

ATIVIDADE FUNGISTÁTICA DE CHALCONAS A FITOPATÓGENOS A CULTIVOS AMAZÔNICOS

Heriberto Rodrigues Bitencourt¹ (eriberto@ufpa.br), Jaqueline R. Verzignassi² (jaque@cpatu.embrapa.br), Antonio Pedro Souza Filho² (apedro@cpatu.embrapa.br), Lourivaldo da Silva Santos¹ (lss@ufpa.br).

1. Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, Rua Augusto Côrrea, 01, 66075-110, CP. 479 Belém – PA

2. Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Enéas Pinheiro, S/N, CEP 66095-100 Belém - PA

INTRODUÇÃO

A maioria das chalconas e seus derivados apresentam atividades biológicas. A molécula 4'-etóxi-2'-hidróxi-4,6'-di-metóxi-chalcona, por exemplo, é ativa contra cepas de rinovírus (associadas a resfriados) (Ishitsuka et al., 1982a). Tal chalcona foi obtida após modificações moleculares na estrutura química da flavona 4',5-di-hidróxi-3,3',7-tri-metóxi-flavona, isolada da planta agastache (*Agastache rugosa* Kuntze), que apresenta potente atividade contra o picornavírus (Ishitsuka et al., 1982b). Já, a chalcona 2',4'-di-hidróxi-6-metóxi-chalcona, isolada da planta *Boesenberg rotuda* (L.) (Zingiberaceae), possui a capacidade de inibir a protease NS3 do vírus da dengue (DEN-2) (Kia et al., 2006). De chalconas isoladas de *Millettia leucantha* (Leguminosae) foi relatada atividade moderada contra o vírus da herpes simples. A inibição da replicação de HIV-1 em linfócitos-H9 de camundongos foi obtida com as moléculas 2-metóxi-3-metil-4,6-di-hidróxi-5-(3'-hidróxi)-cinamoil-benzaldeído (Wu et al., 2003) e 2-hidróxi-3-metóxi-chalcona (Deng et al., 2006). Lall et al. (2006) relatam a atividade de chalconas contra o vírus influenza (Infl A). A estes compostos são também relatadas ação antagonista a fungos dermatófitos (López et al., 2001), proteção das células do trato gastroduodenal, bem como atividade antimetabólica (Edwards et al., 1990) e atividade anti-plaquetária (2',4',6'-tri-hidróxi-chalcona).

OBJETIVO

Avaliar o efeito fungistático *in vitro* de duas moléculas do tipo chalcona em quatro fungos fitopatogênicos a cultivos amazônicos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Síntese e caracterização das chalconas

As substâncias sintéticas, sob protocolo 17 (2,6-bis-(2-metóxi-benzilideno)-ciclo-hexa-1-ona) e 28 (2,4'-di-metóxi-chalcona), foram obtidas pela reação de condensação entre cetonas (ciclohexanona e 4-metóxi-acetofenona, respectivamente) e ortoanisalaldeído, utilizando-se a metodologia descrita por Hathaway (1987). Para tanto, 15 mL de etanol PA, 1 mL de cetona PA, 15 mL de solução NaOH (10%) e 1,5 mL de ortoanisalaldeído foram misturados em balão de fundo chato e boca esmerilhada e mantido sob agitação magnética (50 °C/40 min.). Após, a solução foi resfriada (-15°C) por 24 horas. O produto reacional (sólido-17 ou viscoso-28) foi filtrado ou decantado e lavado com água destilada para a retirada do excesso de solução NaOH. Ambos os produtos foram obtidos em bom rendimento, 90 e 75%, respectivamente.

Para a identificação das estruturas químicas dos produtos obtidos, utilizou-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono - ¹³C (RMN¹H e ¹³C), a espectroscopia no infravermelho e no ultravioleta e a espectrometria de massas. As referidas estruturas estão esquematizadas na Figura 1.

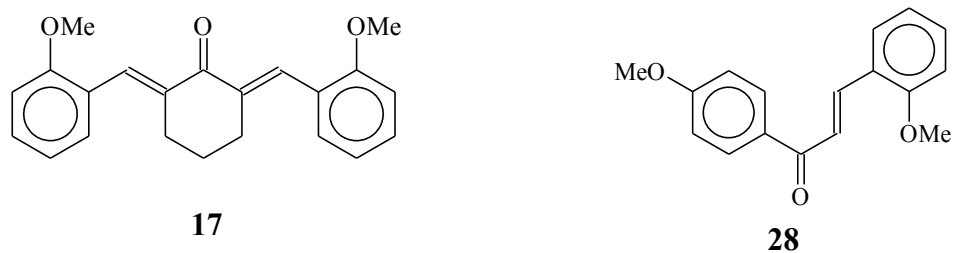


Figura 1 – Estruturas químicas das substâncias 17 e 18.

