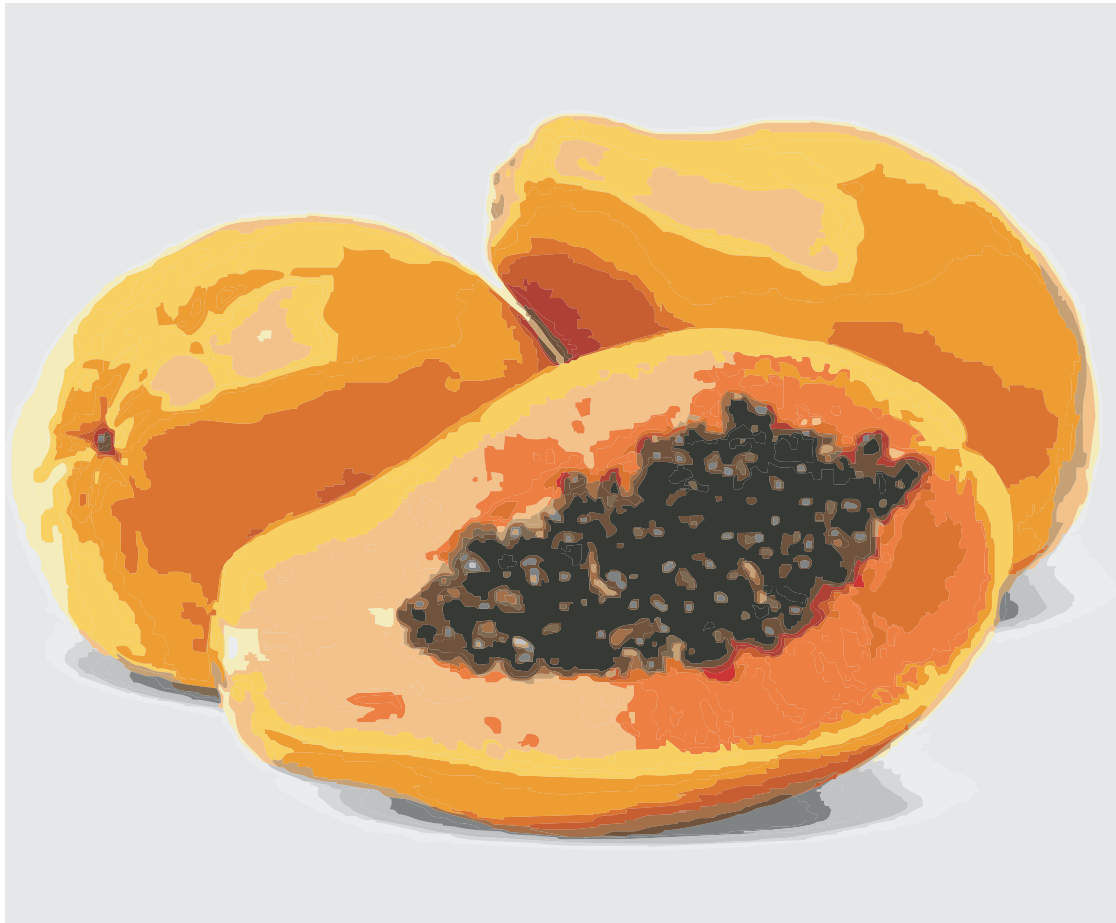


**Teste de Inibição da Enzima
Acetilcolinesterase de
Compostos Organofosforados
com Potencial Ação Fungicida
na Cultura de Mamão (*Carica
papaya* L.)**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 107

**Teste de inibição da enzima
acetilcolinesterase de compostos
organofosforados com potencial ação
fungicida na cultura de mamão (*Carica
papaya* L.)**

Henriqueta Talita Guimarães Barboza
Antonio Gomes Soares
Marcos José de Oliveira Fonseca
João Batista Neves da Costa
Maria Inês de Moura Sarquis

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Rio de Janeiro, RJ
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Americas, 29501 - Guaratiba.
Rio de Janeiro, RJ - Brasil - CEP 23020-470
Fone: (21) 3622-9600
Fax: (21) 3622-9713
<http://www.ctaa.embrapa.br>
sac@ctaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela de Grandi Castro Freitas,
Luciana Sampaio de Araújo, Marcos Jose de Oliveira Fonseca, Marília Penteado
Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan

Supervisão editorial: Virgínia Martins da Matta
Revisão de texto: Edson Watanabe
Normalização bibliográfica: Luciana Sampaio de Araújo
Tratamento de ilustrações: Marcos Moulin e Andre Luis do Nascimento Gomes
Editoração eletrônica: Marcos Moulin e Andre Luis do Nascimento Gomes
Ilustração da capa: Andre Luis do Nascimento Gomes

1ª edição

1ª impressão (ano): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria de Alimentos**

Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase de compostos organofosforados com potencial ação fungicida na cultura de mamão (*Carica papaya* L.) / Henriqueta Talita Guimarães Barboza... [et al.]. — Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010.
X p. ; 21 cm. — (Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 1516-8247 ; 107).

