effects were produced on soybean and corn foliage. Spraying solutions of tyrosol at 40 to 100 mM on plants of wild poinsettia resulted in rapid development of wilting, necrosis, bleaching, leaf blight and death in up to 7 days. These findings clearly indicate that tyrosol may become useful as a selective herbicide for both weeds. This is the first report of a phytotoxic metabolite isolated from *A. euphorbiicola*.

Keywords: Ascomycota, fungi, herbicide, hyphomycete, phytotoxin, weed.

INTRODUCTION

Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*), a native herb of the tropical and subtropical America, is regarded as one of worst weeds in important crops such as corn, sugarcane, bean and soybean, being responsible for great losses in agriculture worldwide (1-3).

ALS-inhibiting herbicides have been used as the tool of choice for management of *E. heterophylla* infestations in soybean. However, their repetitive use over the years has led to the selection and now widespread occurrence of wild poinsettia populations that are resistant to this herbicide group (4). This problem has been worsened with the occurrence of biotypes resistant to glyphosate in transgenic soybean fields (5, 6) and emergence of multiple resistance in *E. heterophylla* populations, some of which are now resistant to herbicides with different mechanisms of action [ALS and protoporphyrinogen oxidase (PPO or PROTOX) inhibition] (7).

Surveys for fungal pathogens of wild poinsettia in Brazil and their evaluation as potential tools for management of that major weed have been started in the late 1980s (8). Among the several fungi which were collected, *Alternaria euphorbiicola* was regarded as one among the fungi being of particular interest for such use. This fungus was found causing severe inflorescence necrosis, foliage blight and stem canker on *E. heterophylla*. During early studies, when this fungus was investigated as a potential mycoherbicide, it was observed that the application of fungal spore suspensions on the host plant resulted in the production of widespread necrosis at time intervals ranging from few hours to 1-2 days after application. This was regarded as too short a period to allow for the occurrence of the whole process

of spore germination, fungal penetration of tissues, colonization of plant organ and development of symptoms due to plant infection. These observations led to the conjecture that *A. euphorbiicola* might produce phytotoxic metabolites capable of causing the first wave of damage to the host plant.

It is well recognized that phytopathogenic fungi often produce toxins which may play a significant role in plant disease development, adversely affecting their hosts (9-14). Factors such as structural diversity, high biological activities (11, 13) and the involvement of different mechanisms of action in fungal metabolites as compared to commercially available synthetic herbicides (15) make fungal phytotoxins a promising source for discovery of new natural herbicides (16-18) or molecules that can be used as templates in the search for synthetic analogues with herbicidal action (18-21).

The great losses to agriculture caused by wild poinsettia and the extent and fast-pace of impact produced by *A. euphorbiicola* on this weed sparked the interest in investigating the production of phytotoxic metabolites by this fungus with potential interest for the discovery of a new chemical tool for weed management. This paper describes the isolation, chemical characterization and phytotoxic activity of tyrosol produced by *A. euphorbiicola* against wild poinsettia.

MATERIALS AND METHODS

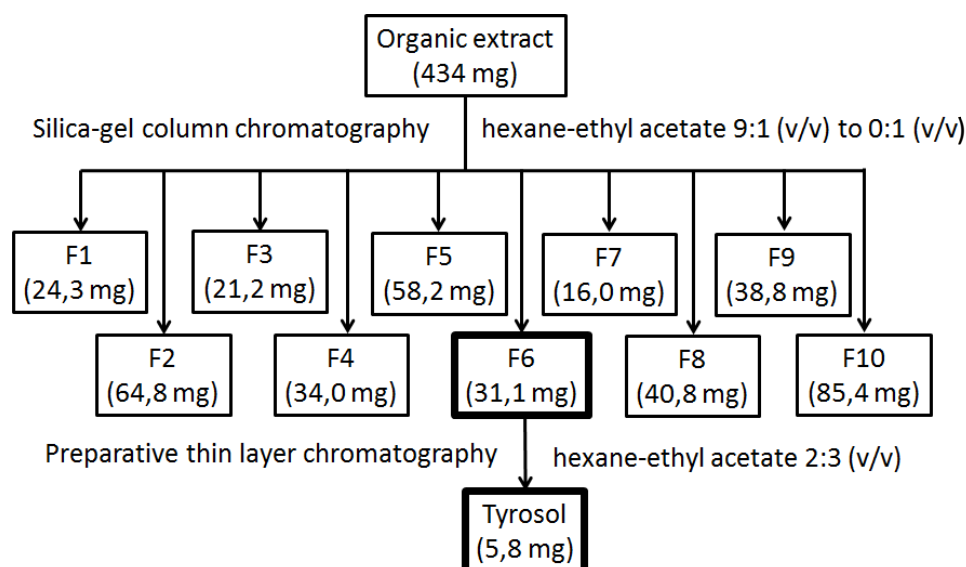
General Experimental Procedures. Attenuated Total Reflectance (ATR) Fourier Transform Infrared (FT-IR) was registered on a Varian 600-IR FT-IR spectrometer equipped with a Pike GladiATR accessory. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian MERCURY 300 instrument (300 MHz and 75 MHz,

respectively) using CD₃OD as solvent and tetramethylsilane (TMS) as reference ($\delta = 0$). Coupling constants (J) are given in Hertz. Mass spectra were recorded under electron impact (70 eV) in a Shimadzu GCMS-QP5050A equipment. GC analysis were performed using a Restek RTx 5 capillary column (30 m long, 0.25 mm id, film thickness 0.25 μ m), flow rate 1 mL/min, temperature program: initial temperature 40 °C, held for 5 min, then to 285 °C at a rate of 10 °C/min, and held for 5 minutes. The melting point was obtained with a MQAPF301 digital apparatus and value is uncorrected. Analytical and preparative TLC were performed on silica gel (Macherey-Nagel, silica gel 60 G F254, 0.25 mm and Merck, Kieselgel 60 G F254, 1 mm, respectively) and visualized by exposure to UV radiation (λ 254 and 325 nm) and by spraying with 5% phosphomolybdic acid in MeOH, followed by heating at 110 °C for 10 min. Column chromatography was performed on silica gel (Macherey-Nagel, silica-gel 60, 0.04-0.063 mm). Synthetic tyrosol was purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and used without further purification.

Fungal Strain, Culture Media and Growth Conditions. *Alternaria euphorbiicola* was cultured on general-purpose VBA medium (pH 6,5) (22) at 25 °C for 7 days. For the production of toxic metabolites, five culture discs (10 mm in diameter) obtained from cultures formed on VBA were aseptically transferred to 2 L erlenmeyers containing 300 mL of Jenkins-Prior medium (pH 6,7) (23). After seeding, the flasks were incubated on an orbital shaker at 180 rpm and 25 °C in the dark for 14 days. At harvest, the liquid cultures (4 L, pH 5.8) were filtered, assayed for phytotoxic activity and the culture filtrates were lyophilized for the successive purification steps.

Extraction, Purification and Chemical Characterization of Tyrosol. The lyophilized residue was dissolved in distilled water to a final volume of 1 L. This solution was acidified with HCl 0.2 mol L⁻¹ until pH 4.5 and subjected to extraction with ethyl acetate (3 x 1 L). The organic phases were combined, dried with MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure at 40 °C. The brown oil residue obtained (434 mg) was fractionated by silica gel column chromatography (Scheme 1) eluted with hexane-ethyl acetate 9:1 to 0:1 (v/v) and ethyl acetate-methanol 1:1 (v/v). Fractions (7 mL each) were collected and pooled according to the thin layer chromatography (TLC) profiles, yielding 10 homogeneous fractions. The residue left by the 6th fraction (31.1 mg) eluted with hexane-ethyl acetate 2:3 (v/v) showed a high phytotoxic activity and was submitted to preparative TLC purification on silica [eluent hexane-ethyl acetate 4:1 (v/v)], affording three bands. The residue from the band of intermediate polarity (6.3 mg), exhibiting high phytotoxic activity, yielded tyrosol as colourless crystals (4.3 mg). The residues from the mother liquors were submitted to additional preparative TLC analysis [hexane:ethyl acetate 4:1 (v/v)], to afford a further amount (1.5 mg) of tyrosol.

Tyrosol: colourless crystals, R_f 0.24 [hexane:EtOAc 4:1(v/v)], mp: 90-91 °C. IR ν_{max} 3297, 1597, 1515, 1448, 1235, 1044 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.02 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H-3 and H-5), 6.68 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H-2 and H-6), 5.48 (br s, 1H, OH), 3.67 (t, 2H, J = 7.2 Hz, H-8), 2.70 (t, 2H, J = 7.2 Hz, H-7); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 155.6 (C-1), 129.8 (C-4), 129.7 (C-3 and C-5), 114.9 (C-2 and C-6), 63.4 (C-8), 38.2 (C-7). EIMS m/z: 138 [M⁺] (138), 107 (100), 77 (20), 51 (8), 39 (10), 31 (6).



Scheme 1. Fractionation of the organic extract.

Punctured-Leaf Assay. Organic extract, chromatographic fractions and tyrosol were assayed on the fungal host plant using a punctured leaf assay (24). Well expanded leaves of two-three week old *E. heterophylla* grown in greenhouse were punctured (adaxial side) with a sterile fine pointed needle and droplets (10 μL) of each test solution were deposited onto each of these sites (two punctures per leaf, three leaves per solution). Organic extract and chromatographic fractions were assayed at 5 mg mL⁻¹ and tyrosol was tested at concentrations ranging from 1 to 100 mM. Solutions were prepared in 20% (v/v) aqueous MeOH. After droplet application, plants were maintained in a dew chamber at 25 °C under natural light. Symptom appearance was observed daily and the diameter of the lesions was measured after 72 h. The punctured leaf assay was also utilized to evaluate the phytotoxic effects of tyrosol at 100 mM on different weeds (*Desmodium tortuosum*, *Bidens pilosa*, *Bidens subalternans*, *Ipomoea grandifolia*, *Brachiaria decumbens*, *Euphorbia hirta* and *E. heterophylla* resistant to ALS-inhibiting herbicides), on soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). Solutions of 20% (v/v) aqueous MeOH

were applied as negative control (the absence of phytotoxicity having separately been confirmed for *E. heterophylla* as well as the other plants).

Leaf Spray Assay. The phytotoxic activity of culture filtrates were tested by means of a leaf spray assay (24). Plants of *E. heterophylla* obtained as described above were sprayed with culture filtrates containing 0.05% (v/v) Tween 80, kept in a wet chamber under natural light at 28 °C and observed daily for symptoms development. 0.05% (v/v) Aqueous Tween 80 was used as control. A leaf spray assay was also used to assess the herbicidal activity of tyrosol against *E. heterophylla*. Solutions of tyrosol at concentrations from 10 to 100 mM containing 0.2% (v/v) Agral® (a non-ionic liquid wetting and spreading agent containing 20% (w/v) nonylphenoxy polyethoxy ethanol as active ingredient) as adjuvant were sprayed on *E. heterophylla* (11 plants per treatment). Aqueous solution of Agral® at 0.2% (v/v) was used as control. After spraying, the plants were kept in a greenhouse under natural light at 28 °C and observed daily for symptoms development.

Data analysis. Statistical differences between treatments were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and means separated using the least significant difference (LSD) test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and Structural Characterization of Tyrosol. The culture filtrates produced yellowing and necrosis on leaves of *E. heterophylla* and were extracted with ethyl acetate. The organic extract, also showing phytotoxic activity, was submitted to successive column chromatography on silica gel and TLC analysis

as described in Experimental, to yield the tyrosol as main metabolite (Figure 1) as colourless crystals. Its molecular formula $C_6H_{10}O_2$ was deduced from its electron impact mass spectrum. The IR spectrum showed bands at 3297 cm^{-1} (νOH), 1515 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{C}$) and two bands at 1235 e 1044 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{O}$) consistent with the presence of primary and phenolic hydroxyl groups, respectively. The ^1H NMR spectrum showed the presence of two isolated spin systems, one characteristic of a para

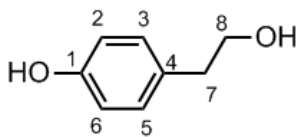


Figure 1. Structure of tyrosol.

The complete characterization of the compound was carried out by analysis of data from $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HETCOR and NOEDIFF experiments. The data obtained by the IR, and ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy are in perfect agreement with those reported in the literature (25, 26) and those obtained for synthetic tyrosol.

Phytotoxic Activity. Tyrosol is a primary metabolite with phytotoxic activity commonly produced by phytopathogenic fungal species, including *Alternaria tagetica* (26), *Ceratocystis adiposa* (27), and *Neofusicoccum parvum* (28). When assayed on punctured leaves of *E. heterophylla*, bleached lesions appeared in less than 24 h. At the minimal concentration tested (1 mM), tyrosol produced lesions with 1.8 mm in diameter 72 h after application. At a tyrosol concentration of 100 mM, bleached lesions reached ~10 mm in diameter (Figures 2 and 3). The same phytotoxic effect was observed on *E. heterophylla* resistant to ALS-inhibiting herbicides. Since bleaching of leaves is the first symptom observed after inoculation of *A. euphorbiicola* on *E. heterophylla*, these findings suggest that tyrosol may play a major role in the early process of infection of host tissues by the fungus.



Figure 2. Phytotoxic damage on *E. heterophylla* leaves. A, control; B, tyrosol at 1 mM; C, tyrosol at 100 mM.

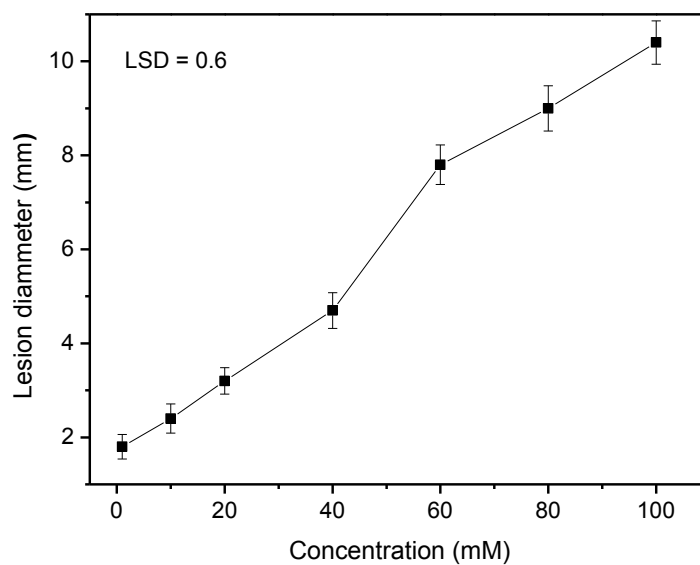


Figure 3. Dose-response relationship for tyrosol on punctured leaves of *E. heterophylla*. Bars represent standard deviation; $n = 3$.

The punctured leaf assay was also utilized to investigate the effects of tyrosol on leaves of various weed and crop plants (Figure 4). Assayed at 100 mmol L^{-1} (the maximum concentration tested against *E. heterophylla*), tyrosol produced

strong phytotoxicity only against *Desmodium tortuosum* (dixie ticktrefoil), another weed known from unpublished results of previous experiments to be equally susceptible to direct inoculations with suspensions of fungal propagules. This is also a highly important agricultural weed. To this plant, tyrosol applications produced complete bleaching of leaves rendering it impossible to evaluate the effect of the toxin through lesion diameter (Figure 5). Defoliation was also observed after 72 h of application. Even at high concentrations, very low effects were produced on leaves of the other tested plants, including corn and soybean, two of the main crops impacted by infestations of both *E. heterophylla* and *D. tortuosum*. Interestingly, strong phytotoxic effects were also observed on a biotype of *E. heterophylla* known to be resistant to ALS herbicides.

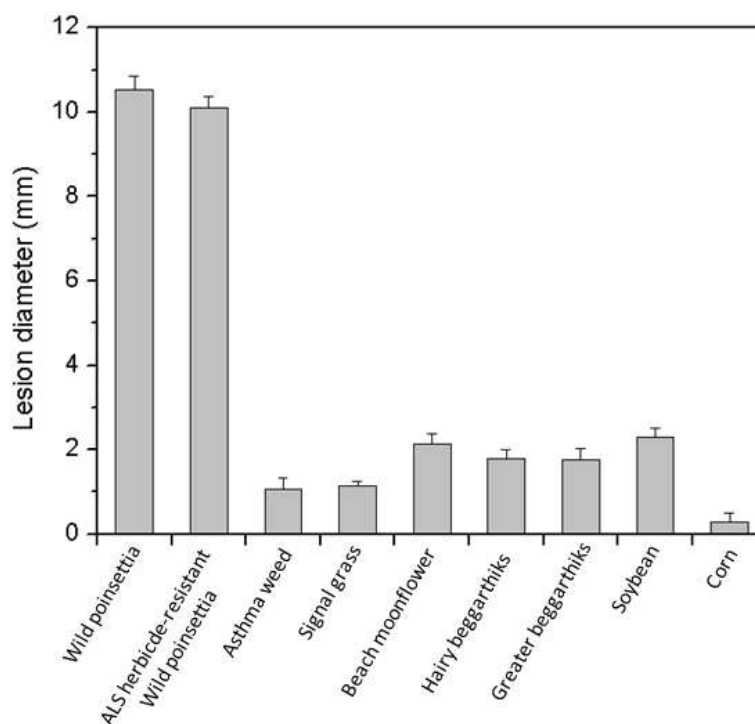


Figure 4. Effect of tyrosol at 100 mM on various weed and crop plants using a punctured leaf assay. Bars represent standard deviation; n = 3.