2. Fitopatógenos

Os fungos *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* e *Crinipellis pernicioso*, patógenos de caupi (*Vigna unguiculata*), noni (*Morinda citrifolia*), pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*) e cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), respectivamente, isolados de plantas sintomáticas no Estado do Pará, foram utilizados para a investigação da atividade das substâncias. Os referidos patógenos causam a mela do caupi, antracnose do noni, murcha amarela da primenteira-do-reino e vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro.

Os patógenos foram multiplicados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e incubados, por cinco dias (26°C/12 horas de luz fluorescente e 12 h de escuro).

3. Tratamentos

Os testes foram efetuados em placas de Petri (9cm de diâmetro) contendo meio de cultura BDA. As substâncias foram adicionadas ao meio de cultura, na concentração de 1000 ppm, antes ou após a autoclavagem (20'/120atm). Para a substância viscosa (28) utilizou-se acetona PA para a diluição após a autoclavagem. Assim, os tratamentos efetuados foram os seguintes:

- 1 – substância 17 adicionada após a autoclavagem do meio (17NA);
- 2 – substância 28 adicionada após a autoclavagem do meio (28NA);
- 3 – substância 17 adicionada antes da autoclavagem do meio (17A);
- 4 – substância 28 adicionada antes da autoclavagem do meio (28A);
- 5 – testemunha – meio de cultura autoclavado (T).

Após a preparação, os discos de cultura (8 mm de diâmetro) dos quatro isolados foram posicionados no centro das placas, sobre o meio. As placas foram, então, mantidas em câmara de incubação tipo BOD (26°C e fotoperíodo de 12h de luz fluorescente e 12 h de escuro) e avaliadas diariamente durante sete dias. Para tanto, o crescimento das culturas foi mensurado (diâmetros opostos) para o cálculo do diâmetro médio das colônias. Ao final do ensaio, avaliou-se a coloração das colônias nos diferentes tratamentos. O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições (cada parcela representado por uma placa) e os dados submetidos à análise de variância e teste de médias (Tukey, 5% de significância).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *R. solani* apresentou rápido crescimento e a testemunha completou a área total da placa ao segundo dia do plaqueamento, ou seja, logo na primeira avaliação. Para a substância 28, adicionada após a autoclavagem, o crescimento médio foi 1,89 cm, apresentando-se como o melhor tratamento, seguido pela mesma substância submetida à autoclavagem (5,66cm) (Figura 2). A chalcona 17 apresentou relativamente baixo efeito fungistático sobre o patógeno e, quando não autoclavada, não diferiu da testemunha, apresentando valores de 8,74 cm e 9 cm, respectivamente. A esterilização do meio de cultura por autoclavagem resultou em perdas das propriedades fungistáticas pela substância 28, demonstrando a sua termosensibilidade. Além do efeito fungistático, foram observadas alterações no aspecto das colônias no que tange à coloração, variando de marrom a marrom escura (Tabela 1).