1. Acetilcolinesterase. 2. Composto organofosforado. 3. Pesticida. 4. Mamão. I. Barboza, Henriqueta Talita Guimarães. II. Soares, Antonio Gomes III. Fonseca, Marcos José de Oliveira. IV. Dacosta, João Batista. V. Sarquis, Maria Inês de Moura. VI. Série.

CDD 547.758 (21. ed.)

Autores

Henriqueta Talita Guimarães Barboza

Química, M.Sc. em Química Orgânica, Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, htalita@ctaa.embrapa.br

Antonio Gomes Soares

Químico, D.Sc. em Ciência de Alimentos, Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, agomes@ctaa.embrapa.br

Marcos José de Oliveira Fonseca

Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Produção Vegetal, Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, mfonseca@ctaa.embrapa.br

João Batista Neves da Costa

Químico, D.Sc. em Química, Professor da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, dacosta@ufrj.br

Maria Inês de Moura Sarquis

Bióloga, D.Sc. em Biologia Parasitária, Pesquisadora associada da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, isarquis@ioc.fiocruz.br

Apresentação

O ataque por microrganismos, tais como fungos e bactérias, é provavelmente uma das causas mais sérias de perdas pós-colheitas de produtos perecíveis. Em frutos de mamão, esses fitopatógenos causam perdas consideráveis, podendo atingir 75% na fase de comercialização.

A utilização de agrotóxicos organoclorados para o controle de pragas foi gradativamente substituída por compostos organofosforados, por serem mais biodegradáveis, terem menor tempo de residência no meio ambiente e não serem inibidores da enzima acetilcolinesterase, enzima muito utilizada como parâmetro para avaliar a toxicidade de pesticidas e herbicidas, pois pode causar, eventualmente, a morte por falência respiratória.

Diferentes hidrazonas vêm sendo sintetizadas para diversas aplicações, desde pesticidas no ramo agrícola e antioxidantes no setor industrial, até a aplicação na medicina.

A busca por compostos que minimizem os danos à saúde do homem e ao meio ambiente é necessária, principalmente quando há um cenário onde a aplicação de agrotóxicos é realizada, muitas vezes, de forma incorreta, sem utilização de equipamentos de proteção individual e em doses acima do necessário.

O presente documento trata da síntese de novas dialquilfosforilidrazonas, que são hidrazonas com potencial ação fungicida para controle de podridões pós-colheita em mamão, e destina-se a agricultores e profissionais de *packing house*.

Regina Celi Araujo Lago

Chefe Geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Sumário

Introdução	09
Material e Métodos	11
Preparo das Soluções e Inoculação dos Fungos	11
Teste de Inibição para Enzima Acetilcolinesterase	12
Ensaio em Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	13
Resultados e Discussão	14
Avaliação da Inibição da Acetilcolinesterase	18
Conclusão	19
Referências	20

Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase de compostos organofosforados com potencial ação fungicida na cultura de mamão (*Carica papaya* L.)

Henriqueta Talita Guimarães Barboza

Antonio Gomes Soares

Marcos José de Oliveira Fonseca

João Batista Neves da Costa

Maria Inês de Moura Sarquis

Introdução

O ataque por microrganismos tais como fungos, bactérias e, em menor extensão, vírus, é provavelmente uma das causas mais sérias de perdas pós-colheitas dos produtos perecíveis (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Em frutos de mamão, esses fitopatógenos causam consideráveis perdas pós-colheita, podendo atingir 75% na fase de comercialização do mamão (PAULL et al., 1997), estando associadas a efeitos físicos ou danos mecânicos, a causas de origem fisiológica e bioquímica e a ação de agentes microbianos (DANTAS et al., 2003).

Doenças fúngicas podem provocar a podridão interna dos frutos e são prevenidas com a aplicação de fungicidas, com tratamentos que se iniciam na época da floração dos frutos e durante o período de armazenamento e maturação (FAY et al., 2005).

A antracnose constitui-se na mais importante doença incidente sobre frutos maduros em regiões produtoras do mundo. Sendo um problema tanto em frutos não refrigerados para o comércio interno, como em frutos refrigerados para exportação, gera grande prejuízo econômico, pois os frutos atacados pela antracnose tornam-se inviáveis para a comercialização e consumo (DICKMAM, 1994).

As podridões pedunculares ocorrem quando a região do pedúnculo é afetada e nela ocorre o sintoma da podridão. Essas podridões são atribuídas a fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium* e *Phoma*, entre outros. Outras doenças, como a podridão causada pelo fungo *Alternaria alternata* pode ser um problema em áreas secas. Os sintomas

são lesões redondas e elipsoidais pretas no fruto seguidas pela podridão dos tecidos subjacentes. Se os mamões forem comercializados poucos dias após a colheita, a podridão por *Alternaria* não é problema. No entanto, quando o armazenamento refrigerado é utilizado para aumentar a vida pós-colheita do fruto, este se torna muito mais susceptível ao ataque (ALVAREZ; NISHIJIMA, 1987).