Figure 5. Phytotoxic effects of tyrosol (100 mM) on leaves of *Desmodium tortuosum* using a punctured leaf assay.

The phytotoxic activity of tyrosol against *E. heterophylla* was also assessed by means of a leaf spray assay. When sprayed with solutions of tyrosol at concentrations from 40 to 100 mM, plants developed wilting in less than 24 h (Figure 6), followed by necrosis (Figure 7), general leaf blight and death in up to 7 days after application (Figure 8 and 9). No symptoms were produced by the control.



Figure 6. Effects of the spray application of tyrosol [40 mM plus 0,2% (v/v) Agral®] on leaves of *E. heterophylla* 24 h after application.



Figure 7. Effects of the spray application of tyrosol [40 mM plus 0,2% (v/v) Agral®] on leaves of *E. heterophylla* 72 h after application.



Figure 8. Effects of the spray application of tyrosol on leaves of *E. heterophylla* 7 days after application. A, controle (0,2% (v/v) Agral®); B, tirosol at 40 mM plus 0,2% (v/v) Agral®].

The results from the present work indicate that tyrosol may constitute either in itself, or as a starting point in search for analogues, a promising finding for the development of a novel selective herbicides for the management of very important weeds.

LITERATURE CITED

- (1) Wilson, A. K. Euphorbia heterophylla: a review of distribution, importance and control. *Weed Technol.* **1971**, 27, 32-38.
- (2) Willard, T. S.; Griffin, J. L.; Reynolds, D. B.; Saxton, A. M. Interference of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) with soybean (*Glycine max*). *Weed Technol.* **1994**, 8, 679-683.
- (3) Carvalho, L. B.; Bianco, S.; Guzzo, C. D. Interference of *Euphorbia heterophylla* in the growth and macronutrient accumulation of soybean. *Planta Daninha* **2010**, 28, 33-39.
- (4) Gazziero, D. L. P.; Brighenti, A. M.; Maciel, C. D. G.; Christofolleti, P. J.; Adegas, F. S.; Voll, E. Wild poinsettia resistance to acetolactate synthase inhibitor herbicides. *Planta Daninha* **1998**, 16, 117-125.
- (5) Cerdeira, A. L.; Gazziero, D. L. P.; Duke, O. S.; Matallo, M. B. Agricultural Impacts of Glyphosate-Resistant Soybean Cultivation in South America. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 5799-5807.
- (6) Vidal, R. A.; Trezzi, M. M.; Prado, R.; Ruiz-Santaella, J. P.; Vila-Aiub, M. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* (L.)) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. *J. Food Agric. Environ.* **2007**, 5, 265–269.
- (7) Trezzi, M. M.; Felippi, C. L.; Mattei, D.; Silva, H. L.; Nunes, A. L.; Sebastiani, C.; Vidal, R. A.; Marques, A. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. *J. Environ. Sci. Health B* **2005**, 40, 101-109.

- (8) Barreto, R. W.; Evans, H. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathologia* **1998**, *36*, 21-36.
- (9) Demuner, A. J.; Barbosa, L. C. A.; Veita, T. A. M.; Barreto, R. W.; King-Diaz, B.; Lotina-Hennsen, B. Phytotoxic constituents from *Nimbya alternantherae*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, *34*, 790-795.
- (10) Evidente, A.; Punzo, B.; Andlofi, A.; Berestetskiy, A.; Motta, A. Alternethanoxins A and B, Polycyclic Ethanones Produced by *Alternaria sonchi*, Potential Mycoherbicides for *Sonchus arvensis* Biocontrol. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 6656–6660.
- (11) Berestetskiy, O. A Review of Fungal Phytotoxins: From Basic Studies to Practical Use. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2008**, *44*, 453–465.
- (12) Möbius, N.; Hertweck, C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Cur. Op. Plant Biol.* **2009**, *12*, 390-398.
- (13) Strange, R. N. Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 127-144.
- (14) Horbach, R.; Navarro-Quesada, A. R.; Knogge, W.; Deising, H. B. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 5162.
- (15) Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Romagni, J. G.; Rimando, A. M. Natural Products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Res.* **2000**, *40*, 99-111.
- (16) Hoagland, R. E. Microbial Allelochemicals and Pathogens as Bioherbicultural Agents. *Weed Technol.* **2001**, *15*, 835-857.

- (17) Li, Y.; Sun, Z.; Zhuang, X.; Xu, L.; Chen S.; Li, M. Research Progress on Microbial Herbicides. *Crop Protect.* **2003**, *22*, 247-252.
- (18) Duke, S. O.; Rimando, A. M.; Baerson, S. R.; Scheffler, B. E.; Ota, E.; Belz, R. G. Strategies for the Use of Natural Products for Weed Management *J. Pestic. Sci.* **2002**, *27*, 298-306.
- (19) Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Maltha, C. R. A.; Silva, P. S.; Silva, A. A. Synthesis and phytotoxic activity evaluation of new oxygenated analogues of helminthosporic acid. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 655-660.
- (20) Barbosa, L. C. A.; Nogueira, L. B.; Maltha, C. R. A.; Teixeira, R. R.; Silva, A. A. Synthesis and Phytogrowth properties of oxabicyclic analogues related to helminthosporin. *Molecules* **2009**, *14*, 160-173.
- (21) Chaves, F. C.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Silva, A. A. New helminthosporal analogues with plant-growth regulatory properties synthesized via oxallyl cation. *Z. Naturforsch B* **2006**, *61*, 1287-1294.
- (22) Pereira, J. M.; Barreto, R. W.; Ellison, C.; Maffia, L. A. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biol. Control* **2003**, *26*, 21-31.
- (23) Fargues, J.; Smits, N.; Vidal, C.; Vey, A.; Veja, F.; Mercadier, G.; Quimby, P. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia* **2001**, *15*, 127-137.
- (24) Pedras, M. S. C.; Ahiahonu, P. W. K. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 2163-2179.

(25) Gamboa-Angulo, M. M.; García-Sosa, K.; Alejos-Gonzales, F.; Escalante-Erosa, F.; Delgado-Lamas, G.; Peña-Rodrigues, L. M. Two Phytotoxic Polyketides from *Alternaria tagetica*. *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**, 1228-1232.

(26) Guzmán-López, O.; Trigos, A.; Fernández, F. J.; Yañez-Morales, M. J.; Saucedo-Castañeda, G. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 23, 1473-1477.

(27) Evidente, A.; Punzo, B.; Andolfi, A.; Cimmino, A.; Melck, D.; Luque, J. Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent *Phytopath. Medit.* **2010**, 49, 74-79.

APÊNDICE 1

Espectros de massas, IV e RMN do tirosol

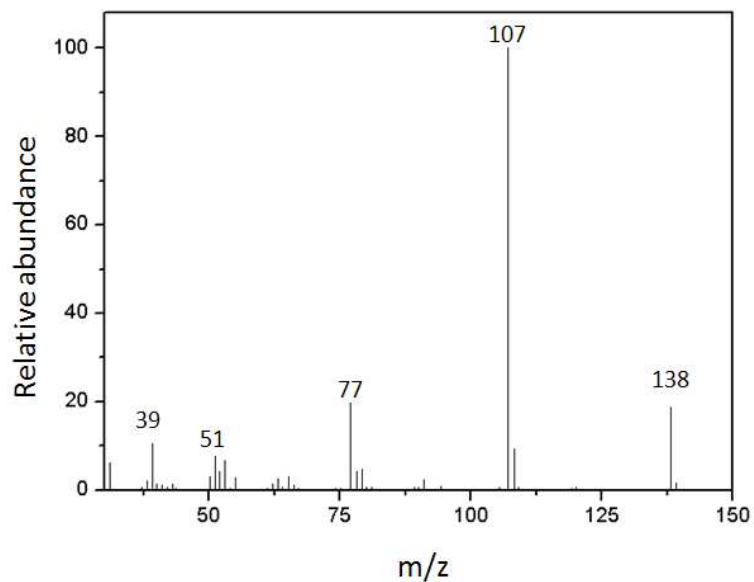


Figura 5. Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) do tirosol

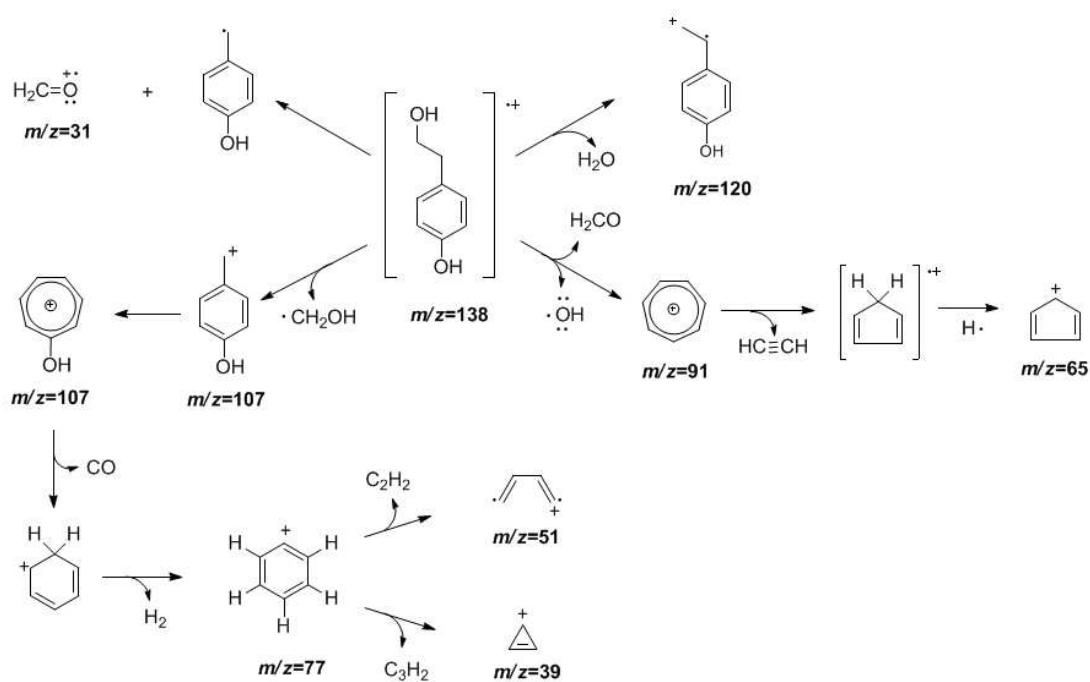


Figura 6. Principais fragmentações do tirosol por espectrometria de massas com impacto de electrons (70 eV).

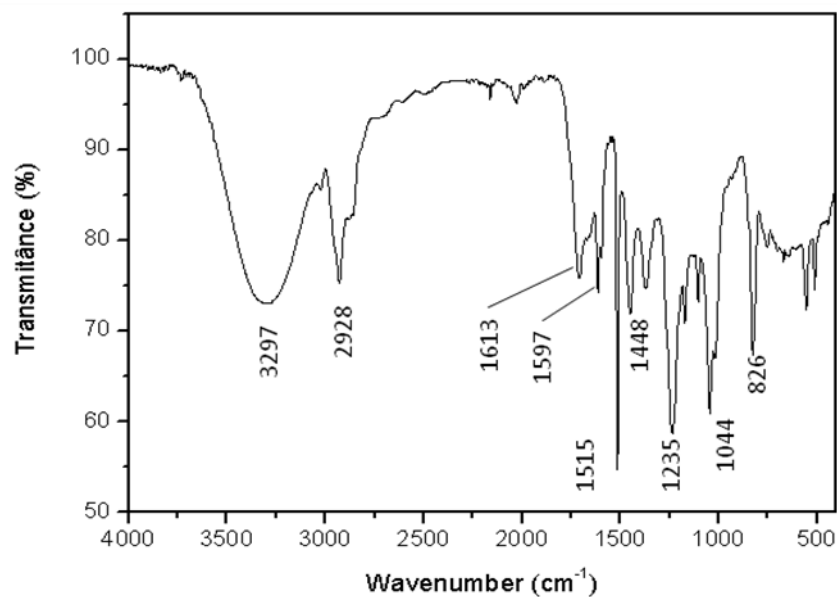


Figura 7. Espectro no infravermelho (sólido) do tirosol.

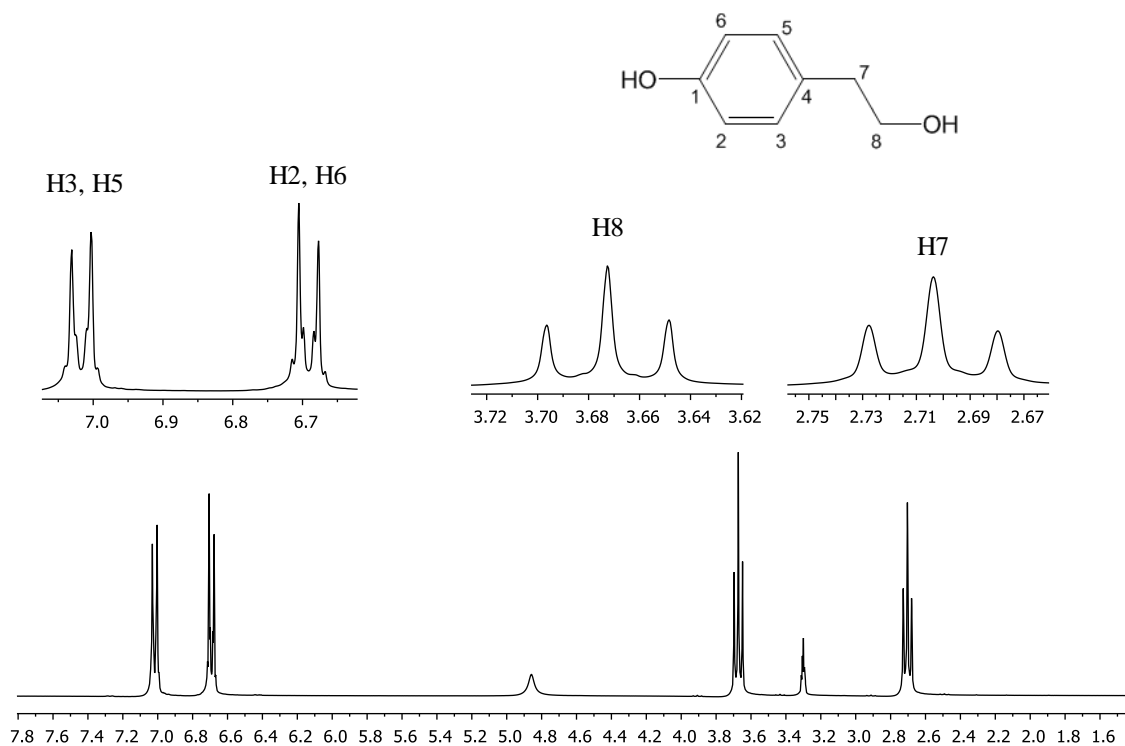


Figura 8. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) do tirosol.

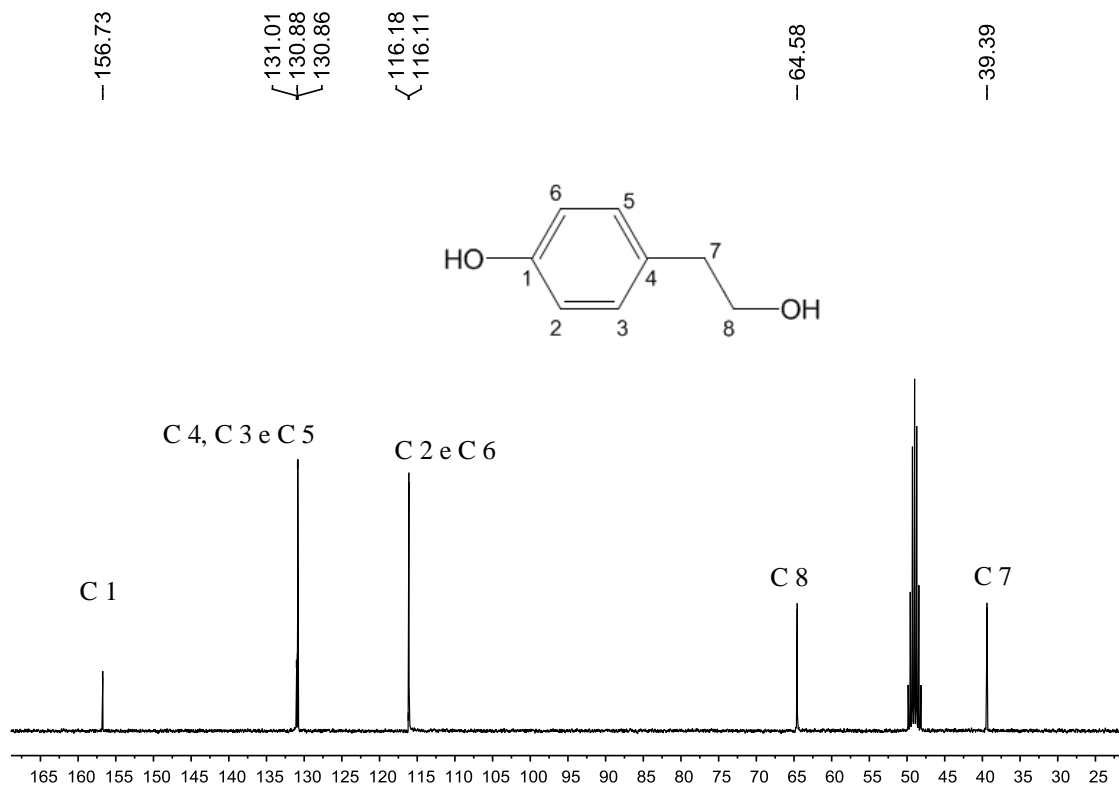


Figura 9. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) do tirosol.