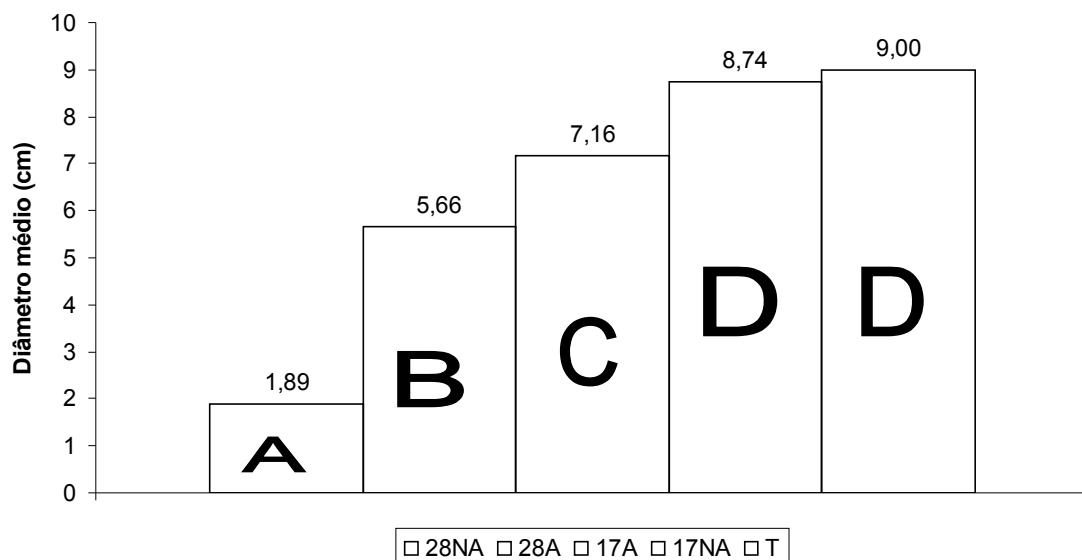


Figura 2 – Diâmetro médio (cm) da colônia de *Rhizoctonia solani* em meio acrescido das chalconas 17 e 28, dois dias após plaqueamento. 17NA: substância 17 adicionada após a autoclavagem do meio; 28NA: substância 28 adicionada após a autoclavagem do meio; 17A: substância 17 adicionada antes da autoclavagem do meio; 28A: substância 28 adicionada antes da autoclavagem do meio; T: testemunha. Média de quatro repetições, compostas por uma placa cada. Tratamentos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. CV: 4,49%.

Os valores de Área Abaixo da Curva do Crescimento da Colônia (AACCC) de *C. gloeosporioides* (Figura 3), indicam que ambas as substâncias apresentaram atividade deletéria ao crescimento micelial do patógeno em relação à testemunha, variando de 24,88 (substância 28) a 33,49 (substância 17). A inibição ao patógeno foi observada em todas as avaliações, porém não foi observada qualquer diferença no aspecto da colônia nos diferentes tratamentos (Tabela 1).

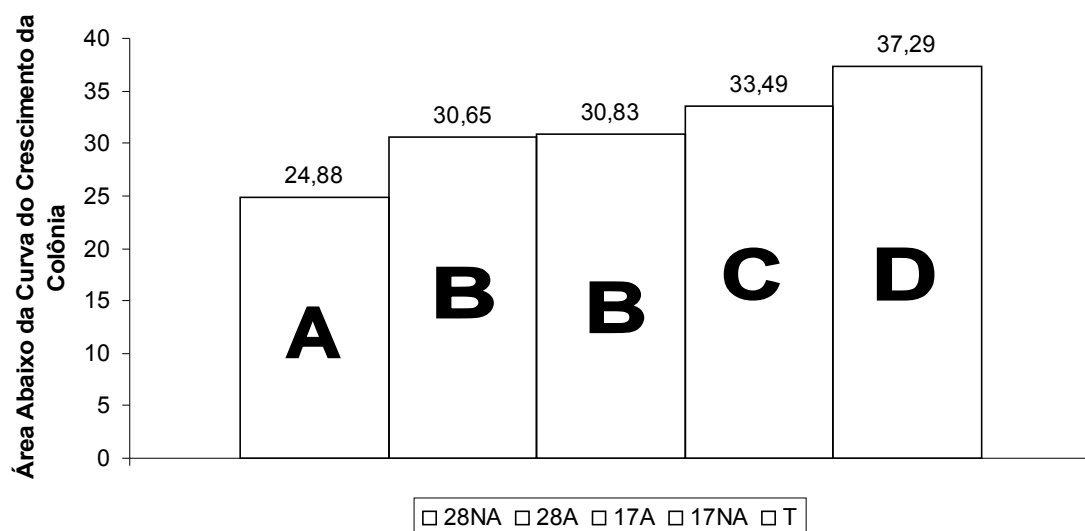


Figura 3 – Área Abaixo da Curva de Crescimento da Colônia de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio acrescido das chalconas 17 e 28. 17NA: substância 17 adicionada após a autoclavagem do meio; 28NA: substância 28 adicionada após a autoclavagem do meio; 17A: substância 17 adicionada antes da autoclavagem do meio; 28A: substância 28 adicionada antes da autoclavagem do meio; T: testemunha. Média de quatro repetições, compostas por uma placa cada. Tratamentos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. CV: 3,23%.

Assim como para o fungo *R. solani* (Figura 2), *F. oxysporum* apresentou sensibilidade apenas ao tratamento em que se utilizou a chalcona 28, adicionada ao meio de cultura após a autoclavagem (Figura 3). Quando autoclavada, a substância não apresentou estabilidade ao calor, não diferindo da testemunha. Com relação às características morfológicas, a substância 28 não autoclavada promoveu a formação de colônias cujo micélio apresentava-se tênue e de coloração menos acentuada que os demais, em especial em relação às substâncias submetidas ao calor (Tabela 1).