A podridão causada pelo fungo *Fusarium* sp. foi relatada em Israel, Índia, Filipinas e Havaí. Várias espécies podem causar essa perda, dentre elas o *Fusarium solani* (Mart.) Saac. Tanto os frutos novos quanto os fisiologicamente maduros são resistentes à infecção, desde que o fruto não apresente injúrias.

Os danos causados ao organismo humano pelos organofosforados estão ligados aos sistemas nervosos autônomo, simpático e central. A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor descoberto. É uma amina produzida no citoplasma das terminações nervosas. Sua precursora é uma vitamina pertencente ao complexo B, a colina que é obtida a partir da alimentação ou da própria degradação da acetilcolina por uma enzima específica (acetilcolinesterase). A acetilcolina é o mediador químico necessário para a transmissão do impulso nervoso nas fibras pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo (SNA), nas fibras parassimpáticas pós-ganglionares e algumas do sistema nervoso simpático, na junção neuromuscular e em algumas sinapses interneuronais do sistema nervoso central (SNC). Porém, essa transmissão tem que ser controlada, tendo a acetilcolinesterase um papel fundamental neste controle, pois impede o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, impedindo assim a hiperestimulação dos receptores da acetilcolina. Dessa forma, essa enzima é capaz de modular a intensidade da resposta sináptica (GOODMAN; GILMAN, 1996). A toxicidade provocada pelos organofosforados deve-se essencialmente a inibição da enzima acetilcolinesterase (síndrome colinérgica) sendo esta a ação mais relevante e que trás as consequências mais nefastas para o organismo. A síndrome colinérgica deve-se a uma estimulação excessiva dos receptores da acetilcolina.

Os organofosforados possuem vasta gama de aplicações, dentre as quais pode ser destacada a ação como pesticidas (inseticidas, acaricidas, herbicidas, nematocidas e fungicidas). Porém, aquela que têm despertado nos últimos anos interesse maior na química dos compostos de fósforo é a ação farmacológica, onde os compostos organofosforados possuem atividade anticolinesterásica, antiglaucoma, antiblastoma, neurotrópica, anti-helmíntica, antiviral, antiarteroesclerose, antialérgica, antibacteriana, analgésica, antiartrite, anti-hipoglicêmica, além de gerar compostos para o

tratamento e profilaxia de doenças cardiovasculares, com ação contra anemias, tendo ainda os compostos de fósforo, que são classificados como vitaminas e análogos a essas (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005; SANTOS et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi testar o potencial da atividade fungicida de compostos organofosforados sintetizados previamente e observar se os compostos sintetizados inibem a enzima acetilcolinesterase.

Material e Métodos

Os compostos organofosforados (dialquilfosforidrazonas) são inéditos e foram obtidos através de reação química. Foram sintetizados os seguintes compostos: 5A, 5B, 6A, 6B, 6C, 6D, 7A, 8A, 8B, 8C, 8D e 8E como descrito por Barboza, Soares e DaCosta (2009).

Foram realizados testes *in vitro* para avaliar, o efeito fungistático dos compostos organofosforados obtidos quando utilizados contra fitopatógenos *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium solani*, *Fusarium sp.*, comumente encontrados na pós-colheita do mamão em comparação com o produto comercial Sportak® 450 EC, que tem como princípio ativo o procloraz (C₁₅H₁₆Cl₃N₃O₂) utilizado com a concentração de 367 mg.L⁻¹.

Para avaliar o desenvolvimento fúngico, foram utilizadas placas de Petri contendo os fungos *Fusarium sp.*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum sp.*, *Alternaria sp.*, adquiridos na micoteca da Fundação Oswaldo Cruz. O meio de cultura utilizado foi o Ágar Sabouraud glicose 4% que é recomendado para o cultivo, isolamento e identificação de fungos patogênicos e leveduras.

Preparo das soluções e Inoculação dos fungos.

O estudo foi realizado incorporando-se os compostos ao meio de cultura, adotando-se a técnica descrita por Edgington, Khew e Barron (1971), modificada por Menten et al. (1976). A técnica consiste em dissolver a amostra em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo-se uma solução de 50.000 mg.L⁻¹ da amostra. A partir da solução procedeu-se à diluição, de tal maneira a obter a concentração final de 500 mg.L⁻¹ da amostra no meio Ágar Sabouraud glicose 4%.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 12 tratamentos e 5 repetições. Os tratamentos foram constituídos pelos compostos sintetizadas com concentração de 500 mg.L⁻¹, o fungicida comercial Sportak® na concentração de 337 mg.L⁻¹ como Controle positivo, o Branco contendo 1,0% de DMSO e o Controle negativo constituído somente pelo meio de cultura.

O estudo foi constituído por placas identificadas como Controle negativo, Branco, compostos e Controle positivo. Cada tratamento foi constituído por cinco repetições. A diluição dos tratamentos no meio de cultura foi realizada alguns instantes antes de serem vertidos nos meios de cultura e posteriormente sobre as placas de petri de 9 cm de diâmetro. O meio de cultura foi previamente preparado (Ágar Sabouraud glicose 4%) e somente após estar a uma temperatura próxima a 60 °C, os tratamentos foram adicionados, homogeneizados e então vertidos nas placas de petri correspondentes.