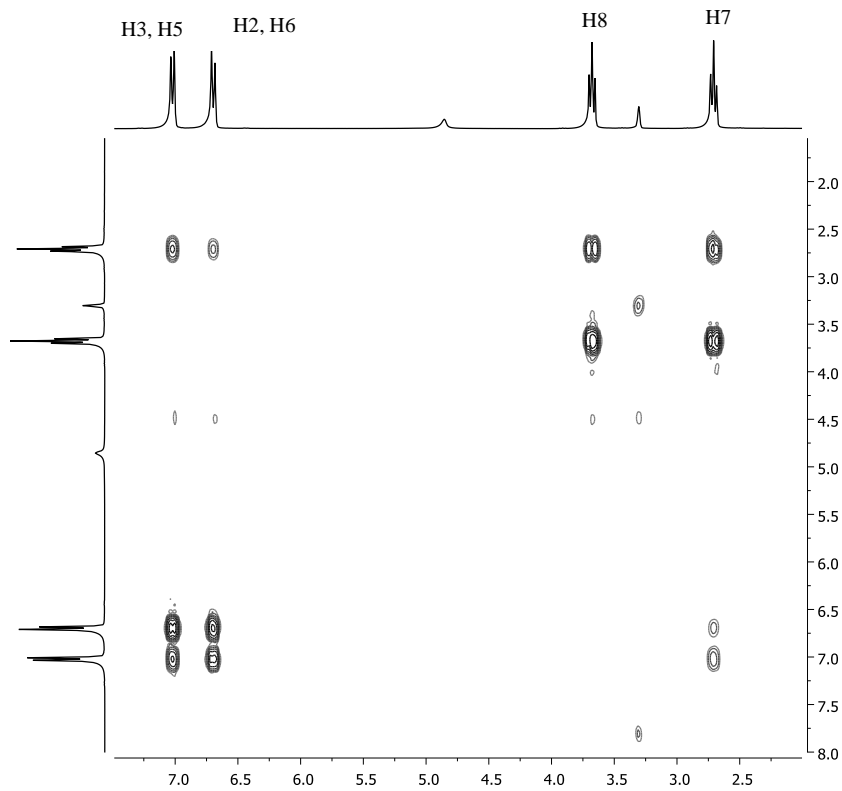


Figura 10. Mapa de contornos de ¹H-¹H COSY (300 MHz; CD₃OD) do tirosol.

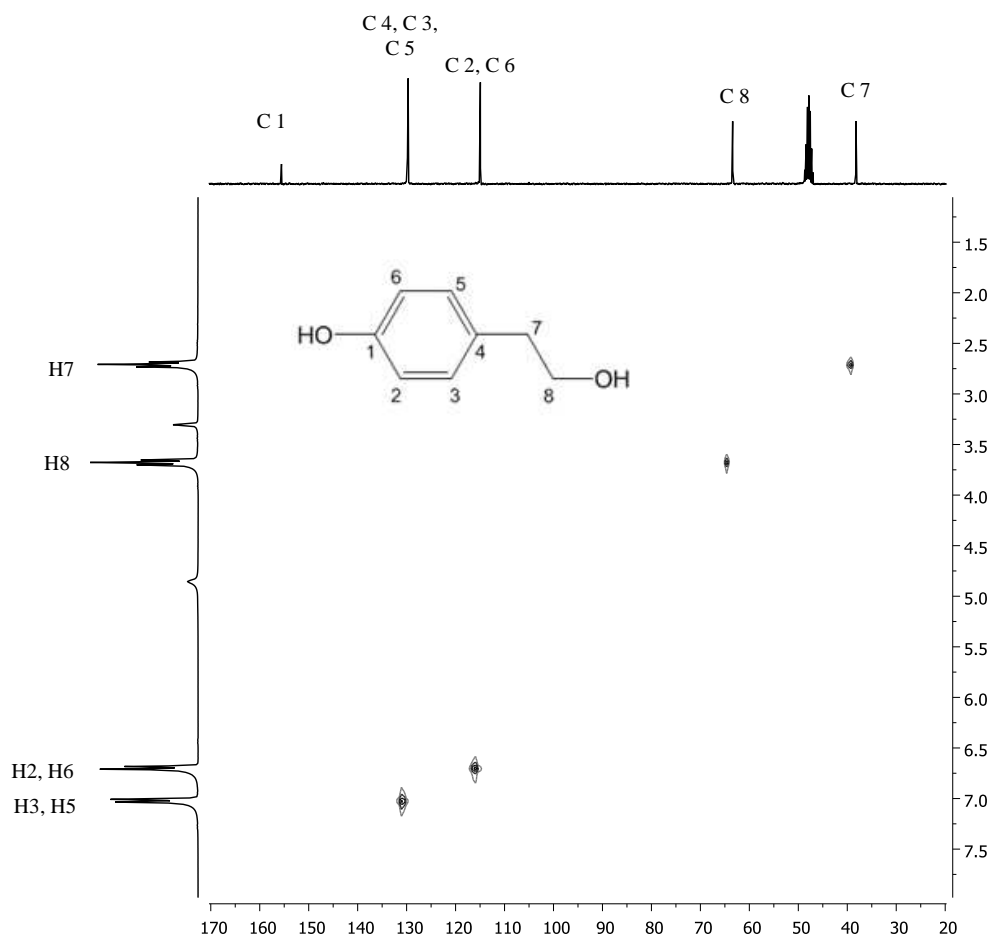


Figura 11. Mapa de contornos de ^1H - ^{13}C HETCOR (75 MHz; CD_3OD) do tirosol.

APÊNDICE 2

Análise da fase aquosa resmanescente da extração do filtrado de cultura com acetato de etila

Após extração do filtrado de cultura do fungo com acetato de etila, a fase aquosa remanescente foi avaliada quanto à atividade fitotóxica, através de ensaio em câmara úmida. Tendo produzido lesões necróticas sobre folhas da planta, a fase aquosa foi concentrada para um volume final de 500 mL e extraída com 1 L de acetonitrila, a frio. A mistura foi mantida à temperatura de $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após o congelamento da fase aquosa, a fase em acetonitrila foi separada por decantação e secada sobre MgSO_4 . O solvente foi removido a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob vácuo, fornecendo extrato obtido com 370 mg. O extrato foi avaliado (5 mg mL^{-1}) contra folhas de *E. heterophylla* utilizando ensaio com punctura de folhas e não produziu atividade fitotóxica. A solução aquosa remanescente da extração com acetonitrila foi então tratada com resina polimérica adsorvente Amberlite[®] XAD 4 (50 g), sob agitação em temperatura ambiente por 16 horas. A resina foi separada por filtração, empacotada em coluna de vidro e eluída com 500 mL de metanol. O solvente foi removido a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob vácuo, fornecendo extrato sólido com 1,4 g. O extrato foi submetido a ensaio sobre folhas de *E. heterophylla* e, tendo produzido lesões necróticas, foi fracionada em coluna de sílica-gel 60 (70-230 mesh), eluída com misturas de acetato de etila-metanol 1:1 (v/v) a 0:1 (v/v) [200 mL cada]. A fração eluída com clorofórmio-metanol 1:9 apresentou atividade fitotóxica. A análise por CCD [AcOEt-MeOH 1:6 (v/v)] mostrou um único ponto (R_f 0,23). A análise da fração por CG-EM (Figura 1)

mostrou dois picos que, por comparação com a biblioteca do equipamento, foram identificados como 2,3-diidro-3,5-diidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona **(1)** e 5-(hidroximetil)-2-furancarboxialdeído **(2)** (Figura 2). Estes compostos constituem produtos de degradação de açúcares em meio ácido (Shaw et al., 1971; Nishibori & Kawakishi, 1994; Arribas-Lorenzo & Morales, 2010) e apresentam atividades tóxicas para diferentes tipos de organismos, inclusive para o ser humano (Henares-Rufián & Morales, 2007; Linden et al., 2008; Capuano & fogliano, 2011)

Estes resultados indicam que não se trata de compostos produzidos pelo fungo, mas sim artefatos do meio de cultura, a fração não foi submetida a etapas adicionais para o isolamento e caracterização espectroscópica dos compostos e avaliação das suas atividades fitotóxicas.

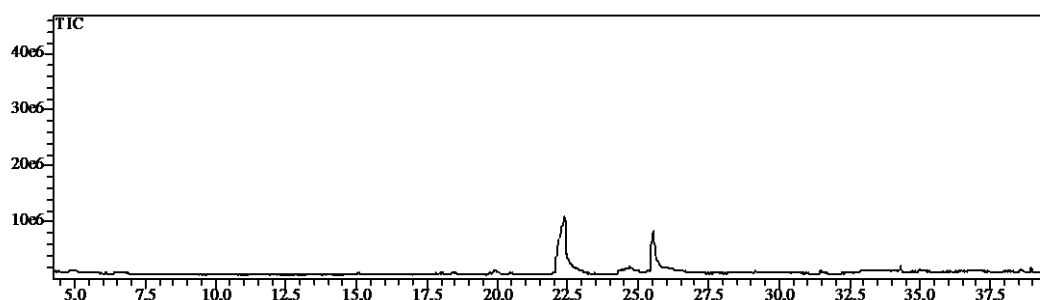


Figura 1. Análise por CG-EM da fração fitotóxica.

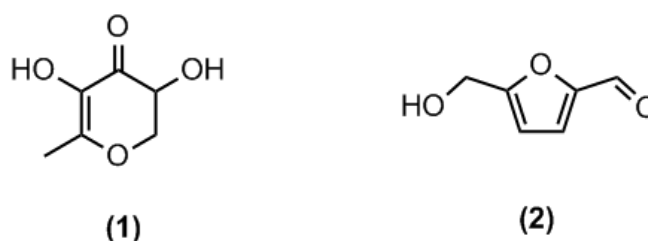


Figura 2. Estrutura química dos constituintes da fração fitotóxica.

Referências

ARRIBAS-LORENZO, G.; MORALES, F. J. Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 644-649, 2010.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Food Sci. Technol.*, 44, 793 – 810, 2011.

HENARES-RUFIÁN, J. A.; MORALES, F. J. Antimicrobial activity of melanoidins. *J. Food Qual.*, 30, 160-168, 2007.

LINDEN, E.; CAI, W.; HE, J.C.; XUE, C.; LI, Z.; WINSTON, J.; VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Endothelial Dysfunction in Patients with Chronic Kidney Disease Results from Advanced Glycation End Products (AGE)-Mediated Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase through RAGE Activation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 3, 691-698, 2008.

NISHIBORI, S.; KAWAKISHI, S. Formation of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one from Fructose and beta-Alanine under Conditions Used for Baking. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1080–1084, 1994.

SHAW, P. E.; TATUM, J. H.; BERRY, R. E. 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, a degradation product of a hexose. *Carbohydr. Res.*, 16, 207-211, 1971.

CAPÍTULO 6

Metabólitos Fitotóxicos Isolados de filtrados de Cultura de *Alternaria euphorbiicola* patógeno de *Euphorbia* *heterophylla*

Resumo

A espécie fúngica *Alternaria euphorbiicola* foi isolada de tecidos severamente infectados de *Euphorbia heterophylla* (leiteiro ou amendoim-bravo), uma das mais novas plantas daninhas tropicais e causadora de grandes prejuízos em importantes culturas como a soja e o milho. Estudos anteriores mostraram que a aplicação de esporos do fungo sobre a planta hospedeira resultam em rápido desenvolvimento de severas necroses de inflorescência, queimas de folhas e cancos da haste. Estes resultados levaram à conjectura de que o fungo produziria metabólitos fitotóxicos responsáveis, ao menos em parte, pelos sintomas. No presente trabalho, o fracionamento guiado por bioensaio de extrato orgânico de filtrados de cultura de *A. euphorbiicola* levou ao isolamento dos compostos (R)-(-)-mevalonolactona, anidromevalonolactona e da dicetopiperazina ciclo(Gly-L-Pro). Testados na concentração de 1 e 3 mg mL⁻¹, os compostos produziram necrose e despigmentação em folhas de *E. heterophylla*.

Palavras-chave: amendoim-bravo, ciclopeptídeos, dicetopiperazina, fitotoxina, mevalonolactona, planta daninha.

1. Introdução

Euphorbia heterophylla, popularmente conhecida como amendoim-bravo ou leiteiro, é uma planta nativa da América tropical e subtropical, sendo considerada uma das principais plantas daninhas na agricultura tropical e responsável por prejuízos a várias culturas em diversos países (Wilson, 1981). No Brasil, *E. heterophylla* se tornou uma das mais importantes plantas invasoras em importantes culturas como milho, cana-de-açúcar, feijão e soja (Rizzardi et al., 2004; Carvalho et al., 2010; Cury et al. 2011). Este problema vem sendo agravado pela crescente ocorrência de populações de *E. heterophylla* resistentes a herbicidas com diferentes mecanismos de ação (Trezzi et al. 2005; Cerdeira et al. 2011).

Durante levantamentos de fungos fitopatogênicos associados a plantas daninhas no Brasil, uma espécie identificada como *A. euphorbiicola* foi encontrada infectando plantas de *E. heterophylla* (Barreto & Evans, 1998). Estudos prévios sobre o potencial do fungo como agente para o controle biológico de *E. heterophylla* mostraram que a aplicação de suspensões de esporos do fungo sobre a planta hospedeira resultava na produção de extensas necroses em intervalos de tempo entre algumas horas e 2 dias após a aplicação. Estes intervalos de tempo foram considerados insuficientes para o desenvolvimento dos processos de germinação de esporos, penetração e colonização de tecidos e desenvolvimento dos sintomas comumente observados em interações planta-patógeno. Estas observações levaram à conjectura de que o fungo produza metabólitos fitotóxicos capazes de causar danos à planta hospedeira.

O objetivo do presente estudo foi isolar, identificar e avaliar a atividade fitotóxica de metabólitos produzidos por *A. euphorbiicola*.

2. Seção Experimental

2.1. Procedimentos Gerais

Extrações e procedimentos cromatográficos foram realizados utilizando-se solventes de grau analítico. As separações cromatográficas em coluna foram realizadas utilizando-se sílica-gel (Merck, Kieselgel 60, 0.063-0.20 mm). Para cromatografia em camada delgada (CCD) analítica e preparativa foram utilizadas placas de sílica gel (Merck, Kieselgel 60, F254, 0.25 and 0.5 mm, respectivamente) reveladas com luz ultravioleta (254 e 366 nm) seguida por nebulização com solução alcoólica de ácido fosfomolibdico e aquecimento a 110 °C por 10 min. Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Varian FT-IR 660-IR equipado com acessório Pike GladiATR. Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetro Varian MERCURY (300 MHz e 75 MHz, respectivamente) usando clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência ($\delta = 0$). As constantes de acoplamento (J) são dadas em Hertz. Os espectros de massas foram obtidos sob impacto de elétrons (70 eV) em equipamento Shimadzu GCMS-QP5050A. Pontos de fusão foram obtidos com equipamento digital MQAPF301 e os valores não estão corrigidos. As rotações específicas foram medidas em polarímetro manual (B + S) Bellingham + Stanley Ltd. dl-mevalonolactona e reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) e usados sem purificação adicional.