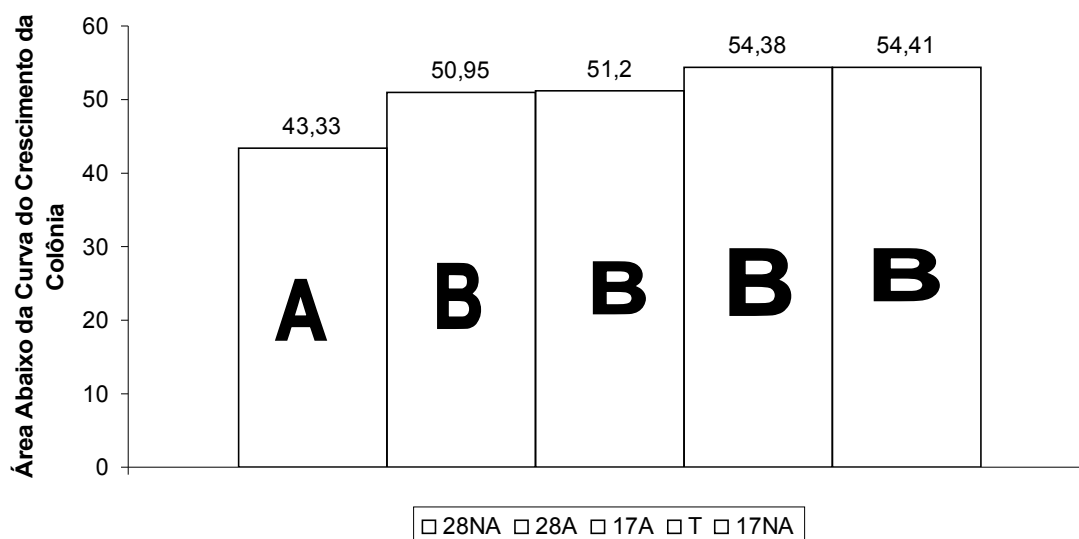


Figura 4 – Área Abaixo da Curva de Crescimento da Colônia de *Fusarium oxysporum* em meio acrescido das chalconas 17 e 28. 17NA: substância 17 adicionada após a autoclavagem do meio; 28NA: substância 28 adicionada após a autoclavagem do meio; 17A: substância 17 adicionada antes da autoclavagem do meio; 28A: substância 28 adicionada antes da autoclavagem do meio; T: testemunha. Média de quatro repetições, compostas por uma placa cada. Tratamentos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. CV: 4,39%.

Crinipellis pernicioso, analogamente aos fungos *R. solani* e *F. oxysporum*, apresentou-se altamente sensível à chalcona 28, quando não submetida à esterilização por calor. No entanto, o aspecto cultural das colônias não diferiu nos tratamentos, apresentando a coloração branca e a textura cotonosa (Tabela 1).

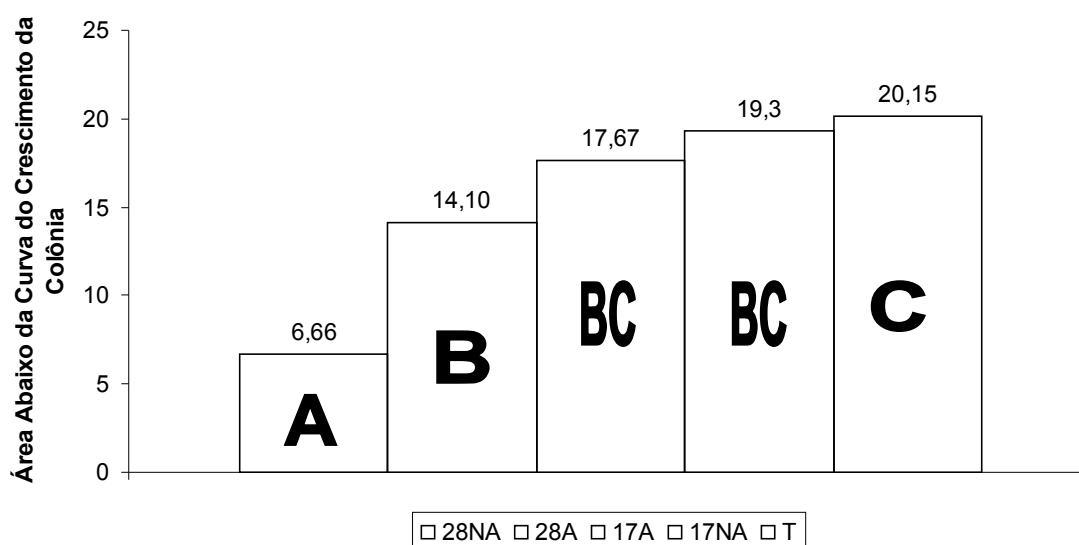


Figura 5 – Área Abaixo da Curva de Crescimento da Colônia de *Crinipellis pernicioso* em meio acrescido das chalconas 17 e 28. 17NA: substância 17 adicionada após a autoclavagem do meio; 28NA: substância 28 adicionada após a autoclavagem do meio; 17A: substância 17 adicionada antes da autoclavagem do meio; 28A: substância 28 adicionada antes da autoclavagem do meio; T: testemunha. Média de quatro repetições, compostas por uma placa cada. Tratamentos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. CV: 15,54%.