As soluções foram preparadas com concentração de 50.000 mg.L⁻¹ de cada substância sintetizada, em DMSO. Foram adicionados 3 mL dessa solução a 300 mL de meio de cultura Ágar Sabouraud glicose 4% obtendo-se uma concentração final da substância testada de 500 mg.L⁻¹. Este meio de cultura foi distribuído em 15 placas. Destas, cinco placas foram inoculadas com um disco de micélio de cada fungo estudado (Figura 1).

Fotos: Henriqueta Talita



Figura 1. Inoculação dos fungos nas placas de petri.

Teste de inibição para enzima acetilcolinesterase.

O Branco foi elaborado substituindo a substância sintetizada por DMSO, para isto, adicionou-se 3,0 mL de DMSO a 300 mL de meio de cultura Ágar Sabouraud glicose 4%, obtendo concentração final de 1,0%.

Utilizou-se o fungicida comercial para o Controle positivo que recebeu o mesmo tratamento substituindo a substância sintetizada por Sportak[®] (Procloraz) 450g.L⁻¹. Para isto, adicionou-se 225 mL da substância a 300 mL de meio de cultura Ágar Sabouraud glicose 4%, obtendo uma concentração final de 337 mg.L⁻¹. O Controle negativo foi o meio de cultura sem adição de nenhum tratamento. Todas as placas foram lacradas com filme plástico e acondicionadas a 25 °C ± 1°C.

Doze compostos foram avaliados em três semanas, distribuídos da seguinte forma: 1.^a semana - Controle negativo, Branco, Controle positivo e 4 compostos; 2.^a semana - Controle negativo, Branco, Controle positivo e 5 compostos e 3.^a semana - Controle negativo, Branco, Controle positivo e 3 compostos.

Devido à insolubilidade dos compostos em água, somente os compostos incolores puderam ser analisados, uma vez que a metodologia utilizada envolve alteração de cor, variando da coloração amarelada, quando não há inibição da enzima a incolor, quando há inibição da enzima.

Ensaio em cromatografia de camada delgada (CCD).

As seguintes soluções foram preparadas:

(1) 50mM Tris/HCl pH 8; (2) 50mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) fração V; (3) 1,0mM de ácido 5,5-ditiobis-[2-nitrobenzoíco] (DTNB ou reagente de Ellman), (4) 1,0mM de iodeto deacetilcolina (ACTI); (5) 0.22U/mL da acetilcolinesterase.

A enzima acetilcolinesterase liofilizada foi dissolvida na solução tampão (1) para fazer solução estoque 1000 U/mL, deixando-se em solução por 20 min., depois sob agitação por mais um período de 10-15 min. para obtenção de uma solução homogênea. Para as diluições posteriores, utilizou-se a solução tampão (2) (TREVISAN et al., 2003).

Aplicou-se os compostos (concentração 1,5 - 2,5 iL) em CCD, DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck. Pulverizou-se a placa com as soluções (3) + (4), deixando 3 min. (Figura 2).

Fotos: Henriqueta Talita

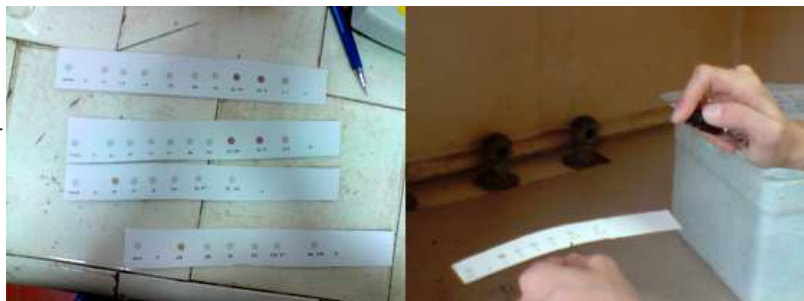


Figura 2. Aplicação dos compostos, do solvente e do padrão, seguido do borrifado da placa com as soluções (3) + (4).

Após secar, borrifou-se a enzima 3U/mL e em 10 min. apareceu a coloração amarela, porém onde houve inibição da enzima, observou-se um halo branco (RHEE et al., 2001). Em 20 - 30 min. a coloração desapareceu.

Resultados e Discussão

Verifica-se que o composto 6B apresentou maior inibição do crescimento de para o fungo *Alternaria* sp., 62,1% ($p < 0,001$), quando comparado com o controle negativo. A inibição do solvente DMSO nesta semana foi de 25,6%. Sandskär e Magalhães (1994) relataram toxicidade do DMSO sobre fungos, todavia este fato parece ser dependente da concentração. O composto 8C promoveu 49,2% de inibição em relação ao controle negativo. Observou-se que a contribuição do DMSO como inibidor é de somente 6,5%. O composto 8D obteve uma inibição aproximada de 41,0% ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo. Novamente verificou-se uma baixa contribuição do solvente DMSO na inibição, em torno de 8,1%. Rand-luby et al. (1996) relataram que, devido à intensa capacidade de penetração do DMSO, muitas substâncias, quando associadas à ele, podem ser carregadas através das membranas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Inibição de crescimento fúngico com os fungos testados.