2.2 Fungo, Meio de Cultura e Condições de Cultivo

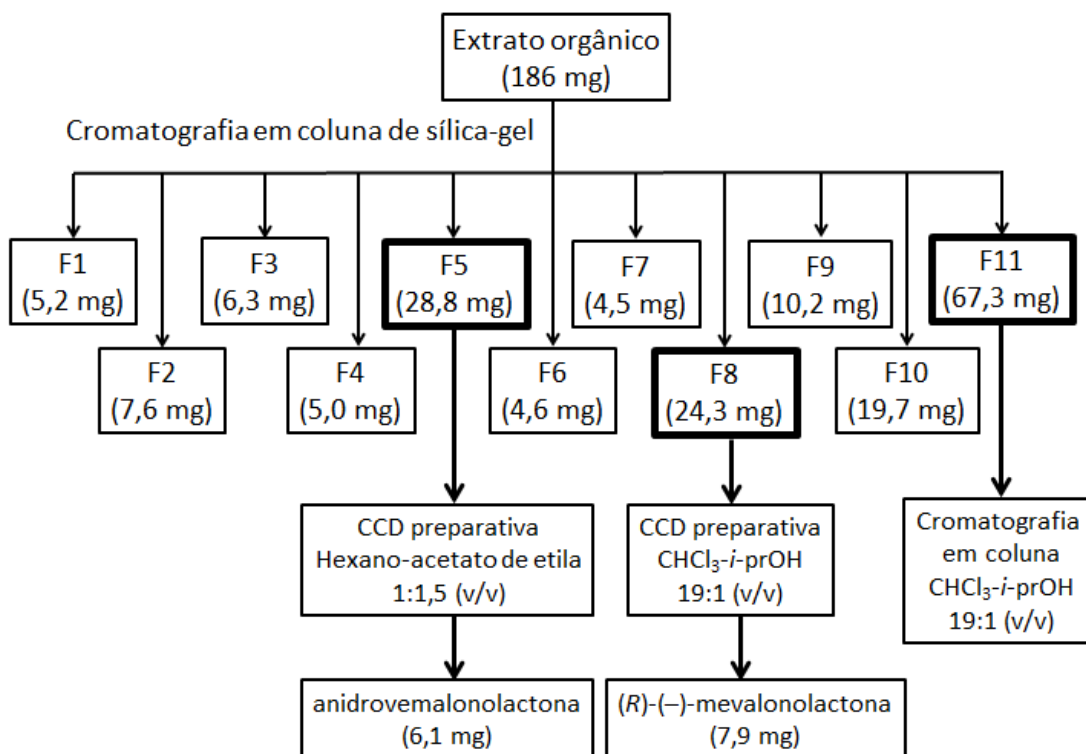
Alternaria euphorbiicola foi isolado de plantas de *E. heterophylla* naturalmente infectadas coletadas no Brasil e encontra-se armazenado a 5 °C na

coleção de culturas fúngicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. O fungo foi cultivado em meio Caldo de Vegetais Agar (Pereira et al. 2003)¹¹ a 25 °C por 7 dias. Para a produção e isolamento de metabólitos, frascos erlenmeyer (1 L) contendo meio de Fries (300 mL) foram semeados, cada um, com cinco discos de micélio (10 mm de diâmetro) obtidos de colônias em crescimento ativo. As culturas foram incubadas estaticamente a 25°C por 30 dias no escuro.

2.3. Extração, Fracionamento e Purificação de Metabólitos Fitotóxicos

Após o período de cultivo, o micélio foi removido por filtração e os filtrados (2,6 L) foram liofilizados, testados para atividade fitotóxica e extraídos exaustivamente com acetato de etila. Os extratos orgânicos foram combinados, secados sobre MgSO₄ e filtrados. O solvente foi removido em evaporador rotatório e o resíduo sólido obtido (186 mg) foi avaliado quanto à atividade fitotóxica. Tendo produzido amarelecimento e necrose em folhas de *E. heterophylla*, o material foi fracionado por cromatografia em coluna utilizando hexano-acetato de etila 9:1 (v/v) a 0:1 (v/v) e acetato de etila-metanol 1:1 (v/v) (200 mL cada). As frações 5, 8 e 11 apresentaram atividade fitotóxica e foram submetidas a procedimentos adicionais de fracionamento (Esquema 1).

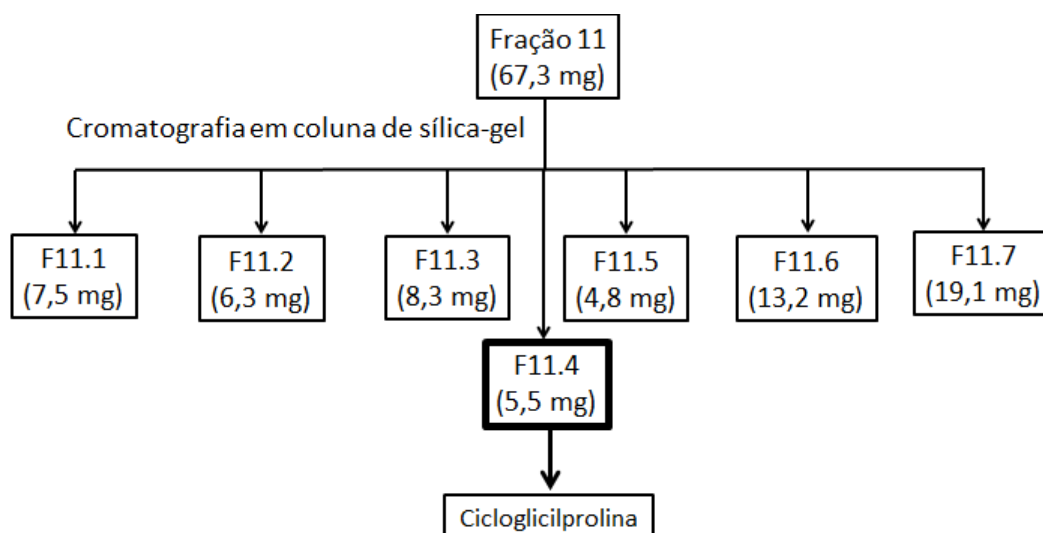
Após remoção do solvente, o resíduo da fração 5 (28,8 mg), eluída com hexano-acetato de etila 1:1 (v/v), foi purificada por sucessivas separações em CCD preparativa [hexano-acetato de etila 1:1.5 (v/v)], fornecendo o composto posteriormente identificado como anidromevalonolactona (**1**, 6,1 mg, R_f 0,40) como um óleo amarelo pálido (Esquema 2).



Esquema 1. Fracionamento do extrato em acetato de etila.

O resíduo obtido da fração 8 (24,3 mg) da coluna inicial, eluída com hexano-acetato de etila 1:4 (v/v), foi submetido a sucessivas etapas de CCD preparativa [CHCl₃-iso-PrOH 19:1 (v/v)] para fornecer o composto (*R*)-(-)-mevalonolactona (**2**, 7,9 mg, *R_f* 0,31), obtido como cristais incolores a partir de hexano-acetato de etila.

Após a evaporação do solvente, a fração 11 da coluna inicial, eluída com acetato de etila-metanol 1:1 (v/v), forneceu um resíduo (67,3 mg) que foi submetido a um segundo fracionamento em coluna cromatográfica [CHCl₃-iso-PrOH 9:1 (v/v)]. As frações (5 mL cada) foram coletadas e agrupadas com bases nos perfis em CCD, obtendo-se 7 frações (Esquema 2). O resíduo da fração 4 [*R_f* 0,26, CHCl₃-iso-PrOH 9:1 (v/v)] cristalizou durante a evaporação do solvente, fornecendo 5,5 mg de um cristal incolor posteriormente identificado como cicloglicilprolina (**3**).



Esquema 2. Isolamento da ciclogliciprolina.

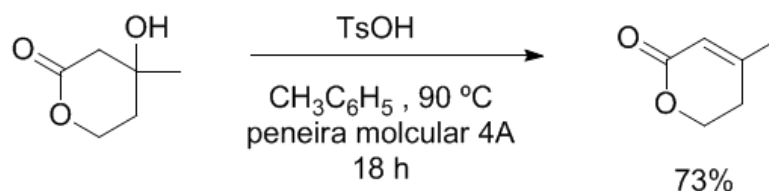
Anidromevalonolactona (1): óleo amarelo pálido; CCD [silica gel, hexano-acetato de tila 1:1.5(v/v)], $R_f=0,40$; IV (filme) ν_{\max} cm^{-1} 2981, 2948, 2908, 1714, 1643, 1398, 1220, 1149, 1062, 850. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 2,01 (m, 3H, H-7), 2,38 (m, 2H, H-4), 4,38 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz, H-3), 5,82 (sext, $J = 1,41$ Hz, 1H, H-6); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 23,2 (C-7), 29,4 (C-4), 66,1 (C-3), 116,9 (C-6), 158,1 (C-5), 164,8 (C-1). EM, m/z (%) 112 [M^+] (47.9), 82 (100), 67 (6.63), 54 (68.4), 39 (84.4).

(R)-(-)-Mevalonolactona (2): cristal incolor; CCD [silica gel, CHCl_3 -iso-PrOH 19:1 (v/v)], R_f 0.26; $[\alpha]_D^{25} -19.6$ (c 0.4, CHCl_3) [lit. $[\alpha]_D^{26} -20.1$ (c 1.0, EtOH) (Mash & Arterburn, 1991), $[\alpha]_D^{30} -22.0$ (c 0.4, CHCl_3) (Shimizu et al., 1997)]; T_f 24-26 °C; IR (sólido) ν_{\max} cm^{-1} 3396, 2971, 1700, 1263, 1128, 1068, 759; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1,38 (s, 3H, H-7), 1,91 (m, 2H, H-4), 2,36 (s l, 1H, OH), 2,50 (d, $J=17,4$ Hz, 1H, H-6a), 2,65 (d, $J = 17,4$ Hz, 1H, H-6b), 4,35 (m, 1H, H-3a), 4,60 (m, 1H, H-3b); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 29,9 (C-7), 36,1 (C-4), 44,9 (C-6), 66,3 (C-3), 68,4 (C-5), 170,9 (C-1); EM m/z (%) 71 (46,3), 58 (28,7), 43 (100), 31 (6,8).

Cicloglicilprolina (3): cristal incolor; CCD [silica gel, CHCl₃-iso-PrOH 9:1 (v/v)], R_f=0.26; T_f 216-217 °C; IR (sólido) ν_{\max} cm⁻¹ 3164, 2933, 1675, 1642, 1451, 1292, 880; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,20 (s 1, 1H, NH), 4,19–4,06 (m, 2H, 3-Ha, 8-Hb), 3,90 (dd, J = 16,9, 4,6 Hz, 1H, 3-Hb), 3,70–3,56 (m, 2H, 6-H), 2,48–2,30 (m, 1H, 8-Ha), 2,19–1,82 (m, 3H, 7-H e 8-Hb). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 22,4 (C-7), 28,4 (C-8), 45,3 (C-6), 46,6 (C-3), 58,5 (C-8a), 163,6 (C-4), 169,9 (C-1). EM, m/z (%) 155 [M⁺¹] (4,5), 154 [M⁺] (37,1), 126 (7,6), 111 (70,6), 98 (20,1), 83 (78,9), 70 (53,9), 55 (36,6), 41 (100), 30 (42,6).

2.4. Síntese da anidromevalonolactona

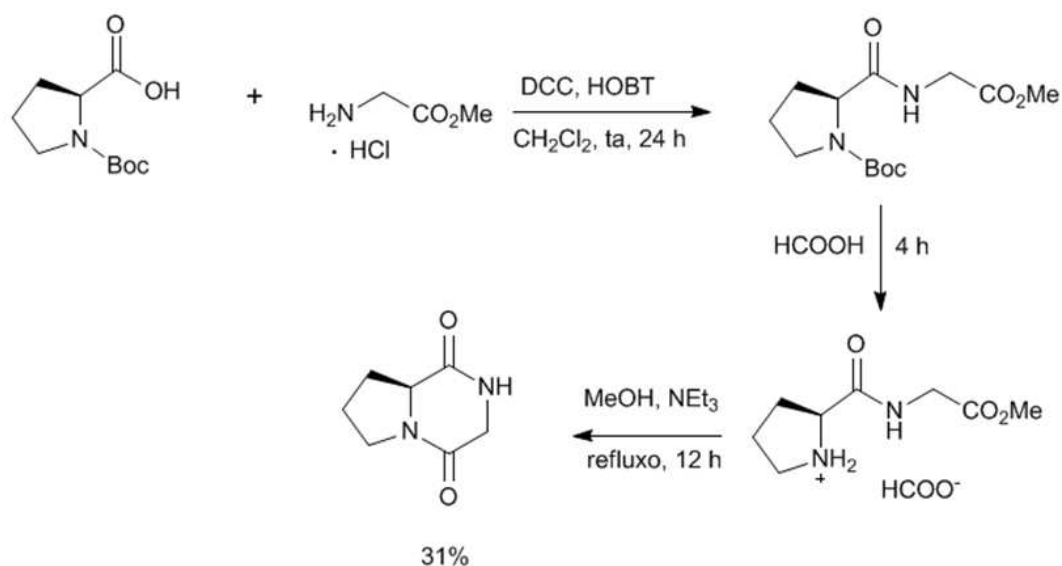
A síntese da anidromevalonolactona (4-metil-5,6-dihidropirano-2-ona) foi baseada em metodologia reportada por Shintani & Hayashi (2011) (Esquema 1). Uma mistura de (±)-mevalonolactona (79 mg, 0,61 mmol) e ácido p-toluenossulfônico (9,5 mg, 0,05 mmol) em tolueno (2 mL) foi aquecida a 90 °C por 18 horas em tubo selado, sob agitação, na presença peneira molecular 4A. Os voláteis foram removidos sob vácuo em evaporador rotatório e o resíduo foi submetido a cromatografia em coluna de sílica-gel com dietil éter-pentano 2:3 a 2:1 (v/v) para fornecer a anidromevalonolactona como óleo amarelo claro (49 mg, 0,44 mmol, 73%).



Esquema 3. Síntese da anidromevalonolactona.

2.5. Síntese da cicloglicilprolina

A cicloglicilprolina foi sintetizada segundo metodologias propostas por Nitecki et al. (1968) e Costa et al. (1993) (Esquema 2). A uma mistura de Boc-L-Pro (100 mg, 0,45 mmol), glicina metil éster (57 mg, 0,45 mmol, 1 equiv.), DCC (112 mg, 0,54 mmol, 1,2 equiv.) e HOBT monoidratado (73 mg, 0,54 mmol, 1,2 equiv.) foram adicionados 0,125 mL de trietilamina (0,9 mmol, 2,0 equiv.) e a mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. A análise por cromatografia em camada delgada [hexano-acetato de etila 2:1 (v/v)] indicou o término da reação. Após evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em AcOEt (10 mL) e lavado sucessivamente com água (10 mL), ácido cítrico a 5% (m/v) (2 x 5 mL) e solução de K_2CO_3 a 10% (m/v) (2 x 5 mL). O solvente foi removido sob vácuo, o resíduo foi dissolvido em 20 mL de ácido fórmico e a mistura foi mantida sob agitação por 4 horas. Foram adicionados 20 mL de tolueno e os solventes foram removidos sob vácuo. O resíduo obtido foi dissolvido em MeOH e, após adição de Et_3N (0,250 mL, 4 equiv.), a solução foi refluxada por 12 horas. Após evaporação dos solventes sob vácuo, o resíduo foi submetido a cromatografia flash em coluna de sílica gel (230-400 mesh) utilizando como eluentes misturas de diclorometano-propan-2-ol 3:1 a 1:1 (v/v), fornecendo o produto como sólido incolor [(22 mg, 0,14 mmol, 31%)].



Esquema 4. Síntese da cicloglicilprolina

2.6. Ensaio por Aspersão

Filtrados de cultura contendo Tween 80 a 0,5% (m/v) foram uniformemente aspergidos sobre folhas saudáveis de plantas jovens (2 a 3 semanas) de *E. heterophylla* cultivadas em casa de vegetação. Filtrados de meios de cultura sem crescimento fúngico contendo Tween® 80 a 0,5% (m/v) e solução aquosa de Tween® 80 a 0,5% (m/v) foram utilizados como controles. Após aspersão das soluções, as plantas foram mantidas em câmara úmida a 28 °C e o desenvolvimento de sintomas foi monitorado diariamente por 72 h.

2.7. Ensaio com Punctura de Folhas

As atividades fitotóxicas de extrato orgânico, frações cromatográficas e compostos puros foram avaliadas por meio de ensaio sobre folhas puncturadas de *E. heterophylla* (Pedras and Ahiahonu, 2004). Folhas saudáveis de plantas jovens de *E. heterophylla* (2 a 3 semanas) cultivadas em casa de vegetação foram puncturadas com auxílio de agulha e gotas (10 µL) de cada solução-teste foram depositadas sobre cada

punctura (2 puncturas por folha, 3 folhas por tratamento). As soluções foram preparadas pela dissolução de cada material em pequeno volume de DMSO e diluídas com água destilada para a concentração final desejada. A concentração final de DMSO, na qual não houve produção de efeitos tóxicos, foi de 2% (v/v). Extrato orgânico e frações cromatográficas foram avaliados a 10 mg mL^{-1} e compostos puros em concentrações de 1 e 3 mg mL^{-1} . Após aplicação das soluções, as plantas foram mantidas em câmara úmida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ sob luz natural. O desenvolvimento de sintomas foi observado diariamente e os diâmetros das lesões desenvolvidas foram medidos após 72 h.

3. Resultados e Discussão

Os filtrados de cultura foram ensaiados sobre folhas de *E. heterophylla* através de ensaio por aspersão e causaram amarelecimento e necroses em folhas da planta. Os filtrados foram então extraídos com acetato de etila e o extrato orgânico, também capaz de causar lesões em folhas puncturadas da planta, foi submetido a sucessivas etapas de fracionamento por cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa, conforme descrito na Seção Experimental. O fracionamento dos extratos levou à obtenção de três metabólitos principais (1–3), que foram caracterizados por comparação de seus dados espectroscópicos com dados reportados na literatura e com os obtidos dos compostos sintéticos. As atribuições dos sinais mostrados por RMN de ^1H e ^{13}C foram confirmados por experimentos COSY e HETCOR (os espectros estão apresentados no Apêndice).