Tabela 1 – Aspecto das colônias fúngicas nos diferentes tratamentos, sete dias após a instalação do ensaio.

Tratamento ¹	Fungo			
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Crinipellis pernicioso</i>
17NA	Marrom clara ²		Rosa, esparso	
28NA	Marrom		Rosa, muito esparso	
17A	Marrom clara	Branca acinzentada	Rosa tendendo a violeta, cotonoso	Branco, cotonoso
28A	Marrom		Rosa, esparso	
Testemunha	Marrom escura		Violeta, cotonoso	

¹ 17NA: substância 17 adicionada após a autoclavagem do meio.

28NA: substância 28 adicionada após a autoclavagem do meio.

17A: substância 17 adicionada antes da autoclavagem do meio.

28A: substância 28 adicionada antes da autoclavagem do meio.

² Média de quatro repetições, compostas por uma placa cada.

Conforme os resultados apresentados, a substância 17 não demonstrou potencial para o controle dos fitopatógenos. Já, a substância 28, principalmente quando não submetida ao calor intenso, apresentou atividades fungistáticas significativas, bem como alterações morfológicas nas colônias.

A variável estudada (crescimento micelial) mostrou-se bastante aplicável no que tange à triagem inicial (“screening”) de substâncias com potencial para o controle de fitodoenças.

O efeito de diferentes concentrações da substância no controle dos patógenos *in vitro*, a atuação dessas substâncias na produção de inóculo e na reprodução do patógeno, bem como na capacidade infectiva, na formação de estruturas de resistência e na persistência do efeito antagonista da substância, constituem, entre outros, pontos importantes a investigar.

Da mesma forma, testes de eficiência *in vivo* (antes e após o estabelecimento da doença); persistência na planta (efeito residual); aspectos relativos à fitotoxicidade; estudo da estabilidade da molécula quando em formulações; a persistência do produto no campo; residuais nos alimentos tratados; toxicidade ao ser humano e danos ao ambiente também são aspectos importantes a estudar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) DENG, J.; KELLEY, J.A.; BARCHI, J.J.; SANCHEZ, T.; DAYAM, R.; POMMIER, Y.; NEAMATI, N. Mining the NCI antiviral compounds for HIV-1 integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.3785-3792. 2006.
- 2) EDWARDS, M.L.; STEMERICK, D.M.; SUNKARA, P.S. Chalcones: a new class of antimetabolic agents. **J. Med. Chem.**, v.33, p.1948-1954. 1990.
- 3) HATHAWAY, B.A. An aldol Condensation Experiment Using a Number of Aldehydes and Ketones. **J. Chem. Education**, v.64, n.4, p.367-368. 1987.

- 4) ISHITSUKA, H.; NINOMIYA, Y.T.; OHSAWA, C.; FUJIU, M.; SUHARA, Y. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v.22, n.4, p.617-621. 1982a.
- 5) ISHITSUKA, H.; OHSAWA, C.; OHIWA, T.; UMEDA, I.; SUHARA, Y. Anti picorna virus flavone Ro 09-0179. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v.22, n.4, p.611-616. 1982b.
- 6) KIA, T.S.; POPPEN, R.; YUSOF, R.; IBRAHIM, H.; KHALID, N.; RAHMAN, N. A. Inhibitory activity of ciclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of figerrot, *Boesenbergia rotuda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p.3337-3340. 2006.
- 7) LALL, N.; HUSSEIN, A.A.; MEYER, J.J.M. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents. **Fitoterapia**, v.77, p.230-232. 2006.
- 8) LÓPEZ, S.N.; CASTELLI, M.V.; ZACCHINO, S.A.; DOMINGUEZ, J.N.; LOBO, G.; CHARRIS-CHARRIS, J.; CORTÉS, J.C.G.; RIBAS, J.C.; DEVIA, C.; RODRIGUEZ, A.M.; ENRIZ, R.D. In vitro antifungal evaluation and struture-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analougues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorg. Med. Chem.**, v.9, p.1999-2013. 2001.
- 9)WU, J.-H.; WANG, X.H.; YI, Y.H.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV Chalcones and Flavonoids Genus Desmos. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p.1813-1815. 2003.