Substância	<i>Alternaria</i> sp. (% de inibição)	<i>Colletotrichum</i> sp. (% de inibição)	<i>Fusarium</i> sp. (% de inibição)	<i>Fusarium solani</i> (% de inibição)
Branco	25,6	26,7	0	0,4
6 A	43,1	42,2	1,7	20,1
6 B	62,1	66,5	32,0	43,8
7 A	19,9	35,6	9,5	14,8
8 B	34,8	51,7	0	15,7
Branco	6,5	42,6	0	38,5
5 A	23,2	37,8	0	11,8
5 B	32,9	44,2	0	14,9
6 C	26,4	33,2	0	11,8
8 A	22,4	38,1	19,2	34,1
8 C	49,2	63,4	0	39,6
Branco	8,1	18,8	0	0
6 D	16,8	36,1	0	0
8 D	41,0	51,0	0	0
8 E	18,8	43,2	0	0

Resultados em negrito expressam tratamento com maior efeito fungicida; resultados em negrito e itálico expressam 2.º tratamento com maior efeito fungicida e resultados em itálico indicam 3.º tratamento com maior efeito fungicida.

Tabela 2. Crescimento dos fungos por semana.

Tratamentos ¹	<i>Alternaria</i> sp	<i>Colletotrichum</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium solani</i>
	Área (cm ²)	Área (cm ²)	Área (cm ²)	Área (cm ²)
Controle negativo	29,31a	21,49a	16,064a	23,75a
Branco	21,80bc	15,75b	22,234b	23,67a
Controle positivo	0,43f	0,43f	0,43d	0,43d
6 A	16,66d	12,43cd	15,786b	18,98b
6 B	11,12e	7,20e	10,916c	13,34c
7 A	23,47b	13,83bc	14,544b	20,25b
8 B	19,13cd	10,38d	16,496b	20,03b

Tratamentos ²	<i>Alternaria</i> sp	<i>Colletotrichum</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium solani</i>
	Área (cm ²)	Área (cm ²)	Área (cm ²)	Área (cm ²)
Controle negativo	28,64a	24,28a	17,43d	22,46a
Branco	26,78ab	13,93c	17,74d	13,82c
Controle positivo	0,43g	0,43e	0,43f	0,43d
5 A	24,66bc	15,11bc	25,10a	19,82b
5 B	19,20e	13,55c	19,57cd	19,12b
6 C	21,06de	16,21b	23,84ab	19,81b
8 A	22,22cd	15,04bc	14,08e	14,80c
8 C	14,54f	8,90d	21,21bc	13,57c

Tratamentos ³	<i>Alternaria</i> sp	<i>Colletotrichum</i> sp	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium solani</i>
	Área (cm ²)	Área (cm ²)	Área (cm ²)	Área (cm ²)
Controle negativo	25,16a	22,60a	14,15e	19,66c
Branco	23,12ab	18,35b	23,68a	27,26a
Controle positivo	0,43f	0,43f	0,43f	0,43d
6 D	20,92bc	14,45c	19,27bc	24,03b
8 D	14,85e	11,07d	17,46cd	23,96b
8 E	20,43c	12,84cd	19,42b	23,35b

¹ Resultados obtidos na 1.º semana; ² Resultados obtidos na 2.º semana; ³ Resultados obtidos na 3.º semana.

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Fisher a 5% de probabilidade.

Para o fungo *Colletotrichum* sp., o procloraz apresentou maior eficiência, inibindo o crescimento fúngico. Segundo Tavares (2004), o procloraz é recomendado para o tratamento pós-colheita do mamão. Os resultados confirmam a eficiência do ingrediente ativo em baixas concentrações. O procloraz mostrou eficiência no controle do fungo, apresentando uma concentração mínima de inibição (CMI) entre 1-10 mg.L⁻¹. Neste trabalho, a concentração utilizada foi a especificada, de 337 mg.L⁻¹. Segundo Costa et al. (2001), o procloraz é utilizado no controle de doenças de frutas cítricas na pós-colheita, porém, aproximadamente 30% do resíduo encontrado na laranja *in natura* também foi encontrado no suco, indicando níveis residuais altos.

Pode-se observar também que, para *Colletotrichum* sp., o composto 6B obteve resultados de inibição semelhantes ao ocorrido com o fungo do gênero *Alternaria* sp., por volta de 66,5 % (p , 0,001), quando comparado ao controle negativo. A inibição do solvente DMSO na 1.ª semana foi de 26,7%. A extrema capacidade de penetração e difusão do DMSO há muito tempo é motivo de sua inclusão como veículo componente de defensivos agrícolas (ROSENBAUM; HERSCHLER; JACOB, 1965). Ainda para o fungo *Colletotrichum* sp., o composto 8C obteve 63,3% em relação ao controle negativo. A contribuição do DMSO como inibidor foi de 42,6%, muito acima das outras semanas (Tabelas 1 e 2). Silva et al. (2008) observaram que o solvente orgânico DMSO inibiu o crescimento do fungo *Colletotrichum* na concentração de 1%.