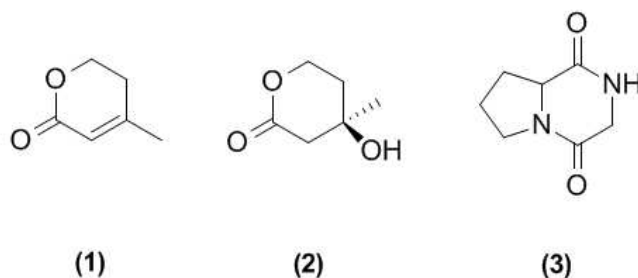


Figura 1. Metabólitos isolados do filtrado de cultura de *A. euphorbiicola*

O composto **(1)** foi identificado como anidromevalonolactona. Sua fórmula molecular $C_6H_8O_2$ foi deduzida do espectro de massas (Figura 3), consistente com três graus de insaturação dos quais, por dedução a partir do espectro no IV (Figura 5), um corresponde a uma dupla ligação carbono-carbono (ν 1643 cm^{-1}) e outro a um grupo carbonila (ν 1714 cm^{-1}). O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7) mostra um sinal a δ 164,8, compatível com a presença de carbonila de lactona conjugada a uma dupla ligação carbono-carbono cujos sinais aparecem a δ 158,1 e 116,9. Estas atribuições estão em concordância com os dados inferidos a partir do espectro no IV. Sinais correspondentes a um grupo metila e dois grupos metilenos aparecem em δ 23,2, 29,4 e 66,1, respectivamente. O espectro de RMH de ^1H (Figura 6) mostra um sinal característico de hidrogênio olefínico, integrado para 1H, que aparece como um sexteto em δ 5,82. Conforme evidenciado a partir do espectro de ^1H - ^1H COSY (Figura 8), este hidrogênio se acopla com o grupo metil (δ 2,01, 3H, m) e com um grupo metileno (δ 2,38, 2H, m), ambos os grupos ligados ao carbono β da insaturação conjugada à carbonila, conforme verificado pelo espectro de ^1H - ^{13}C HETCOR (Figura 9). Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C estão em concordância com aqueles repostados na literatura (Fernandes & Kumar, 1999) e com os dados obtidos para o composto sintético.

O espectro no IV do composto (**2**) (Figura 12) mostra bandas características de grupo hidroxila (ν 3396 cm^{-1}) e carbonila de lactona (ν 1700 cm^{-1}). O espectro de RMN de ^{13}C de (**2**) (Figura 14) mostra sinais correspondentes a carbonila de lactona a δ 170,9, um sinal de grupo metila em δ 29,9, de dois grupos grupo metileno em δ 36,1 e δ 66,3 e um sinal compatível com a presença de carbono carbinólico em δ 68,4. O espectro de RMN de ^1H (Figura 13) confirma os dados de ^{13}C , onde se observam os sinais dos dois átomos de hidrogênio diastereotópicos em δ 2,50 (d, 1H) e 2,65 (d, 1H) do grupo metileno ligado ao carbono da carbonila, o sinal dos hidrogênios do grupo metila em δ 1,38, e os hidrogênios dos dois outros grupos metileno em δ 1,91 (m, 2H), 4,35 (m, 1H) e 4,60 (m, 1H). As atribuições foram confirmadas por experimentos de ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HETCOR (Figuras 15 e 16). Com base na comparação dos dados espectroscópicos do composto isolado com os dados da literatura (Fernandes & Kumar, 1999), o metabólito (**2**) foi identificado como (R)-(-)-mevalonolactona. A identificação foi confirmada pela comparação dos dados espectroscópicos com os obtidos para o composto sintético.

O espectro de massas do composto (**3**) (Figura 17) mostra o pico do íon molecular em m/z 154, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_2$. A análise do espectro de RMN de ^1H permitiu identificar o composto como sendo a dicetopiperazina formada pela ciclização entre os aminoácidos glicina e prolina (cicloglicilprolina). Os multipletos em δ 1,82–2,19 (3H), δ 2.30–2,48 (1H) e δ 3,66–3,70 (2H) correspondem aos hidrogênios dos grupos metilenos da porção prolina. O multipletos em δ 4,06–4,19 (2H) corresponde aos dois átomos de hidrogênio do carbono ligado à carbonila da prolina e a um dos átomos de hidrogênio diastereotópicos do grupo metileno da porção glicina. O segundo átomo de hidrogênio do grupo metileno da glicina aparece como um duplete duplo em 3,90 (1H) e o sinal

do NH aparece em δ 6,20. A presença destas estruturas parciais foi confirmada pelas correlações observadas no espectro de ^1H - ^1H COSY (Figura 22). Os dados espectroscópicos estão de acordo com os reportados na literatura e com os obtidos para o composto sintético (Furtado et al., 2005).

A atividade de cada um dos compostos foi avaliada pela aplicação de soluções a 1 e 3 mg mL⁻¹ sobre folhas puncturadas de *E. heterophylla* (Figura 2). A (R)-(-)-mevalonolactona apresentou a menor atividade fitotóxica, tendo produzido halos de despigmentação com 2,8 mm de diâmetro apenas quando ensaiada a 3 mg mL⁻¹. Anidromevalonolactona e cicloglicilprolina causaram sintomas em ambas as concentrações testadas. Na concentração de 3 mg mL⁻¹, os halos de despigmentação produzidos pela anidromevalonolactona e as lesões necróticas produzidas pela cicloglicilprolina atingiram 3,1 mm e 4,2 mm de diâmetro, respectivamente.

A (R)-(-)-mevalonolactona corresponde à forma cíclica do ácido mevalônico, um intermediário chave em processos bioquímicos celulares (Herbert, 1989). Em fungos, a via do ácido mevalônico é a principal rota metabólica para a biossíntese de esteróides e terpenos (Hanson, 2008). Diferentes trabalhos reportam a síntese da (R)-(-)-mevalonolactona por fungos (Pittayakhajonwut et al., 2002; Ding et al., 2008; Hemtasin et al., 2011). As atividades citotóxica (Hemtasin et al., 2011) e antimalárica (Pittayakhajonwut, 2002) deste composto foram observadas. Embora a produção de vários metabólitos terpenóides fitotóxicos por fungos patógenos de plantas tenha sido reportada (Ballio et al., 1991; Evidente et al., 2006; Sparapano et al., 2004), o presente trabalho constitui a primeira demonstração da atividade fitotóxica da cicloglicilprolina.

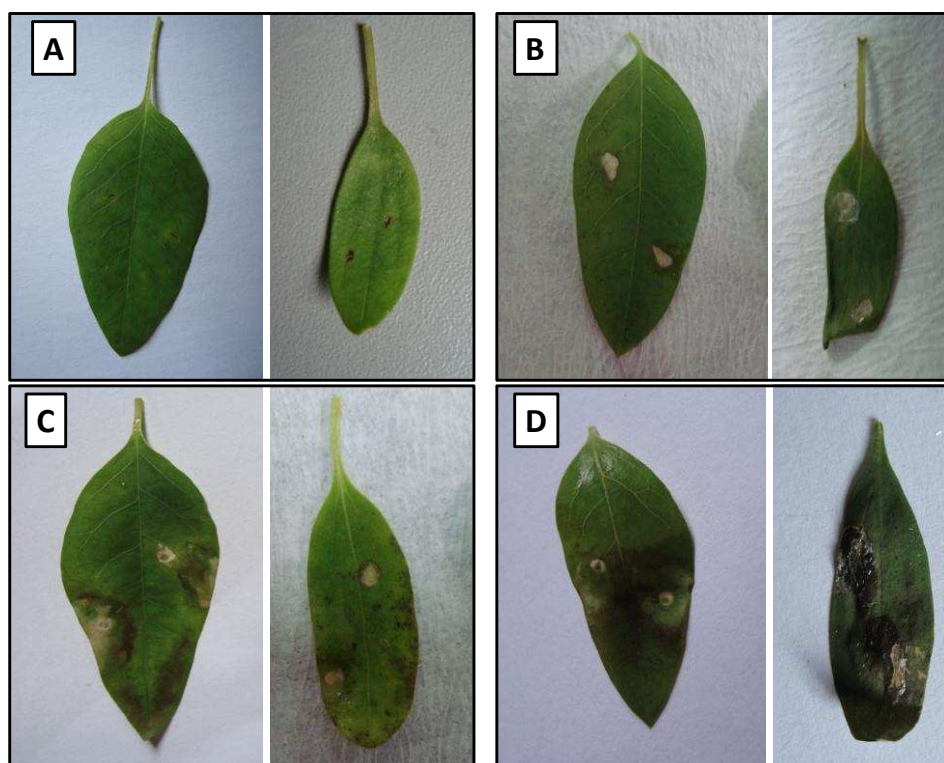


Figura 2. Efeitos dos metabólitos isolados (3 mg mL^{-1}) sobre *E. heterophylla* por meio de ensaio com punctura de folhas. A, controle [DMSO 0,2% (v/v)]; B, (R)-(-)-mevalonolactona; C, anidromevalonolactona; D, cicloglicilprolina.

Como os filtrados de cultura de *A. euphorbiicola* apresentaram pH 5,6, foi considerada a possibilidade da anidromevalonolactona (**1**) ter sido produzida pela desidratação da mevalonolactona (**2**) no caldo da cultura, em vez de produzida e secretada pelo fungo. Para verificar esta possibilidade, foi preparada uma solução aquosa de mevalonolactona a 3 mg mL^{-1} em pH 5,6 e a possível formação de (**1**) neste pH foi monitorada por CG-EM. Após 72 h de monitoramento, a solução foi aquecida a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 8 horas e novamente analisada por CG-EM. Não tendo sido detectada a formação da anidromevalonolactona nestas condições, sua produção como artefato do meio foi desconsiderada.

O composto cicloglicilprolina [ciclo(Gly-L-Pro)] é uma dicetopiperazina reportada como sendo produzida por diferentes microorganismos, incluindo fungos do solo (Furtado et al., 2005) e fungos patógenos de plantas (Trigos et al., 1997) e apresenta atividade inibitória de quitinases (Houston et al., 2004) e ação antibacteriana (Furtado et al., 2005). Dicetopiperazinas, os menores peptídeos cíclicos, são biossintetizadas por diferentes organismos e apresentam uma variedade de atividades biológicas (Martins & Carvalho, 2007). Embora a produção de diversas dicetopiperazinas fitotóxicas por fungo fitopatogênicos tenha sido reportada (Trigos et al., 1997; Stierle et al., 1988), o presente trabalho constitui o primeiro relato de atividade fitotóxica da cicloglicilprolina.

Os efeitos produzidos pelos compostos isolados foram similares aos primeiros sintomas observados após inoculação de esporos de *A. euphorbiicola* em *E. heterophylla*, o que sugere a participação conjunta destes compostos nos estágios iniciais da interação entre o patógeno e a planta. Os resultados mostraram que tais compostos podem constituir-se em modelos naturais para a síntese de análogos com maior atividade fitotóxica que possam ser utilizados para o manejo de *E. heterophylla*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLIO, A.; MORELLI, A. C.; EVIDENTE, A.; GRANITI, A.; RANDAZZO, G.; SPARAPANO, L. (1991). Seiricardine a, a phytotoxic sesquiterpene from three *Seiridium* species pathogenic for cypress. *Phytochemistry*, 30, 131-136.

BARRETO, R. W.; EVANS, H. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents (1998). *Mycopathologia*, 141, 21-36.

CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. (2010) Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. *Planta Daninha*, 28, 33-39.

CERDEIRA, A. L.; GAZZIERO, D. L.; DUKE, S. O.; MATALLO, M. B. (2011). Agricultural impacts of glyphosate-resistant soybean cultivation in South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5799-5807.

COSTA, B. R.; HE, X-S.; LINDERS, J. T. M.; DOMINGUEZ, C.; GU, Z. Q.; WILLIAMS, W.; BOWEN, W. D. (1993). Synthesis and evaluation of conformationally restricted N-[2-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]-N-methyl-2-(1-pyrrolidiny1)ethylamines at σ Receptors. 2. Piperazines, bicyclic amines, bridged bicyclic amines, and miscellaneous compounds. *J. Med. Chem.*, 36, 2311-2320.

CURY, J. P.; SANTOS, J. B.; SILVA, D. V.; CARVALHO, F. P.; BRAGA, R. R.; BYRRO, E. C. M., FERREIRA, E. A. (2011). Dry matter production and distribution of bean cultivars under weed competition. *Planta Daninha*, 29, 149-158.

DING, L.; QIN, S.; LI, F.; CHI, X.; LAATSCH, H. (2008) Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. *Curr. Microbiol.*, 56, 229-235.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; VURRO, M.; FRACCHIOLLA, M.; CHARUDATTAN, R. (2006). Herbicidal Potential of Ophiobolins Produced by *Drechslera gigantea*. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1779-1783.

- FERNANDES, R. A.; KUMAR, P. (1999). Enantioselective synthesis of (R)-(-)-mevalonolactone via cyclic sulphate methodology. *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 4349-4356.
- FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. (2005). Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16, 1448-1453.
- HANSON, J. R. *Chemistry of fungi*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2008.
- HEMTASIN, C.; KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K., HAHNVAJANAWONG, C.; SOYTONG, K.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. (2011). Cytotoxic pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. *J. Nat. Prod.*, 74, 609-613.
- HERBERT, R. B. *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, 2nd Edn; Chapman and Hall: London, 1989.
- HOUSTON, D. R.; SYNSTAD, B.; EIJSINK, V. G. H.; STARK, M. J. R.; EGGLESTON, I. M.; VAN AALTEN, D. M. F. (2004). Structure-based exploration of cyclic dipeptide chitinase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 47, 5713-5720.
- MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. (2007). Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, 63, 9923-9932.
- NITECKI, D. E.; HALPEN, B.; WETSLEY, J. W. (1968). Simple route to sterically pure diketopiperazines. *J. Org. Chem.*, 33, 864-866.
- PEDRAS, M. S. C.; AHIAHONU, P. W. K. (2004). Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Chem. Ecol.*, 30, 2163-2179.
- PITTAYAKHAJONWUT, P.; THEERASILP, M.; KONGSAEREE, P.; RUNGROD, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. (2002) Pughinin A, a sesquiterpene from the fungus *Kionochaeta pughii* BCC 3878. *Planta Med.*, 68, 1017-1019.

RIZZARDI, M. A.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. (2004) Interference of populations of *Euphorbia Heterophylla* and *Ipomoea ramosissima* isolated or in mixture in soybean crop. *Planta Daninha*, 22, 29-34.

SHINTANI, R.; HAYASHI, T. (2011) Rhodium-catalized asymmetric 1,4-addition of sodium tetraarylborates to β,β -disubstituted α,β -unsaturated esters. *Org. Let.*, 13, 350-352.

SPARAPANO, L.; BRUNO, G.; FIERRO, O.; EVIDENTE, A. (2004). Studies on structure-activity relationship of sphaeropsidins A-F, phytotoxins produced by *Sphaeropsis sapinea* f. sp. *cupressi*. *Phytochemistry*, 65, 189-198.

STIERLE, A. C.; CARDELLINA, J. H.; STROBEL, G. A. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternate*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8808-8011, 1988.

TREZZI, M. M.; FELIPPI, C. L.; MATTEI, D.; SILVA, H. L.; NUNES, A. L., DEBASTIANI, C.; VIDAL, R. A. MARQUES, A. (2005). Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. *J. Environ. Sci. Health*, 40, 101-109.

TRIGOS, A.; REYNA, S.; GUTIERREZ, M. L.; SANCHEZ, M. (1997). Diketopiperazines from Cultures of the Fungus *Colletotrichum gloeosporoides*, *Nat. Prod. Let.*, 11, 13-16.

VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M.; PRADO, R.; RUIZ-SANTAELLA, J. P.; VILA-AIUB, M. (2007) Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* (L.)) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. *J. Food Agric. Environ.*, 5, 265-269.

WILSON, A. K. (1981). *Euphorbia heterophylla*: a review of distribution, importance and control. *Tropical Pest Manag.*, 27, 32-38.

APÊNDICE 1

Espectros de massas, IV e RMN da anidromevalonolactona

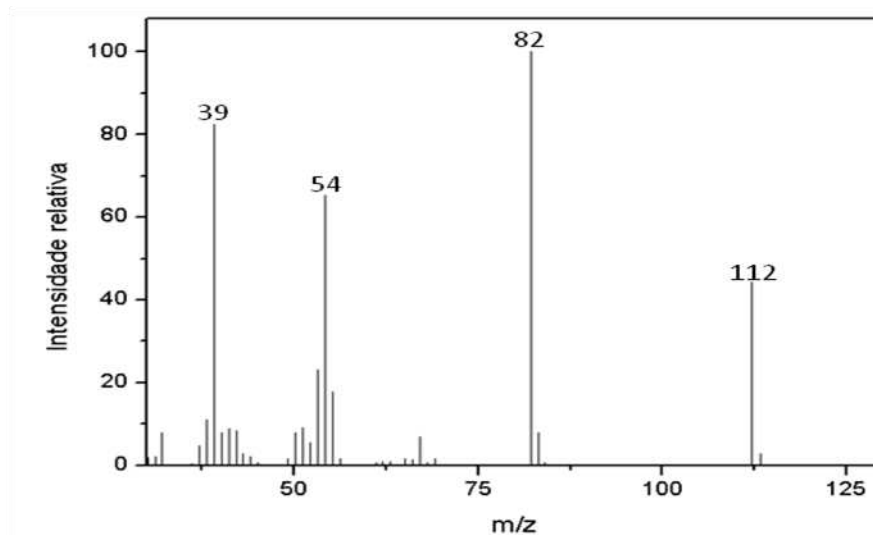


Figura 3. Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) da anidromevalonolactona (**1**).