Percebe-se que compostos contendo radical menor, como o propil aliado ao enxofre, oriundo do tiofurfural, obteve maior poder de inibição. Mais uma vez, a diferença de inibição do DMSO ocorrida pode sugerir a ocorrência de alguma anormalidade neste tratamento em relação ao fungo do gênero *Colletotrichum* sp., apesar da toxicidade do DMSO ser reconhecidamente baixa, de acordo com Brayton (1986) e Stone (1993).

Os fungos dos gêneros *Fusarium* sp. e *Fusarium solani* tiveram um crescimento maior no tratamento branco em comparação com o tratamento controle negativo (Tabelas 1 e 2).

Observou-se que o composto 6B obteve resultados de inibição de *Fusarium* sp. maior que os demais, porém, com somente 32,0%, quando comparado ao controle negativo. Entretanto, verificou-se que há cerca de 50,8% de inibição quando comparado ao tratamento branco. Já o tratamento contendo o composto 8A apresentou redução de 19,2% em relação ao controle negativo e 20,6% em relação ao branco. Verificou-se que o crescimento do fungo no tratamento branco foi superior ao do tratamento controle negativo. Isto pode ser um indicativo de que o solvente DMSO teve influência no

crescimento do fungo, cerca de 27,7% na 1ª semana e 40,2% na 3ª (Tabelas 1 e 2). Campos et al. (2004) verificaram que o DMSO é um dos reagentes utilizados como crio protetor na conservação de fungos. Observaram também que os discos com 4 mm de diâmetro contendo o fungo *Monacrosporium appendiculatum* crio preservado em DMSO 10% v/v teve menor crescimento quando comparado com água e glicerol.

Os demais compostos não apresentaram efeitos de inibição em relação ao fungo do gênero *Fusarium* sp.. Verificou-se, outrossim, que houve maior crescimento deste fungo do que inibição. O tratamento contendo o composto 5A não inibiu o crescimento deste fungo e sim facilitou o seu crescimento, cerca de 44,0% numa semana cuja contribuição do solvente foi de apenas 1,8% (Tabela 2). De acordo com Furlan et al. (1986), o Carboxin, um fungicida contendo enxofre em sua estrutura, não diferiu significativamente do controle frente ao fungo *Fusarium* sp. O presente trabalho indica que os compostos sintetizados, aparentemente, apresentaram pouco efeito sobre este fungo.

Araujo et al. (2004) ao testarem o efeito biocida dos novos complexos sobre culturas do fungo *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp. e *Fusarium cubense* comprovaram que os ácidos R- (-) e S-(+)-mandélico não mostraram eficácia frente aos mesmos, apresentando baixo poder inibidor do crescimento micelial do fungo.

Para o fungo *Fusarium solani* pode-se observar que o composto 6B obteve resultados de inibição de crescimento fúngico maior que os demais, 43,8%, em comparação ao controle negativo ($p < 0,001$). A contribuição do solvente nas 3 semanas de testes foi completamente diferente. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o tratamento controle negativo na primeira semana. Houve influência na inibição pelo DMSO na segunda semana, em torno de 38,5% e influência no crescimento do fungo em torno de 38,6% na terceira semana (Tabela 2). Na terceira semana, nenhum dos compostos sintetizados e testados apresentou inibição significativa ($p > 0,05$) do crescimento fúngico.

Apesar do composto 8C apresentar 39,6% de inibição, o mesmo não diferiu significativamente do tratamento contendo branco ($p > 0,05$). Portanto, o único composto a apresentar efeito fungicida foi o 6 B (Tabela 1).

Segundo Oliveira et al. (2008), que avaliaram a atividade de extratos orgânicos de folha de *Byrsonima* sp. contra o crescimento micelial de *Fusarium solani*, notou-se que o mesmo foi insensível ao extrato.

Avaliação da inibição da acetilcolinesterase.

Dentre os compostos sintetizados, nenhum inibiu a enzima acetilcolinesterase. Isto pode ser facilmente observado pela não formação do halo branco (Figura 3).

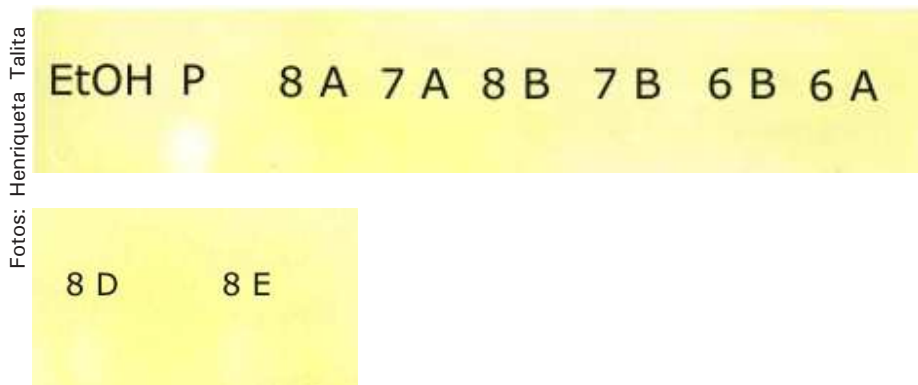


Figura 3. Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Como o composto 6B apresentou inibição para os quatro fungos, o resultado acima é de extrema importância uma vez que este composto além de inibir o crescimento fúngico não inibe a atividade da acetilcolinesterase.

A acetilcolinesterase é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina das sinapses colinérgicas (NIGG; KNAAK, 2000). O acúmulo de acetilcolina no espaço sináptico, por sua vez, pode acarretar no desenvolvimento de uma situação de super-estimulação colinérgica tanto ao nível do sistema nervoso central (SNC) quanto ao nível das junções neuromusculares periféricas (WOREK et al., 2007). Como resultado de uma super-estimulação colinérgica ocorre uma massiva disfunção de inúmeras funções fisiológicas relacionadas à funcionalidade do sistema colinérgico e eventualmente a morte por falência respiratória (EDDLESTON et al., 2006).

A enzima hidrolisa o substrato acetiltiocolina, gerando como produto a tiocolina, que reage com o DTNB ou reagente de Ellman, produzindo 2-nitrobenzoato-5- mercaptotiocolina e o ácido 2-nitro-4-tiobenzóico facilmente identificado pela coloração amarela (Figura 4).

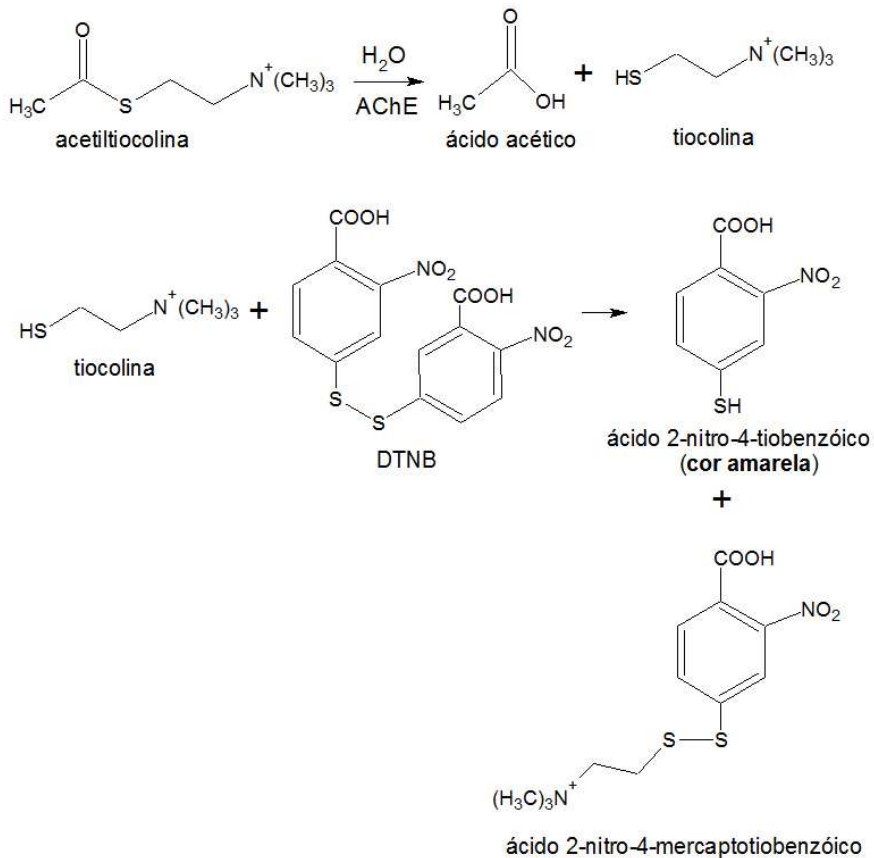


Figura 4. Reação da enzima acetilcolinesterase.

Conclusão

O composto 6B foi o que melhor apresentou atividade fungicida, inibindo o crescimento de todos os fungos testados sendo os resultados mais expressivos em relação aos fungos *Alternaria* sp e *Colletotrichum* sp. com 62,1% e 66,5%, respectivamente. Todas as dialquilfosforidrazonas sintetizadas não inibem a enzima acetilcolinesterase.

Herbicidas organofosforados e carbamatos são inibidores potentes da enzima acetilcolinesterase (AChE), causando hiperestimulação dos receptores de acetilcolina, o que impede a contração muscular normal. Entretanto, os compostos sintetizados não causam esse tipo de dano ao ser humano, uma vez que não provocaram a inibição da enzima.

Referências

ALVAREZ, A. M.; NISHIJIMA, W. T. Postharvest diseases of papaya. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 8, p. 681-686, aug. 1987.

ARAUJO, E. T. de; MELO, W. de C.; GUERREIRO, M.C.; BARBIÉRI, R. S.; ABREU, C. M. P. de. Efeito biocida de mandelatos organoestênicos sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 34-41, jan./fev. 2004.