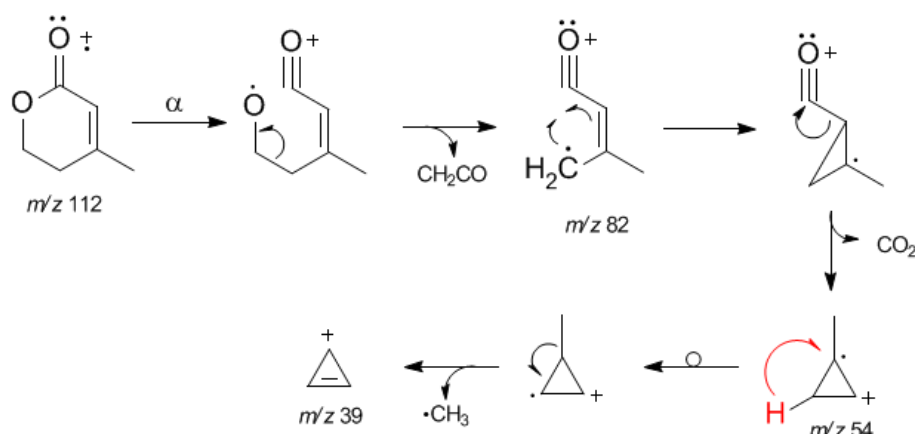


Figura 4. Principais fragmentações da anidromevalonolactona (**1**) por espectrometria de massas com impacto de electrons (70 eV).

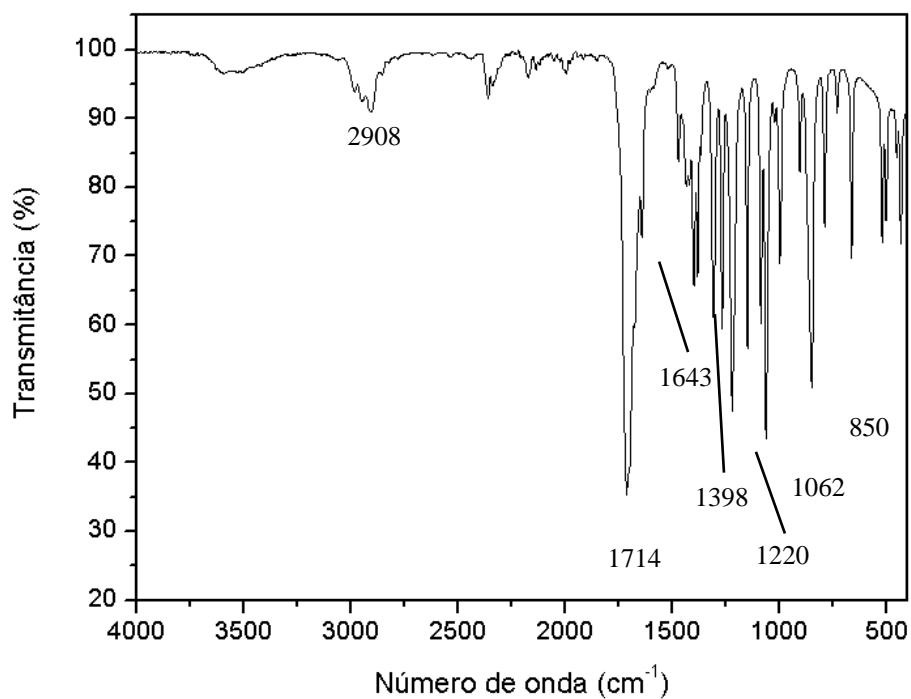


Figura 5. Espectro no infravermelho (filme) da anidromevalonolactona (**1**).

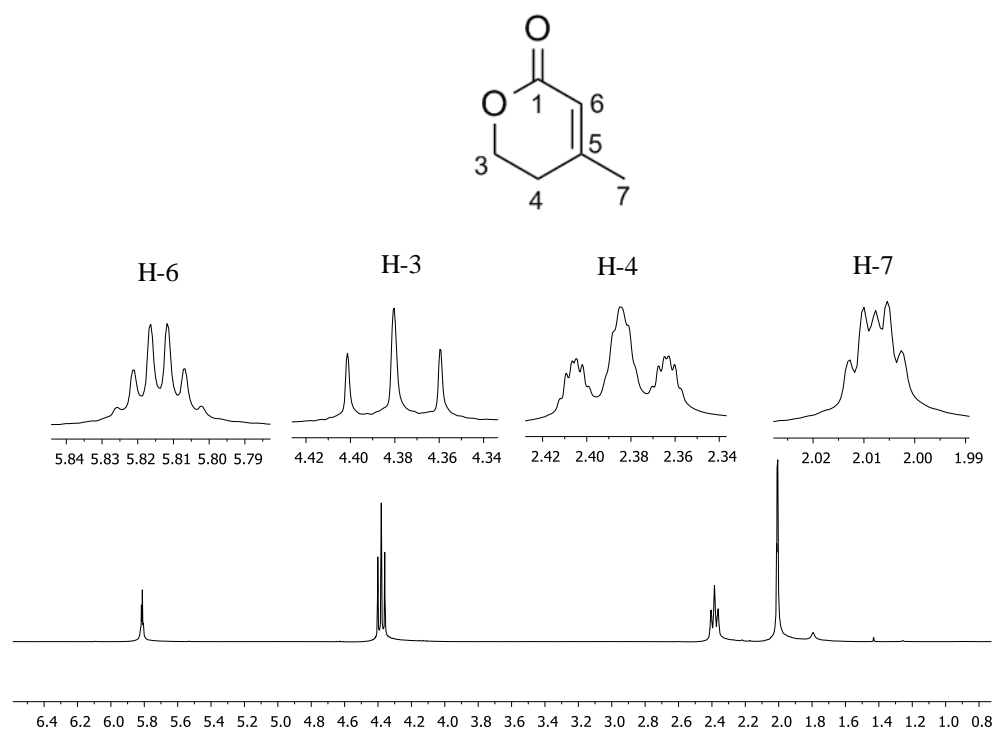


Figura 6. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) da anidromevalonolactona (**1**).

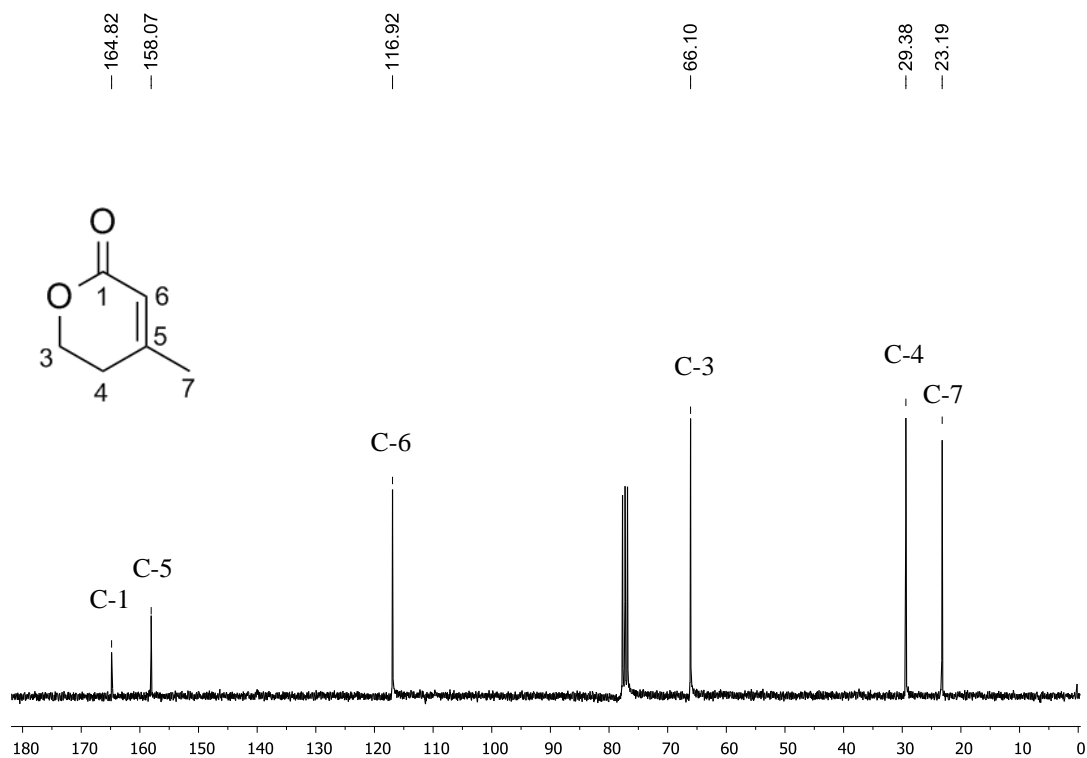


Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da anidromevalonolactona (**1**).

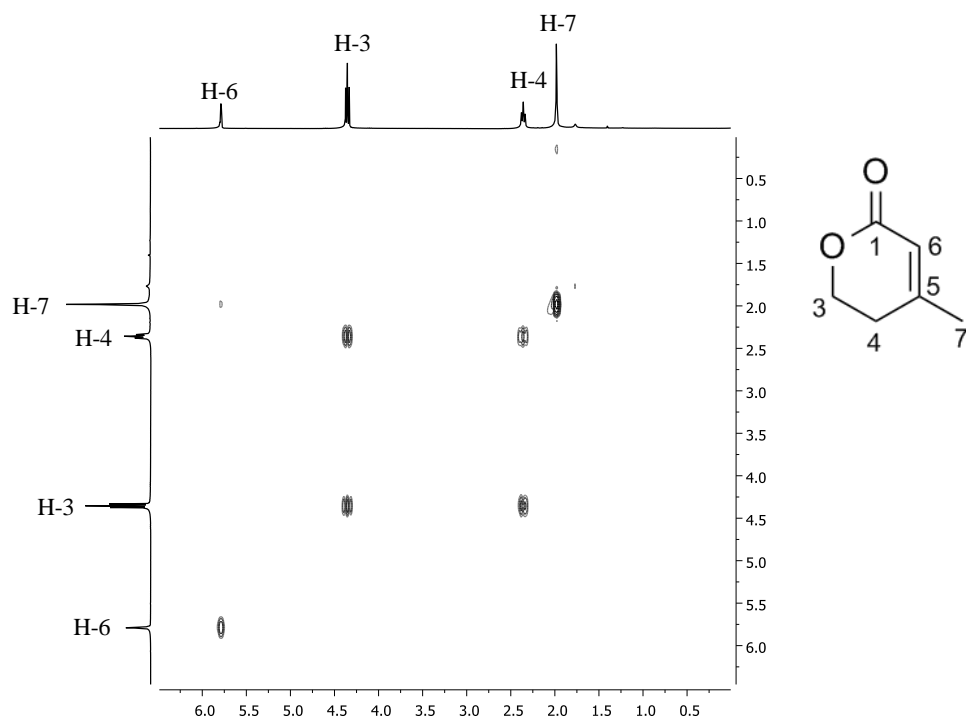


Figura 8. Mapa de contornos de ^1H - ^1H COSY (300 MHz; CDCl_3) da anidromevalonolactona (**1**).

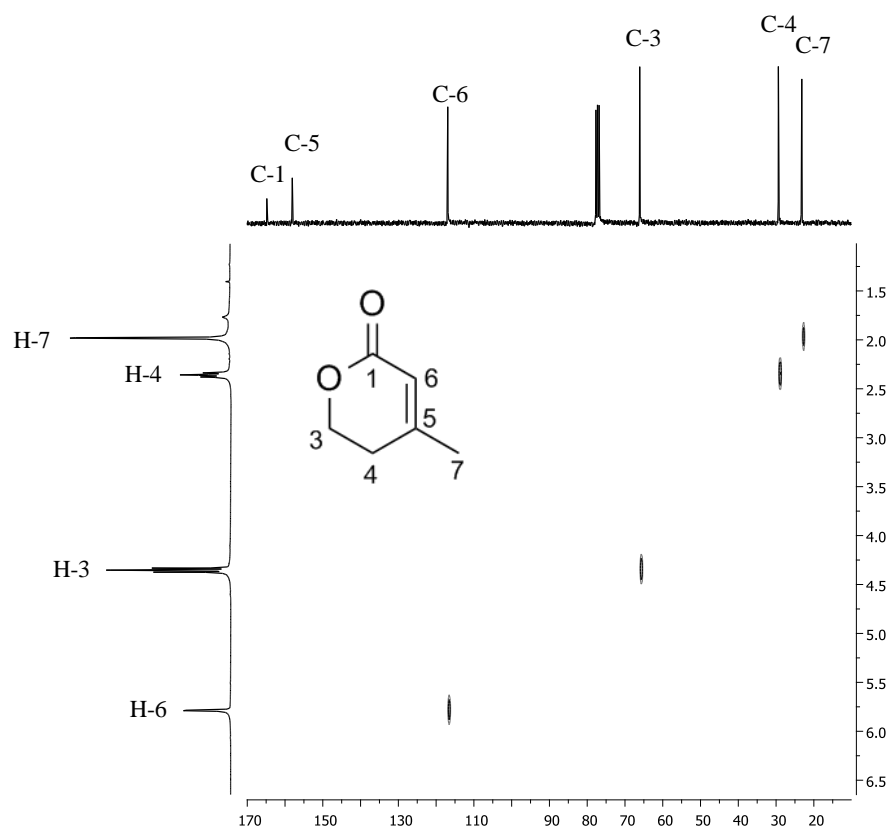


Figura 9. Mapa de contornos de ^1H - ^{13}C HETCOR (75 MHz; CDCl_3) da anidromevalonolactona (**1**).

APÊNDICE 2

Espectros de massas, IV e RMN da (R)-(-)-mevalonolactona

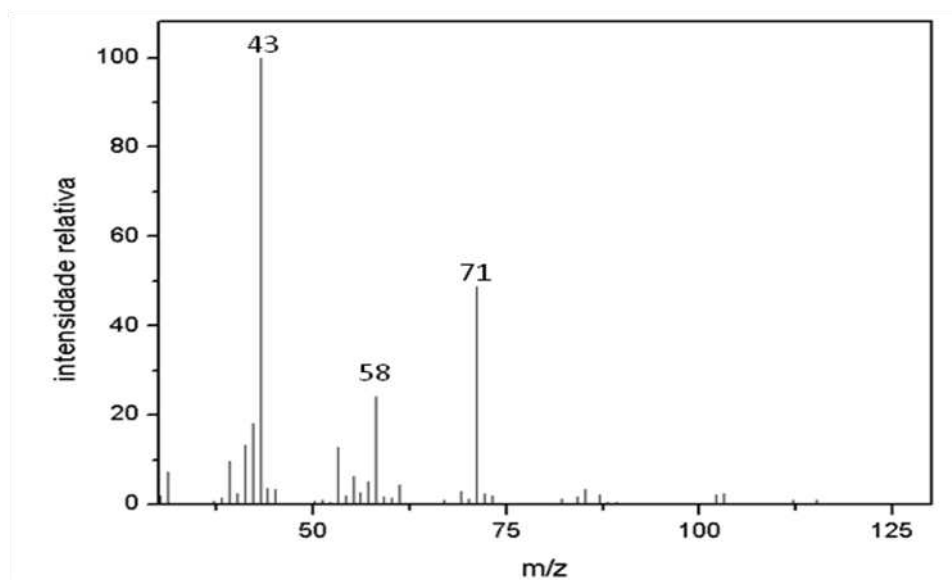


Figura 10. Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) da (R)-(-)-mevalonolactona (**2**).

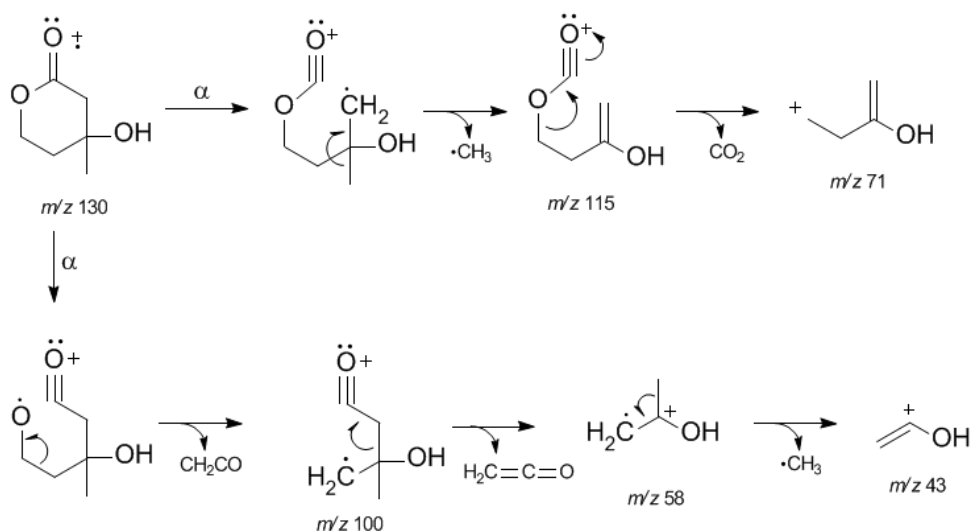


Figura 11. Principais fragmentações da (R)-(-)-mevalonolactona (**2**) por espectrometria de massas com impacto de electrons (70 eV).

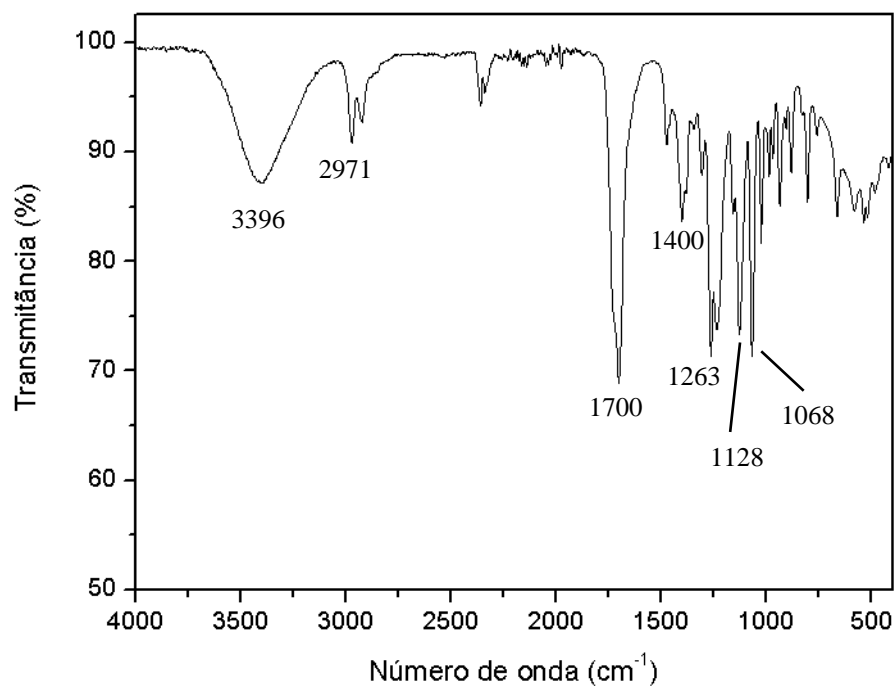


Figura 12. Espectro no infravermelho (sólido) da (R)-(-)-mevalonolactona (**2**).

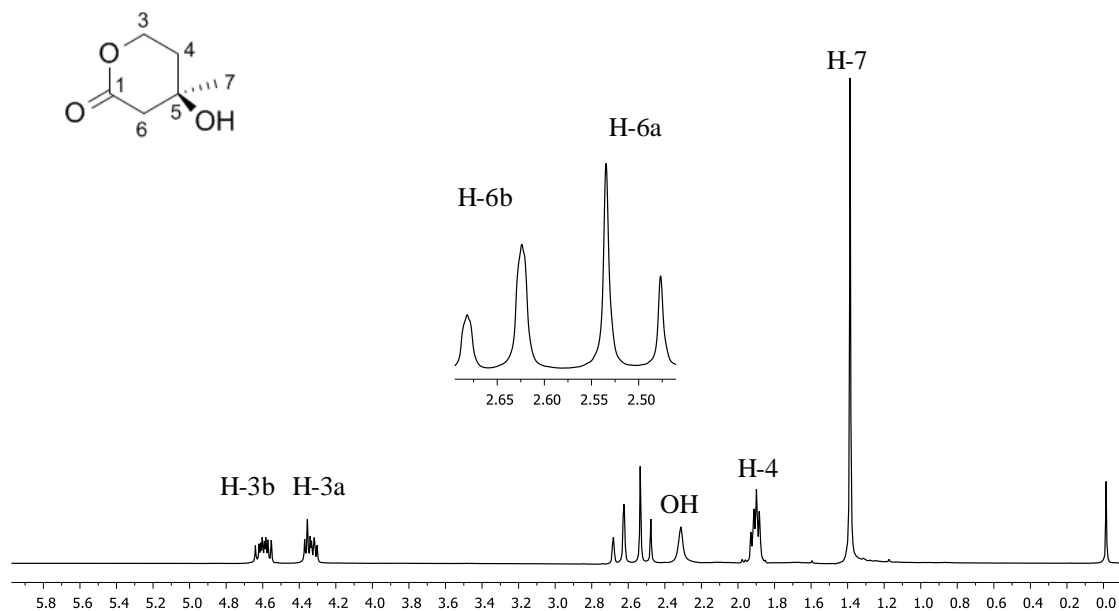


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da (R)-(-)-mevalonolactona (**2**).

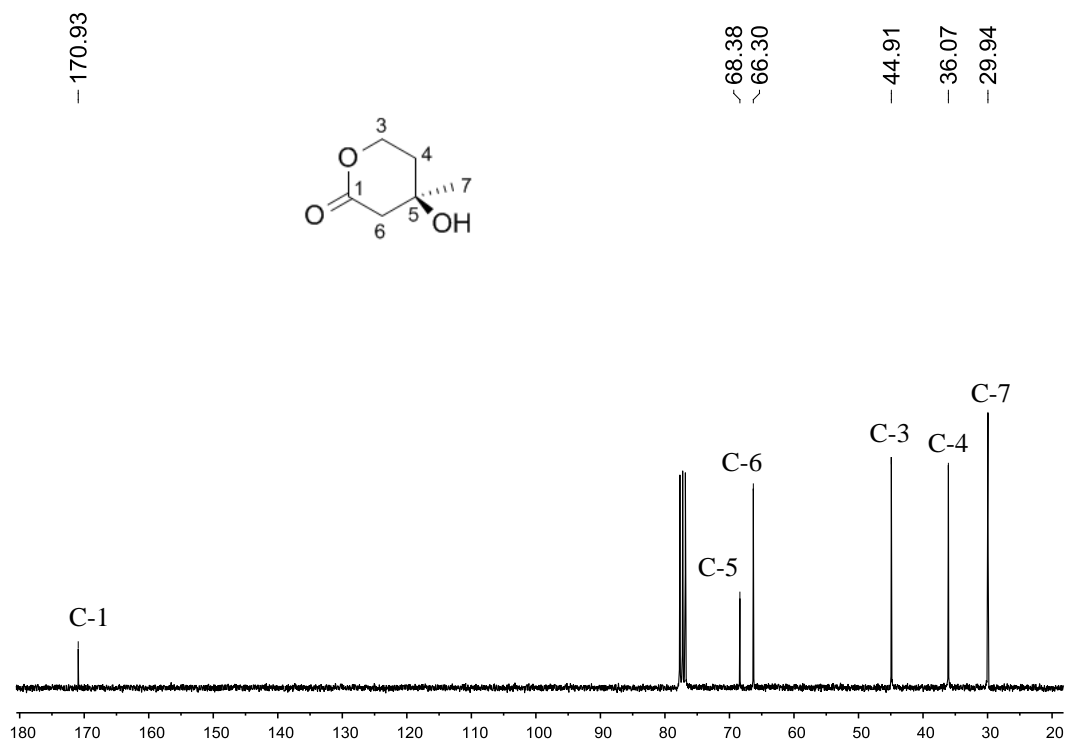


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da (R)-(-)-mevalonolactona (2).

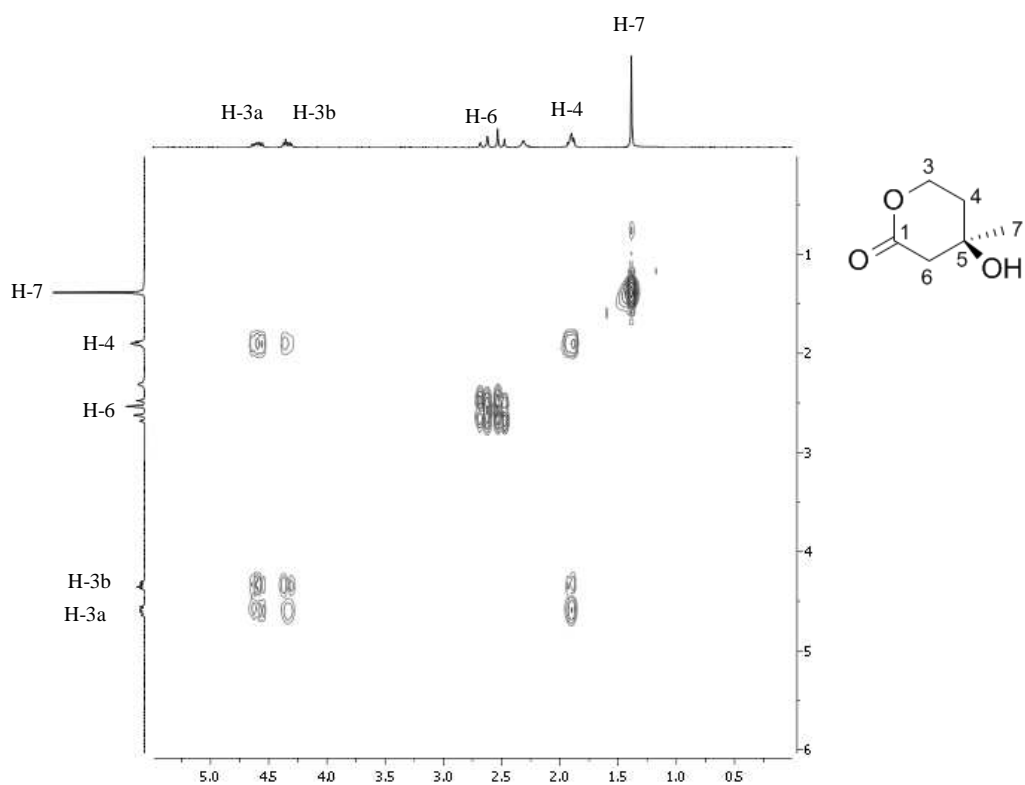


Figura 15. Mapa de contornos de ^1H - ^1H COSY (300 MHz; CDCl_3) da (R)-(-)-mevalonolactona (2).

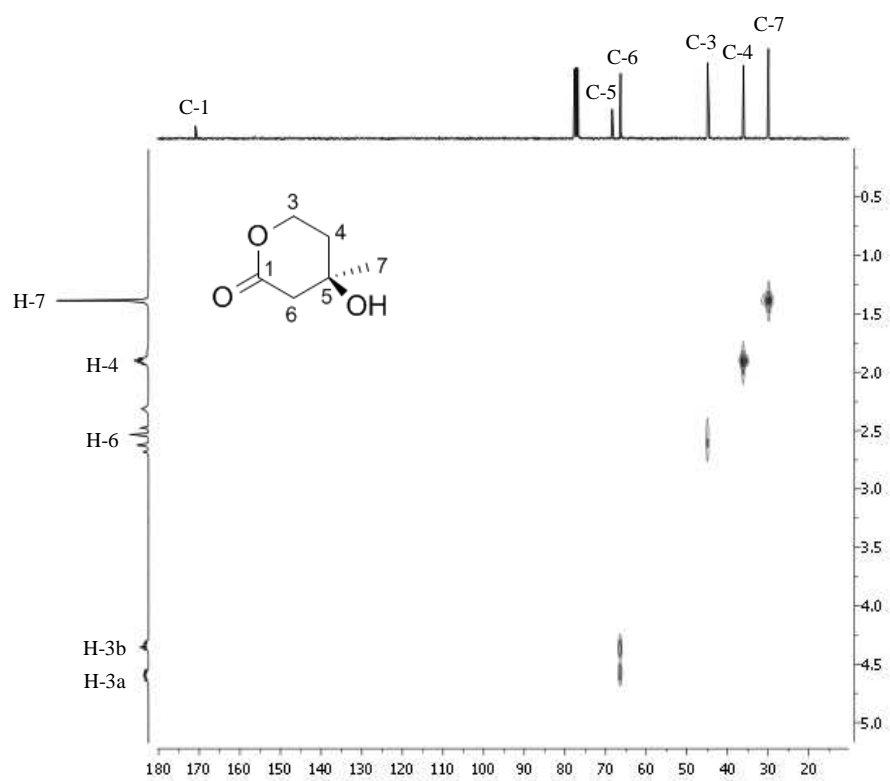


Figura 16. Mapa de contornos de ^1H - ^{13}C HETCOR (75 MHz; CDCl_3) da (R)-(-)-mevalonolactona (**2**).

APÊNDICE 3

Espectros de massas, IV e RMN da cicloglicilprolina

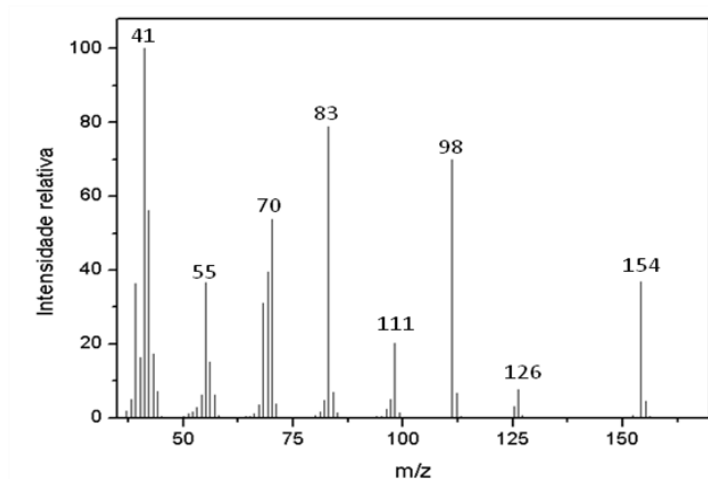


Figura 17. Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) da cicloglicilprolina.

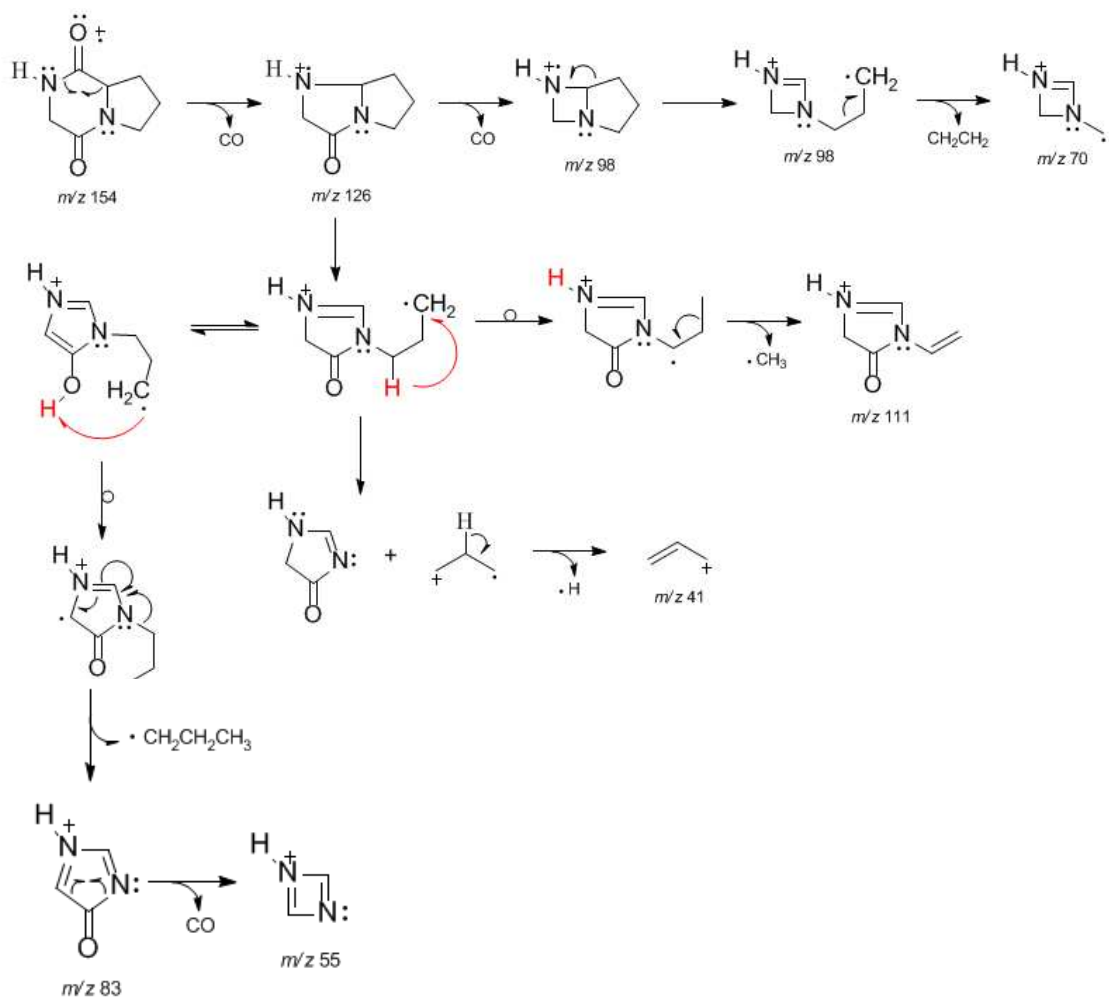


Figura 18. Principais fragmentações da cicloglicilprolina (3) por espectrometria de massas com impacto de electrons (70 eV).