BARBOZA, H. T. G.; SOARES, A. G.; DACOSTA, J. B. N. **Síntese de compostos organofosforados com potencial ação fungicida na cultura de mamão (Carica papaya L.)**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2009. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado técnico, 157).

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinarian**, v. 76, n. 1, p. 61-90, jan. 1986.

CAMPOS, A. K.; MOTA, M. de A.; ARAÚJO, J. V. de; CECON, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 465-469, mar./abr. 2004.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: UFLA, 2005. 783 p.

COSTA, H.; VENTURA, J. A.; RODRIGUES, C. H.; TATAGIBA, J. S. Ocorrência e patogenicidade de *Glomerella cingulata* em mamão no Norte do Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 328, 2001. (Resumo).

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L. C.; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 5, p. 528-533, set./out. 2003.

DICKMAM, M. B. Papaya diseases caused by fungi: anthracnose. In: PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. (Ed.). **Compendium of tropical fruit diseases**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. p. 58-64.

EDDLESTON, M.; MOHAMED, F.; DAVIES, J. O. J.; EYER, P.; WOREK, F.; SHERIFF, M. H. R.; BUCKLEY, N. A. Respiratory failure in acute organophosphorus pesticide self-poisoning. **QJM: an International Journal of Medicine**, v. 99, n. 8, p. 513-522, 2006.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; GORNI, R.; TATAGIBA, J. da S.; GALVÃO, T. D. L.; MARTINS, D. dos S.; YAMANISHI, O. K.; MEDINA, V. M.; SOUZA, D. C. de; ROSA, M. A.; RODRIGUES, N. R.; RODRIGUES, E. G. R.; TOLEDO, H. H. B. de; BONIFÁCIO, A. Resíduos de Mancozebe e ETU em mamão: efeito do tratamento hidrotérmico pós-colheita. In: MARTINS, D. dos S. (Ed.). **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: Incaper, 2005. p. 620-623.

FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 274-280, 2005.

FURLAN, S.H.; AMARAL, H. M.; MORAES, M. H. D.; BUENO, J. T.; MENTEN, J. O. M. Efeito de quatro fungicidas na incidência de *colletotrichum gossypii* e *fusarium* spp. em sementes de algodão (*gossypium hirsutum* L.) e sua relação com o vigor das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 8, n. 2, p. 67-75, 1986.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996.

MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina Phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

NIGG, H. N.; KNAAK, J. B. Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 163, p. 29-111, 2000.

OLIVEIRA, G. A. P. de; SILVA, M. S.; RABELLO, A. R.; ALVES, R. S.; ESPÍNDOLA, L. S.; PAULA, J. E. de; VIEIRA, E. A.; LIMA, T. R.; ANJOS, J. de R. N. dos. Tecido foliar "Murici" nativo do Cerrado (*Byrsonima*: Família Malphighiaceae) possui princípio antimicrobiano contra crescimento micelial in vitro de fungos patogênicos de soja. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília, DF. **Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**: anais... Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 1 CD-ROM.

PAULL, R. E.; NISHIJIMA, W.; REYES, M.; CAVALETTO, C. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 11, n. 3, p. 165-179, jul. 1997.

RAND-LUBY, L.; POMMIER, R. F.; WILLIAMS, S.T.; WOLTERING, E. A.; SMALL, K. A.; FLETCHER, W. S. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. **Annals of Surgery**, v. 224, n. 4, p. 583-590, 1996.

RHEE, I. K.; MEENT, M. van de; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1-2, p. 217-223, 2001.

ROSENBAUM, E. E.; HERSCHLER, R. J.; JACOB, S. W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal of the American Medical Association**, v. 192, n. 4, p. 309-313, 1965.

SANDSKÄR, B.; MAGALHÃES, B. Cryopreservation of *Zoophthora radicans* (Zygomycetes, Entomophthorales) in liquid nitrogen. **Cryobiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 206-213, 1994.

SANTOS, V. M. R. dos; SANT'ANNA, C. M. R.; BORJA, G. E. M.; CHAABAN, A.; CÔRTEZ, W. S.; DACOSTA, J. B. N. New bisphosphorothioates and bisphosphoroamidates: synthesis, molecular modeling and determination of insecticide and toxicological profile.

Bioorganic Chemistry, v. 35, n. 1, p. 68-81, 2007.

SILVA, M. B.; NICOLI, A.; COSTA, A. S. V.; BRASILEIRO, B. G.; JAMAL, C. M.; SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

STONE, R. W. Clinical updates on the use of dimethyl sulfoxide. **Canine Practice**, v. 18, n. 4, p. 16-19, 1993.

TAVARES, G. M. **Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita**. 2004. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; MEENT, M. van de; RHEE, I. K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase pra tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

WOREK, F.; AURBEK, N.; KOLLER, M.; BECKER, C.; EYER, P.; THIERMANN, H. Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 11, p. 1807-1817, 2007.



Agroindústria de Alimentos

CGPE 8891



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