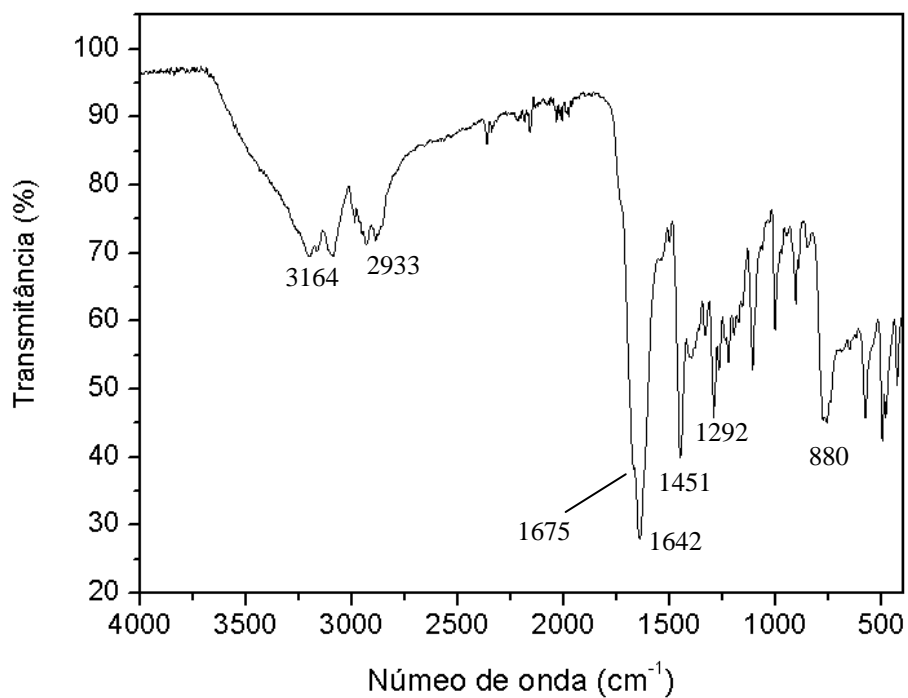


Figura 19. Espectro no infravermelho (sólido) da cicloglicilprolina (**3**).

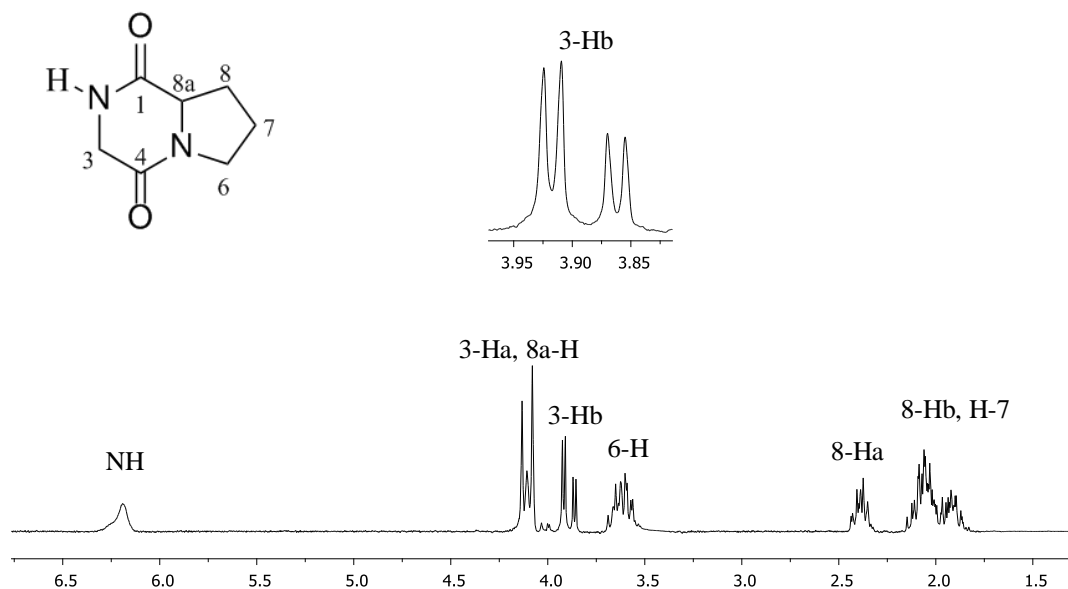


Figura 20. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) da cicloglicilprolina (**3**).

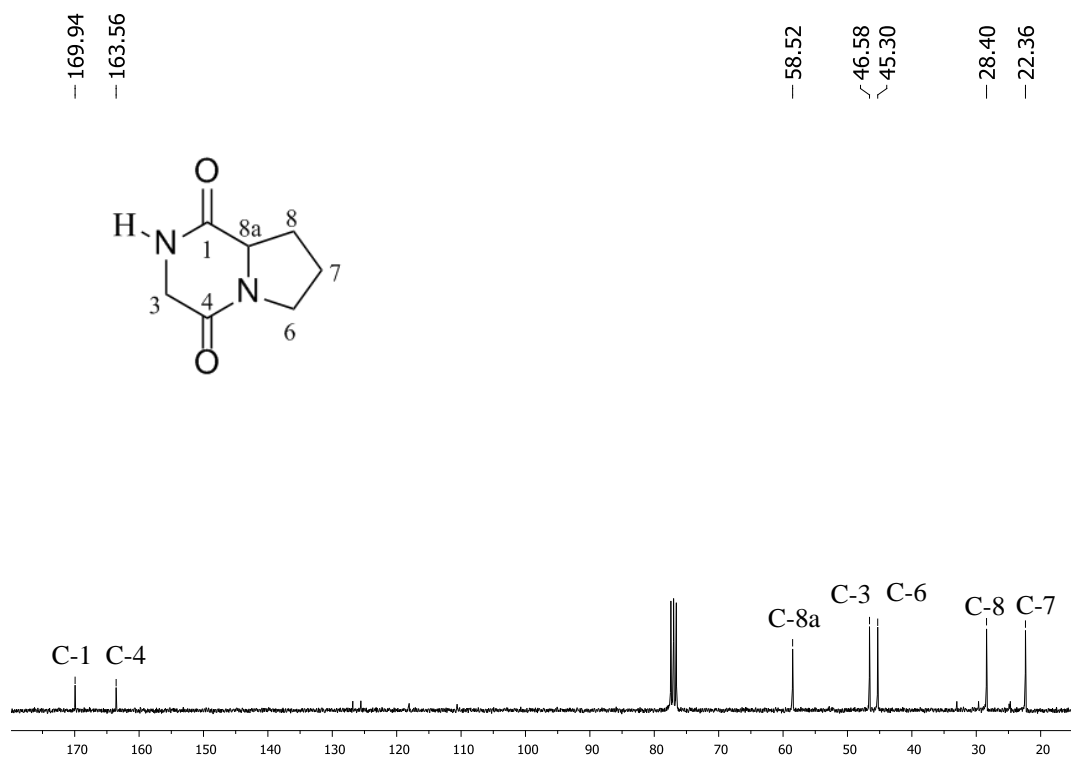


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da ciclogliciprolina (**3**).

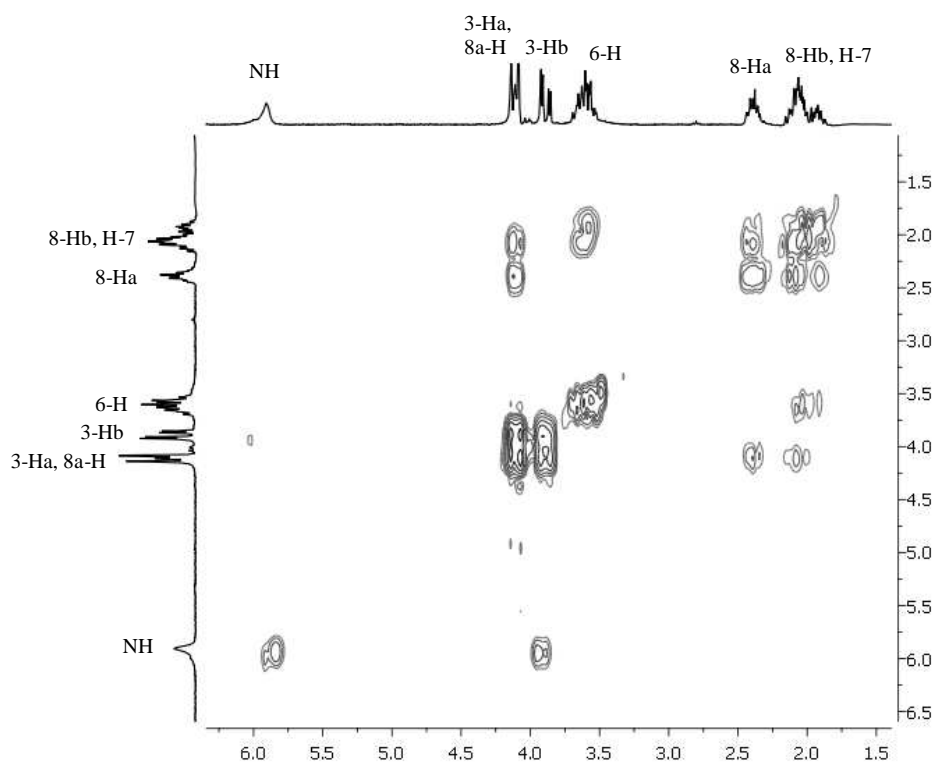


Figura 22. Mapa de contornos de ^1H - ^1H COSY (300 MHz; CDCl_3) da ciclogliciprolina (**3**).

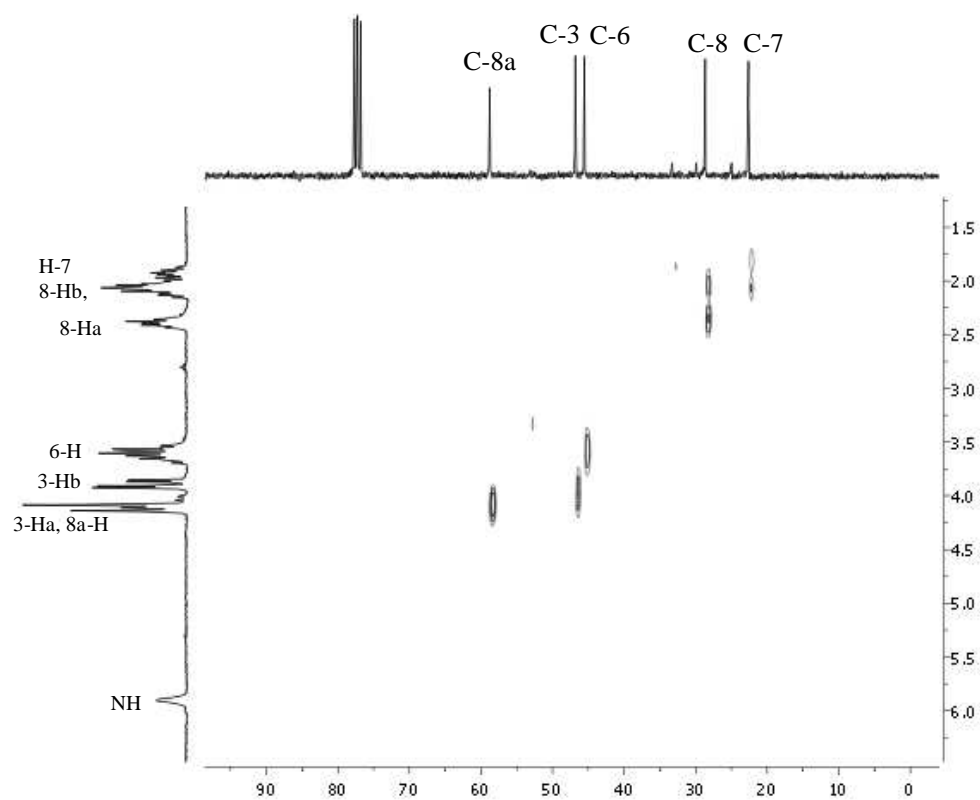


Figura 23. Mapa de contornos de ^1H - ^{13}C HETCOR (75 MHz; CDCl_3) da cicloglicilprolina (**3**).

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho teve como objetivo o isolamento e identificação de compostos fitotóxicos produzidos por *Alternaria euphorbiicola*. Este fungo foi isolado de tecidos severamente infectados de *Euphorbia heterophylla*, uma das plantas daninhas tropicais mais nocivas à agricultura brasileira e responsável por grandes prejuízos em importantes culturas como a soja, o milho, o feijão e o algodão.

Os estudos iniciais mostraram que o fungo é capaz de produzir e secretar metabólitos fitotóxicos quando cultivado em meio de cultura líquido e que a fitotoxicidade dos filtrados de cultura é influenciada pela composição do meio de cultura pelas condições de cultivo utilizadas. Os resultados mostraram que a produção in vitro de fitotoxinas pelo fungo está diretamente condicionada por fatores nutricionais. Ainda, o cultivo sob agitação e na ausência de luz favorece a produção de metabólitos fitotóxicos pelo fungo. O filtrado da cultura em meio de Jenkins-Prior modificado, crescida sob agitação, no escuro e a 28 °C apresentou a maior atividade fitotóxica, tendo inibido em 100 % a germinação de sementes e produzido extensas necroses foliares e desfolha em *E. heterophylla*. Este filtrado de cultura foi submetido a sucessivas etapas de fracionamento e levou à caracterização de uma fração constituída majoritariamente por ácidos graxos. Na concentração de 1 mg mL⁻¹, a fração causou lesões de despigmentação com diâmetro médio de 3,5 cm sobre folhas puncturadas de *E. heterophylla*. O fracionamento do filtrado de cultura em meio de Jenkins-Prior levou também ao isolamento e identificação do metabólito fitotóxico denominado tirosol. O fracionamento guiado por bioensaios de filtrados de cultura de *A. euphorbiicola* em meio de Fries, cultivado estaticamente, a 28 °C e na

ausência de luz levou ao isolamento de três metabólitos identificados como anidromevalonolactona, (R)-(-)-mevalonolactona e cicloglicilprolina.

As atividades fitotóxicas dos compostos isolados foram avaliadas em ensaios sobre folhas puncturadas utilizando diferentes espécies de plantas. Todos os compostos apresentaram atividade fitotóxica contra *E. heterophylla*. Na concentração de 3 mg mL⁻¹, (R)-(-)-mevalonolactona e anidromevalonolactona foram capazes de produzir halos de despigmentação com 2,8 mm e 3,1 mm de diâmetro. Na mesma concentração, cicloglicilprolina produziu lesões necróticas com 4,2 mm de diâmetro em média. O presente trabalho constitui o primeiro relato da atividade fitotóxica da cicloglicilprolina, bem como da (R)-(-)-mevalonolactona e da anidromevalonolactona.

A atividade fitotóxica do tirosol contra *E. heterophylla* foi demonstrada através de ensaios sobre folhas puncturadas. A menor concentração de tirosol capaz de produzir lesões de despigmentação (1,8 mm de diâmetro) em *E. heterophylla* foi de 1 mM. Nas concentrações de 40 e 100 mM, as lesões atingiram um diâmetro médio de 4,7 e 10,4 mm de diâmetro, respectivamente. Os mesmos efeitos foram observados quando aplicado sobre folhas de biótipo de *E. heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. Os efeitos de tirosol sobre *E. heterophylla* foram avaliados também através de ensaios por aspersão. Soluções aquosas de tirosol a partir de 40 mM, contendo adjuvante surfactante comumente empregado em formulações herbicidas, foram capazes de causar sintomas observáveis em menos de 24 horas após aplicação, resultando em queima e morte total das plantas 7 dias após aplicação.

Ensaio com punctura de folhas foram também utilizados para investigar os efeitos de tirosol sobre diferentes espécies de plantas daninhas e cultiváveis. Mesmo

em concentrações tão elevadas quanto 100 mM, tirosol produziu pouco ou nenhum efeito sobre soja e milho, duas das mais importantes culturas impactadas por *E. heterophylla*. Dentre as diferentes espécies daninhas utilizadas, apenas *Desmodium tortuosum* (outra planta daninha responsável por grandes prejuízos à cultura da soja e também reconhecida como hospedeira de *A. euphorbiicola*) apresentou sensibilidade ao composto, desenvolvendo lesões cloróticas que atingiram toda a superfície das folhas.

Como o amarelecimento e a necrose de folhas constituem os primeiros sintomas observados após a inoculação de *A. euphorbiicola* em *E. heterophylla*, os resultados do presente trabalho sugerem a participação conjunta dos compostos identificados nos estágios iniciais do processo de invasão de tecidos da planta pelo fungo. Os resultados mostraram, ainda, que o tirosol apresenta atividade fitotóxica seletiva contra plantas hospedeiras do fungo que constituem espécies daninhas responsáveis por grandes prejuízos agrícolas, indicando que esse composto pode constituir-se um ponto de partida promissor para a síntese de análogos com atividade herbicida para o controle de importantes plantas daninhas.